

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE MOLECULES, MATIERES ET MATERIAUX (3MPL)

Année 2014

Nanomatériaux moléculaires fluorescents et magnétiques pour la bio-imagerie multi-échelle

THÈSE DE DOCTORAT
Discipline : Chimie
Spécialité : Sciences des matériaux

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Adrien FAUCON

Le 22 octobre 2014, devant le jury ci-dessous

Président	Bruno BUJOLI, Directeur de recherche CNRS, Université de Nantes
Rapporteurs	Sylvie BÉGIN-COLIN, Professeur des universités, Université de Strasbourg Chantal ANDRAUD, Directrice de recherche CNRS, Ecole Normale Supérieure de Lyon
Examineurs	Alain LAURENT, Docteur, Société Biomérieux Jérôme FRESNAIS, Chargé de recherche CNRS, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6 Bruno BUJOLI, Directeur de recherche CNRS, Université de Nantes

Directeur de thèse : Professeur des universités Eléna ISHOW

*Merci à Solène,
à ma famille,
à mes ami(e)s
pour leurs soutiens*

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire Chimie Et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse, Modélisation (CEISAM), dirigé par le *Docteur Bruno BUJOLI* que je remercie pour m'avoir accueilli au sein de ce laboratoire. Je tiens à exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance au *Professeur Eléna ISHOW*. Merci Eléna pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe, pour ta confiance, la possibilité de participer à une multitude de conférences, pour ta perpétuelle disponibilité, ton immense enthousiasme, la richesse de nos discussions scientifiques. Je n'oublie bien évidemment pas toute l'aide ainsi que les corrections apportées pour faire de ce manuscrit ce à quoi il ressemble aujourd'hui.

Mes remerciements suivants sont dirigés vers les membres de mon jury pour avoir accepté de juger ce travail de thèse et pour leurs temps passé. Je remercie ainsi les deux rapporteurs de ce travail de thèse, le *Professeur Sylvie BÉGIN-COLIN* et le *Docteur Chantal ANDRAUD*, ainsi que mes trois examinateurs, le *Docteur Alain LAURENT*, le *Docteur Jérôme FRESNAIS* et le *Docteur Bruno BUJOLI*.

Il est évident que ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans l'aide, la disponibilité et la qualité d'un très grand nombre de personnes rencontrées lors des différentes collaborations que j'ai eu la chance d'effectuer. J'espère que cette liste sera exhaustive et m'excuse pour les éventuels oublis. Je tiens ainsi à remercier le *Docteur Tristan DOUSSINEAU* pour les études par spectrométrie de masse ainsi que son enthousiasme ; le *Docteur Jérôme FRESNAIS* pour les études préliminaires de magnétisme ainsi que pour la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer ; le *Docteur Philippe HULIN* et le *Docteur Steven NEDELLEC* pour les études de microscopie confocale, de biologie, pour leurs investissements impressionnants, leurs disponibilités et la multitude d'échanges scientifiques d'une très grande qualité ; le *Professeur Fabrice FLEURY* et le *Docteur Houda BENHELLI-MOKRANI* pour avoir pris de leurs temps et m'avoir formé à la culture cellulaire et à la biologie de manière générale, ainsi que pour toutes les discussions et échanges indispensables à ma rapide formation en tant que chimiste ; le *Docteur Eric GAUTRON* et *Nicolas GAUTIER* pour leurs expertises en microscopie électronique à transmission et leurs continuelles bonnes humeurs ; le *Professeur Alessandro LASCIALFARI* et le *Docteur Tomas ORLANDO* pour les études de relaxométrie, le *Docteur Luis CORDOVA JARA* pour une collaboration en biologie ; *Arnaud BROSSEAU* pour ses compétences en fluorescence résolue en temps et sa disponibilité ; le *Docteur Thomas MALDINEY* pour la richesse des échanges, sa disponibilité et pour son aide lors des études *in vivo* ; *Myriam ROBARD* et *Stéphanie BLANDIN* pour les études histologiques.

Je tiens également à remercier chaleureusement toute l'aide qui m'a été apportée au sein du laboratoire par tous ses membres, pour leurs grandes disponibilités, la qualité des résultats et des échanges. A ce titre je tiens à remercier le *Docteur Lénaïc Lartigue* pour son aide dans la rédaction de ce manuscrit, la richesse des discussions scientifiques ainsi que pour les analyses et interprétations de magnétisme ; le *Docteur Clémence QUEFFELEC* pour son aide de tous les jours au laboratoire et sa perpétuelle bonne humeur ; le *Professeur Denis JACQUEMIN* pour les études de modélisation moléculaire ; le *Docteur Jérôme GRATON* pour les analyses IR ; le *Docteur Virginie SILVESTRE* pour les analyses RMN ; et *Julie HEMEZ* pour les analyses par spectrométrie de masse.

Remerciements

Je remercie vivement également tous les doctorants avec lesquels j'ai eu le plaisir de travailler, d'échanger, avec une pensée particulière pour *Caroline BALLET*, *Mariane AUDDO*, *Christophe AUBÉ*, *Kristen SNELL*, *Simon OLIVIER*, *Pauline GIRARD*, *Yoan BRISSONNET*, *Romy VOMIANDRY* et *Ludovic FAVEREAU*.

Je souhaite également remercier tous les différents stagiaires qui ont apporté une contribution importante à ce travail de thèse, avec notamment *Romarc LENK* (M2), *Damien HEYNARD* (IUT) et *Aurore MICHAUD* (M1) pour sa motivation sans faille ; ainsi que tous les stagiaires de l'équipe qui ont pu contribuer à une ambiance agréable au laboratoire, avec une pensée particulière pour *Florian CHARRIER* (M1), *Estelle CHAEFFER* (IUT) et *Valentin JOUBERT* (M1).

Je tiens également à étendre mes remerciements à toutes les personnes du laboratoire CEISAM, pour leur bonne humeur, leur investissement, ainsi que toutes les personnes des différents laboratoires avec lesquels j'ai eu la chance de collaborer.

Merci

Introduction générale	1
Chapitre I : Bibliographie et état de l'art	7
1.1 Introduction	10
1.2 Rappels de photophysique	11
1.2.1 La luminescence	11
1.2.2 L'absorption de photons	11
1.2.2.1 Absorption monophotonique	12
1.2.2.2 Absorption biphotonique	13
1.2.3 L'émission de photons	15
1.2.3.1 Temps de vie de l'état excité	16
1.2.3.2 Rendement quantique de fluorescence et brillance	17
1.2.4 Phénomène d'extinction de fluorescence	18
1.2.4.1 Extinction dynamique de fluorescence	18
1.2.4.2 Extinction statique de fluorescence	18
1.2.5 Conclusion	19
1.3 Rappels de nanomagnétisme	20
1.3.1 Propriétés des matériaux massifs	20
1.3.2 Matériaux monodomaines	22
1.3.3 Superparamagnétisme	22
1.3.4 L'imagerie par résonance magnétique (IRM)	24
1.3.5 Exaltation des propriétés magnétiques	26
1.3.6 Conclusion	27
1.4 Les grandes familles de fluorophores	28
1.4.1 Les complexes de lanthanides	28
1.4.2 Les quantum dots (QDs)	29
1.4.3 Les fluorophores organiques	30
1.5 Elaboration de nanoassemblages magnéto-fluorescents	32
1.5.1 Synthèse et dopage de nanoparticules inertes	33
1.5.1.1 Synthèse de nanoparticules de silice	33
1.5.1.2 Dopage de nanoparticules inertes	33
1.5.2 Greffage sur des plateformes nanométriques	35
1.5.2.1 Utilisation d'un cœur de silice comme plateforme d'assemblage	35
1.5.2.2 Fonctionnalisation d'un cœur inorganique par des petites molécules	36
1.5.2.3 Fonctionnalisation d'un cœur inorganique par des macromolécules : vers les structures de type cœur-coquille	37
1.6 Auto-assemblages	40
1.6.1 Auto-assemblages d'entités fluorescentes	40
1.6.1.1 Les nanoparticules polymériques conjuguées, PDots	40
1.6.1.2 Les nanosphères organiques fluorescentes, les FON	41
Principe et conditions d'obtention de nanosphères fluorescentes	42
Exemples de structures moléculaires et pré-requis photophysiques	42
Relargage et post-fonctionnalisation	43
1.6.2 Auto-assemblages d'entités magnétiques	44
1.6.3 Auto-assemblages magnéto-fluorescents	45
1.6.3.1 Assemblages par interactions coulombiennes	45
1.6.3.2 Assemblages hydrophobes : utilisation de liposomes	45

1.6.3.3	Utilisation de polymères amphiphiles	46
1.6.4	Notre approche : Utilisation de nanosphères fluorescentes comme plateformes	47
	Assemblages hybrides par liaisons électrostatiques	48
	Stabilisation du lien cœur / coquille : nanosphères chélatantes	50
1.7	Conclusion	51
1.8	Références bibliographiques	52
<i>Chapitre II : Synthèse et caractérisation de fluorophores pour l'obtention de nanosphères</i>		57
2.1	Introduction	59
2.2	Synthèse d'une chimiothèque de triarylamines encombrées	60
2.2.1	Couplage par une réaction de Knoevenagel	61
2.2.2	Estérification en condition douce, de type Steglich	62
2.3	Synthèse d'une chimiothèque de triarylamines complexantes	63
2.3.1	Utilisation d'unités acides carboxyliques comme groupes chélatants	63
2.3.1.1	Synthèse de la chaîne latérale	63
2.3.1.2	Couplage sur le cœur fluorescent	64
2.3.1.3	Déprotection de l'acide protégé	64
2.3.2	Utilisation d'unités acides phosphoniques comme groupes chélatants	65
2.3.2.1	Synthèse de la chaîne latérale	66
2.3.2.2	Couplage sur le cœur fluorescent	67
2.3.2.3	Déprotection de l'acide phosphonique protégé	67
2.3.2.4	Optimisation de la structure de la chaîne latérale, en série polaire	68
2.3.2.5	Optimisation de la structure de la chaîne latérale, en série apolaire	70
2.3.3	Extension aux acides gem-hydroxy-biphosphoniques	72
2.4	Influence de la structure sur les propriétés de fluorescence	75
2.4.1	Influence du transfert de charge intramoléculaire	75
2.4.2	Influence des groupes chélatants	77
2.4.3	Etude des liaisons hydrogène intramoléculaires par analyse thermique	78
2.4.4	Analyses par spectroscopies infrarouge et RMN	79
2.4.5	Modélisation moléculaire et études conformationnelles	82
2.5	Repliements intramoléculaires des dérivés d'acides phosphoniques	84
2.5.1	Influence de la polarité de la chaîne latérale	84
2.5.2	Modification de la distance entre l'unité à transfert de charge intramoléculaire et le groupe chélatant	85
2.5.3	Etude des composés modèles avec des fonctions acides protégées	86
2.5.4	Influence de la chaîne latérale sur le déclin de fluorescence	88
2.6	Etude de complexation avec différents sels métalliques	91
2.6.1	Complexation en milieu organique avec des ions fer (III)	91
2.6.1.1	Etudes comparatives des complexes formés par spectroscopie d'absorption	93
2.6.1.2	Etudes comparatives des complexes formés par spectrofluorimétrie	94
2.6.1.3	Calcul des constantes d'extinction de Stern-Volmer et des constantes de complexation	95
2.6.2	Complexation en milieu organique avec des ions Ca (II)	99
2.6.3	Validation mécanistique par mesure de fluorescence résolue en temps	100
2.6.3.1	Mécanisme pour le composé acide carboxylique fdcooh (8)	101
2.6.3.2	Mécanisme pour les acides phosphoniques	102

Table des matières

Etude d'extinction de fluorescence pour le composé fpoh (13) :	102
Etude d'extinction de fluorescence en fonction de la polarité de la chaîne latérale :	103
Etude d'extinction de fluorescence lors de l'augmentation de la longueur de la chaîne latérale :	104
Etude d'extinction de fluorescence lors de l'ajout de sel de calcium (II) :	104
2.7 Conclusion	106
2.8 Références bibliographiques	107
<i>Chapitre III : Utilisation de nanosphères comme plateformes d'assemblages hybrides</i>	<i>111</i>
3.1 Introduction	113
3.2 Formation de nanosphères chélatantes par nano-précipitation	114
3.2.1 Principe	114
3.2.2 Propriétés physico-chimiques	117
3.2.3 Approche mécanistique	120
3.2.4 Etude d'extinction de fluorescence des nanosphères par ajout de sel métallique	122
3.2.4.1 Etude en fonction de sel de fer (III)	122
3.2.4.2 Etude en fonction d'autres sels métalliques	124
3.3 Formation d'assemblages hybrides magnéto-fluorescents	126
3.3.1 Synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer et stabilisation	126
3.3.1.1 Synthèse	126
3.3.1.2 Stabilisation	128
3.3.1.3 Notion de furtivité en condition physiologique	129
3.3.2 Greffage de nanoparticules d'oxyde de fer en surface de nanosphères	130
3.3.2.1 Formation in situ de nanoassemblages magnéto-fluorescents	130
3.3.2.2 Post-fonctionnalisation de nanosphères par des nanoparticules d'oxyde de fer	131
3.3.2.3 Etude d'extinction de fluorescence en présence de nanoparticules d'oxyde de fer	133
3.4 Stabilisation colloïdale d'assemblages hybrides	136
3.4.1 Utilisation de petites molécules chargées	136
3.4.1.1 Stabilisation à l'aide de citrate de sodium	136
3.4.1.2 Stabilisation à l'aide de petites molécules fluorescentes	138
3.4.2 Utilisation d'un polyélectrolyte	141
3.4.2.1 Stabilisation colloïdale de l'assemblage fluo@mag	141
3.4.2.2 Influence de la taille du polyélectrolyte	143
3.4.2.3 Caractérisation de la couche stabilisante	144
3.4.2.4 Lyophilisation, stockage et stabilité	145
3.5 Caractérisations structurales et physico-chimiques des nanoassemblages	148
3.5.1 Propriétés photophysiques	148
3.5.1.1 Etudes des nanoassemblages dans l'acide nitrique	148
3.5.1.2 Etudes des nanoassemblages stabilisés par le PAA dans l'eau	150
3.5.2 Etudes par spectrométrie de masse	152
3.5.3 Etudes des propriétés magnétiques et phénomène d'exaltation	156
3.5.3.1 Aimantation globale du système et sédimentation magnétique	156
3.5.3.2 Relaxivité et effets additifs	158
3.6 Conclusion et perspectives	160
3.7 Références bibliographiques	161

Chapitre IV : Nanoassemblages hybrides comme outils d'imagerie et de diagnostic médical	163
4.1 Introduction	165
4.2 Internalisation <i>in vitro</i> d'assemblages hybrides	166
4.2.1 Influence de la stabilisation des nanoassemblages : petites molécules vs polyélectrolytes	166
4.2.1.1 Internalisation en fonction du temps.	167
4.2.1.2 Etude de toxicité	170
4.2.1.3 Localisation des assemblages à l'intérieur des cellules	172
4.2.1.4 Quantification des nanoassemblages internalisés	175
4.2.1.5 Etude par microscopie électronique	177
4.2.1.6 Etudes photophysiques intra-cellulaires	178
4.2.2 Etudes d'internalisation en fonction de la nature des nanosphères	180
4.2.2.1 Internalisation de nanosphères ionisables	180
4.2.2.2 Internalisation de nanosphères non ionisables hydrophobes	182
4.2.2.3 Etude de dégradation de nanosphères hydrophobes en présence de macrophages.	184
4.3 Internalisation <i>in vivo</i> d'assemblages hybrides	187
4.3.1 Imagerie par résonance magnétique (IRM)	187
4.3.2 Analyse <i>ex vivo</i> de la biodistribution des nanoassemblages injectés	189
4.3.2.1 Etudes par microscopie de fluorescence à excitation monophotonique	189
4.3.2.2 Etudes par microscopie de fluorescence à excitation biphotonique	191
4.3.2.3 Etudes par microscopie électronique à transmission (MET)	193
4.4 Conclusion	195
4.5 Références bibliographiques	196
Chapitre V : Vers une post-fonctionnalisation et un assemblage bimétallique	199
5.1 Introduction	201
5.2 Post fonctionnalisation et ciblage	202
5.2.1 Fonctionnalisation des macromolécules de PAA	202
5.2.2 Stabilisation des nanoassemblages à l'aide de PAA fonctionnalisés	206
5.2.3 Greffage sur les nanoassemblages	209
5.3 Conclusion	213
5.4 Références bibliographiques	214
Conclusion générale	215
Chapitre VI : Partie expérimentale	219
6.1 Méthodes générales	221
6.2 Instrumentations	222
6.2.1 Analyses moléculaire	222
6.2.2 Analyses et caractérisations de nanoparticules	224
6.2.3 Microscopie de fluorescence	225
6.3 Synthèse organique de fluorophores	226
6.4 Fonctionnalisation de polymères et biomolécules	241

Table des matières

6.5	Synthèse de nanoparticules et stabilisation	242
6.6	Etudes biologiques <i>in vitro</i>	244
6.7	Etudes biologiques <i>in vivo</i>	248
6.8	Références bibliographiques	250

Introduction générale

Une étape de diagnostic s'avère primordiale pour déterminer et adapter le traitement à suivre dans le cas d'une carence quelconque ou d'une pathologie bien précise. Bien souvent, ces étapes sont réalisées de manière non-invasive, c'est-à-dire qu'elles ne nécessitent ni prélèvement de tissus, ni opération profonde. Une prise de sang peut être effectuée, mais l'utilisation d'imagerie médicale s'avère parfois indispensable pour la détection de tumeurs par exemple. Historiquement, l'utilisation de rayons X, par Wilhelm Röntgen pour la première fois en 1895, a ouvert la voie à une multitude de techniques d'imagerie médicale. La découverte des propriétés radioactives de certains éléments a permis l'émergence de la scintigraphie, où une émission α , β ou γ obtenue à partir d'éléments radioactifs permettra de détecter *in vivo* une zone assez réduite après injection par voie systémique d'un complexe radioactif. Dans ce dernier cas, un agent de contraste moléculaire est indispensable et le développement de ces agents a permis l'émergence de nouvelles techniques d'imagerie, plus sensibles et mieux résolues.

