



**HAL**  
open science

# Élaboration de dérivés d'ortho-phthalaldéhyde et de nanomatériaux de type Quantum Dots en vue de l'amélioration de l'analyse fluorimétrique des amines biogènes

Clémence Moitessier

► **To cite this version:**

Clémence Moitessier. Élaboration de dérivés d'ortho-phthalaldéhyde et de nanomatériaux de type Quantum Dots en vue de l'amélioration de l'analyse fluorimétrique des amines biogènes. Chimie organique. Université du Littoral Côte d'Opale, 2019. Français. NNT : 2019DUNK0523 . tel-04612971

**HAL Id: tel-04612971**

**<https://theses.hal.science/tel-04612971>**

Submitted on 15 Jun 2024

**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.



## ULCO

École doctorale ED SMRE 104

Unité de recherche UCEiV

Thèse présentée par **Clémence MOITESSIER**

Soutenue le **5 juin 2019**

En vue de l'obtention du grade de docteur de l'ULCO

Discipline **Chimie**

Spécialité **Chimie organique**

# Élaboration de dérivés d'*ortho*-phthalaldéhyde et de nanomatériaux de type Quantum Dots en vue de l'amélioration de l'analyse fluorimétrique des amines biogènes

**Thèse dirigée par** Francine CAZIER-DENNIN Directrice  
Isabelle MALLARD Co-encadrante

### Composition du jury

<i>Rapporteurs</i>	Thierry BESSON François COUDERC	Professeur, Université de Rouen Professeur, Université Toulouse III	Président de jury
<i>Examineurs</i>	Raphaël SCHNEIDER Guillaume DUFLOS Thierry GRARD	Professeur, Université de Lorraine Ingénieur de recherche - HDR, ANSES Professeur, ULCO	
<i>Directrice de thèse</i>	Francine CAZIER-DENNIN	Maître de conférence - HDR, ULCO	

*À Jean-Baptiste,  
À ma famille*

Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées.

---

Congrès Avenir de la Culture (1933)  
Marie Curie

# Avant-propos

Co-financée par le Pôle Métropolitain du Littoral Côte d'Opale (PMCO) et l'Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO), cette thèse a été réalisée au sein de l'Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEiV) dirigée par Dominique COURCOT de l'ULCO. Plus précisément, ces travaux ont été conduits dans l'équipe de Chimie Supramoléculaire (CS).

Dirigé par Francine CAZIER et co-encadré par Isabelle MALLARD, ce travail de thèse a été accompagné par un comité de suivi composé de Chantal COMPÈRE, Chercheur à l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) de PLOUZANÉ, de Guillaume DUFLOS, Chercheur à l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) de BOULOGNE-SUR-MER, de Thierry GRARD, Professeur de l'unité de Biochimie des Produits Aquatiques (BPA) de l'ULCO de BOULOGNE-SUR-MER et de Raphaël SCHNEIDER, Professeur du Laboratoire Réactions et génie des Procédés (LRP) de l'Université de Lorraine.

Ce travail a été valorisé par plusieurs présentations sous forme de communication orale aux Journées Nord Ouest Européennes des Jeunes Chercheurs (JNOEJC) de 2017 et une communication affichée aux JNOEJC de 2016. Ces travaux de recherche ont également été valorisés par une publication scientifique avec comité de lecture de rang A qui sera présentée en fin de ce manuscrit.

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Je voudrais exprimer mes sincères remerciements aux professeurs Thierry BESSON de l'Université de Rouen et François COUDERC de l'Université Paul SABATIER de Toulouse pour avoir consenti à rapporter ces travaux. Je remercie infiniment les professeurs Thierry GRARD de l'ULCO et Raphaël SCHNEIDER de l'Université de Lorraine ainsi que Guillaume DUFLOS de l'ANSES pour avoir accepté de juger ce travail et pour les conseils salutaires procurés lors de leur présence aux réunions de comité de suivi. Enfin, je remercie Chantal COMPÈRE de l'IFREMER pour ses précieuses recommandations lors de ces mêmes comités.

Je souhaite remercier Dominique COURCOT, directeur de l'UCEiV, et Sophie FOURMENTIN, responsable de l'équipe Chimie Supramoléculaire, pour m'avoir accueilli parmi eux.

Je souhaiterais, par ailleurs, témoigner toute ma gratitude envers Francine CAZIER, directrice de thèse, qui m'a non seulement fait découvrir l'élégance de la chimie organique mais qui m'a également soutenu dans tous mes projets, même le plus fou (rédiger une thèse de chimie sous L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X). Je ne saurais exprimer toute ma reconnaissance pour son temps, ses encouragements et pour avoir fait de ce Doctorat une formidable expérience à la fois productive et stimulante. Le plaisir et l'enthousiasme à transmettre son savoir ont été, pour moi, un moteur incroyable.

Je tiens remercier ma co-encadrante, Isabelle MALLARD pour le temps qu'elle m'a consacré, pour m'avoir aiguillé de ses conseils scientifiques et pour la qualité de ses suggestions et de son aide qui ne se sont pas limités au cadre de cette thèse.

Un grand merci à Pierre-Édouard DANJOU pour son temps, son énergie et ses conseils (pas toujours scientifiques). Je ne pouvais imaginer meilleur tuteur pédagogique.

Je remercie tout autant François DELATTRE pour m'avoir initié à la fluorescence moléculaire. Son aide fût grandement apprécié durant toute cette période clé.

Je voudrais également remercier tous les collègues qui m'ont aidée à mener à bien ce projet, David LANDY pour son aide dans l'interprétation des résultats d'analyse et Steven RUELLAN pour son appui en analyse RMN. Leurs conseils et leur gentillesse m'ont permis d'apprendre énormément.

Je tiens aussi à remercier les membres du Centre Commun de Mesures,

Fabrice CAZIER, Dorothee DEWAELE, Paul GENEVRAY et Coralie VANDENBILCKE, pour m'avoir permis de bénéficier de leur savoir-faire et de leurs ressources.

Merci également à Christophe POUPIN pour son aide lors de la caractérisation des Quantum Dot par Diffraction des Rayons X.

Je ne peux oublier tous les étudiants qui, lors de leurs stages, ont permis l'avancée de ces travaux. Antoine, Romain, Tatiana, Badr et Khalil, votre implication et votre envie de bien faire me fût d'un grand secours.

Je remercie tout particulièrement Isabelle DELSARTE et Tarek MOUFAWAD pour leur bonne humeur, leur sympathie et les discussions de fin de semaine. Merci à Tracy EL ACHKAR, Nancy AL HADDAD et Éliane SALIBA pour les moments inoubliables. Travailler à vos côtés fût une expérience très enrichissante.

Je souhaite remercier Catherine RAFIN et Etienne VEIGNIE pour leur gentillesse, leur bonne humeur et les discussions botaniques et « champignoniques ».

Enfin, je remercie très chaleureusement les étudiants en thèse qui ont participé à cette étape avec moi notamment Alice, Clémence, Corentin, Khemesse et Lamia. Merci pour tous les bons moments que nous avons partagés ensemble.

J'adresse mes remerciements à Magaly WEGSCHEIDER, Caroline DUHR, Pierre KULINSKI, pour leur bienveillance ainsi qu'à Amaury KASPROWIAK pour son aide appréciable.

Je voudrais remercier le PMCO et l'ULCO pour le financement de ce Doctorat et l'ANSES pour les envois gracieux d'échantillons de poisson pour les analyses.

Merci à Élodie C. pour ses corrections essentielles et à Élodie B. pour sa disponibilité.

Bien sûr, je remercie ma famille d'avoir toujours cru en moi, en particulier mes parents pour m'avoir soutenu et permis de jouer au Tanguy. Je ne peux oublier mon frère et ma belle-sœur pour leur soutien sans faille. Merci à Marie-Alix et Lou, qui malgré la distance ont toujours été là.

Enfin, j'adresse une pensée spéciale à mon compagnon de vie, Jean-Baptiste, qui ne comprend rien à la chimie mais sans qui je ne serais probablement pas là aujourd'hui. Je le remercie pour sa patience et son soutien tout au long de cette expérience sans pareil.

## Résumé

Les amines biogènes (AB) sont des substances physiologiquement actives résultant de la décarboxylation enzymatique des acides aminés libres. Elles participent, dans le corps, aux processus de transmissions d'informations et de régulation de fonctions physiologiques mais peuvent aussi, à doses élevées, avoir des effets néfastes pour la santé. De nombreuses AB sont répertoriées dans la littérature, telles que l'histamine, la cadavérine et la putrescine. Mais, seul le contrôle d'histamine dans la chair de certains poissons de la famille des scombridés est actuellement réglementée (CE n°2073/2005). Du fait de cette réglementation, les techniques d'analyses chimiques de l'histamine sont largement documentées. Elles peuvent être semi-quantitatives (chromatographie sur couche mince) ou encore quantitatives (fluorescence moléculaire) mais, la chromatographie liquide haute-performance reste, à ce jour, l'unique méthode homologuée au niveau des instances de santé européenne. En marge de ces méthodes traditionnelles, l'enjeu d'un dispositif rapide, peu onéreux et permettant un contrôle plus systématique des aliments anime à la fois la communauté scientifique et le monde économique. Dans ce contexte, la pertinence à recourir à des Quantum Dot (QD) fonctionnalisés par un dérivé d'*ortho*-phthalaldéhyde (OPA) (utilisé en tant qu'agent de dérivation en fluorescence moléculaire pour les AB) a été posée.

Lors de ce projet, deux éléments clés d'un tel dispositif ont été réalisés et caractérisés. Les premiers correspondent aux dérivés fonctionnalisés de l'OPA (4-MeO-OPA et 4-HO-OPA). Ils ont été obtenus avec succès selon trois voies de synthèse. Les premières correspondent à des optimisations de synthèses référencées du 4-HO-OPA à partir d'alcool furfurylique ou du 3,4-diméthylphénol. Enfin, celle issue de l'acide 3-méthoxybenzoïque est une adaptation d'une synthèse référencée du 4-MeO-OPA. Dans un second temps, les propriétés du 4-MeO-OPA en tant qu'agent de dérivation vis-à-vis de l'histamine ont été évaluées et comparées à celles de l'OPA. Pour cela, les conditions optimales de complexation ont été étudiées par spectroscopies Ultra-Violet (UV) et de fluorescence moléculaire. Les seconds composants du dispositif sont des nanostructures fluorescentes (QD) dont les propriétés d'émission de fluorescence sont modulables. Notre choix s'est porté sur des QD hydrosolubles de cadmium et sélénium stabilisés par de l'acide mercaptosuccinique. Ces derniers ont été synthétisés par trois modes d'activation (thermique, micro-ondes, ultrasons) et caractérisés par diffractométrie de rayons X, spectrométrie à plasma à couplage inductif, spectroscopies UV et de fluorescence moléculaire. En conclusion, deux entités, le 4-HO-OPA et des QD possédant des ligands de type mercaptosuccinique, ont été réalisées en vue de la mise en place d'un dispositif innovant d'analyse d'histamine.

## Abstract

The biogenic amines (BA) are physiologically active substances resulting from the enzymatic decarboxylation of free amino acids. In the body, they are involved in the transmission of informations and in regulating physiological functions but, at high levels, they can also have damaging health effects. Many BA are recorded in literature, such as histamine, cadaverine and putrescine. Currently, the control of histamine in fish flesh is only regulated in the case of some Scombridae species (CE No. 2073/2005). As a consequence, histamine chemical analysis techniques are widely documented. They can be semi-quantitative (thin layer chromatography) or quantitative (molecular fluorescence). At present, high-performance liquid chromatography remains the only approved method by public health authorities. Next to the commonly used methods, the challenge of a fast inexpensive system that allows a more systematic control of food animates both the scientific community and the economic world. In this context, a study of the relevance of using Quantum Dots (QD) functionalized by an *ortho*-phthalaldehyde (OPA) derivative (OPA), used as molecular fluorescence derivation agent for BA, was undertaken.

During this project, two key elements of the system were realized and characterized. The first corresponds to OPA functionalized derivatives (4-MeO-OPA and 4-HO-OPA). They have been successfully achieved through three synthesis ways. The first two are optimizations of 4-HO-OPA referenced syntheses from furfuryl alcohol or 3,4-dimethylphenol. Finally, the last one uses 3-methoxybenzoic acid and is a 4-Me-OPA reference synthesis adaptation. In a second part, the 4-MeO-OPA properties as a bypass agent for histamine analysis were evaluated and compared with OPA ones. In this case, optimal complexation conditions were analysed by ultra-violet (UV) and molecular fluorescence spectroscopies. The second components are QD, which are fluorescent nanostructures with modular properties. We selected water-soluble cadmium and selenium QD which were stabilized by mercaptosuccinic acid. They were synthesized by three activation modes (thermal, microwave, ultrasound) and characterized by X-ray diffractometry, inductively coupled plasma spectrometry, UV spectroscopy and molecular fluorescence. In conclusion, two entities, 4-HO-OPA and QD, both having a mercaptosuccinic-type shell, were created as the innovative set up for histamine analysis.

# Liste des acronymes

<b>[bmim]Br</b>	bromure de 1-butyl-3-méthylimidazolium.
<b>[emim]Br</b>	bromure de 1-éthyl-3-méthylimidazolium.
<b>18C6</b>	18-couronne-6.
<b>4-AcO-OPA</b>	4-acétoxy- <i>ortho</i> -phthalaldéhyde.
<b>4-HO-OPA</b>	4-hydroxy- <i>ortho</i> -phthalaldéhyde.
<b>4-MO-OPA</b>	4-méthoxy- <i>ortho</i> -phthalaldéhyde.
<b>AB</b>	amine biogène.
<b>Ac<sub>2</sub>O</b>	anhydride acétique.
<b>ACN</b>	acétonitrile.
<b>AFB</b>	acide 2-formylbenzoïque.
<b>ANSES</b>	agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
<b>AOAC</b>	association scientifique garante de l'excellence des méthodes analytiques ou Association of Official Agricultural Chemists.
<b>APTS</b>	acide <i>para</i> -toluènesulfonique.
<b>ATR</b>	Réflectance totale atténuée.
<b>BMB</b>	2-(bromométhyl)benzaldéhyde.
<b>BnCl</b>	chlorure de benzyle.
<b>BPA</b>	unité de Biochimie des Produits Aquatiques.
<b>CCM</b>	Chromatographie sur Couche Mince.
<b>CE</b>	Électrophorèse Capillaire.
<b>CS</b>	Chimie Supramoléculaire.
<b>DCM</b>	dichlorométhane.
<b>DDQ</b>	2,3-dichloro-4,5-dicyanobenzoquinone.
<b>DHLA</b>	acide dihydrolipoïque.
<b>DLS</b>	Diffusion dynamique de la lumière.
<b>DMF</b>	diméthylformamide.
<b>DMSO</b>	diméthylsulfoxyde.
<b>DRX</b>	Diffraction des Rayons X.

---

<b>ELISA</b>	immunoabsorption par enzyme liée ou Enzyme-Linked Immuno Assay.
<b>FIA</b>	analyse par injection en flux continu.
<b>FRET</b>	Transfert d'Énergie par Résonance de Förster.
<b>GC</b>	Chromatographie en phase Gazeuse.
<b>HDA</b>	hexadécylamine.
<b>HPLC</b>	Chromatographie Liquide Haute Performance.
<b>HPTLC</b>	chromatographie sur couche mince à haute performance ou High-Performance Thin-Layer Chromatography.
<b>HRMS-ESI</b>	Spectrométrie de masse à haute résolution avec ionisation par électronébulisation.
<b>ICP-AES</b>	Spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif.
<b>IFREMER</b>	Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer.
<b>IR</b>	Infrarouge.
<b>JCPDS</b>	Joint Committee on Powder Diffraction Standards.
<b>JNOEJC</b>	Journées Nord Ouest Européennes des Jeunes Chercheurs.
<b>LDD</b>	limite de détection.
<b>LDQ</b>	limite de quantification.
<b>LED</b>	diodes électroluminescentes.
<b>LRP</b>	Laboratoire Réactions et génie des Procédés.
<b>MAA</b>	acide mercaptoacétique.
<b>MAOS</b>	Synthèse organique assistée par micro-onde ou Microwave Assisted Organic Synthesis.
<b>MeI</b>	iodométhane.
<b>MSA</b>	acide 11-mercaptosuccinique.
<b>MsOH</b>	acide méthylsulfonique.
<b>NBS</b>	N-bromosuccinimide.
<b>NMM</b>	N-méthylmorpholine.
<b>OPA</b>	<i>ortho</i> -phthalaldéhyde.
<b>PB</b>	péroxyde de benzoyle.
<b>PCC</b>	chlorochromate de pyridinium.
<b>PDC</b>	dichromate de pyridinium.
<b>PMCO</b>	Pôle Métropolitain du Littoral Côte d'Opale.
<b>PMT</b>	tube photomultiplicateur.

---

<b>QD</b>	Quantum Dot.
<b>Q-TOF</b>	Quadrupole Time-of-Flight.
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire.
<b>SILAR</b>	Successive Ion Layer Adsorption and Reaction.
<b>SM</b>	Spectrométrie de Masse.
<b>SPE</b>	extraction en phase solide.
<b>TA</b>	température ambiante.
<b>TBAB</b>	bromure de tétra-N-butylammonium.
<b>TBAI</b>	iodure de tétra-N-butylammonium.
<b>TBDMSCI</b>	chlorure de <i>tert</i> -butyldiméthylsilyle.
<b>TEM</b>	Microscopie Électronique en Transmission.
<b>TEOS</b>	orthosilicate de tétraéthyle.
<b>TFA</b>	acide trifluoroacétique.
<b>THF</b>	tétrahydrofurane.
<b>TMS</b>	Tétraméthylsilane.
<b>TMSCI</b>	chlorure de triméthylsilyle.
<b>TOP</b>	trioctylphosphine.
<b>TOPO</b>	oxyde de trioctylphosphine.
<b>u.a.</b>	unité arbitraire.
<b>UCEiV</b>	Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant.
<b>UHPLC</b>	Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance.
<b>ULCO</b>	Université du Littoral Côte d'Opale.
<b>UV</b>	Ultra-Violet.

# Sommaire

<b>Avant-propos</b>	<b>iv</b>
<b>Remerciements</b>	<b>v</b>
<b>Résumé</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des acronymes</b>	<b>viii</b>
<b>Sommaire</b>	<b>xi</b>
<b>Table des figures</b>	<b>xiii</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>xix</b>
<b>Table des équations</b>	<b>xxii</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 Synthèse bibliographique</b>	<b>4</b>
1.1 Les amines biogènes (AB) . . . . .	4
1.2 L' <i>ortho</i> -phthalaldéhyde (OPA) et ses dérivés . . . . .	18
1.3 Les Quantum Dots (QD) . . . . .	23
<b>Chapitre 2 Synthèse du 4-hydroxy-<i>ortho</i>-phthalaldéhyde (4-HO-OPA)</b>	<b>50</b>
2.1 Stratégie de synthèse selon CAO et ISAACS . . . . .	52
2.2 Stratégie de synthèse selon BILL et TARBELL . . . . .	65
2.3 Stratégie de synthèse selon SINGH et KHADE . . . . .	73
2.4 Conclusion . . . . .	77
<b>Chapitre A Section Expérimentale</b>	
<b>Protocoles de synthèse du 4-HO-OPA</b>	<b>79</b>
A.1 Synthèse à partir de l'alcool furfurylique . . . . .	79
A.2 Synthèse à partir du 3,4-diméthylphénol . . . . .	86
A.3 Synthèse à partir de l'acide 3-méthoxybenzoïque . . . . .	89

---

<b>Chapitre 3 Analyses spectroscopiques en solution aqueuse de l'histamine en présence d'OPA et de 4-MO-OPA par UV et fluorescence moléculaire</b>	<b>92</b>
3.1 Analyse de l'histamine en présence d'OPA ou de 4-MO-OPA . . . . .	93
3.2 Analyse spectroscopique d'un mélange d'AB . . . . .	120
3.3 Analyse de l'histamine dans un échantillon réel . . . . .	129
3.4 Conclusion . . . . .	130
<b>Chapitre B Section Expérimentale</b>	
<b>Protocoles d'analyses par UV et fluorescence moléculaire des AB</b>	<b>133</b>
<b>Chapitre 4 Synthèses et caractérisations des QD</b>	<b>134</b>
4.1 Synthèses et caractérisations de QD de CdSe stabilisés par MSA (système direct) . . . . .	135
4.2 Bilan et perspectives de synthèses de QD fonctionnalisés avec l'OPA . . . . .	150
4.3 Conclusion . . . . .	152
<b>Chapitre C Section Expérimentale</b>	
<b>Protocoles de synthèse des QD</b>	<b>153</b>
C.1 Synthèse des précurseurs de NaHSe . . . . .	153
C.2 Synthèse des précurseurs de Cd <sup>2+</sup> /MSA . . . . .	153
C.3 Synthèse des QD CdSe/MSA . . . . .	153
<b>Conclusion générale</b>	<b>155</b>
<b>Perspectives</b>	<b>157</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>159</b>
<b>Annexe I Matériel et méthodes</b>	<b>179</b>
<b>Annexe II Publication</b>	<b>181</b>
<b>Table des matières</b>	<b>188</b>

# Table des figures

1.1	Exemple de décarboxylation de l'histidine en histamine. . . . .	5
1.2	Synthèse de la spermidine et de la spermine à partir de la putrescine. . . . .	6
1.3	Formule semi-développée de l'histamine. . . . .	7
1.4	Formule semi-développée de l' <i>ortho</i> -phthalaldéhyde (OPA). . .	18
1.5	Représentation des formes de l'OPA issues de la littérature. . .	18
1.6	Équilibre des structures dialdéhyde, monohydrate et dihémiacétal cyclique de l'OPA dans l'eau. . . . .	19
1.7	Mécanisme réactionnel de complexation entre l'OPA et l'histamine proposé par RÖNNBERG et al. . . . .	21
1.8	Mécanisme réactionnel de complexation entre l'OPA et l'histamine proposé par YOSHIMURA et al. . . . .	22
1.9	QD avec émission progressive du violet au rouge © Antipoff Wikimedia Commons, CC-by-3.0. . . . .	23
1.10	Classement des isolants, semi-conducteurs et conducteurs en fonction de leur conductivité $\sigma$ . . . . .	23
1.11	Représentation schématique d'un QD. . . . .	25
1.12	Représentation schématique des bandes interdites des trois types de QD. . . . .	26
1.13	Exemple de spectres d'absorption et d'émission d'un QD de CdSe. . . . .	28
1.14	Diagramme simplifié de PERRIN-JABLONSKI. . . . .	30
1.15	Schéma de la formation des QD. . . . .	35
1.16	Schéma d'un QD cœur/coquille hydrophobe encapsulé dans une micelle. . . . .	43
1.17	Schéma d'un ligand de QD en vu d'une fonctionnalisation. . .	44
1.18	Représentation schématique du capteur réalisé par WANG et al. . . . .	48
1.19	Représentation schématique du capteur réalisé par KHAN et al. . . . .	49
2.1	Schéma de la composition du dispositif QD/Ligand/OPA. . . . .	50
2.2	Formule semi-développée de l'OPA, de la fluorescamine et du chlorure de dansyl. . . . .	51
2.3	Synthèse du 4-HO-OPA à partir de l'alcool furfurylique décrite par CAO et ISAACS . . . . .	52
2.4	Mécanisme de cyclisation de l'alcool furfurylique en 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol. . . . .	53

2.5	Mécanisme réactionnel proposé par LEE-RUFF et ABLENAS pour la réaction d'oxydation du (3-méthoxy-1-propén-1-yl)benzène avec le DDQ. . . . .	56
2.6	Proposition de mécanisme réactionnel pour la réaction d'oxydation avec le DDQ. . . . .	57
2.7	Proposition de mécanisme réactionnel pour la réaction de déshydratation observée lors de la réaction d'oxydation avec le DDQ. . . . .	57
2.8	Rétrosynthèse du 4-HO-OPA à partir de l'alcool furfurylique comportant les étapes de protection et déprotection. . . . .	58
2.9	Synthèse du 2-((prop-2-ynyloxy)méthyl)furane à partir de l'alcool furfurylique. . . . .	58
2.10	Synthèses des 5-méthoxy et 5-acétoxy-4,5-dihydrobenzofurane à partir du 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol. . . . .	61
2.11	Synthèse du 4-MO-OPA à partir du 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol. . . . .	62
2.12	Synthèse optimisée du 4-HO-OPA à partir du 4-MO-OPA. . . . .	63
2.13	Synthèse optimisée du 4-HO-OPA à partir de l'alcool furfurylique. . . . .	64
2.14	Rétrosynthèse du 4-HO-OPA à partir du 3,4-diméthylphénol. . . . .	65
2.15	Synthèse de l'OPA à partir de l' <i>ortho</i> -xylène décrite par BILL et TARBELL. . . . .	65
2.16	Synthèse du 1,2-bis(dibromométhyl)benzène à partir de l' <i>ortho</i> -xylène. . . . .	66
2.17	Synthèse envisagée de l'OPA à partir de <i>ortho</i> -xylène via une bromation. . . . .	66
2.18	Réaction d'oxydation du 1,2-bis(bromométhyl)benzène en présence de NMM. . . . .	66
2.19	Mécanisme réactionnel de l'oxydation d'un (halogénométhyl)benzène en présence de NMM. . . . .	67
2.20	Rétrosynthèse du 4-HO-OPA à partir du 3,4-diméthylphénol avec les étapes de protection et déprotection. . . . .	68
2.21	Synthèse par MAOS du 3,4-diméthylanisole à partir du 3,4-diméthylphénol . . . . .	70
2.22	Synthèse du 3,4-di(bromométhyl)anisole à partir du 3,4-diméthylanisole. . . . .	70
2.23	Bromation du 3,4-diméthylanisole en présence de NBS et de PB. . . . .	70
2.24	Synthèse du 3,4-di(bromométhyl)anisole à partir du 3,4-diméthylanisole par voie photochimique. . . . .	71
2.25	Synthèse par MAOS du 4-MO-OPA à partir du 3,4-di(bromométhyl)anisole. . . . .	72
2.26	Synthèse du 4-HO-OPA à partir du 3,4-diméthylphénol. . . . .	72

2.27	Rétrosynthèse du 4-HO-OPA au départ de l'acide 3-méthoxybenzoïque. . . . .	73
2.28	Synthèse du 6-méthoxyphthalide selon SINGH et KHADE à partir de l'acide 3-méthoxybenzoïque. . . . .	74
2.29	Synthèse du (4-méthoxy-1,2-phénylène)diméthanol à partir du 6-méthoxyphthalide. . . . .	76
2.30	Synthèse du 4-MO-OPA à partir du (4-méthoxy-1,2-phénylène)diméthanol. . . . .	76
2.31	Synthèse optimisée du 4-HO-OPA à partir de l'acide 3-méthoxybenzoïque. . . . .	77
3.1	Spectre d'excitation avec $\lambda_{\text{émission}} = 419 \text{ nm}$ et spectre d'émission avec $\lambda_{\text{excitation}} = 358 \text{ nm}$ des complexes OPA/histamine à pH 12,5. . . . .	95
3.2	Visualisation des complexes OPA/histamine en solution à une concentration de $1.10^{-4} \text{ mol/L}$ en fonction du pH. . . . .	96
3.3	Spectres d'absorption UV des complexes OPA/histamine en fonction du pH. . . . .	97
3.4	Spectres d'excitation et d'émission de fluorescence des complexes OPA/histamine en fonction du pH. . . . .	98
3.5	Évolution de l'intensité de l'émission à 419 nm après une excitation à 358 nm des complexes OPA/histamine en fonction du rapport des concentrations OPA/histamine. . . . .	100
3.6	Exemples de spectres de fluorescence après une excitation à 358 nm des complexes OPA/histamine pour des temps de complexation de 1 min à 50 h à 20 °C. . . . .	102
3.7	Évolution au cours du temps de l'intensité d'émission maximale après une excitation à 358 nm des complexes OPA/histamine. . . . .	103
3.8	Évolution au cours du temps de la longueur d'onde ayant l'intensité d'émission maximale après une excitation à 358 nm des complexes OPA/histamine. . . . .	103
3.9	Évolution de l'intensité des spectres d'excitation et d'émission des complexes OPA/histamine en fonction de la concentration en complexe. . . . .	105
3.10	Graphique représentant le maximum d'intensité du pic d'émission ( $\lambda_{\text{émission}} = 419 \text{ nm}$ ) pour une excitation $\lambda_{\text{excitation}} = 358 \text{ nm}$ en fonction de la concentration. . . . .	106
3.11	Allure des spectres d'émission de fluorescence des complexes OPA/histamine après une excitation à 358 nm pour des concentrations entre $4.10^{-6} - 5.10^{-6} \text{ mol/L}$ . . . . .	107

3.12 Spectres d'excitation et d'émission des complexes 4-MO-OPA/histamine à pH 12,5. . . . .	109
3.13 Spectres d'absorption UV des complexes 4-MO-OPA/histamine enregistrés à des pH de 9,0 à 12,5. . . . .	110
3.14 Spectres d'absorption UV des complexes 4-MO-OPA/histamine enregistrés à des pH de 9,0 à 12,5. . . . .	111
3.15 Spectres d'excitation ( $\lambda_{\text{émission}} = 462 \text{ nm}$ ) et d'émission de fluorescence ( $\lambda_{\text{excitation}} = 351 \text{ nm}$ ) des complexes 4-MO-OPA/histamine en fonction du pH. . . . .	112
3.16 Évolution de l'intensité maximale de l'émission de fluorescence à 462 nm après une excitation à 351 nm en fonction du pH. . . . .	112
3.17 Évolution de l'intensité maximale de l'émission à 462 nm après une excitation à 351 nm en fonction du rapport 4-MO-OPA/histamine. . . . .	113
3.18 Spectres de fluorescence après une excitation à 351 nm des complexes 4-MO-OPA/histamine pour des temps de complexation de 1 min à 50 h. . . . .	115
3.19 Évolution de l'intensité d'émission maximale après une excitation à 351 nm des complexes 4-MO-OPA/histamine en fonction du temps. . . . .	116
3.20 Évolution de la longueur d'onde ayant l'intensité d'émission maximale après une excitation à 351 nm des complexes 4-MO-OPA/histamine en fonction du temps. . . . .	116
3.21 Évolution de l'intensité de l'émission à $\lambda_{\text{émission}} = 462 \text{ nm}$ après une excitation à 351 nm des complexes 4-MO-OPA/histamine à pH 12,5. . . . .	117
3.22 Spectres de fluorescence après une excitation à 351 nm des complexes 4-MO-OPA/histamine pour des concentrations comprise entre $9.10^{-7}$ et $1.10^{-6} \text{ mol/L}$ . . . . .	119
3.23 Spectres d'excitation et d'émission des complexes OPA/agmatine et 4-MO-OPA/agmatine dans les conditions d'analyse de l'histamine. . . . .	122
3.24 Spectres d'excitation et d'émission des complexes de cadavérine en présence d'OPA et de 4-MO-OPA dans les conditions d'analyse de l'histamine. . . . .	123
3.25 Spectres d'excitation et d'émission des complexes de putrescine en présence d'OPA et de 4-MO-OPA dans les conditions d'analyse de l'histamine. . . . .	124

3.26 Spectres d'excitation et d'émission des complexes de spermidine en présence d'OPA et de 4-MO-OPA dans les conditions d'analyse de l'histamine. . . . .	125
3.27 Spectres d'émission après une excitation à 358 nm des complexes OPA/histamine en fonction de la concentration en interférant. . . . .	126
3.28 Spectres d'émission après une excitation à 358 nm des complexes 4-MO-OPA/histamine en fonction de la concentration en interférant. . . . .	127
3.29 Intensité de fluorescence des échantillons réels en présence d'OPA et de 4-MO-OPA. . . . .	129
3.30 Diagramme de comparaison des propriétés de l'analyse de l'histamine par fluorescence moléculaire utilisant soit l'OPA soit le 4-MO-OPA en tant qu'agent de dérivation. . . . .	132
4.1 Schéma proposé pour la composition du dispositif QD/Ligand/OPA. . . . .	134
4.2 Photographie de QD synthétisés par voie thermique. . . . .	138
4.3 Spectres d'absorption, d'émission et de la dérivée seconde du spectre d'absorption d'un QD de CdSe/MSA avec une synthèse de 30 min par irradiation micro-ondes. . . . .	139
4.4 Évolution de la longueur d'onde d'émission en fonction du diamètre du cœur des QD obtenus par voie thermique. . . . .	140
4.5 Évolution du diamètre du cœur de CdSe en fonction du temps de synthèse par voie thermique. . . . .	141
4.6 Évolution de la longueur d'onde d'émission en fonction du diamètre du cœur des QD obtenus par irradiation micro-ondes. . . . .	142
4.7 Évolution de la longueur d'onde d'émission en fonction du diamètre du cœur des QD obtenus par activation sonochimique. . . . .	143
4.8 Spectre DRX obtenu pour l'échantillon préparé par méthode thermique. . . . .	146
4.9 Spectre DRX obtenu pour l'échantillon préparé par irradiation micro-ondes. . . . .	146
4.10 Spectre DRX obtenu pour l'échantillon préparé par activation sonochimique. . . . .	147
4.11 Schéma proposé pour la composition du dispositif QD/Ligand thiolé/OPA . . . . .	150
4.12 Schéma proposé pour les rétrosynthèses du dispositif QD/Ligand thiolé/OPA . . . . .	151
4.13 Proposition de synthèse du greffage du 4-HO-OPA avec l'anhydride acétylthiosuccinique. . . . .	152

# Liste des tableaux

1.1	Présentation des principales AB et de leur précurseur. . . . .	5
1.2	Comparaison du rendement quantique de fluorescence $\Phi_F$ de standards et QD commerciaux. . . . .	32
1.3	Comparaison des propriétés des QD avec celles des fluorophores organiques. . . . .	34
1.4	Méthodes permettant de caractériser les QD. . . . .	47
2.1	Comparaison des ratios 4-HO-OPA/OPA lors de l'étape d'oxydation du 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol. . . . .	55
2.2	Comparaison des rendements selon les traitements associés pour la synthèse du 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol. . . . .	59
2.3	Rendements des réactions de protection du 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol. . . . .	60
2.4	Comparaison des rendements et des rapports OPA et RO-OPA pour les réactions d'oxydation en présence et en absence d'un groupement protecteur. . . . .	61
2.5	Comparaison des conditions opératoires et des rendements de déprotections du 4-MO-OPA. . . . .	63
2.6	Comparaison des rendements de la synthèse totale du 4-HO-OPA réalisée lors de cette étude par rapport à la littérature. . .	64
2.7	Structures obtenues suite aux conditions d'oxydation par l'eau oxygénée. . . . .	67
2.8	Comparaison des rendements de méthylation du 3,4-diméthylphénol en fonction de la durée et de la température de synthèse. . . . .	69
2.9	Comparaison des rendements de méthylation du 3,4-diméthylphénol obtenus par activation sous MAOS en fonction de la durée et de la température de synthèse. . . . .	69
2.10	Comparaison des rendements obtenus pour la synthèse du 4-MO-OPA à partir du 3,4-di(bromométhyl)anisole. . . . .	71
2.11	Comparaison des rendements en 6 et en 7-méthoxyphthalide obtenus en fonction du solvant et de la température. . . . .	74
2.12	Comparaison des rendements de 6-méthoxyphthalide obtenus dans la littérature. . . . .	75
2.13	Optimisation des conditions de la réaction de lactonisation (temps et température). . . . .	75

3.1	Évolution des longueurs d'onde d'excitation et d'émission et des intensités relatives associées en unité arbitraire (u.a.) des complexes OPA/ histamine en fonction du temps de complexation.	95
3.2	Conditions expérimentales de l'étude des complexes OPA/histamine en fonction du pH. . . . .	96
3.3	Conditions expérimentales de l'étude des complexes OPA/histamine en fonction du rapport $R_{OPA/histamine}$ . . . . .	99
3.4	Conditions expérimentales de l'étude cinétique des complexes OPA/ histamine. . . . .	101
3.5	Conditions expérimentales de l'étude des complexes OPA/histamine en fonction de la concentration de complexes. . . . .	105
3.6	Conditions expérimentales de l'étude des complexes OPA/histamine pour déterminer les LDD et LDQ. . . . .	106
3.7	Tableau comparatif des LDD et LDQ obtenues lors de cette étude par rapport à la littérature. . . . .	108
3.8	Conditions expérimentales de l'étude des complexes 4-MO-OPA/histamine en fonction du pH. . . . .	110
3.9	Conditions expérimentales de l'étude des complexes 4-MO-OPA/histamine en fonction du rapport $R_{4-MO-OPA/histamine}$ . . . . .	113
3.10	Conditions expérimentales de l'étude cinétique des complexes 4-MO-OPA/histamine. . . . .	114
3.11	Conditions expérimentales de l'étude des complexes 4-MO-OPA/histamine en fonction de la concentration de complexes. . . . .	117
3.12	Conditions expérimentales de l'étude des complexes 4-MO-OPA/histamine pour déterminer les LDD et LDQ. . . . .	118
3.13	Tableau comparatif des LDD et LDQ obtenues lors de cette étude sur le 4-MO-OPA par rapport à celle en présence d'OPA. . . . .	119
3.14	Tableau comparatif des conditions optimum pour une réponse en fluorescence moléculaire des complexes OPA/histamine et 4-MO-OPA/histamine. . . . .	120
3.15	Conditions d'analyse en fluorescence moléculaire de l'agmatine, la cadavérine et la putrescine en présence d'OPA. . . . .	121
3.16	Tableau comparatif des effets de quatre AB sur la réponse en fluorescence moléculaire des complexes OPA/histamine et 4-MO-OPA/histamine. . . . .	128
3.17	Tableau comparatif des fractions massiques obtenues à partir des intensités maximales en fluorescence moléculaire des complexes OPA/histamine et 4-MO-OPA/histamine. . . . .	130
4.1	Méthodologie d'élaboration des QD par voies thermique, micro-ondes et ultrasons. . . . .	137

---

4.2	Comparaison des diamètres de cœur et longueurs d'onde d'émission des QD selon le mode d'activation des synthèses. . . . .	144
4.3	Pourcentage de Cadmium, Sélénium et Soufre et rapport Cd/Se et Cd/S selon les méthodes d'activation thermique, micro-ondes et ultrasons . . . . .	147
4.4	Comparaison des structures des QD obtenues par rapport à la littérature. . . . .	148
4.5	Problématiques identifiées et actions menées lors de la non répétabilité des synthèses de QD de CdSe. . . . .	150

# Table des équations

1.1	Équation permettant le calcul de l'énergie de la bande interdite de nanocristaux sphériques. . . . .	27
1.2	Expression du rayon de Bohr (en nm). . . . .	28
1.3	Expression de la longueur d'onde du pic excitonique (en nm). . . . .	29
1.4	Expression du rendement quantique de fluorescence $\Phi_F$ . . . . .	31
1.5	Expression du rendement quantique de fluorescence $\Phi_{QD}$ . . . . .	32
1.6	Calcul du diamètre D du cœur de CdSe à partir de $\lambda_{max}$ du pic excitonique. . . . .	45
1.7	Calcul du coefficient d'extinction molaire $\epsilon$ en fonction du diamètre D du cœur de CdSe. . . . .	46
1.8	Calcul de la concentration à partir du spectre d'absorption. . . . .	46
4.1	Équation de la réaction du sélénium solide en présence de $\text{NaBH}_4$ pour former $\text{NaHSe}$ . . . . .	136

# Introduction générale

Les produits alimentaires renferment des nutriments organiques et minéraux essentiels pour la santé humaine. Toutefois, la présence de micro-organismes pathogènes, de parasites mais aussi de composés générés par les traitements de maturation et de fermentation des denrées représentent un risque sanitaire important. En termes de Santé Publique, la recherche de marqueurs d'altération des aliments est donc un axe majeur et se traduit notamment par la recherche d'amines biogènes (AB). Ces composés, résultant principalement de la décarboxylation enzymatique des acides aminés libres, participent aux processus de régulation des fonctions physiologiques mais peuvent, à dose élevée, avoir des effets néfastes sur la santé. De nombreuses AB sont répertoriées dans la littérature, telles la putrescine, la cadavérine, la spermidine et l'agmatine mais, la plus étudiée car contrôlée par les instances sanitaires européenne, est l'histamine. A l'origine de la principale toxi-infection alimentaire liée à la consommation de poissons en France, elle est aussi la seule réglementée (CE n°2073/2005) même si la cadavérine et la putrescine ont été récemment inventoriées comme potentialisateurs des effets de l'histamine. Du fait de cette réglementation, les techniques d'analyse de l'histamine sont largement documentées avec pour exemple des méthodes colorimétriques, enzymatiques ou encore chromatographiques comportant des modes de détection variés (spectroscopie UV, fluorescence moléculaire, spectrométrie de masse). À ce jour, la Chromatographie Liquide Haute Performance avec détection par Ultra-Violet (HPLC-UV) reste l'unique méthode homologuée au niveau des instances de Santé. En marge de ces méthodes usuelles, l'enjeu d'un dispositif rapide, peu onéreux et permettant un contrôle plus systématique des aliments anime à la fois la communauté scientifique et le monde économique. Dans ce contexte, la pertinence à recourir à des Quantum Dot (Quantum Dot (QD)) fonctionnalisés par un dérivé d'*ortho*-phthalaldéhyde (OPA) (utilisé en tant qu'agent de dérivation en fluorescence moléculaire pour les amines biogènes

(AB)) a été posée.

Les QD sont des nanomatériaux cités comme possédant une haute fluorescence et présentant une simplicité d'utilisation. Composés d'un cœur constitué de semi-conducteurs et d'un ligand organique en surface, les QD possèdent des propriétés photophysiques d'intérêt à savoir un rendement quantique de fluorescence important et un spectre d'émission symétrique et très fin. Étudiés depuis une dizaine d'années dans le domaine de la recherche en Biologie en tant que marqueurs fluorescents, l'emploi des QD dans le domaine de l'analyse des amines biogènes (AB) ne présentait, à notre connaissance, aucune antériorité au commencement de cette étude. Pour les applications biologiques, les QD sont fonctionnalisés par un anticorps ou une protéine assurant la fonction de reconnaissance visée. Ici, la fonctionnalisation du ligand organique stabilisant le QD par un agent de complexation des AB apparaissait comme un choix pertinent. En parcourant la littérature dédiée, de nombreuses études mettent en avant des réactions de complexation d'AB par des agents de dérivation pour leur analyse par fluorescence moléculaire. Parmi ces dérivés, l'*ortho*-phthalaldéhyde (OPA), la fluorescamine et le chlorure de dansyle sont les plus citées. Notre choix s'est en premier lieu orienté vers l'OPA dont la fonctionnalisation semblait la plus accessible. De plus, ce dérivé d'OPA pouvait susciter un intérêt suffisant à lui seul en tant que nouvel agent de dérivation. Dans une première approche, la validation d'un tel système s'est principalement focalisée sur l'histamine car seule réglementée à ce jour.

Ce mémoire de recherche, à la jonction de la chimie organique, inorganique et de la biologie, comporte un premier chapitre bibliographique dédié aux AB, à l'OPA ainsi qu'aux QD; en première partie la définition des AB et leur rôle biologique y sont retrouvés. Un focus sur l'histamine est ensuite réalisé afin d'appréhender les enjeux de Santé publique liés à sa toxicité et se poursuit par un descriptif des méthodes d'analyses qui lui sont dédiées. Une seconde partie est consacrée à l'utilisation de l'OPA et ses dérivés structuraux, complétée par une présentation du mécanisme de complexation entre l'OPA et l'histamine. Enfin, une dernière partie est dédiée aux QD et comporte un descriptif de leur structure, de leurs propriétés, de leurs synthèses et applications.

Le second chapitre expose la synthèse de dérivés d'OPA et notamment de 4-

méthoxy-*ortho*-phthalaldéhyde (4-MO-OPA) et 4-hydroxy-*ortho*-phthalaldéhyde (4-HO-OPA) selon trois voies de synthèse; les premières correspondent à des optimisations de synthèses référencées de 4-hydroxy-*ortho*-phthalaldéhyde (4-HO-OPA) à partir d'alcool furfurylique ou d'acide 3-méthoxybenzoïque. Enfin, une adaptation de synthèse référencée de l'OPA à partir du 3,4-diméthylphénol est présentée.

Dans la continuité, une étude par spectroscopie de fluorescence moléculaire de l'histamine en présence d'OPA et de 4-méthoxy-*ortho*-phthalaldéhyde (4-MO-OPA) est développée en chapitre 3. Les paramètres optimaux de complexation sont présentés ainsi que l'étude des gammes de concentration et limites de détection et quantification de chacun des deux systèmes.

Enfin, le dernier chapitre détaille la synthèse des QD élaborés avec un cœur de CdSe et un ligand de type acide 11-mercaptosuccinique. Trois voies d'activation (thermique, irradiation par microondes puis activation sonochimique) ont été testées pour cette synthèse. Les propriétés optiques ainsi que les caractérisations structurales par Diffraction des Rayons X (DRX) et Spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES) de ces trois types de QD sont détaillées.

Une discussion sur les perspectives de couplage des deux entités est menée en conclusion.

# Synthèse bibliographique

Ce premier chapitre comporte une analyse bibliographique des trois thématiques relatives à ces travaux de thèse. En premier lieu, les études récentes sur les amines biogènes (AB) et plus particulièrement sur l’histamine seront détaillées. Elles seront suivies par une description des méthodes d’analyses et de la réglementation dont elle fait l’objet. Dans un second temps, Les propriétés de l’*ortho*-phthalaldéhyde (OPA), agent de dérivation de l’histamine, seront présentées. Enfin, un dernier point sur les caractéristiques et les synthèses des Quantum Dots (QD) sera établi.

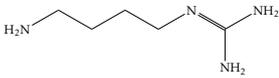
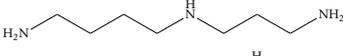
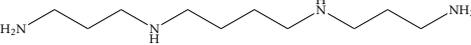
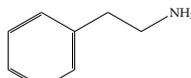
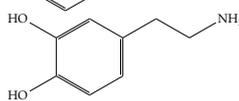
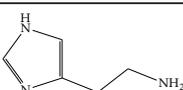
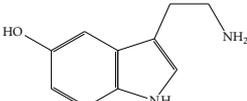
## 1.1 Les amines biogènes (AB)

### 1.1.1 Définition des AB

Les amines biogènes (AB) sont des molécules organiques azotées naturellement présentes à des concentrations variables au sein de tout organisme vivant. Elles sont majoritairement observées dans les produits fermentés comme les aliments carnés et marins, le vin, la bière ou encore le fromage ainsi que dans certains fruits et légumes.<sup>[1]</sup>

De faible masse moléculaire, leur structure chimique est de type aliphatique, aromatique ou encore hétérocyclique, avec un nombre variable de groupements aminés (Tableau 1.1).

TABLEAU 1.1 – Présentation des principales AB et de leur précurseur.

AB	Formule	Précurseur
<b>Aliphatique</b>		
Agmatine		Arginine
Cadavérine		Lysine
Putrescine		Ornithine
Spermidine		Putrescine
Spermine		Spermidine
<b>Aromatique</b>		
2-phényléthylamine		Phénylalanine
Dopamine		Tyrosine
<b>Hétérocyclique</b>		
Histamine		Histidine
Sérotonine		Tryptophane

Issues principalement de la décarboxylation enzymatique d'acides aminés libres (Figure 1.1), elles peuvent également être obtenues par amination de composés carboxylés, par hydrolyse de produits aminés ou par réaction enzymatique sur une autre AB (Figure 1.2).

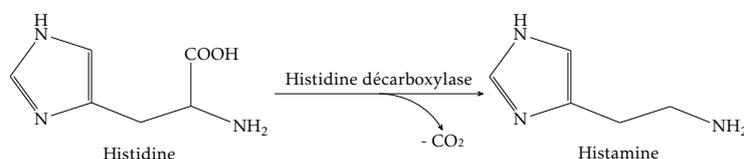


FIGURE 1.1 – Exemple de décarboxylation de l'histidine en histamine.

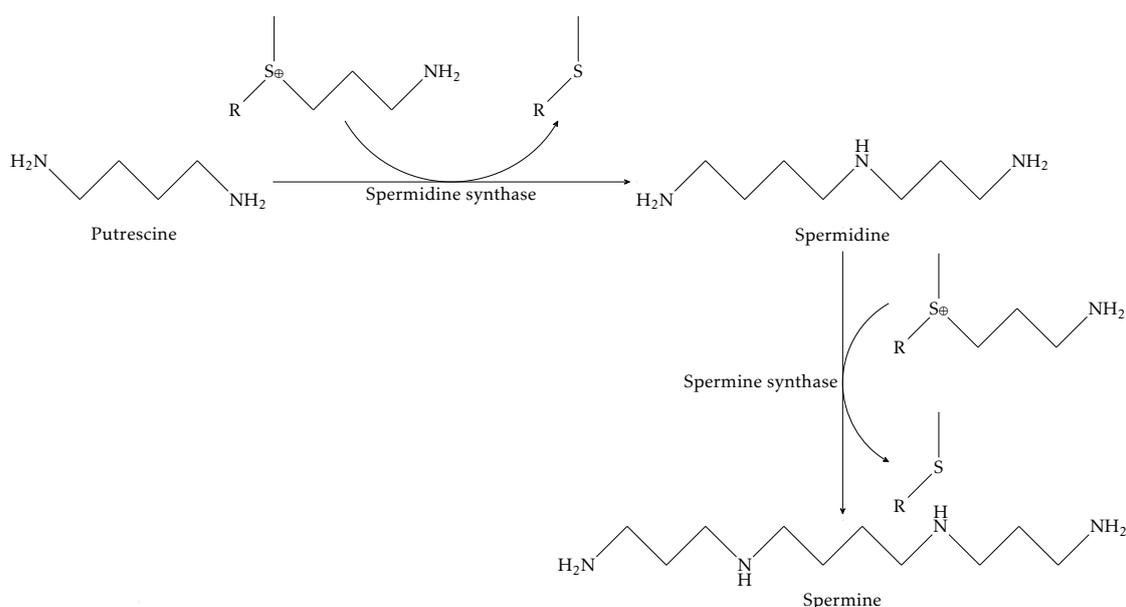


FIGURE 1.2 – Synthèse de la spermidine et de la spermine à partir de la putrescine.

Le nom de certaines AB se décline selon l'acide aminé dont elle dérive. Ainsi, l'histidine devient l'histamine après décarboxylation. D'autres AB tirent leur nom de la matrice dans laquelle elles furent découvertes; la spermidine et la spermine caractérisées dans le sperme ainsi que la cadavérine et la putrescine issues de cadavres putréfiés d'animaux en sont des exemples.

### 1.1.2 Origines des AB chez l'Homme

Chez l'Homme, les trois sources d'AB sont <sup>[2]</sup> :

- **endogène** due à la présence d'acides aminés libres dans le corps humain (exemple : production d'histamine par les cellules entérochromaffines de l'estomac suite à un stimulus),
- **pseudo-endogène** consécutive à la présence de microorganismes dans l'intestin (exemple : décarboxylation de l'histidine en histamine par les bactéries *Escherichia coli*),
- **exogène** résultant de l'ingestion d'aliments contaminées en AB (source majoritaire chez l'Homme) et pouvant conduire à une intoxication alimentaire

### 1.1.3 Rôles biologiques

En faible quantité, les AB sont primordiales au fonctionnement du corps humain. En effet, elles participent aux processus de transmissions d'informations et de régulation de fonctions physiologiques.

Ainsi, les AB régulent les fonctions cérébrales dans le système nerveux périphérique. Elles sont, par ailleurs, impliquées dans des processus comportementaux allant de l'homéostasie centrale à certains phénomènes cognitifs tels que l'attention.<sup>[3]</sup> À forte dose, dont le seuil limite dépend de la sensibilité de chacun, les effets des AB sont amplifiés causant ainsi, un dérèglement des fonctions biologiques qui leur sont associées.

Ainsi, la dopamine est présente au niveau du cerveau et joue un rôle essentiel dans la coordination des mouvements du corps. Dans la maladie de Parkinson, les neurones dopaminergiques de la substance noire dégèrent et entraînent un dysfonctionnement moteur caractéristique.<sup>[4]</sup> Ce neurotransmetteur est également impliqué dans la motivation, la récompense et le renforcement.

De même, la sérotonine, couramment appelée hormone du bonheur, joue un rôle important dans la régulation de l'humeur, des comportements alimentaires et sexuels ainsi que sur les cycles de sommeil. Elle permet également d'inhiber la dopamine et ses effets. Un dérèglement des circuits sérotoninergiques peut être responsable d'une diminution du taux de sérotonine. Ce dernier peut être à l'origine d'un état dépressif, d'une forte émotivité et agressivité et même d'un état désinhibant.

### 1.1.4 L'histamine

L'histamine<sup>[5]</sup> (ou 2-(4-imidazolyl)éthylamine) (Figure 1.3) influe sur de nombreux processus biologiques qui doivent être strictement contrôlés afin d'éviter des réactions allergiques indésirables.

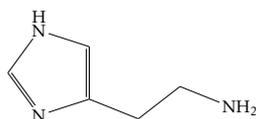


FIGURE 1.3 – Formule semi-développée de l'histamine.

Toutefois, les seuils de tolérance à cette AB dépendent de l'individu et de son état de santé. L'histamine se trouve dans les aliments à divers degrés en raison de la maturation d'histidine en présence de son enzyme décarboxylase (Figure 1.1). Par conséquent, elle se retrouve à forte concentration dans les aliments et boissons fermentés tels que le fromage vieilli, le vin rouge et la bière.

Elle représente également un indicateur fiable de l'altération des poissons et des viandes car sa teneur est liée à leur dégradation.<sup>[6]</sup>

#### 1.1.4.1 Actrice de nombreux processus biologiques

Des concentrations endogènes d'histamine sont nécessaires aux fonctions physiologiques normales. Toutefois, elles deviennent toxiques à de plus fortes doses dans le système circulatoire.<sup>[5,7]</sup>

Les personnes ayant une faible expression de l'amine oxydase extracellulaire (responsable de la dégradation de l'histamine) ou les patients ingérant des médicaments inhibiteurs de cette enzyme sont prédisposés à ressentir les effets toxiques de l'histamine liés à une amplification anormale de ses actions physiologiques.

Au niveau vasculaire, l'histamine entraîne une vasodilatation des artères et augmente la perméabilité capillaire et la viscosité sanguine. En parallèle, elle joue un rôle primordial sur le système cardiaque car elle exerce une action stimulatrice. Au niveau des appareils digestif et respiratoire, elle permet la contraction et la relaxation des muscles lisses extravasculaires, en particulier dans l'intestin et les bronches. Au niveau neurologique, c'est un important stimulant sensoriel. Enfin, des études ont montré l'effet de l'histamine sur l'immunomodulation, la cicatrisation, le rythme jour-nuit et la régulation de la prolifération cellulaire induite dans les modèles tumoraux.<sup>[5,7]</sup>

L'excès d'histamine généré par un empoisonnement entraîne une hypotension, des bouffées de chaleur et des maux de tête. Elle peut aussi être responsable de l'apparition d'œdème, d'urticaire et de palpitations. Lorsqu'elle pénètre dans le tube digestif, la contraction du muscle lisse intestinal est accentuée causant des crampes abdominales, des diarrhées et des vomissements. Enfin, la neurostimulation peut être potentialisée par la douleur et les démangeaisons qui

accompagnent fréquemment les lésions urticariennes dues à l’empoisonnement.

#### 1.1.4.2 La scombroidose

L’histamine cause de nombreux empoisonnements alimentaires en Europe.<sup>[7]</sup> En effet, elle est responsable de la scombroidose, intoxication par ingestion de toxines contenues dans la chair de certains poissons de la famille des scombridés (*Scombridae*) comme le thon (*Thunnus sp.*), la sardine (*Sardina pilchardus*), le hareng (*Clupea harengus*) et l’anchois (*Engraulis sp.*).

Cette maladie n’est pas corrélée à la capacité de dégradation et d’élimination de l’histamine, contrairement au phénomène d’intolérance à l’histamine.

Les symptômes sont identiques à ceux d’une intoxication à l’histamine, auxquels peuvent s’ajouter dans de rares cas, une accentuation de l’asthme et des problèmes cardiaques préexistants. Les premiers symptômes apparaissent très rapidement (de 5 min à 2 h) après l’ingestion et peuvent persister pendant plusieurs jours sans trace de séquelles à long terme. Un traitement antihistaminique est préconisé pour accélérer la guérison.

Il est difficile d’estimer un nombre précis d’empoisonnement à l’échelle d’un territoire puisque le diagnostic de cet empoisonnement n’est pas systématique. En effet, la maladie présente des symptômes similaires à d’autres intoxications alimentaires mais peut néanmoins être confirmée par une analyse des aliments incriminés ou provenant de la même source.<sup>[7]</sup>

Des études récentes montrent qu’il existe des potentialisateurs d’histamine qui favoriseraient voire accentueraient les intoxications. Des études animales in vitro et in vivo ont montré que la putrescine, la cadavérine, la tyramine, la tryptamine et la 2-phényléthylamine peuvent être considérées comme des possibles potentialisateurs.<sup>[8,9]</sup> En inhibant de manière compétitive les enzymes de détoxification et de dégradation, ces potentialisateurs diminuent la dose seuil nécessaire pour provoquer une réaction. Ils dérèglent la barrière intestinale empêchant l’absorption de l’histamine et provoquent, dans une moins grande ampleur, les mêmes symptômes que l’histamine aggravant ainsi les effets de la maladie.

### 1.1.4.3 Réglementation de l'histamine

Suite à ce problème sanitaire, l'Europe, et en particulier la France, a mis en place une réglementation qui impose un seuil de sécurité pour « les produits de la pêche fabriqués à partir d'espèces de poissons associées à une grande quantité d'histidine et ceux ayant subi un traitement de maturation aux enzymes dans la saumure fabriquée à partir de ces mêmes espèces ».<sup>[10]</sup>

D'après cette réglementation, seule la présence de deux échantillons sur neuf ayant une concentration massique en histamine entre « m » limite correspondant à une qualité satisfaisante et « M » correspondant à une qualité insatisfaisante est admise. Après échantillonnage, les critères de sécurité correspondent aux valeurs suivantes pour les poissons ayant :

- **une grande quantité d'histidine** m=100 mg/kg et M=200 mg/kg,
- **subi un traitement de maturation** m=200 mg/kg et M=400 mg/kg.

Ces limites s'appliquent exclusivement aux espèces de poissons appartenant aux familles ayant une grande quantité d'histidine (*Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryphaenidae*, *Pomatomidae*, *Scombresosidae*).

Un échantillonnage différent est utilisé pour les sauces liquides de poisson produites par fermentation. Dans ce type de cas, l'histamine est supposée uniformément répartie et un échantillon unique peut être prélevé. Le lot est donc supposé dangereux s'il présente un résultat supérieur à M=400 mg/kg.

De plus, en dehors du poisson, aucune autre denrée alimentaire n'est actuellement réglementée.

### 1.1.4.4 Méthodes d'analyse de l'histamine

Une grande variété de méthodes d'analyse de l'histamine est référencée. Elles peuvent être qualitatives, semi-quantitatives ou quantitatives.

Historiquement, les méthodes biologiques ont été les premières procédures d'évaluation de la toxine « scombroïde ». Elles mesuraient le nombre de crispation d'un organe sensible à l'histamine.

En 1954, l'observation du nombre de contractions et relaxations de l'intestin du cochon d'Inde fut la première méthode référencée pour l'analyse de l'histamine par l'association scientifique garante de l'excellence des méthodes analytiques ou Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) avec AOAC Official method 954.04.<sup>[11]</sup>

Par la suite, ces techniques ont été remplacées par des méthodes plus reproductibles. Elles sont classées en deux catégories. Les premières, dites « de routine », sont simples et rapides mais en général moins précises. Elles permettent de vérifier une grande quantité d'échantillons. Les secondes nécessitent des équipements plus importants et permettent de caractériser de manière qualitative et quantitative un mélange d'AB.

#### 1.1.4.4.1 Méthodes colorimétriques

Les premières méthodes colorimétriques comportaient une purification préalable sur colonne échangeuse d'ions<sup>[12]</sup> suivie de la formation d'un complexe coloré par réaction de l'histamine avec un métal comme le cuivre.

Depuis 2005, de nouveaux tests ont été proposés.<sup>[13,14]</sup> Ces techniques non spectrométriques reposent sur la comparaison visuelle de l'intensité de couleur des échantillons tests avec un standard de concentration connue. Elles permettent d'estimer rapidement la présence d'histamine dans le poisson frais ou les produits dérivés.

PATANGE et al.<sup>[13]</sup> a fait appel à l'imidazole et au sulfonate de *para*-phényldiazonium comme réactifs colorimétriques et obtient une limite de quantification à 10 mg/kg. Cette méthode à l'avantage d'être rapide (45 min avec la préparation de l'échantillon) et peu coûteuse en réactif.

En comparaison, la méthode proposée par OGURI et al.<sup>[14]</sup> se base sur la réaction de coloration entre l'histamine avec le 2,3-naphtalènedicarbaldéhyde. Cette technique est capable de détecter la présence d'histamine dans les aliments avec une limite de détection plus élevée (25 mg/kg). De plus, sa durée de conservation est bien plus longue que celle des kits biologiques comportant des enzymes ou des anticorps spécifiques de l'histamine (Sections 1.1.4.4.3 et 1.1.4.4.4).

#### 1.1.4.4.2 Méthodes de Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Ces méthodes historiques sont actuellement encore employées dans les laboratoires de contrôle. L'analyse peut être réalisée soit après une extraction de l'histamine par le méthanol<sup>[15,16]</sup> soit à partir d'une fraction aqueuse du jus obtenu par pressage de la chair de poisson.<sup>[17]</sup> De nombreuses combinaisons phase mobile / phase solide existent.<sup>[18,19]</sup> D'après LIEBER et TAYLOR,<sup>[19]</sup> les meilleurs systèmes de solvants sont :

- méthanol : ammoniac (20 :1, v :v);
- chloroforme : méthanol : ammoniac (2 :2 :1, v :v :v).

En effet, ces deux systèmes permettent une bonne séparation de l'histamine parmi un mélange d'amines.

L'utilisation d'un révélateur tel que la ninhydrine<sup>[18,19]</sup> est ensuite nécessaire. Une étude comparative a permis de mettre en avant des réactifs usuels spécifiques à l'histamine : la fluorescamine, l'*ortho*-diacétylbenzène et la *para*-nitroaniline.<sup>[20]</sup>

Dans l'ensemble des cas, la détection peut être semi-quantitative en comparant l'intensité de la couleur de la tache correspondant à l'échantillon par rapport à celle d'un standard à la concentration maximum indiquée par la norme (Section 1.1.4.3). Cette méthode est rapide avec un temps de migration inférieur à 2 h, une analyse simultanée de huit échantillons par plaque et de plusieurs plaques dans une même chambre de migration. Elle est peu coûteuse et peut être utilisée comme un test de dépistage préalable aux analyses plus spécifiques. Le résultat permet de mettre en évidence la présence d'échantillon sans histamine. Cependant, la précision de cette technique ne permet pas d'avoir des résultats fiables pour des échantillons dont le taux d'histamine est proche du seuil maximal.

Pour améliorer ces résultats et pouvoir analyser semi-quantitativement plusieurs amines, des systèmes à deux dimensions ont été réalisés.<sup>[21]</sup>

Dans cette continuité, le développement d'instruments pour l'application automatisée d'échantillons et la densitométrie ont permis d'avoir des résultats quantitatifs et similaires à ceux obtenus avec des chromatographies plus poussées comme la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)<sup>[22]</sup>

ou la Chromatographie en phase Gazeuse (GC) (Sections 1.1.4.4.9 et 1.1.4.4.8). Appelée maintenant chromatographie sur couche mince à haute performance ou High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC), cette CCM quantitative permet la détermination simultanée de nombreuses AB. Après extraction, les amines sont dérivées avec du chlorure de dansyle,<sup>[15,22]</sup> de la ninhydrine,<sup>[15]</sup> ou de la *para*-nitroaniline.<sup>[15]</sup> Cette méthode présente les mêmes avantages que la CCM classique : rapide, peu coûteuse, sensible et reproductible. De plus, elle est quantitative et permet également d'analyser simultanément un grand nombre d'échantillons.

#### 1.1.4.4.3 Méthodes enzymatiques

À l'origine très imprécise, cette technique utilisant un système enzymatique séquentiel en deux étapes a été développée par LERKE et al.<sup>[23]</sup> Premièrement, la diamine oxydase catalyse la dégradation de l'histamine en imidazole acétaldéhyde avec la formation de peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde est ensuite décomposé par la peroxydase en présence du « leucocrystal violet » conduisant à son changement de couleur (incolore à violet) dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'histamine. Elle peut être évaluée visuellement pour un résultat qualitatif ou par spectrométrie d'absorbance pour une quantification avec des limites de détection et de quantification respectivement de 0,5 mg/kg et de 1,5 mg/kg.<sup>[24]</sup> Cette technique dispose également d'une bonne corrélation avec la méthode AOAC fluorimétrique<sup>[25]</sup> comme le montre BEN-GIGIREY et al. ( $r^2 = 0,829$ ).<sup>[26]</sup>

Pour simplifier et compléter cette procédure, des biocapteurs<sup>[27]</sup> ont été développés afin de mesurer l'augmentation de la teneur en oxygène observée lors de la libération du peroxyde d'hydrogène. De plus, ils permettent l'analyse de plusieurs AB en simultané et peuvent être réutilisés jusqu'à soixante fois. Malheureusement leur non-commercialisation rend leur utilisation et leur démocratisation difficile.

Le principal problème de cette procédure est la surestimation du taux d'histamine en présence d'autres AB. En effet, l'imidazole acétaldéhyde réagit avec certaines AB telles que l'agmatine, la putrescine et la cadavérine.<sup>[26]</sup>

Très récemment, BIOO SCIENTIFIC CORP. a développé un test quantitatif rapide pour la détermination de l'histamine dans les produits de mer.<sup>[28]</sup> Ce kit est conforme aux directives et méthodes approuvées par l'AOAC ( $r^2 > 0,99$ ) et possède une limite de détection de 0,9 mg/kg et une limite de quantification de 2,6 mg/kg bien inférieure à celle d'autres méthodes dites de routine.<sup>[29]</sup> La réactivité croisée du test a été testée sur quatorze autres AB. Pour douze de ces AB, aucune interférence avec l'histamine n'a été observée (surestimation inférieure à 0,5 %) tandis que l'agmatine (4,1 %) et la putrescine (0,9 %) ont eu un impact légèrement plus élevé. De plus, sa durée de conservation a été élargie à un an à 4 °C.

#### 1.1.4.4.4 Méthodes immuno-enzymatiques

En 1995, un kit de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée ou Enzyme-Linked Immuno Assay (ELISA) a été développé pour la mesure de l'histamine dans les aliments,<sup>[30]</sup> suivi d'autres kits permettant des analyses qualitatives ou quantitatives.<sup>[31]</sup> Il s'agit d'un dosage sur support solide utilisant des anticorps spécifiques à cette AB.

Historiquement, il s'agissait de dosages indirects (ou par compétition)<sup>[30,31]</sup> qui, depuis, ont été remplacés par des dosages directs.<sup>[32,33]</sup>

Pour un dosage indirect, un réactif (dont la nature diffère en fonction du kit) est ajouté après l'extraction de l'histamine de la matrice afin de former des conjugués d'histamine. Ces derniers sont ensuite placés dans des puits de microtitrage ou des tubes de réaction recouverts d'anticorps spécifiques. Puis, une quantité connue de conjugué d'histamine marqué comme la Phosphatase alcaline<sup>[31]</sup> est ajoutée. Une compétition s'instaure alors au niveau des sites de reconnaissance des anticorps vis à vis de l'histamine présente dans l'échantillon, et le standard marqué. Les puits sont ensuite lavés après incubation afin de stopper la compétition entre l'histamine et le standard marqué. En fin de réaction, l'intensité de la couleur développée est inversement proportionnelle à la quantité d'histamine non marquée dans l'échantillon.

Dans le cas d'un dosage direct, la procédure est beaucoup plus simple ; l'extrait contenant de l'histamine est mis en contact avec l'anticorps préalablement

fixé sur un support puis couplé à un chromophore.<sup>[32]</sup> Il est également possible de fixer l'histamine sur un support solide puis de la mettre en présence de l'anticorps marqué.<sup>[33]</sup>

En fonction du kit choisi, différentes gammes de concentration peuvent être étudiées. Pour tous les systèmes, une lecture spectrophotométrique et une comparaison à une droite d'étalonnage permet de fournir une valeur quantitative fiable. Cette méthode est rapide, très sensible et spécifique, permettant l'analyse simultanée de plusieurs échantillons dont le nombre est limité par celui des puits par plaque.

#### 1.1.4.4.5 Méthodes d'analyse par injection en flux continu (FIA)

Beaucoup moins démocratisée, cette technique analytique est basée sur l'injection microfluidique d'échantillons dans une solution support qui le transporte jusqu'au détecteur. La réponse du détecteur (absorbance, fluorescence, capteur) permet d'aboutir à une droite d'étalonnage quantifiant l'analyte cible.

Dans le cas de l'histamine, une détection fluorimétrique a été développée pour fournir un criblage rapide. La limite de quantification se situe entre 0,8 et 2,4 mg/kg et le seuil maximal de détection atteint 340 mg/kg.<sup>[34]</sup> C'est une méthode quantitative très rapide (une minute par extrait) qui nécessite toutefois un équipement coûteux.

#### 1.1.4.4.6 Méthodes par Électrophorèse Capillaire (CE)

Ce test est basé sur l'Électrophorèse Capillaire (CE) avec une détection par Ultra-Violet (UV) (mono longueur d'onde<sup>[35]</sup> ou à barrette de diodes<sup>[36]</sup>), par Spectrométrie de Masse (SM)<sup>[37]</sup> ou encore par fluorescence moléculaire.<sup>[38,39]</sup> Les AB sont extraites avec une solution acide avant d'être injectées sous pression dans un capillaire. La séparation est réalisée avec l'aide d'un micro-courant à une température contrôlée. Dans les procédures par fluorescence moléculaire, les AB sont dérivées avant l'injection.

Une amélioration récente consiste à réaliser non plus de la CE mais de l'électrochromatographie.<sup>[40]</sup> C'est une méthode hybride entre la CE haute performance et la HPLC qui présente une très grande efficacité.

#### 1.1.4.4.7 Méthodes par fluorescence moléculaire

Cette méthode sensible et reproductible a été validée et standardisée par l'AOAC (AOAC Official method 977.13).<sup>[25,41]</sup> En amont de l'analyse, l'histamine est extraite au méthanol puis purifiée sur une colonne échangeuse d'anions de type Bio-Rad AG 1-X8, afin d'éliminer les substances interférentes comme les protéines ou les acides gras avant d'être dérivée avec l'*ortho*-phthalaldéhyde (OPA).<sup>[25,42,43]</sup> D'autres chromophores sont possibles dont la fluoescamine<sup>[44]</sup> et le chlorure de dansyle.<sup>[16]</sup> Enfin, la fluorescence du composé est mesurée par spectrophotométrie.

Par ailleurs, des adduits ont été formés en présence de composés thiolés tels que le 2-mercaptoéthanol,<sup>[45,46]</sup> l'acide 3-mercaptopropionique<sup>[45]</sup> ou la N-acétylcystéine<sup>[45]</sup> afin de créer des complexes OPA/thiol/histamine plus stables et ainsi élargir la zone de pH nécessaire à la formation de composés fluorescents.<sup>[45]</sup> Des travaux similaires ont été réalisés sur l'agmatine, la cadavérine et la putrescine et sur les acides aminés dont elles sont issues comme l'histidine (pour l'histamine), l'arginine, la lysine et l'ornithine.<sup>[46,47]</sup>

#### 1.1.4.4.8 Méthodes par Chromatographie en phase Gazeuse (GC)

L'histamine ainsi que les AB sont extraites au méthanol puis dérivées par réaction avec l'anhydride pentafluoropropionique.<sup>[48]</sup>

Suite à l'amélioration de la qualité des colonnes GC, HWANG et al.<sup>[49]</sup> ont décrit une méthode d'analyse directe de l'histamine en utilisant une colonne GC de polarité intermédiaire (CP-SIL 19CB) avec une limite de détection pour l'histamine aux alentours de 5 mg/kg.

Cette méthode est sensible, reproductible et rapide, une analyse complète de l'extrait nécessitant environ 10 min. L'avantage évident de cette technique GC (avec et sans dérivation) réside dans la possibilité de caractériser un panel d'AB en une seule analyse<sup>[50]</sup> que ce soit par détection par ionisation de flamme,<sup>[51]</sup> ou par SM.<sup>[52]</sup>

#### 1.1.4.4.9 Méthodes par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

Les études par HPLC diffèrent selon la colonne employée ou encore le type de détection.<sup>[50]</sup> Lors d'une détection par fluorescence moléculaire, une dérivation en pré ou post-colonne des AB est nécessaire et fait aussi appel aux dérivés comme l'OPA,<sup>[42,53]</sup> la fluoescamine<sup>[54]</sup> et le chlorure de dansyle<sup>[55]</sup> (Section 1.1.4.4.7). Les autres méthodes de détection n'impliquent pas de dérivation pré ou post colonne pour l'histamine et peuvent être réalisées avec un détecteur à barrette de diodes<sup>[56]</sup> ou encore avec un spectromètre de masse.<sup>[57]</sup>

À la fin des années 80', l'Europe a souhaité uniformiser la quantification de l'histamine dans les poissons responsables de la scombroidose. C'est dans le cadre de la quatrième thématique du programme « Community research and coordination programmes in the fisheries sector (FP2-FAR) »<sup>[58]</sup> que le projet européen « Biogenic amines in fishery products »<sup>[59]</sup> a vu le jour avec pour objectif de standardiser la méthode analytique des AB dans les produits de la pêche. En amont de ce projet, des laboratoires de référence ont comparé et standardisé les techniques d'analyses essentiellement de type HPLC afin de permettre une normalisation. La présence d'histamine dans les produits de la pêche a été déterminée pour des taux de 25 à 100 mg/kg (après dopage) avec une précision, une répétabilité et une reproductibilité acceptables. Puis, ces procédures HPLC normalisées pour la détermination des AB dans les produits de la pêche ont été appliquées pour des tests inter-laboratoires dans l'optique d'éprouver les méthodes. Le protocole retenu s'est alors orienté vers une dérivation post-colonne avec l'OPA dont l'emploi donnait de bonnes fiabilité et reproductibilité pour déterminer les seuils d'histamine dans les aliments.<sup>[60]</sup>

De par sa spécificité, sa rapidité, sa précision et le nombre de composés pouvant être analysés simultanément, de nombreux laboratoires utilisent cette technique comme référence afin de comparer leurs propres méthodes.<sup>[16,22]</sup> Aujourd'hui, elle correspond à la méthode européenne de référence analytique du règlement (CE) n° 2073/2005.<sup>[10,61-63]</sup>

Depuis, les méthodes Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance (UHPLC) tendent à remplacer celles par HPLC car elles sont plus rapides et plus

sensibles.<sup>[64]</sup>

## 1.2 L'*ortho*-phthalaldéhyde (OPA) et ses dérivés

### 1.2.1 Généralité

L'*ortho*-phthalaldéhyde ou 1,2-benzènedialdéhyde (OPA) (Figure 1.4) se présente sous la forme d'une poudre jaune pâle et se conserve entre 2 °C et 8 °C. Sa légère instabilité nécessite une recristallisation dans un solvant organique comme l'hexane<sup>[65]</sup> avant toute utilisation.

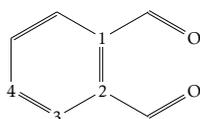


FIGURE 1.4 – Formule semi-développée de l'*ortho*-phthalaldéhyde (OPA).

### 1.2.2 Formes de OPA en milieu aqueux

Soluble dans de nombreux solvants, l'OPA a tout particulièrement été étudié dans l'eau<sup>[66-70]</sup> où quatre formes ont pu y être observées (Figure 1.5).

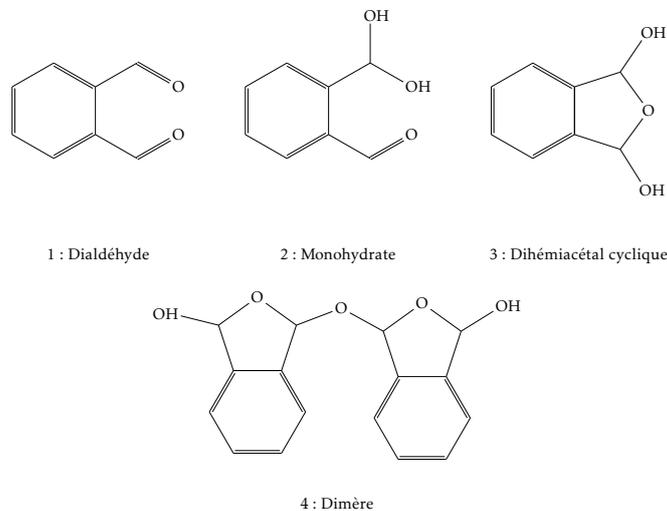


FIGURE 1.5 – Représentation des formes de l'OPA issues de la littérature.<sup>[66,67]</sup>

Les trois premières formes de type dialdéhyde, monohydrate et dihémiacétal cyclique sont en équilibre (Figure 1.6)<sup>[66]</sup> et représentent les formes les plus étudiées.<sup>[68-70]</sup>

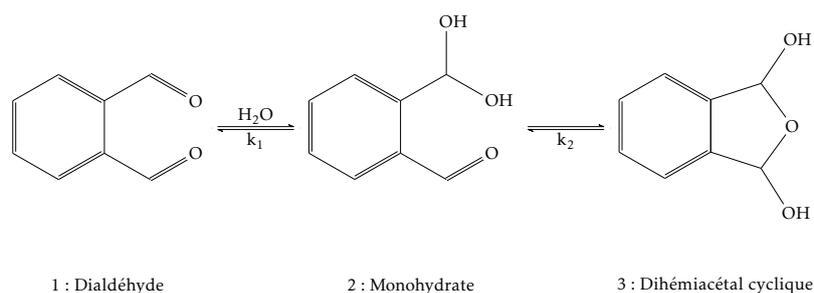


FIGURE 1.6 – Équilibre des structures dialdéhyde, monohydrate et dihémiacétal cyclique de l'OPA dans l'eau.

Une étude polarographique a montré que l'équilibre entre les formes 1 et 2 s'établit très lentement alors que le second équilibre entre les formes 2 et 3 est plus rapide.<sup>[71]</sup> Les constantes d'équilibre associées sont  $k_1 \approx 3$  et  $k_2 \approx 2$ <sup>[66]</sup> déplaçant l'équilibre est en faveur de la forme 3.

Suite à ce résultat, ZHU et al.<sup>[68]</sup> ont réalisé des études par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)  $^1\text{H}$  à 400 MHz et par spectroscopie Ultra-Violet (UV). L'étude RMN a été menée dans le chloroforme deutéré et l'eau lourde et montre que l'OPA n'existe que sous sa forme dialdéhydrique (Forme 1) dans le  $\text{CDCl}_3$ , tandis que dans le  $\text{D}_2\text{O}$ , cette forme dialdéhydrique reste minoritaire vis-à-vis des isomères *cis* et *trans* de la forme dihémiacétal cyclique (Forme 3). Ces deux résultats ont été confirmés par spectroscopie UV, dans le dichlorométhane où deux bandes ont été observées. La première à  $\lambda = 258\text{ nm}$  est caractéristique du cycle benzénique et la seconde à  $\lambda = 300\text{ nm}$  est spécifique aux fonctions aldéhydiques. Dans l'eau, ces bandes sont également présentes mais d'intensité plus faible et un léger épaulement apparaît sur la première.

Enfin, le dimère (Forme 4) a été décrit par KATSUJISA dans un brevet de 2012.<sup>[67]</sup> À  $0^\circ\text{C}$ , il s'obtient spontanément à partir de la forme dihémiacétal cyclique (Forme 3) couplée à une seconde molécule d'OPA sous sa forme dialdéhydrique.

### 1.2.3 Dérivés de l'OPA

Malgré la fonctionnalisation possible du cycle aromatique, on retrouve peu d'études concernant l'OPA modifié en position 3 ou 4. En effet, les composés

substitués en position 3 sont absents de la littérature et ceux en position 4 ne sont que très légèrement décrits. Seuls les 4-halogéno-OPA,<sup>[69,70]</sup> le 4-nitro-OPA,<sup>[70]</sup> le 4-méthoxy-OPA (4-MO-OPA),<sup>[72,73]</sup> le 4-hydroxy-OPA (4-HO-OPA)<sup>[72,74-76]</sup> sont référencés.

#### 1.2.4 Applications de l'OPA

L'OPA est utilisé principalement en milieu hospitalier comme désinfectant de matériels médicaux et chirurgicaux ne pouvant pas être thermiquement stérilisés. Il est considéré comme une sérieuse alternative à l'utilisation du glutaraldéhyde.<sup>[77]</sup>

En parallèle, l'OPA est très employé en chimie analytique en amont de méthodes chromatographiques de séparation comme l'HPLC<sup>[42]</sup> comme réactif de dérivation pour l'analyse des composés aminés<sup>[66]</sup> (acides aminés, protéines, AB), et thiolés (Section 1.1.4.4.7).

Enfin, l'OPA est également utilisé en synthèse organique comme synthon de base pour de nombreuses familles de composés.<sup>[66]</sup> À titre d'exemple, il entre dans les synthèses d'imines,<sup>[78]</sup> d'isoindoles<sup>[79]</sup> et de macrocycles.<sup>[80]</sup> Par ailleurs, des polymérisations cationiques de l'OPA ont été décrites afin de former des polymères de poly-phthalaldéhyde.<sup>[81]</sup>

Concernant les rares dérivés d'OPA décrits actuellement, le 4-hydroxy-*ortho*-phthalaldéhyde (4-HO-OPA) est noté comme synthon de base pour la formation d'anti-tumoraux<sup>[74]</sup> et de cucurbit-[6]-uriles.<sup>[76]</sup> Enfin, le 4-méthoxy-*ortho*-phthalaldéhyde (4-MO-OPA) reste uniquement référencé comme réactif pour le dosage par fluorescence moléculaire de traces d'ammonium dans l'eau de mer et d'eau douce.<sup>[73]</sup> Les faibles rendements des synthèses de ces 4-HO-OPA et 4-MO-OPA limitent néanmoins leur potentiel applicatif.

#### 1.2.5 OPA et histamine

Très utilisé en tant qu'agent de dérivation pour l'étude par fluorescence moléculaire de l'histamine (Section 1.1.4.4.7), le mécanisme de formation du complexe OPA-histamine est toutefois peu référencé. Seules deux équipes<sup>[82,83]</sup> en 1984 et 1987 s'y sont intéressées.

D'après les travaux de RÖNNBERG et al.,<sup>[82]</sup> les complexes ont été réalisés à froid ( $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) à pH de 12,5 dans du méthanol. Puis après 10 h à  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  et sous atmosphère inerte, le mélange a été acidifié à pH de 2,5 et lyophilisé avant d'être purifié. Par la suite, les différents composés ont été isolés par séparation sur colonnes chromatographiques Sephadex G 25 et HPLC-UV semi-préparative. Enfin, les analyses par HPLC-fluorescence, par RMN et par SM ont permis de caractériser les structures représentées dans la Figure 1.7. Suite à cela, RÖNNBERG et al. ont proposé l'hypothèse d'un complexe fluorescent formé en milieu basique (Forme présente en milieu basique :  $F_{base}$ ) capable de se transformer en milieu acide (Forme présente en milieu acide :  $F_{acide}$ ). Le complexe  $F_{acide}$  a une stœchiométrie OPA-histamine [2 : 1]. Le mécanisme de formation proposé se déroule en cinq étapes (Figure 1.7).

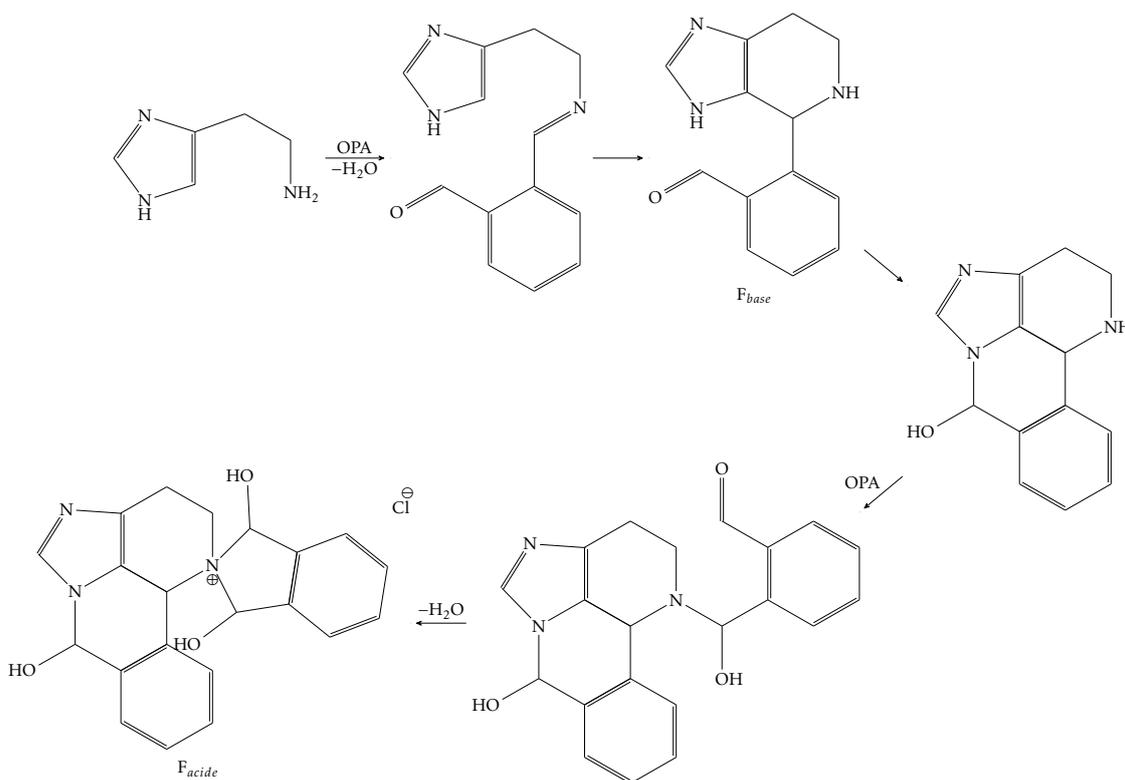


FIGURE 1.7 – Mécanisme réactionnel de complexation entre l'OPA et l'histamine proposé par RÖNNBERG et al..<sup>[82]</sup>

Trois ans plus tard, ces travaux ont été repris par YOSHIMURA et al.<sup>[83]</sup> pour attester du mécanisme de formation de  $F_{base}$  et  $F_{acide}$ . Une analyse cinétique de la formation et de la dégradation du complexe fluorescent formé en milieu basique puis acidifié a été effectuée. Toutefois, dans ces travaux, la forme basique ne correspond pas au précurseur de la forme acide. En effet, les temps de réaction et les rendements observés en fonction de la quantité initiale d'OPA tendent à indiquer la présence d'un composé non-fluorescent à l'origine des deux formes. Un nouveau mécanisme de formation a donc été proposé (Figure 1.8).

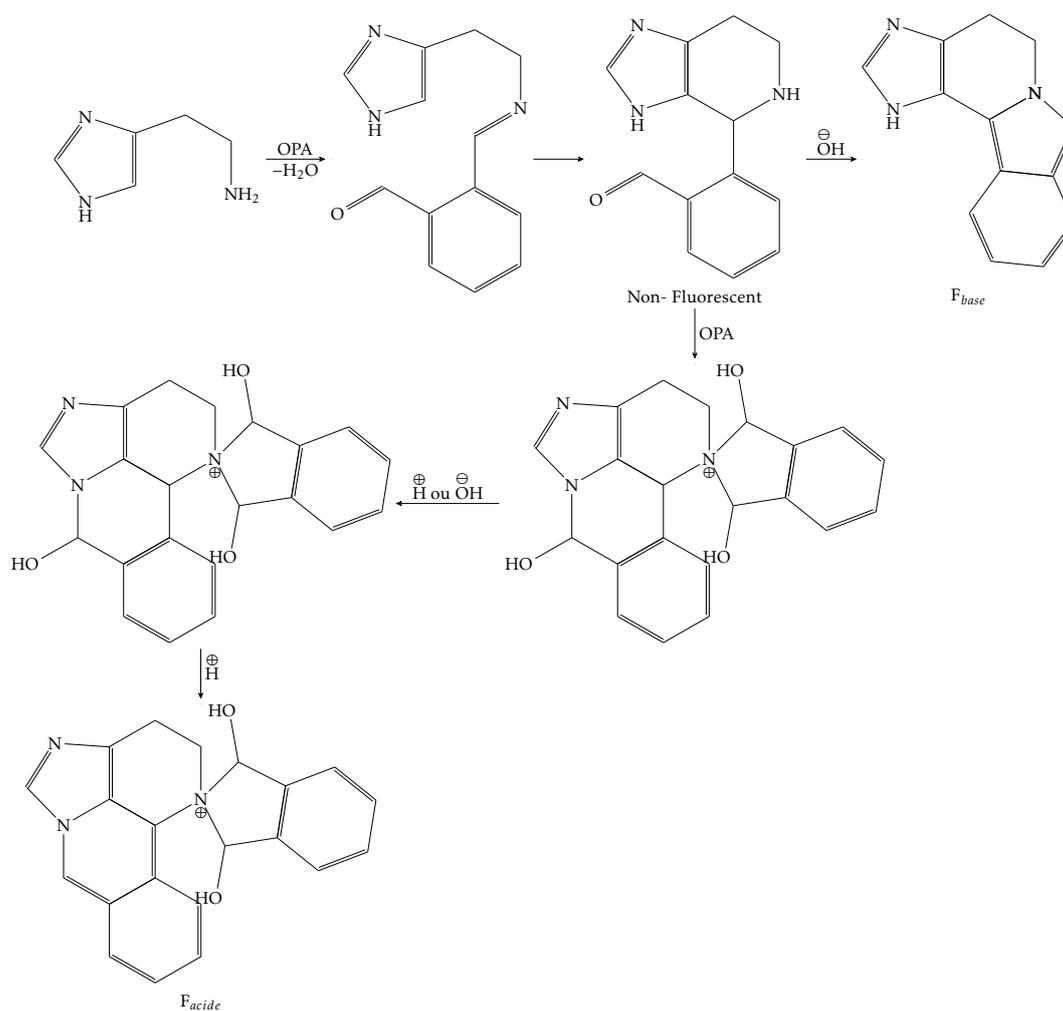


FIGURE 1.8 – Mécanisme réactionnel de complexation entre l'OPA et l'histamine proposé par YOSHIMURA et al..<sup>[83]</sup>

## 1.3 Les Quantum Dots (QD)

### 1.3.1 Généralité et structure

Les Quantum Dots (QD), appelés parfois boîtes quantiques, sont des nanoparticules fluorescentes de semi-conducteurs habituellement sphériques.<sup>[84]</sup> Ils sont composés de cristaux et possèdent des propriétés photophysiques très spécifiques dépendant à la fois de la nature des semi-conducteurs utilisés mais surtout de leur taille (Section 1.3.2.1). Ainsi, en faisant varier ces deux paramètres, il est possible d'avoir une infinité de combinaison et donc d'obtenir une multitude de propriétés différentes. De cette manière, toutes les longueurs d'onde d'émission dans le visible sont théoriquement atteignables. (Figure 1.9).



FIGURE 1.9 – QD avec émission progressive du violet au rouge © Antipoff - Wikimedia Commons, CC-by-3.0.<sup>[85]</sup>

#### 1.3.1.1 Structure électronique et propriétés des semi-conducteurs

Les matériaux peuvent être classés en trois groupes : isolants, semi-conducteurs et conducteurs en fonction de leur conductivité (Figure 1.10).

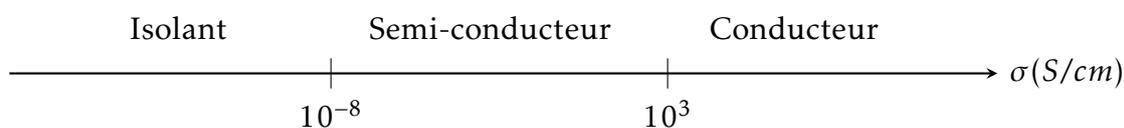


FIGURE 1.10 – Classement des isolants, semi-conducteurs et conducteurs en fonction de leur conductivité  $\sigma$ .

Les propriétés électriques de conduction des matériaux sont liées au remplissage des différentes bandes d'énergie. Trois bandes doivent être considérées : une bande d'énergie basse (bande de valence), une bande d'énergie haute (bande de conduction) et une zone entre les deux (bande interdite). La conduction est le résultat du déplacement d'un électron de la bande de valence vers un trou de la bande de conduction à travers la bande interdite. Cette paire électron-trou est appelée exciton.

Dans le cas des isolants, la bande de conduction ne contient pas d'électron alors que la seconde est remplie, la différence d'énergie entre les deux est donc très importante. Le passage d'un électron de la bande de valence à la bande de conduction demande donc une énergie importante de l'ordre de 9 eV rendant la formation d'un courant électrique impossible.

Dans le cas des conducteurs, les deux bandes sont partiellement pleines et interpénétrées et un apport en énergie plus faible est suffisant pour permettre le passage d'un électron à l'état excité. Enfin, les semi-conducteurs sont isolants à froid et leur conduction augmente avec la température, nécessitant qu'une énergie de 1 à 3 eV afin de passer la bande interdite.<sup>[86]</sup>

Les QD sont composés de nanocristaux semi-conducteurs dont le diamètre est compris entre 1 et 10 nm. Dans cette gamme de taille, le niveau d'énergie est considéré comme discret au lieu de continu. Cela s'appelle le « quantum ». Puisque l'énergie de la bande interdite est déterminée par la taille et la composition des QD, les propriétés physiques peuvent être ajustées de manière contrôlée en gardant à l'esprit que plus le diamètre de la nanoparticule est petit, plus la bande interdite est grande et donc plus l'énergie nécessaire pour la traverser l'est également.

### 1.3.1.2 Structure d'un QD

Les QD sont des nanostructures le plus souvent sphériques et constitués au minimum d'un cœur photoactif inorganique, d'au moins deux semi-conducteurs, et d'un revêtement extérieur de ligands organiques (Figure 1.11) permettant de stabiliser le cœur et empêchant l'agrégation de plusieurs nanoparticules. Les cœurs les plus utilisés sont composés de cadmium, de sélénium et de tellure (CdSe et CdTe).

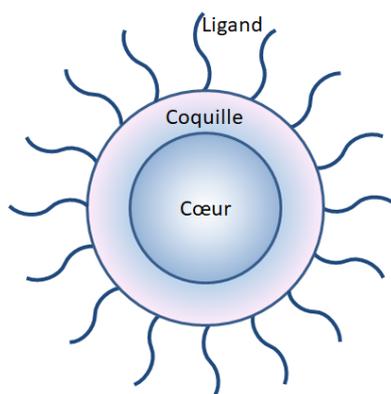


FIGURE 1.11 – Représentation schématique d'un QD.

En réalité, les QD ne sont pas parfaitement sphériques car leur surface cristalline présente de nombreux défauts. Appelés « pièges à électrons », ils sont dus à des lacunes ou des erreurs de compositions engendrées par l'inhomogénéité des cristaux de QD. Ces irrégularités diminuent fortement le rendement quantique de fluorescence (Section 1.3.2.4) et modifient de ce fait les propriétés des QD (Section 1.3.2.3).<sup>[87]</sup>

La diminution de ces imperfections permet d'augmenter la stabilité et d'améliorer les propriétés photophysiques. Pour cela, il est possible de couvrir le cœur par une ou plusieurs coquilles de matériaux semi-conducteurs distincts<sup>[88,89]</sup> dont l'épaisseur est maîtrisable lors de la synthèse. Certaines études<sup>[89]</sup> montrent que lorsque le cœur est recouvert progressivement d'une coquille, la photoluminescence augmente jusqu'à un maximum avant de diminuer à l'ajout suivant de ligand. Dans le même temps, la longueur d'onde d'excitation est légèrement décalée vers le rouge suite à un phénomène de confinement (Section 1.3.2.1).<sup>[89]</sup>

Selon la combinaison de cœur/coquille, trois types de QD peuvent être obtenus<sup>[90]</sup> (Figure 1.12).

**Type I** La coquille est composée de semi-conducteurs avec une plus grande bande interdite. L'exciton est confiné dans le cœur<sup>[90]</sup> (Exemple CdSe/ZnS).

**Type I inversé** C'est la symétrie du type I. Le cœur a une bande interdite plus grande que la coquille (Exemple CdS/CdSe). Ce type de système a des propriétés photophysiques médiocres nécessitant d'ajouter une deuxième coquille (de type I) (CdS/CdSe/ZnS).<sup>[91]</sup>

**Type II** Les deux bandes du cœur sont soit au dessus des deux bandes de la coquille, soit en dessous (Exemple CdTe/CdSe). Leur fluorescence peut se rapprocher vers le proche infrarouge (jusqu'à 800 nm). L'exciton peut être à la fois dans le cœur et la coquille augmentant ainsi sa durée de vie.<sup>[88]</sup>

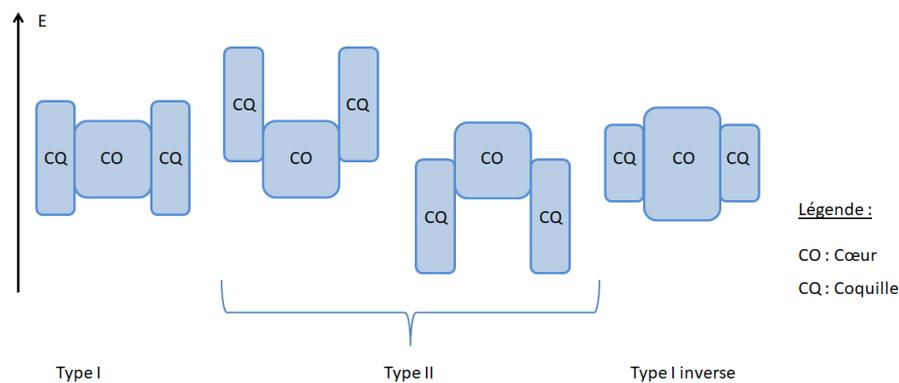


FIGURE 1.12 – Représentation schématique des bandes interdites des trois types de QD.

Un autre paramètre à considérer pour l'ajout d'une coquille est le désaccord de maille entre les deux semi-conducteurs qui se calcule grâce au paramètre de maille ( $a$ ). Par exemple, ce paramètre est de 12 % pour CdSe/ZnS avec  $a_{CdSe} = 4,31 \text{ \AA}$  et  $a_{ZnS} = 3,82 \text{ \AA}$ .<sup>[89]</sup> Si le désaccord est trop grand, le cœur peut être comprimé par la coquille et ainsi créer des défauts et donc diminuer le rendement quantique de fluorescence (effet de saturation). L'ajout d'une coquille intermédiaire (avec un désaccord de maille plus faible à la fois avec le cœur et avec la coquille extérieure) permet de pallier à ce problème. Des systèmes comme CdSe/CdS/ZnS et CdSe/ZnSe/CdS ont alors été développés.<sup>[88]</sup> Ces montages cœur/coquille 1/coquille 2 donnent des rendements quantiques de fluorescence moléculaire plus importants que ceux comportant une seule coquille. En effet, ils permettent d'avoir une coque plus épaisse (et donc plus stable) sans perte de luminescence.

Dans le cas des QD biocompatibles utilisés en biologie, ceux-ci doivent avoir au minimum quatre couches : un cœur et une coque inorganique protégés par une coque et des ligands organiques<sup>[92]</sup> augmentant leur stabilité et limitant les risques de relargage de métaux.<sup>[93]</sup>

## 1.3.2 Propriétés photophysiques des QD

### 1.3.2.1 Importance du diamètre des QD

Pour des semi-conducteurs usuels, l'énergie nécessaire au passage d'un électron de la bande de valence à la bande de conduction correspond à une énergie au moins égale à la bande interdite. En passant au niveau nanométrique, la structure en bandes devient une structure avec des niveaux discrets. De plus, l'énergie nécessaire pour traverser la bande interdite varie inversement à la taille du QD.<sup>[94,95]</sup> En effet, plus les nano-objets sont petits plus les excitons sont confinés et subissent des contraintes dues aux dimensions du matériau. L'énergie cinétique dans le semi-conducteur est donc plus importante ce qui augmente la bande interdite. Ce phénomène correspond au confinement quantique. En contrôlant la taille du QD, ses propriétés photophysiques vont l'être également.

BRUS a déterminé la relation entre le diamètre et la bande interdite en approximant un rayon de Bohr de semi-conducteur sphérique inférieur au rayon de Bohr de l'exciton (Équation 1.1).<sup>[95,96]</sup>

$$E_g = E_g^{massif} + \frac{\hbar^2 \pi^2}{2r^2} \left( \frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) - \frac{1,8e^2}{\epsilon_r \epsilon_0} \frac{1}{r} + \text{termes négligeables}$$

Équation 1.1 – Équation permettant le calcul de l'énergie de la bande interdite de nanocristaux sphériques.

Avec  $E_g$  l'énergie de la bande interdite (ou gap band),

$E_g^{massif}$  l'énergie de la bande interdite du semi-conducteur massif,

$\hbar$  la constante de Planck ( $\hbar = 1,0546.10^{-34} J.s$ ),

$r$  (en nm) la taille de l'exciton (appelé le rayon de Bohr),

$m_e^*$  et  $m_h^*$  (sans dimension) les masses effectives d'un électron et d'un trou,

$\epsilon_r$  la permittivité diélectrique statique du matériau relative par rapport à celle du vide  $\epsilon_0$  ( $\epsilon_0 = 8,854.10^{-12} F/m$ ).

Le second terme (en  $1/r^2$ ) est le terme de confinement quantique calculé selon l'hypothèse d'un puits de potentiel sphérique dans lequel sont confinés les électrons et les trous. Le troisième terme (en  $1/r$ ) décrit l'attraction coulombienne de l'exciton.

Le rayon de Bohr ( $r$ ) est déterminé selon l'Équation 1.2. Il peut être obtenu à partir du modèle de Bohr de l'atome d'hydrogène et les paramètres du matériau semi-conducteur du nanocristal.

$$r = 0,053 \epsilon_r m_e \left( \frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right)$$

Équation 1.2 – Expression du rayon de Bohr (en nm).

Avec  $m_e^*$  et  $m_h^*$  (sans dimension) les masses effectives d'un électron et d'un trou,  $\epsilon_r$  la permittivité diélectrique statique du matériau relative par rapport à celle du vide  $\epsilon_0$  ( $\epsilon_0 = 8,854.10^{-12} F/m$ ).

### 1.3.2.2 Absorption

D'après la Section 1.3.2.1, les propriétés photophysiques des QD dépendent de leur diamètre responsable du confinement quantique.<sup>[97]</sup> L'absorption d'un photon par le QD n'est possible que si l'énergie est supérieure à la bande interdite. Le spectre d'absorption d'un QD large et étendu sur une plage allant de l'ultraviolet au visible selon la taille de la nanoparticule est très caractéristique (Figure 1.13).

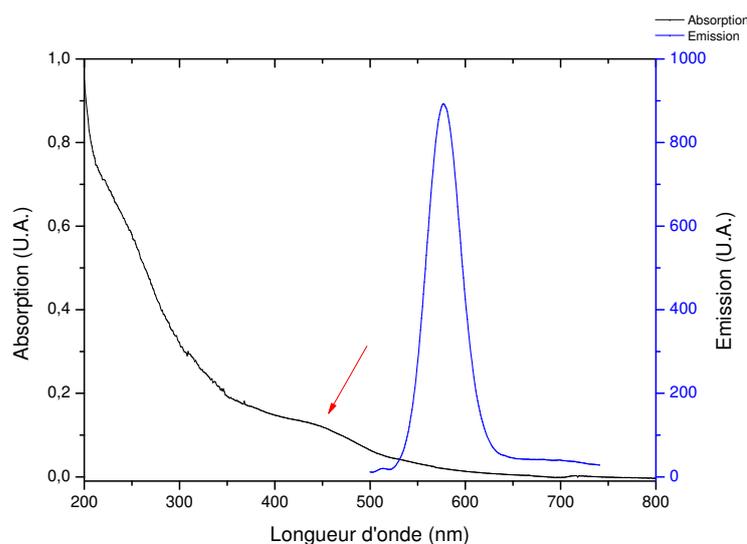


FIGURE 1.13 – Exemple de spectres d'absorption et d'émission d'un QD de CdSe.

L'état excité d'énergie le plus faible est caractérisé par un épaulement au seuil d'absorption dont la forme et la largeur dépendent de la distribution de tailles dans l'échantillon et cet épaulement correspond à la transition optique du premier exciton (pic excitonique) dont la position est inversement proportionnelle à l'énergie de la bande interdite selon l'Équation 1.3.

$$\lambda_{exciton} = \frac{hc}{E_g}$$

Équation 1.3 – Expression de la longueur d’onde du pic excitonique (en nm).  
avec  $\lambda_{exciton}$  la longueur d’onde du premier pic excitonique.

Une diminution du diamètre du QD déplace le système vers des énergies plus élevées et des longueurs d’onde d’émission plus faibles.

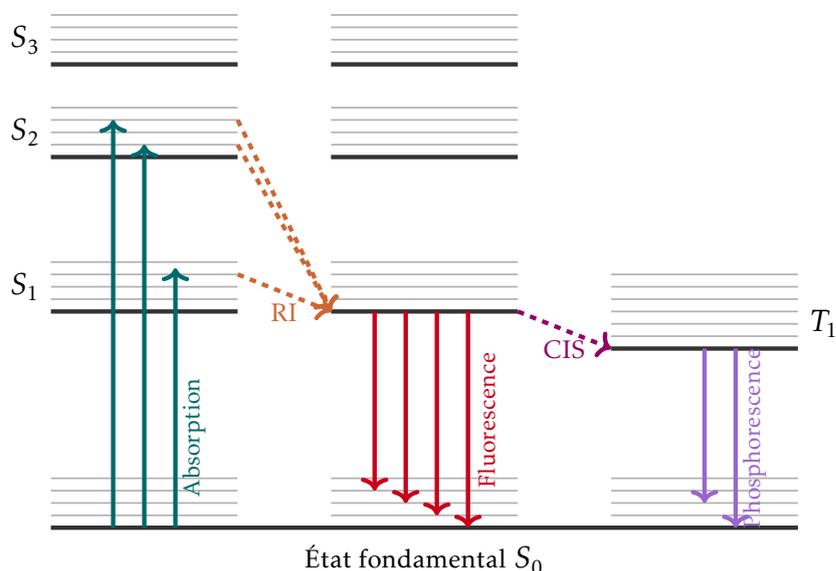
### 1.3.2.3 Photoluminescence

Suite à l’absorption d’un photon ayant une énergie supérieure à la bande interdite, il y a la formation d’un exciton faisant ainsi passé le QD dans un état excité. Il tend donc à retourner à son état énergétique fondamental avec l’émission de fluorescence par un processus radiatif issu de la recombinaison de la paire électron-trou dont l’énergie est égale à la bande interdite. Comme cette dernière est proportionnelle à la taille du QD, le spectre d’émission en dépend également. Il est déplacé de quelques nanomètres vers les longueurs d’onde plus élevées par rapport au pic excitonique. Cette différence, appelée déplacement de STOKES, a pour origine la structure électronique du semi-conducteur.<sup>[98]</sup>

À titre d’exemple, le premier état excité pour le CdSe correspond à  $S_1$  qui est divisé en cinq sous-niveaux vibrationnels. Lors de l’absorption d’un photon, l’électron se situe sur l’état de plus haute énergie (appelé état numéro 5) puis redescend ensuite sur le troisième niveau selon une relaxation non-radiative pour retrouver à l’état fondamental par une recombinaison radiative fluorescente. C’est le faible écart entre les états 5 et 3 qui est responsable du déplacement de Stokes. Néanmoins, pour les QD et contrairement aux fluorophores classiques, ce déplacement est sans conséquence car la bande d’absorption est très large. L’excitation peut donc être effectuée à une longueur d’onde éloignée de celle de l’émission de fluorescence évitant ainsi les interférences.

Dans le cas général, après un apport d’énergie suffisant, l’électron passe de son état fondamental  $S_0$  à un état excité  $S_n$ . En effet, même si l’état  $S_1$  est le plus proche, il est possible de passer à un état supérieur si l’énergie fournie est suffisante. Des conversions internes ont alors lieu pour revenir au niveau  $S_1$  avant

une ultime recombinaison radiative permettant de revenir à l'état fondamental avec émission de fluorescence (Figure 1.14).



Légende

-  Reconversion énergétique Interne, Transition non radiative (ex :  $S_2 \rightarrow S_1$ ).
-  Conversion énergétique Inter-Système, Transition non radiative (ex :  $S_1 \rightarrow T_1$ ).

FIGURE 1.14 – Diagramme simplifié de PERRIN-JABLONSKI.

Une raie de spectre d'émission fine et symétrique indique une faible dispersité de taille de QD dans l'échantillon<sup>[99]</sup> (Figure 1.13) ce qui est un des avantages par rapport aux fluorophores organiques qui ont très souvent des spectres larges<sup>[100]</sup> et qui présentent parfois un recouvrement partiel des spectres d'excitation et d'émission.<sup>[100]</sup> Ainsi, contrairement aux fluorophores classiques, des mélanges de QD émettant à des longueurs d'onde différentes peuvent être ciblés et observés simultanément. Par exemple, pour un QD CdSe, les particules émettent du bleu au rouge avec respectivement des diamètres de 2 à 7 nm<sup>[101]</sup>

De même, les émissions peuvent varier énormément pour des QD de même diamètre mais de compositions différentes. Par exemple, pour des nanoparticules de 5 nm, un cœur de CdSe provoque une émission à une longueur d'onde proche

de 620 nm alors que pour les cœurs de CdTe et CdSeTe, les valeurs se situent respectivement à 710 et 800 nm.<sup>[101]</sup>

La forme des QD a également un effet sur les spectres d'émission ; Hu et al.<sup>[102]</sup> ont montré que les QD de formes allongées émettent une lumière polarisée linéaire alors que les QD sphériques ont des émissions circulaires polarisées ou non.<sup>[103]</sup>

Parmi leurs propriétés remarquables, les QD ont une photostabilité et une durée de vie de fluorescence beaucoup plus importantes (respectivement jusqu'à cent et dix fois) par rapport aux fluorophores conventionnels grâce à leur faible photoblanchiment.<sup>[104]</sup>

Une propriété dites de scintillation se retrouve spécifiquement chez les QD. Ce phénomène correspond à une succession d'états brillants et éteints sous une excitation continue qui est due aux défauts de surface.<sup>[105]</sup>

Cependant, dans la très large majorité des utilisations, le scintillement est indécélable car moyenné sur l'échantillon. Seule une diminution du rendement quantique de fluorescence est observée (Section 1.3.2.4).

#### 1.3.2.4 Rendement quantique de fluorescence

L'émission de fluorescence peut être quantifiée par le rendement quantique de fluorescence  $\Phi_F$  correspondant à l'efficacité de la fluorescence par rapport aux autres voies de désexcitation. C'est une grandeur sans dimension comprise entre 0,05 et 1 qui évalue le ratio entre les recombinaisons radiatives (fluorescentes) et les non-radiatives (Équation 1.4).

$$\Phi_F = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}}$$

Équation 1.4 – Expression du rendement quantique de fluorescence  $\Phi_F$ .

Dans le cas des QD, il dépend très fortement de la structure. Des défauts de surface, une mauvaise stabilisation (par les ligands) ou une dégradation due au temps ou au mode de conservation peuvent très fortement diminuer ce rendement. Pour mesurer ce rendement, une méthode fiable consiste à utiliser un fluorophore déjà caractérisé ayant une valeur de  $\Phi_F$  connue et normée.<sup>[106]</sup>

Ce standard doit avoir des zones d'absorbance et d'émission très proche de celle de l'échantillon. Une autre solution consiste à utiliser la méthode de mesures ponctuelles. Elle a l'avantage d'être plus rapide que la méthode comparative (Équation 1.5).<sup>[107-109]</sup>

$$\Phi_{QD} = \Phi_{Std} \frac{I_{QD} A_{Std} \eta_{QD}^2}{I_{Std} A_{QD} \eta_{Std}^2}$$

Équation 1.5 – Expression du rendement quantique de fluorescence  $\Phi_{QD}$ .

Avec  $\Phi_{QD}$  le rendement quantique,

$I_{QD}$  l'intensité d'émission intégrée du QD mesurée,

$I_{Std}$  l'intensité d'émission intégrée du standard mesurée,

$\eta_{QD}$  l'indice de réfraction du solvant de la solution de QD,

$\eta_{Std}$  l'indice de réfraction du solvant de la solution de standard,

$A_{QD}$  l'absorbance de la solution de QD,

$A_{Std}$  l'absorbance de la solution de standard.

Le rendement quantique des QD sont jusqu'à vingt fois plus lumineux que les fluorophores classiques.<sup>[99]</sup> En contrepartie, leur rendement quantique  $\Phi_{QD}$  est inférieur à celui de certains des meilleurs composés organiques (Tableau 1.2).

TABLEAU 1.2 – Comparaison du rendement quantique de fluorescence de standards et QD commerciaux.<sup>[86]</sup>

Composé	Excitation (nm)	Émission (nm)	$\Phi_F$
Dans le domaine du visible			
Fluoresceine <sup>1</sup>	500	544	0,97
Cy3 <sup>1</sup>	560	575	0,09
CdS	350–470	370–500	≤ 0,6
CdSe	450–640	470–660	0,65-0,85
CdTe	500–700	520–750	0,3-0,75
Dans le domaine du proche IR			
Cy7 <sup>2</sup>	747	774	0,24
IR125 (ICG) <sup>1</sup>	786	825	0,05
PbS <sup>3</sup>	800–3000	>900	0,70
PbSe <sup>3</sup>	900–4000	>1,000	0,81

<sup>1</sup> dans l'éthanol

<sup>2</sup> dans l'eau

<sup>3</sup> dans l'hexane

### 1.3.2.5 Comparaison des propriétés des QD avec celles des fluorophores classiques

Selon RESCH-GENGER et al.,<sup>[86]</sup> un fluorophore approprié doit répondre à un certain nombre d'exigences. Il doit entre autres être :

**- facilement excitable et détectable**

sans excitation simultanée de la matrice biologique

**- brillant**

c'est à dire posséder un coefficient d'absorption molaire et un rendement quantique de fluorescence élevés à la longueur d'onde d'excitation choisi

**- soluble**

dans les tampons et tous milieux biologiques pertinents

**- stable**

dans les conditions d'utilisation (pH, température, sels) et à la dégradation photo-chimique

**- fonctionnalisé**

pour réagir avec un site spécifique

**- capable de supporter le multiplexage et l'amplification de son signal**

pour obtenir le maximum d'informations

Comme indiqué dans le Tableau 1.3, les QD présentent de nombreux avantages comme une importante photo-stabilité, une durée de vie jusqu'à 100 fois plus élevée que les fluorophores organiques, et une solubilité facilement ajustable en fonction des ligands utilisés. De plus, il est plus facile de choisir une longueur d'onde d'excitation ayant un effet minime sur l'environnement grâce au spectre d'absorption large.<sup>[86]</sup> Enfin, une détection multiple et un ciblage peuvent être réalisés simultanément si une ou plusieurs biomolécules distinctes de fonctionnalités différentes sont couplées à un même QD.

TABLEAU 1.3 – Comparaison des propriétés des QD avec celles des fluorophores organiques.<sup>[86]</sup>

Propriétés	Fluorophores organiques	QD
Spectre d'absorption	Bandes discrètes	Augmentation constante vers la zone d'UV
Coefficient d'absorption molaire	$2,5 \cdot 10^4 - 2,5 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$10^5 - 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour le 1 <sup>er</sup> pic excitonique
Spectre d'émission	Asymétrique	Symétrique
$\Phi_F$	0,5 – 1,0 (visible) 0,05 – 0,25 (proche IR)	0,1 – 0,8 (visible) 0,2 – 0,7 (proche IR)
Temps de vie de la fluorescence	1–10 ns, Décroissance mono-exponentielle	10–100 ns, Décroissance multi-exponentielle
Solubilité et dispersibilité	Contrôle par motif de substitution	Contrôle par ligands
Liaison à des biomolécules	Avec des groupes fonctionnels (Plusieurs fluorophores pour une seule biomolécule)	Avec la chimie des ligands (Plusieurs biomolécules pour un seul QD)
Taille	$\approx 0,5 \text{ nm}$	1–10 nm
Stabilité thermique	Dépend du type de fluorophore	Haute (dépend de la coquille et des ligands)
Stabilité photochimique	Suffisante pour des applications en visible	Haute en visible et en proche IR
Toxicité	Très variable	Encore peu connu
Reproductibilité (propriétés optiques et chimiques)	Bonne (Structures commerciales)	Limité par les structures complexes (Peu de systèmes commerciaux)
Multiplexage spectral	4 couleurs maximum	5 couleurs
Multiplexage à temps de vie	Possible	Possible entre QD et fluorophores organiques
Amplification du signal	Techniques décrites	Pas encore démontré

### 1.3.3 Synthèses des QD

#### 1.3.3.1 Synthèse, croissance et stabilisation d'un QD

Les QD faisant partie de la famille des cristaux, leurs synthèses suivent les principes de nucléation et de croissance associés à ce type de matériau. La formation de cristaux (massifs ou nanométriques) consiste en un processus de précipitation d'une phase solide dans un solvant. Ce processus comporte une étape de nucléation suivie par plusieurs étapes de croissance des particules et se termine par une maturation (Figure 1.15).

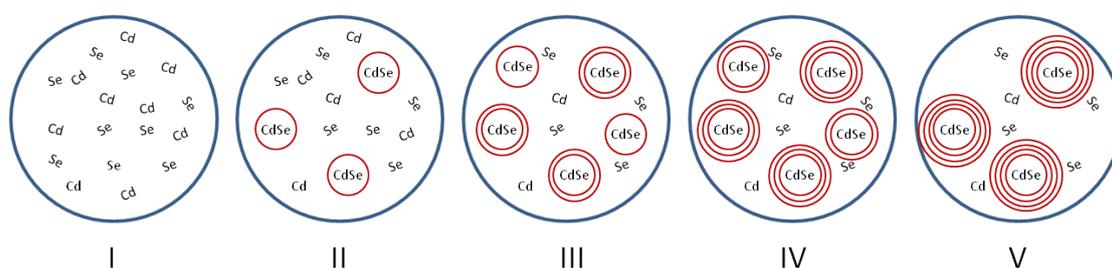


FIGURE 1.15 – Schéma de la formation des QD.

**Étape I Saturation** Cette première étape consiste à saturer la solution en semi-conducteurs (Ici Cd et Se). Deux méthodes sont possibles : une dissolution à température élevée des réactifs suivie d'un refroidissement ou une addition de réactifs en quantité supérieure au seuil de nucléation.

**Étape II Nucléation** Elle correspond à la formation des premiers germes de nanoparticules.

**Étape III Croissance et Nucléation** Elle débute immédiatement après la formation des germes. Durant cette étape, la solution est encore saturée. La croissance consiste en l'addition successive d'espèces en solution à la surface des particules qui permettent leur développement (ajout de couches successives sur la nanoparticule). En parallèle, la nucléation continue (formation d'autres germes).

**Étape IV Croissance** Lorsque la concentration du soluté passe sous le seuil de nucléation, la nucléation s'arrête. Les particules continuent leur développement par addition jusqu'à atteindre un équilibre entre les concentrations

des espèces précipitées.

**Étape V Maturation d'OSTWALD** Lorsque les concentrations en réactifs passent sous le seuil de précipitation, les espèces restées en solution ne participent plus à la croissance mais les plus petites particules vont se dissoudre à nouveau en faveur du développement des plus importantes. C'est un processus spontané thermodynamiquement favorable. Ces particules ont un rapport surface/volume beaucoup plus faible que celles de petites tailles. Elles vont être moins déstabilisées par les atomes de surface. Plus la particule est imposante, plus sa structure est stable et plus son état énergétique sera faible.<sup>[110]</sup>

**Étape V' facultative Croissance secondaire** Parfois, une particule stable se combine avec un germe instable. Cette croissance par agrégation de plusieurs particules est appelée croissance secondaire.

Par ailleurs, les particules sont cinétiquement instables à cause de leurs dimensions nanométriques et doivent donc être stabilisées. Dans le cas des QD, ce sont des ligands qui servent d'agents de protection de surface. Le choix de ces derniers est primordial car ils déterminent la solubilité et la dispersion de la particule dans un solvant donné. De plus, ils empêchent les agglomérations en formant une barrière énergétique qui bloquent les attractions de VAN DER WAALS et les attractions magnétiques.

Deux types d'interactions ligand/particule existent :

**fortes** stabilisation forte (exemple : ligand soufré - Cadmium)

**faibles** stabilisation faible mais permet des modifications de ligands et donc des propriétés (exemple : ligand oxydé - Cadmium)

Par ailleurs, il est important d'avoir un échantillon le plus monodispersé possible (Section 1.3.2.3). Pour répondre à ce critère, la période de nucléation doit être la plus courte possible et être suivie d'une croissance lente<sup>[111]</sup> ce qui implique une mise en contact très rapide des réactifs dans le milieu réactionnel. Cette injection va amener brutalement les concentrations de réactifs au dessus de la limite de solubilité et favoriser la nucléation. Toutefois, il est très important de pouvoir contrôler la dispersion de taille pour un échantillon aux propriétés homogènes.

### 1.3.3.2 Voies de synthèses

Il existe principalement deux types de synthèses chimiques de QD. Le premier, dit « synthèse organométallique », permet d'obtenir des composés organosolubles. Le second, appelé « synthèse en milieu aqueux », donne des composés hydrosolubles. Ces synthèses en phase liquide monophasique sont utilisées pour obtenir des échantillons mono-dispersés dont la taille est contrôlée. Pour cela, des paramètres réactionnels comme le choix du ligand, la température, le temps, le pH ou encore le solvant doivent être maîtrisés.

#### 1.3.3.2.1 Synthèse organométallique

La première synthèse efficace de QD a été publiée par MURRAY et al.<sup>[112]</sup> et présente une synthèse contrôlée de CdS, CdSe et CdTe. Elle a permis, pour la première fois, d'obtenir des nanocristaux avec une faible dispersion de taille et de bonnes propriétés photophysiques grâce à l'utilisation de ligands. Depuis des méthodes similaires ont été développées pour des QD comportant d'autres éléments (InP,<sup>[113]</sup> PbSe<sup>[114]</sup>).

Les synthèses de QD à base de CdSe ont particulièrement été étudiées car ce type de QD couvre une plage très large d'émission.<sup>[101]</sup> Elles consistent à injecter rapidement et à haute température (environ 150 ° C à 360 °C) des précurseurs de sélénium dans une solution de cadmium. Le solvant étant un coordinant organique, il joue à la fois le rôle de solvant réactionnel et de ligand stabilisateur. Généralement, c'est un mélange d'alkylphosphines à longue chaîne (exemple trioctylphosphine (TOP)), d'oxydes d'alkylphosphines (exemple : oxyde de trioctylphosphine (TOPO)) et parfois d'alkylamines (exemple : hexadécylamine (HDA)). L'utilisation d'oxyde d'alkylphosphine avec une chaîne plus courte favorise une croissance accélérée. À température élevée (230°C pour l'oxyde de tributylphosphine), il devient alors difficile de maîtriser le diamètre des QD. Les QD sont généralement dispersés à l'issue de la synthèse dans un solvant organique tel que le butanol, l'hexane, le toluène ou le chloroforme.

Un anti-solvant plus polaire que le solvant de stockage est ensuite utilisé (méthanol ou acétone) afin d'éliminer l'excès de ligands organiques et agir comme un sélecteur de taille. Ainsi, son addition augmente la polarité moyenne

du mélange et le revêtement d'oxyde d'alkylphosphine perd sa fonction de stabilisant stérique. Les QD de grande taille, soumis aux forces d'attraction de VAN DER WAALS, commencent à s'agréger puis à précipiter alors que les QD de plus petites tailles resteront en solution dans le surnageant. Moduler le rapport volumique solvant/anti-solvant facilitera ainsi l'obtention de la fraction de taille souhaitée. En exemple, l'hexadécylamine est utilisée à la fois comme solvant de coordination durant la synthèse et comme sélecteur de taille.<sup>[115]</sup> Son rapport volumique avec l'oxyde de tri-n-octylphosphine influence les étapes de nucléation et de croissance conduisant à des dispersions de plus faible taille. L'échantillon est d'autant plus monodispersé que l'opération est reconduite. En contrepartie, une diminution du rendement quantique et de la solubilité des QD peut être observée.<sup>[116]</sup>

Au cours de la synthèse du cœur de semi-conducteurs, de nombreux paramètres influencent la structure du QD et donc ses propriétés. Des études indiquent que la température ainsi que le rapport entre les précurseurs de cadmium et de sélénium affecteraient à la fois la taille moyenne des particules et la distribution de taille de l'échantillon.<sup>[117]</sup> Une diminution de ce rapport Cd/Se favoriserait également une croissance des nanocristaux en forme allongée.<sup>[118]</sup>

Cette synthèse organométallique utilise des solvants coordinants, composés toxiques, chers, nocifs, pyrophoriques et explosifs.<sup>[111]</sup> Des méthodes alternatives sans phosphine ont donc été développées en employant des solvants non-coordinants (alcane ou alcène à longue chaîne comme le 1-octadécène)<sup>[119]</sup> ou des mélanges complexes comme les paraffines liquides.<sup>[120]</sup> Contrairement aux solvants coordinants, ces solvants ne servent pas de ligands et le contrôle de la croissance et de la taille est réalisé par un changement de type et de concentration de ligands. En parallèle, TALAPIN et al.<sup>[115]</sup> ont introduit un composant de coordination supplémentaire (l'hexadécylamine) pour réduire la distribution de taille lors de la croissance des particules.

Dans l'ensemble des cas, la synthèse organométallique permet d'obtenir les paramètres optimaux pour tout type de QD grâce au panel de précurseurs, et de solvants organiques coordinants ou non. Sa polyvalence fait qu'elle est très répandue et est, de plus, toujours étudiée. Mais l'utilisation de ligands hydrophobes rend plus difficile leur utilisation en biologie rendant nécessaire

une étape supplémentaire afin de les disperser en milieu aqueux (Section 1.3.3.3).

Des synthèses alternatives dites hydrothermales permettent d'éviter cette étape additionnelle en préparant des QD directement solubles en phase aqueuse.

#### 1.3.3.2.2 Synthèse en milieu aqueux

Ces synthèses sont réalisées dans l'eau avec des ligands hydrosolubles devant présenter les propriétés suivantes :

- stabiliser le système,
- résister au photoblanchiment,
- posséder des fonctionnalisations,
- faciliter l'obtention de petites tailles de QD.

Dans ce type de synthèse, la dispersion des QD dans le milieu aqueux peut être obtenue, soit par stabilisation électrostatique par échange entre ligands chargés de faible chaîne hydrocarbonée, soit par stabilisation stérique avec des polymères.<sup>[86]</sup> Dans le premier cas, les structures de QD (cœur/coquille/ligands) peuvent être de petites tailles mais ils ont tendance à s'agréger dans les tampons à force ionique élevée et sont très sensibles au changement de pH. De plus, la présence de charges favorise la formation de liaisons non spécifiques avec la matrice. Dans le deuxième cas, l'absence de charges permet l'utilisation de tampon et les changements de pH mais la présence des polymères volumineux augmente fortement la taille totale du système rendant plus difficile son absorption cellulaire. Il n'y a donc pas de ligand « idéal » pour les applications biologiques.

En 1998, BRUCHEZ JR. et al.<sup>[100]</sup> ont utilisé de la silice pour rendre des QD de CdSe/CdS solubles dans l'eau, tandis que les équipes de CHAN et NIE ont utilisé des ligands thiolés (l'acide mercaptoacétique<sup>[99]</sup>) sur des QD CdSe/ZnS en se basant de l'affinité entre le thiol et le zinc. Ces ligands forment des liaisons covalentes avec la surface des semi-conducteurs. L'inconvénient de ces techniques porte sur les conditions standards de pression et de température d'ébullition de l'eau qui fait que les QD obtenus sont couramment peu cristallins et possèdent une forte dispersion de taille qui peut nécessiter une étape de séparation (Section 1.3.3.2.1).