Depuis la fin des années 1960, l'idée d'utiliser la résonance magnétique nucléaire (IRM) à des fins médicales a été émise par le Prof. Raymond Vahan Damadian et tend aujourd'hui à se démocratiser dans les hôpitaux. Cette technique repose sur l'étude de la perturbation des protons de l'eau, en interaction avec un champ magnétique statique externe. L'utilisation d'agents de contraste est toutefois nécessaire pour accroître le contraste entre les zones saines et les zones lésées ou tumorales, chacune étant caractérisée par un signal propre des molécules d'eau qui y sont présentes. Différents types d'agents de contraste sont désormais employés tels que des complexes de gadolinium^{1,2}, commercialisés sous le nom de DOTAREM®. Il est également possible de détecter une émission de photons grâce à la microscopie de fluorescence, principalement utilisée *in vitro*, en raison de la faible transparence des tissus vis-à-vis d'une irradiation dans le domaine du visible.

La limitation actuelle des systèmes de diagnostic *in vivo* repose sur un manque de sensibilité autant que de résolution. En effet, l'utilisation d'agents moléculaires fluorescents conduit à une résolution et à une sensibilité insuffisantes pour détecter des cellules tumorales circulantes. Le cancer, maladie qui affectera 1 homme sur 2 ou 1 femme sur 3 avant 85 ans correspond à l'un des plus grands défis à ce jour. Le principal traitement consiste en une exérèse chirurgicale de la tumeur, associée à un traitement de type chimio- ou radiothérapie pour éliminer les tumeurs les plus petites, non détectées par radiologie. L'objectif est bien celui d'une détection de tumeurs de plus en plus petites, et ce jusqu'aux métastases. A défaut de pouvoir toutes les éliminer par intervention chirurgicale, les détruire *in situ* semble être une solution d'avenir efficace. Certaines tumeurs, comme les tumeurs cérébrales et le glioblastome pour être plus précis, sont également difficiles à opérer. De plus, l'amélioration du confort du patient tend à réduire les doses d'agents de contraste injectés, limitant par la même occasion les effets secondaires.

En réponse à ces limites de détection et de sensibilité, la notion de multimodalité a émergé ces dernières années. La possibilité de détecter un événement ou un corps étranger de manière simultanée par deux ou plusieurs techniques croisées permet de diminuer fortement le nombre de faux positifs. Il est également intéressant et nécessaire de combiner ces techniques, permettant l'analyse d'un échantillon à des échelles de tailles variables.

Introduction générale

Le domaine des nanosciences, initialement évoqué par Richard Feynman en 1959, continue de promettre de grandes avancées scientifiques et technologiques. Autrefois utilisées comme pigments dans l'Antiquité, les nanoparticules ont émergé comme de nouveaux agents de diagnostic mais également de thérapie biomédicale. Avant de s'interroger sur la raison et la nécessité de développer de nouveaux outils nanoparticulaires pour la détection de maladies ou de processus biologiques, il nous faut rappeler que les nanoparticules ont également été largement utilisées dans bien d'autres domaines. Nous pouvons par exemple citer le domaine du stockage optique de l'information^{3,4}, celui de lutte contre la pollution, ou encore celui de détection d'agents chimiques.

De très nombreuses nanoparticules, notamment des nanoparticules métalliques, sont actuellement étudiées comme agents potentiels de diagnostic médical. Les nanoparticules d'or⁵ ont été parmi les premières utilisées et sont actuellement largement employées pour détecter et quantifier des interactions ligand - protéine par exemple, technique employant historiquement des surfaces d'or fonctionnalisées par des anti-corps et connue sous le nom de BIACORE™. Il s'agit d'utiliser les nanoparticules d'or également fonctionnalisées par des anti-corps ou des brins d'ADN et de jouer sur leur état d'agrégation ou de reconnaissance conduisant à des changements de couleur par modification de l'énergie de résonance de la bande plasmonique.

Ainsi, l'utilisation de nanoassemblages, combinant des propriétés de luminescence et de magnétisme permet, grâce à l'IRM, de détecter ces objets à une échelle millimétrique au sein d'un corps entier puis, après une étape de biopsie, de localiser ces mêmes nano-objets au sein des cellules elles-mêmes. La corrélation entre ces deux techniques rend l'observation et le diagnostic final plus précis et plus fiables. Outre le gain de résolution spatiale que peuvent apporter les nanoparticules, la limite de détection est grandement abaissée. En effet, l'utilisation d'objets de taille nanométrique fonctionnalisés ou composés intrinsèquement de molécules luminescentes limite l'effet de dilution des luminophores lorsqu'ils sont injectés par voie systémique, et permet d'augmenter le temps de circulation dans l'organisme. La densité de molécules émissives étant grandement augmentée, une brillance très supérieure pourra être obtenue, autorisant ainsi l'étude d'organes très autofluorescents comme le foie.

Plus récemment, le terme « nanomédecine » a été créé au vu des avancées technologiques que les nanoparticules ont suscitées⁶. Ce nouveau domaine scientifique soulève toutefois des interrogations et des incompréhensions au niveau de la société tout entière (cliniciens, patients, sociétés pharmaceutiques...). Le faible recul sur les apports de la nanomédecine à la médecine plus traditionnelle, couplé au principe de précaution, rend difficile aujourd'hui encore le transfert technologique de nano-vecteurs vers le monde socio-économique.

Pour notre part, nous nous sommes intéressés aux nanoparticules d'oxyde de fer, connues dans la littérature pour leur faible toxicité^{7,8}, en raison d'une quantité importante en ions fer intrinsèquement présente dans tous les organismes vivants, à l'inverse du gadolinium actuellement utilisé en clinique pour l'IRM. Après injection systémique de cet agent de contraste fonctionnalisé par un agent de ciblage, il devient également possible d'imager la zone d'intérêt ou un phénomène biologique donné chez le patient.

C'est dans ce contexte très général que s'inscrit ce travail de thèse. L'ensemble des études présentées tout au long de ce manuscrit aura pour but de développer de nouvelles sondes nanométriques pour l'imagerie médicale, permettant de combiner deux propriétés distinctes, la

fluorescence et le magnétisme et d'ouvrir la voie vers des méthodes d'investigation non invasives. Il s'agira de s'intéresser à l'élaboration et aux études physico-chimiques de nanoparticules bimodales avec une attention toute particulière portée à la compréhension fine de leurs mécanismes de formation et de leurs interactions aussi bien entre elles qu'avec leur environnement.

Notre approche, qui sera développée tout au long de ce manuscrit, a été de préparer des nano-assemblages fluorescents constitués de petites molécules organiques. Après un phénomène de nano-précipitation, ces fluorophores organiques vont s'auto-assembler spontanément en milieu aqueux et de manière non covalente sous forme de nanoparticules organiques fluorescentes (FON). Ces nano-objets auront pour principal avantage d'émettre une fluorescence indépendante de l'environnement. Il sera alors possible d'imager tout type de cellules ou d'organes, possédant des micro-environnements différents, comme l'environnement tumoral, caractérisé par un pH anormalement acide, qui peut provoquer une extinction de fluorescence. Une fois obtenue, ces nanosphères organiques seront décorées en surface par des nanoparticules d'oxyde de fer via la présence de groupes complexant. La présence d'un nombre important de nanoparticules superparamagnétiques assemblées autour d'un même objet va permettre d'exalter la réponse magnétique de ces systèmes, comparée à celles des unités constitutives.

Cette combinaison de propriétés magnétiques et fluorescentes va nous permettre de diminuer la quantité d'agents de contrastes couramment utilisés et ainsi de diminuer la toxicité inhérente à tout agent étranger introduit dans le corps d'un patient. Différentes architectures d'agent de contraste ont pu être développées ces dernières années, chacune possédant des avantages et des inconvénients propres. Nous nous sommes intéressés à la préparation de structures nanométriques simples et originales, non encore développées par la communauté scientifique. En effet, un nouveau débat a émergé ces dernières années au sein de la communauté scientifique sur la notion de complexité des assemblages aujourd'hui élaborés⁹. Cette complexité entraîne une augmentation du nombre d'étapes de synthèse et de purification, générant des coûts supplémentaires. Les études de toxicité de chaque constituant ainsi que de leur devenir *in vivo* se compliquent et diminuent la probabilité de promouvoir l'exploitation future d'agents de diagnostic, ou de théranostique. Un compromis entre la complexité et la finalité de l'assemblage doit alors être trouvé.

Nous allons nous intéresser dans le premier chapitre aux architectures couramment utilisées ou en cours de développement par la communauté scientifique afin de comprendre les pré-requis nécessaires à l'obtention d'agents de contraste efficaces. Dans le second chapitre, nous nous intéresserons à optimiser et à caractériser la partie fluorescente des objets visés avant de nous attacher dans le troisième chapitre à comprendre les interactions mises en jeu avec la partie magnétique et l'influence du procédé de stabilisation colloïdale pour aboutir à une biocompatibilité des nanoassemblages en milieu physiologique. Enfin, les quatrième et cinquième chapitres seront consacrés aux études *in vitro* et *in vivo* effectuées, suivies d'études de post-fonctionnalisation, démontrant ainsi tout l'intérêt de la multimodalité des systèmes élaborés.

Pour conclure, trois critères principaux vont guider nos choix tout au long de ce manuscrit, une forte densité en unités actives pour éviter tout phénomène de dilution, une simplicité de fabrication et une stabilité dans tout type de milieu, principalement les milieux biologiques.

Références bibliographiques

- (1) Rowe, M. D.; Thamm, D. H.; Kraft, S. L.; Boyes, S. G. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 983–993.
- (2) Guenoun, J.; Ruggiero, A.; Doeswijk, G.; Janssens, R. C.; Koning, G. A.; Kotek, G.; Krestin, G. P.; Bernsen, M. R. *Contrast Media Mol. Imaging* **2013**, *8*, 165–174.
- (3) Kim, S.; Yoon, S.-J.; Park, S. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12091–12097.
- (4) Yoon, S.-J.; Chung, J. W.; Gierschner, J.; Kim, K. S.; Choi, M.-G.; Kim, D.; Park, S. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13675–13683.
- (5) Saha, K.; Agasti, S. S.; Kim, C.; Li, X.; Rotello, V. M. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2739–2779.
- (6) Riehemann, K.; Schneider, S. W.; Luger, T. A.; Godin, B.; Ferrari, M.; Fuchs, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 872–897.
- (7) Couto, D.; Freitas, M.; Vilas-Boas, V.; Dias, I.; Porto, G.; Lopez-Quintela, M. A.; Rivas, J.; Freitas, P.; Carvalho, F.; Fernandes, E. *Toxicol. Lett.*
- (8) Iversen, N. K.; Frische, S.; Thomsen, K.; Laustsen, C.; Pedersen, M.; Hansen, P. B.; Bie, P.; Fresnais, J.; Berret, J.-F.; Baatrup, E. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2012**.
- (9) Cheng, Z.; Zaki, A. A.; Hui, J. Z.; Muzykantov, V. R.; Tsourkas, A. *Science* **2012**, *338*, 903–910.

Chapitre I : Bibliographie et état de l'art

Chapitre I : Bibliographie et état de l'art	7
1.1 Introduction	10
1.2 Rappels de photophysique	11
1.2.1 La luminescence	11
1.2.2 L'absorption de photons	11
1.2.2.1 Absorption monophotonique	12
1.2.2.2 Absorption biphotonique	13
1.2.3 L'émission de photons	15
1.2.3.1 Temps de vie de l'état excité	16
1.2.3.2 Rendement quantique de fluorescence et brillance	17
1.2.4 Phénomène d'extinction de fluorescence	18
1.2.4.1 Extinction dynamique de fluorescence	18
1.2.4.2 Extinction statique de fluorescence	18
1.2.5 Conclusion	19
1.3 Rappels de nanomagnétisme	20
1.3.1 Propriétés des matériaux massifs	20
1.3.2 Matériaux monodomaines	22
1.3.3 Superparamagnétisme	22
1.3.4 L'imagerie par résonance magnétique (IRM)	24
1.3.5 Exaltation des propriétés magnétiques	26
1.3.6 Conclusion	27
1.4 Les grandes familles de fluorophores	28
1.4.1 Les complexes de lanthanides	28
1.4.2 Les quantum dots (QDs)	29
1.4.3 Les fluorophores organiques	30
1.5 Elaboration de nanoassemblages magnéto-fluorescents	32
1.5.1 Synthèse et dopage de nanoparticules inertes	33
1.5.1.1 Synthèse de nanoparticules de silice	33
1.5.1.2 Dopage de nanoparticules inertes	33
1.5.2 Greffage sur des plateformes nanométriques	35
1.5.2.1 Utilisation d'un cœur de silice comme plateforme d'assemblage	35
1.5.2.2 Fonctionnalisation d'un cœur inorganique par des petites molécules	36
1.5.2.3 Fonctionnalisation d'un cœur inorganique par des macromolécules : vers les structures de type cœur-coquille	37
1.6 Auto-assemblages	40
1.6.1 Auto-assemblages d'entités fluorescentes	40
1.6.1.1 Les nanoparticules polymériques conjuguées, PDots	40
1.6.1.2 Les nanosphères organiques fluorescentes, les FON	41
Principe et conditions d'obtention de nanosphères fluorescentes	42
Exemples de structures moléculaires et pré-requis photophysiques	42
Relargage et post-fonctionnalisation	43
1.6.2 Auto-assemblages d'entités magnétiques	44
1.6.3 Auto-assemblages magnéto-fluorescents	45
1.6.3.1 Assemblages par interactions coulombiennes	45
1.6.3.2 Assemblages hydrophobes : utilisation de liposomes	45
1.6.3.3 Utilisation de polymères amphiphiles	46

1.6.4	Notre approche : Utilisation de nanosphères fluorescentes comme plateformes	47
	Assemblages hybrides par liaisons électrostatiques	48
	Stabilisation du lien cœur / coquille : nanosphères chélatantes	50
1.7	Conclusion	51
1.8	Références bibliographiques	52

1.1 Introduction

Avant d'aborder les différentes architectures développées au sein de la communauté scientifique pour obtenir des assemblages magnéto-fluorescents, il semble intéressant de rappeler quelques notions fondamentales.

Nous débuterons dans une première partie par un bref rappel de photophysique pour mieux comprendre et analyser les résultats obtenus par la suite. La luminescence sera alors décrite, ainsi que les différents processus pouvant influencer sur la cinétique de relaxation de l'état excité. Dans une seconde partie, nous nous attacherons à effectuer un rappel de magnétisme comme introduction à la compréhension des interactions développées entre les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques et le milieu environnant.

Par la suite, nous présenterons les différents types d'assemblages habituellement fabriqués pour obtenir des nanosystèmes magnéto-fluorescents, en commençant par une rapide description des fluorophores les plus couramment utilisés pour la bio-imagerie. Nous nous intéresserons alors à des systèmes auto-assemblés, répondant mieux à notre cahier des charges visant à élaborer des systèmes stables, de taille nanométrique, de fabrication facile et rapide et comportant une forte densité en matériaux actifs.

Finalement, l'utilisation potentielle de nanoparticules organiques fluorescentes comme plateformes d'assemblages sera présentée.