### 1.3.3.2.3 Synthèses alternatives

Afin d'améliorer les propriétés des QD hydrosolubles, des synthèses en milieu aqueux ont été mises au point à plus haute température en utilisant notamment des autoclaves. Ces synthèses « hydrothermale » permettent d'augmenter la cinétique de formation et la cristallinité des QD. Ainsi, les rendements quantiques sont améliorés et les échantillons sont moins dispersés.<sup>[121]</sup>

De même, la Synthèse organique assistée par micro-onde ou Microwave Assisted Organic Synthesis (MAOS) en phase aqueuse<sup>[122]</sup> a permis d'améliorer la cinétique de croissance, la monodispersité et le rendement quantique. En effet, la chaleur homogène au sein du milieu permet une croissance des QD plus régulière.<sup>[122]</sup>

Dans le cas de ces méthodes alternatives (hydrothermale ou Synthèse organique assistée par micro-onde ou Microwave Assisted Organic Synthesis (MAOS)), la possibilité de monter en température par rapport à un reflux aqueux « classique » permet une hydrolyse partielle des ligands thiolés.<sup>[123]</sup> Le soufre libéré s'incorpore alors dans les mailles de CdSe ou dans les sites vacants de sélénium faisant apparaître un alliage de type CdSe/CdS (pour le cas de CdSe).<sup>[124]</sup> La présence du soufre modifiant la structure électronique du cœur, la bande interdite résultante va en être affectée et le QD final absorbera et émettra dans la zone du rouge/proche Infrarouge (IR).<sup>[123]</sup> BAILEY et NIE<sup>[125]</sup> ont obtenu des alliages CdSeTe homogène ou avec cœur plus riche en tellure selon les rapports de précurseurs utilisés.

Enfin, les techniques sonochimiques permettent d'obtenir des QD organosolubles ou hydrosolubles. MURCIA et al.<sup>[126]</sup> ont mis en évidence un meilleur contrôle de la croissance avec des températures de réaction significativement plus faibles que lors des synthèses thermiques et des rendements quantiques de fluorescence plus importants.<sup>[126]</sup>

Selon le type de QD choisi (organosoluble ou hydrosoluble), différentes approches sont possibles. Dans le premier cas, des solvants organiques à haut point d'ébullition (octadécane) sont utilisés pour solubiliser les précurseurs puis dilués avec un solvant à faible point d'ébullition (toluène) pour les rendre moins visqueux. Durant la synthèse, la nébullisation du solvant à bas point

d'ébullition concentre les précurseurs dans le mélange organique à haut point d'ébullition favorisant la formation des nanoparticules.<sup>[127]</sup> Les avantages majeurs de cette technique sont sa reproductibilité et sa rapidité par rapport à la synthèse organométallique ainsi que la formation d'alliages.<sup>[128]</sup>

Dans le cas de solutions aqueuses, le mécanisme de formation des QD reste similaire. Les réactions sonochimiques s'effectuent à l'intérieur des bulles de cavitation pour les molécules volatiles et à l'interface pour celles à plus haute température d'ébullition. Les précurseurs de QD étant moins volatiles que l'eau, ils se concentrent donc à l'interface pour réagir entre eux.<sup>[129]</sup>

Pour ces trois types de synthèses alternatives en milieu aqueux, plusieurs ligands soufrés fonctionnalisés par un acide carboxylique (acide mercaptopropionique<sup>[130]</sup>), par une amine (cystéamine<sup>[131]</sup>) ou encore par un alcool (mercaptoéthanol<sup>[132]</sup>) sont référencés. Cependant, ces QD ont une durée de conservation très courte (généralement moins d'une semaine) en raison de la faible liaison entre le mono-thiol et la couche externe du QD.<sup>[133]</sup> L'ajout de chaîne hydrocarbonée plus longue (acide mercaptoundecanoïque<sup>[134]</sup>) ou l'ajout des ligands en excès<sup>[135]</sup> permet d'améliorer ce temps de conservation. Suite à cela, MATTOUSSI et al.<sup>[136]</sup> ont mis au point des QD avec l'acide dihydrolipoïque (DHLLA) à base de thiol allongeant leur durée de conservation à 1 ou 2 ans. Néanmoins, le rendement quantique est diminué en raison de la densité plus faible sur la surface des nanocristaux.

Pour augmenter ce rendement, des travaux de fonctionnalisation ont été réalisés pour former des polymères amphiphiles<sup>[137]</sup> ou à base de siloxane<sup>[138]</sup> qui vont par la suite être encapsulés. En contrepartie, la taille totale augmente considérablement.

#### 1.3.3.2.4 Synthèse d'une coquille

La synthèse du cœur peut être suivie par celle d'une ou plusieurs coquilles de semi-conducteur selon l'une des deux méthodes existant actuellement.

La première, très utilisée avec les cœurs de CdSe, est appelée méthode à croissance au goutte-à-goutte. Comme son nom l'indique, elle consiste à injecter au goutte-à-goutte la solution des précurseurs de la coquille à une température

réactionnelle légèrement inférieure à celle du cœur, évitant la nucléation de ces nouveaux éléments. L'inconvénient principal de cette méthode est la perte possible de la monodispersité.<sup>[139]</sup>

Le QD de type cœur/coquille le plus commun est CdSe/ZnS<sup>[89]</sup> dont la coquille de ZnS a été obtenue à l'origine par injection d'un mélange de diéthylzinc et hexaméthyl-disilathiane à haute température (entre 140 et 220°C selon la taille du cœur<sup>[140]</sup>).

La seconde méthode, appelée protocole de croissance « Successive Ion Layer Adsorption and Reaction (SILAR) » permet de conserver la monodispersité grâce à une croissance plus homogène. Il consiste à construire la coquille par l'ajout de monocouches successives<sup>[141]</sup> et non plus par injection continue comme précédemment. Les cations et les anions sont ajoutés alternativement pour former une à une chacune des monocouches jusqu'à avoir l'épaisseur voulue et entrecoupées de temps de pause. Ce système permet d'avoir de bons rendements quantiques de fluorescence et une bonne résistance à l'échange de ligands (Section 1.3.3.3.1).

### 1.3.3.3 Dispersion des QD hydrophobes en milieu aqueux

#### 1.3.3.3.1 Échange de ligand à la surface des QD

La stratégie d'échange de ligand, comme son nom l'indique, consiste à substituer les ligands hydrophobes du QD par d'autres ligands comportant une fonction d'ancrage (par exemple un thiol) et une fonctionnalisation hydrophile.

Une variante consiste à modifier le ligand hydrophobe pour le rendre hydrophile après la formation du QD comme la silylation de surface avec pour exemple, un ligand de type mercaptotriméthoxysilane. Puis, dans une seconde étape, les méthoxysilanes sont hydrolysés en silanol afin d'obtenir des siloxanes. Ces derniers forment alors une coquille stable et soluble en phase aqueuse qui permet la dispersion des QD dans le milieu.<sup>[138]</sup>

Ces méthodes sont peu utilisées par rapport à la synthèse hydrothermale qui donne un meilleur rendement quantique de fluorescence pour le même QD. Cette baisse de fluorescence est liée à la polarité du solvant aqueux et à l'augmentation de la fragilité de la surface du QD du au déplacement des ligands.<sup>[142]</sup>

### 1.3.3.3.2 Encapsulation des QD hydrophobes

La méthode d'encapsulation du QD (ligand compris) avec une coque organique permet également de faire passer les QD hydrophobes en solution aqueuse. Cette stratégie peut s'effectuer de deux manières : soit par l'utilisation de nanosphères de silice,<sup>[143]</sup> soit par l'introduction de molécules amphiphiles.<sup>[144]</sup> Ainsi, les propriétés initiales des QD sont conservées puisque la structure n'est pas altérée.

Pour incorporer des QD dans des nanosphères de silice, les QD sont mis en réaction avec l'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS) puis hydrolysés dans des conditions douces et contrôlées afin de former des nanosphères de silice enrobant les QD, selon la méthode de STÖBER.<sup>[143]</sup> Ainsi, les QD sont parfaitement isolés du milieu aqueux et ont de meilleures propriétés optiques que les QD initiaux. En général, une nanosphère contient plusieurs QD.

La deuxième stratégie d'encapsulation emploie des molécules amphiphiles afin de former des micelles (Figure 1.16).

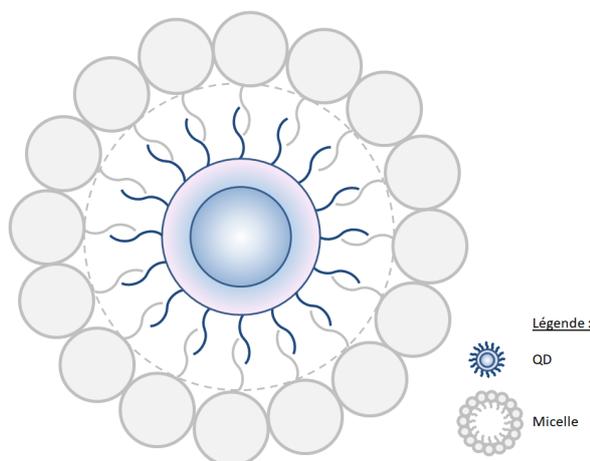


FIGURE 1.16 – Schéma d'un QD cœur/coquille hydrophobe encapsulé dans une micelle.

Ainsi, les chaînes alkyles forment des liaisons de VAN DER WAALS avec les ligands hydrophobes (exemple : TOP ou TOPO) et la tête polaire permet la formation de micelles dispersables en milieu aqueux. Des oligomères amphiphiles peuvent être utilisés car ils sont capables de former une couche organique épaisse très réticulée permettant ainsi une très bonne passivation de la surface des QD et

une stabilité du système sur une plus large plage de pH. Le problème principal de ces techniques avec tensioactifs ou oligomères réside dans la taille finale du système suite à l'encapsulation. Des molécules amphiphiles plus complexes permettent également de garder les propriétés du QD en limitant l'augmentation du diamètre des nano-objets (exemple : phosphoglycérolipides<sup>[145]</sup>). Actuellement les phospholipides sont les plus intéressants puisqu'ils permettent également de diminuer les interactions non spécifiques grâce à leur forte densité.

#### 1.3.3.4 Fonctionnalisation

Comme détaillé précédemment (Sections 1.3.3.2.1 et 1.3.3.2.2), le choix du ligand dépend directement de la méthode de synthèse choisie et doit également être adapté aux applications visées. Il contrôle en effet les propriétés de dispersion du QD et gouverne, de par sa nature chimique, le type de greffage sur une structure annexe au QD.

Le ligand est généralement composé de trois parties distinctes (Figure 1.17). La première (F1) correspond à la fonction d'ancrage qui assure la liaison QD/ligand. C'est traditionnellement un oxyde de phosphine pour les synthèses organométalliques ou un thiol pour les synthèses hydrothermales.

Le deuxième élément du ligand est un espaceur composé le plus souvent d'une chaîne aliphatique ou aromatique permettant d'adapter la taille du ligand. Enfin, la seconde extrémité comporte une fonction (F2) qui assure à la fois la dispersion dans le solvant spécifique désiré et le greffage du QD sur une structure distincte. Cette fonction correspond majoritairement à un acide carboxylique, une amine ou un alcool.

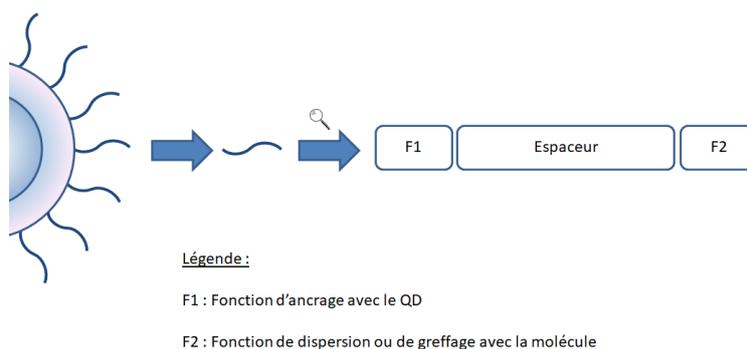


FIGURE 1.17 – Schéma d'un ligand de QD en vue d'une fonctionnalisation.

En biologie, le QD est souvent fonctionnalisé par des anticorps, des protéines ou des peptides afin d'obtenir une reconnaissance de la structure ciblée. Deux types de liaison entre le QD et la cible peuvent exister. Pour des QD préalablement chargés durant leur synthèse avec pour exemple des acides amines protonés, des interactions électrostatiques sont créées pour former des liaisons non-covalentes avec des composés également chargés.<sup>[146]</sup> Une autre stratégie consiste à utiliser des biomolécules (protéines) qui ont des affinités avec les semi-conducteur du QD (ex : acide carboxylique avec cadmium et zinc<sup>[147]</sup>). Les QD peuvent également former des liaisons covalentes. Pour cela, ils sont généralement fonctionnalisés par des carboxylates se complexant avec les amines de la biomolécule.

### 1.3.4 Techniques de caractérisation et quantification

Pour caractériser un échantillon de QD, plusieurs paramètres doivent être déterminés (taille, forme et structures internes de chaque couche).

#### 1.3.4.1 Détermination du diamètre du cœur et de la concentration de la solution par spectroscopie UV

##### 1.3.4.1.1 Détermination du diamètre du cœur à partir du spectre d'absorption

La longueur d'onde du premier pic excitonique visualisée sur le spectre d'absorption permet d'accéder, par calcul, au diamètre du cœur. En effet, d'après Yu et al.,<sup>[148]</sup> le diamètre  $D$  d'un cœur de QD de CdSe peut être exprimé par une fonction polynomiale empirique et ne peut donc être utilisée que pour des diamètres de 1 à 9 nm (Équation 1.6).

$$D = (1,6122 \times 10^{-9})\lambda_{max}^4 - (2,6575 \times 10^{-6})\lambda_{max}^3 + (1,6242 \times 10^{-3})\lambda_{max}^2 - (0,4277)\lambda_{max} + 41,57$$

Équation 1.6 – Calcul du diamètre  $D$  du cœur de CdSe à partir de  $\lambda_{max}$  du pic excitonique.

Avec  $D$  le diamètre en nm,

$\lambda_{max}$  la longueur d'onde en nm du premier pic excitonique.

### 1.3.4.1.2 Détermination du coefficient d'extinction molaire à partir du spectre d'absorption

Ces travaux<sup>[148]</sup> ont également déterminé que le coefficient d'extinction molaire  $\epsilon$  des solutions de CdSe dépend de la taille des QD suivant l'Équation 1.7. En revanche, il n'est pas influencé par la nature des ligands, le rendement quantique ou les résidus de synthèses. Là aussi, la validité de cette équation empirique impose que la gamme étudiée soit de 1 à 7 nm.

$$\epsilon = 5857D^{2,65}$$

Équation 1.7 – Calcul du coefficient d'extinction molaire  $\epsilon$  en fonction du diamètre  $D$  du cœur de CdSe.

Avec  $\epsilon$  le coefficient d'extinction molaire en  $\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ,  
 $D$  le diamètre en nm.

### 1.3.4.1.3 Détermination de la concentration de la solution à partir du spectre d'absorption

Enfin, selon la loi de BEER-LAMBERT, l'absorbance  $A$  au seuil d'absorption (ici du premier pic excitonique) et le coefficient d'extinction molaire  $\epsilon$  sont liés à la concentration de la solution avec l'Équation 1.8. Elle ne dépend que du cœur de semi-conducteur.

$$C = \frac{A \cdot \lambda_{max}}{\epsilon \cdot l}$$

Équation 1.8 – Calcul de la concentration à partir du spectre d'absorption.

Avec  $C$  la concentration molaire en  $\text{M}$ ,

$A$  l'abondance au niveau de  $\lambda_{max}$ ,

$\epsilon$  le coefficient d'extinction molaire en  $\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ,

$l$  la longueur du chemin optique en cm.

### 1.3.4.2 Techniques de caractérisation structurale

La Diffraction des Rayons X (DRX), la Microscopie Électronique en Transmission (TEM) ou encore la Diffusion dynamique de la lumière (DLS) permettent d'accéder à des caractéristiques physico-chimique complémentaires à savoir la structure cristalline, la forme ou le diamètre de la nanoparticule. De même, des analyses par Spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES) ou RMN vont préciser les natures des composés inorganiques (cœur et coquille) et organiques (ligands) (Tableau 1.4).

TABLEAU 1.4 – Méthodes permettant de caractériser les QD.

Méthode	Caractérisation
DRX	Structure cristalline
TEM	Diamètre, Forme, Structure cristalline
DLS	Diamètre hydrodynamique
ICP-AES	Composition en semi-conducteurs
RMN	Nature des ligands organiques

### 1.3.5 Applications des QD

De nombreuses applications font appel aujourd'hui aux QD.

La plus connue du grand public concerne les diodes électroluminescentes (LED). LIN et al.<sup>[149]</sup> ont ainsi associé des QD de CdSe/CdS/ZnS émettant dans le vert et le rouge avec des copeaux de GaN émettant dans le bleu conduisant aux LED utilisés dans les télévisions 4K et 8K.

En recherche, les QD peuvent également servir de capteurs au travers de systèmes considérés comme des « puces de détection » contenant un mélange de QD spécifiques à différentes molécules. Dans ces systèmes, la longueur d'onde d'excitation reste identique mais les longueurs d'onde d'émissions sont spécifiques.<sup>[150]</sup>

L'intérêt majeur des QD est l'adaptabilité aux applications biologiques et en particulier à l'imagerie médicale ainsi qu'à la détection de biomolécules. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont permis de marquer des cellules afin de les localiser et les suivre jusqu'aux sites spécifiques désirés.<sup>[151]</sup> AKERMAN et

al.<sup>[152]</sup> ont montré qu'un QD-peptide pouvait être délivré sur un site particulier en étant guidé par la séquence du peptide.

L'utilisation des QD à des fins d'analyse de l'histamine n'est apparue qu'en 2017 dans les travaux de deux équipes distinctes.

WANG et al.<sup>[153]</sup> ont développé un capteur comportant un polymère imprégné de QD de CdSe/ZnS et stabilisés par interactions électrostatiques avec un liquide ionique (Figure 1.18). Lors de la mise en contact avec l'histamine, des liaisons hydrogènes se créent corrigeant ainsi les défauts de surface du QD et conduisant à une importante augmentation l'intensité de la fluorescence. Cette méthode permet une quantification de l'histamine pour des concentrations entre 0,45 et 2,25 mmol/L et possède une limite de détection à 0,11 mmol/L. En outre, la méthode a montré une bonne sensibilité lors de l'analyse de l'histamine d'échantillons dopés de conserves de poisson.

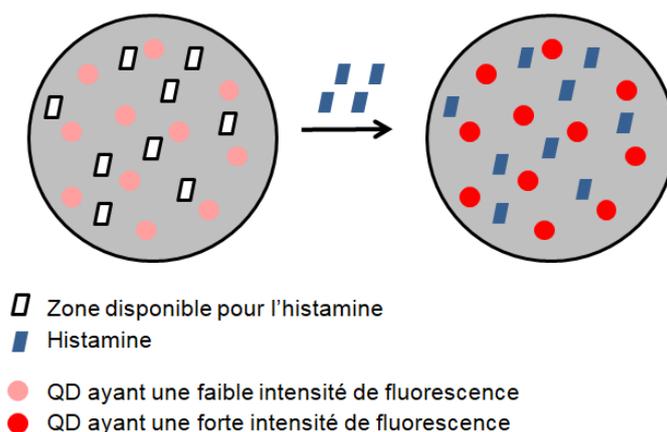


FIGURE 1.18 – Représentation schématique du capteur réalisé par WANG et al.

Durant la même année, KHAN et al.<sup>[154]</sup> ont réalisé un capteur d'histamine composé de QD stabilisés par de l'acide thioglycolique basée sur la diminution de la fluorescence du QD en présence d'histamine (Figure 1.19). Des interactions électrostatiques (carboxylate et amine protonée) sont générées à pH 8,0 afin de former un complexe QD/histamine. Lors de l'excitation des QD, les électrons des excitons sont alors piégés par l'histamine chargée diminuant ainsi la fluorescence du QD. Dans des conditions expérimentales optimales, la méthode peut détecter des niveaux d'histamine allant jusqu'à 9,6  $\mu\text{mol/L}$  et quantifier

des concentrations comprises entre 9,6 et 570  $\mu\text{mol/L}$ .

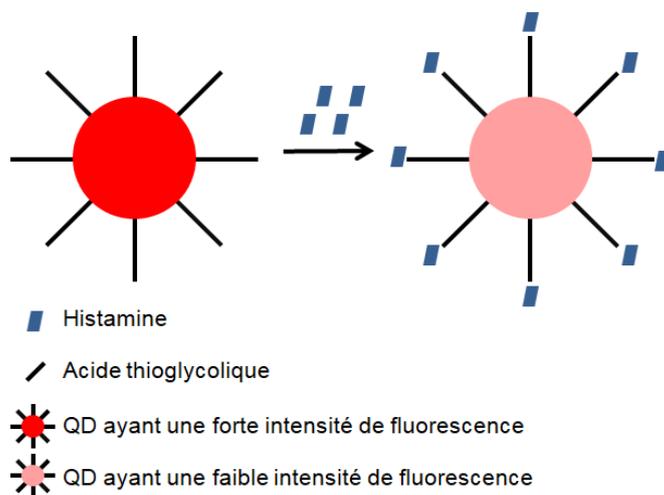


FIGURE 1.19 – Représentation schématique du capteur réalisé par KHAN et al.

Dans les deux cas, les liaisons entre le QD et l'histamine sont de type électrostatique d'énergie faible et sensible au milieu d'étude. Dans notre projet, l'introduction sur le QD d'un ligand permettant une liaison covalente avec l'histamine est une alternative intéressante afin de s'affranchir de cet effet de milieu.

## Synthèse du 4-hydroxy-*ortho*-phthalaldéhyde (4-HO-OPA)

L'objectif de ce travail doctoral est d'introduire un agent de complexation de l'histamine sur un dispositif de QD. À l'image des systèmes de reconnaissance à base de QD employées en biologie, le schéma de composition proposé ici est similaire et correspond à la jonction successive d'un QD, d'un ligand et d'un agent de complexation de l'histamine.

Ces jonctions nécessitent la présence de trois fonctions d'ancrage ; la première F1 située entre le QD et le ligand, la seconde F2 assure la connexion entre le ligand et l'agent de complexation et une troisième fonction F3 permet de greffer l'agent de complexation au ligand (Figure 2.1).

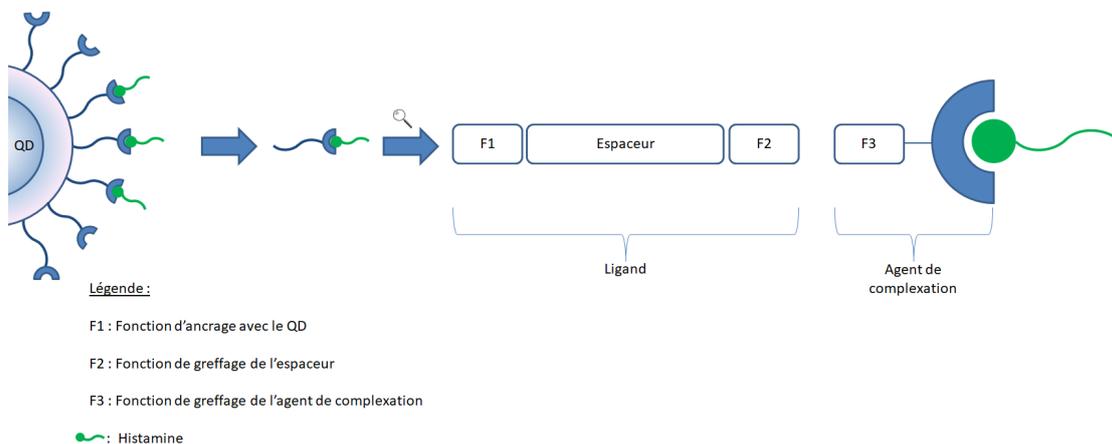


FIGURE 2.1 – Schéma de la composition du dispositif QD/Ligand/OPA.

Parmi les agents de dérivation des AB et de l'histamine en particulier, les plus employées sont l'OPA, la fluorescamine et le chlorure de dansyle.

Le choix s'est orienté en premier lieu vers l'OPA, dialdéhyde benzénique, dont la fonctionnalisation (F3) semblait accessible.

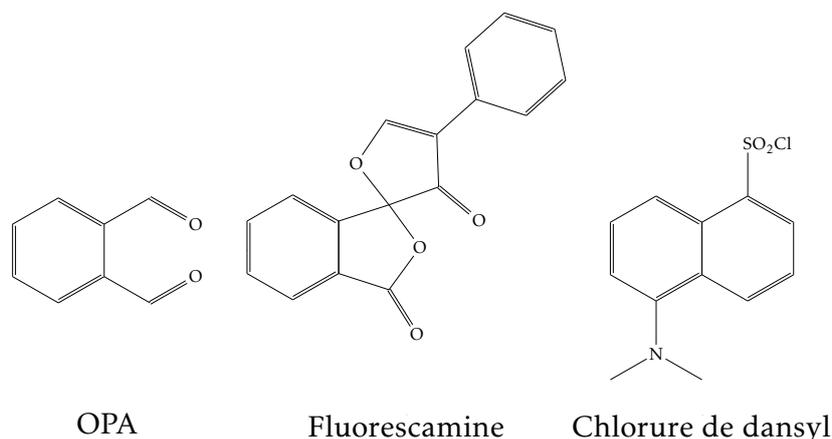


FIGURE 2.2 – Formule semi-développée de l'OPA, de la fluorescamine et du chlorure de dansyl.

Les dérivés d'OPA cités dans la littérature correspondent essentiellement à une fonctionnalisation en position 4 (Section 1.2.1), comme en témoigne l'existence des 4-halogéno-OPA,<sup>[69,70]</sup> le 4-nitro-OPA,<sup>[70]</sup> du 4-méthoxy-OPA<sup>[72,73]</sup> et du 4-hydroxy-OPA.<sup>[72,74-76]</sup>

Parmi ces dérivés, le 4-hydroxy-OPA (4-HO-OPA) a été priorisé pour la flexibilité de fonctionnalisation de sa fonction phénolique et ainsi permettre le greffage sur le ligand. Non commercial, il existe, à ce jour, trois synthèses référencées du 4-HO-OPA :

- La première, décrite par KHAN et al.<sup>[72]</sup> en 1966, a été réalisée par bromation et oxydation successives des groupements méthyles du 4-hydroxy-*ortho*-xylène avec un rendement de 5 %,
- La seconde, développée en 1997 par TAYLOR et al.<sup>[75]</sup> décrit la formation du 4-HO-OPA en tant que produit intermédiaire et non isolé dans la synthèse d'un agent antitumoral. Il est ainsi obtenu par réaction entre le diène de DANISHEFSKY et le 4,4-diéthoxybut-2-ynal,

- La plus récente, proposée par CAO et ISAACS,<sup>[76]</sup> décline la synthèse du 4-HO-OPA en trois étapes à partir de l'alcool furfurylique. Bien qu'obtenu avec un très faible rendement de 4 %, le 4-HO-OPA a servi de synthon de départ à la synthèse multi-étapes de cucurbit[6]urile.

Dans le cadre de ce travail, deux des trois synthèses du 4-HO-OPA ont été exploitées. La première correspond à une optimisation du travail de CAO et ISAACS<sup>[76]</sup> à partir de l'alcool furfurylique. La seconde s'inspire des synthèses de KHAN et al.<sup>[72]</sup> et de BILL et TARBELL<sup>[155]</sup> à partir du 3,4-diméthylphénol. Enfin, la dernière voie est issue des travaux de SINGH et KHADE<sup>[156]</sup> concernant la synthèse d'un analogue au 4-HO-OPA à savoir le 4-MO-OPA, lui même formé à partir de l'acide 3-méthoxybenzoïque, a été exploitée.

## 2.1 Stratégie de synthèse selon CAO et ISAACS<sup>[76]</sup>

Décrite pour la première fois en 2012 par CAO et ISAACS,<sup>[76]</sup> cette synthèse s'inspire de trois réactions décrites de manière distinctes<sup>[157-159]</sup> (Figure 2.3) et donne accès au 4-HO-OPA avec un rendement global de 4 %.

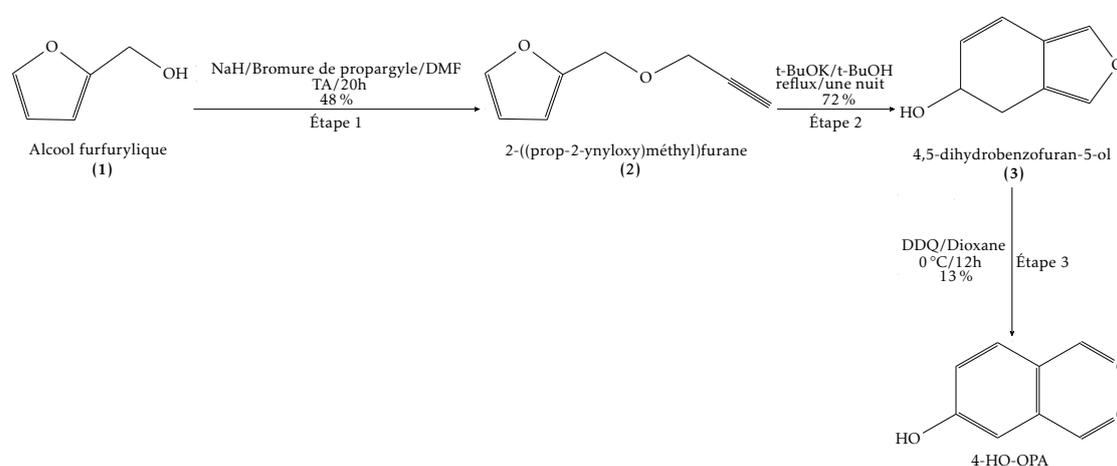


FIGURE 2.3 – Synthèse du 4-HO-OPA à partir de l'alcool furfurylique décrite par CAO et ISAACS.<sup>[76]</sup>

Une O-alkylation de l'alcool furfurylique par le bromure de propargyle conduit à du 2-((prop-2-ynoxy)méthyl)furane selon MARTÍN-MATUTE et al.<sup>[157]</sup>

La seconde étape, décrite en 1985 par HAYAKAWA et al.,<sup>[158]</sup> correspond à une isomérisation par activation thermique de l'éther propargylique en éther allénylique. Celui-ci intervient ensuite comme entité diénophile dans un processus de cyclisation intramoléculaire de type DIELS-ALDER pour conduire au 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol (Figure 2.4).

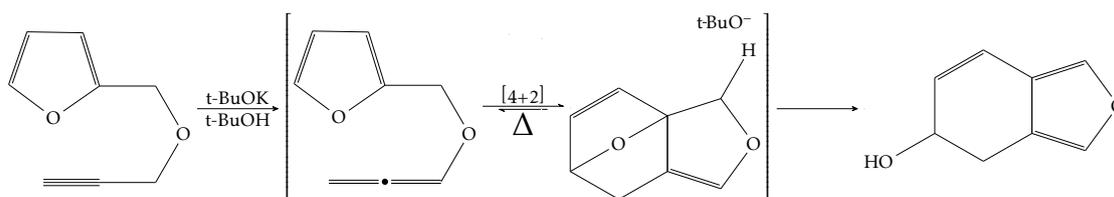


FIGURE 2.4 – Mécanisme de cyclisation de l'alcool furfurylique en 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol.

Enfin, la dernière étape fut adaptée des travaux de WENKERT et KHATUYA<sup>[159]</sup> et correspond à une oxydation en présence de 2,3-dichloro-4,5-dicyanobenzoquinone (DDQ).

### 2.1.1 Étude de reproductibilité de la synthèse selon CAO et ISAACS

Afin de tester la pertinence de cette voie de synthèse, une étude de reproductibilité a été effectuée.

En premier lieu, l'étape d'alcynylation a conduit au 2-((prop-2-ynoxy)méthyl)furane désiré avec un rendement de 50 %, conformément à la littérature.

Puis, la cyclisation intramoléculaire a permis d'obtenir le 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol, dont l'instabilité thermique et photochimique a néanmoins constitué un frein au développement de cette voie. Cette caractéristique, non référencée dans les travaux de CAO et ISAACS,<sup>[76]</sup> peut toutefois être corrélée à la grande réactivité du noyau isobenzofuranique par cycloaddition.<sup>[160]</sup>

Enfin, la réalisation de l'étape d'oxydation a abouti à un rendement limité de 20 %. L'analyse du mélange brut par RMN  $^1\text{H}$  conduit en effet à la présence de trois signaux non échangeables par  $\text{D}_2\text{O}$  à 10-11 ppm démontrant la présence majoritaire et non souhaitée d'OPA (commercial) en plus du 4-HO-OPA.

Suite à cette étude de reproductibilité, seule l'étape d'oxydation a été approfondie dans un premier temps (Section 2.1.2).

### 2.1.2 Étude de reproductibilité de l'étape d'oxydation du 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol en 4-HO-OPA

Comme illustrée sur le Tableau 2.1, la littérature fait état de la formation d'OPA lors de l'oxydation du 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol avec un rapport 4-HO-OPA/OPA qui varie en fonction de la nature de l'oxydant.<sup>[159]</sup> Une quantité de 4-HO-OPA supérieure à celle de l'OPA est notée lors de l'emploi de dichromate de pyridinium (PDC) et de dioxyde de manganèse. Le chlorochromate de pyridinium (PCC) et le 2,3-dichloro-4,5-dicyanobenzoquinone (DDQ), quant à eux, conduisent à un mélange (1 : 1). Enfin, dans le cas du dioxyde de sélénium ( $\text{SeO}_2$ ), un rendement de 64 % en OPA est indiqué sans indication de la quantité en 4-HO-OPA.

Afin de confirmer ces études, une sélection des oxydants a été opérée dans chacun des trois groupes et des essais ont été menés sur :  $\text{MnO}_2$ , DDQ et  $\text{SeO}_2$ .

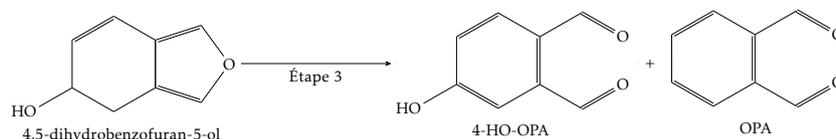
Lors des essais avec le dioxyde de sélénium, une absence de réaction (à 22 °C) ou une oxydation totale (à reflux) en diacide ont été observées en contradiction avec les travaux de WENKERT et KHATUYA.<sup>[161]</sup>

En second lieu, l'emploi de  $\text{MnO}_2$  a abouti à des rendements en 4-HO-OPA très interdépendants de la méthode d'activation de l'oxydant et a, par ailleurs, conduit principalement à un mélange équimolaire en 4-HO-OPA/OPA.

Un troisième essai a donc été mené en présence de DDQ, réactif classé comme libérant du cyanure d'hydrogène au contact de l'eau ou à haute température. Les conditions de réactions ont donc été limitées aux solvants organiques anhydres et à température ambiante (TA). Les meilleurs résultats ont permis d'aboutir à

un rapport maximum en 4-HO-OPA/OPA de 2 à 14°C et 4 à 22°C.

TABLEAU 2.1 – Comparaison des ratios 4-HO-OPA/OPA lors de l'étape d'oxydation du 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol.



Auteur	Oxydant	Solvant	Température	Équivalents	
				4-HO-OPA	OPA
WENKERT	MnO <sub>2</sub>	Dioxane	Reflux	2	1
	PCC	DCM <sup>1</sup>	-78°C et 22°C	1	1
	PDC	DCM	-78°C et 22°C	2	1
et	PDC	DCM	22°C	1	4
	DDQ	Dioxane	22°C	1	1
KHATUYA	DDQ	Dioxane	Reflux	1	4
	SeO <sub>2</sub>	Dioxane	Reflux	N.R. <sup>2</sup>	64 %
Ce travail	SeO <sub>2</sub>	Dioxane	22°C	/ <sup>3</sup>	
	SeO <sub>2</sub>	Dioxane	Reflux	/ <sup>4</sup>	
	MnO <sub>2</sub>	Dioxane	Reflux	1 <sup>5</sup>	1 <sup>5</sup>
	DDQ	Dioxane	14°C	2 <sup>5</sup>	1 <sup>5</sup>
	DDQ	Dioxane	22°C	4 <sup>5</sup>	1 <sup>5</sup>

<sup>1</sup> DCM : dichlorométhane

<sup>4</sup> Oxydation jusqu'à l'acide

<sup>2</sup> Non renseigné

<sup>5</sup> Déterminé par RMN

<sup>3</sup> Pas de réaction

Une étude bibliographique du mécanisme d'oxydation par le DDQ a été menée afin d'expliquer la formation d'OPA lors de cette oxydation; le DDQ est un oxydant très employé en synthèse organique mais son mécanisme d'action est toutefois peu documenté. La propriété marquante du DDQ vient de sa structure de type quinone qui est accepteur d'hydrure.<sup>[162]</sup> Cette propriété se retrouve dans le mécanisme réactionnel proposé par LEE-RUFF et ABLENAS en 1989<sup>[163]</sup> sur l'oxydation du (3-méthoxyprop-1-ényl)benzène (Figure 2.5).

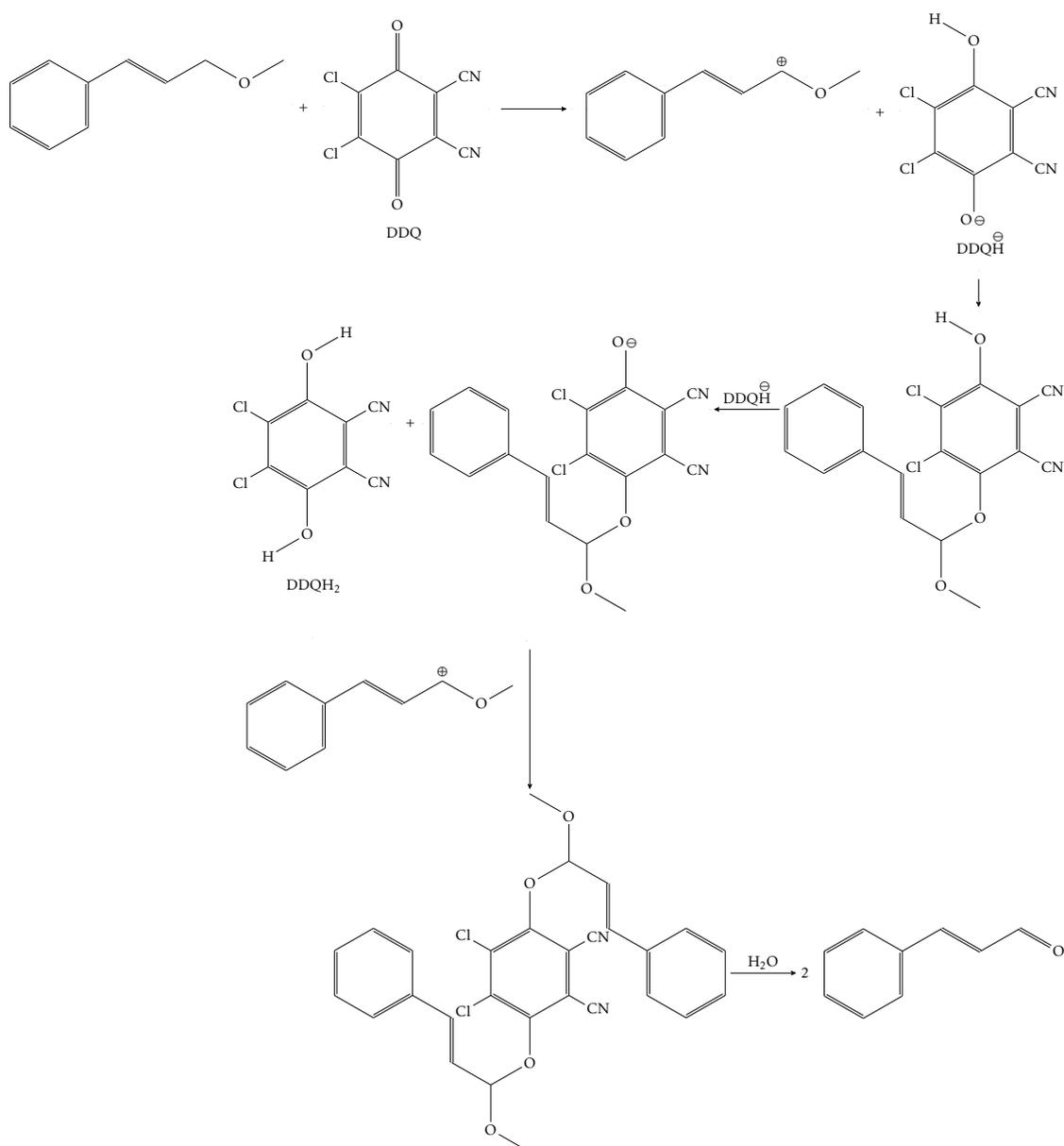


FIGURE 2.5 – Mécanisme réactionnel proposé par LEE-RUFF et ABLENAS<sup>[163]</sup> pour la réaction d'oxydation du (3-méthoxy-1-propén-1-yl)benzène avec le DDQ.

Ce mécanisme transposé au 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol permettrait d'expliquer l'oxydation du cycle furanique en dialdéhyde ainsi que la formation de l'isobenzofurane (Figure 2.6).

Enfin, l'attaque basique du DDQH<sup>⊖</sup> sur l'hydrogène situé en  $\alpha$  du groupe hydroxyle pourrait expliquer la formation d'OPA (Figure 2.7).

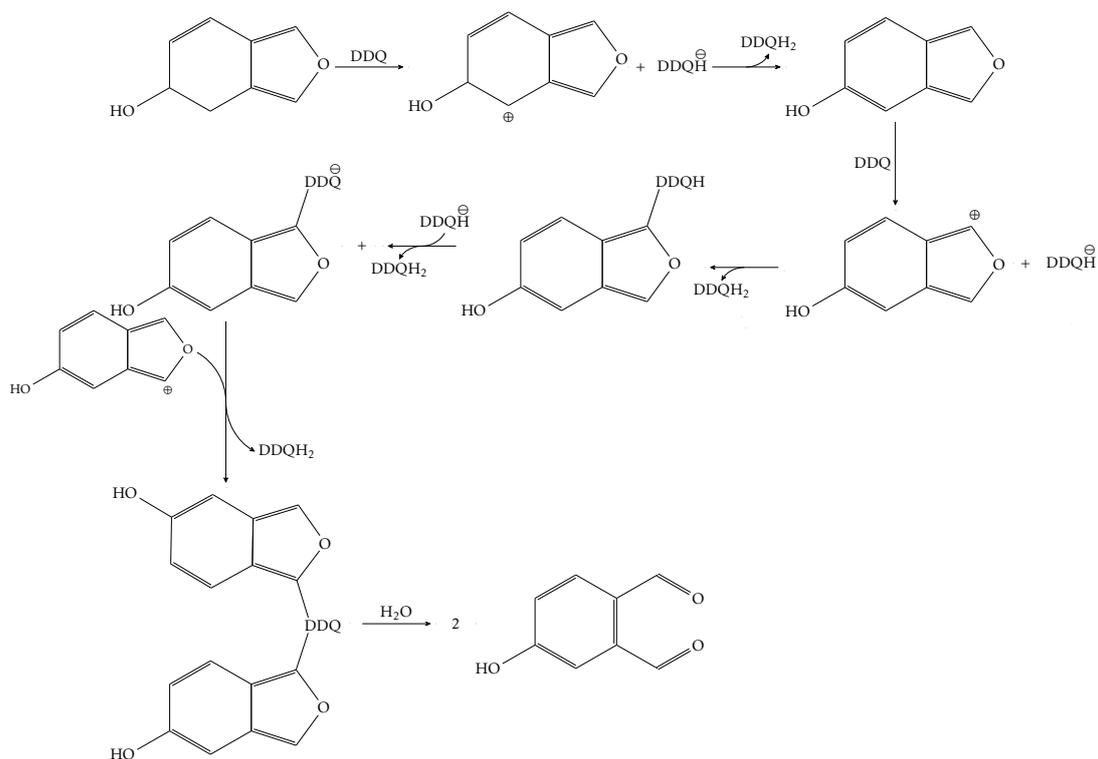


FIGURE 2.6 – Proposition de mécanisme réactionnel pour la réaction d'oxydation avec le DDQ.

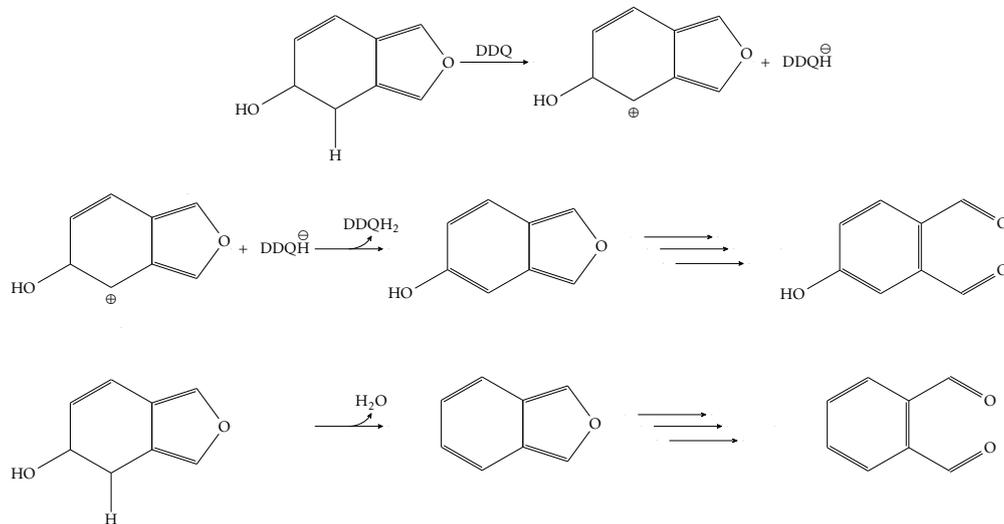


FIGURE 2.7 – Proposition de mécanisme réactionnel pour la réaction de déshydratation observée lors de la réaction d'oxydation avec le DDQ.

Pour conclure, l'étude des différentes étapes de la synthèse décrite par CAO et ISAACS<sup>[76]</sup> montre que les rendements associés sont limités suite à l'instabilité du 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol, et par la présence excessive d'OPA à l'issue de l'étape d'oxydation.

### 2.1.3 Synthèse optimisée du 4-HO-OPA à partir de l'alcool furfurylique

Une stratégie de protection de la fonction alcool du 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol a été menée afin de minimiser la formation non souhaitée d'OPA. Deux étapes supplémentaires (protection et déprotection de fonction) ont été apportées à la synthèse globale de CAO et ISAACS<sup>[76]</sup> selon le schéma détaillé en Figure 2.8. Des optimisations de réaction et/ou de traitements ont été également apportées sur l'ensemble des étapes afin d'en augmenter les rendements et de faciliter l'accès au 4-HO-OPA.

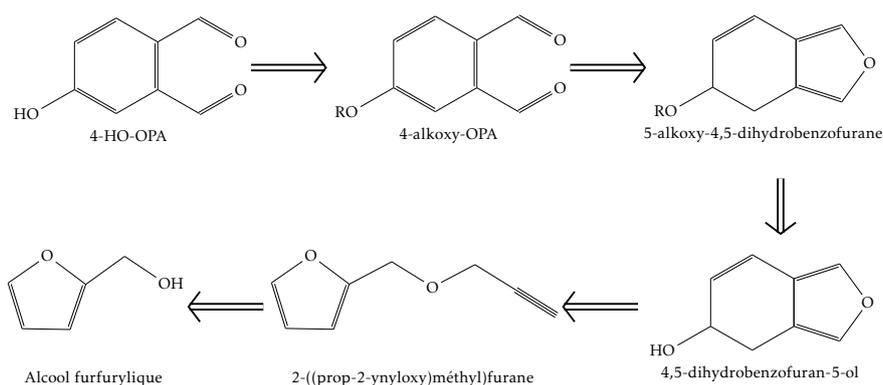


FIGURE 2.8 – Rétrosynthèse du 4-HO-OPA à partir de l'alcool furfurylique comportant les étapes de protection et déprotection.

#### 2.1.3.1 Synthèse du 2-((prop-2-ynyloxy)méthyl)furane (2)

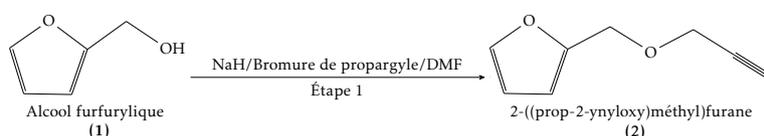


FIGURE 2.9 – Synthèse du 2-((prop-2-ynyloxy)méthyl)furane à partir de l'alcool furfurylique.

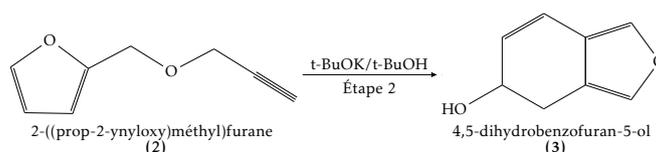
Une optimisation des procédés de traitements (substitution de la purification sur colonne chromatographique par un lavage au cyclohexane) de la synthèse du 2-((prop-2-ynyloxy)méthyl)furane (**2**) (Figure 2.9) a permis de doubler le rendement par rapport aux travaux de CAO et ISAACS la rendant ainsi quantitative.<sup>[76]</sup>

### 2.1.3.2 Synthèse du 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol (**3**)

La seconde réaction permet d'accéder au 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol (**3**), instable thermiquement et photochimiquement (Section 2.1.1). Cette étape (synthèse et traitement) doit donc être la plus rapide et efficace possible. Le composé est obtenu en employant des conditions optimales de deux équivalents de *tert*-butylate de potassium à 80 °C pendant 5 h. Ces conditions ont été déterminées par suivi RMN <sup>1</sup>H des bruts réactionnels et notamment par l'apparition d'un système ABX caractéristique du composé (**3**).

Trois procédés de purification (colonne chromatographique, distillation fractionnée sous vide poussée (par Kugelröhr) et colonne chromatographique flash automatisée) ont été comparés. Le 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol (**3**) a été obtenu suite à une séparation par chromatographie flash automatisée avec un rendement doublé par rapport à la littérature (Tableau 2.2). Il est ensuite rapidement mis en réaction pour une étape de protection.

TABLEAU 2.2 – Comparaison des rendements selon les traitements associés pour la synthèse du 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol.



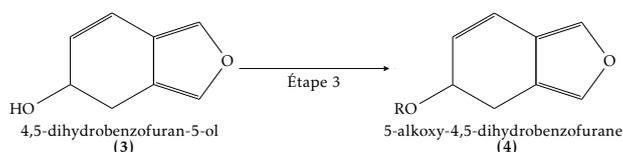
Type de purification	Temps de traitement	Rendement <sup>1</sup>
Colonne chromatographique	7h	40 %
Distillation fractionnée sous vide poussée	4h	70 %
Colonne chromatographique flash automatisée	2h	85 %

<sup>1</sup> Rendement isolé

## 2.1.3.3 Synthèses des 5-alkoxy-4,5-dihydrobenzofuranes (4)

Cinq groupements protecteurs stables en condition oxydante de type acétyle, benzyle, méthyle, *tert*-butyldiméthylsilane et triméthylsilane (Tableau 2.3) ont été sélectionnées. Au vu de l'instabilité thermique et photochimique du 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol (**3**), ces fonctionnalisations ont été testées à température ambiante et dans l'obscurité.

TABLEAU 2.3 – Rendements des réactions de protection du 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol.



Entrée	Protection	Réactif	Équivalent <sup>1</sup>	Temps	Rendement <sup>2</sup>
1	Ac	Ac <sub>2</sub> O <sup>3</sup>	12	24h	95 %
2	Bn	BnCl <sup>4</sup>	2	6j	10 %
3	Me	MeI <sup>5</sup>	2	une nuit	95 %
4	TBDMS	TBDMSCl <sup>6</sup>	1,2	une nuit	30 %
5	TMS	TMSCl <sup>7</sup>	1,2	une nuit	15 %

<sup>1</sup> Nombre d'équivalent du réactif normalisé par rapport au 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol

<sup>2</sup> Rendement isolé

<sup>3</sup> Ac<sub>2</sub>O : anhydride acétique

<sup>4</sup> BnCl : chlorure de benzyle

<sup>5</sup> MeI : iodométhane

<sup>6</sup> TBDMSCl : chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle

<sup>7</sup> TMSCl : chlorure de triméthylsilyle

Sur ces cinq synthèses de protection, seules la méthylation et l'acétylation ont abouti à des rendements supérieurs à 90 % et ont été sélectionnées pour le reste de l'étude (Figure 2.10).

Fait marquant, le 5-méthoxy-4,5-dihydrobenzofurane (**4-a**) et le 5-acétoxy-4,5-dihydrobenzofurane (**4-b**) se sont révélés stables aussi bien thermiquement que photochimiquement. Ce constat est à mettre en lien avec les propriétés de stabilité de l'isobenzofurane.<sup>[160]</sup> En effet, la structure native de type isobenzofurane est instable alors que ses dérivés substitués en position 1 et/ou 3 par un groupement aryle ou un groupement électroattracteur sont stables à long terme.

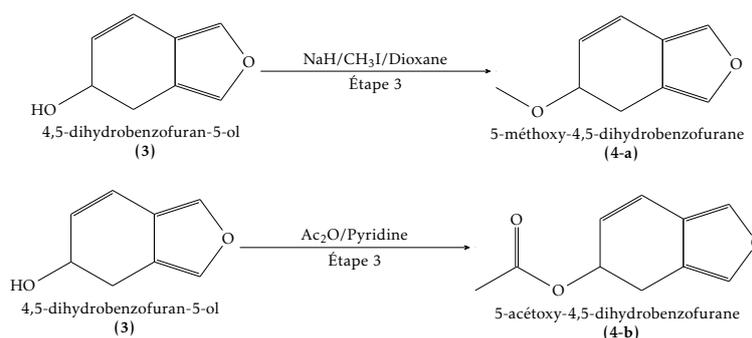
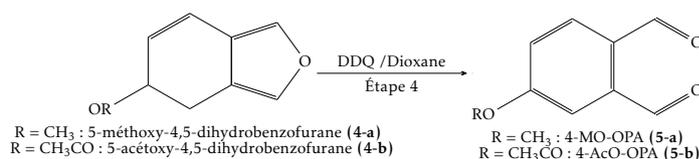


FIGURE 2.10 – Synthèses des 5-méthoxy et 5-acétoxy-4,5-dihydrobenzofurane à partir du 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol.

### 2.1.3.4 Synthèses des 4-MO-OPA et 4-acétoxy-*ortho*-phthalaldéhyde (4-AcO-OPA) (5-a et 5-b)

Pour mémoire, l'oxydation du 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol en présence de DDQ a donné un rapport favorable en 4-HO-OPA (Section 2.1.1). De fait, l'oxydation des 5-méthoxy-4,5-dihydrobenzofurane (4-a) et 5-acétoxy-4,5-dihydrobenzofurane (4-b) a été testée selon ces conditions. Les résultats obtenus sont présentés et comparés à ceux obtenus pour le 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol dans le Tableau 2.4.

TABLEAU 2.4 – Comparaison des rendements et des rapports OPA et RO-OPA pour les réactions d'oxydation en présence et en absence d'un groupement protecteur.



Entrée	Composé de départ	Équivalents		Rendement <sup>1</sup>
		OPA	RO-OPA	
1	4,5-dihydrobenzofuran-5-ol	1	4	21 %
2	5-acétoxy-4,5-dihydrobenzofurane	1	/	/
3	5-méthoxy-4,5-dihydrobenzofurane	1	28	63 %

<sup>1</sup> Rendement isolé

L'ajout de ces deux groupements protecteur en amont de l'étape d'oxydation par le DDQ a abouti à deux types de résultat :

- Lors de l'oxydation du 5-acétoxy-4,5-dihydrobenzofurane, la formation exclusive d'OPA est observée et peut s'expliquer par le schéma réactionnel proposé pour le mécanisme de formation d'OPA lors de l'oxydation par le DDQ (Figure 2.6). Selon ce schéma, l'acétylation de la fonction alcool favoriserait la réaction d'élimination procurant ainsi au groupement acétyle un rôle d'activation de fonction plutôt que de protection de fonction. La protection du 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol par un groupement acétyle n'est donc pas adaptée à l'oxydation en présence de DDQ.
- Dans le cas du 5-méthoxy-4,5-dihydrobenzofurane, l'emploi du DDQ a abouti à un rapport 4-MO-OPA/OPA de type 28/1 pour un rendement de 63 %. Ici, le groupement méthoxy remplit pleinement son rôle de protection de fonction et minimise fortement la formation d'OPA.

En conclusion, le 4-MO-OPA (**5-a**) a été synthétisé avec succès par méthylation du 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol puis oxydation en présence de DDQ. Cette voie permet de réduire drastiquement l'apparition d'OPA en tant que sous-produit de la réaction (Figure 2.11).

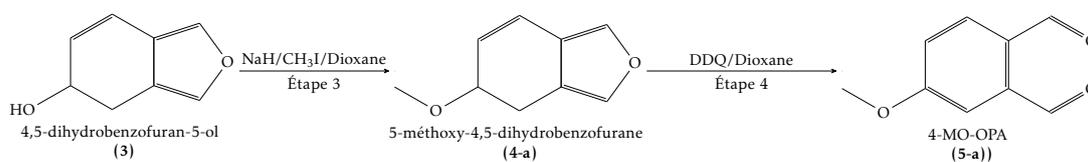


FIGURE 2.11 – Synthèse du 4-MO-OPA à partir du 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol.

### 2.1.3.5 Synthèse du 4-HO-OPA (6) à partir du 4-MO-OPA

Pour rappel, l'OPA en solution existe sous plusieurs formes (dialdéhyde, monohydrate, dihémiacétal cyclique et dimère) qui ont été déterminées par polarographie,<sup>[71]</sup> RMN <sup>1</sup>H<sup>[68]</sup> et spectroscopie UV<sup>[68]</sup> (Section 1.2.2). La forme dialdéhyde de l'OPA est stable en milieu organique mais se retrouve minoritaire en milieu aqueux vis-à-vis de ses formes hydratées. Une déprotection du 4-MO-OPA (**5-a**) en milieu organique sans traitement aqueux a donc été ciblée afin de limiter le nombre de forme en présence susceptible de se disperser dans les différentes phases.

Parmi les travaux respectant cette condition, nous retrouvons, dans la littérature, l'emploi de bromure d'hydrogène, de chlorure de lithium en présence d'acide, d'iodure de triméthylsilyle ou encore d'acides de BRÖNSTED en présence de liquide ionique (Tableau 2.5). Parmi l'ensemble de ces conditions de déprotection réalisées, seules deux ont été concluantes. L'acide méthylsulfonique (MsOH) et l'acide *para*-toluènesulfonique (APTS) en présence de bromure de 1-butyl-3-méthylimidazolium ([bmim]Br) ont conduit à des rendements respectifs de 75 % et 100 %.

TABLEAU 2.5 – Comparaison des conditions opératoires et des rendements de déprotections du 4-MO-OPA.

4-MO-OPA (5-a)  $\xrightarrow{\text{Étape 5}}$  4-HO-OPA (6)

Entrée	Réactif	Résultat	Rendement <sup>1</sup>	Référence
1	TMSCl, NaI, ACN <sup>2</sup>	pas de réaction	/	[164]
2	LiCl, DMF <sup>3</sup>	OPA	/	[165]
3	LiCl, APTS, DMF	OPA	/	[165]
4	HBr gazeux, éthanol	pas de réaction	/	[166]
5	[bmim]Br, MsOH	4-HO-OPA	75 %	[167]
6	[bmim]Br, TFA <sup>4</sup>	pas de réaction	/	[167]
7	[bmim]Br, APTS, $\Delta$	4-HO-OPA	100 %	[167]
8	[bmim]Br, APTS, MAOS	4-HO-OPA	100 %	[167]

<sup>1</sup> Rendement isolé

<sup>2</sup> ACN : acétonitrile

<sup>3</sup> DMF : diméthylformamide

<sup>4</sup> TFA : acide trifluoroacétique

Un rendement quantitatif a été atteint à la fois par voie thermique (24 h) et par activation sous MAOS (30 min) dans les mêmes conditions de température (150 °C) et sous vial scellé (Figure 2.12).

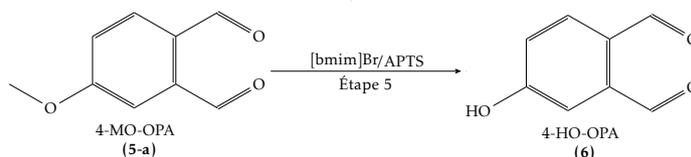


FIGURE 2.12 – Synthèse optimisée du 4-HO-OPA à partir du 4-MO-OPA.

### 2.1.4 Conclusion sur la voie de synthèse du 4-HO-OPA à partir de l'alcool furfurylique

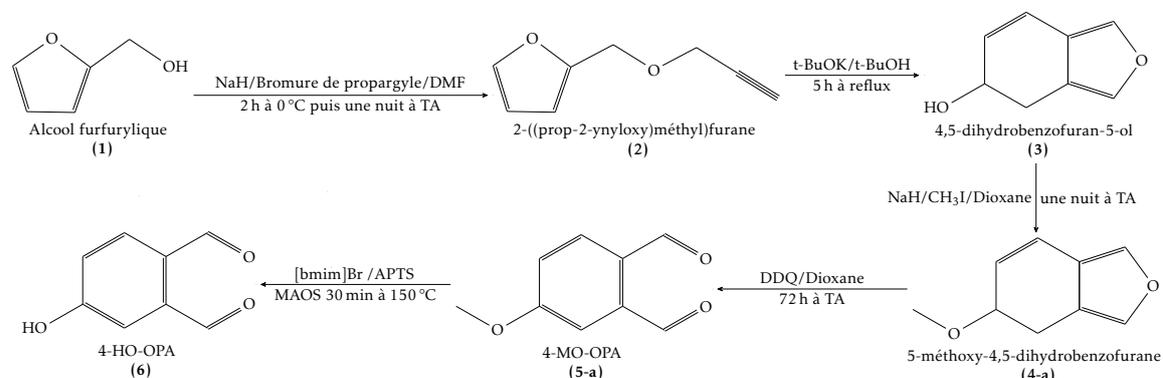


FIGURE 2.13 – Synthèse optimisée du 4-HO-OPA à partir de l'alcool furfurylique.

Initialement référencée par CAO et ISAACS,<sup>[76]</sup> la synthèse du 4-HO-OPA (6) présentait un rendement de 4 % limitant de fait son emploi en tant qu'intermédiaire clé au sein d'une réaction multi-étapes. Cette étude démontre qu'un rendement de 51 % (Tableau 2.6) est réalisable au travers d'une stratégie de protection-déprotection suivie d'une optimisation des conditions d'oxydation limitant la présence d'OPA (Figure 2.13). Par conséquent, le 4-HO-OPA apparaît à ce jour comme un synthon accessible en quantité suffisante (Tableau 2.6).<sup>[168]</sup>

TABLEAU 2.6 – Comparaison des rendements de la synthèse totale du 4-HO-OPA réalisée lors de cette étude par rapport à la littérature.<sup>[76]</sup>

Étape	Réactif	Rendement <sup>1</sup>		
		Littérature	Sans protection	Actuel
1	NaH/bromure de propargyle	48 %	100 %	100 %
2	tert-butoxyde de potassium	72 %	85 %	85 %
3	NaH/CH <sub>3</sub> I	/	/	95 %
4	DDQ	13 %	21 %	63 %
5	[bmim]Br/APTS	/	/	100 %
Rendement global		4 %	18 %	51 %

<sup>1</sup> Rendement isolé

## 2.2 Stratégie de synthèse selon BILL et TARBELL<sup>[155]</sup>

La formation de deux fonctions aldéhydiques aromatiques vicinales peut être obtenue par bromation benzylique puis oxydation (Figure 2.14).

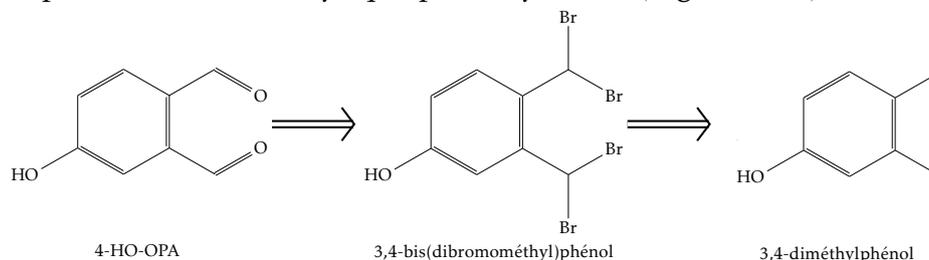


FIGURE 2.14 – Rétrosynthèse du 4-HO-OPA à partir du 3,4-diméthylphénol.

Cette stratégie (Figure 2.15) a permis à BILL et TARBELL<sup>[155]</sup> de former l'OPA (9) à partir du 1,2-bis(dibromométhyl)benzène (8) et a été retenue comme alternative intéressante. Dans ce but, une première étude à partir de l'*ortho*-xylène (7), comme molécule modèle, a été effectuée avant d'être adaptée au 3,4-diméthylphénol (10).

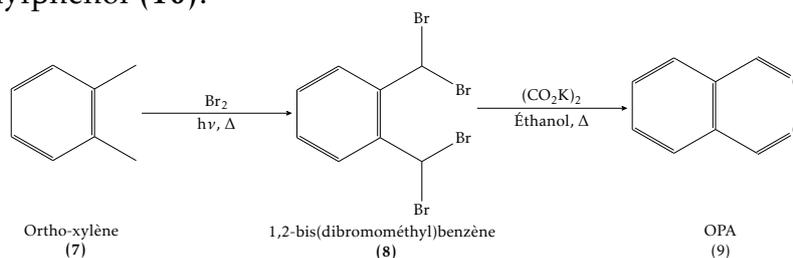


FIGURE 2.15 – Synthèse de l'OPA à partir de l'*ortho*-xylène décrite par BILL et TARBELL.<sup>[155]</sup>

### 2.2.1 Bromation de l'*ortho*-xylène par du N-bromosuccinimide (NBS)

Conformément aux travaux de STEINMANN,<sup>[169]</sup> un premier essai de bromation a été réalisé en présence de NBS et de peroxyde de benzoyle (PB). L'analyse structurale du brut de réaction a montré la présence d'un mélange de composés tétra (8) et dibromés (8-b) (Figure 2.16). Par réduction de la quantité de NBS à deux équivalents, seul le composé dibromé (8-b) a été obtenu avec un rendement de 75 %.

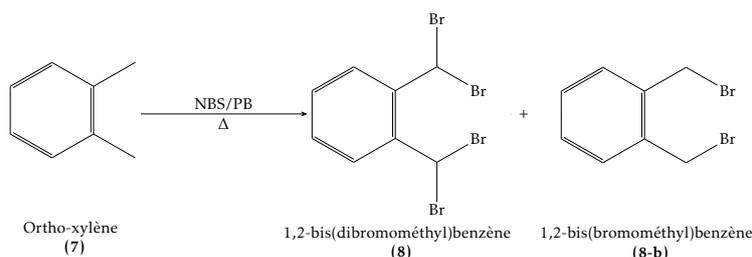


FIGURE 2.16 – Synthèse du 1,2-bis(dibromométhyl)benzène à partir de l'*ortho*-xylène.

### 2.2.2 Oxydation du 1,2-bis(bromométhyl)benzène

Le produit majoritaire issue de la bromation correspondant au 1,2-bis(bromométhyl)benzène (8-b), l'oxydation ménagée des dérivés dibromés benzyliques peut se réaliser en présence de méthénamine (également appelé hexaméthylène-tétramine) (Figure 2.17).<sup>[170,171]</sup>

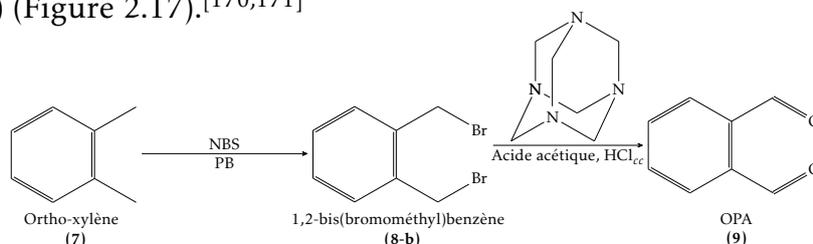


FIGURE 2.17 – Synthèse envisagée de l'OPA à partir de *ortho*-xylène via une bromation.

Par translation de ce processus d'oxydation au 1,2-bis(bromométhyl)benzène (8-b), une seule des deux fonctions bromées a été oxydée (Figure 2.18).

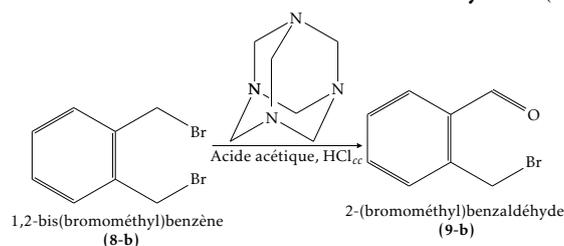


FIGURE 2.18 – Réaction d'oxydation du 1,2-bis(bromométhyl)benzène en présence de N-méthylmorpholine (NMM).

Ce résultat peut se comprendre à la lecture du mécanisme réactionnel (Figure 2.19). En effet, l'intermédiaire réactionnel issu de la substitution du méthénamine sur le dérivé bromé peut engendrer un encombrement stérique préjudiciable à une seconde transformation en alpha.

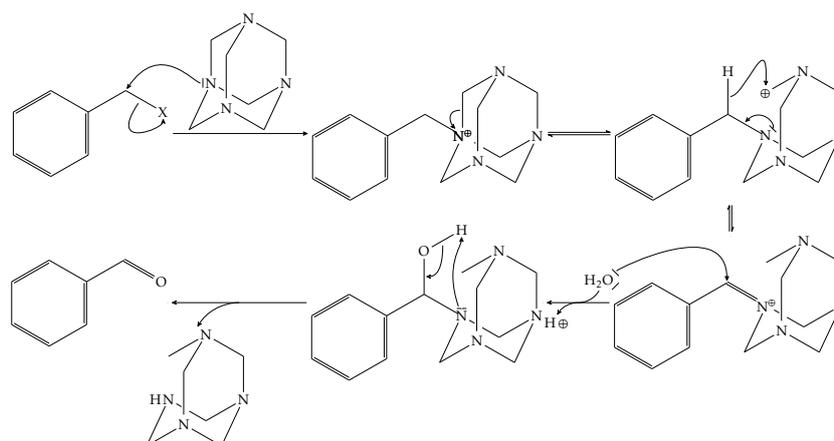
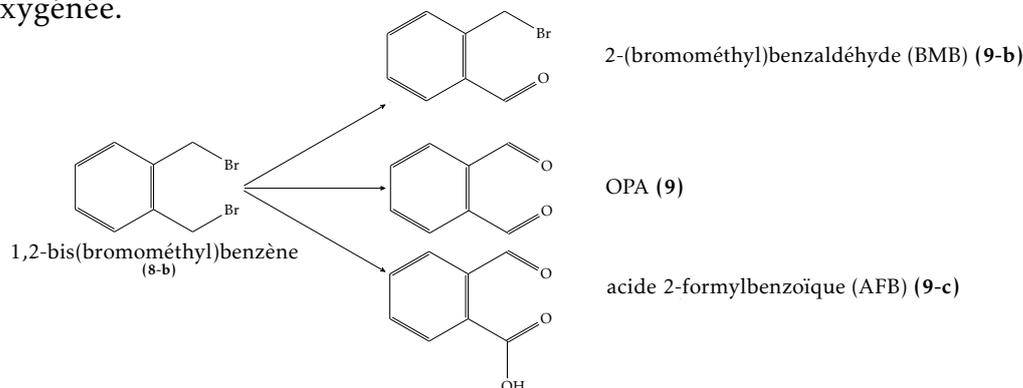


FIGURE 2.19 – Mécanisme réactionnel de l'oxydation d'un (halogénométhyl)benzène en présence de NMM.

Dans la continuité des travaux de KHUMRAKSA et al.,<sup>[172]</sup> des réactions d'oxydation en présence de peroxyde d'hydrogène ont été testées en modifiant certains paramètres (Tableau 2.7) et ont permis d'accéder à l'OPA (**9**) mais également au 2-(bromométhyl)benzaldéhyde (**9-b**) et à l'acide 2-formylbenzoïque (**9-c**).

TABLEAU 2.7 – Structures obtenues suite aux conditions d'oxydation par l'eau oxygénée.



Entrée	Réaction	Synthèse	Composition brute réactionnel
1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , éthanol	Δ	BMB et OPA
2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , éthanol	MAOS	BMB et OPA
3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , TBAI <sup>1</sup> , NMM	MAOS	Aucune réaction
4	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , [emim]Br <sup>2</sup> , NMM	MAOS	BMB
5	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , [emim]Br, NMM, KI	MAOS	OPA et AFB

<sup>1</sup> TBAI : iodure de tétra-N-butylammonium

<sup>2</sup> [emim]Br : bromure de 1-éthyl-3-méthylimidazolium

Deux conditions de synthèses ont été conservées : eau oxygénée/éthanol et eau oxygénée/bromure de 1-éthyl-3-méthylimidazolium ([emim]Br) /NMM /KI. L'OPA étant toutefois un modèle expérimental, aucune optimisation n'a été réalisée sur cette synthèse.

### 2.2.3 Synthèse du 4-HO-OPA à partir du 3,4-diméthylphénol

Suite aux résultats satisfaisants sur l'*ortho*-xylène, nous avons transposé cette synthèse au 3,4-diméthylphénol.

La littérature présente des exemples de synthèses de dialdéhydes fonctionnalisés au départ de 3,5-diméthylanisole<sup>[173]</sup> et de 2-méthoxy-1,3-diméthylbenzène.<sup>[174]</sup> Dans ces travaux, les bromations sont effectuées sur des composés méthoxylés.<sup>[171,173,174]</sup> L'étape ultime de déprotection (Section 2.1.3.5) a été réemployée selon les mêmes conditions (Figure 2.20).

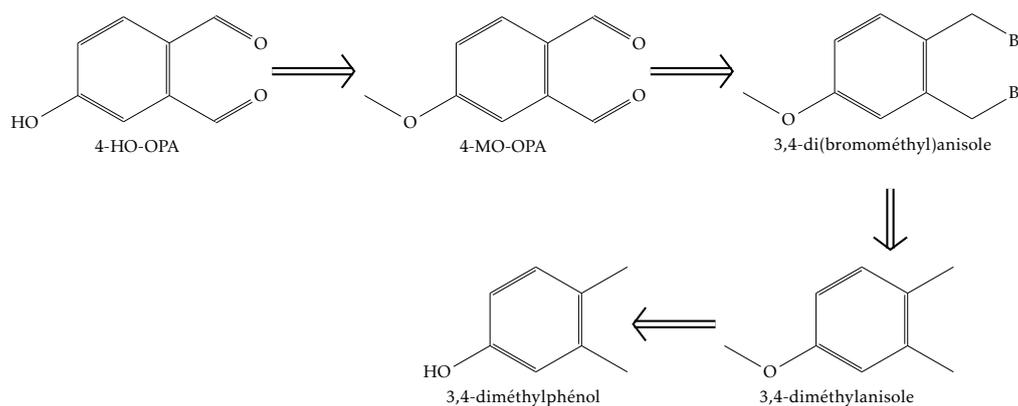
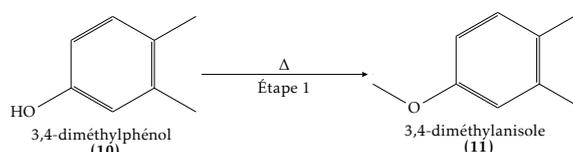


FIGURE 2.20 – Rétrosynthèse du 4-HO-OPA à partir du 3,4-diméthylphénol avec les étapes de protection et déprotection.

#### 2.2.3.1 Synthèse du 3,4-diméthylanisole (11)

Bien que commercial, l'accès par voie thermique au 3,4-diméthylanisole (10) a été entrepris selon les conditions de CHO<sup>[175]</sup> d'une part et de CHEN et al.<sup>[176]</sup> d'autre part (Tableau 2.8).

TABLEAU 2.8 – Comparaison des rendements de méthylation du 3,4-diméthylphénol en fonction de la durée et de la température de synthèse.

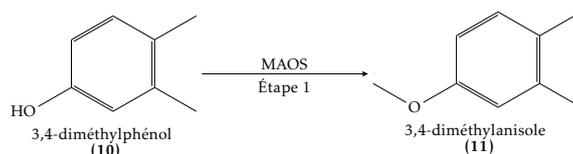


Entrée	Réactif	Température	Temps	Rendement <sup>1</sup>
1	KOH, MeI, méthanol <sup>[175]</sup>	65 °C	30+45 min	5 %
2	KOH, MeI, méthanol <sup>[175]</sup>	65 °C	30+ une nuit	15 %
3	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , MeI, acétone <sup>[176]</sup>	60 °C	une nuit	83 %
4	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , MeI, 18C6 <sup>2</sup> , acétone	130 °C	5 min	6 %

<sup>1</sup> Rendement isolé<sup>2</sup> 18C6 : 18-couronne-6

Dans la continuité, une adaptation de cette synthèse a été réalisée par activation par MAOS avec et sans catalyse à transfert de phases (Tableau 2.9). Les rendements sont comparables à ceux obtenus par méthode thermique à savoir 85 % avec toutefois un temps de réaction divisé par deux cents (Figure 2.21). En comparaison, la synthèse témoin sans MAOS dite "silencieuse" n'a permis qu'un rendement de 6 %.

TABLEAU 2.9 – Comparaison des rendements de méthylation du 3,4-diméthylphénol obtenus par activation sous MAOS en fonction de la durée et de la température de synthèse.



Entrée	Réactif	Température	Temps	Rendement <sup>1</sup>
1	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , MeI, acétone	130 °C	5 min	Aucune réaction
2	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , MeI, acétone	130 °C	20 min	Aucune réaction
3	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , MeI, acétone	150 °C	60 min	Aucune réaction
4	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , MeI, TBAB <sup>2</sup> , acétone	130 °C	10 min	30 %
5	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , MeI, 18C6, acétone	130 °C	5 min	85 %

<sup>1</sup> Rendement isolé<sup>2</sup> TBAB : bromure de tétra-N-butylammonium

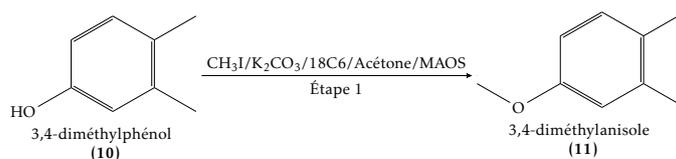


FIGURE 2.21 – Synthèse par MAOS du 3,4-diméthylanisole à partir du 3,4-diméthylphénol.

### 2.2.3.2 Synthèse du 3,4-di(bromométhyl)anisole (12)

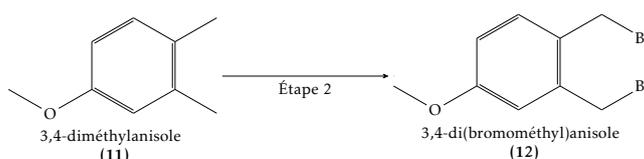


FIGURE 2.22 – Synthèse du 3,4-di(bromométhyl)anisole à partir du 3,4-diméthylanisole.

La seconde étape correspond à la dibromation benzylique régiosélective du 3,4-diméthylanisole (11) afin d'accéder au 3,4-di(bromométhyl)anisole (12) (Figure 2.22). Une méthodologie similaire (NBS et PB dans le cyclohexane) a été appliquée mais a cependant conduit à une plurifonctionnalisation. La première, conforme à la littérature,<sup>[173]</sup> correspond à une bromation aliphatique en para du groupement méthoxy. La présence du groupement bromométhyle active ensuite la position en ortho du méthoxy conduisant à une substitution aromatique sur le cycle benzénique. Enfin, une troisième bromation aliphatique a lieu sur le méthyle en méta du méthoxy si la réaction n'est pas stoppée (Figure 2.23).

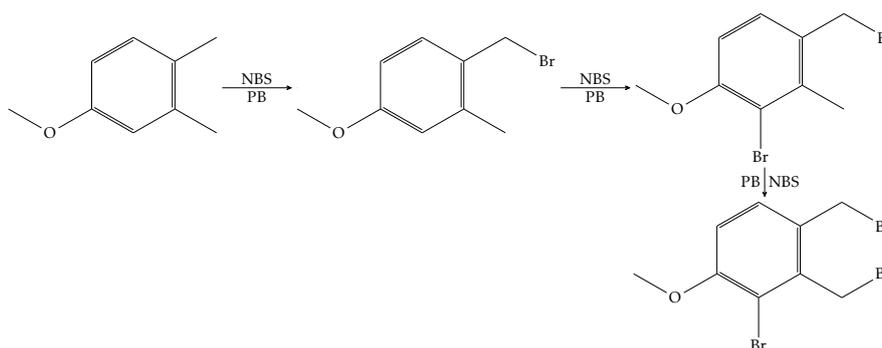


FIGURE 2.23 – Bromation du 3,4-diméthylanisole en présence de NBS et de PB.

L'accès au 3,4-di(bromométhyl)anisole (**12**) n'est donc pas réalisable dans ces conditions. Une voie photochimique a alors été envisagée pour limiter les substitutions aromatiques.<sup>[173,174]</sup> Dans ces conditions et en présence de NBS, le 3,4-di(bromométhyl)anisole (**12**) a été obtenu avec succès avec un rendement de 31 % (Figure 2.24).

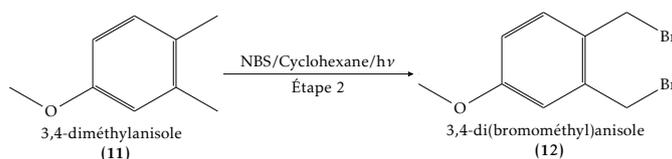
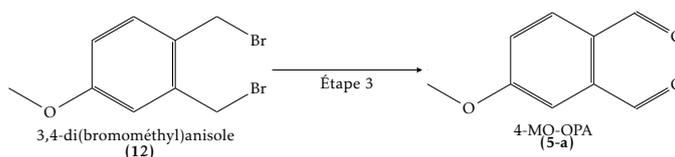


FIGURE 2.24 – Synthèse du 3,4-di(bromométhyl)anisole à partir du 3,4-diméthylanisole par voie photochimique.

### 2.2.3.3 Synthèse du 4-MO-OPA (**5-a**)

L'oxydation du 3,4-di(bromo- méthyl)anisole (**12**) a été testée selon les conditions optimales déterminées pour l'oxydation du 1,2-bis(bromométhyl)benzène (**8-b**). Ici, seul le mélange eau oxygénée et éthanol a donné accès au 4-MO-OPA (**5-a**) (Tableau 2.10 et Figure 2.25).

TABLEAU 2.10 – Comparaison des rendements obtenus pour la synthèse du 4-MO-OPA à partir du 3,4-di(bromométhyl)anisole.



Entrée	Réactif	Synthèse	Température	Temps	Rendement <sup>1</sup>
1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , éthanol	Δ	80 °C	15 h	45 %
2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , éthanol	MAOS	130 °C	30 min	85 %
3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , [emim]Br, NMM, KI	MAOS	100 °C	30 min	/ <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Rendement isolé

<sup>2</sup> 2-(bromométhyl)-4-méthoxybenzaldéhyde

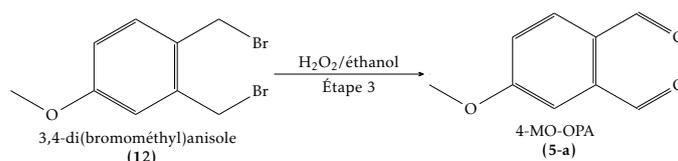


FIGURE 2.25 – Synthèse par MAOS du 4-MO-OPA à partir du 3,4-di(bromométhyl)-anisole.

### 2.2.4 Conclusion sur la voie de synthèse du 4-HO-OPA à partir du 3,4-diméthylphénol

Cette synthèse totale de 4-HO-OPA (6) se déroule en quatre étapes (Figure 2.26). Elle se compose de trois étapes par MAOS et d'une étape photochimique pour un rendement global de 22 %. La partie limitante de cette synthèse concerne l'irradiation photochimique car à conditions opératoires constantes, le taux de conversion en dérivés dibromés n'est pas répétable. Une fluctuation du degré de fonctionnalisation conduisant à une pluribromation aliphatique a été observée sur une longue période d'utilisation du réacteur photochimique laissant à supposer une variation de la plage d'irradiation (UV-C).

En réponse à ce problème, une réduction de la polyfonctionnalisation pourrait être tentée par action de la triéthylphosphite et de la N,N-diisopropyléthylamine pour accéder au dérivé alpha dibromé.<sup>[177]</sup>

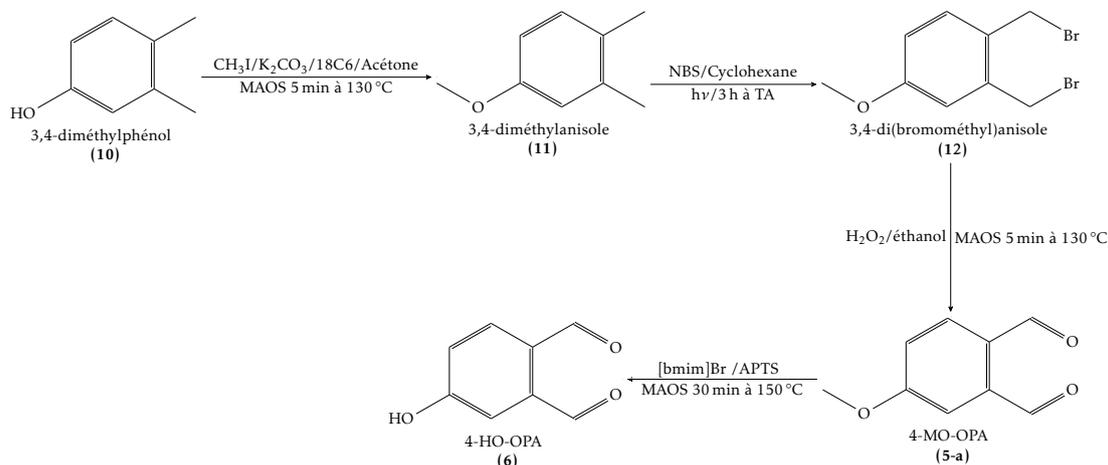


FIGURE 2.26 – Synthèse du 4-HO-OPA à partir du 3,4-diméthylphénol.

## 2.3 Stratégie de synthèse selon SINGH et KHADE<sup>[156]</sup>

L'accès au 4-HO-OPA a été envisagé ici au travers de la déprotection du 4-MO-OPA dont la synthèse a été décrite dans les travaux de SINGH et KHADE<sup>[156]</sup> à partir de l'acide 3-méthoxybenzoïque (Figure 2.27).

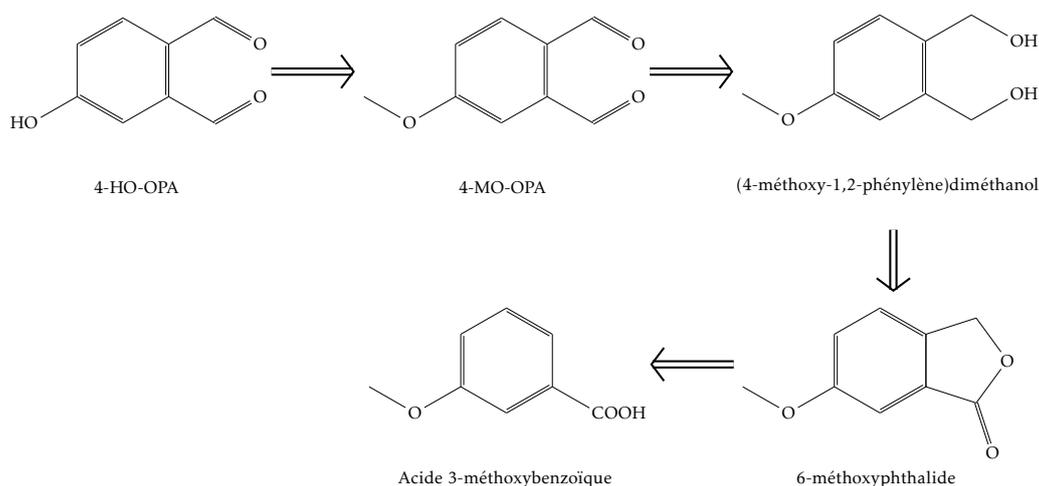


FIGURE 2.27 – Rétrosynthèse du 4-HO-OPA au départ de l'acide 3-méthoxybenzoïque.

Le 4-MO-OPA a été obtenu par hydroxyméthylation de l'acide 3-méthoxybenzoïque suivie d'une lactonisation pour aboutir au 6-méthoxyphthalide. Une réduction en présence de  $\text{LiAlH}_4$  conduit au (4-méthoxy-1,2-phénylène)diméthanol qui est ensuite oxydé.

Une dernière étape de déprotection de la fonction méthoxy du 4-MO-OPA est ensuite apportée à cette synthèse publiée par SINGH et KHADE<sup>[156]</sup> pour permettre l'accès au 4-HO-OPA.

### 2.3.1 Synthèse optimisée du 4-MO-OPA à partir de l'acide 3-méthoxybenzoïque

#### 2.3.1.1 Synthèse du 6-méthoxyphthalide (14)

Comme indiqué, la synthèse du 6-méthoxyphthalide (14) s'effectue au travers d'une hydroxyméthylation de l'acide 3-méthoxybenzoïque suivie d'une lactonisation intramoléculaire (Figure 2.28).

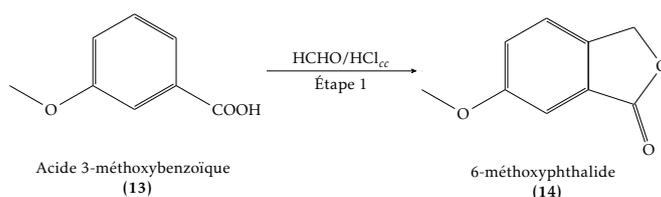


FIGURE 2.28 – Synthèse du 6-méthoxyphthalide selon SINGH et KHADE<sup>[156]</sup> à partir de l'acide 3-méthoxybenzoïque.

Cette synthèse a initialement été développée sur l'acide 3,4-diméthoxybenzoïque par BHATTACHARJEE et POPP<sup>[178]</sup> dans un mélange [50 : 50] de formaldéhyde et d'acide chlorhydrique concentré. Transposée à l'identique par SINGH et KHADE à acide 3-méthoxybenzoïque, elle ne permet toutefois pas un accès au 6-méthoxyphthalide avec un bon rendement.<sup>[156]</sup> Ce résultat s'explique par la présence d'une seconde lactone, isomère de la première, inséparable sur colonne de silice.<sup>[156]</sup> Durant ce travail, trois conditions opératoires ont été testées. La présence de ces deux lactones a été confirmée par RMN <sup>1</sup>H du brut réactionnel (Tableau 2.11).

TABLEAU 2.11 – Comparaison des rendements en 6 et en 7-méthoxyphthalide obtenus en fonction du solvant et de la température.

COc1cccc(C(=O)O)c1  $\xrightarrow{\text{HCHO/HCl}_{cc}}$  COc1ccc2c(c1)oc(=O)c2 + COc1ccc2c(c1)oc(=O)c2  
 Acide 3-méthoxybenzoïque (13)                      6-méthoxyphthalide (14)                      7-méthoxyphthalide (14-b)

Entrée	Formaldéhyde 37 %	Température	Rendement <sup>1</sup>	
			(8)	(8-b)
1	aqueux	70 °C	25 %	18 %
2	aqueux	Reflux (100 °C)	37 %	20 %
3	dans méthanol (15 %)	Reflux (70 °C)	34 %	65 %

<sup>1</sup> Rendement brut

Pour un accès exclusif au 6-méthoxyphthalide (14), les travaux de KAMAIKE et al.,<sup>[179]</sup> BRIMBLE et BURGESS,<sup>[180]</sup> SPERRY et al.<sup>[181]</sup> et LIANG et al.<sup>[73]</sup> évoquent, en condition optimale, l'utilisation de dioxane en co-solvant pendant une durée

de 72 h avec une température de 50 à 60 °C (Tableau 2.12).

TABLEAU 2.12 – Comparaison des rendements de 6-méthoxyphthalide obtenus dans la littérature.

Équipe	Quantité <sup>1</sup>	Température	Temps	Rendement <sup>2</sup>
KAMAIKE et al. <sup>[179]</sup>	25 mmol	50 °C	72 h	80 %
BRIMBLE et BURGESS <sup>[180]</sup>	/	50 °C	120 h	45 %
SPERRY et al. <sup>[181]</sup>	79 mmol	70 °C	80 h	61 %
LIANG et al. <sup>[73]</sup>	100 mmol	60 °C	72 h	70 %

<sup>1</sup> Quantité de matière initiale d'acide 3-méthoxybenzoïque

<sup>2</sup> Rendement isolé

L'influence de la présence de ce co-solvant (dioxane) a donc été évaluée (Tableau 2.13); elle a permis d'aboutir à la même conclusion, à savoir l'obtention exclusive du 6-méthoxyphthalide (**14**). Ce résultat peut s'expliquer par la formation de liaisons hydrogènes entre le co-solvant et le formaldéhyde qui, pour des raisons d'encombrement, réagit sélectivement en para du groupement méthoxy.

TABLEAU 2.13 – Optimisation des conditions de la réaction de lactonisation (temps et température).

Acide 3-méthoxybenzoïque (13)  $\xrightarrow[\text{Étape 1}]{\text{HCHO/HCl}_{cc}/\text{Dioxane}}$  6-méthoxyphthalide (14)

Entrée	Température	Temps	Rendement <sup>1</sup>
1	60 °C	15 h	34 %
2	60 °C	48 h	61 %
3	60 °C	72 h	60 %
4	70 °C	15 h	85 %
5	70 °C	48 h	39 %
6	70 °C	72 h	35 %
7	80 °C	72 h	16 %

<sup>1</sup> Rendement isolé

Un rendement optimum à 85 % pour une température de 70 °C et une durée de réaction de 15 h a été obtenu suite à l'optimisation des conditions opératoires.

### 2.3.1.2 Synthèse du (4-méthoxy-1,2-phénylène)diméthanol (15)

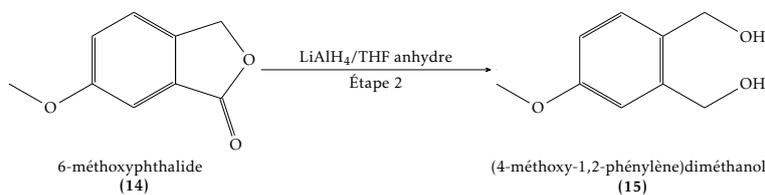


FIGURE 2.29 – Synthèse du (4-méthoxy-1,2-phénylène)diméthanol à partir du 6-méthoxyphthalide.

Le (4-méthoxy-1,2-phénylène)diméthanol (15) est obtenu par réduction du 6-méthoxyphthalide en présence de  $\text{LiAlH}_4$  dans le tétrahydrofurane (THF) anhydre (Figure 2.29) selon les travaux de LIANG et al..<sup>[73]</sup> Toutefois, une étude de solubilité a permis d'identifier des pertes de (4-méthoxy-1,2-phénylène)diméthanol lors des traitements. Un lavage à l'éthanol en lieu et place du dichlorométhane (DCM) a permis un rendement de 82 %.

### 2.3.1.3 Synthèse du 4-MO-OPA (5-a)

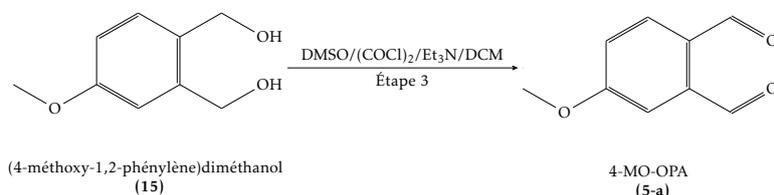


FIGURE 2.30 – Synthèse du 4-MO-OPA à partir du (4-méthoxy-1,2-phénylène)-diméthanol.

La dernière étape correspond à une oxydation de SWERN (Figure 2.30). Toutefois, un lavage à l'éther diéthylique et non pas au DCM a été choisi lors du traitement pour permettre un rendement de 70 %.

### 2.3.2 Conclusion sur la voie de synthèse du 4-HO-OPA à partir de l'acide 3-méthoxybenzoïque

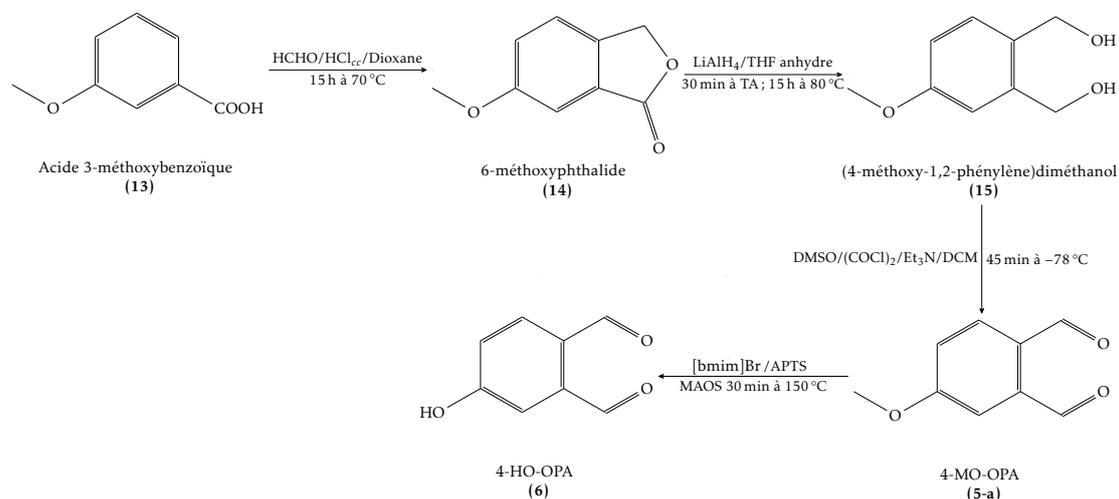


FIGURE 2.31 – Synthèse optimisée du 4-HO-OPA à partir de l'acide 3-méthoxybenzoïque.

Cette synthèse totale du 4-HO-OPA (6) possède un rendement global de 49 % (Figure 2.31). Malheureusement, des problèmes de répétabilité durant la troisième étape (oxydation de SWERN) ne nous ont pas permis d'avoir une synthèse robuste. Les écarts de rendement observés sont probablement dus à la faible solubilité à froid du (4-méthoxy-1,2-phénylène)diméthanol dans le dichlorométhane.

## 2.4 Conclusion

L'étude présentée dans ce chapitre concerne la synthèse du 4-HO-OPA menée selon trois stratégies.

La première voie permet d'obtenir le 4-MO-OPA avec un rendement global de 51 %. Cette synthèse débute par une alcynylation de l'alcool furfurylique afin de former le 2-((prop-2-ynoxy)méthyl)furane. Elle est suivie d'une réaction de DIELS-ALDER intramoléculaire pour donner le 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol qui est

rapidement mis en réaction pour former le 5-méthoxy-4,5-dihydrobenzofurane. Ce dernier est ensuite oxydé en présence de DDQ pour générer le 4-MO-OPA.

La seconde voie permet d'obtenir le 4-MO-OPA à partir du 3,4-diméthylphénol avec un rendement de 22 %. La formation du 3,4-diméthylanisole suivie d'une dibromation benzylique régiosélective permet d'accéder au 3,4-di(bromo-méthyl)anisole. Enfin, une oxydation en présence de peroxyde d'hydrogène fournit le 4-MO-OPA.

Enfin, la dernière synthèse est réalisée à partir de l'acide 3-méthoxybenzoïque avec un rendement de 49 %. La première étape correspond à une hydroxyméthylation suivie d'une lactonisation menant au 6-méthoxyphthalide dont la réduction nous a conduit au (4-méthoxy-1,2-phénylène)diméthanol. Enfin, une oxydation de SWERN sur ce (4-méthoxy-1,2-phénylène)diméthanol mène au 4-MO-OPA.

Ces trois voies de synthèse convergent toutes vers le 4-MO-OPA dont la déprotection a été réalisée selon la même méthodologie (MAOS) afin de générer le 4-HO-OPA.

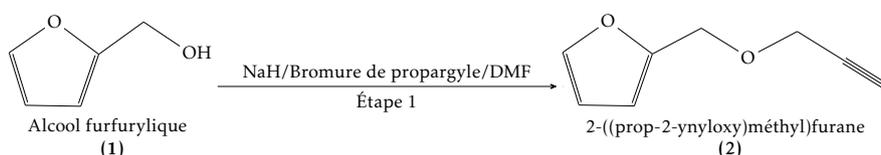
Parmi ces trois voies de synthèse, la première issue de l'alcool furfurylique est la plus robuste. De plus, l'optimisation réalisée dans le cadre de ce travail a produit un rendement global de 51 % soit 10 fois supérieur à celui des travaux de CAO et ISAACS.

Quant deux autres voies, celle développée à partir de l'acide 3-méthoxybenzoïque comporte une étape d'oxydation difficilement répétable. Enfin, le manque de régiosélectivité de la bromation du 3,4-diméthylanisole en 3,4-di(bromo-méthyl)anisole conduit à écarter la voie inspirée des travaux de BILL et TARBELL. Néanmoins, une réflexion plus poussée devrait être portée sur le contrôle de la régiosélectivité de cette étape de bromation car elle assurerait, en cas de réussite, un accès extrêmement performant au 4-HO-OPA.

## Protocoles de synthèse du 4-HO-OPA

### A.1 Synthèse à partir de l'alcool furfurylique

#### A.1.1 2-((prop-2-ynyloxy)méthyl)furane (2)

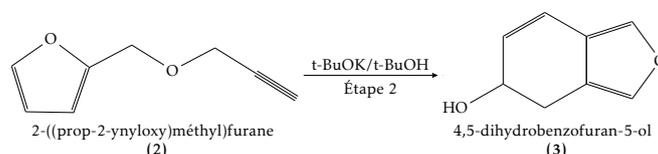


9,0 mL (103,8 mmol) d'alcool furfurylique est ajouté goutte à goutte à une solution de NaH (5,0 g, 207,5 mmol) dans 100 mL de DMF à 0 °C. Après 90 min, 1,1 équivalent de bromure de propargyle (12,7 mL, 114,2 mmol) est introduit goutte à goutte dans le milieu. Le mélange résultant est ensuite agité pendant une nuit à température ambiante. Après addition d'eau, de multiples extractions à l'éther diéthylique sont réalisées jusqu'à l'obtention d'une phase organique incolore. Les phases organiques combinées sont ensuite lavées avec une solution saturée de NaCl, séchées sur MgSO<sub>4</sub> et concentrées sous pression réduite. Le produit huileux est ensuite lavé à l'hexane pour fournir le composé (2) sous forme d'une huile brune (14,1 g; rendement quantitatif).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ 7,40 (d, J=1,5 Hz, 1H, H<sub>arom</sub>); 6,35 (d, J=3,1 Hz, 1H, H<sub>arom</sub>); 6,33 (dd, J=3,1 et 1,5 Hz, 1H, H<sub>arom</sub>); 4,54 (s, 2H); 4,13 (d, J=2,3 Hz, 2H); 2,46 (t, J=2,3 Hz; 1H).

RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 150,9; 143,2; 110,5; 110,2; 79,4; 74,9; 63,2; 56,9.

### A.1.2 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol (3)



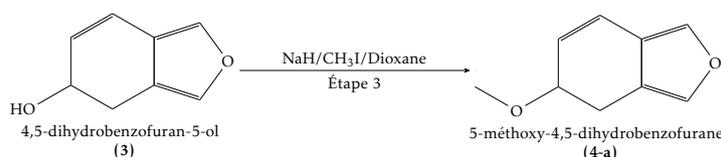
14,1 g (103,8 mmol) de 2-((prop-2-ynoxy)méthyl)furane (2) est ajouté à une solution de t-BuOK (23,2 g; 207,5 mmol) dans 100 mL de t-BuOH puis chauffé à reflux pendant 5 h. Après ajout de 100 mL d'eau, de multiples extractions à l'éther diéthylique sont réalisées jusqu'à l'obtention d'une phase organique incolore. Les phases organiques combinées sont ensuite lavées avec une solution saturée de NaCl, séchées sur MgSO<sub>4</sub> et évaporées sous vide. Le produit est ensuite purifié par chromatographie flash en utilisant une cartouche de SiO<sub>2</sub> (80 g) et un gradient d'hexane:acétate d'éthyle de 2:1 à 1:1 (CCM hexane:acétate d'éthyle 2:1 R<sub>f</sub> = 0,4). Le 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol (3) est ainsi obtenu sous forme d'une huile jaune (12,0 g; 85%).

IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)  $\nu$  3340.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7,31 (s, 1H, H<sub>arom</sub>); 7,19 (s, 1H, H<sub>arom</sub>); 6,51 (d, J=9,8 Hz, 1H); 5,92 (dd, J=9,8 et 3,9 Hz, 1H); 4,49 (td, J=6,6 et 3,9 Hz, 1H); 2,87 (dd, J=15,7 et 6,6 Hz, 1H); 2,77 (dd, J=15,7 et 6,6 Hz, 1H); 2,03 (s, 1H).

RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  138,3; 137,3; 129,7; 120,4; 119,9; 117,3; 65,5; 27,9.

### A.1.3 5-méthoxy-4,5-dihydrobenzofurane (4-a)



3,3 g (24,3 mmol) de 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol (**3**) est ajouté à une solution de NaH (1,46 g; 36,4 mmol) dans 20 mL de dioxane anhydre. Après 15 min, 1,8 mL (29,1 mmol) de iodométhane est additionné lentement puis la solution résultante est agitée pendant une nuit à TA. Après addition d'eau et filtration, le filtrat est récupéré et concentré sous pression réduite pour donner le composé (**4-a**) (3,4 g; 95%) sous la forme d'une huile orange utilisée sans purification supplémentaire.

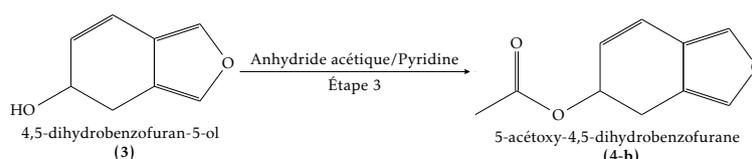
IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ )  $\nu$  1075, 791, 586.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,30 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ); 7,18 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6,55 (d,  $J=9,9$  Hz, 1H); 5,93 (dd,  $J=9,9$  et 3,6 Hz, 1H); 4,12-4,11 (m, 1H); 3,39 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 2,90 (dd,  $J=15,6$  et 6,1 Hz, 1H), 2,76 (dd,  $J=15,6$  et 6,1 Hz, 1H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  137,8; 137,1; 127,6; 120,7; 120,2; 117,8; 74,2; 56,0; 24,4.

HRMS-ESI ( $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_2^+$ ) calculé : 151,0754 [ $\text{M} + \text{H}^+$ ].  
expérimental : 151,0753.

#### A.1.4 5-acétoxy-4,5-dihydrobenzofurane (**4-b**)



Une solution composée de 4,72 g (34,7 mmol) de 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol (**3**) dans 40 mL d'anhydride acétique et 40 mL de pyridine est agitée pendant 72 h à TA. Après concentration sous vide, la pyridine résiduelle est éliminée par distillation azéotropique à l'aide de toluène pour donner le composé (**4-b**) (5,9 g; 95%) sous la forme d'une huile jaune.

IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ )  $\nu$  1709, 1234, 1002, 748, 602.

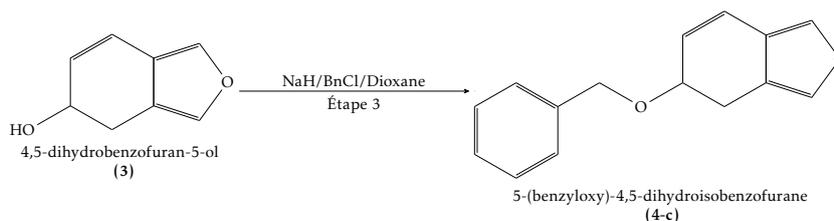
RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,33 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ); 7,18 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6,60 (d,  $J=9,8$  Hz, 1H); 5,84 (dd,  $J=9,8$  et 4,1 Hz, 1H); 5,52 (td,  $J=6,2$  et 4,1 Hz, 1H); 2,87 (dd,  $J=16,2$  et 6,2 Hz, 1H), 2,74 (dd,  $J=16,2$  et 6,2 Hz, 1H); 1,93 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170,7; 138,0; 137,6; 125,1; 121,8; 120,2; 116,9; 67,7; 24,4; 21,3.

HRMS-ESI ( $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_3^+$ ) calculé : 179,0703 [ $\text{M} + \text{H}^+$ ].

expérimental : 179,0701.

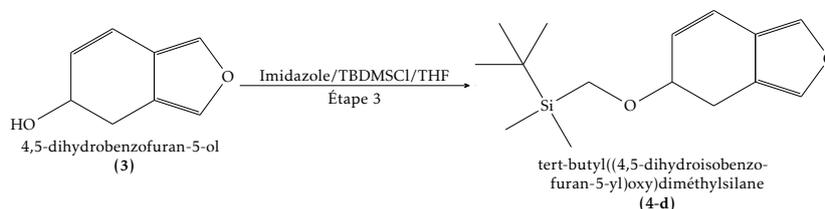
### A.1.5 5-(benzyloxy)-4,5-dihydroisobenzofurane (4-c)



0,15 g (1,1 mmol) de 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol (**3**) est ajouté à une solution de NaH (9 g; 2,2 mmol) dans du dioxane anhydre (6 mL). Après 30 min, 0,26 mL (2,2 mmol) de BnCl est additionné puis la solution résultante est agitée pendant une nuit à TA. Après addition de 10 mL d'eau, la phase aqueuse est extraite au DCM puis à éther diéthylique. Enfin, les phases organiques sont réunies, séchées sur  $\text{MgSO}_4$  et concentrées sous pression réduite pour donner le composé (**4-c**) (24 mg; 10%) sous la forme d'une huile brune.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,42 - 7,34 (m, 5H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ); 7,32 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ); 7,20 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6,53 (d,  $J=9,6$  Hz, 1H); 5,94 (dd,  $J=9,6$  et 4,2 Hz, 1H); 4,59 (s, 2H); 4,50 (td,  $J=6,2$  et 4,2 Hz, 1H); 2,96 (dd,  $J=16,2$  et 6,2 Hz, 1H), 2,84 (dd,  $J=16,2$  et 6,2 Hz, 1H).

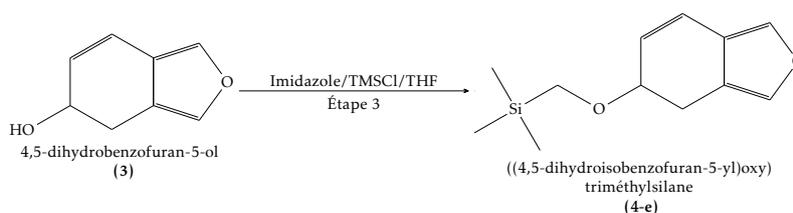
### A.1.6 *tert*-butyl((4,5-dihydroisobenzofuran-5-yl)oxy)diméthylsilane (4-d)



1,6 g (23,2 mmol) d'imidazole et 2,1 g (13,9 mmol) de TBDMSCl sont ajoutés à 0 °C à une solution de 1,6 g (11,6 mmol) de 4,5-dihydroisobenzofuran-5-ol (3) dans du THF anhydre (50 mL). La solution résultante est agitée pendant une nuit à TA. Après addition de 25 mL d'une solution saturée en chlorure d'ammonium, le mélange est extrait à l'éther diéthylique. Enfin, les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO<sub>4</sub> et concentrées sous pression réduite pour donner le composé (4-d) (0,88 g ; 30%) sous la forme d'une huile jaune.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz ; CDCl<sub>3</sub>) δ 7,24 (s, 1H, H<sub>arom</sub>) ; 7,12 (s, 1H, H<sub>arom</sub>) , 6,37 (d, J=9,8 Hz, 1H) ; 5,75 (dd, J=9,8 et 2,9 Hz, 1H) ; 4,60 (td, J=6,3 et 2,9 Hz, 1H) ; 2,64 (dd, J=16,2 et 6,3 Hz, 1H) , 2,60 (dd, J=16,2 et 6,3 Hz, 1H) ; 0,93 (s, 9H, CCH<sub>3</sub>) ; 0,12 (s, 6H, SiCH<sub>3</sub>).

### A.1.7 ((4,5-dihydroisobenzofuran-5-yl)oxy)triméthylsilane (4-e)

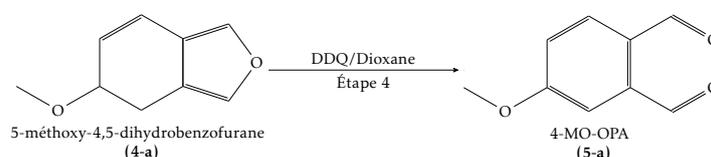


1,6 g (23,2 mmol) d'imidazole et 1,8 mL (13,9 mmol) de TMSCl sont ajoutés à 0 °C à une solution de 1,6 g (11,6 mmol) de 4,5-dihydroisobenzofuran-5-ol (3) dans du THF anhydre (50 mL). La solution résultante est agitée pendant une nuit à TA. Après addition de 25 mL d'une solution saturée en chlorure d'ammonium,

le mélange est extrait à l'éther diéthylique. Enfin, les phases organiques sont combinées, séchées sur  $\text{MgSO}_4$  et concentrées sous pression réduite pour donner le composé (**4-e**) (0,37 g; 15%) sous la forme d'une huile jaune.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,32 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ); 7,13 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6,39 (d,  $J=9,7$  Hz, 1H); 5,74 (dd,  $J=9,7$  et 3,9 Hz, 1H); 4,57 (td,  $J=6,4$  et 3,9 Hz, 1H); 2,87 (dd,  $J=16,4$  et 6,4 Hz, 1H), 2,81 (dd,  $J=16,4$  et 6,4 Hz, 1H); 0,11 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ).

### A.1.8 4-MO-OPA (**5-a**)



3,4 g (22,7 mmol) de 5-méthoxy-4,5-dihydrobenzofurane (**4-a**) sont placés dans 100 mL de dioxane anhydre. Après ajout de 10,3 g (45,3 mmol) de DDQ, le milieu est agité à TA pendant 48 h. L'excès de DDQ est éliminé par filtration, lavé avec du DCM puis le filtrat est concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par deux chromatographies automatisées successives. La première comporte une phase mobile à 100% de DCM ( $R_f = 0,9$ ) et la seconde est réalisée avec un mélange hexane:acétate d'éthyle (1:3) afin de séparer le 4-MO-OPA ( $R_f = 0,6$ ) de l'OPA ( $R_f = 0,9$ ). Le produit brun huileux résultant est finalement recristallisé dans l'hexane pour donner le composé (**5-a**) sous forme d'aiguilles blanches (2,8 g; 63%).

Point de fusion : 41 - 42 °C.

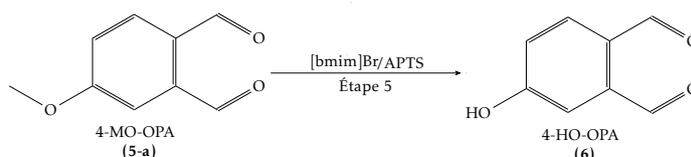
IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ )  $\nu$  1710, 1690.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,67 (s, 1H); 10,34 (s, 1H); 7,94 (d,  $J=8,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ); 7,46 (d,  $J=2,6$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ); 7,22 (dd,  $J=8,5$  et 2,6 Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ); 3,95 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  192,0; 191,0; 163,9; 138,7; 134,6; 129,6; 118,9; 114,7; 56,0.

HRMS-ESI ( $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_3^+$ ) calculé : 165,0546 [ $\text{M} + \text{H}^+$ ].  
expérimental : 165,0549.

### A.1.9 4-HO-OPA (6)



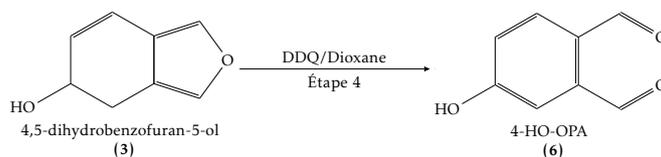
Un mélange composé de 4-MO-OPA (5-a) (200 mg ; 1,2 mmol), d'APTS (1,68 g ; 9,8 mmol) et de [bmim]Br (4,0 g ; 18,3 mmol) est placé dans un vial scellé et irradié sous micro-ondes pendant 30 min à 150 °C sous forte agitation. Après refroidissement, le mélange est soumis à une extraction vigoureuse à l'éther diéthylique pendant une nuit. La phase étherée est séparée, concentrée sous vide pour fournir un brut de réaction qui cristallise dans l'hexane. Le composé (6) est ensuite récupéré par filtration et se présente sous forme de cristaux jaunes (181 mg ; rendement quantitatif).

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ )  $\nu$  3213, 2913, 2847, 1682, 1591, 1572, 1500, 1449, 1366, 1308, 1243, 1204, 1161, 1095, 973.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz ; diméthylsulfoxyde (DMSO))  $\delta$  11,00 (s, 1H); 10,49 (s, 1H); 10,27 (s, 1H); 7,92 (d,  $J=8,4$  Hz, 1H,  $H_{\text{arom}}$ ); 7,26 (d,  $J=2,5$  Hz, 1H,  $H_{\text{arom}}$ ); 7,17 (dd,  $J=8,4$  et 2,5 Hz, 1H,  $H_{\text{arom}}$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO)  $\delta$  193,8; 192,3; 162,8; 139,5; 134,9; 128,7; 120,4; 116,3.

### A.1.10 4-HO-OPA (6) oxydation directe



1,3 g (9,9 mmol) de 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol (**3**) sont placés dans 40 mL de dioxane anhydre. Après ajout de 3,4 g (14,8 mmol) de DDQ, le milieu est agité à TA pendant 48 h. Après filtration et lavage de l'excès de DDQ au DCM, le filtrat est récupéré puis concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié au moyen de deux chromatographies automatisées successives. La première comporte une phase mobile à 100% de DCM ( $R_f = 0,9$ ) et la seconde est réalisée avec un mélange hexane:acétate d'éthyle (1:3) afin de séparer le 4-HO-OPA ( $R_f = 0,8$ ) de l'OPA ( $R_f = 0,9$ ). Le produit brun huileux résultant est finalement recristallisé dans l'hexane pour donner le composé (**6**) sous forme de cristaux jaunes (310 mg; 21%).

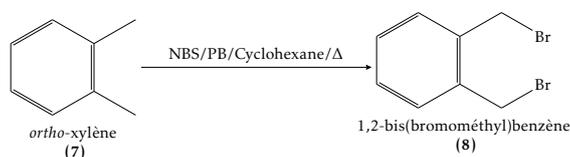
IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ )  $\nu$  3213, 2913, 2847, 1682, 1591, 1572, 1500, 1449, 1366, 1308, 1243, 1204, 1161, 1095, 973.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz; DMSO)  $\delta$  11,00 (s, 1H); 10,49 (s, 1H); 10,27 (s, 1H); 7,92 (d,  $J=8,4$  Hz, 1H,  $H_{\text{arom}}$ ); 7,26 (d,  $J=2,5$  Hz, 1H,  $H_{\text{arom}}$ ); 7,17 (dd,  $J=8,4$  et 2,5 Hz, 1H,  $H_{\text{arom}}$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO)  $\delta$  193,8; 192,3; 162,8; 139,5; 134,9; 128,7; 120,4; 116,3.

## A.2 Synthèse à partir du 3,4-diméthylphénol

### A.2.1 1,2-bis(bromométhyl)benzène (**8**)



1,1 mL (9,1 mmol) d'*ortho*-xylène (**7**) est ajouté à une solution de NBS (4,1 g; 22,8 mmol) et PB (0,22 g; 0,9 mmol) dans 20 mL de cyclohexane et le mélange est chauffé à reflux pendant 6 h. Après retour à TA, la solution est filtrée puis

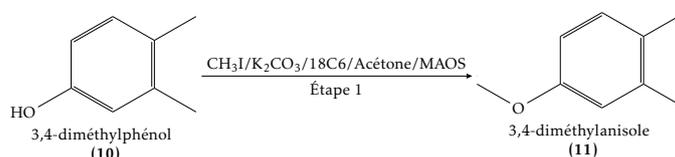
évaporée. Une recristallisation dans l'éthanol fournit un solide blanc (**8**) (1,1 g; 46%).

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ )  $\nu$  2939, 1610, 1504, 1455, 1161, 1122.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,40 (dd,  $J=7,5$  et  $3,7$  Hz, 2H,  $H_{\text{arom}}$ ); 7,34 (dd,  $J=7,5$  et  $3,7$  Hz, 2H,  $H_{\text{arom}}$ ); 4,70 (s, 4H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  139,9; 126,5; 124,8; 29,9.

### A.2.2 3,4-diméthylanisole (**11**)



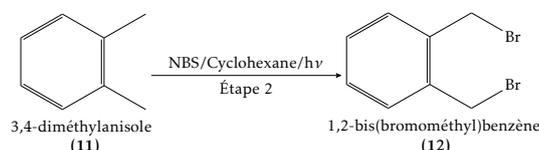
1,0 g (8,2 mmol) de 3,4-diméthylphénol (**10**) et 1,24 g (9,0 mmol) de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  sont dissous dans 40 mL d'acétone puis introduit dans un vial. Après ajout d'1,0 mL (16,4 mmol) d'iodométhane et de 4,76 g (18,0 mmol) de 18C6, le mélange est irradié pendant 5 min à  $130^\circ\text{C}$ . Après retour à TA, la solution est filtrée et évaporée. Le mélange solide/huile est alors dissous dans 4 mL afin de récupérer une huile jaune correspondant au composé (**11**) (0,95 g; 85%).

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ )  $\nu$  2939, 1610, 1504, 1455, 1161, 1122.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,04 (d,  $J=8,2$  Hz, 1H,  $H_{\text{arom}}$ ); 6,72 (d,  $J=2,7$  Hz, 1H,  $H_{\text{arom}}$ ); 6,65 (dd,  $J=8,2$  et  $2,7$  Hz, 1H,  $H_{\text{arom}}$ ); 3,78 (s, 3H); 2,24 (s, 3H); 2,20 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  157,2; 137,7; 130,3; 128,6; 115,5; 110,7; 55,2; 20,1; 18,8.

### A.2.3 3,4-di(bromométhyl)anisole (12)

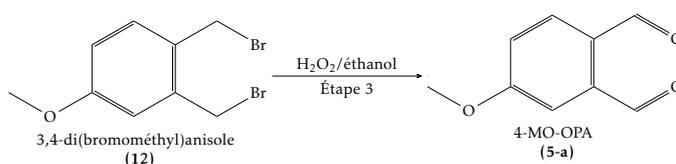


1,0 g (7,35 mmol) de 3,4-diméthylanisole (**11**) et 2,9 g (16,3 mmol) de NBS sont mis en solution dans 50 mL de cyclohexane puis placés dans un réacteur photochimique. Le mélange est placé en atmosphère inerte sous agitation, puis irradié sous UV-C pendant 90 min. Après filtration du brut de réaction, le solvant est évaporé sous vide. L'huile obtenue est purifiée par chromatographie flash sur cartouche de SiO<sub>2</sub> (25 g) avec un éluant hexane:acétate d'éthyle de 2:1 (CCM R<sub>f</sub> = 0,8) pour fournir le 3,4-di(bromométhyl)anisole (**12**) sous forme d'une huile brune (660 mg; 31%).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ 7,29 (d, J=8,5 Hz, 1H, H<sub>arom</sub>); 6,90 (d, J=2,7 Hz, 1H, H<sub>arom</sub>); 6,83 (dd, J=8,5 et 2,7 Hz, 1H, H<sub>arom</sub>); 4,66 (s, 2H); 4,62 (s, 2H); 3,82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160,2; 138,1; 132,5; 128,5; 116,5; 114,7; 55,4; 30,6; 30,0.

### A.2.4 4-MO-OPA (5-a)



120 mg (0,4 mmol) de 3,4-di(bromométhyl)anisole (**12**) sont dissous dans de l'éthanol à 95 % (4,0 mL) en présence d'eau oxygénée à 35 % (0,4 mL; 4,1 mmol) puis l'ensemble est placé dans un vial scellé. Le mélange est irradié 30 min à 130 °C. Une extraction du brut de réaction est réalisée au DCM puis la phase

organique est évaporée sous pression réduite et le résidu est séché sous vide afin d'obtenir le composé **(5-a)** (53 mg; 85%).

Point de fusion : 41 - 42 °C.

IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ )  $\nu$  1710, 1690.

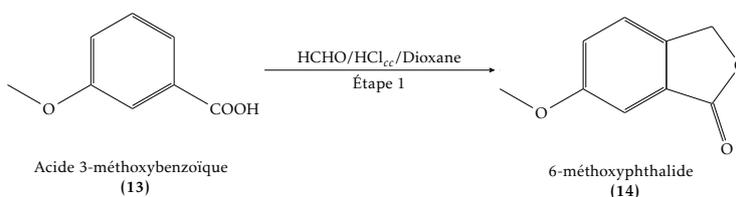
RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,67 (s, 1H); 10,34 (s, 1H); 7,94 (d,  $J=8,5$  Hz, 1H,  $H_{\text{arom}}$ ); 7,46 (d,  $J=2,6$  Hz, 1H,  $H_{\text{arom}}$ ); 7,22 (dd,  $J=8,5$  et 2,6 Hz, 1H,  $H_{\text{arom}}$ ); 3,95 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  192,0; 191,0; 163,9; 138,7; 134,6; 129,6; 118,9; 114,7; 56,0.

HRMS-ESI ( $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_3^+$ ) calculé : 165,0546 [ $\text{M} + \text{H}^+$ ].  
expérimental : 165,0549.

## A.3 Synthèse à partir de l'acide 3-méthoxybenzoïque

### A.3.1 6-méthoxyphthalide (14)

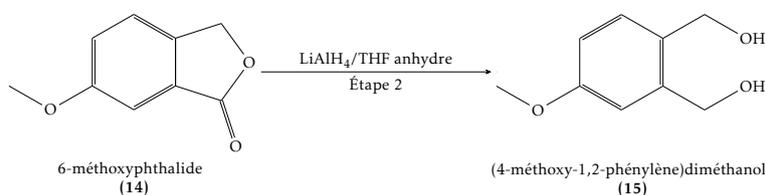


5,0 g (32,9 mmol) d'acide 3-méthoxybenzoïque (**13**) sont dissous dans 20 mL de dioxane. Après ajout de 20 mL de formaldéhyde (37 % dans méthanol) et 20 mL d'acide chlorhydrique concentré, le mélange est porté à reflux pendant 16 h. L'acide chlorhydrique et le dioxane sont évaporés sous vide. Le mélange hétérogène est filtré et le solide ainsi obtenu est mis sous agitation dans l'éthanol à TA pendant une nuit. Enfin, le solide blanc (**14**) ainsi obtenu est filtré et séché sous vide (4,6 g; 85%).

IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ )  $\nu$  1775.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,40 (d,  $J=6,0$  Hz, 1H,  $H_{\text{arom}}$ ); 7,38 (d,  $J=2,3$  Hz, 1H,  $H_{\text{arom}}$ ); 7,25 (dd,  $J=6,0$  et 2,3 Hz, 1H,  $H_{\text{arom}}$ ); 5,29 (s, 2H); 3,90 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).  
RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171,2; 160,6; 138,9; 127,1; 123,2; 122,9; 107,5; 69,5; 55,8.

### A.3.2 (4-méthoxy-1,2-phénylène)diméthanol (15)



5,0 g (30,5 mmol) de 6-méthoxyphthalide (**14**) sont dissous dans 20 mL de THF anhydre puis additionné lentement à une solution d'1,5 g (39,6 mmol) de  $\text{LiAlH}_4$  dans 20 mL de THF anhydre. Le mélange est laissé sous agitation à TA pendant 20 min puis porté à reflux pendant 8 h. Après hydrolyse (10 mL d'eau), le mélange est agité à TA pendant 1 h, évaporé sous vide. Après l'ajout de 10 mL d'éthanol et filtration, la solution est évaporée sous vide pour donner une huile jaune orangée (**15**) (4,2 g; 82%).

IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ )  $\nu$  3421.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,19 (d,  $J=8,3$  Hz, 1H,  $H_{\text{arom}}$ ); 6,87 (d,  $J=2,2$  Hz, 1H,  $H_{\text{arom}}$ ); 6,76 (dd,  $J=8,3$  et 2,2 Hz, 1H,  $H_{\text{arom}}$ ); 4,57 (s, 2H); 4,54 (s, 2H); 3,77 (s, 3H;  $\text{OCH}_3$ ); 3,52 (s, 1H); 1,54 (s, 1H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  159,4; 141,3; 131,6; 131,1; 115,4; 112,7; 63,7; 63,1; 55,3.