1.2 Rappels de photophysique

Cette partie regroupe quelques rappels nécessaires pour comprendre et analyser les résultats obtenus lors de ces travaux de recherche et elle a été inspirée par le livre *Molecular Fluorescence*¹⁰, de B. Valeur.

1.2.1 La luminescence

Historiquement évoquée par le physicien et historien des sciences Eilhardt Wiedemann en 1888, la luminescence décrit une émission de photons qui n'a pas été provoquée par un échauffement de température, comme l'incandescence. Elle permet ainsi à une molécule portée dans son état électronique excité S_1 de relaxer vers son état électronique fondamental S_0 . Elle se caractérise donc par une émission de photon après absorption d'un autre photon de plus grande énergie. Nous nous intéresserons ici uniquement à la photoluminescence où la molécule cible a atteint cet état de plus haute énergie par absorption d'un photon. Cependant, d'autres types d'excitation peuvent être utilisés comme un champ électrique, l'électroluminescence, ou une réaction chimique comme l'oxydation, conduisant à la chimiluminescence.

La fluorescence qui sera décrite tout au long de ce manuscrit ne représente qu'une partie des processus de la luminescence. La spectroscopie et notamment la microscopie de fluorescence se sont fortement développées du fait de leur très grande sensibilité. La conception de luminophores, et plus particulièrement de fluorophores, a conduit à un vaste domaine d'applications¹¹ et d'études inexplorées, notamment à l'échelle de la molécule unique, d'où la large utilisation de molécules ou de matériaux émissifs comme sondes de phénomènes biologiques statiques et/ou dynamiques.

1.2.2 L'absorption de photons

L'interaction d'une onde électromagnétique avec la matière peut être résonante (absorption) ou non résonante (diffusion). Une molécule absorbe alors un rayonnement lorsque le quantum d'énergie fourni correspond exactement à la différence d'énergie entre deux de ses niveaux. A l'inverse, si une molécule voit ses niveaux modifiés sous l'effet d'une polarisation de son nuage électronique, le rayonnement est diffusé de manière inélastique avec gain ou perte d'énergie par rapport au rayonnement incident selon les niveaux initial et final de la molécule mis en jeu. On parle respectivement de bande anti-Stokes (gain d'énergie pour le rayonnement par émission d'un quantum vibrationnel ou rotationnel) et de bande Stokes (perte d'énergie pour le rayonnement par absorption d'un quantum vibrationnel ou rotationnel).

L'absorption d'un photon dans les domaines de l'UV-visible conduit à la promotion d'un électron d'une orbitale moléculaire (OM) à une autre de plus haute énergie. La molécule est alors portée de son état électronique fondamental S_0 vers un état électronique excité S_n de plus haute énergie (Figure 1a). Ce type de transition se déroule en 10^{-15} s environ. Comme le mouvement d'un électron est près de 1000 fois plus rapide que celui des noyaux (10^{-11} s à 10^{-13} s), la transition électronique est dite verticale. On parle de transition optique durant laquelle les noyaux n'ont pas le

1.2/ Rappels de photophysique

temps de bouger. La largeur des bandes d'absorption de molécules en solution provient donc d'une distribution boltzmanienne de l'énergie initiale des molécules et de multiples collisions. La probabilité d'absorption d'un photon d'énergie $h\nu$ est de ce fait liée à la section efficace d'absorption de la molécule à la fréquence ν , elle-même fonction du moment de transition dipolaire pour la transition impliquée et donc du recouvrement entre les fonctions d'onde vibrationnelles des états électroniques mis en jeu. Une fois cet état excité atteint, la molécule relaxe vers son état fondamental selon différents processus mono- ou bimoléculaires (Figure 1b). Le diagramme de Perrin-Jablonski a ainsi proposé au début du XXème siècle pour expliquer les processus de relaxation possibles. Il sera décrit de manière plus approfondie dans la suite de ce chapitre.

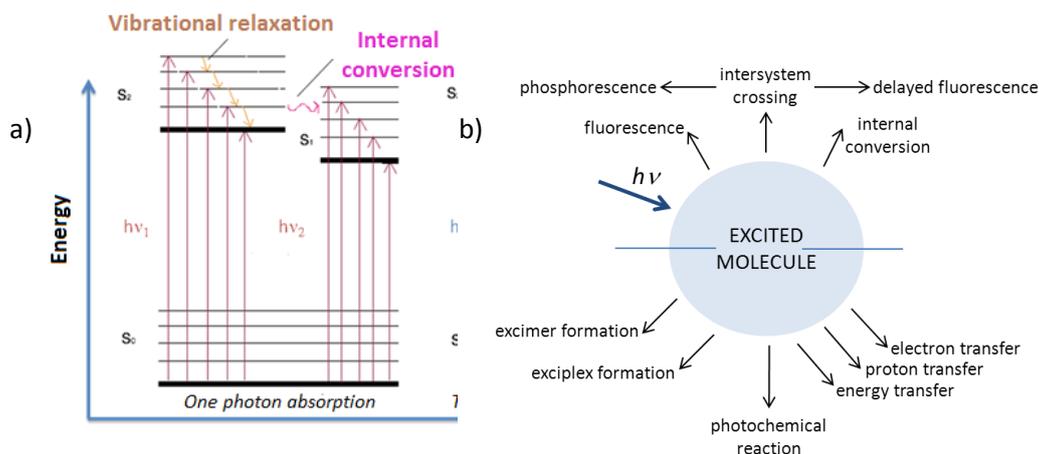


Figure 1 : a) Processus d'absorption monophotonique et b) processus de relaxation d'une molécule après absorption d'un quantum d'énergie $h\nu$.

1.2.2.1 Absorption monophotonique

En fonction de l'énergie du photon utilisé, de la nature et de la symétrie des orbitales moléculaire (OM) concernées différents types de transitions électroniques peuvent avoir lieu. Les transitions électroniques au sein d'une molécule sont en réalité souvent localisées sur des groupes d'atomes spécifiques, appelés chromophores. La symétrie du recouvrement orbitalaire entre les orbitales atomiques des atomes liés donne son nom à l'OM résultante. On parle de ce fait d'OM de type σ , π ou n . Les transitions électroniques sont alors dénommées en fonction de l'OM initiale et de l'OM finale impliquées dans la transition. On parle par exemple de transition $\pi-\pi^*$ lorsqu'un électron est promu d'une OM de type π vers une OM vacante de type π^* . Usuellement, pour une molécule à l'état fondamental, la transition de plus basse énergie fait intervenir l'orbitale moléculaire la plus haute occupée (HO) et l'orbitale moléculaire la plus basse vacante (BV). Etant donnée la stabilisation énergétique E apportée par des recouvrements liants σ , π ou non-liants n , avec $E(\sigma) < E(\pi) < E(n)$, l'ordre énergétique suivant pour des molécules non conjuguées est observé (Figure 2).

$$n - \pi^* < \pi - \pi^* < n - \sigma^* < \sigma - \pi^* < \sigma - \sigma^*$$

Figure 2 : Evolution croissante des transitions électroniques¹⁰ pour des molécules non conjuguées.

Quelques règles quantiques régissent toutefois ces transitions. Pour commencer, seules les transitions entre deux états de même multiplicité de spin, singulet ou triplet, sont autorisées. Un état singulet est défini par une multiplicité de spin égale à 1 ($2S+1$), avec $S = 0$, spin total de la molécule (Figure 3). Toutefois, l'existence d'un couplage spin - orbite génère la formation d'un état triplet caractérisé par un spin total S égal à 1, et une multiplicité de spin égale à 3 (Figure 3). Ce couplage est

gouverné par différents paramètres tels que le numéro atomique Z , correspondant à un « effet d'atome lourd » avec une dépendance en Z^4 , ou des couplages vibroniques entre états de différentes symétries, comme par exemple $^1(n\pi^*)$ et $^3(\pi\pi^*)$. La molécule à l'état excité singulet S_1 peut ainsi évoluer vers un état triplet T_1 de plus basse énergie.

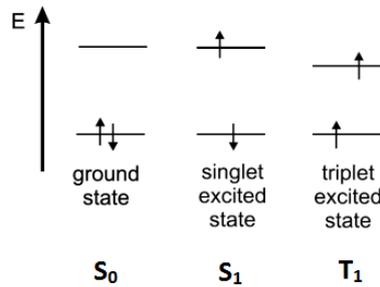


Figure 3 : Répartition et orientation des électrons en fonction de l'état électronique de la molécule¹⁰.

D'un point de vue macroscopique, le processus d'absorption est caractérisé par la relation empirique de Beer-Lambert et représente la probabilité d'absorption d'un faisceau lumineux d'intensité incidente I_λ^0 par une solution homogène et non diffusante de molécules à la longueur d'onde λ (Équation 1).

$$A(\lambda) = \log \frac{I_\lambda^0}{I_\lambda^t} = -\log T(\lambda) = \varepsilon(\lambda)lc \quad (1)$$

avec I_λ^t l'intensité du faisceau transmis, $\varepsilon(\lambda)$ le coefficient d'absorption molaire ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$), l le trajet optique (cm) et c la concentration molaire ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Dans le cadre de ce manuscrit, nous nous limiterons à une réponse linéaire des molécules étudiées, validant la relation empirique de Beer-Lambert puisqu'aucun phénomène d'agrégation n'a été noté aux faibles concentrations utilisées.

1.2.2.2 Absorption biphotonique

Dans les années 30, Maria Göppert-Mayer¹², physicienne allemande, prédit l'absorption simultanée de deux photons par une seule molécule. Pour des raisons expérimentales et techniques, ce phénomène d'absorption biphotonique ne put être mis en évidence qu'en 1961¹³. Il permet de peupler un état excité inaccessible par excitation monophotonique en utilisant deux photons d'énergie moitié moindre. Les principes physiques fondamentaux ne seront pas explicités dans le cadre de cette introduction. L'absorption biphotonique est en réalité un processus optique non-linéaire du troisième ordre. Pour réaliser cette absorption, les molécules doivent présenter une section efficace d'absorption à deux photons élevée, fonction de la partie imaginaire de l'hyperpolarisabilité du second ordre $\text{Im}(\gamma)$ avec $\mu_{\text{ind}} = \alpha E + \beta E^2 + \gamma E^3 + \dots$ où μ_{ind} moment dipolaire induit sous l'action du champ électrique E de l'onde électromagnétique incidente, α polarisabilité, β hyperpolarisabilité du premier ordre (hyperpolarisabilité quadratique) et γ hyperpolarisabilité du second ordre (hyperpolarisabilité cubique). Ce processus nécessite des densités élevées d'énergie et requiert des lasers pulsés (de type titane-saphire par exemple). La fréquence de pompage peut avoir une incidence sur la nature des états formés après excitation. Les lasers femtosecondes sont alors privilégiés sur les lasers nanosecondes et évitent de biaiser la valeur de la section efficace d'absorption à deux photons. En effet, pour des pulses larges (ns), l'état peuplé à deux photons peut absorber à nouveau un photon durant l'excitation. Le nouvel état excité ainsi formé est souvent peuplé avec une probabilité de transition bien supérieure à celle pour une transition à deux photons.

1.2/ Rappels de photophysique

La mesure de la section efficace d'absorption à deux photons est alors surestimée du fait de la contribution de l'absorption du nouvel état excité formé.

Afin de détailler rapidement ce phénomène d'absorption non linéaire, il est nécessaire de classer les molécules organiques en deux catégories : les molécules centro-symétriques et celles polaires, non centro-symétriques. Le phénomène d'absorption à deux photons fait intervenir majoritairement trois états, l'état fondamental $|g\rangle$, l'état excité final $|f\rangle$ et un état intermédiaire $|i\rangle$ ¹⁴. Pour une molécule centrosymétrique (Figure 4a), les états électroniques initial et final sont symétriques tandis que l'état intermédiaire est antisymétrique. La transition directe $|g\rangle \rightarrow |f\rangle$ est interdite pour une excitation monophotonique selon les règles de sélection mais est permise pour une excitation à deux photons. Cette transition procède via un état virtuel intermédiaire, créé après absorption du premier photon. Un second photon peut alors être absorbé pour peupler l'état final $|f\rangle$. Dans le cas d'une molécule polaire (Figure 4b), la transition $|g\rangle \rightarrow |f\rangle$ est permise aussi bien à un qu'à deux photons par les règles de sélection.

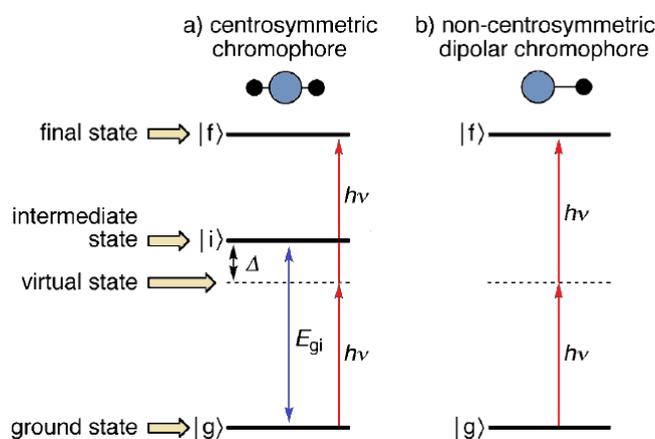


Figure 4 : Diagramme énergétique des trois états électroniques impliqués lors d'un phénomène d'absorption à deux photons dans le cas a) d'une molécule centrosymétrique et b) non centrosymétrique¹⁴.

Deux techniques sont majoritairement utilisées pour déterminer la section efficace d'absorption à deux photons σ_{TPA} (TPA *two-photon absorption* en anglais). La première technique, appelée Z-scan en raison d'un balayage de la position de l'échantillon selon l'axe horizontal (OZ), mesure l'intensité transmise du faisceau après traversée de l'échantillon. Il s'agit d'une technique délicate à mettre en œuvre, nécessitant un alignement optique précis de la source, de l'échantillon et du détecteur ainsi que des concentrations d'échantillons élevées.

La seconde technique, historiquement développée par Xu et Webb¹⁵, pour des molécules émissives, consiste à mesurer l'intensité de fluorescence σ_{TPE} ¹⁶ émise par des fluorophores alors excités à deux photons. L'utilisation d'échantillons de référence, excités dans les mêmes conditions, permet de déterminer σ_{TPA} en supposant un rendement quantique de conversion interne égal à 1 entre l'état S_2 peuplé à deux photons et l'état S_1 radiatif. Le nombre de photons émis est alors égal au nombre de molécules portées à l'état excité, après absorption de deux photons et pondération par la valeur du rendement quantique de fluorescence Φ_f (Équation 2). Nous reviendrons sur ces différents éléments lors de la mesure des différentes sections efficaces d'absorption des fluorophores étudiés (chapitre 6).

$$\sigma_{TPE} = \Phi_f \cdot \sigma_{TPA}. \quad (2)$$

L'excitation biphotonique présente plusieurs avantages par rapport à une excitation monophotonique. La réponse d'un système dépend de l'intensité excitatrice au carré, conduisant à une réduction des dommages par l'utilisation d'un flux moins intense. Par ailleurs, la distribution de l'intensité du champ électrique est plus confinée, conduisant à l'excitation de très faibles volumes, de l'ordre du femtolitre, et à une résolution longitudinale supérieure. Pour des applications en bioimagerie, l'utilisation d'une longueur d'onde dans le prochain infrarouge permet également de diminuer l'absorption des tissus, minimale entre 750 et 1100 cm^{-1} .

1.2.3 L'émission de photons

Une fois la molécule portée dans son état excité, elle subit des relaxations vibrationnelles ultrarapides (RV) (10^{-12} s), ce qui l'amène jusqu'au niveau vibrationnel fondamental de l'état S_1 . Trois voies de relaxation de l'état excité S_1 vers l'état fondamental S_0 , décrites par le diagramme de Perrin-Jablonski, sont alors possibles : deux processus non radiatifs et un processus radiatif (Figure 5). Lorsque la relaxation de l'état S_1 vers l'état S_0 s'accompagne d'une émission de photon, on parle de phénomène de fluorescence. Une loi empirique, développée par le spectroscopiste américain M. Kasha, énonce que l'émission d'un photon ne peut se faire qu'à partir de l'état excité de plus basse énergie. Ainsi, pour une multitude de photons absorbés, peuplant différents états excités, un seul photon pourra être émis, correspondant à la transition S_1 vers S_0 .

La désactivation de cet état excité S_1 peut se réaliser de manière non radiative par conversion interne (CI) ou par croisement intersystème (CIS). Le processus de conversion interne implique un couplage vibrationnel entre les états S_1 et S_0 (et de manière plus large entre deux états de même multiplicité de spin). Le processus de croisement intersystème conduit à la formation d'un état triplet T_1 par désactivation de l'état S_1 . Cet état triplet peut alors se relaxer vers S_0 de manière non radiative par croisement intersystème retour ou de manière radiative par émission de photon. Dans ce dernier cas, l'émission est appelée phosphorescence.

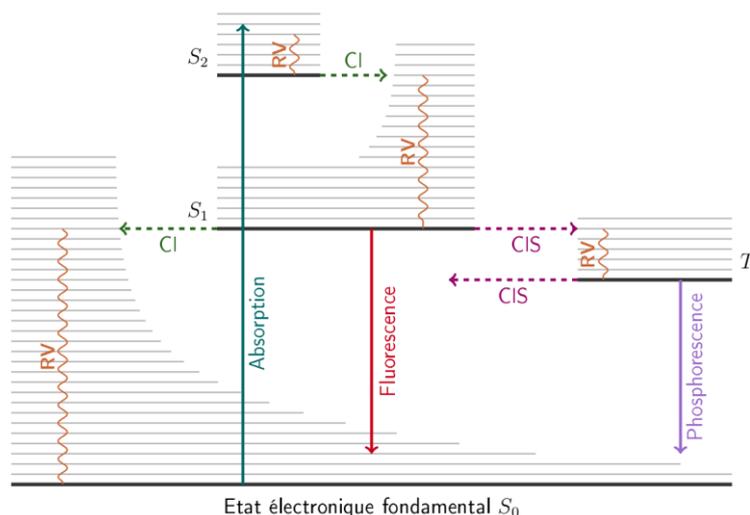


Figure 5 : Diagramme de Perrin-Jablonski (<http://gvallver.perso.univ-pau.fr>).

1.2/ Rappels de photophysique

Un signal de fluorescence sera plus étroit et intense à basse température. Ce gain d'intensité provient d'une diminution des processus de collision et de conversion interne au profit d'une relaxation radiative.

La présence de relaxations rotationnelles et vibrationnelles suivant l'excitation, et/ou de réorganisation des molécules de solvant autour du fluorophore excité, entraîne des pertes d'énergie par rapport à celle initialement fournie par absorption. La différence énergétique entre la fréquence d'absorption maximale et celle d'émission maximale est appelée déplacement de Stokes. Une valeur élevée du déplacement de Stokes conduit à une minimisation de la réabsorption de l'émission par les fluorophores environnants et est bénéfique à l'obtention de systèmes émissifs à l'état solide.

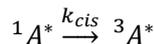
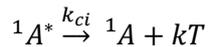
D'autres processus peuvent également intervenir mais ne seront pas détaillés dans le cadre de ce manuscrit. Par exemple, une fois l'état triplet peuplé, un phénomène de croisement inter-système inverse vers S_1 peut intervenir si les deux états sont proches énergétiquement et en équilibre thermique, ce qui génère une fluorescence dite retardée (fluorescence de type E). Cela entraîne un décalage temporel de l'émission de fluorescence par rapport à l'excitation, augmentant ainsi le contraste par élimination de la diffusion de la lumière incidente. Ce phénomène est actuellement exploité dans les diodes électroluminescentes pour accroître le rendement quantique du processus de recombinaison des excitons¹⁷.

1.2.3.1 Temps de vie de l'état excité

Considérons une molécule 1A dans son état fondamental et notons $^1A^*$ son premier état excité singulet. Comme décrit précédemment, deux relaxations, radiative (r) (Équation 3) et non-radiative (nr) (Équation 4) peuvent se produire depuis l'état S_1 vers l'état S_0 . Ces processus sont des actes élémentaires monomoléculaires, régis chacun par une constante de vitesse k_i spécifique.



$$k_{nr} = k_{ci} + k_{cis} \quad (4)$$



L'évolution au cours du temps de la concentration de l'espèce à l'état excité [$^1A^*$] est décrite par une cinétique monoexponentielle (Équation 5).

$$-\frac{d[^1A^*]}{dt} = (k_r + k_{nr})[^1A^*] \quad (5)$$

Après intégration et en posant que [$^1A^*$] = [$^1A^*$]₀ à t = 0, on obtient l'équation suivante (Équation 6).

$$[^1A^*] = [^1A^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right) \quad (6)$$

avec, τ_s le temps de vie de l'état excité singulet, défini par la relation suivante (Équation 7), k_r la constante de vitesse de relaxation par fluorescence et k_{nr} , la constante de relaxation non radiative, par conversion interne ou par croisement intersystème.

$$\tau_s = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (7)$$

L'intensité de fluorescence I_f émise par l'espèce $^1A^*$ est décrite par les équations suivantes (Équation 8).

$$I_f \propto k_r [^1A^*] \quad \text{avec,} \quad [^1A^*] \propto e^{-\frac{t}{\tau_s}} \quad (8)$$

$$\text{D'où } I = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right)$$

avec I_f l'intensité de fluorescence à un instant t , I_0 l'intensité de fluorescence à l'instant initial et τ_s le temps de vie de l'état excité singulet.

La mesure du temps de vie de l'état excité fournit des informations sur l'environnement de la molécule dans son état excité et sur ses processus de relaxation. En effet, l'apparition d'un phénomène de relaxation supplémentaire non radiatif, dû à l'interaction de $^1A^*$ avec une autre molécule M, peut entraîner une diminution de ce temps τ_s par ajout d'un troisième terme $k_Q[M]$ où k_Q représente la constante de vitesse d'extinction de fluorescence et $[M]$ la concentration en espèces M.

1.2.3.2 Rendement quantique de fluorescence et brillance

Le rendement quantique d'émission Φ_f traduit la probabilité avec laquelle la molécule relaxe de manière radiative depuis son état excité le plus bas. Ce rendement quantique est donc fonction de la température mais non de la longueur d'onde d'excitation si la relation de Kasha est vérifiée. Il est défini par la relation suivante (Équation 9).

$$\Phi_f = \frac{\text{Nombre de photons émis}}{\text{Nombre de photons absorbés}} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = k_r \tau_s \quad (9)$$

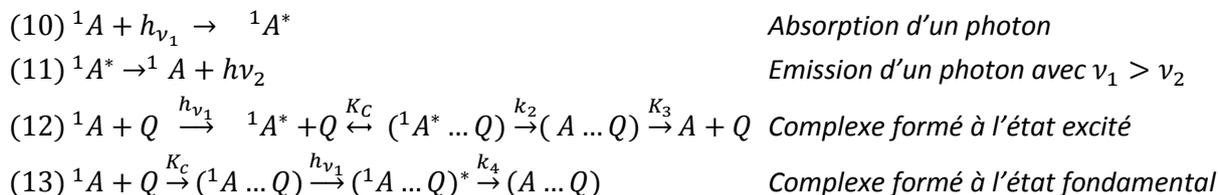
Expérimentalement, le rendement quantique de fluorescence se mesure par comparaison du signal d'émission de ce composé avec celui d'une référence, de Φ_f connu, excité à la même longueur d'onde et de plages spectrales d'absorption et d'émission proches de celles du composé à étudier. De plus, il est nécessaire de réaliser ces mesures avec des solutions diluées. En effet, une absorbance supérieure à 0,1 provoquerait des phénomènes de réabsorption de l'émission d'une molécule par les molécules environnantes en présence d'un recouvrement spectral des bandes d'absorption et d'émission. Par ailleurs, lorsque la concentration augmente, des interactions entre une molécule à l'état excité et une molécule à l'état fondamental peuvent intervenir, conduisant à la formation d'un excimère $^1AA^*$ présentant des propriétés photophysiques propres. Il en résulte soit une extinction de fluorescence par formation d'un état noir, non fluorescent, soit une exaltation du signal de fluorescence.

De manière générale, l'obtention d'un rendement quantique d'émission proche de l'unité représente une priorité mais c'est la brillance qui doit être considérée comme le critère le plus significatif. En effet, un bon rendement quantique de fluorescence ne sous-entend pas un coefficient d'absorption molaire également élevé. Pour émettre, les molécules doivent absorber. Lorsqu'un nombre important de molécules est regroupé au sein d'une architecture nanométrique, l'émission de fluorescence résultante est bien plus intense que celle provenant d'un fluorophore isolé, le plus émissif soit-il. On définit ainsi la brillance comme le produit du coefficient d'absorption molaire par le rendement quantique d'émission, soit $\epsilon\Phi_f$.

1.2/ Rappels de photophysique

1.2.4 Phénomène d'extinction de fluorescence

Comme évoqué précédemment, la présence d'un extincteur de fluorescence (Q) va diminuer la probabilité de relaxation radiative de l'état excité d'un fluorophore $^1A^*$. De nouveaux chemins réactionnels apparaissent, comme décrit dans les équations suivantes (Équation 10-13).



avec, $h\nu_1$ et $h\nu_2$ les énergies des photons absorbés et émis, K_C la constante de formation du complexe (AQ), k_2 la constante de relaxation de $^1A^*$ complexé, K_3 la constante de dissociation du complexe et k_4 la constante de relaxation du complexe à l'état excité.

1.2.4.1 Extinction dynamique de fluorescence

L'étude des processus précédents (Équation 10-13) permet d'illustrer que des collisions entre la molécule A dans son état excité et une molécule Q puissent donner lieu à une extinction dynamique de fluorescence. Cette diminution de l'intensité émise est en réalité fonction de la concentration en molécules Q et également fonction du temps de vie de l'état excité $^1A^*$. Pour qu'une désexcitation bimoléculaire non radiative soit favorisée, le temps de vie τ_s de l'état excité $^1A^*$ doit être assez long pour qu'une molécule Q vienne s'approcher et échanger de l'énergie (transfert d'énergie électronique) ou un électron (transfert d'électron photoinduit, en anglais PET). Une diminution du temps de vie de l'état singulet est observée par ajout d'une nouvelle cinétique de désexcitation. L'équation de Stern-Volmer permet d'établir que le signal de fluorescence varie en fonction de la constante de vitesse du processus de transfert k_Q et de la concentration en extincteurs selon (Équation 14).

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{\tau_s^0}{\tau_s} = \frac{I_0}{I_f} = 1 + k_Q \tau_s^0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (14)$$

avec, k_Q la constante de vitesse du processus d'extinction de fluorescence, τ_s^0 le temps de vie de l'état excité en l'absence d'extincteur, $[Q]$ la concentration en extincteur de fluorescence et K_{SV} la constante de Stern-Volmer.

1.2.4.2 Extinction statique de fluorescence

Une extinction de fluorescence dite statique provient de la formation d'un complexe non fluorescent à l'état fondamental. L'efficacité de cette extinction de fluorescence est alors fonction de la constante de stabilité K_C du complexe formé. L'émission de fluorescence des molécules A libres reste inchangée, tout comme le temps de vie de leurs états excités, et est régie par l'équation suivante (Équation 15).

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_S [Q] \quad (15)$$

avec, K_S la constante de formation du complexe, $[Q]$ la concentration en extincteur de fluorescence.

L'espace dans lequel ce complexe se forme peut également être appréhendé via une sphère effective d'extinction de fluorescence. Prenons le cas le plus simple, celui du solvant comme molécule Q. Dans ce cas, une molécule de ce solvant se retrouve toujours au voisinage de molécules $^1A^*$, entraînant une extinction de la fluorescence.

D'autres voies sont également possibles mais ne seront pas discutées dans le cadre de ce manuscrit, au travers par exemple des combinaisons de plusieurs types d'extinction de fluorescence. On peut par exemple citer des transferts d'électron entre une molécule $^1A^*$ à l'état excité vers une autre molécule Q qui se comporterait comme un accepteur ou un donneur d'électron selon les énergies relatives des différentes orbitales HO et BV¹⁸ de chacun des composés mis en jeu.

1.2.5 Conclusion

Après ces quelques rappels de photophysique, il est important de retenir que le paramètre décisif est la brillance. L'augmentation de la valeur de ce paramètre repose donc soit sur une augmentation du rendement quantique, soit sur une augmentation de la quantité de fluorophores présents au sein d'un même assemblage. Des phénomènes d'extinction de fluorescence sont généralement présents avec le milieu environnement mais « l'isolement » de ces fluorophores permet de diminuer ces processus.

1.3 Rappels de nanomagnétisme

Dans le cas d'un matériau magnétique, les moments magnétiques s'orientent selon des directions privilégiées et peuvent se comporter de manière indépendante ou interagir positivement pour conférer au matériau une aimantation globale. Dans les paragraphes suivants, nous décrirons quelques grandeurs et notions importantes d'ingénierie moléculaire permettant au chimiste d'optimiser la réponse magnétique du système recherché.

1.3.1 Propriétés des matériaux massifs

A un électron est associé un moment angulaire de spin. En tournant sur lui-même et autour des noyaux, l'électron acquiert un moment magnétique orbital et un moment magnétique de spin. Le moment magnétique résulte de la somme de ces deux contributions. La somme des moments magnétiques des électrons donnent le moment magnétique de l'atome. Si la somme des moments magnétiques électroniques est nulle le matériau est diamagnétique si le moment magnétique est non nul le matériau est paramagnétique (Figure 6). L'aimantation d'un système complexe résulte alors de la contribution des moments magnétiques de tous les atomes. Dans un matériau paramagnétique les moments magnétiques atomiques sont orientés de manière aléatoire, leur résultante est alors nulle.

Sous l'action d'un champ magnétique extérieur, la valeur moyenne de l'orientation des moments magnétiques est modifiée. Pour des matériaux paramagnétiques, ces moments s'alignent parallèlement à la direction du champ alors qu'ils s'orientent de façon antiparallèle pour les matériaux diamagnétiques. La réponse des matériaux varie de manière linéaire avec l'intensité du champ appliqué mais aucune aimantation résiduelle n'est observée en l'absence de champ.

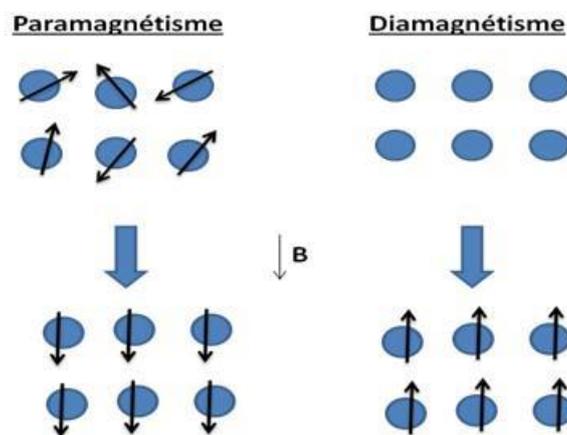


Figure 6 : Matériaux paramagnétiques et diamagnétiques avant et après sollicitation magnétique.

Dans un matériau un ordre magnétique longue distance peut être observé, donnant naissance à un moment magnétique total non nul, malgré l'absence de champ magnétique. Pour les matériaux ferromagnétiques, les moments magnétiques sont orientés parallèlement les uns aux autres, créant une aimantation importante. Ces matériaux sont généralement utilisés comme aimants permanents. Les moments magnétiques s'orientent de façon antiparallèle avec des intensités identiques pour les matériaux antiferromagnétiques et non équivalentes pour les matériaux

ferrimagnétiques. Seuls ces derniers matériaux possèdent une aimantation globale non nulle (Figure 7).

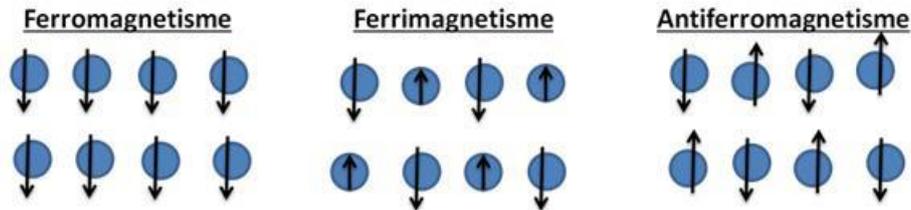


Figure 7 : Matériaux ferromagnétique, ferrimagnétique et antiferromagnétique en l'absence de sollicitation magnétique.

Pour un matériau cristallin à l'échelle micrométrique, les moments magnétiques s'organisent spontanément en domaines, nommés domaines de Weiss, séparés entre eux par des parois de Bloch, afin de minimiser l'énergie globale du système. Chaque domaine se comportant de manière indépendante, l'aimantation totale résulte de la somme vectorielle des aimantations propres à chaque domaine (Figure 8). L'orientation des domaines de Weiss dépend d'un ensemble d'interactions développées entre les moments magnétiques, comme des interactions d'échange, des interactions avec le réseau, et finalement des interactions magnétiques dipolaires. Les domaines sont constitués de moments magnétiques orientés selon une même direction préférentielle. Sous l'action d'un champ magnétique statique externe, tous les moments magnétiques s'alignent selon la direction de la sollicitation (Figure 8). De manière privilégiée, les domaines de Weiss initialement orientés dans la direction du champ magnétique externe s'étendent par déplacement de leurs parois de Bloch, constituées de quelques plans cristallins. Les moments magnétiques subissent alors une réorientation pour s'aligner avec les moments présents de chaque côté de cette paroi. L'intensité du champ magnétique nécessaire pour réaliser cette transition est fonction de la structure chimique de l'objet étudié mais également de la qualité structurale de celui-ci. En effet, la présence de défauts au niveau de la maille cristalline facilite le déplacement de ces parois à faible champ.