## Analyses spectroscopiques en solution aqueuse de l'histamine en présence d'OPA et de 4-MO-OPA par UV et fluorescence moléculaire

Dans ce chapitre, le potentiel applicatif du 4-MO-OPA en tant qu'agent de dérivation vis à vis de l'histamine a été évalué et comparé à celui de l'OPA. Pour cela, les conditions de complexation ainsi que les paramètres de la méthode ont été optimisés par spectroscopie Ultra-Violet (UV) et fluorescence moléculaire sur l'OPA puis transposés au 4-MO-OPA. Ces conditions optimales ont ensuite été appliquées à l'analyse de l'histamine en présence de 4-MO-OPA dans un mélange de standards d'AB puis sur des échantillons réels de thon albacore (*Thunnus albacares*) fournis par l'ANSES.

Pour rappel, la méthode d'analyse de l'histamine par fluorescence moléculaire a été standardisée par l'AOAC et réactualisée en 2015 (AOAC Official method 977.13).<sup>[25,41]</sup> Cette méthode est sensible et reproductible pour l'analyse de l'histamine en présence d'OPA<sup>[25,41,82,83,182-185]</sup> et s'effectue après passage d'un mélange d'AB sur une résine échangeuse d'ions (résine Bio-Rad AG 1-X8).

Pour l'analyse par fluorescence moléculaire des AB en présence d'OPA, la littérature présente des pH d'analyses et des longueurs d'onde d'excitation et d'émission spécifiques en fonction des complexes OPA/AB étudiés laissant entrevoir une possible discrimination des complexes OPA/AB<sup>[186-188]</sup> par rapport

aux complexes OPA/histamine.<sup>[25,41,82,83,182-185]</sup> Cependant, sur échantillon réel, la très large majorité des analyses par fluorescence moléculaire de l'histamine en présence d'OPA s'effectue en aval d'une séparation par HPLC<sup>[42,53,82]</sup> ou résine échangeuse d'ions.<sup>[25,41,82,83,182,184,185]</sup>

Peu d'études<sup>[183,184]</sup> ont été consacrées à l'analyse des complexes OPA/histamine par spectroscopies UV et de fluorescence moléculaire sans séparation antérieure. Les caractéristiques des complexes OPA/histamine, en présence de chlorure de sodium, ont toutefois été étudiées par DOUABALÉ et al..<sup>[183]</sup>

En 2010, TINE et DOUABALÉ<sup>[184]</sup> ont complété ces résultats en étudiant les effets de la température sur la cinétique de formation des complexes en milieu basique. Ils ont également déterminé un pH optimal de 11,5 en présence de chlorure de sodium pour l'analyse en fluorescence moléculaire. Enfin, la méthode d'analyse sur échantillon réel fut adaptée à l'issue d'une séparation sur résine cationique (Amberlite CG-50, Type 1).

Afin de pouvoir comparer les propriétés de dérivation du 4-MO-OPA à l'OPA vis-à-vis de l'histamine, les conditions optimales d'analyse pour l'OPA en fluorescence moléculaire ont été reproduites selon la littérature, complétées et ensuite exploitées pour le 4-MO-OPA.

Une étude par spectroscopies UV et de fluorescence moléculaire des complexes OPA/histamine et 4-MO-OPA/histamine en solution aqueuse a donc été effectuée avec pour objectif de, non seulement déterminer les conditions optimales de détection de l'histamine, mais également d'identifier l'intérêt de l'utilisation du 4-MO-OPA par rapport à l'OPA.

Enfin, la sélectivité de l'analyse de l'histamine dans un mélange synthétique d'AB puis dans un échantillon réel de poisson sera évaluée.

### **3.1 Analyse de l'histamine en présence d'OPA ou de 4-MO-OPA**

Pour caractériser les complexes obtenus par fluorescence moléculaire, différents paramètres doivent être ajustés :

- **le pH** optimal de complexation
- **la stoechiométrie des complexes** en utilisant le rapport du nombre d'équivalent OPA/histamine,
- **la cinétique de formation des complexes** donnant une information sur l'évolution de la réponse en fonction du temps, critère essentiel pour le déploiement de la méthode,
- **la concentration** gamme dans laquelle la réponse est linéaire,
- **la limite de détection et de quantification** .

Pour chacun des paramètres, les optimisations seront tout d'abord réalisées sur l'OPA, puis transposées et adaptées au 4-MO-OPA.

### 3.1.1 Étude par spectroscopie UV et fluorescence moléculaire des complexes OPA/histamine

#### 3.1.1.1 Première approche : détermination des paramètres expérimentaux

La littérature indique qu'un pH basique (supérieur à 11,5) permet d'avoir une émission fluorescente plus importante qu'en milieu acide.<sup>[82,83,183,185]</sup> À pH basique, DOUABALÉ et al.<sup>[183]</sup> précise que les complexes OPA/histamine sont excités à 352 nm et émettent à 433 nm. Une seconde longueur d'onde d'excitation est observée à 268 nm. À cette excitation, les complexes émettent également à 433 nm mais avec une intensité neuf fois plus faible que pour  $\lambda_{\text{excitation}} = 352 \text{ nm}$ .

De plus, d'après les mécanismes supposés de formation (Figures 1.7 et 1.8),<sup>[82,83]</sup> l'histamine peut se complexer avec au moins deux molécules d'OPA. Avant son optimisation, le rapport OPA/histamine a donc été fixé à cinq pour se placer dans des conditions d'analyse similaires à celles obtenues lors de la quantification de la concentration de l'histamine d'un échantillon inconnu.

Une première étude cinétique par fluorescence moléculaire a été réalisée avec un échantillon conservé à 4°C et à l'abri de la lumière pour limiter sa dégradation. Les analyses à différentes durées de complexation ont donné des résultats (en longueurs d'onde et en intensité) très variables (Tableau 3.1).

TABLEAU 3.1 – Évolution des longueurs d'onde d'excitation et d'émission et des intensités associées en unité arbitraire (u.a.) des complexes OPA/histamine en fonction du temps de complexation.

Temps suivant la mise en contact	Excitation		Émission	
	$\lambda_{\text{excitation}}$	Intensité relative (u.a.)	$\lambda_{\text{émission}}$	Intensité relative (u.a.)
3 min	350 nm	661	438 nm	652
30 min	352 nm	747	432 nm	735
6 h	352 nm	896	427 nm	880
15 h	354 nm	945	424 nm	940
24 h	358 nm	1000	419 nm	994
48 h	358 nm	999	419 nm	1000

Cette cinétique indique qu'une complexation de 24 h effectuée à 4 °C permet d'avoir des longueurs d'onde d'excitation et d'émission stables avec une intensité optimale (Figure 3.1).

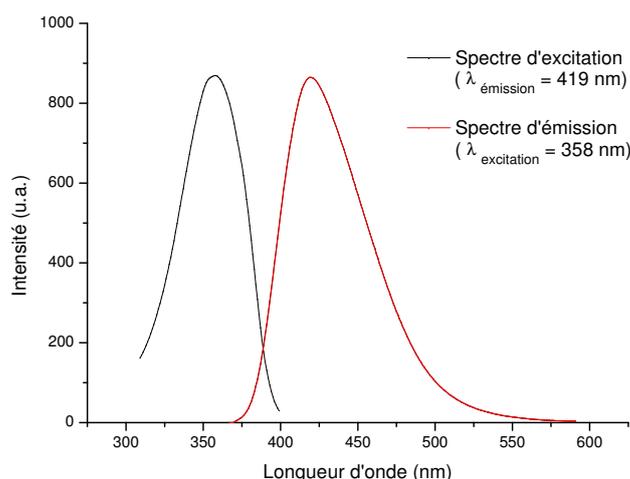


FIGURE 3.1 – Spectre d'excitation avec  $\lambda_{\text{émission}} = 419 \text{ nm}$  et spectre d'émission avec  $\lambda_{\text{excitation}} = 358 \text{ nm}$  des complexes OPA/histamine à pH 12,5.

### 3.1.1.2 Détermination des paramètres optimaux de complexation (pH, rapport de concentration OPA/histamine, temps de complexation)

L'analyse des complexes par spectroscopies UV et fluorescence moléculaire étant un processus itératif, les paramètres préalablement fixés pour chaque étape seront précisés avant chaque étude.

### 3.1.1.2.1 Évaluation de l'influence du pH

Le premier paramètre étudié correspond au pH de complexation. Cette étude a pour objectif de confirmer l'utilisation d'un milieu basique pour obtenir l'intensité d'émission en fluorescence moléculaire la plus élevée. Les paramètres d'analyse des complexes OPA/histamine en fonction du pH ont été les suivants (Tableau 3.2) :

TABLEAU 3.2 – Conditions expérimentales de l'étude des complexes OPA/histamine en fonction du pH.

Temps	pH	$\lambda_{\text{absorption}}$	$\lambda_{\text{excitation}}$	$\lambda_{\text{émission}}$
24 h	Variable étudiée	275 à 800 nm	285 à 400 nm	380 à 600 nm
	[Histamine] (mol/L)	[OPA] (mol/L)	Rapport de concentration	
	UV : $1.10^{-4}$	UV : $5.10^{-4}$	5	
	Fluorescence : $8.10^{-6}$	Fluorescence : $4.10^{-5}$	5	

Lors de la préparation de solutions pour les analyses par UV, une variation de coloration a été observée à l'œil nu (Figure 3.2).

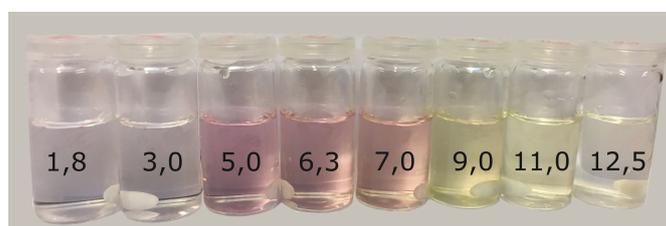
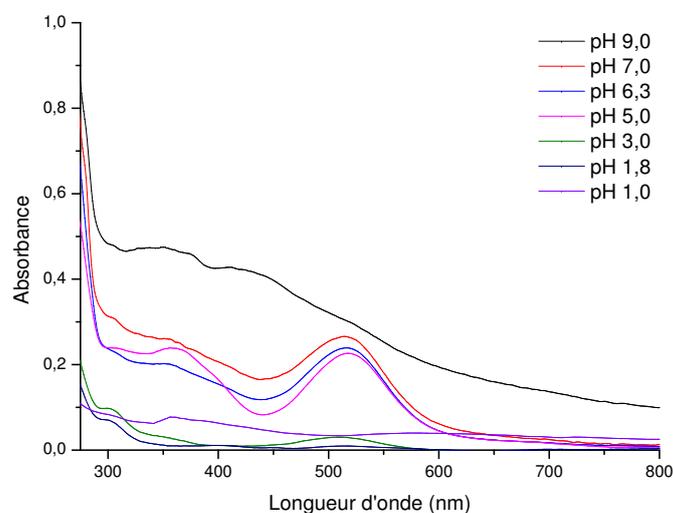


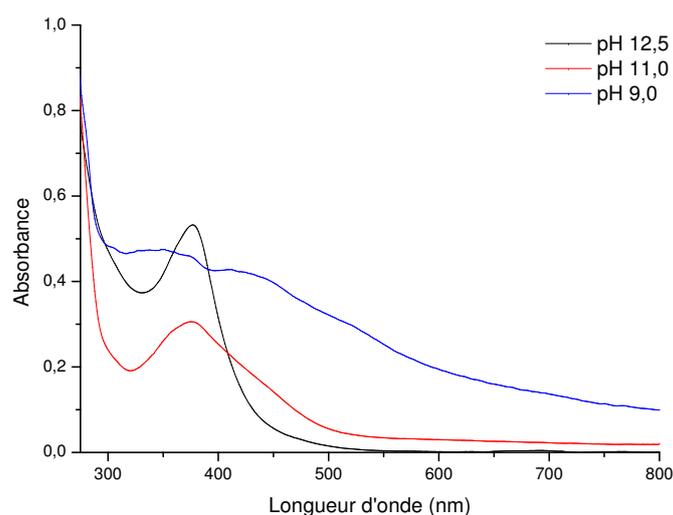
FIGURE 3.2 – Visualisation des complexes OPA/histamine en solution à une concentration de  $1.10^{-4}$  mol/L en fonction du pH.

Quatre zones de pH différentes ont été observées et confirmées par UV indiquant au moins quatre mélanges de complexes (Figure 3.3) :

- $\text{pH} \leq 3$  : Pas d'absorption,
- $3 < \text{pH} \leq 7$  :  $\lambda_{\text{absorption}} = 517 \text{ nm}$ ,
- $7 < \text{pH} \leq 9$  : Zone intermédiaire,
- $9 < \text{pH}$  :  $\lambda_{\text{absorption}} = 377 \text{ nm}$ .



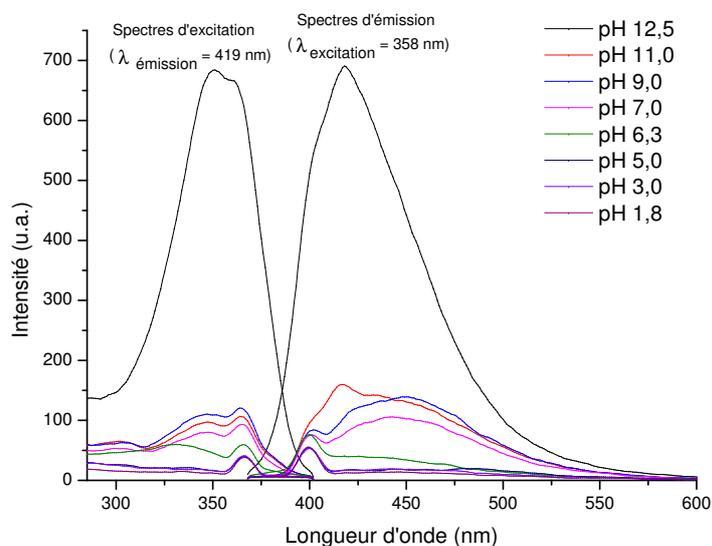
(a) Spectres d'absorption UV enregistrés aux pH de 1,0 à 9,0.



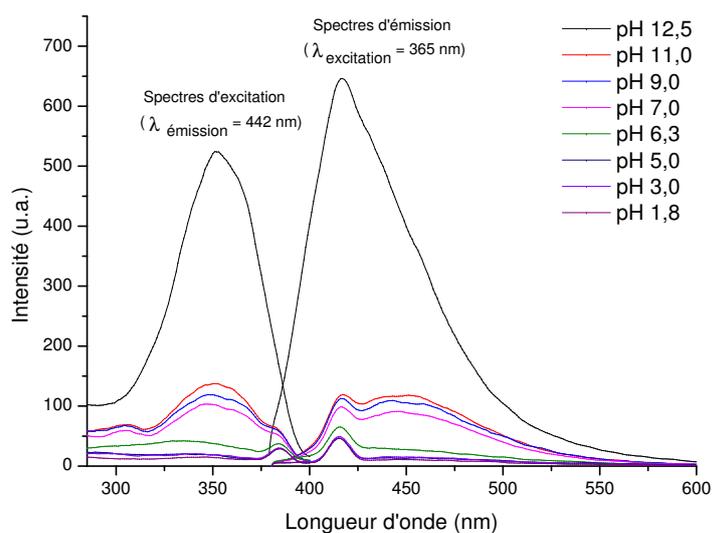
(b) Spectres d'absorption UV enregistrés aux pH de 9,0 à 12,5.

FIGURE 3.3 – Spectres d'absorption UV des complexes OPA/histamine en fonction du pH.

Les analyses par fluorescence moléculaire de trois réplicats avec deux lectures de chaque pH ont été effectuées. Les spectres obtenus pour la gamme d'un des réplicats sont représentés sur la Figure 3.4.



(a) Spectres d'excitation avec  $\lambda_{\text{émission}} = 419 \text{ nm}$  et spectres d'émission de fluorescence avec  $\lambda_{\text{excitation}} = 358 \text{ nm}$ .



(b) Spectres d'excitation avec  $\lambda_{\text{émission}} = 442 \text{ nm}$  et spectres d'émission de fluorescence avec  $\lambda_{\text{excitation}} = 365 \text{ nm}$ .

FIGURE 3.4 – Spectres d'excitation et d'émission de fluorescence des complexes OPA/histamine en fonction du pH.

Ainsi, en fluorescence moléculaire, quatre nouvelles zones ont pu être diffé-

renciées :

- **pH  $\leq 6,3$**  : Absence de fluorescence,
- **$6,3 < \text{pH} \leq 9,0$**  :  $\lambda_{\text{excitation}} = 365 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{émission}} = 442 \text{ nm}$ ,
- **$9,0 < \text{pH} \leq 11,0$**  : Zone intermédiaire,
- **$11,0 < \text{pH}$**  :  $\lambda_{\text{excitation}} = 358 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{émission}} = 419 \text{ nm}$ .

Lorsque le pH est acide, aucune fluorescence n'est observée malgré une légère absorbance à 517 nm pour les pH supérieurs à 3,0 signifiant qu'il existe au moins une forme non fluorescente. Pour des pH neutres ou légèrement basiques (inférieurs ou égales à 9,0), les complexes émettent à 442 nm après une excitation à 365 nm. À pH 11,0, ces complexes sont également observables mais le déplacement de l'émission de 442 à 419 nm après une excitation à 358 nm indique la présence d'au moins une autre forme fluorescente. Enfin, l'augmentation du pH à 12,5 multiplie la fluorescence par environ cinq et est maximum pour une excitation à 358 nm et une émission à 419 nm.

Ces résultats ont permis de valider le pH de 12,5 auquel les complexes OPA/histamine sont les plus fluorescents. Ce pH optimal de complexation est conforme à la littérature puisque cette dernière indique que le pH doit être au minimum de 11,5.<sup>[82,83,183,185]</sup>

### 3.1.1.2.2 Rapport de concentration ( $R_{\text{OPA/histamine}}$ )

Le deuxième paramètre étudié correspond au rapport de concentration entre l'OPA et l'histamine. Cette étude permet de déterminer la stœchiométrie des complexes en présence. Les paramètres suivants ont été fixés (Tableau 3.3)

TABLEAU 3.3 – Conditions expérimentales de l'étude des complexes OPA/histamine en fonction du rapport  $R_{\text{OPA/histamine}}$ .

Temps	pH	$\lambda_{\text{excitation}}$	$\lambda_{\text{émission}}$
		( $\lambda_{\text{émission}} = 419 \text{ nm}$ )	( $\lambda_{\text{excitation}} = 358 \text{ nm}$ )
24 h	12,5	285 à 400 nm	380 à 600 nm
	[Histamine] (mol/L)	[OPA] (mol/L)	Rapport de concentration
	$8 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6} - 3, 2 \cdot 10^{-5}$	Variable étudiée

Pour cela, trois réplicats avec deux lectures de chaque échantillon ont été réalisés. La gamme d'échantillon de complexes est composée d'histamine de concentration fixe et d'OPA de concentration variable. Cette dernière est comprise entre  $2.10^{-6}$  mol/L ( $R_{OPA/histamine} = 0,25$ ) et  $3,2.10^{-5}$  mol/L ( $R_{OPA/histamine} = 4,00$ ) (Figure 3.5).

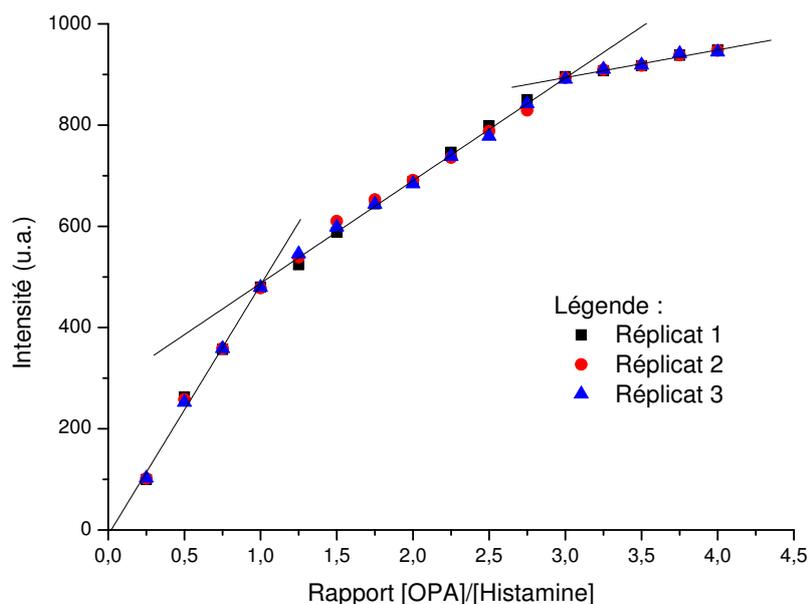


FIGURE 3.5 – Évolution de l'intensité de l'émission à 419 nm après une excitation à 358 nm des complexes OPA/histamine en fonction du rapport des concentrations OPA/histamine.

Il apparait que les complexes en présence peuvent avoir trois stœchiométries différentes comme le montrent les trois droites de tendance :

- Rapport  $\leq 1$ ,
- Rapport compris entre 1 et 3,
- Rapport  $\geq 3$

Ces zones indiquent que les complexes OPA/histamine majoritaires dans chacune des zones se présentent préférentiellement sous la stœchiométrie 1:1 puis 2:1 et enfin 3:1.

La suite de l'étude sur l'OPA a été réalisée en respectant un rapport OPA/histamine équimolaire afin de favoriser au maximum la présence de complexes 1:1 et ainsi limiter le nombre de formes.

### 3.1.1.2.3 Étude de la cinétique

La littérature indique que le temps de complexation entre l'OPA et l'histamine est un paramètre qui influence les formes en présence.<sup>[83]</sup>

Pour cette étude cinétique, deux températures d'analyses ont été fixées. La première solution a été thermostatée à 20 °C alors que la seconde a été stockée à 4 °C entre chaque analyse. Dans les deux cas, les échantillons ont été conservés dans l'obscurité et les paramètres d'analyse suivants ont été fixés (Tableau 3.4)

TABLEAU 3.4 – Conditions expérimentales de l'étude cinétique des complexes OPA/histamine.

Temps	pH	$\lambda_{\text{émission}}$ ( $\lambda_{\text{excitation}} = 358 \text{ nm}$ )
Variable étudiée	12,5	375 à 600 nm
[Histamine] (mol/L)	[OPA] (mol/L)	Rapport de concentration
$8.10^{-6}$	$8.10^{-6}$	1

Pour l'étude cinétique de fluorescence à 20 °C, le premier spectre a été effectuée une minute après la mise en contact de l'OPA et de l'histamine, le second à t=15 min. Puis un spectre a été réalisé toutes les 15 min jusqu'à 50 h (Figure 3.6).

Cette analyse cinétique à 20 °C a montré deux éléments importants. Le premier concerne l'intensité de fluorescence maximale. En effet, dans les conditions d'analyse, cette dernière est atteinte après 15 min puis diminue de moitié en 2 h (Figure 3.7). De même, en 9 h, la longueur d'onde de l'émission maximale diminue de 448 à 419 nm avec une perte de 70 % de l'intensité de fluorescence.

Lors de l'étude à 4 °C, les résultats diffèrent puisque la longueur d'onde émission maximale diminue également de 448 à 419 nm mais environ cinq fois plus lentement et, dans le même temps, l'intensité de fluorescence augmente de 50 % (Figure 3.8).

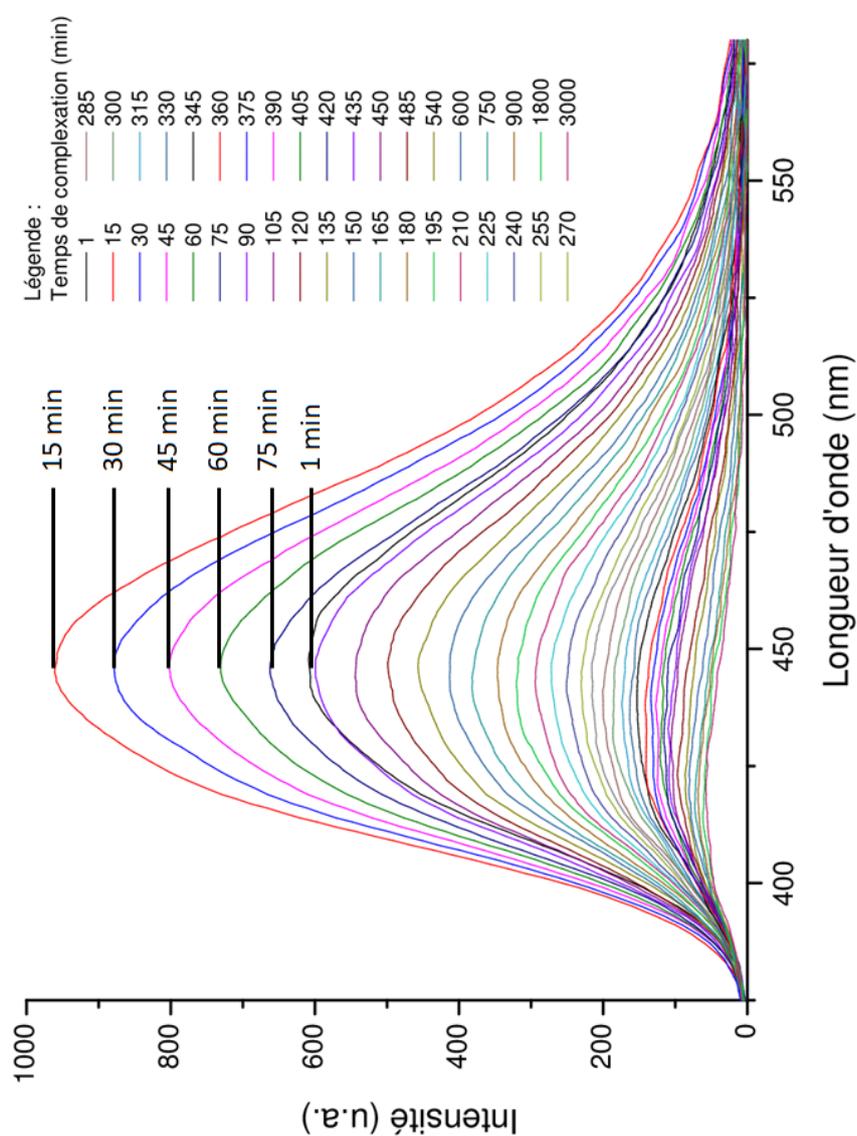


FIGURE 3.6 – Exemples de spectres de fluorescence après une excitation à 358 nm des complexes OPA/histamine pour des temps de complexation de 1 min à 50 h à 20 °C.

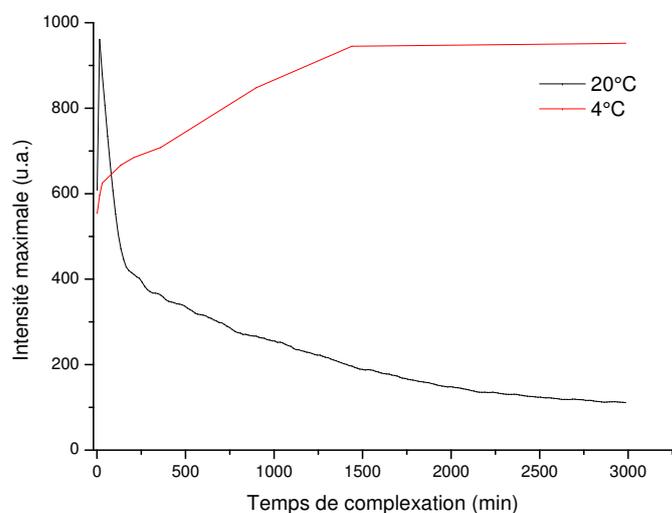


FIGURE 3.7 – Évolution au cours du temps de l'intensité d'émission maximale après une excitation à 358 nm des complexes OPA/histamine.

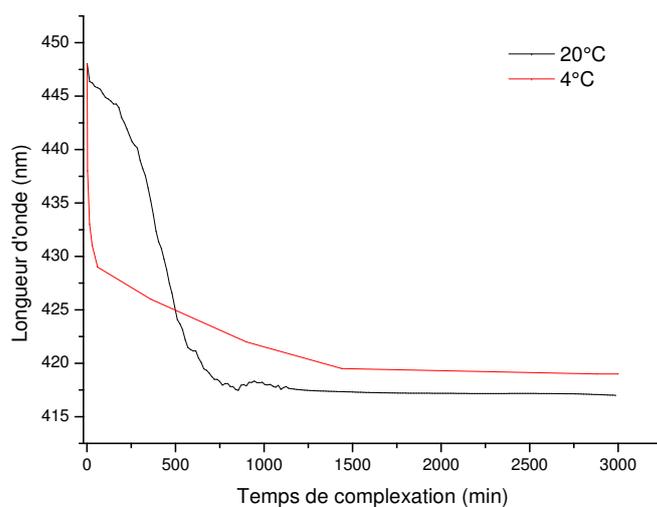


FIGURE 3.8 – Évolution au cours du temps de la longueur d'onde ayant l'intensité d'émission maximale après une excitation à 358 nm des complexes OPA/histamine.

Cette étude corrobore nos précédentes observations (Section 3.1.1.1) et confirme les problèmes de stabilité rencontrés lors de l'analyse des complexes OPA/histamine. Cette instabilité avait déjà été observée dans la littérature et des

solutions comme l'ajout d'un acide<sup>[41,185]</sup> ou d'un nucléophile<sup>[45,189]</sup> ont été proposées.

Des essais supplémentaires basés sur les données issues du brevet de TINE<sup>[185]</sup> ont été réalisés avec un chauffage de 3 min à 50 °C mais n'ont pas permis d'obtenir des résultats répétables.

À 20 °C, la longueur d'onde d'émission ne se stabilise qu'après 9 h et l'intensité maximale de l'émission est atteinte après 15 min pour décroître ensuite (même après la stabilisation de la longueur d'onde d'émission).

À 4 °C, la longueur d'onde d'émission ne se stabilise qu'après 24 h. Après cette durée de complexation et contrairement aux résultats obtenus à 20 °C, l'intensité d'émission est à son maximum.

Selon les fournisseurs, les standards d'OPA et d'histamine sont à conserver entre 1 et 6 °C afin d'éviter leur dégradation et rend nécessaire le stockage des solutions à basse température durant la complexation.

Pour la suite de l'étude, un temps de complexation de 24 h à basse température sera respecté. Dans ces conditions et à pH 12,5, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont stabilisées respectivement à 358 et 419 nm avec des intensités de fluorescence optimales. Les paramètres d'études choisis ont donc été fixés à un pH de 12,5, un temps de contact de 24 h, 4 °C et dans l'obscurité. Dans ces conditions, les longueurs d'onde obtenues ont été les suivantes :  $\lambda_{\text{absorption}} = 271 \text{ nm}$  et  $377 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{excitation}} = 358 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{émission}} = 419 \text{ nm}$ .

### 3.1.1.3 Détermination des propriétés des complexes OPA/histamine dans les conditions optimales de fluorescence moléculaire

Suite à la détermination des conditions optimales de formation des complexes fluorescents, la gamme de concentration permettant une réponse linéaire et les limites de détection et de quantification de l'histamine ont été étudiées.

#### 3.1.1.3.1 Gamme de concentration avec réponse linéaire

La première propriété évaluée concerne la gamme de concentration permettant d'avoir une réponse linéaire. Les paramètres d'analyse ont été les suivants (Tableau 3.5) :

TABLEAU 3.5 – Conditions expérimentales de l'étude des complexes OPA/histamine en fonction de la concentration de complexes.

Temps	pH	$\lambda_{\text{excitation}}$	$\lambda_{\text{émission}}$
		( $\lambda_{\text{émission}} = 419 \text{ nm}$ )	( $\lambda_{\text{excitation}} = 358 \text{ nm}$ )
24 h	12,5	310 à 400 nm	370 à 600 nm
	[Histamine] (mol/L)	[OPA] (mol/L)	Rapport de concentration
	$5.10^{-6} - 5.10^{-5}$	$5.10^{-6} - 5.10^{-5}$	1

Pour cette partie, trois réplicats de dix concentrations différentes ont été réalisés ( $5.10^{-6} - 5.10^{-5} \text{ mol/L}$ ). Les spectres d'excitation et d'émission d'un des réplicats sont représentés dans la Figure 3.9.

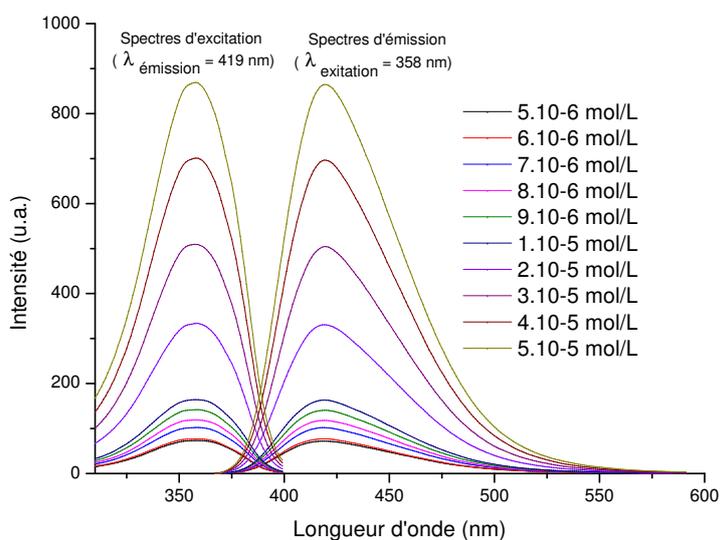


FIGURE 3.9 – Évolution de l'intensité des spectres d'excitation et d'émission des complexes OPA/histamine en fonction de la concentration en complexe.

À partir de ces spectres, les maximums d'intensité en fonction des concentrations des trois réplicats ont pu être déterminés (Figure 3.10).

En fluorescence moléculaire et dans nos conditions d'analyse, l'intensité de l'émission des complexes OPA/histamine est proportionnelle à la concentration dans la gamme de  $5.10^{-6}$  à  $5.10^{-5} \text{ mol/L}$ .

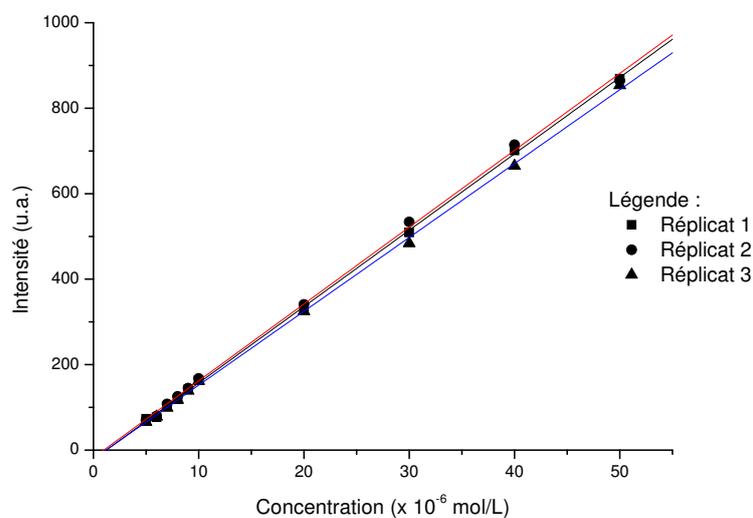


FIGURE 3.10 – Graphique représentant le maximum d'intensité du pic d'émission ( $\lambda_{\text{émission}} = 419 \text{ nm}$ ) pour une excitation  $\lambda_{\text{excitation}} = 358 \text{ nm}$  en fonction de la concentration.

### 3.1.1.3.2 Limite de détection et de quantification

D'après l'étude de la gamme de linéarité, une concentration de complexe à  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$  permet une quantification alors qu'à une concentration de  $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ , aucune émission n'est observée, les limite de détection (limite de détection (LDD)) et de quantification (limite de quantification (LDQ)) se situent entre  $4 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ . Les paramètres d'étude ont été les suivants (Tableau 3.6) :

TABLEAU 3.6 – Conditions expérimentales de l'étude des complexes OPA/histamine pour déterminer les LDD et LDQ.

Temps	pH	$\lambda_{\text{émission}}$ ( $\lambda_{\text{excitation}} = 358 \text{ nm}$ )
24 h	12,5	340 à 560 nm

[Histamine] (mol/L)	[OPA] (mol/L)	Rapport de concentration
$4 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-6}$	1

La LDD et la LDQ ont été évaluées à partir des spectres d'émission en réalisant une gamme de cinq concentrations (Figure 3.11). Le réglage utilisé pour le tube photomultiplicateur (PMT) est précisé pour chaque échantillon puisqu'il a été adapté afin d'optimiser la lecture de chaque échantillon. Ce dispositif permet la détection de photons avec un gain important dépendant du réglage.

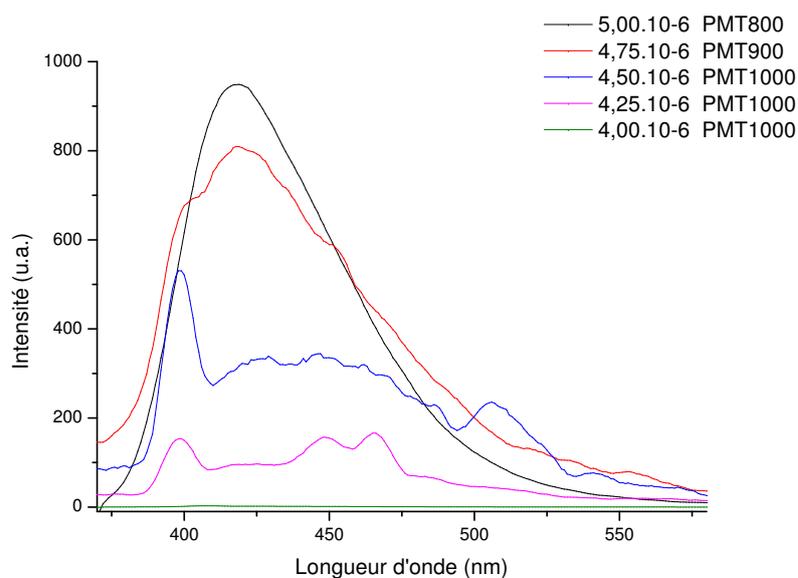


FIGURE 3.11 – Allure des spectres d'émission de fluorescence des complexes OPA/histamine après une excitation à 358 nm pour des concentrations entre  $4.10^{-6}$  –  $5.10^{-6}$  mol/L

Le spectre effectué à une concentration de  $5,00.10^{-6}$  mol/L est utilisé comme témoin. Son intensité maximale est bien observée à 419 nm et fait partie de la gamme de linéarité (Section 3.1.1.3.1).

À partir d'une concentration de  $4,75.10^{-6}$  mol/L, le spectre présente des irrégularités mais comporte toujours une longueur d'onde maximale à 419 nm. À cette concentration, il n'est plus possible de quantifier les complexes. En dessous de  $4,75.10^{-6}$  mol/L, la longueur d'onde maximale varie et les effets de solvants sont trop important.

D'après cette étude, il est donc possible de réaliser la quantification de complexes OPA/histamine par fluorescence moléculaire à partir de  $5,00.10^{-6}$  mol/L et

de la détection à partir de  $4,75 \cdot 10^{-6}$  mol/L. En dessous de ces valeurs, les effets de « solvants » sont trop élevés pour permettre un résultat fiable.

Ces limites sont similaires à celles obtenues dans la norme AOAC réactualisée d'analyse de l'histamine par fluorescence moléculaire (Tableau 3.7).<sup>[25,41]</sup>

TABLEAU 3.7 – Tableau comparatif des LDD et LDQ obtenues lors de cette étude par rapport à la littérature.

Auteur	LDD	LDQ
AOAC <sup>[25,41]</sup>	0,2 mg/kg	0,6 mg/kg
Ce travail	0,53 mg/kg	0,56 mg/kg

### 3.1.2 Étude par spectroscopie UV et fluorescence moléculaire des complexes 4-MO-OPA/histamine

À notre connaissance, aucune étude de fluorescence moléculaire sur l'histamine n'a été effectuée sur les dérivés structuraux d'OPA faute d'accessibilité. L'étude des complexes 4-MO-OPA/histamine a donc été réalisée selon la méthodologie préalablement éprouvée pour l'OPA/histamine.

#### 3.1.2.1 Première approche : détermination des paramètres expérimentaux

Selon la même approche que celle menée sur l'OPA (Section 3.1.1), le pH a été fixé à 12,5 et le rapport 4-MO-OPA/histamine à cinq.

Les longueurs d'onde obtenues ont été les suivantes :  $\lambda_{\text{excitation}} = 351$  nm et  $\lambda_{\text{émission}} = 462$  nm (Figure 3.12).

Contrairement à l'OPA, les intensités et les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des complexes 4-MO-OPA/histamine restent constants sur une durée de 24 h à l'issue de la conservation des solutions à 4 °C. L'intérêt majeur du 4-MO-OPA réside donc dans la possibilité de réaliser de manière immédiate l'analyse de l'histamine par rapport à l'OPA qui lui nécessite un temps d'attente de 24 h.

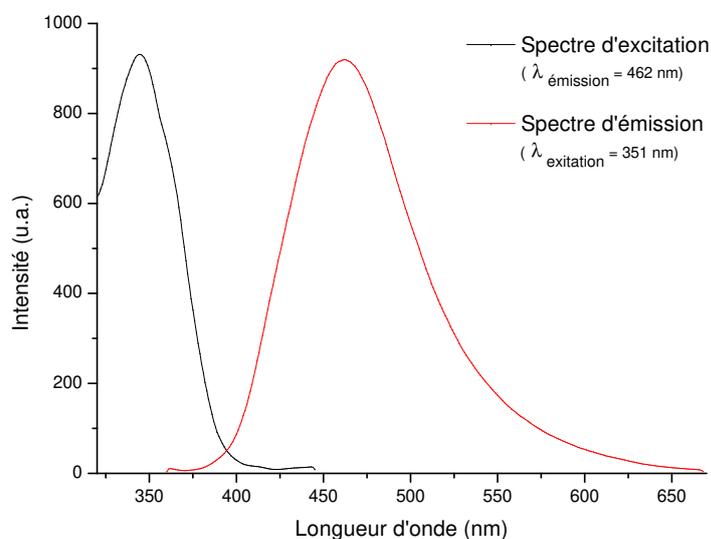


FIGURE 3.12 – Spectres d'excitation ( $\lambda_{\text{émission}} = 462 \text{ nm}$ ) et d'émission ( $\lambda_{\text{excitation}} = 351 \text{ nm}$ ) des complexes 4-MO-OPA/histamine à pH 12,5.

### 3.1.2.2 Détermination des paramètres optimaux de complexation (pH, rapport de concentration 4-MO-OPA/histamine, temps de complexation)

Un processus itératif, similaire à celui employé pour l'OPA, a été mis en place afin de déterminer chaque paramètre expérimental (pH, stœchiométrie, cinétique).

Néanmoins, afin de comparer les résultats obtenus à ceux de l'OPA, deux séries d'analyses ont été réalisées ; une première immédiatement à la mise en contact des réactifs et une seconde à l'issue de 24 h à 4 °C.

#### 3.1.2.2.1 Évaluation de l'influence du pH

D'après les résultats obtenus (Section 3.1.2.1), les paramètres suivants ont été fixés (Tableau 3.8).

TABLEAU 3.8 – Conditions expérimentales de l'étude des complexes 4-MO-OPA/histamine en fonction du pH.

Temps	pH	$\lambda_{\text{absorption}}$	$\lambda_{\text{excitation}}$	$\lambda_{\text{émission}}$
30 min et 24 h	Variable étudiée	200 à 800 nm	180 à 410 nm	375 à 625 nm
	[Histamine] (mol/L)	[MOPA] (mol/L)	Rapport de concentration	
	UV : $1.10^{-4}$	UV : $5.10^{-4}$	5	
	Fluorescence : $8.10^{-6}$	Fluorescence : $4.10^{-5}$	5	

Une étude par UV a été réalisée lors de la mise en contact du 4-MO-OPA/histamine, puis 24 h plus tard. Les deux analyses ont donné des résultats semblables et ont permis de différencier deux zones de pH (Figures 3.13 et 3.14) :

-  $\text{pH} \leq 11,0$  : Pas ou peu d'absorption,

-  $11 < \text{pH}$  :  $\lambda_{\text{absorption}} = 345 \text{ nm}$ .

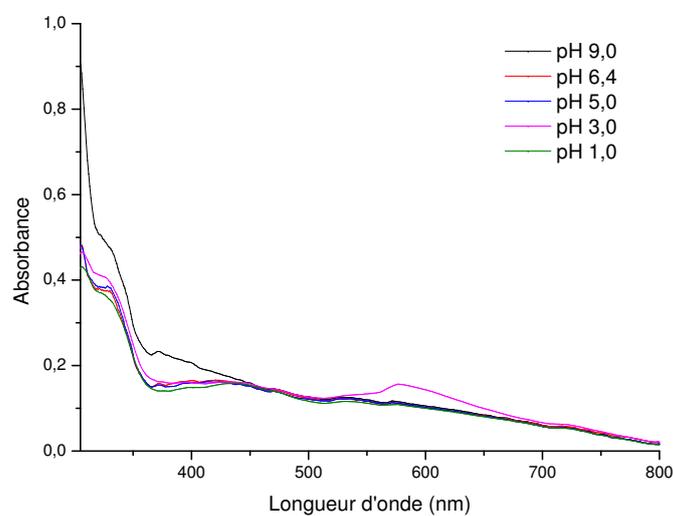


FIGURE 3.13 – Spectres d'absorption UV des complexes 4-MO-OPA/histamine enregistrés à des pH de 1,0 à 9,0.

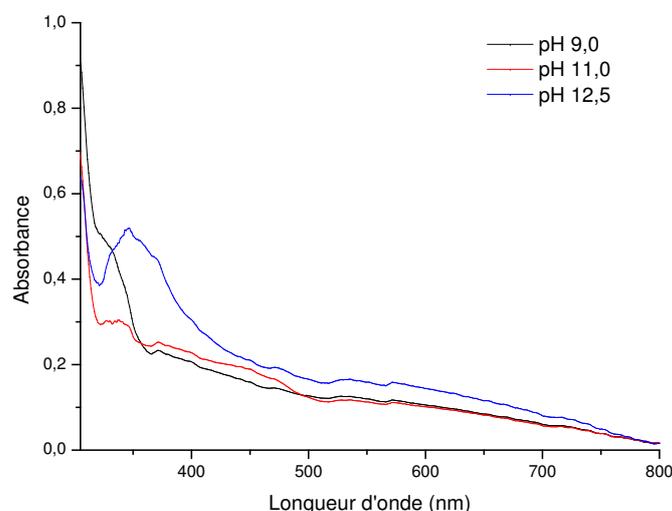


FIGURE 3.14 – Spectres d'absorption UV des complexes 4-MO-OPA/histamine enregistés à des pH de 9,0 à 12,5.

Deux répliquats ont ensuite été réalisés pour l'analyse par fluorescence moléculaire avec chacun deux lectures (immédiatement et à l'issue de 24 h de mise en contact) pour chaque échantillon. Comme pour l'analyse UV, les résultats obtenus en fluorescence moléculaire après 24 h sont similaires à ceux obtenus des la mise en contact. Lors de l'analyse, deux couples excitation/émission ont été déterminés (Figure 3.15) :

- $\lambda_{\text{excitation}} = 235 \text{ nm} / \lambda_{\text{émission}} = 330 \text{ nm}$ ,
- $\lambda_{\text{excitation}} = 351 \text{ nm} / \lambda_{\text{émission}} = 462 \text{ nm}$ .

À partir de ces spectres, les maximaux d'intensité ont été relevés (Figure 3.16).

Pour des pH acides ( $< 5$ ), les intensités maximales sont observées pour le couple excitation/émission 235 nm/330 nm mais restent tout de même très faibles et sont difficile à interpréter.

À l'opposé, pour des pH basiques ( $> 10$ ), les intensités maximales correspondent au couple excitation/émission 351 nm/462 nm. L'augmentation du pH permet une intensité de l'émission plus importante pour atteindre, à pH 12,5 (maximum d'intensité en milieu basique), une intensité quatre fois plus élevée que celle obtenue à pH 1,0 (maximum d'intensité en milieu acide). Le pH de 12,5 est donc, comme pour l'OPA, celui qui a été conservé pour la suite de l'étude.

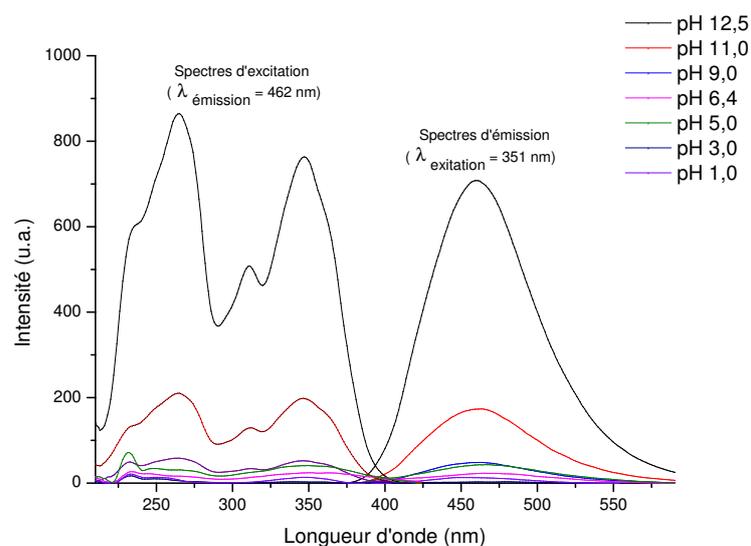


FIGURE 3.15 – Spectres d'excitation ( $\lambda_{\text{émission}} = 462 \text{ nm}$ ) et émission de fluorescence ( $\lambda_{\text{excitation}} = 351 \text{ nm}$ ) des complexes 4-MO-OPA/histamine en fonction du pH.

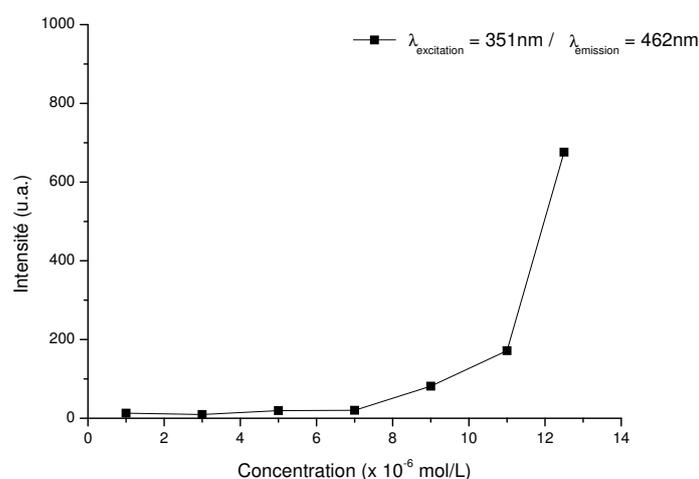


FIGURE 3.16 – Évolution de l'intensité maximale de l'émission de fluorescence à 462 nm après une excitation à 351 nm en fonction du pH.

### 3.1.2.2.2 Rapport de concentration ( $R_{4\text{-MO-OPA/histamine}}$ )

Le rapport de concentration entre le 4-MO-OPA et l'histamine a été évalué et les paramètres suivants ont été fixés (Tableau 3.9) :

TABLEAU 3.9 – Conditions expérimentales de l'étude des complexes 4-MO-OPA/histamine en fonction du rapport  $R_{4\text{-MO-OPA/histamine}}$ .

Temps	pH	$\lambda_{\text{excitation}}$ ( $\lambda_{\text{émission}} = 462 \text{ nm}$ )	$\lambda_{\text{émission}}$ ( $\lambda_{\text{excitation}} = 351 \text{ nm}$ )
30 min et 24 h	12,5	290 à 425 nm	350 à 675 nm
[Histamine] (mol/L)	[MOPA] (mol/L)	Rapport de concentration	
$8.10^{-6}$	$2.10^{-6} - 3,2.10^{-5}$	Variable étudiée	

Les complexes 4-MO-OPA/histamine existent sous trois stœchiométries différentes selon les trois droites de tendance (Figure 3.17) :

- Rapport  $\leq 1$ ,
- Rapport compris entre 1 et 3,
- Rapport  $\geq 3$

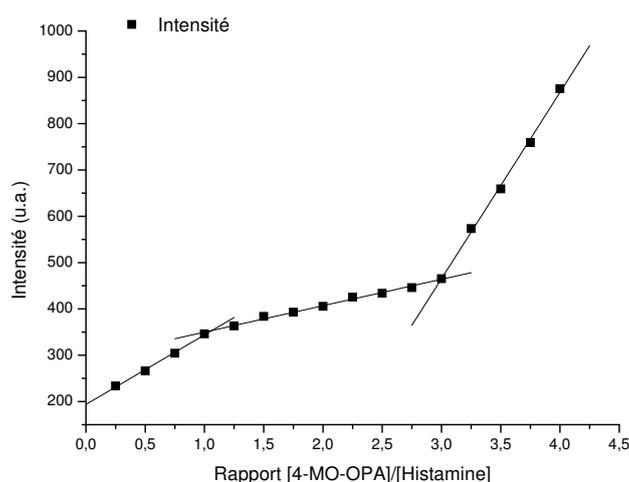


FIGURE 3.17 – Évolution de l'intensité maximale de l'émission à 462 nm après une excitation à 351 nm en fonction du rapport 4-MO-OPA/histamine.

Ces zones indiquent que les complexes 4-MO-OPA/histamine majoritaires dans chacune des zones se présentent tout d'abord sous la stœchiométrie 1:1 puis 2:1 et enfin 3:1. Pour limiter le nombre de complexes présents, la suite de l'étude sur le 4-MO-OPA a été réalisée en respectant le rapport 1/1 afin de favoriser au maximum les complexes 1:1.

### 3.1.2.2.3 Étude de la cinétique

Suite à l'étude de la cinétique des complexes OPA/histamine (Section 3.1.1.2.3), des études de pH et du rapport de concentration (Sections 3.1.2.2.1 et 3.1.2.2.2) des complexes 4-MO-OPA/histamine, il apparaît clairement que la formation de complexes fluorescents avec le 4-MO-OPA est plus rapide qu'avec l'OPA. Pour vérifier ces observations, une étude cinétique à 20 °C a été réalisée (Tableau 3.10).

TABLEAU 3.10 – Conditions expérimentales de l'étude cinétique des complexes 4-MO-OPA/histamine.

Temps	pH	$\lambda_{\text{émission}}$ ( $\lambda_{\text{excitation}} = 351 \text{ nm}$ )
1 min à 50 h	12,5	350 à 610 nm
[Histamine] (mol/L)	[MOPA] (mol/L)	Rapport de concentration
$8 \cdot 10^{-6}$	$8 \cdot 10^{-6}$	1

L'intensité de fluorescence maximale et la longueur d'onde associée ont été relevées dès la mise en contact du 4-MO-OPA et de l'histamine, puis à  $t=15 \text{ min}$ . Un spectre a ensuite été réalisé toutes les 15 min jusqu'à 50 h. Durant toute la durée de l'analyse, l'échantillon est thermostaté à 20 °C (Figure 3.18).

Cette étude montre un temps de complexation minimal et optimal de 15 min pour accéder au maximum d'intensité. De plus, la longueur d'onde de l'émission à 462 nm suite à une excitation à 351 nm est constante pendant 8 h à 20 °C (dans l'obscurité) (Figures 3.19 et 3.20).

En conclusion, le 4-MO-OPA permet d'obtenir des résultats répétables d'analyse (maximum d'intensité et longueur d'onde constante) dès 15 min à 20 °C quand l'OPA nécessite à 20 °C 9 h d'attente pour que sa longueur d'onde d'émission se stabilise avec une perte de 70 % d'intensité.

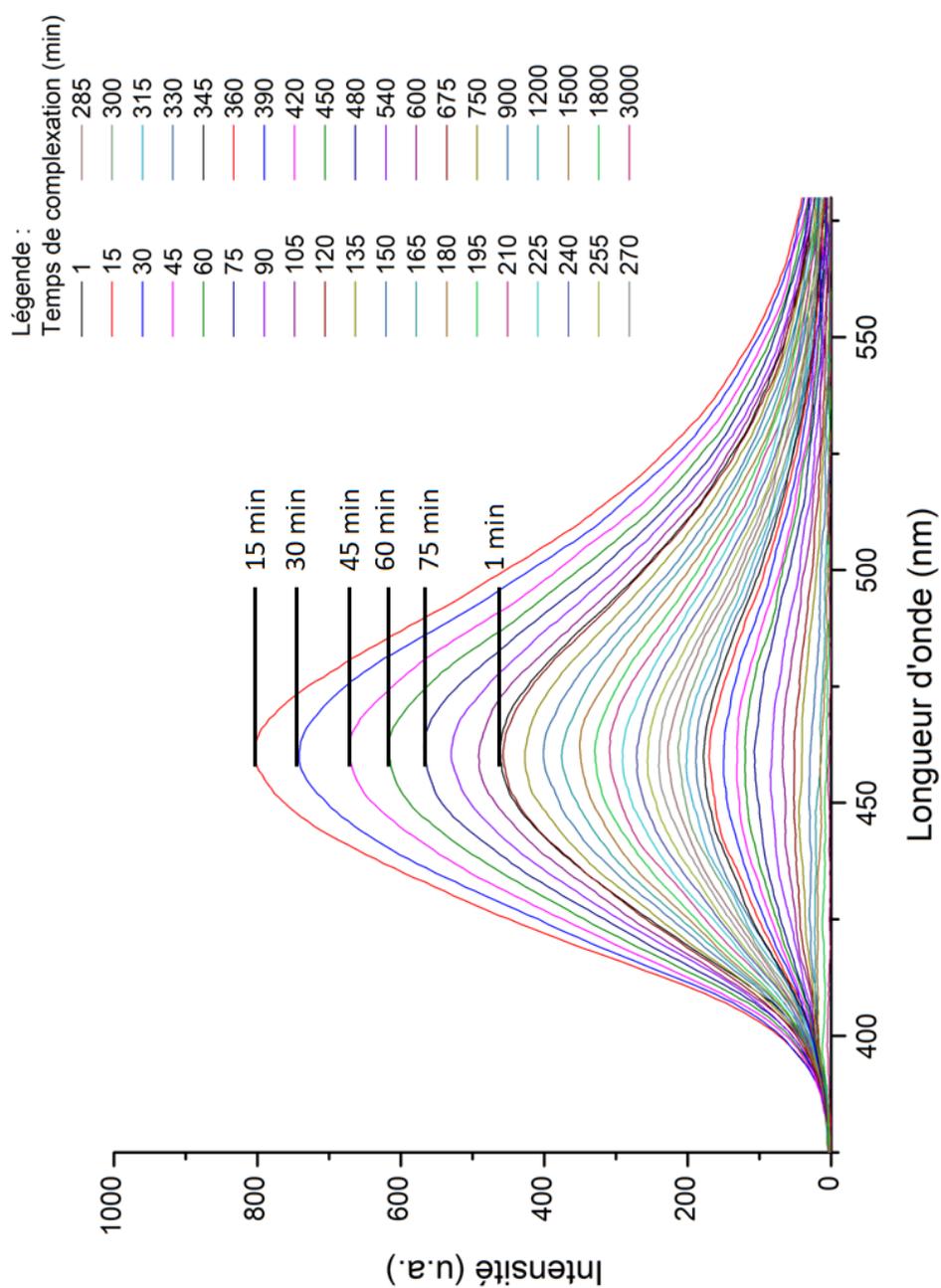


FIGURE 3.18 – Spectres de fluorescence après une excitation à 351 nm des complexes 4-MO-OPA/histamine pour des temps de complexation de 1 min à 50 h.

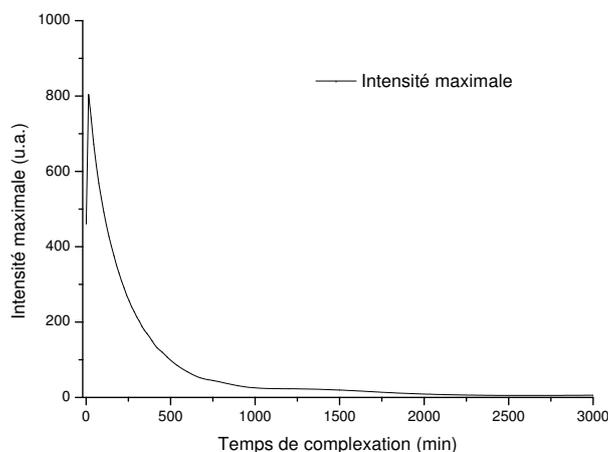


FIGURE 3.19 – Évolution de l'intensité d'émission maximale après une excitation à 351 nm des complexes 4-MO-OPA/histamine en fonction du temps.

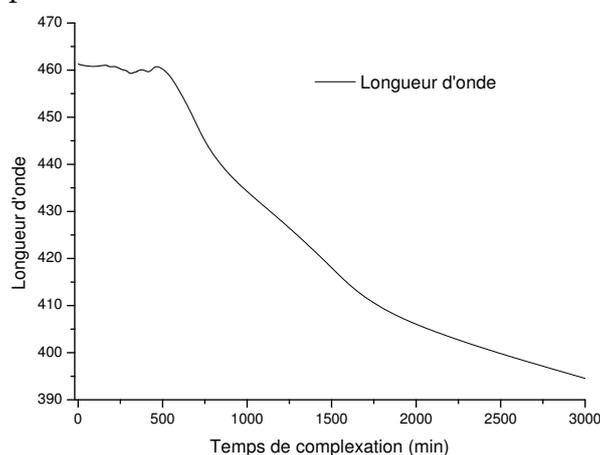


FIGURE 3.20 – Évolution de la longueur d'onde ayant l'intensité d'émission maximale après une excitation à 351 nm des complexes 4-MO-OPA/histamine en fonction du temps.

### 3.1.2.3 Détermination des propriétés des complexes 4-MO-OPA/histamine dans les conditions optimales de fluorescence moléculaire

Après avoir déterminé les conditions optimales de formation des complexes fluorescents, la gamme de concentration permettant une réponse linéaire ainsi que les limites de détection et de quantification de l'histamine ont été déterminées.

### 3.1.2.3.1 Gamme de concentration avec réponse linéaire

La première propriété à être évaluée correspond à la gamme de concentration permettant d'avoir une réponse linéaire. Les paramètres suivants ont été fixés (Tableau 3.11) :

TABLEAU 3.11 – Conditions expérimentales de l'étude des complexes 4-MO-OPA/histamine en fonction de la concentration de complexes.

Temps	pH	$\lambda_{\text{excitation}}$ ( $\lambda_{\text{émission}} = 462 \text{ nm}$ )	$\lambda_{\text{émission}}$ ( $\lambda_{\text{excitation}} = 351 \text{ nm}$ )
30 min et 24 h	12,5	280 à 410 nm	375 à 625 nm
	[Histamine] (mol/L)	[MOPA] (mol/L)	Rapport de concentration
	$1.10^{-7} - 1.10^{-4}$	$1.10^{-7} - 1.10^{-4}$	1

Lors de cette étude, une gamme de concentration de complexes de  $10^{-7}$  à  $10^{-4}$  mol/L a été réalisée avec trois réplicats de dix concentrations différentes (Figure 3.21).

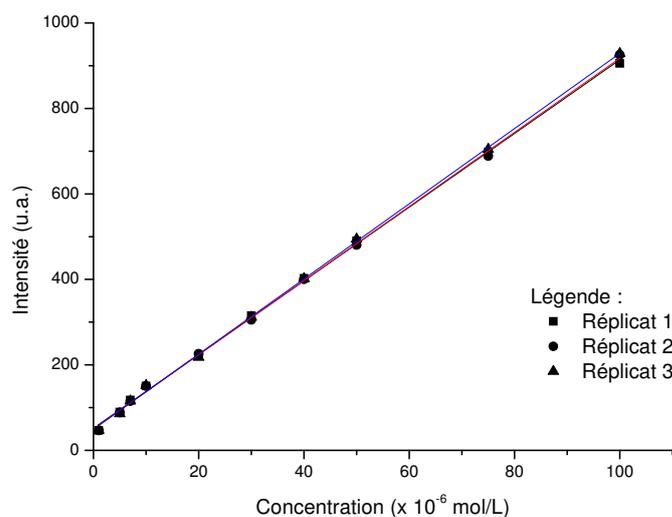


FIGURE 3.21 – Évolution de l'intensité de l'émission à  $\lambda_{\text{émission}} = 462 \text{ nm}$  après une excitation à  $351 \text{ nm}$  des complexes 4-MO-OPA/histamine à pH 12,5.

Deux zones ont été déterminées :

- $1.10^{-7} - 9.10^{-7}$  mol/L : Aucune réponse,
- $1.10^{-6} - 1.10^{-4}$  mol/L : Réponse correcte du système.