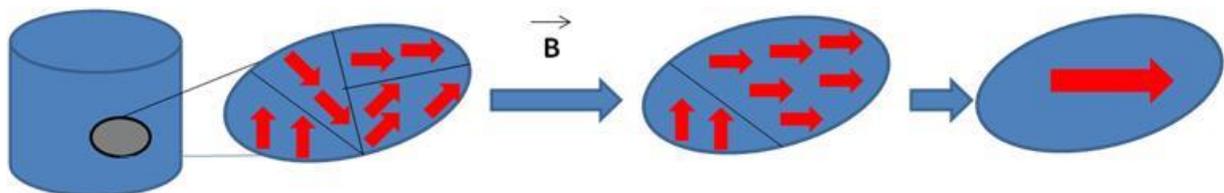


Figure 8 : Représentation des domaines de Weiss (bleus) composés de moments magnétiques (flèches rouges) alignés selon une direction préférentielle, et des parois de Bloch (lignes noires).

Le moment magnétique d'une nanoparticule sphérique augmente généralement avec le volume (Figure 9) et donc le rayon de la nanoparticule¹⁹. En effet, pour des nanoparticules de quelques nanomètres, l'anisotropie de surface (spin canting) ou la nature même du stabilisant peut devenir prépondérante, modifiant les constantes d'anisotropie précédemment décrites. La valeur maximale de l'aimantation est alors notée M_S et est obtenue à haute valeur de champ.

1.3/ Rappels de nanomagnétisme

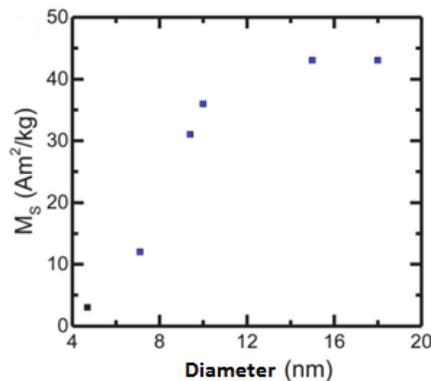


Figure 9 : Evolution de l'aimantation à saturation en fonction du diamètre de nanoparticules de magnétite cristallines¹⁹.

1.3.2 Matériaux monodomaines

Lors d'une diminution en taille des matériaux utilisés, l'énergie requise pour former plusieurs domaines de Weiss devient supérieure à l'énergie requise pour aligner tous les moments magnétiques du matériau selon une unique direction²⁰. La taille critique est fonction de la structure chimique et correspond habituellement à celle d'un domaine de Weiss. En-deçà d'un diamètre critique de 140 nm pour les nanoparticules de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), des nanoparticules monodomaines sont obtenues. De par la présence de directions cristallographiques de plus faible énergie, les moments magnétiques s'orientent préférentiellement le long de ces directions lors de l'application d'un champ magnétique. On parle alors d'axes de facile aimantation.

L'énergie d'anisotropie magnétique, résultant de ces alignements privilégiés, dépend de plusieurs paramètres comme l'énergie d'anisotropie magnétocristalline, dépendante du couplage spin-orbite, fonction de la symétrie du cristal et l'arrangement atomique dans les mailles cristallines. Il existe également la contribution de l'anisotropie de forme, dépendante de la forme de l'objet, et de l'anisotropie de surface pour des objets non symétriques en raison d'un champ magnétique local générés par les moments magnétiques en surface. La présence de défauts ou la réduction de la symétrie en surface modifie l'énergie d'anisotropie magnétique. La somme de toutes ces contributions conduit à une constante d'anisotropie globale. Toutes ces considérations ne seront toutefois pas étudiées lors de ce manuscrit mais leurs compréhensions s'avèrent importantes pour appréhender les propriétés magnétiques des nanoassemblages réalisés par la suite.

1.3.3 Superparamagnétisme

Les matériaux superparamagnétiques sont définis comme des matériaux monodomaines dont l'aimantation résiduelle en l'absence de champ magnétique est égale à zéro. Deux états équivalents de plus basses énergies sont alors obtenus, alignés parallèlement (spin haut) ou antiparallèlement (spin bas) à l'axe de facile aimantation (Figure 10). L'énergie d'activation E_a , ou l'énergie d'anisotropie magnétique, correspond à l'énergie requise pour faire basculer les moments magnétiques d'un état à l'autre. Elle est définie par la relation suivante (Équation 16).

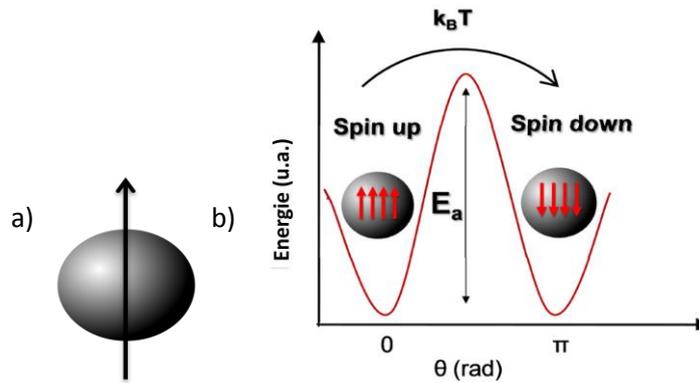


Figure 10 : a) Représentation de l'axe de facile aimantation. b) Profil énergétique d'une nanoparticule en fonction de l'angle θ entre l'axe de facile aimantation et les moments magnétiques de spin pour une symétrie unidirectionnelle.²¹

$$E_a(\theta) = KV \sin^2 \theta \quad (16)$$

avec θ l'angle entre les moments magnétique de spin et l'axe de facile aimantation, K la constante d'anisotropie et V le volume.

En deçà d'une certaine température T, l'énergie thermique est bien inférieure à cette énergie d'activation. Les moments magnétiques sont donc orientés et bloqués selon les deux directions de plus basses énergies²². Par contre, au-delà d'une certaine température nommée température de blocage T_B , l'énergie thermique apportée au système est suffisante pour contrebalancer l'énergie d'anisotropie, les moments magnétiques de spin fluctuent librement entre les deux états stables isoénergiques, conduisant à une aimantation globale nulle du système. La température de blocage est donc fonction de la constante d'anisotropie du système K et du volume V de la nanoparticule.

Sous l'action d'un champ magnétique externe, les nanoparticules superparamagnétiques s'orientent le long de la direction du champ magnétique, créant une aimantation globale du système non nulle. Après suppression du champ magnétique extérieur, les nanoparticules relaxent selon deux mécanismes. Le premier mécanisme correspond à une relaxation interne du moment magnétique de spin. Il a été défini par Néel et est caractérisé par un temps τ_N , selon l'équation (Équation 17) (Figure 11). Cette inversion peut donc avoir lieu pour des particules en suspension ou immobilisées.



Figure 11 : Représentation schématique de la relaxation de Néel.

$$\tau_N = \tau_0 \exp -E_a/k_B T \quad (17)$$

avec τ_0 un temps d'essai, E_a l'énergie d'anisotropie magnétique k_B la constante de Boltzmann et T la température.

La seconde possibilité pour une nanoparticule superparamagnétique de s'aligner avec la direction du champ magnétique correspond à la rotation de la particule sur elle-même (Figure 12). Il s'agit de la relaxation de Brown qui n'est possible qu'en solution. Le temps nécessaire τ_B à cette

1.3/ Rappels de nanomagnétisme

relaxation est défini par la relation suivante (Équation 18) et est fonction de la température, du rayon hydrodynamique R_H mais également de la viscosité η du milieu dispersant.

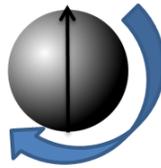


Figure 12 : Représentation schématique de la relaxation de Brown.

$$\tau_B = \frac{3R_H\eta}{k_B T} \quad (18)$$

1.3.4 L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une méthode non invasive, fondée sur le principe de résonance magnétique nucléaire (RMN) et utilisée pour imager les tissus mous avec une bonne résolution, tant spatiale que temporelle, grâce à l'utilisation d'agents de contraste. Elle est classiquement utilisée en milieu hospitalier et implique l'utilisation de spectromètres pour des valeurs de fréquences comprises entre 21 et 64 MHz, soit d'environ 0,5 à 1,5 T. Elle repose sur la modification de la vitesse de relaxation des protons de l'eau en présence d'un champ magnétique statique externe (Figure 13a). Sous l'action d'un champ magnétique, les spins nucléaires s'alignent de façon parallèle (spin haut) et antiparallèle (spin bas) au champ magnétique. La différence d'énergie entre ces deux alignements est proportionnelle au rapport gyromagnétique γ du proton mais surtout à l'intensité du champ magnétique utilisé B_0 , elle est définie par l'équation ci-dessous (Équation 19). Par augmentation de celui-ci, la différence d'énergie entre ces deux configurations de spin augmente si bien que les populations spin haut et spin bas ne sont plus équivalentes à température ambiante.

$$\Delta E = \gamma m B_0 = h\nu \quad (19)$$

L'IRM reste néanmoins une technique peu sensible puisque uniquement 0,001 % des protons sont détectés, dus à une différence énergétique faible entre les deux populations spin haut et spin bas, quasi-équivalentes. Un pulse radiofréquence est alors appliqué perpendiculairement à la direction (Oz) du champ statique précédent, faisant basculer d'un angle de 90° tous les spins nucléaires (Figure 13b). Une aimantation transversale M_{xy} dans le plan (Oxy) apparaît lors de l'impulsion. L'arrêt du champ radiofréquence entraîne un retour à l'équilibre de l'aimantation selon la direction du champ initial \vec{B}_0 . Cette relaxation de l'aimantation conduit au retour de l'aimantation M_z selon la direction (Oz), (Figure 13c), et à une disparition de l'aimantation M_{xy} (Figure 13d). On note ainsi T_1 , le temps nécessaire pour retrouver 63% de l'aimantation initiale selon l'axe (Oz) et T_2 le temps nécessaire pour que seuls 37% de l'aimantation générée dans le plan (Oxy) soient encore détectés.

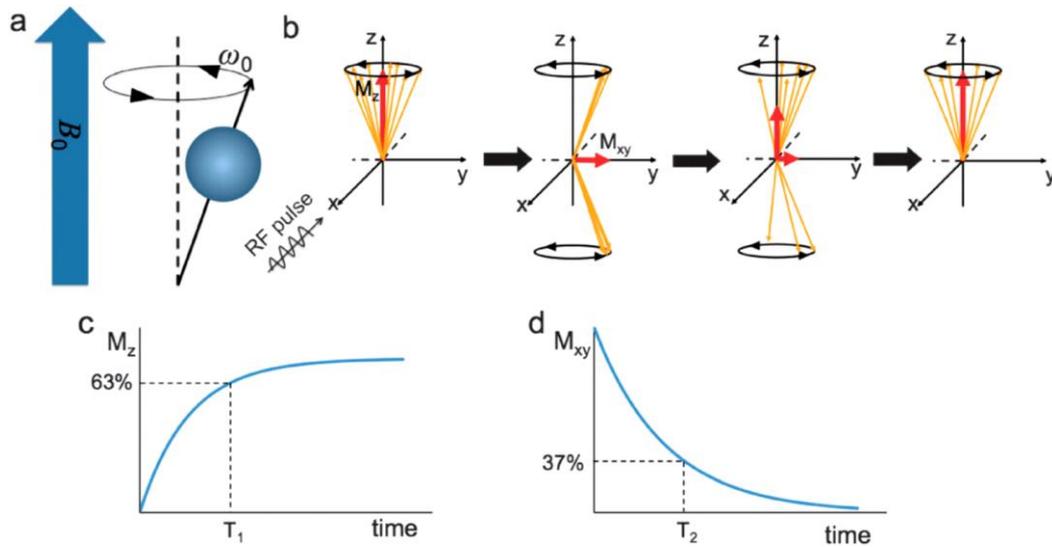


Figure 13 : Principe de la RMN. a) Alignement des moments magnétiques le long du champ B_0 . b) Application d'un champ radiofréquence perpendiculaire au champ magnétique statique et relaxation du spin nucléaire du proton selon deux directions, l'axe (Oz) et le plan (Oxy). c) Mesure de l'aimantation en fonction du temps selon c) l'axe (Oz) et d) le plan (Oxy).

Afin de détecter un événement biologique intéressant, il est nécessaire de modifier l'environnement local des molécules d'eau et ainsi leurs réponses vis-à-vis du champ magnétique externe. Des agents de contrastes de type T_1 peuvent être utilisés pour leurs aptitudes à augmenter la vitesse de relaxation du moment magnétique M_z , vers sa valeur initiale. Un contraste positif sera alors obtenu grâce à une augmentation de l'aimantation mesurée, par comparaison avec celle de molécules d'eau non influencées par l'agent de contraste. C'est par exemple le cas des complexes de gadolinium^{2,23,24} où un échange de molécules d'eau intervient dans la sphère de coordination des ions gadolinium, augmentant ainsi la vitesse de relaxation des protons selon l'axe (Oz).

L'imagerie en mode T_2 s'intéresse à la cinétique de disparition de l'aimantation transversale M_{xy} . Elle est utilisée pour des agents de contraste entraînant une inhomogénéité du champ magnétique local. La disparition de l'aimantation M_{xy} , plus rapide en présence d'agent de contraste T_2 , conduit à un contraste négatif par diminution de l'intensité du signal détecté. Il est également possible de réaliser une imagerie en mode T_2^* où l'on va prendre en considération des effets de déphasage entre les protons lors de leur relaxation, entraînant une relaxation de l'aimantation total du système plus rapide vers son état initial. Les agents de contraste négatifs en mode T_2 les plus utilisés sont les solutions de nanoparticules d'oxyde de fer, même si quelques études ont été réalisées en mode T_1 ²⁵ avec l'utilisation de nanoparticules de très petite taille (5,5 nm). En effet, la relative innocuité de ces systèmes, tant *in vitro* que *in vivo*, a permis le développement d'un grand nombre d'agents de contraste à base de nanoparticules d'oxyde de fer. Ils sont par exemple commercialisés sous le nom de Feridex® ou Endorem® et stabilisés par un mélange de polymères (dextran) et de petits ligands (ions citrates).

La relaxivité r_i est définie comme l'augmentation de la vitesse de relaxation des protons de l'eau générée normalisée par la concentration en agent de contraste. Elle est donc définie pour deux types de relaxation, à savoir la relaxation longitudinale r_1 , selon l'axe (Oz), et la relaxation transversale r_2 selon le plan (Oxy) par l'équation suivante (Équation 20).

1.3/ Rappels de nanomagnétisme

$$r_i = \frac{(1/T_i)_{\text{mesuré}} - (1/T_i)_{\text{diamagnétique}}}{C_{\text{Agent de contraste}}} \quad (20)$$

avec, $(\frac{1}{T_i})_{\text{mesuré}}$ l'inverse du temps mesuré, $(\frac{1}{T_i})_{\text{diamagnétique}}$ l'inverse de la contribution diamagnétique du milieu dispersant (environ 4 s^{-1} pour l'eau ultrapure) et $C_{\text{Agent de contraste}}$ la concentration en agent de contraste à analyser.

L'interaction entre une nanoparticule et une molécule d'eau a été décrite par une approximation de relaxation spin – spin, un modèle qui ne sera pas explicité dans le cadre de ce manuscrit. La relaxivité r_i des molécules d'eau est fonction du carré du moment magnétique de la nanoparticule et est inversement proportionnelle à la distance entre ces deux entités. Il est donc indispensable d'assurer une bonne mouillabilité de la surface de la nanoparticule par les molécules d'eau en fonctionnalisant celle-ci de manière adéquate. Cette dépendance vis-à-vis de la distance est liée à un mécanisme de type « sphère externe », reposant sur une diffusion des protons de l'eau à l'intérieur d'un volume sphérique entourant une nanoparticule donnée. L'efficacité d'un agent de contraste T_2 négatif est fonction du rapport r_2/r_1 à la fréquence du spectromètre utilisé. Plus ce rapport est élevé, plus le contraste sera important, permettant de réduire le temps d'acquisition ainsi que le bruit de fond.

1.3.5 Exaltation des propriétés magnétiques

Selon la concentration ou la taille des nanoparticules d'oxyde de fer utilisées, des interactions peuvent apparaître, modifiant les propriétés magnétiques du système dans son intégralité. Parmi les interactions possibles, l'une des plus courantes, et la seule discutée dans le cadre de ce chapitre, est l'interaction de type dipôle-dipôle entre deux nanoparticules. Pour créer ce type d'interaction, les nanoparticules d'oxyde de fer doivent être assemblées en un même objet. La nature du ligand ou l'agencement des unités magnétiques entraînent une modification des relaxivités r_i des protons. Comme nous l'avons vu, les relaxivités sont des paramètres primordiaux pour obtenir un agent de contraste efficace. Il est alors intéressant de pouvoir optimiser leurs valeurs, et principalement la valeur de la relaxivité r_2 , qui signale la présence d'effet additif localisé, voir de coopérativité.

Comme évoqué dans la suite de ce chapitre, l'assemblage de nanoparticules est apparu comme un moyen efficace pour augmenter les propriétés magnétiques par simple effet additif des nanoparticules. Les unités magnétiques peuvent être rassemblées en surface d'un objet et former une coquille (Figure 14a) ou à l'intérieur d'un même objet jouant le rôle de vésicule (Figure 14b)²⁶.

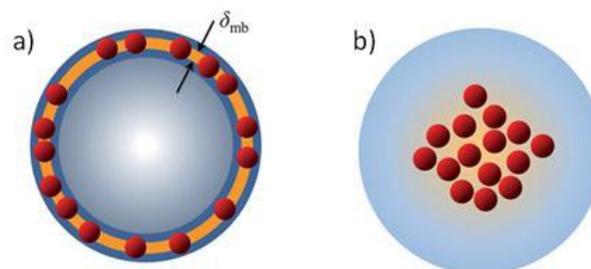


Figure 14 : Représentation schématique d'un assemblage de nanoparticules a) en surface de l'objet ou b) au sein d'une vésicule²⁶.

Une étude réalisée par Arosio et al²⁶ a ainsi pu mettre en évidence une faible influence de la géométrie de l'assemblage de nanoparticules sur la valeur de la relaxivité. Celle-ci doit principalement augmenter de manière linéaire avec le nombre de nanoparticules de même taille encapsulées. Néanmoins, une augmentation de la relaxivité r_2 est observée bien au-delà des valeurs obtenues pour des particules étudiées de manière indépendante (Figure 15). Cette augmentation a été attribuée à un effet additif dû au regroupement des nanoparticules d'oxyde de fer. Des interactions non délétères entre nanoparticules permettent ainsi d'augmenter la réponse du système tout en diminuant la quantité de fer utilisée. De plus, une seconde étude réalisée par Hickey et al²⁷, a pu mettre en évidence une relaxivité transversale environ deux fois supérieure dans le cas de structures de type cœur-coquille, comparé à celle obtenue pour des nanoparticules encapsulées au sein de vésicules.

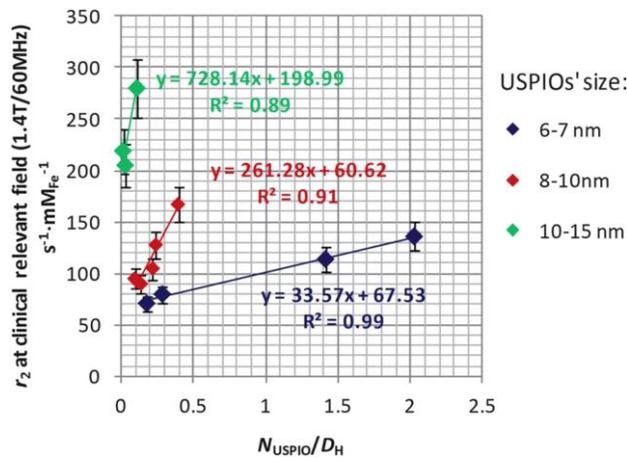


Figure 15 : Augmentation de la valeur de la relaxivité r_2 en fonction du nombre de nanoparticules de taille identique, incorporées à la surface des assemblages²⁶.

1.3.6 Conclusion

Après ces quelques rappels de nanomagnétisme, il est important de retenir que la réalisation d'un système magnéto-fluorescent possédant de bonnes propriétés magnétiques en termes d'aimantation et de relaxivité repose sur un assemblage de nanoparticules. En effet, l'existence d'effets additifs non délétères conduit à une réduction de la quantité de fer utilisée. L'optimisation de la taille, de la cristallinité et de la composition des nanoparticules individuelles représente également un enjeu très important, qui ne sera toutefois pas abordé dans ce manuscrit.

1.4 Les grandes familles de fluorophores

Avant de présenter les différents nanoassemblages et nanoplateformes, plus particulièrement magnéto-fluorescentes, rapportés dans la littérature, il est nécessaire de présenter rapidement les luminophores couramment utilisés dans le domaine de la bio-imagerie, tant *in vitro* qu'*in vivo*. Il est possible de distinguer trois principales classes de luminophores, à savoir les complexes de lanthanides, les quantum dots et les plus utilisés, les fluorophores organiques. Pour des raisons inhérentes au choix des structures retenues dans le manuscrit, nous ne détaillerons pas les les oxydes de lanthanide, ni les phénomènes d'up-conversion associés^{28,29}.

1.4.1 Les complexes de lanthanides

Les complexes de lanthanide sont des luminophores largement utilisés pour des applications en bio-imagerie^{30,31} et actuellement commercialisés³². Ils sont également utilisés comme sonde de pH, ou d'anions pour ne citer que quelques exemples d'applications³³. Le principal avantage des complexes de lanthanide repose sur un temps de vie naturel de fluorescence très long, de quelques μ s à quelques ms, comparé à celui de l'autofluorescence des tissus biologiques, de quelques nanosecondes. Ils possèdent également des déplacements de Stokes très importants et des bandes d'émission fines. Tous ces avantages ont permis le développement des expériences de microscopie résolue en temps³⁴ où l'acquisition est décalée de l'excitation de quelques microsecondes par exemple, permettant de réaliser des observations sur fond noir, sans être gêné par l'autofluorescence. Malgré tout, la limitation de ces systèmes provient de leurs très faibles sections efficaces d'absorption. Il est alors nécessaire de greffer des chromophores, antennes absorbant un photon incident à plus haute énergie et généralement dans l'UV, pour le transférer à l'ion métallique. De nombreuses avancées ont été réalisées pour optimiser ce transfert d'énergie entre l'antenne et le centre métallique, ou pour optimiser l'absorption de ces systèmes sous excitation biphotonique, moins photodestructrice et plus adaptée à la fenêtre de transparence biologique. Voici quelques exemples ci-dessous de ligands utilisés pour une absorption à un ou deux photons.

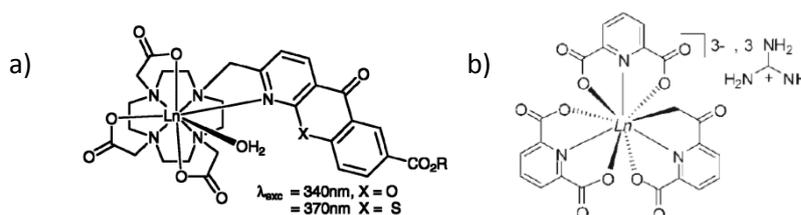


Figure 16 : Exemples d'antennes permettant une excitation du coeur métallique. a) post fonctionnalisation via la fonction ester et b) excitation sous irradiation biphotonique^{30,31}.

Finalement, la limitation majeure de ces systèmes demeure leur très grande sensibilité à l'eau, où une extinction de fluorescence est observée lors de la complexation des molécules au centre métallique. Les ions métalliques doivent donc être encapsulés au sein de ligands très fortement chélatants, limitant par la même occasion le risque de relargage dans le milieu biologique et la toxicité inhérente de ces atomes lourds.

1.4.2 Les quantum dots (QDs)

Les quantum dots représentent une autre classe de luminophores très prisés pour leur forte brillance. Ce sont des alliages métalliques semi-conducteurs de taille nanométrique. Les systèmes les plus utilisés sont constitués d'un cœur de CdSe, de 2 à 8 nm de diamètre³⁵, et d'une coquille détaillée plus loin dans ce paragraphe. De par leur faible taille, ces nanocristaux possèdent des caractéristiques intermédiaires entre une molécule et un matériau massif, telles que des niveaux d'énergie électronique discrets formant une bande de valence et une bande de conduction ainsi que des propriétés cristallines. Une excitation dans le domaine de l'UV-visible provoque l'apparition d'une paire électron-trou par promotion d'un électron de la bande de valence vers la bande de conduction. La recombinaison de la paire électron-trou s'accompagnera de l'émission d'un photon de plus basse énergie. Les dimensions nanométriques du système entraînent un confinement spatial de cet exciton, modulant ainsi le gap énergétique entre la bande de valence et la bande de la conduction. L'énergie du photon émis est ainsi obtenue par variation de la taille des nanocristaux, avec une gamme d'émission du bleu au rouge, balayée par simple augmentation du diamètre de 2 à 8 nm (Figure 17)^{36,37}.

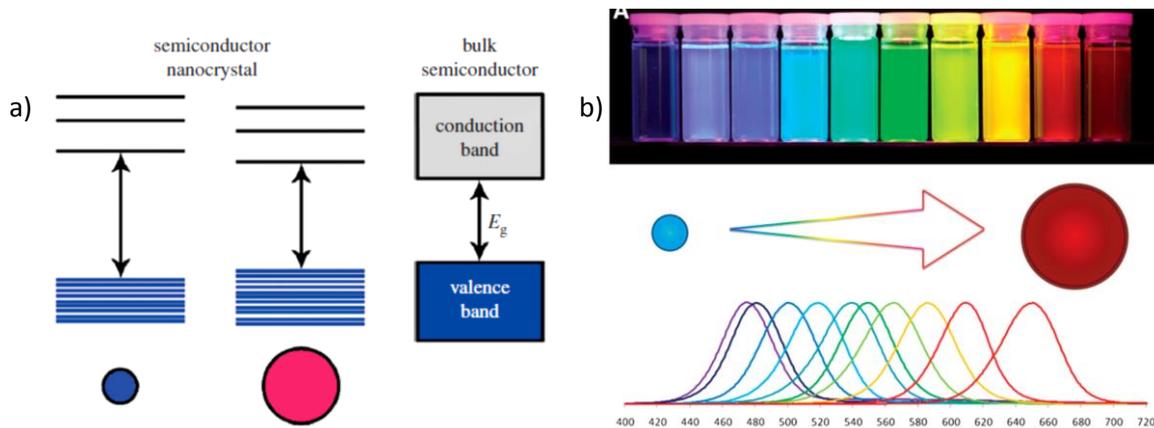


Figure 17 : a) Effet de confinement de l'exciton sur le gap énergétique entre la bande de valence et la bande de conduction³⁷. b) Evolution du spectre d'émission en fonction de la taille des QDs³⁶.

Différentes procédures de dopage des QDs ont permis de générer des systèmes émettant dans le domaine du proche infrarouge³⁸. De manière à gagner en stabilité et en brillance, des structures de type cœur-coquille ont également été développées, dites de type I et de type II (Figure 18). Le sulfure de zinc ZnS représente l'un des matériaux les plus utilisés pour former les coquilles. Pour les QDs de type I, la paire électron-trou demeure confinée soit dans le cœur, limitant les phénomènes d'extinction de luminescence par interaction avec l'environnement, soit dans la coquille et de type I inverse. Pour les QDs de type II, la paire électron-trou se dissocie quant à elle entre le cœur et la coquille si bien que l'énergie du photon émis peut être fortement abaissée en fonction de la nature des semi-conducteurs choisis. Grâce à leurs sections efficaces d'absorption 10 à 50 fois supérieures à celles des fluorophores organiques et la facilité avec laquelle un multiplexage en émission peut être obtenu, les QDs se sont imposés comme de très bon candidats pour l'imagerie biologique^{35,39}.

Toutefois, la fonctionnalisation en surface des QDs est indispensable pour, d'une part, assurer leur solubilité en milieu aqueux et éviter le relargage de métaux lourds, toxiques pour les

1.4/ Les grandes familles de fluorophores

milieux biologiques, et d'autre part pour éviter tout phénomène de relaxation non radiatif par couplage vibrationnel avec les molécules d'eau.

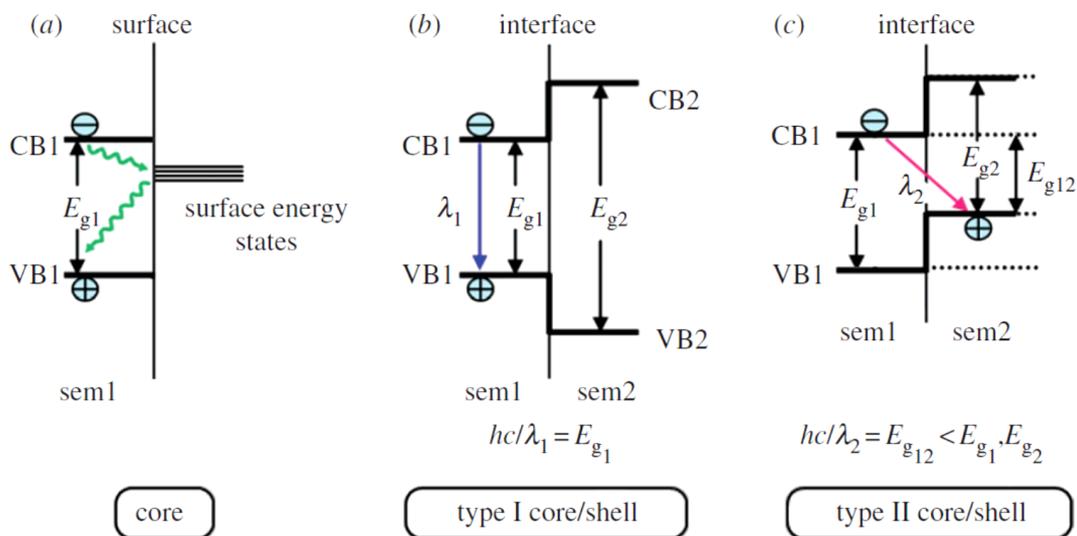


Figure 18 : Représentation schématique de nanocristaux luminescents en fonction de leurs architectures³⁷.

Enfin, la dernière limitation de ces systèmes est liée au phénomène de clignotement dû à un piégeage temporaire des charges, empêchant leur recombinaison. De ce fait, un suivi continu de ces objets s'avère délicat en raison de périodes aléatoires et prolongées d'extinction de luminescence.

Néanmoins, de nombreux progrès en termes de fonctionnalisation et de remplacement des semi-conducteurs actuels par des combinaisons d'éléments moins toxiques (InP, CuS...) ont déjà été accomplis.

1.4.3 Les fluorophores organiques

Les luminophores les plus largement utilisés à ce jour sont les fluorophores organiques. En effet, depuis leur découverte à la fin du 19^{ème} siècle, on ne compte plus le nombre de fluorophores synthétisés efficacement grâce à l'apport de la synthèse organique, pour étudier des phénomènes biologiques⁴⁰. Leurs forts coefficients d'absorption dans le visible, accompagnés de rendements quantiques d'émission élevés permettent d'obtenir des images très contrastées. Des fluorophores sensibles au pH, à des agents chimiques (ions métalliques ou molécules), à des entités biologiques (sucres, protéines...), à la viscosité ou à la polarité du milieu sont autant d'exemples possibles et commercialement disponibles. Nombre d'entre eux ont également été dérivés pour faciliter leur bioconjugaison et appréhender des mécanismes biologiques. Grâce à la grande variété de structures et donc de plages de longueurs d'onde d'émission, du visible au proche infrarouge, il est désormais aisé de multiplexer des fluorophores émettant des couleurs distinctes pour signaler simultanément différents événements ou marquer différents compartiments cellulaires. Quelques exemples de fluorophores couramment utilisés sont présentés sur la figure suivante (Figure 19).

Par exemple, des BODIPY (Figure 19d) ont plus récemment été dérivés pour générer une émission centrée sur le domaine spectral du proche infra-rouge⁴¹. Ces dérivés ont été réalisés par

augmentation de la conjugaison de ces fluorophores, grâce à un couplage en position alpha du BODIPY de greffons insaturés.

D'autres fluorophores plus sophistiqués contrôlables par la lumière ont également émergé dans la littérature, permettant de passer réversiblement d'un état noir à un état fluorescence après irradiation (Figure 19g). La grande majorité des structures fait intervenir des photochromes (spiropyranes, diaryléthènes, chromènes). Cette activation *in situ* permet ainsi de détecter séquentiellement un mélange de fluorophores et d'atteindre des résolutions spatiales au-delà des limites de la diffraction, ce qui a donné naissance à des techniques d'imagerie super-résolues telles que le PALM (*photoactivated localization microscopy*) et le dSTORM (*direct stochastic optical reconstruction microscopy*)⁴².