La seconde zone permet d'avoir une réponse linéaire en fonction de la concentration. Une seconde lecture après 24 h a montré une stabilité de l'intensité et de la longueur d'onde d'émission.

Cette gamme de concentration est plus étendue que celle obtenue avec l'OPA ( $5 \cdot 10^{-6}$  -  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/L) et est là aussi en faveur du 4-MO-OPA pour l'analyse d'échantillon de concentration inconnue en histamine.

### 3.1.2.3.2 Limite de détection

Les conditions optimales de complexation fixées sont les suivantes (Tableau 3.12) :

TABLEAU 3.12 – Conditions expérimentales de l'étude des complexes 4-MO-OPA/histamine pour déterminer les LDD et LDQ.

Temps	pH	$\lambda_{\text{émission}}$ ( $\lambda_{\text{excitation}} = 351 \text{ nm}$ )
30 min et 24 h	12,5	375 à 590 nm
[Histamine] (mol/L)	[MOPA] (mol/L)	Rapport de concentration
$9 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-6}$	$9 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-6}$	1

La zone de linéarité s'étend de  $1,00 \cdot 10^{-6}$  à  $1,00 \cdot 10^{-4}$  mol/L et aucune émission n'a été observée à  $9,00 \cdot 10^{-7}$  mol/L situant la limite de détection entre  $9,00 \cdot 10^{-7}$  et  $1,00 \cdot 10^{-6}$  mol/L. Comme pour l'OPA, la LDD et la LDQ ont été évaluées à partir des spectres d'émission en réalisant une gamme de cinq concentrations (Figure 3.22).

Le spectre à  $1,00 \cdot 10^{-6}$  mol/L est utilisé comme témoin. D'après l'étude de la gamme de linéarité, cette concentration permet une quantification avec une longueur d'onde d'émission de 462 nm. À partir de  $9,75 \cdot 10^{-7}$  mol/L, le spectre présente des irrégularités et la longueur d'onde associée à l'intensité maximale varie. D'après cette étude, il est donc possible de faire de la quantification de complexes 4-MO-OPA/histamine par fluorescence moléculaire à partir de  $1,00 \cdot 10^{-6}$  mol/L et de la détection à partir de  $9,75 \cdot 10^{-7}$  mol/L. En dessous de ces valeurs, les effets de « solvants » sont trop élevés pour fournir un résultat

fiable.

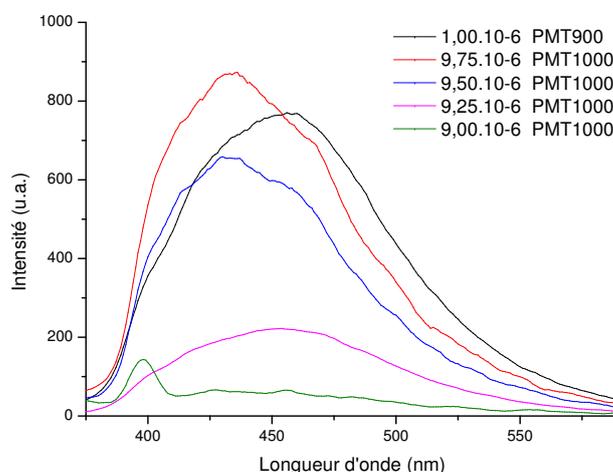


FIGURE 3.22 – Spectres de fluorescence après une excitation à 351 nm des complexes 4-MO-OPA/histamine pour des concentrations comprise entre  $9.10^{-7}$  et  $1.10^{-6}$  mol/L

D'après cette étude, la quantification de complexes 4-MO-OPA/histamine par fluorescence moléculaire est réalisable à partir de  $1,00.10^{-6}$  mol/L et la limite de détection a été estimée à de  $9,75.10^{-7}$  mol/L. En dessous de ces valeurs, la longueur d'onde d'émission varie. La comparaison de ces limites de détection et de quantification avec celles de l'OPA abouti à des valeurs cinq fois plus faibles en faveur du 4-MO-OPA (Tableau 3.13).

TABLEAU 3.13 – Tableau comparatif des LDD et LDQ obtenues lors de cette étude sur le 4-MO-OPA par rapport à celle en présence d'OPA.

Agent de dérivation	LDD	LDQ
OPA	0,53 mg/kg	0,56 mg/kg
4-MO-OPA	0,10 mg/kg	0,11 mg/kg

### 3.1.3 Comparaison des résultats obtenus sur l'OPA et le 4-MO-OPA en présence d'histamine

Les résultats obtenus en UV et en fluorescence moléculaire sur les complexes OPA/histamine et 4-MO-OPA/histamine ont été comparés (Tableau 3.14).

À la lecture du Tableau 3.14, le 4-MO-OPA présente trois avantages majeurs vis à vis de l'OPA lors de l'analyse en fluorescence moléculaire de l'histamine.

- La zone de concentration dans laquelle il est possible de travailler est plus étendue ( $1.10^{-6} - 1.10^{-4}$  mol/L au lieu de  $5.10^{-6} - 5.10^{-5}$  mol/L).
- Les limites de quantification et de qualification sont environ cinq fois plus basses.
- Enfin, le temps nécessaire pour atteindre le maximum d'intensité en fluorescence moléculaire est très rapide (15 min) aux deux températures d'étude (4 et 20 °C) par comparaison aux 24 h à 4 °C nécessaires à l'OPA.

TABLEAU 3.14 – Tableau comparatif des conditions optimum pour une réponse en fluorescence moléculaire des complexes OPA/histamine et 4-MO-OPA/histamine.

Critère	OPA/histamine	4-MO-OPA/histamine
$\lambda_{\text{absorption}}$	271 et 377 nm	303 et 359 nm
$\lambda_{\text{excitation}}$	358 nm	351 nm
$\lambda_{\text{émission}}$	419 nm	462 nm
Gamme de concentration	$5.10^{-6} - 5.10^{-5}$ mol/L	$1.10^{-6} - 1.10^{-4}$ mol/L
pH	12,5	12,5
Stoechiométrie	1:1, 2:1 et 3:1	1:1, 2:1 et 3:1
LDQ	$5.10^{-6}$ mol/L	$1.10^{-6}$ mol/L
LDD	$4,75.10^{-6}$ mol/L	$9,75.10^{-7}$ mol/L
Complexes fluorescents à 4 °C	Stable après 24 h	Stable après 15 min
Intensité maximale à 4 °C	À 24 h	À 15 min
Intensité maximale à 20 °C	À 15 min	À 15 min

### 3.2 Analyse spectroscopique d'un mélange d'AB

En fluorescence moléculaire, la littérature décrit les conditions d'analyse (pH,  $\lambda_{\text{excitation}}$  et  $\lambda_{\text{émission}}$ ) de l'agmatine, la cadavérine et la putrescine en présence d'OPA (Tableau 3.15).

D'après ce tableau, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des complexes en présence d'OPA sont dépendantes de l'AB considérée et du pH appliqué. La seconde partie de ce chapitre consistera donc à étudier la sélectivité de l'OPA et du 4-MO-OPA vis à vis de l'histamine dans un mélange d'AB.

TABLEAU 3.15 – Conditions d'analyse en fluorescence moléculaire de l'agmatine, la cadavérine et la putrescine en présence d'OPA.

Amine	pH	$\lambda_{\text{excitation}}$	$\lambda_{\text{émission}}$
Histamine (ce travail)	12,5	358	419
Agmatine <sup>[186]</sup>	13	340	473
Cadavérine <sup>[187]</sup>	1,0	234 <sup>1</sup> et 381	313
	3,5	234 <sup>1</sup> et 381	313
	9,0	234 <sup>1</sup> et 381	313
	13,0	234 <sup>1</sup> et 381	313
Putrescine <sup>[188]</sup>	pH < 7	239; 271; 334 et 376	430
	7 < pH < 11	309 et 355	408
	11 < pH	331 <sup>1</sup>	415

<sup>1</sup> avec intensité d'émission maximale

Pour cela, chaque amine a tout d'abord été analysée de manière individuelle en présence d'OPA d'une part, et de 4-MO-OPA d'autre part, dans les conditions optimisées pour l'analyse de l'histamine à savoir :

- **OPA** : pH 12,5, temps de complexation de 24 h à 4 °C,  
 $\lambda_{\text{excitation}} = 358 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{émission}} = 419 \text{ nm}$ ,

- **4-MO-OPA** : pH 12,5, temps de complexation de 15 min à 20 °C,  
 $\lambda_{\text{excitation}} = 351 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{émission}} = 462 \text{ nm}$ .

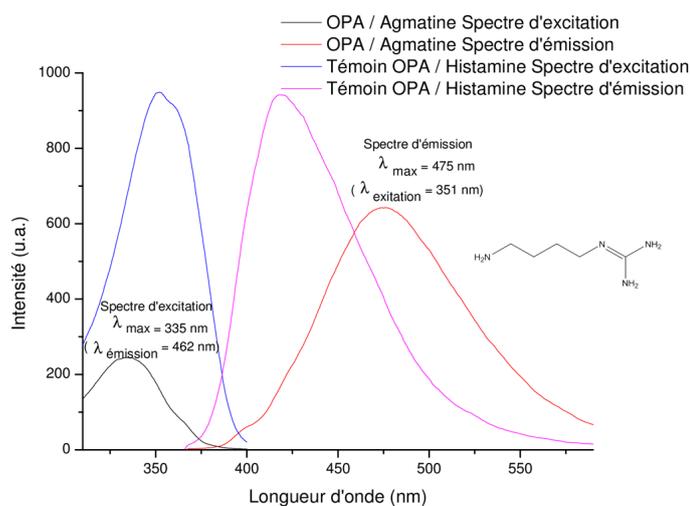
L'histamine a ensuite été mise en solution avec un mélange d'agmatine, de cadavérine, de putrescine et de spermidine dans l'objectif de la détecter et de la quantifier sélectivement.

La cadavérine et la putrescine ont été sélectionnées car répertoriées comme potentialisateurs des effets de l'histamine.<sup>[8,9]</sup> Pour l'agmatine, des interférences avec l'histamine ont été notées lors d'analyses en présence d'OPA.<sup>[186]</sup> Enfin, la spermidine, présentant une amine aliphatique secondaire, a également été testée pour vérifier l'impact de ce type d'amine sur les résultats obtenus.

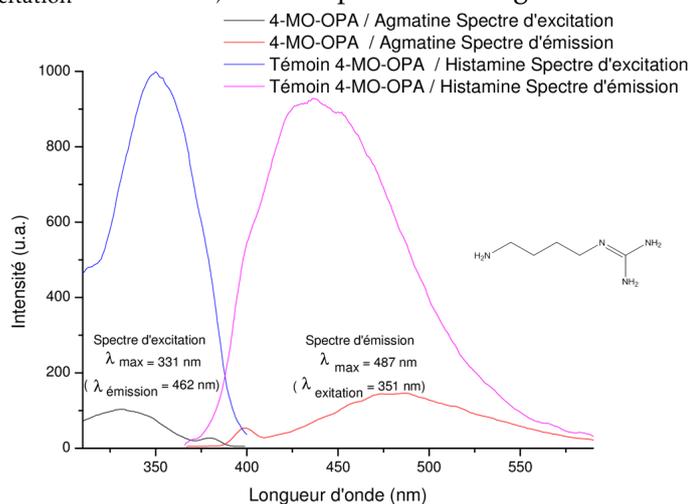
### 3.2.1 Analyse des AB individuellement

#### 3.2.1.1 Agmatine

Des solutions d'OPA/agmatine et de 4-MO-OPA/agmatine ont été préparées et analysées (Figure 3.23).



(a) Spectres d'excitation ( $\lambda_{\text{émission}} = 419 \text{ nm}$ ) et émission ( $\lambda_{\text{excitation}} = 358 \text{ nm}$ ) des complexes OPA/agmatine.



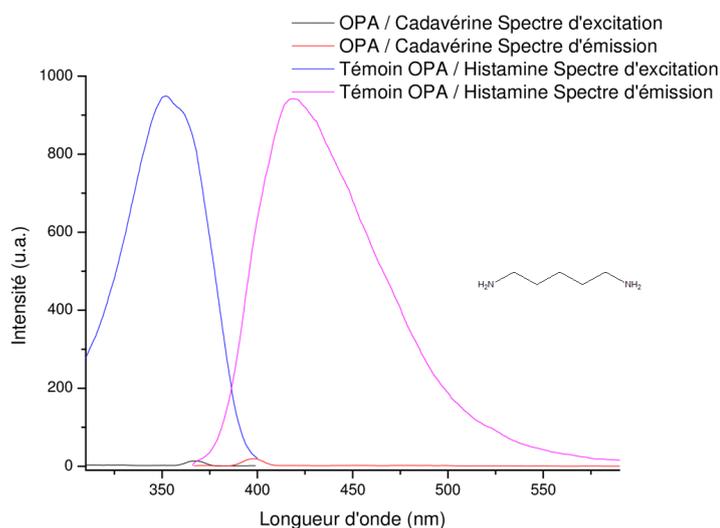
(b) Spectres d'excitation à ( $\lambda_{\text{émission}} = 462 \text{ nm}$ ) et émission ( $\lambda_{\text{excitation}} = 351 \text{ nm}$ ) des complexes 4-MO-OPA/agmatine.

FIGURE 3.23 – Spectres d'excitation et d'émission des complexes OPA/agmatine et 4-MO-OPA/agmatine dans les conditions d'analyse de l'histamine.

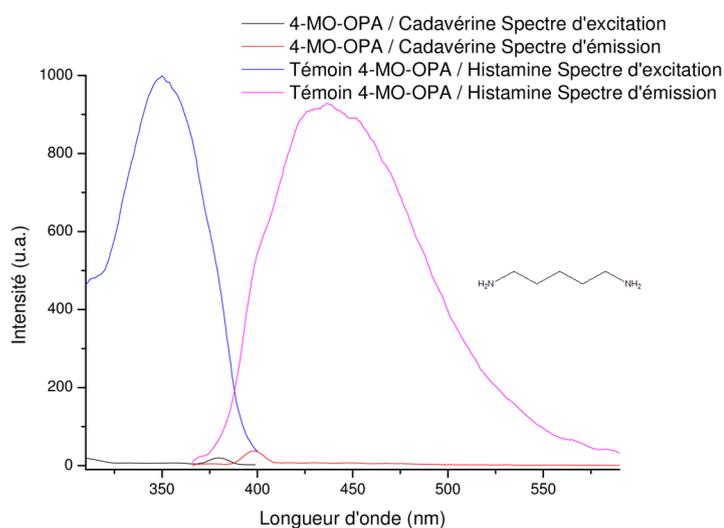
En appliquant la longueur d'onde d'excitation caractéristique de l'histamine, les complexes OPA/agmatine et 4-MO-OPA/agmatine sont excités et émettent à des longueurs d'onde proches de celles de l'histamine et sont donc susceptibles de créer des interférences. Ce résultat, déjà observé lors de l'analyse de l'agmatine en présence d'OPA dans un mélange d'amines dont l'histamine, reste problématique.<sup>[186]</sup>

### 3.2.1.2 Cadavérine, Putrescine et Spermidine

La cadavérine, la putrescine et la spermidine ont également été étudiées individuellement en présence d'OPA et de 4-MO-OPA (Figures 3.24, 3.25 et 3.26).

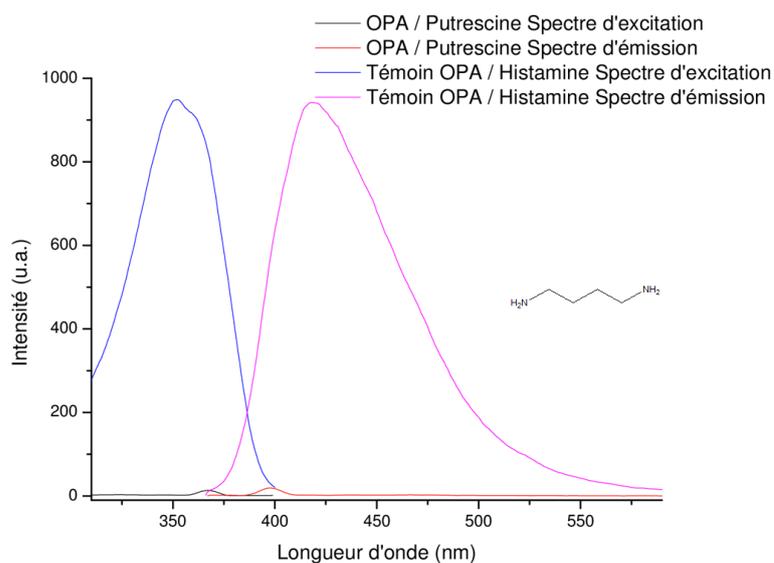


(a) Spectres d'excitation ( $\lambda_{\text{émission}} = 419 \text{ nm}$ ) et émission ( $\lambda_{\text{excitation}} = 358 \text{ nm}$ ) des complexes OPA/cadavérine.

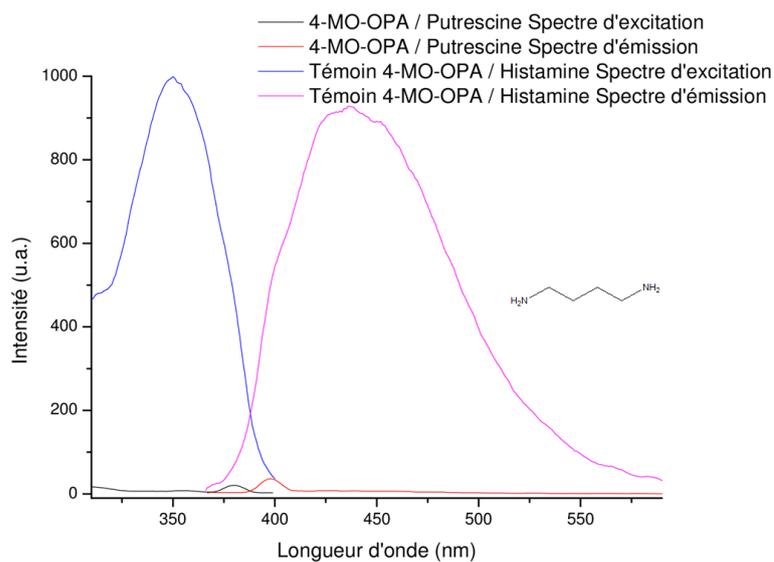


(b) Spectres d'excitation à ( $\lambda_{\text{émission}} = 462 \text{ nm}$ ) et émission ( $\lambda_{\text{excitation}} = 351 \text{ nm}$ ) des complexes 4-MO-OPA/cadavérine.

FIGURE 3.24 – Spectres d'excitation et d'émission des complexes de cadavérine en présence d'OPA et de 4-MO-OPA dans les conditions d'analyse de l'histamine.

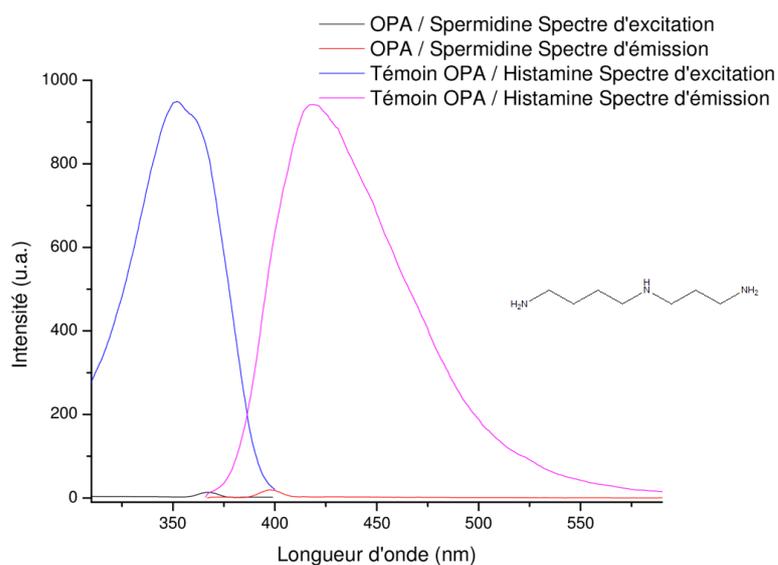


(a) Spectres d'excitation ( $\lambda_{\text{émission}} = 419\text{nm}$ ) et émission ( $\lambda_{\text{excitation}} = 358\text{nm}$ ) des complexes OPA/putrescine.

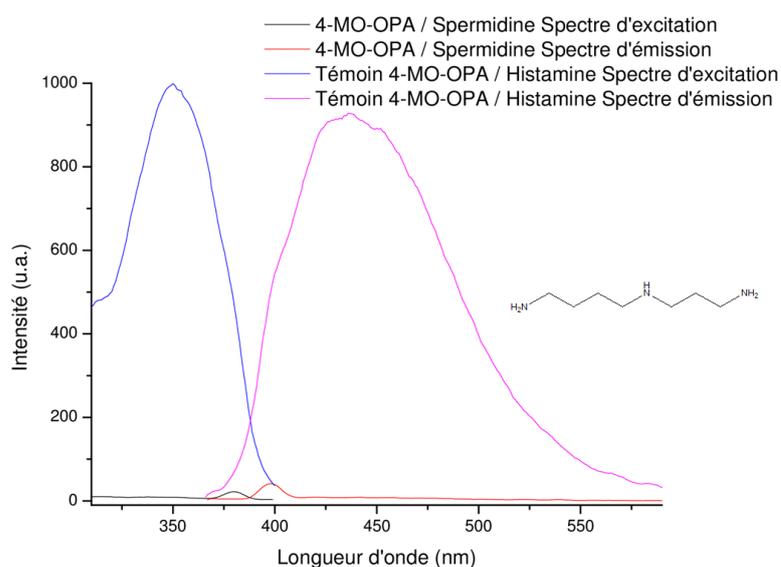


(b) Spectres d'excitation à ( $\lambda_{\text{émission}} = 462\text{nm}$ ) et émission ( $\lambda_{\text{excitation}} = 351\text{nm}$ ) des complexes 4-MO-OPA/putrescine.

FIGURE 3.25 – Spectres d'excitation et d'émission des complexes de putrescine en présence d'OPA et de 4-MO-OPA dans les conditions d'analyse de l'histamine.



(a) Spectres d'excitation ( $\lambda_{\text{émission}} = 419\text{nm}$ ) et émission ( $\lambda_{\text{excitation}} = 358\text{nm}$ ) des complexes OPA/spermidine.



(b) Spectres d'excitation à ( $\lambda_{\text{émission}} = 462\text{nm}$ ) et émission ( $\lambda_{\text{excitation}} = 351\text{nm}$ ) des complexes 4-MO-OPA/spermidine.

FIGURE 3.26 – Spectres d'excitation et d'émission des complexes de spermidine en présence d'OPA et de 4-MO-OPA dans les conditions d'analyse de l'histamine.

Contrairement aux résultats obtenus pour l'agmatine, en présence d'OPA ou de 4-MO-OPA, la cadavérine, la putrescine et la spermidine n'émettent pas dans les conditions d'analyses des complexes d'histamine (temps de complexation, pH et longueur d'onde d'excitation).

### 3.2.2 Mélange d'AB

L'analyse par fluorescence moléculaire de l'histamine en présence d'OPA d'une part et de 4-MO-OPA d'autre part a été réalisée dans un mélange d'amines (agmatine, cadavérine, putrescine et spermidine).

#### 3.2.2.1 Analyse de l'histamine en présence d'OPA dans un mélange d'AB

En accord avec les études de la cadavérine, de la putrescine et de la spermidine en présence d'OPA, l'intensité et la longueur d'onde d'émission des complexes OPA/histamine restent inchangées par rapport à l'étude du standard d'histamine seul (Figure 3.27).

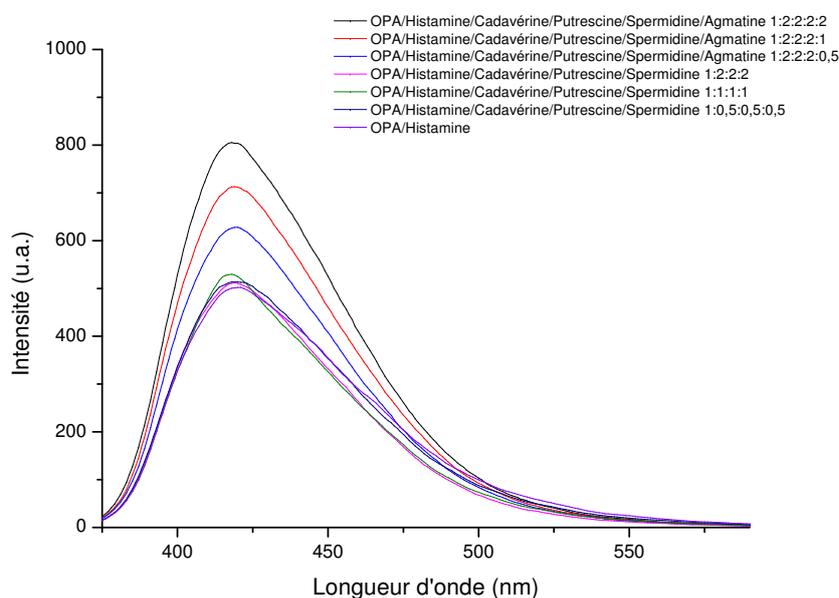


FIGURE 3.27 – Spectres d'émission après une excitation à 358 nm des complexes OPA/histamine en fonction de la concentration en interférent.

À l'opposé, lors de l'ajout d'agmatine, une augmentation de l'intensité d'émission est observée surestimant artificiellement la concentration d'histamine. Lorsque le rapport agmatine/histamine est égal à un, l'intensité de fluorescence moléculaire augmente d'environ de 39 %.

### 3.2.2.2 Analyse de l'histamine en présence d'4-MO-OPA dans un mélange d'AB

De même, l'analyse de l'histamine en présence de 4-MO-OPA dans le mélange d'amines choisies a été réalisée et, a donné des résultats similaires à ceux obtenus en présence d'OPA.

La présence de cadavérine, de putrescine et de spermidine n'ont pas influencé l'intensité et la longueur d'onde d'émission des complexes 4-MO-OPA/histamine alors que celle de l'agmatine provoque une augmentation de l'intensité (Figure 3.28). Lors de cette étude, un rapport de concentration [agmatine]/[histamine] fixé à un augmente l'intensité de fluorescence moléculaire de 33 %.

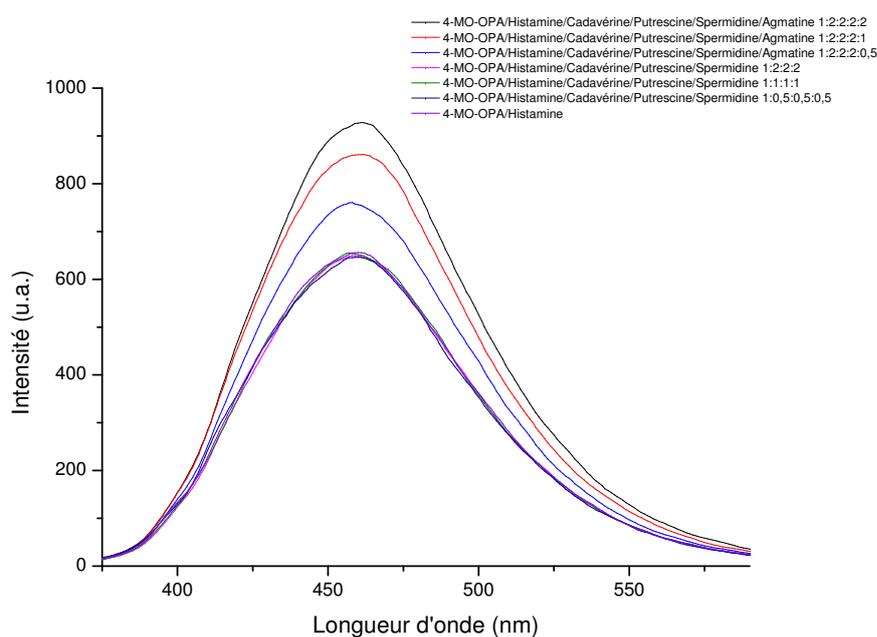


FIGURE 3.28 – Spectres d'émission après une excitation à 358 nm des complexes 4-MO-OPA/histamine en fonction de la concentration en interférent.

### 3.2.3 Comparaison des résultats obtenus pour l'analyse de l'histamine en présence d'OPA et de 4-MO-OPA dans un mélange d'AB

Les résultats obtenus en UV et en fluorescence moléculaire sur l'analyse des complexes OPA/histamine et 4-MO-OPA/histamine au sein d'un mélange d'AB ont été comparés (Tableau 3.16).

TABLEAU 3.16 – Tableau comparatif des effets de quatre AB sur la réponse en fluorescence moléculaire des complexes OPA/histamine et 4-MO-OPA/histamine.

Mélange d'AB	[histamine]	
	en présence d'OPA	en présence de 4-MO-OPA
Cadavérine	Aucun effet	Aucun effet
Spermidine	Aucun effet	Aucun effet
Putrescine	Aucun effet	Aucun effet
Agmatine	Surestimation 39 % <sup>1</sup>	Surestimation 33 % <sup>1</sup>

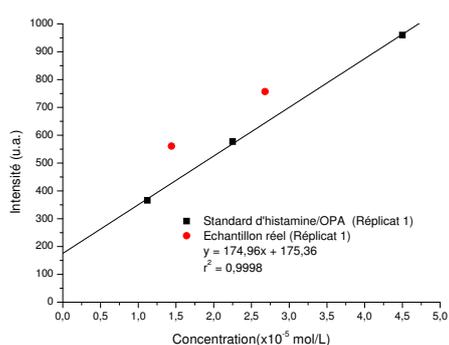
<sup>1</sup> pour [agmatine] = [histamine]

En présence d'un mélange d'AB, le 4-MO-OPA et l'OPA ont des réponses similaires. Dans les conditions d'analyse de l'histamine, la cadavérine, la putrescine et la spermidine n'interfèrent pas sur l'intensité et la longueur d'onde d'émission des complexes OPA ou 4-MO-OPA/histamine. À l'opposé, la présence d'agmatine donne lieu à une augmentation de l'intensité d'émission des complexes OPA ou 4-MO-OPA/histamine ayant pour conséquence de surestimer la quantité d'histamine. Cette surestimation est légèrement plus faible en présence de 4-MO-OPA qu'en présence d'OPA (-6 points).

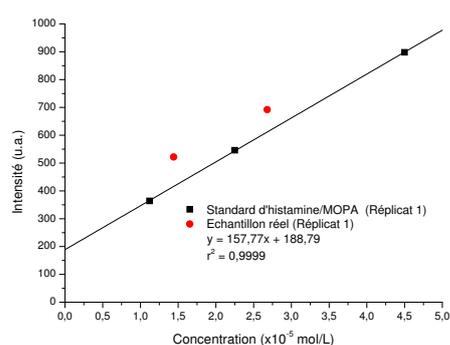
La plus value du 4-MO-OPA par rapport à l'OPA réside ici encore dans la méthode de préparation des échantillons. En effet, l'ensemble des analyses effectuées en présence de 4-MO-OPA peut être réalisé dans la continuité immédiate de la préparation des échantillons. De plus, la répétabilité de l'analyse s'affranchit dorénavant de son temps de réalisation, une analyse de contrôle ayant été effectuée après 24 h sans changement significatif de l'intensité ou de la longueur d'onde d'émission. Le 4-MO-OPA apparaît donc comme un candidat de choix pour une analyse rapide d'histamine par fluorescence moléculaire.

### 3.3 Analyse de l'histamine dans un échantillon réel

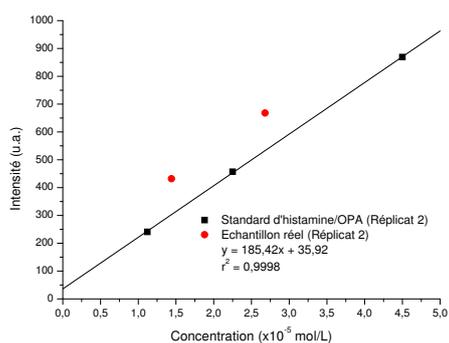
Afin de valider nos résultats et estimer le potentiel applicatif du 4-MO-OPA sur échantillon réel, l'analyse d'histamine a été effectuée sur quatre échantillons de thon albacore (*Thunnus albacares*) dopés en histamine à 16 mg/kg et à 149 mg/kg et fournis par l'ANSES. Une extraction de chaque échantillon (deux réplicats de chaque concentration) par le méthanol, suivi d'évaporation à sec et une mise en solution aqueuse en présence d'OPA et de 4-MO-OPA ont été réalisées selon une adaptation de la norme de fluorescence moléculaire.<sup>[25]</sup> Les droites d'étalonnage ont été réalisées avec des standards d'histamine en présence d'OPA d'une part, et de 4-MO-OPA d'autre part à 1,12; 2,25 et 4,50 x 10<sup>-5</sup> mol/L de complexes. Les intensités maximales des échantillons réels ont été visualisées sur les spectres selon leur concentration effective. Dans chaque cas, ces intensités sont supérieures à celles attendues (Figure 3.29).



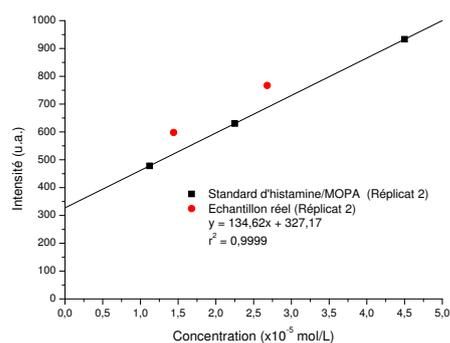
(a) Réplicat 1 en présence d'OPA.



(b) Réplicat 1 en présence de 4-MO-OPA.



(c) Réplicat 2 en présence d'OPA.



(d) Réplicat 2 en présence de 4-MO-OPA.

FIGURE 3.29 – Intensité de fluorescence des échantillons réels en présence d'OPA et de 4-MO-OPA.

Pour chaque échantillon, les analyses en présence d'OPA et de 4-MO-OPA ont montré une surestimation de la quantité théorique d'histamine par rapport aux valeurs attendues (Tableau 3.17).

TABLEAU 3.17 – Tableau comparatif des fractions massiques obtenues à partir des intensités maximales en fluorescence moléculaire des complexes OPA/histamine et 4-MO-OPA/histamine.

	Échantillons à 16 mg/kg		Échantillons à 149 mg/kg	
	Réplikat 1	Réplikat 2	Réplikat 1	Réplikat 2
OPA	22,0 mg/kg (38 %)	21,4 mg/kg (34 %)	166,2 mg/kg (12 %)	170,4 mg/kg (14 %)
4-MO-OPA	21,1 mg/kg (32 %)	20,1 mg/kg (26 %)	159,5 mg/kg (7 %)	163,4 mg/kg (10 %)

Sur ces échantillons, la surestimation est légèrement moins importante lors des analyses en présence de 4-MO-OPA. Toutefois, ce résultat ne peut être significatif au vu du faible nombre d'échantillons étudiés. Afin de comprendre l'origine de cette surestimation, il serait nécessaire de connaître la composition totale en AB de cet échantillon afin d'évaluer si elle peut être reliée à la présence d'agmatine dans une première approche.

### 3.4 Conclusion

Cette étude par spectroscopie UV et de fluorescence moléculaire a permis de caractériser les complexes OPA/histamine et 4-MO-OPA/histamine puis de comparer leurs propriétés. Pour cela, trois étapes ont été réalisées.

La première a eu pour but de définir les conditions de pH et de temps optimales de complexation des deux dialdéhydes (OPA et 4-MO-OPA) avec l'histamine afin d'obtenir la plus forte intensité d'émission en fluorescence moléculaire.

Si une valeur constante de pH de 12,5 est commune aux deux structures, leur différence réside dans le temps caractéristique des complexes fluorescents avec l'histamine, nécessaire pour obtenir une intensité de fluorescence et une longueur d'émission stable. Pour l'OPA, il doit être de 24 h à 4 °C alors que pour

le 4-MO-OPA, cette durée peut être réduite à 15 min à 20 °C (Figure 3.30). Suite à la détermination de ces paramètres de temps et de pH, les longueurs d'onde d'absorption, d'excitation et d'émission ont été précisées et ont permis de définir les stœchiométries des complexes pour l'OPA comme pour le 4-MO-OPA qui sont de trois types : 1:1 puis 2:1 et enfin 3:1. Enfin, les limites de détection et de quantification ont été caractérisées (Figure 3.30). Elles sont cinq fois plus faibles pour le 4-MO-OPA, ce qui représente un atout majeur lors de la détection de trace d'histamine ou pour l'analyse d'échantillon en quantité minimale (Figure 3.30).

La seconde partie a eu pour objectif de comparer la sélectivité des systèmes OPA et 4-MO-OPA pour l'analyse de l'histamine au sein d'un mélange synthétique d'AB réalisé à partir de standards d'agmatine, de cadavérine, de putrescine et de spermidine. Les résultats ont été très comparables pour les deux composés. La présence de cadavérine, de putrescine et de spermidine n'influence pas l'intensité de fluorescence et la longueur d'onde d'émission des complexes OPA ou 4-MO-OPA/histamine. Parmi les AB testées, seule la présence d'agmatine a montré des interférences aboutissant à une surestimation de l'histamine. Lorsque la concentration en agmatine est identique à celle en histamine, l'intensité de fluorescence est augmentée de 39 % lors de l'utilisation d'OPA. Cette surévaluation est légèrement inférieure en présence de 4-MO-OPA (33 %) (Figure 3.30).

Enfin, la dernière partie de l'étude a eu pour objectif d'éprouver les deux agents de dérivation sur des échantillons réels de thon albacore (*Thunnus albacares*) artificiellement dopés à l'histamine à 16 et 149 mg/kg. Une surestimation de la quantité d'histamine a été observée à la fois sur le thon dopé à 16 et 149 mg/kg que ce soit avec l'OPA ou le 4-MO-OPA (Figure 3.30). Ce résultat pourrait s'expliquer par la présence supposée d'autres AB dont l'agmatine étant donné l'absence de séparation chromatographique en amont de l'analyse (Figure 3.30).

En perspective, l'influence de la présence d'un plus grand panel d'AB et de composés susceptibles de se trouver dans les échantillons comme les acides aminés ou les thiols pourrait être évaluée. Enfin, des analyses sur échantillons réels dont la composition en AB est connue devront également être effectuées. Par ailleurs, des enzymes comme l'agmatine déiminase pourraient être utilisées

pour dégrader sélectivement les AB susceptibles d'interférer lors de l'analyse de l'histamine.

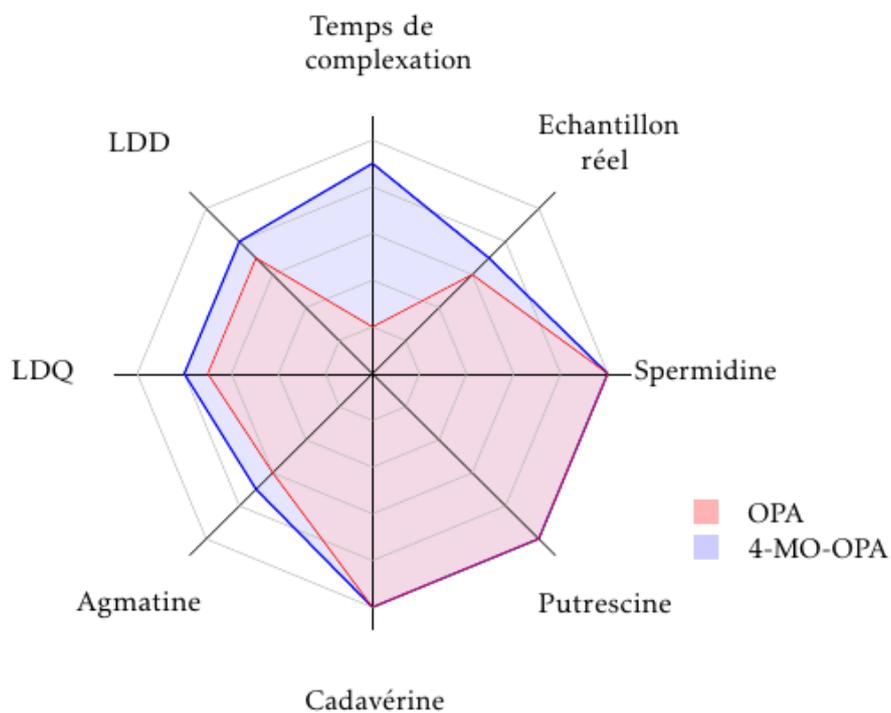


FIGURE 3.30 – Diagramme de comparaison des propriétés de l'analyse de l'histamine par fluorescence moléculaire utilisant soit l'OPA soit le 4-MO-OPA en tant qu'agent de dérivation.

## Protocoles d'analyses par UV et fluorescence moléculaire des AB

Afin d'établir une comparaison, tous les protocoles validés sur l'OPA ont été translatés au 4-MO-OPA. L'unique paramètre variable se situe au niveau de la durée entre la mise en contact de l'OPA ou du 4-MO-OPA avec l'histamine et la réalisation de l'analyse. Pour l'OPA, cette durée correspond à 24 h, alors que pour le 4-MO-OPA, elle se situe à 15 min avec un contrôle à 24 h. L'étude cinétique a toutefois été menée sur une durée de 0 à 50 h (Sections 3.1.1.2.3 et 3.1.2.2.3).

Pour l'ensemble des analyses des AB en présence d'OPA ou de 4-MO-OPA, les consignes suivantes ont été respectées :

- l'ensemble des réactifs a été conservé à 4 °C dans l'obscurité,
- toutes les solutions mères et intermédiaires ont été conservées au maximum une semaine dans l'obscurité et à basse température,
- les AB n'ont été mises en contact avec l'OPA ou le 4-MO-OPA que lors de la réalisation des solutions filles finales,
- tous les pH ont été fixés en amont du mélange des 4-HO-OPA et 4-MO-OPA avec les AB,
- les solutions ont été placés à 4 °C dans l'obscurité dès la mise en solution des réactifs.

## Synthèses et caractérisations des QD

Le schéma du dispositif proposé pour l'analyse de l'histamine, détaillé en introduction du chapitre 2 et repris ici (Figure 4.1), montre que le 4-HO-OPA offre une voie de jonction avec le ligand du QD. Deux constituants, le QD et le ligand, sont également nécessaires à cette construction et font l'objet de l'étude détaillée de ce chapitre.

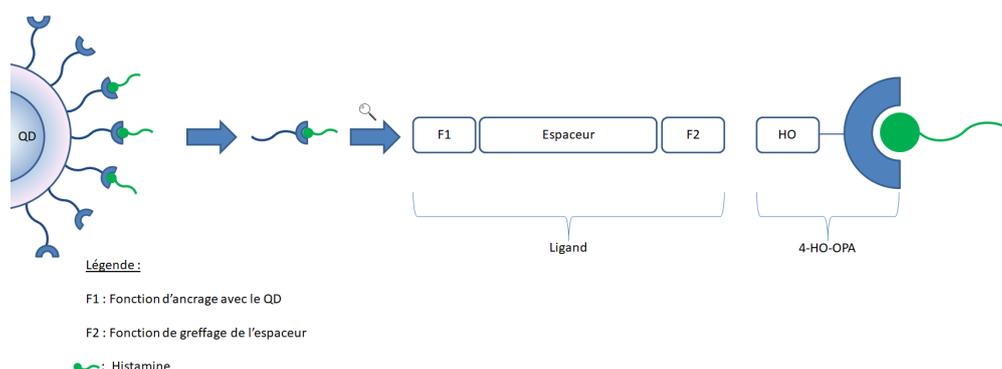


FIGURE 4.1 – Schéma proposé pour la composition du dispositif QD/Ligand/OPA.

La nature des semi-conducteurs composant le cœur du QD correspond à la première interrogation. Le choix s'est porté sur un cœur composé de cadmium et sélénium (CdSe) en raison de leur longueur d'onde d'émission qui couvre la majeure partie du domaine visible (du bleu au rouge)<sup>[101]</sup> mais également par le référencement de leur synthèse en milieu aqueux assurant l'hydrosolubilité nécessaire à leurs applications biologiques (Section 1.3.3.2.2). En effet, un QD dont la synthèse est initialement réalisée en milieu organique doit ensuite subir une encapsulation ou un échange de ligands pour devenir hydrosoluble. Ces transformations impacteraient soit l'approche de l'histamine, soit le rendement quantique de fluorescence (sect 1.3.3.3).

Le second élément à fixer correspond au choix de la structure du ligand. Ces derniers sont nécessaires à la fois pour stabiliser la nanostructure et pour favoriser le retour à l'état fondamental du système avec émission de fluorescence. Les QD hydrosolubles à base de CdSe sont généralement stabilisés par des ligands thiolés et comportent un groupement acide carboxylique assurant leur solubilité aqueuse (Section 1.3.3.2.2). Ici, l'une des deux extrémités du ligand doit également permettre le greffage entre le QD et le dérivé d'OPA ; le choix des fonctionnalisations (F1 et F2) est donc stratégique.

En absence d'expertise en QD au sein du laboratoire, la première phase de cette étude s'est orientée sur la synthèse référencée de QD hydrosolubles de CdSe stabilisés par un ligand de type acide 11-mercaptosuccinique (MSA) , thioacide comportant une chaîne carbonée de petite taille afin de ne pas éloigner l'histamine du QD pour permettre son analyse. Cette synthèse a par ailleurs été étendue à trois modes d'activation : thermique, micro-ondes et ultrasons afin de confronter les caractéristiques et propriétés issues de ces tests. Enfin, une perspective de développement sera présentée pour finaliser la construction du dispositif.

## **4.1 Synthèses et caractérisations de QD de CdSe stabilisés par MSA (système direct)**

### **4.1.1 Synthèses de QD de CdSe stabilisé par MSA**

La synthèse des QD hydrosolubles à base de CdSe se déroule en trois étapes : les deux premières consistent à synthétiser séparément les précurseurs de sélénium et de cadmium et la dernière correspond à la synthèse du QD.

En effet, la littérature indique que les synthèses de QD par voie thermique et par activation sonochimique entraînent l'obtention de QD de CdSe alors que la voie par irradiation micro-ondes conduit à des QD « alliage » CdSe/CdS de types cœur/coquille CdSe/CdS dont les propriétés (diamètre du cœur et longueur d'onde d'émission) sont différentes.

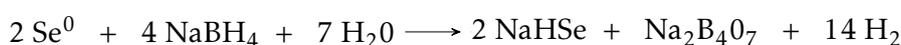
Par conséquent, trois procédés d'activation ont été étudiés pour la formation

du QD :

- par voie thermique,
- par irradiation par micro-ondes,
- et par activation sonochimique.

#### 4.1.1.1 Synthèse des précurseurs de sélénium

Le but de cette étape est d'activer le sélénium en présence de  $\text{NaBH}_4$  afin de former le précurseur  $\text{NaHSe}$  selon le protocole de ALDEEK et al.<sup>[130]</sup> et adapté de KLAYMAN et GRIFFIN<sup>[190]</sup> (Équation 4.1).



Équation 4.1 – Équation de la réaction du sélénium solide en présence de  $\text{NaBH}_4$  pour former  $\text{NaHSe}$ .

#### 4.1.1.2 Synthèses des précurseurs de cadmium

En parallèle, une solution est préparée à pH basique dont la valeur doit être supérieure au  $\text{pK}_a$  de la fonction polaire du ligand afin de permettre la formation de complexes  $\text{Cd}^{2+}$ /thiol insoluble en milieu aqueux acide ou neutre. Ainsi, les QD ioniques finaux auront une meilleure dispersion dans le milieu et leurs agrégations seront limitées par répulsions électrostatiques. Le mélange obtenu est ensuite placé dans un vial scellé et dégazé à l'azote pour limiter l'oxydation du précurseur de séléniure lors de son utilisation future.

Les synthèses ont été adaptées de celles de ALDEEK et al.<sup>[124,130,191]</sup> et de KAUFFER et al..<sup>[192,193]</sup>

#### 4.1.1.3 Synthèses des QD de cadmium et sélénium

Suite à la synthèse des précurseurs, une injection rapide sous agitation vigoureuse de séléniure  $\text{Se}^{2-}$  est effectuée à TA dans la solution de cadmium  $\text{Cd}^{2+}$  afin de favoriser la création des premiers germes de QD. Enfin, selon le mode d'activation (thermique, micro-ondes, ultrasons), la solution colorée jaune obtenue contenant les premiers germes de QD de cadmium sélénium (CdSe) est alors :

- chauffée à 110 °C dans un vial scellé pour une synthèse dite en milieu aqueux (synthèse thermique),
- placée dans un réacteur micro-onde monomode sous pression à 110 °C (3 à 5 bars),
- placée dans un système adapté de type « cup-horn » sous ultrasons à température ajustée ne dépassant pas 40 °C.

L'activation thermique, par micro-ondes ou sonochimique a varié de 1 min à 1 h et a été stoppée par trempe dans l'eau glacée. Huit temps d'activation ont été appliqués sur les trois voies de synthèse (Tableau 4.1) :

- Une première solution de précurseurs (P1 □) a été divisée en trois lots à destination des réactions thermique, micro-ondes et ultrasons et celles-ci ont été menées selon quatre temps (1, 5, 15 et 30 min).
- De manière similaire, une deuxième solution de précurseurs (P2 ○) a été préparée pour les trois modes d'activation aux temps 3, 10, 20 et 30 min.
- Afin de confronter les résultats, un réplicat sur toutes les durées a été réalisé selon la même méthodologie (P3 Δ et P4 x).

TABLEAU 4.1 – Méthodologie d'élaboration des QD par voies thermique, micro-ondes et ultrasons.

Mode d'activation	Solution de précurseurs	Réplicat 1				Réplicat 2				
		Temps (min)				Temps (min)				
		1	5	15	30	3	10	20	60	
Thermique	P1	□	□	□	□	P2	○	○	○	○
	P3	Δ	Δ	Δ	Δ	P4	x	x	x	x
Micro-ondes	P1	□	□	□	□	P2	○	○	○	○
	P3	Δ	Δ	Δ	Δ	P4	x	x	x	x
Ultrasons	P1	□	□	□	□	P2	○	○	○	○
	P3	Δ	Δ	Δ	Δ	P4	x	x	x	x

À l'issue des synthèses, les solutions sont concentrées sous vide puis les particules de QD sont précipitées à l'aide d'isopropanol, lavées et centrifugées trois fois et séchées sous-vide (Figure 4.2).



(a) Lumière naturelle. (b) Lumière à 365 nm.

FIGURE 4.2 – Photographie de QD synthétisés par voie thermique.

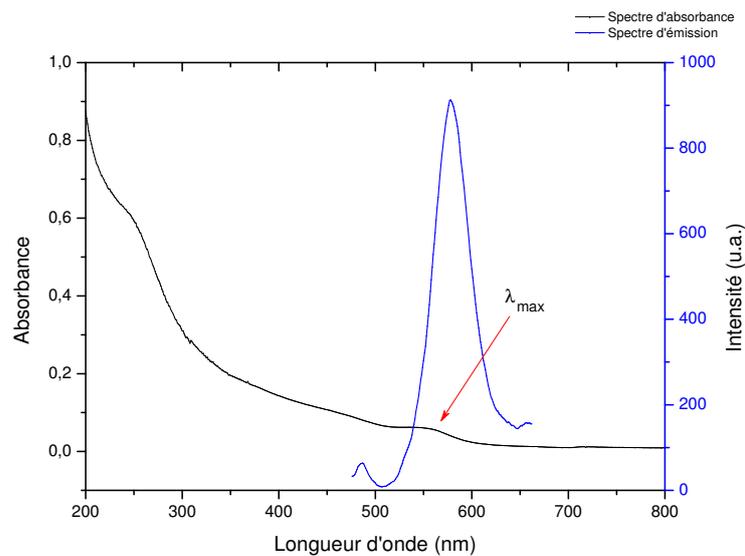
### 4.1.2 Caractérisation des QD de CdSe/MSA

Deux types d'analyse ont été réalisés pour caractériser les QD. En premier lieu, les propriétés optiques (absorption et émission) ont été contrôlées et ont permis de déterminer le diamètre du cœur de CdSe grâce à la longueur d'onde du premier pic excitonique présent sur les spectres d'absorption selon l'équation de Yu et al.<sup>[148]</sup> adaptée de celle de Brus<sup>[95,96]</sup> (Section 1.3.2.1). Puis, dans un second temps, des analyses structurales par Diffraction des Rayons X (DRX) et par Spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES) ont été réalisées pour déterminer la structure de QD (CdSe/MSA ou CdSe/CdS/MSA).

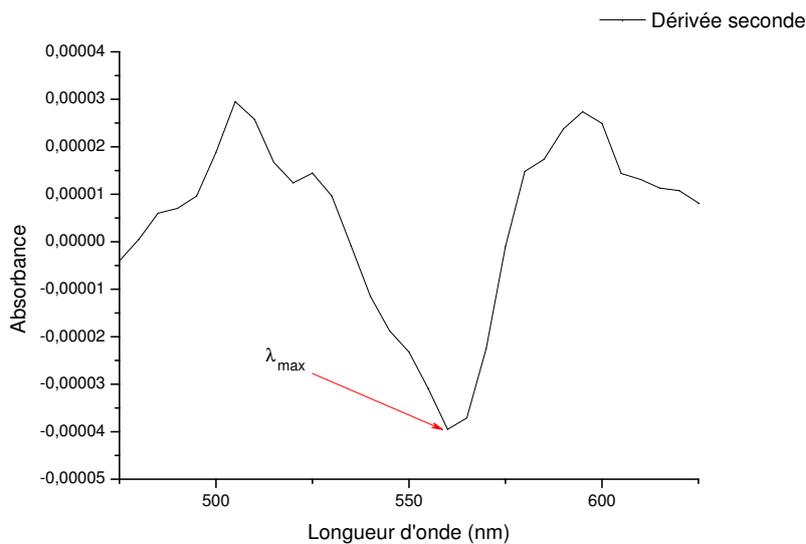
### 4.1.3 Propriétés optiques : Spectres d'absorption et d'émission

À l'issue des synthèses, les QD ont été conservés à  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  dans l'isopropanol afin d'éviter leur oxydation. Un séchage sous vide ainsi qu'une dissolution dans de l'eau ultra-pure sont réalisés avant d'effectuer les analyses spectroscopiques UV et de fluorescence moléculaire.

Les spectres UV des 48 échantillons issus des synthèses ont été réalisés à TA de 200 à 800 nm avec un pas de 0,05 nm. À partir de ces spectres, la longueur d'onde du premier pic excitonique ( $\lambda_{\text{max}}$ ), caractérisé par un épaulement au seuil d'absorption et correspondant à l'état excité d'énergie le plus faible, peut être déterminée (Figure 4.3a). Cette longueur d'onde correspond au minimum d'inflexion de la dérivée seconde du spectre UV (Figure 4.3b).



(a) Spectres d'absorption et d'émission d'un QD de CdSe/MSA avec une synthèse de 30 min par irradiation micro-ondes.



(b) Spectre de la dérivée seconde du spectre UV de l'échantillon relevé à 30 min par irradiation micro-ondes.

FIGURE 4.3 – Spectres d'absorption, d'émission et de la dérivée seconde du spectre d'absorption d'un QD de CdSe/MSA avec une synthèse de 30 min par irradiation micro-ondes.

La seconde valeur expérimentale remarquable sur ce spectre correspond à l'absorbance associée à la longueur d'onde du premier pic excitonique.

À partir de ce couple de valeurs et en appliquant les équations de Yu et al.<sup>[148]</sup> et BRUS,<sup>[95,96]</sup> le diamètre du cœur du QD de CdSe, le coefficient d'extinction molaire et la concentration de la solution de QD peuvent être déterminés (Section 1.3.4).

Les spectres de fluorescence moléculaire ont été enregistrés à 20 °C à partir des solutions caractérisées précédemment (Section 1.3.4.1) et à une longueur d'onde d'excitation de 400 nm.

#### 4.1.3.1 Caractérisations des QD obtenus par voie thermique

La synthèse par voie thermique utilisée (Section 4.1.1) a donné accès à des échantillons de diamètre de 1,64 à 3,24 nm, émettant entre 496 et 580 nm (Figure 4.4).

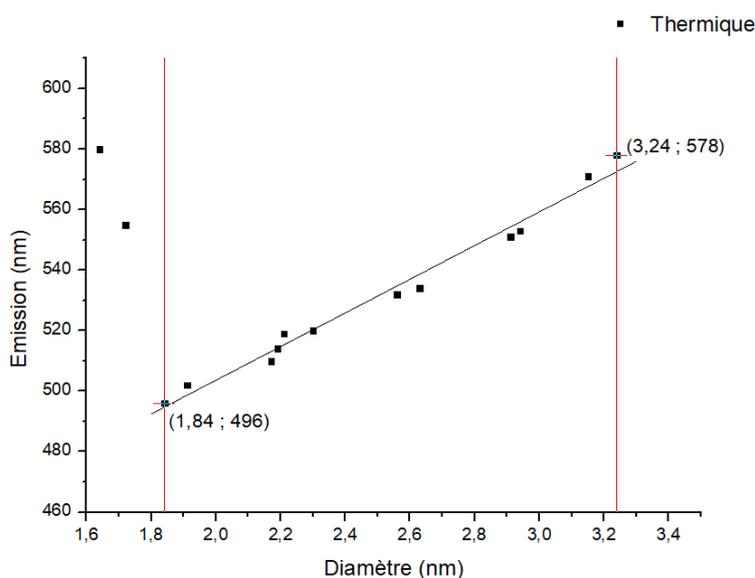


FIGURE 4.4 – Évolution de la longueur d'onde d'émission en fonction du diamètre du cœur des QD obtenus par voie thermique.

Deux zones de tailles sont particulièrement observables :

- une zone strictement inférieure à 1,84 nm pour laquelle les échantillons n'ont pas une longueur d'onde d'émission proportionnelle à leur diamètre.

Ils ne sont donc pas considérés comme des QD mais présentent une émission due aux défauts de surface.

- une zone entre 1,84 et 3,24 nm associée à des QD émettant entre le vert (496 nm) et l'orange (578 nm).

À titre de remarque, pour un lot donné, le diamètre augmente en fonction de la durée de synthèse. Toutefois, deux lots issus de précurseurs différents (exemple P1 et P3) ne conduisent pas à des QD ayant les mêmes caractéristiques de taille (et d'émission). Cette observation corrobore les données de la littérature qui n'associe jamais une durée de synthèse à un diamètre de QD (Figure 4.5).

Par ailleurs, même si un temps de réaction ne peut être associé à un diamètre précis de cœur, une augmentation du diamètre du cœur du QD en fonction de la durée de la synthèse est observée pour chaque lot de précurseurs. L'augmentation de la durée d'activation conduit par conséquent à des émissions de longueur d'onde élevée.

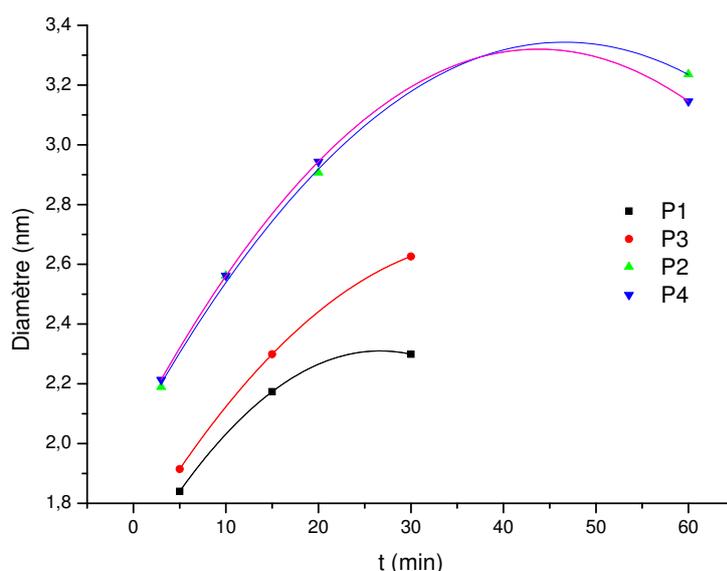


FIGURE 4.5 – Évolution du diamètre du cœur de CdSe en fonction du temps de synthèse par voie thermique.

### 4.1.3.2 Caractérisations des QD obtenus par irradiation micro-ondes

QD La synthèse par irradiation micro-ondes (Section 4.1.1) a donné accès à des échantillons de QD de diamètre de 2,10 à 3,41 nm émettant entre 510 et 582 nm (Figure 4.6).

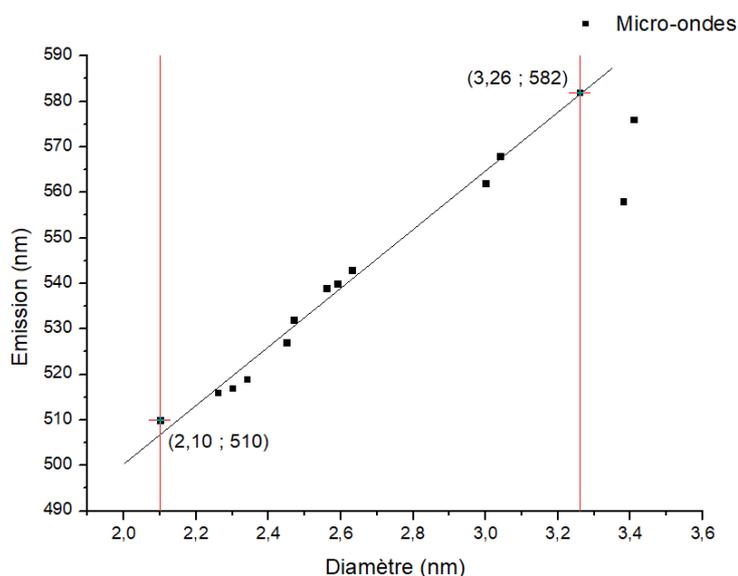


FIGURE 4.6 – Évolution de la longueur d’onde d’émission en fonction du diamètre du cœur des QD obtenus par irradiation micro-ondes.

Deux zones de tailles sont également observables :

- une zone entre 2,10 et 3,26 nm associée à des QD émettent entre le vert (510 nm) et l’orange (582 nm),
- une zone strictement supérieure à 3,26 nm pour laquelle les échantillons n’ont pas une longueur d’onde d’émission proportionnelle à leur diamètre. Ils ne sont donc pas considérés comme des QD dans une première approche.

En conclusion, ces plages de diamètre et longueur d’onde sont légèrement plus restreintes que celles obtenues par voie thermique (environ –15 %). Cette méthode permet donc d’obtenir des QD aux propriétés optiques plus limitées.

Par ailleurs, l’augmentation du temps de synthèse aboutit à un cœur de diamètre plus important au sein d’un même lot.

### 4.1.3.3 Caractérisations des QD obtenus par activation sonochimique

La synthèse par activation sonochimique (Section 4.1.1) a donné accès à des échantillons de QD de diamètre de 1,64 à 2,21 nm émettant entre 546 et 620 nm (Figure 4.7).

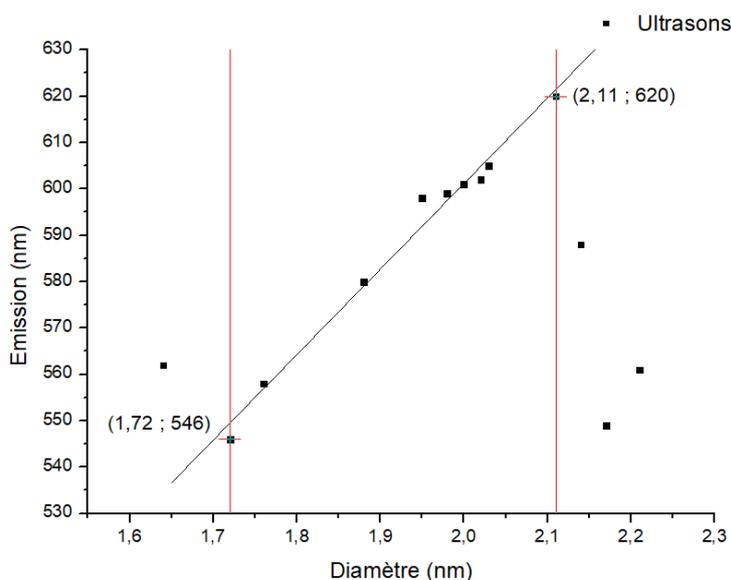


FIGURE 4.7 – Évolution de la longueur d’onde d’émission en fonction du diamètre du cœur des QD obtenus par activation sonochimique.

Pour ce type de synthèse, trois zones de tailles sont observables :

- une zone strictement inférieure à 1,72 nm pour laquelle les échantillons n’ont pas une longueur d’onde d’émission proportionnelle à leur diamètre. Ils ne sont donc pas considérés comme des QD mais présentent une émission de défauts.
- une zone entre 1,72 et 2,11 nm associée à des QD émettent entre le vert (546 nm) et l’orange-rouge (620 nm),
- une zone strictement supérieure à 2,11 nm pour laquelle les échantillons n’ont pas une longueur d’onde d’émission proportionnelle à leur diamètre. Ils ne sont donc pas considérés comme des QD dans une première approche.

En conclusion, cette méthode de synthèse est celle qui présente la plage de variation la plus restreinte (73 % et 66 % de moins) par rapport aux voies ther-

mique et micro-ondes. De plus, l'augmentation du temps de réaction ne garantit pas une augmentation du diamètre du cœur contrairement à ce qui avait été constaté lors des deux premiers types de synthèse. Ce résultat pourrait s'expliquer par les effets mécaniques liés à la cavitation limitant ainsi la croissance des nanoparticules.<sup>[194]</sup>

En revanche, malgré l'obtention de cœur de plus faible diamètre, cette méthode permet de produire des QD ayant une plage de longueur d'onde de fluorescence très similaire à l'irradiation micro-ondes avec toutefois l'observation d'un effet bathochrome de 40 nm.

#### 4.1.3.4 Comparaison des diamètres de cœur et des longueurs d'onde d'émission des QD de CdSe/MSA obtenues par les trois modes d'activation

Les propriétés optiques des QD obtenues par les trois modes d'activation ont été déterminées selon la méthode de BRUS<sup>[95,96]</sup> puis comparées (Tableau 4.2). Les QD obtenus par voie thermique et activation micro-ondes possèdent des diamètres et des longueurs d'onde de plages équivalentes et ont donc des caractéristiques similaires.

En revanche, les QD synthétisés par activation sonochimique montrent des diamètres plus faibles et ont une dispersion de taille trois fois plus réduite que ceux obtenus par les méthodes thermiques et micro-ondes malgré une gamme de longueur d'onde d'émission comparable. Enfin, la composition des cœurs de QD obtenus par sonochimie est différente de celle des QD obtenus par voie thermique et activation micro-ondes car malgré des diamètres de cœur plus faible, un effet bathochrome de 40 nm sur la longueur d'onde d'émission des particules est observé.

TABLEAU 4.2 – Comparaison des diamètres de cœur et longueurs d'onde d'émission des QD selon le mode d'activation des synthèses.

Mode d'activation	Diamètre du cœur (nm)		Longueur d'onde (nm)	
	Plage	$\Delta$	Plage	$\Delta$
Thermique	1,84 - 3,24	1,40	496 - 578	82
Micro-ondes	2,10 - 3,26	1,16	510 - 582	72
Ultrasons	1,72 - 2,11	0,39	546 - 620	74

#### 4.1.4 Propriétés structurales : Diffraction des Rayons X (DRX) et Spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES)

Trois échantillons, issus de la même synthèse de précurseurs, obtenus respectivement par voie thermique, micro-ondes et ultrasons ont été sélectionnés afin de comparer leur structures cristallines par DRX. Des diamètres et des longueurs d'onde d'émission similaires correspondent aux paramètres de sélection des QD synthétisés par activation thermique et micro-ondes. En revanche, en absence de paramètres de taille et longueurs d'onde d'émission comparable entre la méthode sonochimique et les deux autres, la sélection a été effectuée par rapport à une durée de synthèse identique à celle menée par micro-ondes.

En résumé, les échantillons sélectionnés ont été :

**- pour la voie thermique :**

Synthèse de 30 min (diamètre de 2,30 nm et émission à 520 nm),

**- pour l'irradiation micro-ondes :**

Synthèse de 15 min (diamètre de 2,34 nm et émission à 519 nm),

**- pour l'activation sonochimique :**

Synthèse de 15 min (diamètre de 1,88 nm et émission à 580 nm).

##### 4.1.4.1 Analyses par DRX

D'après la fiche Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS), le CdSe est caractérisé par trois pics de diffraction majoritaires (à environ 25,5°, 42,0° et 49,8°) et trois minoritaires (à environ 61,0°, 67,0° et 72,5°). De même, le CdS est lui caractérisé par quatre pics majoritaires (à environ 26,5°, 30,5°, 44,0° et 52,0°) et quatre minoritaires (à environ 54,5°, 64°, 70,2° et 72,5°).

L'analyse des trois échantillons par DRX a permis d'obtenir deux types de diffractogrammes; les résultats obtenus pour les échantillons thermiques (Figure 4.8) et micro-ondes (Figure 4.9) sont très similaires et permettent d'identifier sans ambiguïté les cristaux de CdS induisant la présence d'une coquille de CdS et probablement d'un cœur de CdSe. Quant au spectre DRX de l'échantillon obtenu par voie sonochimique (Figure 4.10), son profil est clairement distinct de

celui issu des échantillons obtenus par voies thermique et micro-ondes. Toutefois, la comparaison des pics de diffraction avec ceux de la base de données de l'instrument n'a pas permis de définir une composition spécifique.

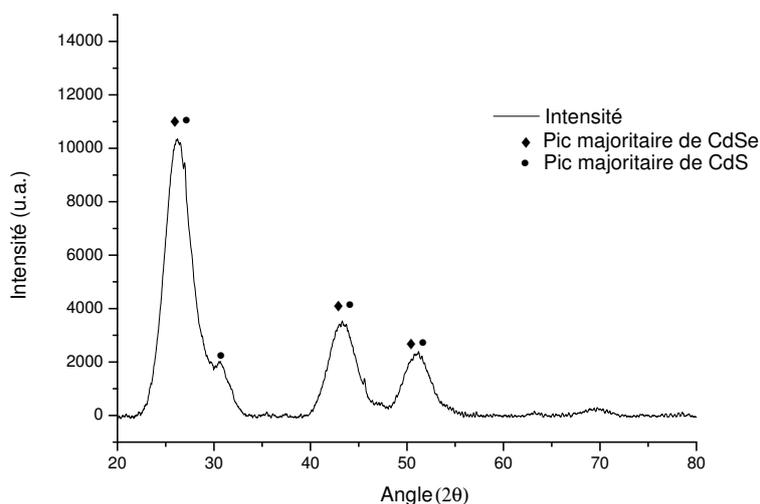


FIGURE 4.8 – Spectre DRX obtenu pour l'échantillon préparé par méthode thermique.

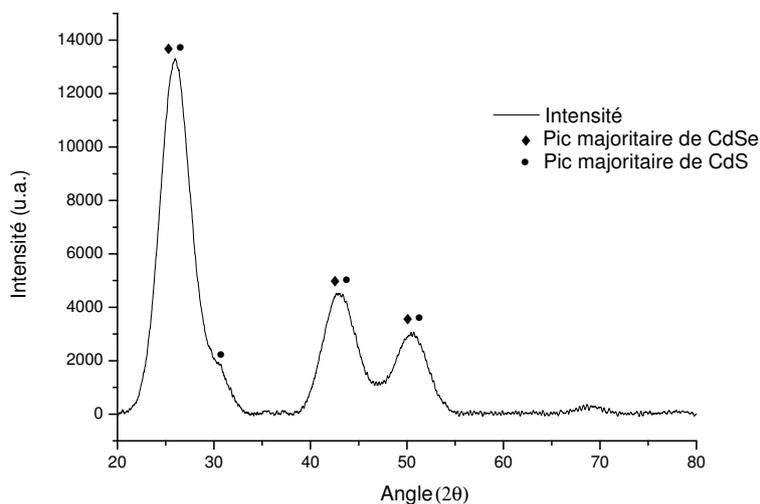


FIGURE 4.9 – Spectre DRX obtenu pour l'échantillon préparé par irradiation micro-ondes.

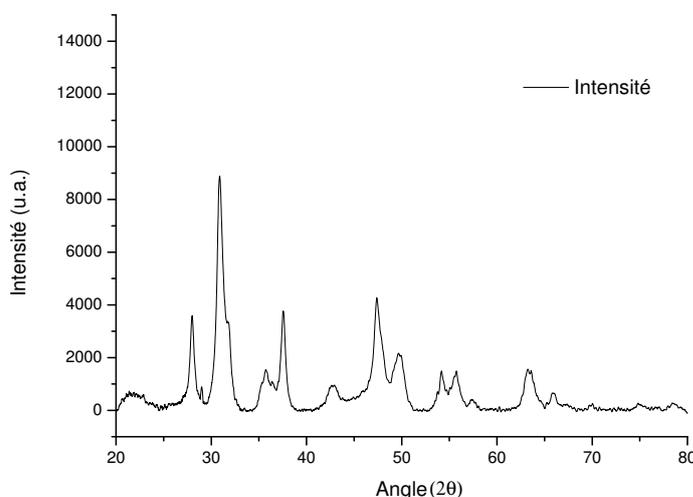


FIGURE 4.10 – Spectre DRX obtenu pour l'échantillon préparé par activation sonochimique.

#### 4.1.4.2 Analyses par ICP-AES

Pour compléter ces résultats, les teneurs en cadmium, sélénium et soufre ont été déterminées par ICP-AES. L'analyse indique que le pourcentage de cadmium est constant pour les trois échantillons alors que le sélénium est trois fois moins présent dans l'échantillon obtenu par sonochimie. Par ailleurs, le rapport Cd sur Se est constant (6,1 à 6,3) sur les échantillons issus des activations thermiques et micro-ondes mais diffère (12,9) pour celui effectué par sonochimie (Tableau 4.3).

TABLEAU 4.3 – Pourcentage de Cadmium, Sélénium et Soufre et rapport Cd/Se et Cd/S selon les méthodes d'activation thermique, micro-ondes et ultrasons .

Activation	Cadmium (%)	Sélénium (%)	Soufre (%)
Thermique	40,3	6,6	6,4
Micro-ondes	39,4	6,2	8,6
Ultrasons	31,4	2,4	4,6

Activation	Rapport Cd sur Se	Rapport Cd sur S
Thermique	6,1	6,3
Micro-ondes	6,3	4,6
Ultrasons	12,9	6,9

En conclusion, l'identification par DRX d'un cœur supposé de CdSe et d'une coquille CdS sur les deux échantillons thermique et micro-onde donne un même ordre de grandeur pour le rapport Cd sur Se (6,1 à 6,3) et Cd sur S (6,3 à 4,6) en ICP-AES. En sonochimie, une valeur en rapport Cd sur Se de 12,9 et de Cd sur S de 6,9 en ICP-AES, combinée à l'analyse du spectre DRX montrant l'absence de raies de diffraction caractéristique de CdSe et CdS laissent supposer la présence d'une autre structure toutefois encore non identifiée à ce jour.

#### 4.1.5 Comparaison des résultats de caractérisation de QD avec la littérature

Selon la littérature, l'activation thermique des précurseurs de cadmium et de sélénium en présence de MSA conduit à des QD de type CdSe ou CdSe/CdS selon les conditions de température et de pression.<sup>[192,193]</sup> Aucun travail, à notre connaissance, ne fait référence à la synthèse de QD à base de cadmium et de sélénium en présence de MSA tant en irradiation micro-ondes qu'en sonochimie. Toutefois, des études similaires sont référencées avec l'acide mercaptoacétique (MAA)<sup>[195-197]</sup> (Tableau 4.4).

TABLEAU 4.4 – Comparaison des structures des QD obtenues par rapport à la littérature.

Mode d'activation	Ce travail		Littérature	
	MSA	MSA	MSA	MAA
Thermique (P=1atm)	/		CdSe <sup>[192,193]</sup>	CdSe <sup>[198]</sup>
Thermique (autoclave)	CdSe/CdS		CdSe/CdS <sup>[192,193]</sup>	/
Micro-ondes (sous pression)	CdSe/CdS		/	CdSe/CdS <sup>[195]</sup>
Ultrasons	?		/	CdSe <sup>[196,197]</sup>

Par comparaison avec les travaux de KAUFFER et al.,<sup>[192,193]</sup> l'accès aux QD de type CdSe/CdS obtenus ici par voie thermique pourrait s'expliquer par la pression générée au sein des vials scellés (initialement dédiés à la synthèse sous MAOS) chauffées à 110 °C.

L'activation par micro-ondes conduit à des QD de CdSe/CdS, ce qui s'apparente aux résultats référencés pour le MAA.<sup>[195]</sup> Ces expériences réalisées

sous pression (ici 4 à 5 bars) posent néanmoins la question de l'apport réel des micro-ondes. Une expérience menée en système ouvert pourrait répondre à ce questionnement.

L'absence de raies de diffraction en DRX correspondant au CdSe et CdS tend à établir que le QD synthétisé par sonochimie se différencie de la littérature (CdSe avec MAA) sans qu'une composition exacte du QD n'ait pu être attribuée. La comparaison des études réalisées sous ultrasons reste toutefois très complexe au vu des facteurs qui influencent le phénomène de cavitation comme la température, la présence de gaz dissous ou encore la puissance employée et absorbée.<sup>[199]</sup> Il est noté que dans les travaux de HAN et al.<sup>[196]</sup> une température de 90 °C a été atteinte au bout d'une heure et qu'une irradiation de 3 h a été appliquée sans indication de la température à l'issue de la réaction décrit par BAO et al.<sup>[197]</sup> Dans cette étude, une température ajustée à 40 °C pendant toutes les durées d'irradiation ainsi qu'une expérience silencieuse menée à 40 °C par voie thermique tendent à prouver que la formation du QD soit ici uniquement lié à l'activation par ultrasons.

En perspective, une détermination du diamètre, de la structure cristalline ainsi que de la forme de l'ensemble des QD devra être réalisée par TEM. Elle permettrait notamment de comparer le diamètre réel avec celui déterminé par la méthodologie de BRUS<sup>[95,96]</sup> réalisée pour des QD de CdSe.

#### 4.1.5.1 Informations complémentaires

Les synthèses de QD ont été reconduites pour approfondir leur caractérisations mais n'ont toutefois pu être reproduites malgré de nombreux essais. Afin d'examiner les causes de cette non répétabilité, plusieurs actions correctives, présentées dans le Tableau 4.5, ont été menées mais sans succès.

TABLEAU 4.5 – Problématiques identifiées et actions menées lors de la non répétabilité des synthèses de QD de CdSe.

Biais envisagé	Solution testée
Contamination ou dégradation d'un des réactifs	Achat de nouveaux réactifs (Sélénium en poudre, $\text{CdCl}_2+2,5\text{H}_2\text{O}$ , $\text{NaBH}_4$ , MSA, $\text{NaOH}$ )
Contamination d'un élément de verrerie	Utilisation d'un matériel entièrement neuf
Contamination du gaz ( $\text{N}_2$ )	Utilisation d'une autre bouteille
Température de l'activation du sélénium	Étude de température de la formation des précurseurs de sélénium
Formation de sous-produits dus au pH	Étude du pH lors de la formation des précurseurs de cadmium

## 4.2 Bilan et perspectives de synthèses de QD fonctionnalisés avec l'OPA (système QD-récepteur)

À ce stade de l'étude, l'optimisation des rendements de la synthèse du 4-HO-OPA permet d'envisager son accès en quantité suffisante et les QD de type CdSe/MSA hydrosolubles ont été obtenues même si les problèmes de répétabilité sont encore à résoudre (Figure 4.11).

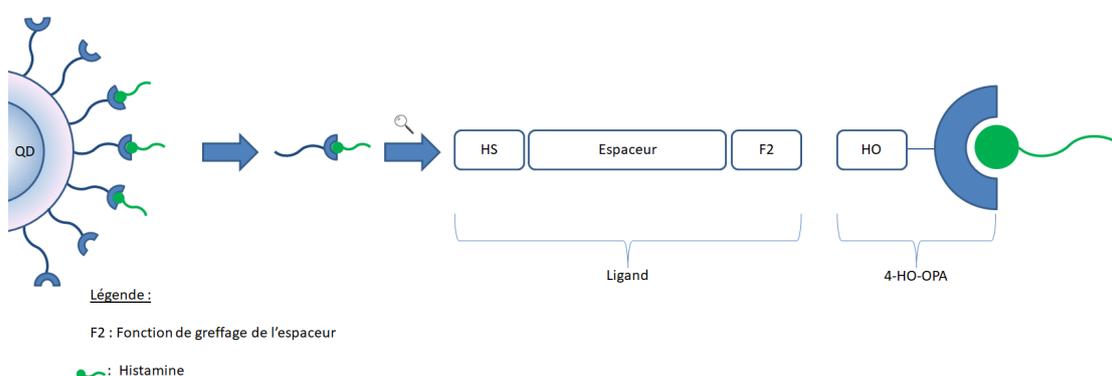


FIGURE 4.11 – Schéma proposé pour la composition du dispositif QD/Ligand thiolé/OPA

Pour achever l'ensemble du dispositif, l'objectif suivant concerne la réali-

sation de la jonction complète du système QD/espaceur/OPA qui peut être envisagée selon deux stratégies (Figure 4.12) :

- une synthèse initiale du QD de cœur de CdSe avec un ligand thiolé et fonctionnalisé à l'autre extrémité afin de permettre la fonction avec le 4-HO-OPA.
- une synthèse du ligand thiolé déjà greffé avec le 4-HO-OPA qui est ensuite réintégré dans la synthèse du QD.

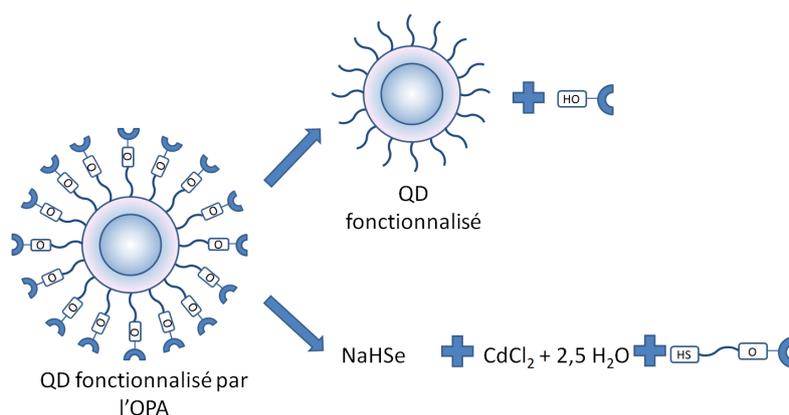


FIGURE 4.12 – Schéma proposé pour les rétrosynthèses du dispositif QD/Ligand thiolé/OPA

L'étude de la réactivité de la fonction phénolique laisse entrevoir deux possibilités de fonctionnalisation (F2) du ligand : une fonction chlorée ou un anhydride d'acide.

Pour la voie 1, la synthèse initiale du QD /ligand en milieu aqueux basique ne peut être envisagée avec l'anhydride d'acide et laisse supposer une polymérisation du ligand thiolé comportant une fonction chlorée.

La voie 2 semble concevable par réaction du 4-HO-OPA sur l'anhydride acétylthiosuccinique. La régiosélectivité de l'attaque du phénol sur ce dérivé a été testé et permet d'envisager une synthèse selon le schéma représenté en Figure 4.13.<sup>[200,201]</sup> Ce modèle reste toutefois à valider notamment sur l'incertitude liée à la réactivité des fonctions aldéhydiques lors de la synthèse finale des QD.

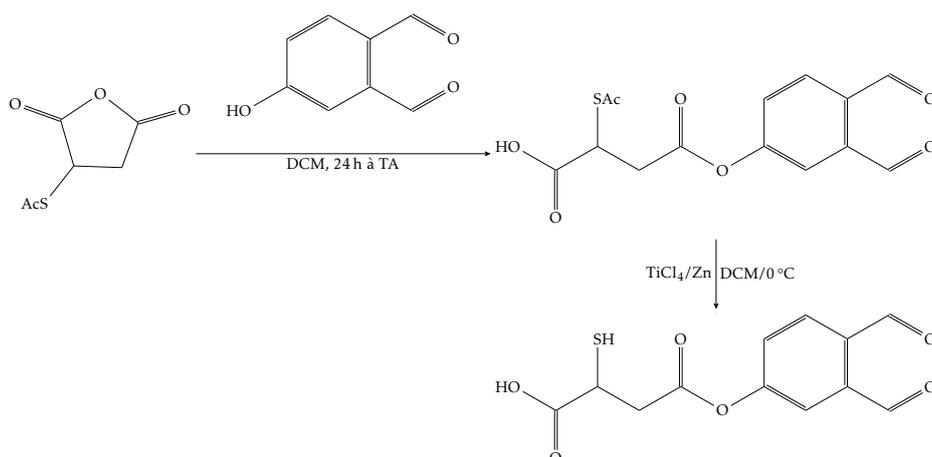


FIGURE 4.13 – Proposition de synthèse du greffage du 4-HO-OPA avec l’anhydride acétylthiosuccinique.

### 4.3 Conclusion

La synthèse de QD stabilisés par MSA pour l’analyse directe de l’histamine a été effectuée par voie thermique, irradiation micro-ondes et activation sonochimique. Leurs caractérisations ont été réalisées par spectroscopie UV et par fluorescence moléculaire afin de déterminer leurs propriétés optiques, et par DRX et ICP-AES pour la détermination de leurs propriétés structurales.

Les QD synthétisés par voie thermique et micro-ondes sont de type CdSe/CdS clairement identifiés par DRX. De même, leur diamètre de cœur et leur gamme de longueur d’onde d’émission sont similaires. Ces observations sont conformes à celles de la littérature précisant la présence de coquille CdS lors de synthèse par voie thermique sous pression (Sections 1.3.3.2.2 et 1.3.3.2.3).

Enfin, la méthode de synthèse par activation sonochimique a permis de synthétiser des QD ayant des propriétés totalement différentes et non décrites dans la littérature à ce jour ; ces QD sont de diamètre plus restreint mais présentent des longueurs d’onde d’émission plus élevées (environ 40 nm vers le rouge) indiquant que la nature du cœur diffère de celle des QD de type CdSe/CdS préalablement obtenus. Les analyses effectuées par DRX et ICP-AES confirment cette différence structurale sans toutefois pouvoir leur associer une structure définie. Celle-ci devra donc être déterminée notamment par TEM.

## Protocoles de synthèse des QD

### C.1 Synthèse des précurseurs de NaHSe

76 mg de  $\text{NaBH}_4$  (2,0 mmol) sont introduits sous atmosphère inerte ( $\text{N}_2$ ) dans un vial scellé contenant 1,0 mL d'eau ultra-pure préalablement dégazée sous  $\text{N}_2$ . Après ajout de 79 mg de sélénium en poudre (1,0 mmol). Le mélange est alors placé sous forte agitation à 0 °C. Après 3 h, la poudre de sélénium solide a laissé place à une solution limpide de NaHSe. Enfin, 19 mL d'eau ultra-pure dégazée sous  $\text{N}_2$  sont ajoutés au mélange pour obtenir une solution à 0,05 mol/L.

### C.2 Synthèse des précurseurs de $\text{Cd}^{2+}$ /MSA

Pour chaque échantillon, 3,1 mg de  $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$  (13,4  $\mu\text{mol}$ ) et 2,1 mg de MSA (14,1  $\mu\text{mol}$ ) sont dissous dans 13 mL d'eau ultra-pure. Le pH est ajusté à 10 à l'aide d'une solution de soude à 0,1 mol/L, puis la solution incolore est dégazée 30 min sous azote.

### C.3 Synthèse des QD CdSe/MSA

64  $\mu\text{L}$  de la solution de NaHSe à 0,05 mol/L (3,2  $\mu\text{mol}$ ) sont injectés rapidement à la solution de cadmium qui est immédiatement agitée afin de l'uniformiser. Selon le type d'activation, les échantillons sont séparés en trois lots :

- pour les synthèses thermiques : les échantillons sont placés dans un vial scellé sous forte agitation et chauffés à 110 °C,

- pour les synthèses sous irradiation micro-ondes : les échantillons sont placés dans un vial micro-ondes scellé sous forte agitation et chauffés à 110 °C dans un four monomode,
- pour les synthèses par activation sonochimique : les échantillons sont placés dans un vial scellé dans un système adapté de type « cup-horn » à TA . Une régulation de la température, n'excédant jamais plus de 40°C, est obtenue par refroidissement ponctuel du bain d'eau.

Dans les trois cas, la croissance des QD est stoppée par une trempe dans un bain de glace. Puis, les solutions sont concentrées sous vide à 10 % du volume initial, précipitées par deux volumes d'isopropanol et centrifugées 15 min à 4000tr/min. Enfin, les QD sont lavés trois fois à l'aide d'un même volume d'isopropanol et séchés sous vide.

# Conclusion générale

L'objectif de ce travail consistait à élaborer des QD fonctionnalisés par un dérivé d'OPA pour l'analyse des AB et plus particulièrement de l'histamine.

En premier lieu, deux dérivés de l'OPA ont été synthétisés : le 4-MO-OPA, dont les propriétés ont été par ailleurs exploitées pour l'analyse par fluorescence moléculaire de l'histamine, et le 4-HO-OPA, dont la présence de la fonction phénol permet d'élargir les possibilités de greffage et de fonctionnalisation de l'OPA. Pour cela, trois voies de synthèse ont été exploitées ; la première voie donne accès au 4-MO-OPA à partir de l'alcool furfurylique avec un rendement global de 51 % et la seconde se réalise à partir du 3,4-diméthylphénol avec un rendement de 22 %. Enfin, la dernière synthèse s'effectue à partir de l'acide 3-méthoxybenzoïque et conduit au 4-MO-OPA avec un rendement de 49 %. Parmi ces trois méthodes, la première est la plus robuste. Son optimisation a permis d'accéder à un rendement global 10 fois supérieur à la littérature dédiée.

Dans un second temps, les propriétés du 4-MO-OPA en tant qu'agent de dérivation vis-à-vis de l'histamine ont été évaluées et comparées à celles de l'OPA. Pour cela, les conditions optimales de complexation des deux dialdéhydes (OPA et 4-MO-OPA) avec l'histamine ont été définies afin d'obtenir l'intensité d'émission de fluorescence moléculaire la plus élevée. L'histamine a été ainsi dérivée avec l'OPA puis avec le 4-MO-OPA et analysée selon un processus itératif. Une analyse réalisable très rapidement et des limites de détection et de quantification cinq fois plus faibles représentent les atouts majeurs du 4-MO-OPA.

La sélectivité de l'analyse a ensuite été évaluée en présence d'un mélange d'AB réalisé à partir de standards d'agmatine, de cadavérine, de putrescine et de spermidine. Des interférences liées à la présence d'agmatine aboutissant à une surestimation de la quantité d'histamine ont été relevées pour le 4-MO-OPA et, de manière usuelle, pour l'OPA. Enfin, les deux agents de dérivation ont été

éprouvés sur des échantillons réels de thon albacore artificiellement dopés à l'histamine sur laquelle une surestimation a été observée.

Le second élément clé réalisé lors cette étude correspond à des QD hydrosolubles de cadmium et sélénium stabilisés par MSA. Leur synthèse a été effectuée par voie thermique, par irradiation micro-ondes et par activation sonochimique.

L'analyse de leurs caractéristiques structurales et propriétés optiques a permis de classer les QD en deux types. Ainsi, les QD obtenus par voie thermique et micro-ondes possèdent des propriétés optiques similaires (diamètre de cœur et gamme de longueur d'onde d'émission) et sont de type CdSe/CdS. Enfin, la méthode de synthèse par activation sonochimique a permis de réaliser des QD de diamètre plus restreint et présentant un effet bathochrome sur leur longueur d'onde d'émission d'environ 40 nm indiquant une nature du cœur différente de celle des QD obtenus par voies thermique et micro-ondes.

# Perspectives

Les intolérances et intoxications liées à un taux élevée d'histamine dans les denrées alimentaires restent un problème de santé publique justifiant les efforts de la communauté scientifique. Ce travail, au travers de la synthèse de dérivés d'OPA, de l'étude de leurs propriétés de fluorescence moléculaire et de la synthèse de QD établit, pour le laboratoire, une base solide vers l'amélioration de l'analyse fluorimétrique des AB. Celle-ci nécessite néanmoins d'être consolidée mais ouvre également des axes de développement complémentaires.

La fonctionnalité amenée par le groupement phénolique du 4-HO-OPA mérite d'être exploitée. En effet l'optimisation de synthèse présentée dans ce travail doctoral a permis de garantir un accès au 4-HO-OPA avec un rendement 10 fois supérieur à celui de la littérature. Le greffage du 4-HO-OPA sur une matrice solide permettrait d'envisager une étape unique de purification d'échantillon et de dérivation des AB, en amont d'une séparation chromatographique.

D'un point de vue analytique, un essai inter-laboratoire pourrait être mené afin d'éprouver les capacités de détection du 4-MO-OPA par rapport à l'OPA dans des conditions expérimentales régies par la norme AOAC. Cette démarche permettrait de confirmer l'abaissement des limites de détection du 4-MO-OPA présenté dans le chapitre 3. De plus, la stabilité des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des complexes 4-MO-OPA/AB pourrait permettre un gain en précision de la méthode.

Concernant la synthèse de QD, des études devront être réalisées afin d'élucider la structure du QD obtenu par voie sonochimique et d'étudier ses propriétés photophysiques. En l'état actuel de nos connaissances, aucune trace dans la littérature scientifique ne fait référence de QD composés de cadmium et de sélénium (stabilisés par MSA) synthétisés par sonochimie à « basse température ». Ces résultats préliminaires sont donc à conforter

Des compléments d'études pourront être menés sur la jonction QD/4-HO-OPA à l'aide de l'anhydride acétylthiosuccinique décrit dans le chapitre 4. Après

---

s'être assuré de l'efficacité de la jonction, l'étude du système QD-OPA pourra être entreprise vis-à-vis de l'histamine dans un premier temps avant d'être élargie aux solutions complexes d'AB voire aux échantillons réels.

# Bibliographie

- [1] A. BRILLET, Sélection et caractérisation de souches de *Carnobacterium* pour la biopréservation du saumon fumé, Thèse de doctorat, Discipline : Biotechnologies Agroalimentaires, Sciences de l'Aliment, Spécialité : Microbiologie, Université de Nantes, 2005, 246 p.
- [2] J. KAROVICOVA, Z. KOHAJDOVA, Biogenic Amines in Food, *Chemical Paper* : 2005, 59, 70-79.
- [3] D. PURVES, *Neuroscience* : Troisième édition, Sinauer Associates Publishers, Sunderland (Etats-Unis), 2004, 832 p.
- [4] FRANCE PARKINSON, Comprendre le mécanisme de la maladie, 2018, <https://www.franceparkinson.fr/la-maladie/presentation-maladie-parkinson/comprendre-mecanisme/> (visité le 23/04/2019).
- [5] H. BÄHRE, V. KAEVER, "Analytical Methods for the Quantification of Histamine and Histamine Metabolites" Dans *Histamine and Histamine Receptors in Health and Disease* : Springer International Publishing, 2017, 3-19.
- [6] ANSES, Histamine, Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments, 2012, p. 1-3.
- [7] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS WORLD HEALTH ORGANIZATION, Public Health Risks of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products, Rome (Italie), 2012, p. 1-138.
- [8] M. BONNIN-JUSSERAND, Etude du métabolisme des amines biogènes chez les bactéries lactiques du vin, Thèse de doctorat, Discipline : Sciences de l'Alimentation, Université de Bourgogne, 2011, 194 p.
- [9] L. PRESTER, Biogenic Amines in Fish, Fish Products and Shellfish : A Review, *Food Additives & Contaminants : Part A* : 2011, 28, 1547-1560.
- [10] COMMISSION EUROPÉENNE, Règlement (CE) n° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires : Journal officiel de l'Union Européenne, édition 2019, Bruxelles, 2005, 26 p.
- [11] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, AOAC Official Method 954.04 - Histamine in Seafood - Biological Method, *Official Methods of Analysis of AOAC International* : 1954, AOAC, 1.

- [12] R. BATEMAN, D. ELDRIGE, S. WADE, J. MC COY-MESSER, E. JESTER, D. MOWDY, Copper Chelation Assay For Histamine in Tuna, *Journal of Food Science* : **1994**, *59*, 517-518.
- [13] S. PATANGE, M. MUKUNDAN, K. ASHOK KUMAR, A Simple and Rapid Method for Colorimetric Determination of Histamine in Fish Flesh, *Food Control* : **2005**, *16*, 465-472.
- [14] S. OGURI, A. MIZUSAWA, M. KAMADA, M. KOHORI, A New Method of Histamine Colorimetry Using 2,3-Naphthalenedicarboxaldehyde on a Silica-Gel Column Cartridge, *Analytica Chimica Acta* : **2006**, *558*, 326-331.
- [15] H. YU, D. ZHUANG, X. HU, S. ZHANG, Z. HE, M. ZENG, X. FANG, J. CHEN, X. CHEN, Rapid Determination of Histamine in Fish by Thin-Layer Chromatography-Image Analysis Method Using Diazotized Visualization Reagent Prepared with *p*-Nitroaniline, *Analytical Methods* : **2018**, *10*, 3386-3392.
- [16] A. ARULKUMAR, G. KARTHIK, S. PARAMASIVAM, M. A. RABIE, Histamine Levels in Indian Fish via Enzymatic, TLC and HPLC Methods during Storage, *Journal of Food Measurement and Characterization* : **2017**, *11*, 281-289.
- [17] D. E. SCHUTZ, G. W. CHANG, L. F. BJELDANES, Rapid Thin Layer Chromatographic Method for the Detection of Histamine in Fish Products, *Journal - Association of Official Analytical Chemists* : **1976**, *59*, 1224-1225.
- [18] J. S. LIN, J. D. BARANOWSKI, H. S. OLCOTT, Rapid Thin-Layer Chromatographic - Densitometric Determination of Histamine in Tuna, *Journal of Chromatography A* : **1977**, *130*, 426-430.
- [19] E. R. LIEBER, S. L. TAYLOR, Thin-Layer Chromatographic Screening Methods for Histamine in Tuna Fish, *Journal of Chromatography A* : **1978**, *153*, 143-152.
- [20] E. R. LIEBER, S. L. TAYLOR, Comparison of Thin-Layer Chromatographic Detection Methods for Histamine from Food Extracts, *Journal of Chromatography A* : **1978**, *160*, 227-237.
- [21] A. SHALABY, Multidetector, Semiquantitative Method for Determining Biogenic Amines in Foods, *Food Chemistry* : **1995**, *52*, 367-372.
- [22] R. JEYA SHAKILA, T. VASUNDHARA, K. KUMUDAVALLY, A Comparison of the TLC-Densitometry and HPLC Method for the Determination of Biogenic Amines in Fish and Fishery Products, *Food Chemistry* : **2001**, *75*, 255-259.
- [23] P. A. LERKE, M. N. PORCUNA, H. B. CHIN, Screening Test for Histamine in Fish, *Journal of Food Science* : **1983**, *48*, 155-157.

- [24] E. I. LÓPEZ-SABATER, J. J. RODRÍGUEZ-JEREZ, A. X. ROIG-SAGUES, M. T. MORA-VENTURA, Determination of Histamine in Fish Using an Enzymic Method, *Food Additives and Contaminants* : **1993**, *10*, 593-602.
- [25] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, AOAC Official Method 977.13 - Histamine in Seafood - Fluorometric Method, *Official Methods of Analysis of AOAC International* : **1977**, AOAC, 1-3.
- [26] B. BEN-GIGREY, C. CRAVEN, H. AN, Histamine Formation in Albacore Muscle Analyzed by AOAC and Enzymatic Methods, *Journal of Food Science* : **1998**, *63*, 210-214.
- [27] I. FRÉBORT, L. SKOUPÁ, P. PEČ, Amine Oxidase-Based Flow Biosensor for the Assessment of Fish Freshness, *Food Control* : **2000**, *11*, 13-18.
- [28] S. GONE, N. KOSA, J. KREBS, J. T. HUNGERFORD, M. W. TRUCKSESS, C. DEWITT, Validation Study of MaxSignal® Histamine Enzymatic Assay for the Detection of Histamine in Fish/Seafood, *Journal of AOAC International* : **2018**, *101*, 783-792.
- [29] J. HUNGERFORD, W.-H. WU, Comparison Study of Three Rapid Test Kits for Histamine in Fish : BiooScientific MaxSignal Enzymatic Assay, Neogen Veratox ELISA, and the Neogen Reveal Histamine Screening Test, *Food Control* : **2012**, *25*, 448-457.
- [30] D. SERRAR, R. BREBANT, S. BRUNEAU, G. A. DENOYEL, The Development of a Monoclonal Antibody-Based ELISA for the Determination of Histamine in Food Application to Fishery Products and Comparison with the HPLC Assay, *Food Chemistry* : **1995**, *54*, 85-91.
- [31] P. L. ROGERS, W. F. STARUSZKIEWICZ, Histamine Test Kit Comparison, *Journal of Aquatic Food Product Technology* : **2000**, *9*, 5-17.
- [32] A. MARCOBAL, M. POLO, P. MARTÍN-ÁLVAREZ, M. MORENO-ARRIBAS, Biogenic Amine Content of Red Spanish Wines : Comparison of a Direct ELISA and an HPLC Method for the Determination of Histamine in Wines, *Food Research International* : **2005**, *38*, 387-394.
- [33] M. CLAEYS-BRUNO, O. VANDENABEELE-TRAMBOUZE, M. SERGENT, M. GEFARD, D. BODET, M. DOBRIJEVIC, A. COMMEYRAS, R. PHAN TAN LUU, Methodological Approaches for Histamine Quantification Using Derivatization by Chloroethylnitrosourea and ELISA Measurement : Part I. Optimization of Derivated Histamine Detection with Coated-Plates Using Optimal Design, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* : **2006**, *80*, 176-185.

- [34] J. M. HUNGERFORD, T. A. HOLLINGWORTH, M. M. WEKELL, Automated Kinetics-Enhanced Flow-Injection Method for Histamine in Regulatory Laboratories : Rapid Screening and Suitability Requirements, *Analytica Chimica Acta* : **2001**, 438, 123-129.
- [35] W.-X. DU, T.-s. HUANG, J. KIM, M. R. MARSHALL, C.-i. WEI, Chemical, Microbiological, and AromaScan Evaluation of Mahi-Mahi Fillets under Various Storage Conditions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* : **2001**, 49, 527-534.
- [36] L. HE, Z. XU, T. HIROKAWA, L. SHEN, Simultaneous Determination of Aliphatic, Aromatic and Heterocyclic Biogenic Amines without Derivatization by Capillary Electrophoresis and Application in Beer Analysis, *Journal of Chromatography A* : **2016**, 109-114.
- [37] B. SANTOS, B. M. SIMONET, A. RÍOS, M. VALCÁRCEL, Direct Automatic Determination of Biogenic Amines in Wine by Flow Injection-Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry, *Electrophoresis* : **2004**, 25, 3427-3433.
- [38] L. ZHANG, X. TANG, M. SUN, Simultaneous Determination of Histamine and Polyamines by Capillary Zone Electrophoresis with 4-Fluor-7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazole Derivatization and Fluorescence Detection, *Journal of Chromatography B* : **2005**, 820, 211-219.
- [39] G. NOUADJE, N. SIMÉON, F. DEDIEU, M. NERTZ, P. PUIG, F. COUDERC, Determination of Twenty Eight Biogenic Amines and Amino Acids during Wine Aging by Micellar Electrokinetic Chromatography and Laser-Induced Fluorescence Detection, *Journal of Chromatography A* : **1997**, 765, 337-343.
- [40] S. OGURI, Y. OKUYA, Y. YANASE, S. SUZUKI, Post-Column Derivatization Capillary Electrochromatography for Detection of Biogenic Amines in Tuna-Meat, *Journal of Chromatography A* : **2008**, 1202, 96-101.
- [41] K. BJORNSDOTTIR-BUTLER, F. A. BENCSATH, R. A. BENNER, Jr, Modification and Single-Laboratory Validation of AOAC Official Method 977.13 for Histamine in Seafood to Improve Sample Throughput, *Journal of AOAC International* : **2015**, 98, 622-627.
- [42] Z. DAI, Z. WU, S. JIA, G. WU, Analysis of Amino Acid Composition in Proteins of Animal Tissues and Foods as Pre-Column o-Phthaldialdehyde Derivatives by HPLC with Fluorescence Detection, *Journal of Chromatography B* : **2014**, 964, 116-127.

- [43] B. M. FONSECA, A. C. CRISTÓVÃO, G. ALVES, An Easy-to-Use Liquid Chromatography Method with Fluorescence Detection for the Simultaneous Determination of Five Neuroactive Amino Acids in Different Regions of Rat Brain, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* : **2018**, *91*, 72-79.
- [44] M. GHANDFOROUSH-SATTARI, S. MASHAYEKHI, A Rapid Determination of Histamine and 3-Methylhistamine in Human Plasma by High Performance Liquid Chromatography, *Toxicological & Environmental Chemistry* : **2008**, *90*, 787-793.
- [45] D. A. LARIONOVA, S. N. SHYKOV, N. V. BELOGLAZOVA, E. N. KOROLEVA, Effect of Nucleophilic Agents and Organized Media on the Fluorimetric Determination of Histamine with O-Phthalic Aldehyde, *Journal of Analytical Chemistry* : **2008**, *63*, 1044-1050.
- [46] M. PALOMINO-VASCO, M. I. ACEDO-VALENZUELA, M. I. RODRÍGUEZ-CÁCERES, N. MORA-DIEZ, Automated Chromatographic Method with Fluorescent Detection to Determine Biogenic Amines and Amino Acids. Application to Craft Beer Brewing Process, *Journal of Chromatography A* : **2019**, S0021967319304480.
- [47] Y. MENGERINK, D. KUTLÁN, F. TÓTH, A. CSÁMPAI, I. MOLNÁR-PERL, Advances in the Evaluation of the Stability and Characteristics of the Amino Acid and Amine Derivatives Obtained with the O-Phthaldialdehyde 3-Mercaptopropionic Acid and o-Phthaldialdehyde N-Acetyl-L-Cysteine Reagents, *Journal of Chromatography A* : **2002**, *949*, 99-124.
- [48] W. F. STARUSZKIEWICZ, J. F. BOND, Gas Chromatographic Determination of Cadaverine, Putrescine, and Histamine in Foods, *Journal - Association of Official Analytical Chemists* : **1981**, *64*, 584-591.
- [49] B.-S. HWANG, J.-T. WANG, Y.-M. CHOONG, A Rapid Gas Chromatographic Method for the Determination of Histamine in Fish and Fish Products, *Food Chemistry* : **2003**, *82*, 329-334.
- [50] M. PAPAGEORGIOU, D. LAMBROPOULOU, C. MORRISON, E. KŁODZIŃSKA, J. NAMIEŚNIK, J. PŁOTKA-WASYLKA, Literature Update of Analytical Methods for Biogenic Amines Determination in Food and Beverages, *Trends in Analytical Chemistry* : **2018**, *98*, 128-142.
- [51] K. R. KIM, M. J. PAIK, J. H. KIM, S. W. DONG, D. H. JEONG, Rapid Gas Chromatographic Profiling and Screening of Biologically Active Amines, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* : **1997**, *15*, 1309-1318.

- [52] J. HUANG, N. GAN, F. LV, Y. CAO, C. OU, H. TANG, Environmentally Friendly Solid-Phase Microextraction Coupled with Gas Chromatography and Mass Spectrometry for the Determination of Biogenic Amines in Fish Samples, *Journal of Separation Science* : **2016**, 39, 4384-4390.
- [53] B. JINADASA, G. JAYASINGHE, S. AHMAD, F. MARINI, Validation of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method for Quantitative Analysis of Histamine in Fish and Fishery Products, *Cogent Chemistry* : **2016**, 1-8.
- [54] Y. MURAKAMI, N. NAKAI, N. ANDO, A. OKAYAMA, Determination of Histamine by a Rapid Fluorescamine-UPLC Method, *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* : **2018**, 59, 121-125.
- [55] A. HERRERO, S. SANLLORENTE, C. REGUERA, M. ORTIZ, L. SARABIA, A New Multiresponse Optimization Approach in Combination with a D-Optimal Experimental Design for the Determination of Biogenic Amines in Fish by HPLC-FLD, *Analytica Chimica Acta* : **2016**, 31-38.
- [56] A. JASTRZĘBSKA, M. KURZAWA, A. PIASTA, E. SZŁYK, Determination of Histamine in Some Foods by Isotachophoretic Method with Simple Sample Preparation, *Food Analytical Methods* : **2012**, 5, 1079-1087.
- [57] A. KAUFMANN, K. MADEN, Easy and Fast Method for the Determination of Biogenic Amines in Fish and Fish Products with Liquid Chromatography Coupled to Orbitrap Tandem Mass Spectrometry, *Journal of AOAC International* : **2018**, 101, 336-341.
- [58] COMMISSION EUROPÉENNE, Programmes communautaires de recherche et de coordination (CEE) du secteur de la pêche, **1988-1992**, [https://www.cordis.europa.eu/programme/rcn/94\\_en.html](https://www.cordis.europa.eu/programme/rcn/94_en.html) (visité le 23/04/2019).
- [59] COMMISSION EUROPÉENNE, Biogenic Amines in Fishery Products, **1990-1992**, [https://www.cordis.europa.eu/project/rcn/16828\\_en.html](https://www.cordis.europa.eu/project/rcn/16828_en.html) (visité le 23/04/2019).
- [60] P. R. BELJAARS, R. VAN DIJK, K. M. JONKER, L. J. SCHOUT, Liquid Chromatographic Determination of Histamine in Fish, Sauerkraut, and Wine : Interlaboratory Study, *Journal of AOAC International* : **1998**, 81, 991-998.
- [61] ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION, *ISO 19343-2017 Microbiologie de la chaîne alimentaire — Détection et quantification de l’histamine dans le poisson et les produits de la pêche — Méthode CLHP* : **2017**, 14 p.
- [62] P. MALLE, M. VALLÉ, S. BOUQUELET, Assay of Biogenic Amines Involved in Fish Decomposition, *Journal of AOAC International* : **1996**, 79, 43-49.

- [63] G. DUFLOS, C. DERVIN, P. MALLE, S. BOUQUELET, Relevance of Matrix Effect in Determination of Biogenic Amines in Plaice (*Pleuronectes Platessa*) and Whiting (*Merlangus Merlangus*), *Journal of AOAC International* : **1999**, 82, 1097-1101.
- [64] S. SENTELLAS, Ó. NÚÑEZ, J. SAURINA, Recent Advances in the Determination of Biogenic Amines in Food Samples by (U)HPLC, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* : **2016**, 64, 7667-7678.
- [65] W. A. JACOBS, O-Phthalaldehyde-Sulfite Derivatization of Primary Amines for Liquid Chromatography-Electrochemistry, *Journal of Chromatography A* : **1987**, 392, 435-441.
- [66] P. ZUMAN, Reactions of Orthophthalaldehyde with Nucleophiles, *Chemical Reviews* : **2004**, 104, 3217-3238.
- [67] I. KATSUJISA, Crystalline Hydrate of Ortho-Phthalaldehyde, Disinfecting Agent and Biocide Containing Same, and Method for Manufacturing Ortho-Phthalaldehyde, Brevet WO2012147865 A1, **2012**, 20p.
- [68] P. ZHU, C. ROBERTS, M. FAVERO, Solvent or Matrix-Mediated Molecular Switches, the Lipophilic Dialdehyde (OPA) and the Amphiphilic 1,3-Phthalandiol and OPA Disinfection Mechanism, *Current Organic Chemistry* : **2005**, 9, 1155-1166.
- [69] P. C. ZHU, D.-H. WANG, K. LU, N. MANI, An Efficient Synthesis of Substituted Benzene-1,2-Dicarboxaldehydes, *Science in China Series B : Chemistry* : **2007**, 50, 249-252.
- [70] P. ZHU, K. LU, D.-H. WANG, Preparation of Phthalaldehydes by Hydrolysis of Aromatic Gem -Tetrabromides, *New Biocides Development* : **2007**, 967, 152-159.
- [71] W. BOVER, M. S. BAYMAK, L. CAMAIONE, P. ZUMAN, Difference in the Electrochemical Behavior of Three Isomeric Phthalaldehydes, *Electrochemistry Communications* : **2003**, 5, 334-336.
- [72] A. M. KHAN, G. R. PROCTOR, L. REES, Novel Aromatic Systems. Part IV. Synthesis and Dehydrogenation of 4-Hydroxy-1,2-Benzocycloheptatrienes, *Journal of the Chemical Society C : Organic* : **1966**, 0, 990-994.
- [73] Y. LIANG, Y. PAN, Q. GUO, H. HU, C. WU, Q. ZHANG, A Novel Analytical Method for Trace Ammonium in Freshwater and Seawater Using 4-Methoxyphthalaldehyde as Fluorescent Reagent, *Journal of Analytical Methods in Chemistry* : **2015**, 2015, 1-7.

- [74] E. C. TAYLOR, P. ZHOU, L. D. JENNINGS, Z. MAO, B. HU, J.-G. JUN, Novel Synthesis of a Conformationally-Constrained Analog of DDATHF, *Tetrahedron Letters* : **1997**, 38, 521-524.
- [75] E. C. TAYLOR, L. D. JENNINGS, Z. MAO, B. HU, J.-G. JUN, P. ZHOU, Synthesis of Conformationally-Constrained Glutamate Analogues of the Antitumor Agents DDATHF, LY254155, and LY231514, *Journal of Organic Chemistry* : **1997**, 62, 5392-5403.
- [76] L. CAO, L. ISAACS, Daisy Chain Assembly Formed from a Cucurbit[6]Uril Derivative, *Organic Letters* : **2012**, 14, 3072-3075.
- [77] K. RIDEOUT, K. TESCHKE, H. DIMICH-WARD, S. KENNEDY, Considering Risks to Healthcare Workers from Glutaraldehyde Alternatives in High-Level Disinfection, *Journal of Hospital Infection* : **2005**, 59, 4-11.
- [78] E. KULLA, P. ZUMAN, Reactions of Orthophthalaldehyde with Ammonia and 2-Aminoethanol, *Organic & Biomolecular Chemistry* : **2008**, 6, 3771-3780.
- [79] M. NAKAO, N. NISHIKIORI, A. NAKAMURA, M. MIYAGI, N. SHIBATA, S. KITAIKE, M. FUKUI, H.-O. ITO, S. SANO, Synthesis of Sterically Protected Isoindoles from Ortho-Phthalaldehyde, *SynOpen* : **2018**, 2, 50-57.
- [80] R. A. AITKEN, C. HAUDUC, R. S. MCLENNAN, A. M. SLAWIN, H. S. WILSON, Novel Ether and Thioether Macrocycles from Phthalaldehyde, *Tetrahedron Letters* : **2015**, 56, 1937-1940.
- [81] F. WANG, C. E. DIESENDRUCK, Polyphthalaldehyde : Synthesis, Derivatives, and Applications, *Macromolecular Rapid Communications* : **2018**, 39, 1-21.
- [82] A. RÖNNBERG, C. HANSSON, T. DRAKENBERG, R. HÅKANSON, Reaction of Histamine with O-Phthalaldehyde : Isolation and Analysis of the Fluorophore, *Analytical Biochemistry* : **1984**, 139, 329-337.
- [83] T. YOSHIMURA, T. KANEUCHI, T. MIURA, M. KIMURA, Kinetic Analysis of the Fluorescence Reaction of Histamine with Orthophthalaldehyde, *Analytical Biochemistry* : **1987**, 164, 132-137.
- [84] H. LI, W. Y. SHIH, W.-H. SHIH, Synthesis and Characterization of Aqueous Carboxyl-Capped CdS Quantum Dots for Bioapplications, *Industrial & Engineering Chemistry Research* : **2007**, 46, 2013-2019.
- [85] ANTIPOFF, *Quantum Dots with Gradually Stepping Emission from Violet to Deep Red* © Antipoff / Wikimedia Commons, CC-by-3.0 : **2012**.
- [86] U. RESCH-GENGER, M. GRABOLLE, S. CAVALIERE-JARICOT, R. NITSCHKE, T. NANN, Quantum Dots versus Organic Dyes as Fluorescent Labels, *Nature Methods* : **2008**, 5, 763-775.

- [87] Y.-W. LIN, M.-M. HSIEH, C.-P. LIU, H.-T. CHANG, Photoassisted Synthesis of CdSe and Core–Shell CdSe/CdS Quantum Dots, *Langmuir* : **2005**, *21*, 728-734.
- [88] R. XIE, X. ZHONG, T. BASCHÉ, Synthesis, Characterization, and Spectroscopy of Type-II Core/Shell Semiconductor Nanocrystals with ZnTe Cores, *Advanced Materials* : **2005**, *17*, 2741-2745.
- [89] B. O. DABBOUSI, J. RODRIGUEZ-VIEJO, F. V. MIKULEC, J. R. HEINE, H. MATTOUSSI, R. OBER, K. F. JENSEN, M. G. BAWENDI, (CdSe)ZnS Core–Shell Quantum Dots : Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites, *Journal of Physical Chemistry B* : **1997**, *101*, 9463-9475.
- [90] P. REISS, M. PROTIÈRE, L. LI, Core/Shell Semiconductor Nanocrystals, *Small* : **2009**, *5*, 154-168.
- [91] D. BATTAGLIA, J. J. LI, Y. WANG, X. PENG, Colloidal Two-Dimensional Systems : CdSe Quantum Shells and Wells, *Angewandte Chemie International Edition* : **2003**, *42*, 5035-5039.
- [92] E. PIC, L. BEZDETNAYA, F. GUILLEMIN, F. MARCHAL, Quantification Techniques and Biodistribution of Semiconductor Quantum Dots, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* : **2009**, *9*, 295-303.
- [93] T. JAMIESON, R. BAKHSHI, D. PETROVA, R. POCOCK, M. IMANI, A. M. SEIFALI, Biological Applications of Quantum Dots, *Biomaterials* : **2007**, *28*, 4717-4732.
- [94] AFSSET, Les Nanomatériaux - Evaluation Des Risques Liés Aux Nanomatériaux Pour La Population Générale et Pour L'environnement, Rapport d'expertise collective, **2010**, p. 223.
- [95] L. 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* : **1984**, *80*, 4403-4409.
- [96] L. BRUS, Electronic Wave Functions in Semiconductor Clusters : Experiment and Theory, *The Journal of Physical Chemistry* : **1986**, *90*, 2555-2560.
- [97] V. BIJU, T. ITOH, A. ANAS, A. SUJITH, M. ISHIKAWA, Semiconductor Quantum Dots and Metal Nanoparticles : Syntheses, Optical Properties, and Biological Applications, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* : **2008**, *391*, 2469-2495.

- [98] Q. ZHAO, P. A. GRAF, W. B. JONES, A. FRANCESCHETTI, J. LI, WANG, K. KIM, Shape Dependence of Band-Edge Exciton Fine Structure in CdSe Nanocrystals, *Nano Letters* : **2007**, 7, 3274-3280.
- [99] W. C. CHAN, S. NIE, Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonspecific Detection, *Science* : **1998**, 281, 2016-2018.
- [100] M. BRUCHEZ JR., M. MORONNE, P. GIN, S. WEISS, A. P. ALIVISATOS, Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels, *Science* : **1998**, 281, 2013-2016.
- [101] A. M. SMITH, X. GAO, S. NIE, Quantum Dot Nanocrystals for In Vivo Molecular and Cellular Imaging, *Photochemistry and Photobiology* : **2004**, 80, 377-385.
- [102] J. HU, L.-S. LI, W. YANG, L. MANNA, L.-W. WANG, A. P. ALIVISATOS, Linearly Polarized Emission from Colloidal Semiconductor Quantum Rods, *Science* : **2001**, 292, 2060-2063.
- [103] S. A. EMPEDOCLES, R. NEUHAUSER, M. G. BAWENDI, Three-Dimensional Orientation Measurements of Symmetric Single Chromophores Using Polarization Microscopy, *Nature* : **1999**, 399, 126-130.
- [104] A. FU, W. GU, C. LARABELL, A. P. ALIVISATOS, Semiconductor Nanocrystals for Biological Imaging, *Current Opinion in Neurobiology* : **2005**, 15, 568-575.
- [105] P. SPINICELLI, S. BUIL, X. QUÉLIN, B. MAHLER, B. DUBERTRET, J.-P. HERMIER, Bright and Grey States in CdSe-CdS Nanocrystals Exhibiting Strongly Reduced Blinking, *Physical Review Letters* : **2009**, 102, 1-4.
- [106] A. T. R. WILLIAMS, S. A. WINFIELD, J. N. MILLER, Relative Fluorescence Quantum Yields Using a Computer-Controlled Luminescence Spectrometer, *Analyst* : **1983**, 108, 1067-1071.
- [107] M. W. ALLEN, Measurement of Fluorescence Quantum Yields, Thermo Fisher Scientific, **2010**, p. 1-4.
- [108] Z. WANG, J. XIA, C. ZHOU, B. VIA, Y. XIA, F. ZHANG, Y. LI, L. XIA, J. TANG, Synthesis of Strongly Green-Photoluminescent Graphene Quantum Dots for Drug Carrier, *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* : **2013**, 112, 192-196.
- [109] P. R. KHARANGARH, S. UMAPATHY, G. SINGH, Effect of Defects on Quantum Yield in Blue Emitting Photoluminescent Nitrogen Doped Graphene Quantum Dots, *Journal of Applied Physics* : **2017**, 122, 1-5.

- [110] C. B. MURRAY, C. R. KAGAN, M. G. BAWENDI, Synthesis and Characterization of Monodisperse Nanocrystals and Close-Packed Nanocrystal Assemblies, *Annual Review of Materials Science* : **2000**, *30*, 545-610.
- [111] L. QU, Z. A. PENG, X. PENG, Alternative Routes toward High Quality CdSe Nanocrystals, *Nano Letters* : **2001**, *1*, 333-337.
- [112] C. B. MURRAY, D. J. NORRIS, M. G. BAWENDI, Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E = Sulfur, Selenium, Tellurium) Semiconductor Nanocrystallites, *Journal of the American Chemical Society* : **1993**, *115*, 8706-8715.
- [113] O. I. MICIC, C. J. CURTIS, K. M. JONES, J. R. SPRAGUE, A. J. NOZIK, Synthesis and Characterization of InP Quantum Dots, *The Journal of Physical Chemistry* : **1994**, *98*, 4966-4969.
- [114] B. L. WEHRENBURG, C. WANG, P. GUYOT-SIONNEST, Interband and Intraband Optical Studies of PbSe Colloidal Quantum Dots, *The Journal of Physical Chemistry B* : **2002**, *106*, 10634-10640.
- [115] D. V. TALAPIN, A. L. ROGACH, A. KORNOWSKI, M. HAASE, H. WELLER, Highly Luminescent Monodisperse CdSe and CdSe/ZnS Nanocrystals Synthesized in a Hexadecylamine–Trioctylphosphine Oxide–Trioctylphosphine Mixture, *Nano Letters* : **2001**, *1*, 207-211.
- [116] L. QU, X. PENG, Control of Photoluminescence Properties of CdSe Nanocrystals in Growth, *Journal of the American Chemical Society* : **2002**, *124*, 2049-2055.
- [117] H. AYDIN, M. R. KARIM, M. BALABAN, H. UNLU, Colloidal Synthesis And Characterization Of Cdse Quantum Dots : Role Of Cd : Se Molar Ratio And Temperature, *International journal of scientific & technology research* : **2016**, *5*, 66-70.
- [118] X. PENG, Mechanisms for the Shape-Control and Shape-Evolution of Colloidal Semiconductor Nanocrystals, *Advanced Materials* : **2003**, *15*, 459-463.
- [119] Z. H. SUN, H. OYANAGI, H. NAKAMURA, Y. JIANG, L. ZHANG, M. UEHARA, K. YAMASHITA, A. FUKANO, H. MAEDA, Ligand Effects of Amine on the Initial Nucleation and Growth Processes of CdSe Nanocrystals, *The Journal of Physical Chemistry C* : **2010**, *114*, 10126-10131.
- [120] L. WANG, X. SUN, W. LIU, X. YU, Phosphine-Free Synthesis of High Quality Zinc-Blende CdSe Nanocrystals in Air, *Colloids and Surfaces A : Physico-chemical and Engineering Aspects* : **2010**, *353*, 232-237.

- [121] N. LIU, P. YANG, Hydrothermal Synthesis of High-Quality Type-II CdTe/CdSe Core/Shell Quantum Dots with Dark Red Emission, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* : **2014**, *14*, 5817-5823.
- [122] Y. HE, L.-M. SAI, H.-T. LU, M. HU, W.-Y. LAI, Q.-L. FAN, L.-H. WANG, W. HUANG, Microwave-Assisted Synthesis of Water-Dispersed CdTe Nanocrystals with High Luminescent Efficiency and Narrow Size Distribution, *Chemistry of Materials* : **2007**, *19*, 359-365.
- [123] A. L. ROGACH, Nanocrystalline CdTe and CdTe(S) Particles : Wet Chemical Preparation, Size-Dependent Optical Properties and Perspectives of Optoelectronic Applications, *Materials Science and Engineering : B* : **2000**, *69-70*, 435-440.
- [124] F. ALDEEK, C. MUSTIN, L. BALAN, G. MEDJAHDI, T. ROQUES-CARMES, P. ARNOUX, R. SCHNEIDER, Enhanced Photostability from CdSe(S)/ZnO Core/Shell Quantum Dots and Their Use in Biolabeling, *European Journal of Inorganic Chemistry* : **2011**, *2011*, 794-801.
- [125] R. E. BAILEY, S. NIE, Alloyed Semiconductor Quantum Dots : Tuning the Optical Properties without Changing the Particle Size, *Journal of the American Chemical Society* : **2003**, *125*, 7100-7106.
- [126] M. J. MURCIA, D. L. SHAW, H. WOODRUFF, C. A. NAUMANN, B. A. YOUNG, E. C. LONG, Facile Sonochemical Synthesis of Highly Luminescent ZnS-Shelled CdSe Quantum Dots, *Chemistry of Materials* : **2006**, *18*, 2219-2225.
- [127] Y. T. DIDENKO, K. S. SUSLICK, Chemical Aerosol Flow Synthesis of Semiconductor Nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society* : **2005**, *127*, 12196-12197.
- [128] J. H. BANG, W. H. SUH, K. S. SUSLICK, Quantum Dots from Chemical Aerosol Flow Synthesis : Preparation, Characterization, and Cellular Imaging, *Chemistry of Materials* : **2008**, *20*, 4033-4038.
- [129] J.-P. GE, Y.-D. LI, G.-Q. YANG, Mechanism of Aqueous Ultrasonic Reaction : Controlled Synthesis, Luminescence Properties of Amorphous Cluster and Nanocrystalline CdSe, *Chemical Communications* : **2002**, 1826-1827.
- [130] F. ALDEEK, L. BALAN, J. LAMBERT, R. SCHNEIDER, The Influence of Capping Thioalkyl Acid on the Growth and Photoluminescence Efficiency of CdTe and CdSe Quantum Dots, *Nanotechnology* : **2008**, *19*, 1-9.
- [131] R. KUANG, X. KUANG, S. PAN, X. ZHENG, J. DUAN, Y. DUAN, Synthesis of Cysteamine-Coated CdTe Quantum Dots for the Detection of Bisphenol A, *Microchimica Acta* : **2010**, *169*, 109-115.

- [132] S. MOENO, T. NYOKONG, The Photophysical Studies of a Mixture of CdTe Quantum Dots and Negatively Charged Zinc Phthalocyanines, *Polyhedron* : **2008**, *27*, 1953-1958.
- [133] W. J. PARAK, D. GERION, T. PELLEGRINO, D. ZANCHET, C. MICHEEL, S. C. WILLIAMS, R. BOUDREAU, M. A. L. GROS, C. A. LARABELL, A. P. ALIVISATOS, Biological Applications of Colloidal Nanocrystals, *Nanotechnology* : **2003**, *14*, 15-27.
- [134] K.-i. HANAKI, A. MOMO, T. OKU, A. KOMOTO, S. MAENOSONO, Y. YAMAGUCHI, K. YAMAMOTO, Semiconductor Quantum Dot/Albumin Complex Is a Long-Life and Highly Photostable Endosome Marker, *Biochemical and Biophysical Research Communications* : **2003**, *302*, 496-501.
- [135] J. ALDANA, Y. A. WANG, X. PENG, Photochemical Instability of CdSe Nanocrystals Coated by Hydrophilic Thiols, *Journal of the American Chemical Society* : **2001**, *123*, 8844-8850.
- [136] H. MATTOUSSI, J. M. MAURO, E. R. GOLDMAN, G. P. ANDERSON, V. C. SUNDAR, F. V. MIKULEC, M. G. BAWENDI, Self-Assembly of CdSe-ZnS Quantum Dot Bioconjugates Using an Engineered Recombinant Protein, *Journal of the American Chemical Society* : **2000**, *122*, 12142-12150.
- [137] X. GAO, Y. CUI, R. M. LEVENSON, L. W. K. CHUNG, S. NIE, In Vivo Cancer Targeting and Imaging with Semiconductor Quantum Dots, *Nature Biotechnology* : **2004**, *22*, 969-976.
- [138] D. GERION, F. PINAUD, S. C. WILLIAMS, W. J. PARAK, D. ZANCHET, S. WEISS, A. P. ALIVISATOS, Synthesis and Properties of Biocompatible Water-Soluble Silica-Coated CdSe/ZnS Semiconductor Quantum Dots, *The Journal of Physical Chemistry B* : **2001**, *105*, 8861-8871.
- [139] B. MAHLER, Synthèse et caractérisation de nanocristaux colloïdaux de semiconducteurs II-VI à structure coeur/coque. Contrôle de la cristallinité et des propriétés d'émission. Thèse de doctorat, Discipline : Physico-Chimie des Matériaux, Université Pierre et Marie Curie, **2009**, 186 p.
- [140] M. A. HINES, P. GUYOT-SIONNEST, Synthesis and Characterization of Strongly Luminescing ZnS-Capped CdSe Nanocrystals, *The Journal of Physical Chemistry* : **1996**, *100*, 468-471.
- [141] J. J. LI, Y. A. WANG, W. GUO, J. C. KEAY, T. D. MISHIMA, M. B. JOHNSON, X. 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* : **2003**, *125*, 12567-12575.