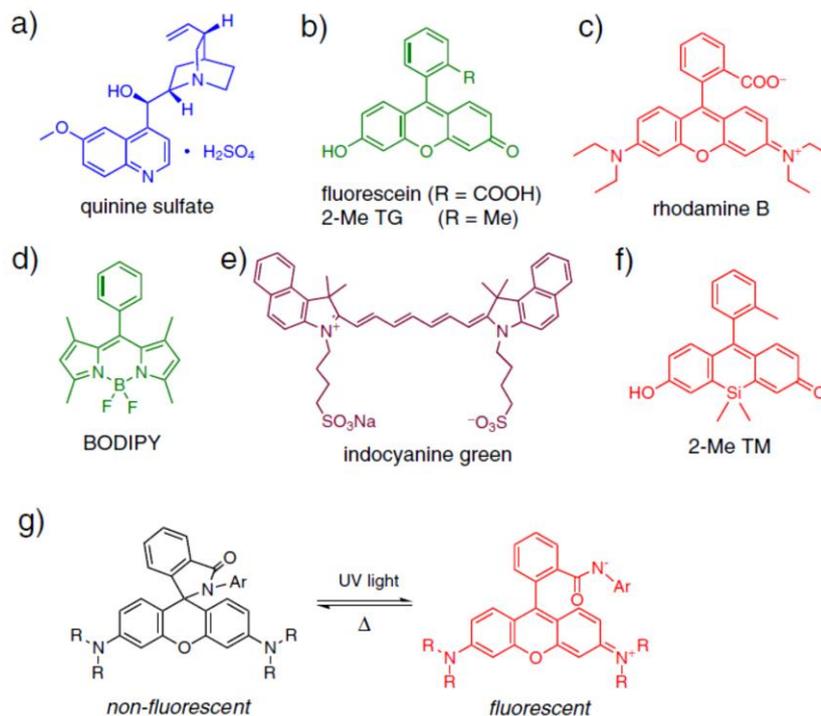


Figure 19 : Fluorophores moléculaires couramment utilisés pour la bio-imagerie. La couleur des fluorophores représente la longueur d'onde d'émission de fluorescence en milieu aqueux⁴⁰.

Malgré leurs qualités photophysiques et leur toxicité réduite par rapport à celle des QDs, les fluorophores organiques se révèlent photosensibles à une irradiation prolongée, conduisant à leur dégradation et à une perte de fluorescence (en anglais : *fading*) au cours des expériences. Ces limitations photochimiques peuvent toutefois être contournées en combinant un nombre important de fluorophores au sein d'une même architecture par formation d'assemblages. La brillance résultant de cet assemblage pourra alors concurrencer celle obtenue avec les QDs.

1.5 Elaboration de nanoassemblages magnéto-fluorescents

Après la présentation non exhaustive des différents luminophores majoritairement présents dans la littérature, nous allons maintenant nous concentrer sur les différents nanoassemblages possibles afin de combiner deux propriétés, le magnétisme et la fluorescence.

La nécessité de rassembler des entités fluorescentes au sein d'un même nanoassemblage s'est avérée primordiale pour gagner en efficacité d'émission et en photostabilité. Dans les années 80, l'émergence des dendrimères⁴³, structures macromoléculaires fractales, a ainsi permis de démultiplier le nombre de fluorophores⁴⁴ en les greffant aux positions externes de la dernière génération, augmentant ainsi la brillance et la quantité locale en fluorophores. Bien que la taille, la forme, et la localisation des groupes fonctionnels puissent être facilement contrôlées, la synthèse des dendrimères reste encore longue et exige des réactions quantitatives d'une génération à l'autre^{45,46} (Figure 20).

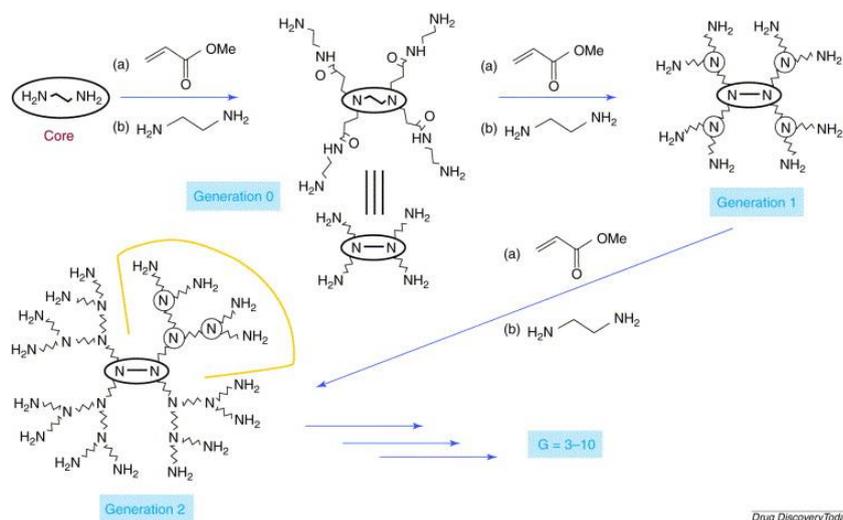


Figure 20 : Exemple de formation de dendrimères. Les amines finales pourront ainsi être fonctionnalisées par des molécules fluorescentes⁴⁵.

Grâce à une fonctionnalisation en surface par des ligands polyamines polycarboxylées de type DOTA (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique) ou DTPA (diéthylènetriaminepentacétate), des ions gadolinium(III), utilisés comme agents de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM) de type T₁, ont pu être complexés²⁴. L'augmentation du nombre d'entités paramagnétiques a logiquement conduit à un accroissement du contraste, proportionnel au nombre d'ions Gd³⁺ chélatés. En revanche, l'incorporation de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques sur ce type d'assemblage n'a jamais été réalisée. Il est possible que la structure très flexible de l'édifice dendrimérique se déforme et conduise à des structures difficilement reproductibles, sans oublier la différence de taille entre les deux entités défavorable, de 10 à 50 nm pour les dendrimères contre 5-20 nm pour les nanoparticules d'oxyde de fer.

Convention : Dans la toute la suite du manuscrit, la notation A@B sera utilisée pour faciliter l'écriture et la compréhension des structures citées. Cette notation se rapporte à une structure cœur-coquille avec un cœur constitué d'entités A, recouvert d'entités B. A@B constitue donc une architecture de type cœur(A)-coquille(B) ou cœur(A)-ligand(B). On peut ainsi étendre le nombre de couches

successivement déposées, ou greffées, à la surface du nanoassemblage avec par exemple $A@B@C$ où les entités B précédentes seront recouvertes d'entités C constituant la couche externe finale.

1.5.1 Synthèse et dopage de nanoparticules inertes

Afin de diminuer les interactions des fluorophores avec l'environnement, une des approches possibles consiste à doper un système inerte chimiquement et biologiquement avec des entités fluorescentes. Cette stratégie, principalement développée pour des architectures à base de nanoparticules de silice ou de polystyrène⁴⁷, consiste à utiliser des systèmes présentant une certaine innocuité, faciles à synthétiser et à fonctionnaliser. Ainsi, l'incorporation de fluorophores au sein de nanoparticules de silice a permis d'observer une augmentation du signal de fluorescence d'un facteur 10 000, comparé au signal d'un fluorophore seul, par simple effet de concentration locale^{48,49}.

Au travers de quelques exemples pertinents, nous présenterons les avantages et les limitations de ce type de système en le confrontant à nos trois critères, essentiels pour des applications en bio-imagerie, à savoir la stabilité colloïdale et chimique, une densité élevée en matériaux actifs et une simplicité de synthèse.

1.5.1.1 Synthèse de nanoparticules de silice

Développées par Stöber et al⁵⁰, puis optimisées par Giesche et al⁵¹, les nanoparticules de silice ont connu un succès fulgurant. Faciles d'accès, reproductibles et pouvant encapsuler différents éléments, ces nanoparticules sont également facilement fonctionnalisables en surface. Elles ont conduit à l'émergence d'un grand nombre de plateformes multimodales et sont synthétisées par hydrolyse puis polycondensation de tétraéthyle d'orthosilicate (TEOS) dans l'éthanol en présence d'eau et d'ammoniaque comme catalyseur. Ces nanoparticules peuvent atteindre des tailles de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs micromètres (Figure 21).

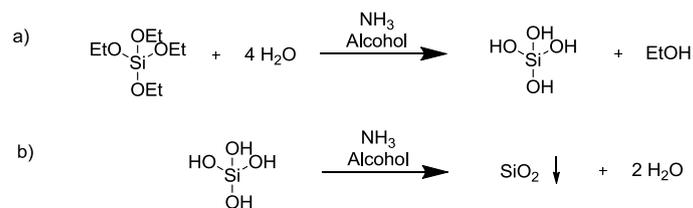


Figure 21 : Mécanisme de formation de nanoparticules de silice selon la méthode Stöber. a) Hydrolyse et b) condensation.

La formation préalable de germes de silice, selon les réactions précédentes, offre un meilleur contrôle de la taille des nanoparticules visées et permet leurs fonctionnalisations en surface. Des organosilanes modifiés, comme l'aminopropyltriéthoxysilane (APTES), peuvent en effet être utilisés pour poursuivre la croissance de la couche de silice. Ils réagiront de la même façon que celle de leurs homologues non fonctionnalisés mis en jeu préalablement pour former le cœur des nanoparticules.

1.5.1.2 Dopage de nanoparticules inertes

Durant le processus de formation des nanoparticules de silice, il est en réalité possible d'encapsuler des éléments d'intérêt, comme des entités lumineuses et notamment magnétiques en ce qui nous concerne.

1.5/ Elaboration de nanoassemblages magnéto-fluorescents

L'exemple suivant présente l'encapsulation de quantum dots et de nanoparticules de maghémite dans une couche de silice. En effet, l'utilisation de germes de silice comme plateformes a permis d'aboutir à ces nanoassemblages magnéto-fluorescents grâce à une seconde étape de croissance en présence d'une nouvelle quantité d'agent précurseur, le TEOS, et d'un mélange homogène de QDs et de nanoparticules de maghémite⁵² (Figure 22).

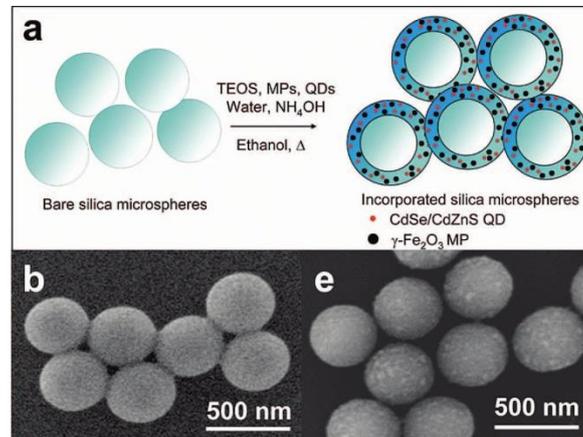


Figure 22 : a) Encapsulation de nanocristaux luminescents et de nanoparticules de maghémite au sein de nanoparticules de silice durant l'étape de croissance des germes de silice ; images MEB avant b) et après e) l'encapsulation⁵².

D'autres types d'architectures dopées ont également été obtenus par encapsulation de nanoparticules d'oxyde de fer dans des coquilles de silice⁵³, via une réaction en microémulsion inverse⁵⁴. Une étape de croissance des nanoparticules de silice ainsi obtenues est alors réalisée en présence d'un mélange de précurseurs TEOS et de QDs, jouant à nouveau le rôle d'entités luminescentes⁵³. Cette séparation spatiale des deux entités, magnétique au cœur et luminescente au niveau de la coquille, permet de diminuer les interactions souvent délétères entre les deux dopants.

Les nanoparticules à base de polymères, également nommées nanolatex, pourraient être rapprochées des nanoparticules de silice. Elles présentent cependant quelques avantages supplémentaires. Historiquement constituées de matrices polymères, dopées par des entités fluorescentes et/ou magnétiques⁵⁵ durant le processus de polymérisation, les nanolatex tendent à se diversifier vers des polymères à façon. Durant ces vingt dernières années, beaucoup de recherches ont été effectuées afin d'utiliser ces nanolatex comme des transporteurs *in vivo*. L'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA), biocompatible, est apparu comme un très bon candidat puisqu'il a été approuvé par la FDA (de l'anglais Food and Drug Administration) pour son absence de toxicité. De plus, il est possible de contrôler sa biodistribution par ajout d'une partie polyéthylène glycol (PEG), et formation de copolymères diblocs. Le relargage par diffusion de molécules d'intérêt qui seraient encapsulées peut également être retardé d'environ 30 à 50 jours par augmentation de la partie glycolique^{56,57} du polymère final, due à une biodégradabilité moins rapide du nouveau copolymère.

Bien que les entités fluorescentes soient protégées du milieu extérieur par encapsulation, elles peuvent diffuser librement à l'extérieur à cause de la grande porosité des nanoparticules de silice. Ce phénomène de relargage incontrôlé s'accompagne d'un autre effet indésirable d'extinction partielle de la luminescence, provoqué par des interactions délétères entre les nanoparticules magnétiques et les entités émissives.

1.5.2 Greffage sur des plateformes nanométriques

Afin de limiter le relargage d'unités magnétiques et lumineuses, l'immobilisation des unités par greffage covalent est apparue comme un moyen efficace de contrer ce relargage. Ce greffage peut aussi bien s'effectuer en surface en introduisant sur la particule de silice des groupes fonctionnels ou au cœur en utilisant des entités actives comportant un agent organosilane apte à réagir avec les germes de silice. L'ajout de groupes fonctionnels en surface des nanoparticules de silice ou métalliques permet d'éviter tout relargage par diffusion.

1.5.2.1 Utilisation d'un cœur de silice comme plateforme d'assemblage

Une première amélioration a été apportée par Cheon et *al.* en proposant un système dopé par des fluorophores et greffé en surface par des unités magnétiques. Dans les travaux rapportés, des nanoparticules de silice, dopées par des unités rhodamines, sont couplées en surface à l'aide d'un lien espaceur bifonctionnel à des nanoparticules magnétiques thiolées. Ce ligand comporte à une extrémité un ester activé pour réagir avec les amines de la silice fonctionnalisée par de l'APTES et former des liaisons amides, tandis que l'autre extrémité est composée d'un maléimide réagissant avec la surface thiolée des nanoparticules d'oxyde de fer⁵⁸ (Figure 23).

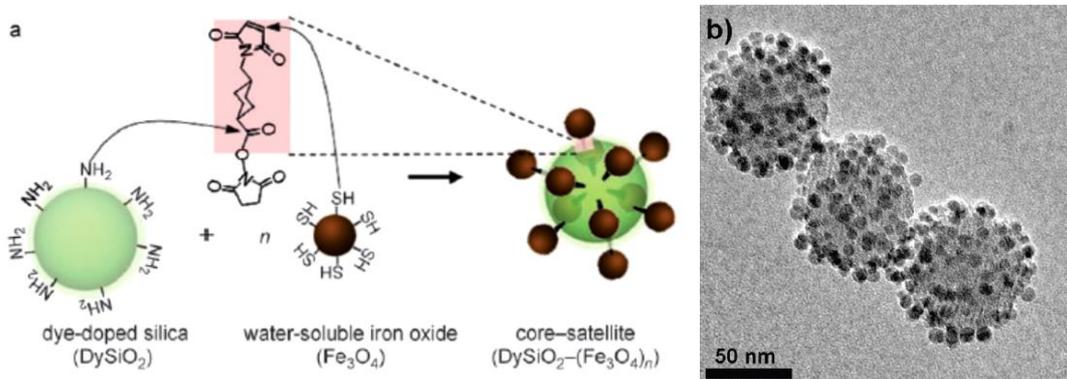


Figure 23 : Synthèse de nanoassemblages cœur-satellites. a) schéma synthétique et b) image TEM⁵⁸.

Ces travaux s'appuient sur la chimie des organosilanes qui a été très longuement étudiée et permet d'obtenir une multitude de groupes fonctionnels (phosphonates, azides, alcynes, acides carboxyliques, amines...) en introduisant des siloxanes fonctionnels au moment des étapes d'hydrolyse et/ou de condensation. Ainsi, la formation de nanoparticules de silice fluorescentes est réalisée par greffage covalent de fluorophores, souvent des dérivés de rhodamine ou de fluorescéine, compatibles avec les conditions alcalines requises pour former ces couches de silice.