- [142] A. M. SMITH, H. DUAN, M. N. RHYNER, G. RUAN, S. NIE, A Systematic Examination of Surface Coatings on the Optical and Chemical Properties of Semiconductor Quantum Dots, *Physical Chemistry Chemical Physics* : **2006**, *8*, 3895-3903.
- [143] X. ZHOU, Z. CHEN, P. HUANG, X. WANG, A. KASUYA, Preparation and Stability of Strongly Luminescent CdSe/Cd(OH)<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> Nanocomposite Particles in Aqueous Solution, *Colloid Journal* : **2008**, *70*, 734-739.
- [144] Y.-H. KIM, E. SUBRAMANYAM, J. H. IM, K. M. HUH, H. CHOI, J. S. CHOI, Y.-K. LEE, S.-W. PARK, A New PEG-Lipid Conjugate Micelle for Encapsulation of CdSe/ZnS Quantum Dots, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* : **2010**, *10*, 3275-3279.
- [145] W. J. M. MULDER, R. KOOLE, R. J. BRANDWIJK, G. STORM, P. T. K. CHIN, G. J. STRIJKERS, C. de MELLO DONEGÁ, K. NICOLAY, A. W. GRIFFIOEN, Quantum Dots with a Paramagnetic Coating as a Bimodal Molecular Imaging Probe, *Nano Letters* : **2006**, *6*, 1-6.
- [146] A. R. CLAPP, E. R. GOLDMAN, H. MATTOUSSI, Capping of CdSe-ZnS Quantum Dots with DHLA and Subsequent Conjugation with Proteins, *Nature Protocols* : **2006**, *1*, 1258-1266.
- [147] Q. SHANG, H. WANG, H. YU, G. SHAN, R. YAN, Effect of Phenylalanine on Photoluminescence and Stability of CdTe Nanocrystals Capped with Thioglycolic Acid, *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* : **2007**, *294*, 86-91.
- [148] W. W. YU, L. QU, W. GUO, X. PENG, Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals, *Chemistry of Materials* : **2003**, *15*, 2854-2860.
- [149] Y. LIN, Y. ZHANG, J. ZHAO, P. GU, K. BI, Q. ZHANG, H. CHU, T. ZHANG, T. CUI, Y. WANG, J. ZHAO, W. W. YU, White-Light-Emitting Diodes Using GaN-Excited CdSe/CdS/ZnS Quantum Dots, *Particuology* : **2014**, *15*, 90-93.
- [150] C. ROH, H.-Y. LEE, S.-E. KIM, S.-K. JO, Quantum-Dots-Based Detection of Hepatitis C Virus (HCV) NS3 Using RNA Aptamer on Chip, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* : **2010**, *85*, 1130-1134.
- [151] C. P. PARUNGO, D. I. SOYBEL, Y. L. COLSON, S.-W. KIM, S. OHNISHI, A. M. DE GRAND, R. G. LAURENCE, E. G. SOLTESZ, F. Y. CHEN, L. H. COHN, M. G. BAWENDI, J. V. FRANGIONI, Lymphatic Drainage of the Peritoneal Space : A Pattern Dependent on Bowel Lymphatics, *Annals of Surgical Oncology* : **2007**, *14*, 286-298.

- [152] M. E. AKERMAN, W. C. W. CHAN, P. LAAKKONEN, S. N. BHATIA, E. RUOSLAHTI, Nanocrystal Targeting in Vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* : **2002**, 99, 12617-12621.
- [153] Q.-H. WANG, G.-Z. FANG, Y.-Y. LIU, D.-D. ZHANG, J.-M. LIU, S. WANG, Fluorescent Sensing Probe for the Sensitive Detection of Histamine Based on Molecular Imprinting Ionic Liquid-Modified Quantum Dots, *Food Analytical Methods* : **2017**, 10, 2585-2592.
- [154] S. KHAN, L. S. CARNEIRO, M. S. VIANNA, E. C. ROMANI, R. Q. AUCELIO, Determination of Histamine in Tuna Fish by Photoluminescence Sensing Using Thioglycolic Acid Modified CdTe Quantum Dots and Cationic Solid Phase Extraction, *Journal of Luminescence* : **2017**, 182, 71-78.
- [155] J. C. BILL, D. S. TARBELL, Ortho-Phthalaldehyde : Phthalaldehyde, *Organic Syntheses* : **1963**, 4, 807-812.
- [156] A. K. SINGH, P. K. KHADE, 7-Methoxy-3-Nitro-2-Naphthalenemethanol—a New Phototrigger for Caging Applications, *Tetrahedron Letters* : **2011**, 52, 4899-4902.
- [157] B. MARTÍN-MATUTE, C. NEVADO, D. J. CÁRDENAS, A. M. ECHAVARREN, Intramolecular Reactions of Alkynes with Furans and Electron Rich Arenes Catalyzed by PtCl<sub>2</sub> : The Role of Platinum Carbenes as Intermediates, *Journal of the American Chemical Society* : **2003**, 125, 5757-5766.
- [158] K. HAYAKAWA, Y. YAMAGUCHI, K. KANEMATSU, Novel Ring Transfer Reaction of Furans via Intramolecular Diels-Alder Reaction of Allene Intermediate : A New Double Annulation Reaction, *Tetrahedron Letters* : **1985**, 26, 2689-2692.
- [159] E. WENKERT, H. KHATUYA, An Unusual Synthesis of Phthalaldehyde, *Synthetic Communications* : **1999**, 29, 2413-2417.
- [160] J. JACQ, Synthèse et Propriétés de Nouveaux N-Hydroxyimides Polyaromatiques, Thèse de doctorat, Discipline : Chimie organique, Université Joseph Fournier - Grenoble I, **2009**, 255 p.
- [161] Q. WENG, F. XIA, W. JIN, Determination of Histamine by Capillary Zone Electrophoresis with End-Column Amperometric Detection at a Carbon Fiber Microdisk Array Electrode, *Electroanalysis* : **2001**, 13, 1459-1461.
- [162] X. GUO, H. ZIPSE, H. MAYR, Mechanisms of Hydride Abstractions by Quinones, *Journal of the American Chemical Society* : **2014**, 136, 13863-13873.

- [163] E. LEE-RUFF, F. J. ABLENAS, Oxidation of Allyl and Benzyl Ethers by 2,3-Dichloro-5,6-Dicyanobenzoquinone (DDQ), *Canadian Journal of Chemistry* : **1989**, *67*, 699-702.
- [164] P.-E. DANJOU, G. DE LEENER, D. CORNUT, S. MOERKERKE, S. MAMERI, A. LASCAUX, J. WOUTERS, A. BRUGNARA, B. COLASSON, O. REINAUD, I. JABIN, Supramolecular Assistance for the Selective Demethylation of Calixarene-Based Receptors, *The Journal of Organic Chemistry* : **2015**, *80*, 5084-5091.
- [165] Z. FANG, G.-C. ZHOU, S.-L. ZHENG, G.-L. HE, J.-L. LI, L. HE, D. BEI, Lithium Chloride-Catalyzed Selective Demethylation of Aryl Methyl Ethers under Microwave Irradiation, *Journal of Molecular Catalysis A : Chemical* : **2007**, *274*, 16-23.
- [166] K. B. BORISENKO, K. ZAUER, I. HARGITAI, Intramolecular Hydrogen Bonding and Molecular Structure of 2,5-Dihydroxyterephthalaldehyde and 4,6-Dihydroxyisophthalaldehyde : A Gas-Phase Electron Diffraction and Ab Initio Molecular Orbital Study, *The Journal of Physical Chemistry* : **1996**, *100*, 19303-19309.
- [167] S. K. BOOVANAHALLI, D. W. KIM, D. Y. CHI, Application of Ionic Liquid Halide Nucleophilicity for the Cleavage of Ethers : A Green Protocol for the Regeneration of Phenols from Ethers, *The Journal of Organic Chemistry* : **2004**, *69*, 3340-3344.
- [168] C. MOITESSIER, A. RIFAI, P.-E. DANJOU, I. MALLARD, F. CAZIER-DENNIN, Efficient Synthesis of 4-Substituted-Ortho-Phthalaldehyde Analogues : Toward the Emergence of New Building Blocks, *Beilstein Journal of Organic Chemistry* : **2019**, *15*, 721-726.
- [169] A. STEINMANN, Substituted O-Phthalaldehydes, Brevet 4 820 829, **1989**, 5p.
- [170] Z.-B. CAI, L.-F. LIU, M. ZHOU, B. LI, Y. CHEN, Synthesis and Photophysical Properties of New S-Triazine Derivatives Containing Quadrupolar Branches, *Dyes and Pigments* : **2014**, *102*, 88-93.
- [171] F. JIN, Z.-B. CAI, J.-Q. HUANG, S.-L. LI, Y.-P. TIAN, Investigation of Two-Photon Absorption Properties in New A-D-A Compounds Emitting Blue and Yellow Fluorescence, *Journal of Molecular Structure* : **2015**, *1093*, 33-38.
- [172] B. KHUMRAKSA, W. PHAKHODEE, M. PATTARAWARAPAN, Rapid Oxidation of Organic Halides with N-Methylmorpholine N-Oxide in an Ionic Liquid under Microwave Irradiation, *Tetrahedron Letters* : **2013**, *54*, 1983-1986.

- [173] G.-J. M. GRUTER, O. S. AKKERMAN, F. BICKELHAUPT, Nuclear versus Side-Chain Bromination of Methyl-Substituted Anisoles by N-Bromosuccinimide, *The Journal of Organic Chemistry* : **1994**, 59, 4473-4481.
- [174] E. AY, H. CHAUMEIL, A. BARSELLA, Syntheses of Four New Pyridinium Phenolates with Caged Phenolate Functionalities as Chromophores for Quadratic Optics, *Tetrahedron* : **2012**, 68, 628-635.
- [175] E.-H. CHO, Piperazine Derivatives and Process for the Preparation Thereof, Brevet US006028195A, **1997**, 44p.
- [176] Y. CHEN, L. CHEN, W. ZHOU, D. ZHA, D. ZHOU, F. BAI, M. WAN, Synthesis and properties of polyacetylenes containing bis(4-alkylphenyl)terephthalate as pendant and methyleneoxy as spacer, *Synthetic Metals* : **2009**, 159, 1649-1656.
- [177] P. LIU, Y. CHEN, J. DENG, Y. TU, An Efficient Method for the Preparation of Benzylic Bromides, *Synthesis* : **2001**, 14, 2078-2080.
- [178] D. BHATTACHARJEE, F. D. POPP, The Oxidation of a Series of Phthalyl Alcohols, *Journal of Heterocyclic Chemistry* : **1980**, 17, 315-320.
- [179] K. KAMAIKE, T. NAMIKI, E. KAWASHIMA, 6-(Levulinylloxymethyl)-3-Methoxy-2-Nitrobenzoyl and 2-(Levulinylloxymethyl)-5-Methoxy-4-Nitrobenzoyl Groups as Novel Base-Labile Groups for 5'-Hydroxy Protection in Solid-Phase Oligonucleotide Synthesis, *Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids* : **2003**, 22, 469-487.
- [180] M. BRIMBLE, C. BURGESS, A Facile Synthesis of 1,1-Spirobi(3H,3H)isobenzofurans, *Synthesis* : **2007**, 2007, 754-760.
- [181] J. SPERRY, J. S. GIBSON, J. J. P. SEJBERG, M. A. BRIMBLE, Enantioselective Synthesis of the Dimeric Pyranonaphthoquinone Core of the Cardinalins Using a Late-Stage Homocoupling Strategy, *Organic & Biomolecular Chemistry* : **2008**, 6, 4261-4270.
- [182] P. A. LERKE, L. D. BELL, A Rapid Fluorometric Method for the Determination of Histamine in Canned Tuna, *Journal of Food Science* : **1976**, 41, 1282-1284.
- [183] S. DOUABALÉ, M. DIONE, A. COLY, A. TINE, Contributions to the Determination of Histamine Rate by Measuring out the Histamine - Orthophthalaldehyde Complex in the Absorption and Fluorescence, *Talanta* : **2003**, 60, 581-590.
- [184] A. TINE, S. E. DOUABALÉ, New Method for Determining Histamine Rate in Halieutic Products, *Reviews in Fluorescence* : **2010**, 2008, (éd. : C. D. GEDDES), 195-218.

- [185] A. TINE, Procédé de Détermination Du Taux d Histamine Dans Les Produits Halieutiques, Brevet WO 2006/018673, **2014**, 13p.
- [186] P. NEDELJKO, M. TUREL, A. LOBNIK, Fluorescence-Based Determination of Agmatine in Dietary Supplements, *Analytical Letters* : **2015**, *48*, 1619-1628.
- [187] M. TRAORÉ, K. KITAL, M. MBAYE, O. M. A. MBAYE, C. DIOP, M. K. CAMARA, L. CISSÉ, M. D. G. SEYE, A. COLY, A. TINE, New Spectrofluorimetric Method for Determining Cadaverine Following Derivation with Orthophthalaldehyde : Application in Fish Tissue, *International Journal of Chemistry* : **2017**, *9*, 1-10.
- [188] O. OYELAKIN, M. TRAORÉ, E. H. B. MBAYE, A. KONTÉ, L. CISSÉ, A. N. FAYE, O. FAYE, M. MBAYE, K. KITAL, G. SEYE, A. COLY, A. TINE, F. DELATTRE, Spectrofluorometric Determination of Putrescine Using Orthophthaldehyde as a Fluorophore : A Novel Method, *Journal of AOAC International* : **2016**, *99*, 170-173.
- [189] N. H. KIM, Y. PARK, E. S. JEONG, C.-S. KIM, M. K. JEOUNG, K. S. KIM, S.-H. HONG, J.-K. SON, J. T. HONG, I.-y. PARK, D.-C. MOON, A Liquid Chromatographic Method for the Determination of Histamine in Immunoglobulin Preparation Using Solid Phase Extraction and Pre-Column Derivatization, *Archives of Pharmacal Research* : **2007**, *30*, 1350-1357.
- [190] D. L. KLAYMAN, T. S. GRIFFIN, Reaction of Selenium with Sodium Borohydride in Protic Solvents. A Facile Method for the Introduction of Selenium into Organic Molecules, *Journal of the American Chemical Society* : **1973**, *95*, 197-199.
- [191] F. ALDEEK, Synthèse et fonctionnalisation de nanocristaux fluorescents (Quantum Dots) pour l'imagerie et la caractérisation des propriétés hydrophobes/hydrophiles de biofilms bactériens, Thèse de doctorat, Discipline : Science de la Vie et de la Santé, Université Henri Poincaré - Nancy, **2010**, 215p.
- [192] F.-A. KAUFFER, C. MERLIN, L. BALAN, R. SCHNEIDER, Incidence of the Core Composition on the Stability, the ROS Production and the Toxicity of CdSe Quantum Dots, *Journal of Hazardous Materials* : **2014**, *268*, 246-255.
- [193] F.-A. KAUFFER, Synthèse, stabilité et toxicité de quantum dots à coeur CdSe, Thèse de doctorat, Discipline : Génie des Produits et des Procédés, Université de Lorraine, **2014**, 278 p.
- [194] D. G. SHCHUKIN, E. SKORB, V. BELOVA, H. MÖHWALD, Ultrasonic Cavitation at Solid Surfaces, *Advanced Materials* : **2011**, *23*, 1922-1934.

- [195] S. BAILÓN-RUIZ, O. J. PERALES-PÉREZ, Generation of Singlet Oxygen by Water-Stable CdSe(S) and ZnSe(S) Quantum Dots, *Applied Materials Today* : **2017**, 9, 161-166.
- [196] H.-y. HAN, Z.-h. SHENG, J.-g. LIANG, A Novel Method for the Preparation of Water-Soluble and Small-Size CdSe Quantum Dots, *Materials Letters* : **2006**, 60, 3782-3785.
- [197] Y. BAO, J. LI, Y. WANG, L. YU, J. WANG, W. DU, L. LOU, Z. ZHU, H. PENG, J. ZHU, Preparation of Water Soluble CdSe and CdSe/CdS Quantum Dots and Their Uses in Imaging of Cell and Blood Capillary, *Optical Materials* : **2012**, 34, 1588-1592.
- [198] G. KAUR, S. TRIPATHI, Size Tuning of MAA Capped CdSe and CdSe/CdS Quantum Dots and Their Stability in Different pH Environments, *Materials Chemistry and Physics* : **2014**, 143, 514-523.
- [199] J. ROOZE, E. V. REBROV, J. C. SCHOUTEN, J. T. KEURENTJES, Dissolved Gas and Ultrasonic Cavitation – A Review, *Ultrasonics Sonochemistry* : **2013**, 20, 1-11.
- [200] A. ARENCIBIA-MOHAR, A. ARIOSA-ALVAREZ, O. MADRAZO-ALONSO, E. GONZÁLEZ ABREU, L. GARCÍA-ÍMIA, G. SIERRA-GONZÁLEZ, V. VEREZ-BENCOMO, Synthesis of Terminal Disaccharide Elements Corresponding to the Ogawa and Inaba Antigenic Determinant from *Vibrio Cholerae* O1, *Carbohydrate Research* : **1998**, 306, 163-170.
- [201] C. K. JIN, H. J. JEONG, M. K. KIM, J. Y. KIM, Y.-J. YOON, S.-G. LEE, The Selective Deprotection of Thioesters Using Titanium(IV) Chloride/Zinc, *Synlett* : **2001**, 2001, 1956-1958.

## **Section annexe**

## Matériel et méthodes

Les réactifs chimiques et les solvants proviennent de sources commerciales (ACROS ORGANICS, FISCHER SCIENTIFIC et SIGMA ALDRICH) et sont utilisés sans purification préalable.

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) sont enregistrés sur un spectromètre BRUCKER AVANCE II 400 opérant à 400 MHz pour le proton et à 100 MHz pour le carbone. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au Tétraméthylsilane (TMS). Les spectres sont calibrés sur le signal résiduel du solvant deutéré utilisé. La multiplicité des signaux est indiquée comme suit : s=singulet, d=doublet, t=triplet, q=quatuorlet, qi=quintuplet, m=multiplet. Les constantes de couplage sont données en Hertz (Hz).

Les spectres de Spectrométrie de masse à haute résolution avec ionisation par électronébulisation (HRMS-ESI) ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Agilent 6540 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) équipé d'une source d'ionisation electrospray en mode positif de type Agilent Jet Stream.

Les spectres infrarouges ont été enregistrés entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$  sur un spectromètre Perkin Elmer FT-IR équipé d'un module Réflectance totale atténuée (ATR).

Les spectres de Diffraction des Rayons X (DRX) ont été enregistré à température ambiante sur un diffractomètre Bruker D8 Advance AXS. Les diagrammes de diffraction ont été indexés par comparaison avec les fichiers du JCPDS.

Les analyses de métaux ont été réalisées au Centre Commun de Mesure par Spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES) sur un spectromètre Thermo Scientific iCAP 6000 series.

Les synthèses organique assistée par micro-ondes ont été réalisées en utilisant un four initiateur BIOTAGE de 400 W. Les échantillons ont été placés dans un flacon scellé et irradiés avec un contrôle de température.

Les photosynthèses ont été réalisées grâce à une lampe photochimique heliosquartz à basse pression à 350 nm (référence RC40/29).

Les expériences sous ultrasons ont été réalisées avec un appareil de type Branson sonifier 450 (13mm de diamètre, 20 kHz) de la compagnie Branson

ultrasonic Corporation. L'instrument peut fournir une puissance maximale de 400 W. Un système de type cup-horn a été adapté afin que la sonde soit située à 1 cm du fond du vial.

Les chromatographies sur couche mince sont réalisées sur des plaques de silices ALUGRAM Xtra SIL G/UV254 imprégnées d'un révélateur UV. Les produits sont révélés grâce à une lampe UV (254 nm ou 366 nm).

Les séparations par chromatographie sur colonne sont réalisées sur gel de silice 70-230 mesh en utilisant 30-40 fois le poids du brut en silice. L'automatisation des séparations par chromatographie sur colonne sont réalisées avec sur colonne chromatographique automatisé de marque Interchim, modèle Puriflash 430.

Les distillations sous vide poussé sont réalisées grâce à un Kugelrohr de chez Sigma-Aldrich couplé à une pompe secondaire atteignant  $7,7 \cdot 10^{-3}$  mbar.

Les spectres d'absorption sont enregistrés sur un spectrophotomètre à double faisceau Cary 100 Scan avec une cuves en optiglass 100-OS de trajet optique égal à 10 nm.

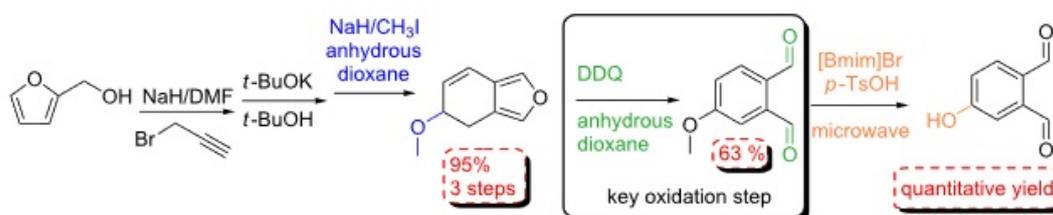
Les spectres de fluorescence moléculaire sont enregistrés sur un spectrofluorimètre Varian Cary Eclipse. Les cuves utilisées sont des cuves en quartz 100-QS et de trajet optique égal à 10 nm. Les solvants utilisés sont de qualité HPLC et sont dégazés dans un bain à ultrasons avant l'enregistrement des spectres de fluorescence moléculaire.

## Publication

Efficient synthesis of 4-substituted-ortho-phthalaldehyde analogues : toward the emergence of new building blocks

Clémence Moitessier, Ahmad Rifai, Pierre-Edouard Danjou, Isabelle Mallard and Francine Cazier-Dennin

Beilstein Journal of Organic Chemistry 2019, 15, 721–726.  
doi :10.3762/bjoc.15.67





# Efficient synthesis of 4-substituted-*ortho*-phthalaldehyde analogues: toward the emergence of new building blocks

Clémence Moitessier<sup>1</sup>, Ahmad Rifai<sup>2</sup>, Pierre-Edouard Danjou<sup>1</sup>, Isabelle Mallard<sup>1</sup> and Francine Cazier-Dennin<sup>\*1</sup>

## Full Research Paper

Open Access

### Address:

<sup>1</sup>Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV) - Université du Littoral Côte d'Opale, 145 Avenue Maurice Schumann, MREI 1, 59140 Dunkerque, France and <sup>2</sup>Lebanese Atomic Energy Commission – National Council for Scientific Research – B. P. 11- 8281, Riad El Solh 1107, 2260 Beirut, Lebanon

### Email:

Francine Cazier-Dennin<sup>\*</sup> - dennin@univ-littoral.fr

<sup>\*</sup> Corresponding author

### Keywords:

demethylation; hydroxy group protection; 4-hydroxy-*ortho*-phthalaldehyde; *ortho*-phthalaldehyde; oxidation

*Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 721–726.

doi:10.3762/bjoc.15.67

Received: 13 November 2018

Accepted: 11 March 2019

Published: 19 March 2019

Associate Editor: B. Stoltz

© 2019 Moitessier et al.; licensee Beilstein-Institut.

License and terms: see end of document.

## Abstract

4-Methoxy-*ortho*-phthalaldehyde and 4-hydroxy-*ortho*-phthalaldehyde are potentially useful molecules for fluorimetric analysis of a variety of amines and for the elaboration of complex molecular architectures. Nevertheless, literature generally describes their synthesis in very low yield (below 5%), mainly due to the inefficiency of the last oxidation step. In this paper, we report a reliable synthesis of 4-substituted-*ortho*-phthalaldehyde analogues in 51% overall yield owing to the addition of a protecting step of the unstable key intermediate 4,5-dihydroisobenzofuran-5-ol. Oxidation and deprotection steps were also studied in order to provide an effective availability of these two dialdehyde compounds that may increase their future applications.

## Introduction

Benzene-1,2-dicarboxaldehyde, also called *ortho*-phthalaldehyde (OPA) was employed in different domains such as in analytical and organic chemistry. In fact, it is one of the most commonly used dialdehydes in fluorometric methods with regard to the analysis of amino acids and biogenic amines [1-3]. It is also used as a derivatization reagent in order to quantify hydrazine by gas chromatography coupled with a mass spectrometer detector [4]. Recently, it was adopted for the analysis of  $\gamma$ -aminobutyric acid by high-performance liquid chromatogra-

phy with molecular fluorescence detection [5]. In addition to the above manipulations, OPA and its derivatives are also valuable reagents [6] in organic chemistry, used to generate phthalimidine [7], imines [8], isoindole [9], 3-hydroxyindanone [10], thioether macrocycles [11], macrocyclic Schiff bases [12] or even poly(phthalaldehyde) polymers [13]; taking into account that few studies were carried out with modified OPA on position 3 or 4. This could probably be due to the fact that the synthesis of 4-substituted OPA was, to the best of our knowledge,

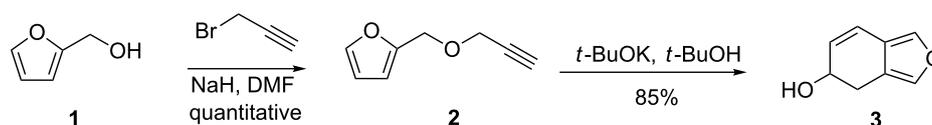
rarely recorded in the literature with an efficient synthetic pathway; conjointly to the 3-substituted OPA that is even less described.

In 1966, Khan et al. presented the synthesis of 4-hydroxy and 4-methoxy-*ortho*-phthalaldehyde (4-HO-OPA and 4-MeO-OPA) by bromination and oxidation of 4-hydroxy and 4-methoxy-*ortho*-xylene in only 5% yield [14]. 4-HO-OPA was also described in 1997 by Taylor et al. as a crude product (via a Diels–Alder reaction of commercially available Danishefsky diene with 4,4-diethoxybut-2-ynal) for the synthesis of an anti-tumor analogue [15]. This aforementioned strategy was applied as well for the preparation of hydantoin derivatives to treat anti-inflammatory disorders [16]. More recently, in a study of Cao et al. [17] 4-HO-OPA was synthesized, once again in a low yield (4%) in order to produce the cucurbit[*n*]uril core.

As shown by literature, the poor efficiency of 4-substituted OPA synthesis represents a major limiting factor to their potential applications. Herein, we set forth a new protection-deprotection strategy which leads to 4-MeO-OPA and 4-HO-OPA as reliable structures for organic and analytical chemistries. A variety of protecting groups of key 4,5-dihydroisobenzofuran-5-ol intermediate has been tested and oxidation parameters of the dedicated structures were optimized. Finally, a rapid deprotection step was initiated to afford 4-MeO-OPA and 4-HO-OPA with 51% overall yield.

## Results and Discussion

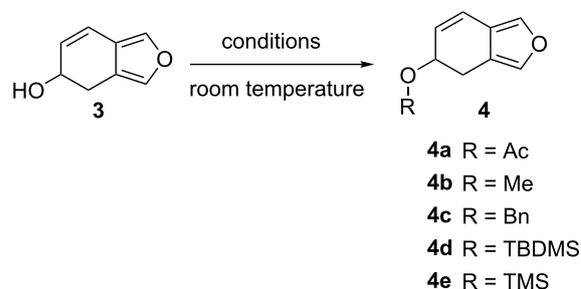
Firstly, 2-((prop-2-ynoxy)methyl)furan (**2**) was synthesized through a reaction of furfuryl alcohol with propargyl bromide, as is referred in the study of Cao et al. (Scheme 1) [17]. As a matter of fact, a modification of the purification step was done in order to quantitatively enhance the yield. An alternative solvent-free microwave-assisted organic synthesis (MAOS) protocol for **2** was also tested in a basic medium with tetrabutylammonium bromide [18]. Nevertheless, this convenient time-saving procedure (15 minutes) shows a lower 74% yield due to the presence of a byproduct (propargylic alcohol) as evidenced by NMR spectroscopy. An intramolecular Diels–Alder cyclisation in a basic medium of **2** then occurred to generate 4,5-dihydroisobenzofuran-5-ol (**3**) [19].



**Scheme 1:** Synthesis of 4,5-dihydroisobenzofuran-5-ol (**3**).

At this step, Cao et al. [17] have chosen the direct oxidation of 4,5-dihydroisobenzofuran-5-ol (**3**) to obtain 4-HO-OPA by using 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) as an oxidant. However, the yield of this reaction was very low (only 13%) mainly due to major production of OPA as is also described in a study of Wenkert et al. [20]. In order to circumvent the dehydration of **3** which generate OPA under oxidative conditions, a protection strategy of the hydroxy group was undertaken.

The only protecting group described in the literature for 4,5-dihydroisobenzofuran-5-ol (**3**) is acetyl [19]. Thus, beside this former, several protecting groups such as: methyl (Me), benzyl (Bn), *tert*-butyldimethylsilyl (TBDMS) and trimethylsilyl (TMS) were tested (Scheme 2). As summarized in Table 1, major disparity in the yield was observed, ranging from 95% for methyl and acetyl to only 10% for benzyl. The poor yield for standard protection conditions could be explained by the sensitivity of compound **3** to reflux conditions. Based on these results, acetyl and methyl have been selected for the protection. It should be mentioned that 5-acetoxy- and 5-methoxy-4,5-dihydroisobenzofuran appear to be shelf stable at room temperature and can be stored for at least one month in contrast to the 5-hydroxy derivative which is liable to degradation.



**Scheme 2:** Protection strategy of 4,5-dihydroisobenzofuran-5-ol (**3**).

Following the protection of the hydroxy group, the oxidation step was initiated in order to evaluate the stability of the protected RO-OPA and to certify the absence of OPA contamination [20]. Two major oxidants, SeO<sub>2</sub> and DDQ were chosen for 5-methoxy and 5-acetoxy-4,5-dihydroisobenzofuran oxidation.

**Table 1:** Protection of 4,5-dihydroisobenzofuran-5-ol (**3**).

R	reactant	solvent	yield (%)
Ac	Ac <sub>2</sub> O	pyridine	95
Me	MeI/NaH	anhydrous dioxane	95
Bn	BnCl/NaH	anhydrous dioxane	10
TBDMS	TBDMSCl/imidazole	anhydrous THF	30
TMS	TMSCl/imidazole	anhydrous THF	15

As illustrated in Scheme 3, the reaction occurred with both reactants but ended up with variable amounts of OPA, the desired 4-substituted *ortho*-phthalaldehyde and the phthalic acid analogues **7**.

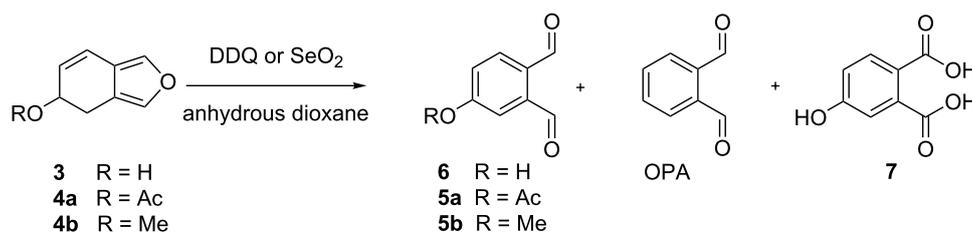
Quantitative analyses were carried on the <sup>1</sup>H NMR on the crude mixture and the percentage of each compound was determined by integration of aldehydic or acidic protons.

As indicated in Table 2, the results clearly show that the oxidation of **3** with SeO<sub>2</sub> (Table 2, entry 1), yields OPA as a main product which is consistent with the study of Wenkert et al. [20]. Similar results were observed for the oxidation of 5-acetoxy-4,5-dihydroisobenzofuran (**4a**) that gave 22% of 4-acetoxy-*ortho*-phthalaldehyde (**5a**) and 78% of OPA (Table 2, entry 2). As for 5-methoxy-4,5-dihydroisobenzofuran (**4b**), it was totally converted to 4-hydroxyphthalic acid (**7**, Table 2,

entry 3). In regard to these results, oxidation with SeO<sub>2</sub> leads to the unwanted products OPA and **7**, so oxidation with DDQ was initiated to avoid side products.

DDQ oxidation of 4,5-dihydroisobenzofuran-5-ol (**3**) led to identical results to the literature and formed a 1:1 mixture of 4-HO-OPA (**6**) and OPA (Table 2, entry 4). In the case of 5-acetoxy-4,5-dihydroisobenzofuran (**4a**), the oxidation prompts the total formation of OPA (Table 2, entry 5). To our delight, the remarkable stability of the methoxy group under the same synthesis conditions introduces the key intermediate 4-methoxyphthalaldehyde (**5b**) with an excellent conversion rate and minimal OPA formation (Table 2, entry 6). Compound **5b** was then isolated by column chromatography in 63% yield.

After completing the oxidation step with convincing results, the final step of the methoxy group removal was undertaken.

**Scheme 3:** Oxidation of 5-substituted-4,5-dihydroisobenzofuran-5-ol in presence of SeO<sub>2</sub> or DDQ.**Table 2:** Ratio quantity of OPA formed during the oxidation of 5-substituted-4,5-dihydroisobenzofuran-5-ol on SeO<sub>2</sub> or DDQ.

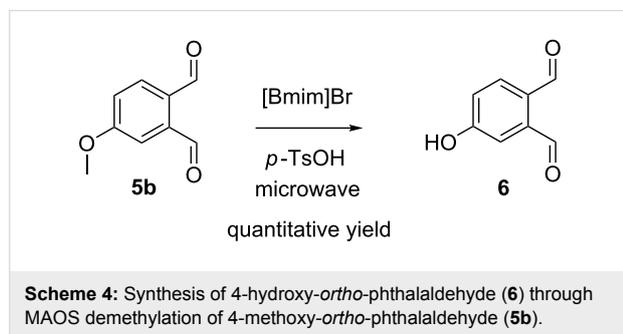
entry	starting product	oxydant	ratio of quantity (%)		
			RO-OPA	OPA	compound <b>7</b>
1	<b>3</b> R = H	SeO <sub>2</sub>	0	80	20
2	<b>4a</b> R = Ac	SeO <sub>2</sub>	22	78	–
3	<b>4b</b> R = Me	SeO <sub>2</sub>	0	0	100
4	<b>3</b> R = H	DDQ	50	50	–
5	<b>4a</b> R = Ac	DDQ	0	100	–
6	<b>4b</b> R = Me	DDQ	97	3	–

Several studies showed that OPA reacts in the presence of water to form a cyclic 1,3-phthalandiol [21] or a dimer [22]. Taking this into account to access pure 4-HO-OPA, it was decided to go for anhydrous deprotection reaction, and in doing so, keeping the dialdehyde part untouched.

Accordingly, hydrogen bromide was employed as a deprotection agent, as previously used by Borisenko et al. [23], to finally achieve the desired product **6** but in a very poor yield (5%). A second deprotection agent was tested, trimethylsilyl iodide, as it was recently published by Danjou et al. [24] as a removal agent of methoxy groups on calixarenes architectures. Although we succeeded with the removal of methoxy groups, both aldehydes were reduced.

Furthermore, the lithium chloride/*N,N*-dimethylformamide system was tested according to the study of Fang et al. [25] revealing that the methoxy group in the *meta*-position of an electron-withdrawing substituents can be removed under microwave irradiation. However, when testing the system on **5b**, no reaction occurred. Another experiment with lithium chloride/*N,N*-dimethylformamide in the presence of a catalytic amount of *p*-toluenesulfonic acid ended up with only the formation of OPA.

Regeneration of phenols from methyl ethers have also been tested by Boovanahalli et al. [26] by using an ionic liquid such as 1-butyl-3-methylimidazolium bromide ([Bmim]Br) in the presence of different Brønsted acids. While investigating these conditions in combination with microwave irradiation (Scheme 4), the desired compound 4-HO-OPA (**6**) was successfully obtained in only 30 minutes, with a good yield (75%) when reacting with methanesulfonic acid (MsOH) as catalyst and a quantitative yield upon its reaction with *p*-toluenesulfonic acid (*p*-TsOH).



## Conclusion

This study presents the highest reported yield for the synthesis of 4-methoxy-*ortho*-phthalaldehyde (**5b**) and 4-hydroxy-*ortho*-phthalaldehyde (**6**). For the latter, our study highlights the

necessity to protect the key intermediate 4,5-dihydroisobenzofuran-5-ol (**3**) before reaching the oxidation step. The methoxy protecting group and the DDQ oxidation reagent were found to be the most efficient. Moreover, deprotection of 4-methoxy-*ortho*-phthalaldehyde (**5b**) was successfully achieved using [Bmim]Br and *p*-TsOH on MAOS conditions. All the above steps constitute a straightforward approach for the synthesis of 4-methoxy and 4-hydroxy-*ortho*-phthalaldehyde. The effective availability of both these structures may now increase their application as building blocks for future organic entities. In particular, the presence of the versatile polar anchoring group can lead to surface modification inducing a growing interest in these *ortho*-phthalaldehyde analogues for further application.

## Experimental

### Materials and methods

All the chemicals were purchased from Acros Organic or Sigma-Aldrich and were used as received without further purification. Microwave-assisted organic synthesis was carried out using a 400 W Biotage initiator oven. Samples were placed in a sealed vial and irradiated with a temperature control. Automated flash chromatography was performed on a Puriflash 430 (Interchim) incorporating a quaternary pump system, diode array and evaporation light scattering detectors using SiO<sub>2</sub> HC prepacked cartridge. NMR spectra were recorded at 300 K with a Bruker Ascend 400 spectrometer operating at 400 MHz and 101 MHz for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C, respectively. Traces of residual solvent were used as internal standard.

### Synthetic procedures

**2-((Prop-2-ynoxy)methyl)furan (2).** Adapted from reference [17]: Furfuryl alcohol (9.0 mL, 103.8 mmol) was added dropwise to a solution of NaH (5.0 g, 207.5 mmol) in DMF (100 mL) at 0 °C. After 90 minutes, propargyl bromide (12.7 mL, 114.2 mmol) was added dropwise and the resulting mixture was stirred overnight at room temperature. Water was then added to the solution. The aqueous phase was extracted several times with Et<sub>2</sub>O until a colorless organic phase was obtained. The combined organic phases were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The oily product was finally washed with hexane to obtain the desired compound **2** as a brown oil (14.1 g, quantitative yield). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.40 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 6.35 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 6.33 (dd, *J* = 3.1, 1.5 Hz, 1H), 4.54 (s, 2H), 4.13 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 2.46 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 150.9, 143.2, 110.5, 110.2, 79.4, 74.9, 63.2, 56.9. Spectroscopic data were in accordance with data from a previously reported synthesis [27].

**4,5-Dihydroisobenzofuran-5-ol (3).** Adapted from reference [19]: Compound **2** (14.1 g, 103.8 mmol) was added to a solu-

tion of *t*-BuOK (23.2 g, 207.5 mmol) in 100 mL of *t*-BuOH and heated at reflux for 5 hours. Then, 100 mL of water were added followed by multiple extractions with Et<sub>2</sub>O until a colorless organic phase was obtained. The combined organic phases were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated in vacuo. The product was then purified by flash chromatography using a SiO<sub>2</sub> cartridge (80 g) with a gradient of hexane/AcOEt from 2:1 to 1:1 (TLC hexane/AcOEt 2:1 *R*<sub>f</sub> = 0.4). Pure 4,5-dihydroisobenzofuran-5-ol (**3**) was obtained as a yellow oil (12.0 g, 85%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.31 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 6.51 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 5.92 (dd, *J* = 9.8, 3.9 Hz, 1H), 4.49 (td, *J* = 6.6, 3.9 Hz, 1H), 2.87 (dd, *J* = 15.7, 6.6 Hz, 1H), 2.77 (dd, *J* = 15.7, 6.6 Hz, 1H), 2.03 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 138.3, 137.3, 129.7, 120.4, 119.9, 117.3, 65.5, 27.9. Spectroscopic data were in accordance with data from a previously reported synthesis [28].

**5-Methoxy-4,5-dihydroisobenzofuran (4b):** Compound **3** (3.3 g, 24.3 mmol) was added to a solution of NaH (1.46 g, 36.4 mmol) in anhydrous dioxane (20 mL). After 15 minutes, methyl iodide (1.8 mL, 29.1 mmol) was slowly added and the resulting solution was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched by the addition of EtOH followed by water and the resulting heterogeneous mixture was filtered. The resulting solution was then dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure to obtain the title compound (3.4 g, 95%) as an orange oil used without further purification. IR (ATR, cm<sup>-1</sup>) 1075, 791, 586; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.30 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 6.55 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 5.93 (dd, *J* = 9.9, 3.6 Hz, 1H), 4.12–4.11 (m, 1H), 3.39 (s, 3H), 2.90 (dd, *J* = 15.6, 6.1 Hz, 1H), 2.76 (dd, *J* = 15.6, 6.1 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 137.8, 137.1, 127.6, 120.7, 120.2, 117.8, 74.2, 56.0, 24.4.

**4-Methoxy-ortho-phthalaldehyde (5b):** A mixture of compound **4b** (3.4 g, 22.7 mmol) and DDQ (10.3 g, 45.3 mmol) in anhydrous dioxane (100 mL) was stirred at room temperature for 2 days. Excess of DDQ was eliminated by filtration and the remaining solid was washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The liquid phase was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure to obtain a residue which was purified by two successive flash chromatography runs. The first one was run on 100% DCM mobile phase in order to eliminate DDQ residue (*R*<sub>f</sub> = 0.9) and the second with ethyl acetate/hexane (3:1) in order to separate 4-MeO-OPA (*R*<sub>f</sub> = 0.6) from OPA (*R*<sub>f</sub> = 0.9). The resulting oily brown product is finally recrystallized in hexane to afford **5b** as white needles (2.8 g, 63%). mp 41–42 °C (Lit. [29] mp 41–43 °C); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.67 (s, 1H), 10.34 (s, 1H), 7.94 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.22 (dd, *J* = 8.5, 2.6 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 192.0, 191.0, 163.9, 138.7, 134.6, 129.6, 118.9,

114.7, 56.0. Spectroscopic data were in accordance with data from a previously reported synthesis [30]

**4-Hydroxy-ortho-phthalaldehyde (6):** A mixture of compound **5b** (200 mg, 1.2 mmol), *p*-TsOH (1.68 g, 9.8 mmol) and [Bmim]Br (4.0 g, 18.3 mmol) was placed in a sealed vial and irradiated under microwave irradiation for 30 minutes at 150 °C under strong agitation. After cooling, the mixture was vigorously extracted with Et<sub>2</sub>O overnight. The ether layer was separated and concentrated under vacuum to obtain crude compound **6** which was then crystallized in hexane to obtain yellow crystals (181 mg, quantitative yield). Mp: >85 °C (dec.) (Lit. [17] mp: >85 °C); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.65 (s, 1H), 10.31 (s, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.19 (dd, *J* = 8.4, 2.6 Hz, 1H); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.00 (s, 1H), 10.49 (s, 1H), 10.27 (s, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.17 (dd, *J* = 8.4, 2.5 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 192.2, 191.2, 160.7, 139.0, 135.4, 129.9, 120.2, 116.8; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO) δ 193.8, 192.3, 162.8, 139.5, 134.9, 128.7, 120.4, 116.3. Data were in accordance with the literature [17].

## Supporting Information

### Supporting Information File 1

Additional protocol and NMR characterization.

[<https://www.beilstein-journals.org/bjoc/content/supplementary/1860-5397-15-67-S1.pdf>]

## Acknowledgements

Pole Metropolitan Cote d'Opale (PMCO) is gratefully acknowledged for financial support.

## ORCID® iDs

Ahmad Rifai - <https://orcid.org/0000-0002-5749-924X>

Pierre-Edouard Danjou - <https://orcid.org/0000-0001-8824-1420>

## References

- Zuman, P.; Salem, N.; Kulla, E. *Electroanalysis* **2009**, *21*, 645–649. doi:10.1002/elan.200804426
- Rönnerberg, A. L.; Hansson, C.; Drakenberg, T.; Håkanson, R. *Anal. Biochem.* **1984**, *139*, 329–337. doi:10.1016/0003-2697(84)90013-7
- Yoshimura, T.; Kaneuchi, T.; Miura, T.; Kimura, M. *Anal. Biochem.* **1987**, *164*, 132–137. doi:10.1016/0003-2697(87)90376-9
- Oh, J.-A.; Shin, H.-S. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1247*, 99–103. doi:10.1016/j.chroma.2012.05.065
- Zandy, S. L.; Doherty, J. M.; Wibisono, N. D.; Gonzales, R. A. *J. Chromatogr., B* **2017**, *1055–1056*, 1–7. doi:10.1016/j.jchromb.2017.04.003
- Zuman, P. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3217–3238. doi:10.1021/cr0304424

7. Allin, S. M.; Hodkinson, C. C.; Taj, N. *Synlett* **1996**, 781–782. doi:10.1055/s-1996-5528
8. Kulla, E.; Zuman, P. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3771–3780. doi:10.1039/b807714m
9. Nakao, M.; Nishikiori, N.; Nakamura, A.; Miyagi, M.; Shibata, N.; Kitaike, S.; Fukui, M.; Ito, H.-O.; Sano, S. *SynOpen* **2018**, *2*, 50–57. doi:10.1055/s-0036-1591932
10. Sun, F.-G.; Ye, S. *Synlett* **2011**, 1005–1009. doi:10.1055/s-0030-1259707
11. Aitken, R. A.; Hauduc, C.; McLennan, R. S.; Slawin, A. M. Z.; Wilson, H. S. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 1937–1940. doi:10.1016/j.tetlet.2015.02.003
12. Reddy, P. M.; Ho, Y.-P.; Shanker, K.; Rohini, R.; Ravinder, V. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2621–2625. doi:10.1016/j.ejmech.2008.09.035
13. Kaitz, J. A.; Diesendruck, C. E.; Moore, J. S. *Macromolecules* **2013**, *46*, 8121–8128. doi:10.1021/ma401744k
14. Khan, A. M.; Proctor, G. R.; Rees, L. J. *Chem. Soc. C* **1966**, 990–994. doi:10.1039/j39660000990
15. Taylor, E. C.; Jennings, L. D.; Mao, Z.; Hu, B.; Jun, J.-G.; Zhou, P. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5392–5403. doi:10.1021/jo9703459
16. Yu, W.; Tong, L.; Chen, L.; Kozlowski, J. A.; Lavey, B. J.; Shih, N. Y.; Madison, V. S.; Zhou, G.; Orth, P.; Guo, Z.; Wong, M. K. C.; Yang, D. Y.; Kim, S. H.; Shankar, B. Hydantoin Derivatives for the Treatment of Inflammatory Disorders. WO Patent WO2006019768A1, Feb 23, 2006.
17. Cao, L.; Isaacs, L. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 3072–3075. doi:10.1021/ol3011425
18. Majdoub, M.; Loupy, A.; Petit, A.; Roudesli, S. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 617–628. doi:10.1016/0040-4020(95)00900-0
19. Hayakawa, K.; Yamaguchi, Y.; Kanematsu, K. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 2689–2692. doi:10.1016/s0040-4039(00)98138-3
20. Wenkert, E.; Khatuya, H. *Synth. Commun.* **1999**, *29*, 2413–2417. doi:10.1080/00397919908086247
21. Zhu, P.; Lu, K.; Wang, D.-H. *ACS Symp. Ser.* **2007**, *967*, 152–159. doi:10.1021/bk-2007-0967.ch007
22. Isogai, K.; Tsumaki, H.; Eguchi, D.; Fukuyama, S. Crystalline Hydrate of Ortho-Phthalaldehyde, Disinfecting Agent and Biocide Containing Same, and Method for Manufacturing Ortho-Phthalaldehyde. WO Patent WO/2012/147865, Nov 2, 2012.
23. Borisenko, K. B.; Zauer, K.; Hargittai, I. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 19303–19309. doi:10.1021/jp9620072
24. Danjou, P.-E.; De Leener, G.; Cornut, D.; Moerkerke, S.; Mameri, S.; Lascaux, A.; Wouters, J.; Brugnara, A.; Colasson, B.; Reinaud, O.; Jabin, I. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 5084–5091. doi:10.1021/acs.joc.5b00464
25. Fang, Z.; Zhou, G.-C.; Zheng, S.-L.; He, G.-L.; Li, J.-L.; He, L.; Bei, D. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2007**, *274*, 16–23. doi:10.1016/j.molcata.2007.04.013
26. Boovanahalli, S. K.; Kim, D. W.; Chi, D. Y. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3340–3344. doi:10.1021/jo035886e
27. Martín-Matute, B.; Nevado, C.; Cárdenas, D. J.; Echavarren, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5757–5766. doi:10.1021/ja029125p
28. Wu, H.-J.; Yen, C.-H.; Chuang, C.-T. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5064–5070. doi:10.1021/jo980240l
29. Bhattacharjee, D.; Popp, F. D. *J. Heterocycl. Chem.* **1980**, *17*, 315–320. doi:10.1002/jhet.5570170221
30. Sánchez-Larios, E.; Holmes, J. M.; Daschner, C. L.; Gravel, M. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5772–5775. doi:10.1021/ol102685u

## License and Terms

This is an Open Access article under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). Please note that the reuse, redistribution and reproduction in particular requires that the authors and source are credited.

The license is subject to the *Beilstein Journal of Organic Chemistry* terms and conditions:

(<https://www.beilstein-journals.org/bjoc>)

The definitive version of this article is the electronic one which can be found at:

doi:10.3762/bjoc.15.67

# Table des matières

<b>Avant-propos</b>	<b>iv</b>
<b>Remerciements</b>	<b>v</b>
<b>Résumé</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des acronymes</b>	<b>viii</b>
<b>Sommaire</b>	<b>xi</b>
<b>Table des figures</b>	<b>xiii</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>xix</b>
<b>Table des équations</b>	<b>xxii</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 Synthèse bibliographique</b>	<b>4</b>
1.1 Les amines biogènes (AB) . . . . .	4
1.1.1 Définition des AB . . . . .	4
1.1.2 Origines des AB chez l'Homme . . . . .	6
1.1.3 Rôles biologiques . . . . .	7
1.1.4 L'histamine . . . . .	7
1.1.4.1 Actrice de nombreux processus biologiques . . . . .	8
1.1.4.2 La scombroidose . . . . .	9
1.1.4.3 Réglementation de l'histamine . . . . .	10
1.1.4.4 Méthodes d'analyse de l'histamine . . . . .	10
1.1.4.4.1 Méthodes colorimétriques . . . . .	11
1.1.4.4.2 Méthodes de CCM . . . . .	12
1.1.4.4.3 Méthodes enzymatiques . . . . .	13
1.1.4.4.4 Méthodes immuno-enzymatiques . . . . .	14

1.1.4.4.5	Méthodes d'analyse par injection en flux continu (FIA) . . .	15
1.1.4.4.6	Méthodes par Électrophorèse Capillaire (CE) . . . . .	15
1.1.4.4.7	Méthodes par fluorescence moléculaire . . . . .	16
1.1.4.4.8	Méthodes par chromatographie en phase gazeuse (GC) . . . .	16
1.1.4.4.9	Méthodes par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) . . . . .	17
1.2	<i>L'ortho</i> -phthalaldéhyde (OPA) et ses dérivés . . . . .	18
1.2.1	Généralité . . . . .	18
1.2.2	Formes de OPA en milieu aqueux . . . . .	18
1.2.3	Dérivés de l'OPA . . . . .	19
1.2.4	Applications de l'OPA . . . . .	20
1.2.5	OPA et histamine . . . . .	20
1.3	Les Quantum Dots (QD) . . . . .	23
1.3.1	Généralité et structure . . . . .	23
1.3.1.1	Structure électronique et propriétés des semi-conducteurs . . . . .	23
1.3.1.2	Structure d'un QD . . . . .	24
1.3.2	Propriétés photophysiques des QD . . . . .	27
1.3.2.1	Importance du diamètre des QD . . . .	27
1.3.2.2	Absorption . . . . .	28
1.3.2.3	Photoluminescence . . . . .	29
1.3.2.4	Rendement quantique de fluorescence	31
1.3.2.5	Comparaison des propriétés des QD avec celles des fluorophores classiques . . . .	33
1.3.3	Synthèses des QD . . . . .	35
1.3.3.1	Synthèse, croissance et stabilisation d'un QD . . . . .	35
1.3.3.2	Voies de synthèses . . . . .	37
1.3.3.2.1	Synthèse organométallique . . . . .	37
1.3.3.2.2	Synthèse en milieu aqueux . . . . .	39
1.3.3.2.3	Synthèses alternatives . . . . .	40
1.3.3.2.4	Synthèse d'une coquille . . . . .	41
1.3.3.3	Dispersion des QD hydrophobes en milieu aqueux . . . . .	42

1.3.3.3.1	Échange de ligand à la surface des QD . . . . .	42
1.3.3.3.2	Encapsulation des QD hydrophobes . . . . .	43
1.3.3.4	Fonctionnalisation . . . . .	44
1.3.4	Techniques de caractérisation et quantification . . . . .	45
1.3.4.1	Détermination du diamètre du cœur et de la concentration de la solution par spectroscopie UV . . . . .	45
1.3.4.1.1	Détermination du diamètre du cœur à partir du spectre d'absorption . . . . .	45
1.3.4.1.2	Détermination du coefficient d'extinction molaire à partir du spectre d'absorption . . . . .	46
1.3.4.1.3	Détermination de la concentration de la solution à partir du spectre d'absorption . . . . .	46
1.3.4.2	Techniques de caractérisation structurale . . . . .	47
1.3.5	Applications des QD . . . . .	47
<b>Chapitre 2</b>	<b>Synthèse du 4-hydroxy-<i>ortho</i>-phthalaldéhyde (4-HO-OPA)</b>	<b>50</b>
2.1	Stratégie de synthèse selon CAO et ISAACS . . . . .	52
2.1.1	Étude de reproductibilité de la synthèse selon CAO et ISAACS . . . . .	53
2.1.2	Étude de reproductibilité de l'étape d'oxydation du 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol en 4-HO-OPA . . . . .	54
2.1.3	Synthèse optimisée du 4-HO-OPA à partir de l'alcool furfurylique . . . . .	58
2.1.3.1	Synthèse du 2-((prop-2-ynyloxy)méthyl)furane (2) . . . . .	58
2.1.3.2	Synthèse du 4,5-dihydrobenzofuran-5-ol (3) . . . . .	59
2.1.3.3	Synthèses des 5-alkoxy-4,5-dihydrobenzofuranes (4) . . . . .	60
2.1.3.4	Synthèses des 4-MO-OPA et 4-AcO-OPA (5-a et 5-b) . . . . .	61
2.1.3.5	Synthèse du 4-HO-OPA (6) à partir du 4-MO-OPA . . . . .	62
2.1.4	Conclusion sur la voie de synthèse du 4-HO-OPA à partir de l'alcool furfurylique . . . . .	64

2.2	Stratégie de synthèse selon BILL et TARBELL . . . . .	65
2.2.1	Bromation de l' <i>ortho</i> -xylène par du NBS . . . . .	65
2.2.2	Oxydation du 1,2-bis(bromométhyl)benzène . . . . .	66
2.2.3	Synthèse du 4-HO-OPA à partir du 3,4-diméthyl- phénol . . . . .	68
2.2.3.1	Synthèse du 3,4-diméthylanisole (11) . . . . .	68
2.2.3.2	Synthèse du 3,4-di(bromométhyl)anisole (12) . . . . .	70
2.2.3.3	Synthèse du 4-MO-OPA (5-a) . . . . .	71
2.2.4	Conclusion sur la voie de synthèse du 4-HO-OPA à partir du 3,4-diméthylphénol . . . . .	72
2.3	Stratégie de synthèse selon SINGH et KHADE . . . . .	73
2.3.1	Synthèse optimisée du 4-MO-OPA à partir de l'acide 3-méthoxybenzoïque . . . . .	73
2.3.1.1	Synthèse du 6-méthoxyphthalide (14) . . . . .	73
2.3.1.2	Synthèse du (4-méthoxy-1,2-phénylène)- diméthanol (15) . . . . .	76
2.3.1.3	Synthèse du 4-MO-OPA (5-a) . . . . .	76
2.3.2	Conclusion sur la voie de synthèse du 4-HO-OPA à partir de l'acide 3-méthoxybenzoïque . . . . .	77
2.4	Conclusion . . . . .	77

## Chapitre A Section Expérimentale

	<b>Protocoles de synthèse du 4-HO-OPA</b>	<b>79</b>
A.1	Synthèse à partir de l'alcool furfurylique . . . . .	79
A.1.1	2-((prop-2-ynyloxy)méthyl)furane (2) . . . . .	79
A.1.2	4,5-dihydrobenzofuran-5-ol (3) . . . . .	80
A.1.3	5-méthoxy-4,5-dihydrobenzofurane (4-a) . . . . .	80
A.1.4	5-acétoxy-4,5-dihydrobenzofurane (4-b) . . . . .	81
A.1.5	5-(benzyloxy)-4,5-dihydroisobenzofurane (4-c) . . . . .	82
A.1.6	<i>tert</i> -butyl((4,5-dihydroisobenzofuran-5-yl)oxy)- diméthylsilane (4-d) . . . . .	83
A.1.7	((4,5-dihydroisobenzofuran-5-yl)oxy)triméthyl- silane (4-e) . . . . .	83
A.1.8	4-MO-OPA (5-a) . . . . .	84
A.1.9	4-HO-OPA (6) . . . . .	85
A.1.10	4-HO-OPA (6) oxydation directe . . . . .	85
A.2	Synthèse à partir du 3,4-diméthylphénol . . . . .	86
A.2.1	1,2-bis(bromométhyl)benzène (8) . . . . .	86
A.2.2	3,4-diméthylanisole (11) . . . . .	87
A.2.3	3,4-di(bromométhyl)anisole (12) . . . . .	88

A.2.4	4-MO-OPA (5-a) . . . . .	88
A.3	Synthèse à partir de l'acide 3-méthoxybenzoïque . . .	89
A.3.1	6-méthoxyphthalide (14) . . . . .	89
A.3.2	(4-méthoxy-1,2-phénylène)diméthanol (15) . .	90
A.3.3	4-MO-OPA (5-a) . . . . .	91
<b>Chapitre 3</b>	<b>Analyses spectroscopiques en solution aqueuse de l'histamine en présence d'OPA et de 4-MO-OPA par UV et fluorescence moléculaire</b>	<b>92</b>
3.1	Analyse de l'histamine en présence d'OPA ou de 4-MO-OPA . . . . .	93
3.1.1	Étude par spectroscopie UV et fluorescence moléculaire des complexes OPA/histamine . . . . .	94
3.1.1.1	Première approche : détermination des paramètres expérimentaux . . . . .	94
3.1.1.2	Détermination des paramètres optimaux de complexation (pH, rapport de concentration OPA/histamine, temps de complexation) . . . . .	95
3.1.1.2.1	Évaluation de l'influence du pH	96
3.1.1.2.2	Rapport de concentration ( $R_{OPA/histamine}$ ) . . . . .	99
3.1.1.2.3	Étude de la cinétique . . . . .	101
3.1.1.3	Détermination des propriétés des complexes OPA/histamine dans les conditions optimales de fluorescence moléculaire . . . . .	104
3.1.1.3.1	Gamme de concentration avec réponse linéaire . . . . .	104
3.1.1.3.2	Limite de détection et de quantification . . . . .	106
3.1.2	Étude par spectroscopie UV et fluorescence moléculaire des complexes 4-MO-OPA/histamine . . . . .	108
3.1.2.1	Première approche : détermination des paramètres expérimentaux . . . . .	108
3.1.2.2	Détermination des paramètres optimaux de complexation (pH, rapport de concentration 4-MO-OPA/histamine, temps de complexation) . . . . .	109
3.1.2.2.1	Évaluation de l'influence du pH	109

3.1.2.2.2	Rapport de concentration ( $R_{4\text{-MO-OPA/histamine}}$ ) . . . . .	112
3.1.2.2.3	Étude de la cinétique . . . . .	114
3.1.2.3	Détermination des propriétés des complexes 4-MO-OPA/histamine dans les conditions optimales de fluorescence moléculaire . . . . .	116
3.1.2.3.1	Gamme de concentration avec réponse linéaire . . . . .	117
3.1.2.3.2	Limite de détection . . . . .	118
3.1.3	Comparaison des résultats obtenus sur l'OPA et le 4-MO-OPA en présence d'histamine . . . . .	119
3.2	Analyse spectroscopique d'un mélange d'AB . . . . .	120
3.2.1	Analyse des AB individuellement . . . . .	121
3.2.1.1	Agmatine . . . . .	121
3.2.1.2	Cadavérine, Putrescine et Spermidine . . . . .	123
3.2.2	Mélange d'AB . . . . .	126
3.2.2.1	Analyse de l'histamine en présence d'OPA dans un mélange d'AB . . . . .	126
3.2.2.2	Analyse de l'histamine en présence d'4-MO-OPA dans un mélange d'AB . . . . .	127
3.2.3	Comparaison des résultats d'analyse de l'histamine dans un mélange . . . . .	128
3.3	Analyse de l'histamine dans un échantillon réel . . . . .	129
3.4	Conclusion . . . . .	130
<b>Chapitre B Section Expérimentale</b>		
<b>Protocoles d'analyses par UV et fluorescence moléculaire des AB</b>		<b>133</b>
<b>Chapitre 4 Synthèses et caractérisations des QD</b>		<b>134</b>
4.1	Synthèses et caractérisations de QD de CdSe stabilisés par MSA (système direct) . . . . .	135
4.1.1	Synthèses de QD de CdSe stabilisé par MSA . . . . .	135
4.1.1.1	Synthèse des précurseurs de sélénium . . . . .	136
4.1.1.2	Synthèses des précurseurs de cadmium . . . . .	136
4.1.1.3	Synthèses des QD de cadmium et sélénium . . . . .	136
4.1.2	Caractérisation des QD de CdSe/MSA . . . . .	138
4.1.3	Propriétés optiques : Spectres d'absorption et d'émission . . . . .	138

4.1.3.1	Caractérisations des QD obtenus par voie thermique . . . . .	140
4.1.3.2	Caractérisations des QD obtenus par irradiation micro-ondes . . . . .	142
4.1.3.3	Caractérisations des QD obtenus par activation sonochimique . . . . .	143
4.1.3.4	Comparaison des diamètres de cœur et des longueurs d'onde d'émission des QD de CdSe/MSA obtenues par les trois modes d'activation . . . . .	144
4.1.4	Propriétés structurales : Diffraction des Rayons X (DRX) et Spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES) . . . . .	145
4.1.4.1	Analyses par DRX . . . . .	145
4.1.4.2	Analyses par ICP-AES . . . . .	147
4.1.5	Comparaison des résultats de caractérisation de QD avec la littérature . . . . .	148
4.1.5.1	Informations complémentaires . . . . .	149
4.2	Bilan et perspectives de synthèses de QD fonctionnalisés avec l'OPA . . . . .	150
4.3	Conclusion . . . . .	152
<b>Chapitre C Section Expérimentale</b>		
	<b>Protocoles de synthèse des QD</b>	<b>153</b>
C.1	Synthèse des précurseurs de NaHSe . . . . .	153
C.2	Synthèse des précurseurs de Cd <sup>2+</sup> /MSA . . . . .	153
C.3	Synthèse des QD CdSe/MSA . . . . .	153
	<b>Conclusion générale</b>	<b>155</b>
	<b>Perspectives</b>	<b>157</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>159</b>
	<b>Annexe I Matériel et méthodes</b>	<b>179</b>
	<b>Annexe II Publication</b>	<b>181</b>
	<b>Table des matières</b>	<b>188</b>