En effet, la formation d'une liaison covalente entre ces fluorophores et l'APTES ne modifie pas la réactivité de ces organosilanes vis-à-vis des réactions d'hydrolyse puis de polycondensation. Ainsi, lors d'une étape de croissance de ces nanoparticules de silice en présence d'APTES modifié conduit à la présence d'amines libres en surface, aptes à former des liaisons amides par réaction avec un ester activé.

Des complexes luminescents à base de terre rare ont également été greffés sur la surface de nanoparticules de silice⁵⁹, possédant un temps de vie de luminescence (μ s), plus long que celui de l'autofluorescence des tissus (ns). Le recours à des antennes excitables sous irradiation biphotonique permet de s'affranchir de l'utilisation de rayonnement UV.

1.5/ Elaboration de nanoassemblages magnéto-fluorescents

Malgré une faible toxicité des nanoparticules à base de silice et la grande multitude de combinaisons possibles grâce à la chimie des silanes, ces systèmes trouvent leurs limitations dans le principe même de la fonctionnalisation du cœur. En effet, une matrice de silice étant requise, les éléments magnétiques et fluorescents restent physiquement dilués.

1.5.2.2 Fonctionnalisation d'un cœur inorganique par des petites molécules

Afin d'éviter l'effet de dilution provoqué par l'utilisation d'une matrice inerte, la fonctionnalisation d'un cœur métallique s'avère être l'architecture principalement utilisée dans la littérature pour développer ces agents bimodaux. Différents cœurs inorganiques ont ainsi pu être utilisés avec une grande préférence pour les systèmes à base d'oxydes de fer (II) et de fer (III) tels que la magnétite Fe_3O_4 et la maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, en raison de leur faible toxicité.

De plus, il existe de nombreux ligands formant des complexes stables avec les ions fer(II) ou fer(III) par chélation^{60,22}. Nous pouvons ainsi citer des dérivés de la dopamine impliquant une fonction catéchol⁶¹, des acides carboxyliques⁶², des acides phosphoniques⁶³ (Figure 24), ou encore des dérivés de silanes, formant des liaisons iono-covalentes de type O-métal avec les ions métalliques.

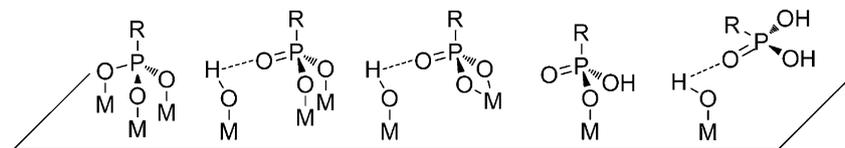


Figure 24 : Exemple de complexes entre un acide phosphonique et un oxyde métallique⁶³.

Après la fonctionnalisation de ces nanoparticules par des ligands appropriés, la stabilité colloïdale des nanoparticules d'oxyde de fer complexées peut être assurée sur une gamme de pH et/ou de force ionique souhaitée. Il est ensuite nécessaire d'apporter une bimodalité grâce à l'introduction d'entités fluorescentes. Ces interrogations concernant la stabilité feront l'objet d'une analyse complète lors du chapitre 3. Deux stratégies sont alors envisageables pour introduire des fluorophores sur des nanoparticules d'oxyde de fer :

- le greffage covalent des sondes fluorescentes par l'intermédiaire d'un ligand complexant et stabilisant la nanoparticule d'oxyde de fer ;
- l'encapsulation de sondes lumineuses à l'intérieur d'une coquille de silice ou de polymère, entourant la nanoparticule d'oxyde de fer.

Ces différentes possibilités ont été étudiées et ont démontré leurs viabilités pour des analyses *in vivo*. Nous pouvons ainsi citer l'exemple de dérivés d'acide *gem*-hydroxybiphosphonique⁶⁴, comme l'alendronate (Figure 25), qui assure une complexation extrêmement stable, une stabilité colloïdale des nanoparticules inorganiques et possède également une amine primaire libre, apte à former une liaison amide avec un fluorophore hydrosoluble en utilisant des agents de couplage de type carbodiimide ou des esters activés.

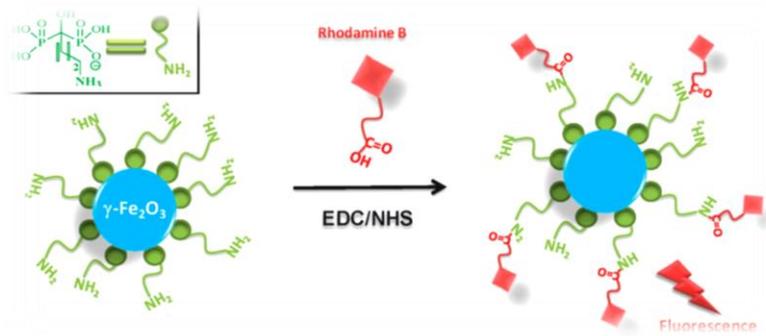


Figure 25 : Couplage d'entités fluorescences par formation de liaisons amides dans l'eau⁶⁴.

Des dérivés de dopamine⁶⁵ ont aussi permis de stabiliser le cœur magnétique grâce aux unités catéchols tandis que la fonction amine non complexée est utilisée pour coupler des luminophores (fluorophores ou complexes luminescents de terre rare) ou encore des molécules d'intérêt biologique, comme la streptavidine par exemple⁶⁶. Des dérivés de diacides peuvent également être utilisés, comme l'acide dimercaptosuccinique⁶², post-fonctionnalisable au niveau de la fonction thiol résiduelle, ou encore l'acide citrique⁶⁷ qui possèdera encore une ou deux fonctions acides libres après complexation (Figure 26).

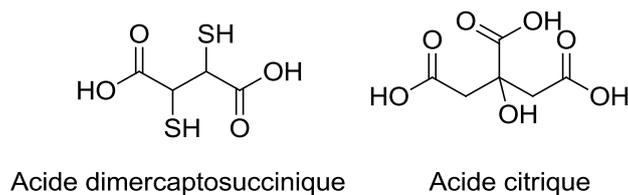


Figure 26 : Structures de ligands stabilisant des nanoparticules d'oxyde de fer par chélation.

Bien que ces systèmes soient rapidement obtenus et comportent un cœur exclusivement magnétique, la grande proximité entre les fluorophores et le cœur métallique entraîne un phénomène d'extinction de fluorescence. En effet, un transfert d'énergie ou d'électron entre ces deux entités peut avoir lieu tandis que les nanoparticules d'oxyde de fer absorbent de manière significative à des longueurs d'onde inférieures à 450 nm. Le choix du fluorophore et son éloignement du cœur métallique seront donc primordiaux. De plus, l'exposition directe des fluorophores vis-à-vis du milieu environnant (solution aqueuse, milieu physiologique) peut modifier les propriétés émissives du système. Enfin, la stabilité colloïdale du nanoassemblage final en solution aqueuse exclut un greffage important d'entités fluorescentes, surtout si elles sont organiques et hydrophobes.

1.5.2.3 Fonctionnalisation d'un cœur inorganique par des macromolécules : vers les structures de type cœur-coquille

L'utilisation de petites molécules comme agents stabilisants et chélatants présente cependant des limites en raison de la fragilité de la liaison iono-covalente entre le ligand et la nanoparticule. En effet, un relargage des ligands peut se produire dû à la présence d'équilibres thermodynamiques de complexation / décomplexation en surface. La cinétique de décomplexation peut toutefois être ralentie par stockage des solutions à basse température. Une alternative a alors été développée, utilisant des coquilles de silice ou des polymères à faible masse moléculaire (Figure 27).

1.5/ Elaboration de nanoassemblages magnéto-fluorescents

Coquille de silice :

Les premières structures permettant d'assurer une stabilité colloïdale des nanoparticules grâce à des fonctions silanols polaires en surface sont de type cœur-coquille, mag@silice, et ont été utilisées comme agents de capture par adsorption de molécules d'intérêt, comme des acides nucléiques⁶⁸.

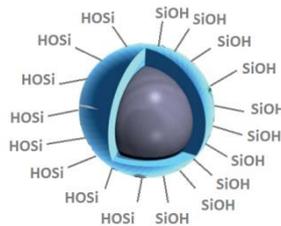


Figure 27 : Nanoparticule d'oxyde de fer recouvertes d'une coquille de silice.

La coquille de silice est en fait obtenue après greffage de silanes à la surface des nanoparticules d'oxyde de fer afin d'amorcer la réaction de condensation et obtenir une couche fine et homogène^{69,70}. Le précurseur utilisé pour former cette couche externe est le TEOS. La substitution partielle du TEOS par de l'APTES permet d'introduire des fonctions amines primaires d'accroche. C'est ainsi qu'un mélange de PEG et de cyanines (Cy5.5) émettant dans le proche infra rouge, a pu être greffé en surface des nanoparticules via la formation de liaisons amides favorisée par l'utilisation d'ester activés. Les architectures résultantes ont alors servi d'agents d'imagerie bimodaux pour l'IRM et la microscopie de fluorescence⁷¹ (Figure 28). Comme le signal de fluorescence des cyanines était complètement éteint par transfert d'énergie vers le cœur métallique, une visualisation par microscopie optique nécessitait l'utilisation d'un lien clivable pour libérer ces cyanines. L'inconvénient majeur de cette approche réside dans le découplage final des deux unités, conduisant à une incertitude sur leur colocalisation et à fortiori sur la correspondance entre les images acquises en IRM et en fluorescence.

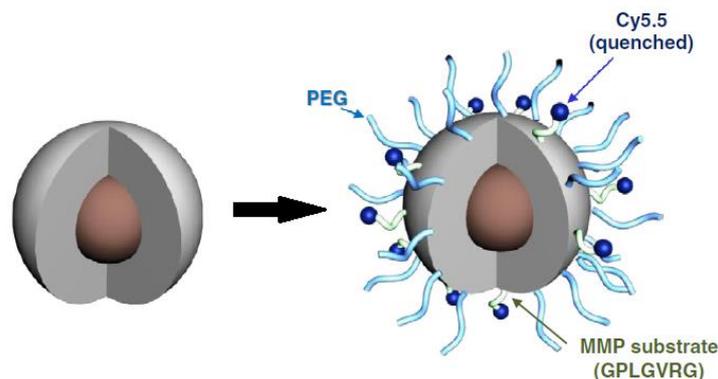


Figure 28 : Fonctionnalisation de nanoparticules composées d'un cœur magnétique et d'une coquille de silice⁷¹.

Au lieu d'être couplés en surface, les fluorophores peuvent également être greffés au cœur de la couche de silice durant le processus de polycondensation, diminuant ainsi les interactions avec le milieu extérieur. Cette encapsulation est réalisée par formation de liaisons covalentes entre des dérivés de rhodamine et/ou de coumarine et des précurseurs du sol-gel⁷², l'APTES. Des luminophores

comme des quantum dots, ou des complexes de métaux lourds ont également été encapsulés de la même manière dans une couche de silice⁷³.

Coquille de polymères :

Aux côtés des coquilles de silice, celles à base de polymères, et notamment à base de dextran, polysaccharide naturel, sont actuellement les plus utilisées sur le marché pour assurer la stabilité de nanoparticules en solution aqueuse⁷⁴. Des nanoparticules de magnétite stabilisées par du dextran sont actuellement commercialisées comme agents de contraste en IRM sous l'appellation Feridex® ou Endorem®, en complément de l'acide citrique. Des copolymères diblocs amphiphiles sont également utilisés pour transférer en milieu aqueux des nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées en milieu organique⁷⁵⁻⁷⁷. Ces polymères assurent une bi-fonctionnalité en complexant le cœur inorganique et en apportant une multitude d'entités réactives en surface.

Pour conclure sur ces procédés de fonctionnalisation de nanoparticules magnétiques, il existe de très nombreux types de ligands qui assurent par complexation la stabilité colloïdale des nanoassemblages. Un greffage de surface apporte différentes valeurs ajoutées telles qu'un agent de ciblage, passif ou actif, et/ou un agent d'imagerie. Pour des applications en théranostique, un couplage de drogues, délivrables ou non de manière sélective, peut être réalisé. Néanmoins, ces systèmes souffrent de deux limitations majeures : un taux de fonctionnalisation en unités fluorescentes faible et une possibilité de relargage non contrôlé des molécules greffées en surface au cours du temps. Par ailleurs, malgré la grande stabilité des fonctions amides, des enzymes tels que des amidases peuvent hydrolyser ces liaisons et complexifier les interprétations *in vivo*.

Bien que les nano-objets possèdent une surface spécifique extrêmement importante, il est nécessaire d'éviter une sur-fonctionnalisation de la nanoparticule par des molécules hydrophobes, sous peine de réduire le nombre de charges de surface et d'entraîner l'agrégation des nanoassemblages. L'utilisation de fluorophores hydrosolubles, chargés pour la grande majorité d'entre eux, entraîne des taux de fonctionnalisation réduits en raison des répulsions électrostatiques développées entre les fluorophores, une fois greffés. Il sera donc difficile d'obtenir des taux de fonctionnalisation très importants, qui se réduisent généralement à environ 5 % pour des nanoparticules de 40 nm⁶².

1.6 Auto-assemblages

Au vu des différents exemples précédents, de leurs limitations et de notre souhait d'élaborer des nanostructures avec une forte densité en unités actives tout en suivant un protocole simple, nous nous sommes intéressés à des structures auto-assemblées. En effet, l'assemblage de plusieurs entités magnétiques et fluorescentes permet d'observer des propriétés exaltées. Le processus d'auto-assemblage permet de rassembler facilement différentes entités magnétiques et fluorescentes. Nous allons dans un premier temps nous intéresser aux auto-assemblages d'entités fluorescentes seules et d'entités magnétiques seules. Dans un second temps, nous nous intéresserons à leur combinaison afin d'obtenir un nano-autoassemblage riche en unités actives, stable et rapide à synthétiser.

1.6.1 Auto-assemblages d'entités fluorescentes

Comme nous avons pu l'observer lors du dopage de nanoparticules de silice, l'augmentation de la concentration locale en fluorophores engendre un effet additif. Malgré tout, la présence d'une matrice, à base de silice ou de latex, limite le taux de fonctionnalisation final. Des auto-assemblages de petites molécules fluorescentes, mais également de polymères, ont ainsi été développés. Nous allons présenter les avantages et les inconvénients de ces deux types d'architectures, assez similaires de prime abord.

1.6.1.1 Les nanoparticules polymériques conjuguées, PDots

Simplement synthétisés par polymérisation contrôlée et nano-reprécipités dans l'eau pour obtenir des nanoparticules, les polymères π -conjugués fluorescents^{79,80} (PDots) permettent d'obtenir des valeurs de rendement quantique et de coefficients d'absorption molaire très importantes ($\epsilon = 10^6$ - 10^7 mol.L⁻¹cm⁻¹ et $\Phi_f = \sim 0,8$)⁸¹. Cette technique de « nano-précipitation » consiste en la préparation initiale d'une solution de PDots dans un solvant organique miscible avec l'eau. Une faible quantité de cette solution organique est alors ajoutée à un grand excès d'eau, entraînant une insolubilité du polymère. Afin de minimiser son énergie, celui va s'auto-assembler pour former des nanosphères organiques, dispersées dans l'eau. Ces PDots sont en général très hydrophobes, rigides et à haute masse molaire (supérieure à 10 000 g.mol⁻¹). Quelques exemples de structures de PDots sont présentés sur la figure ci-dessous (Figure 29)⁷⁹.

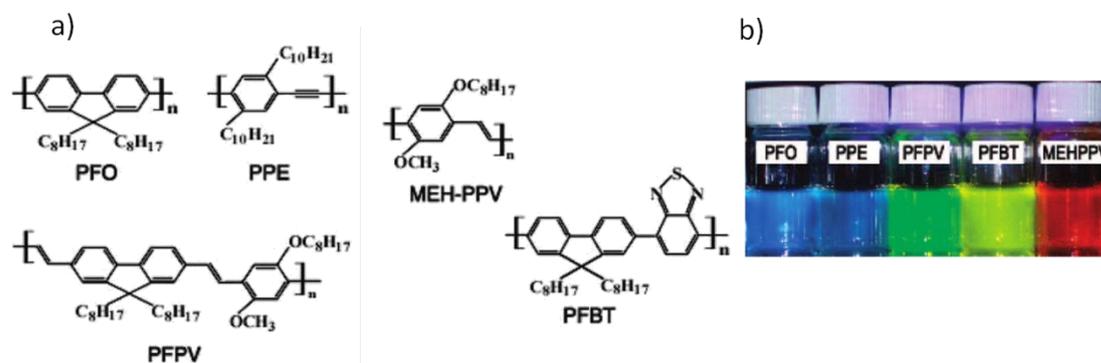


Figure 29 : a) Structures de PDots et b) fluorescence émise après excitation⁷⁹.

Emissives sur toute la gamme du visible, ces nanoparticules sont généralement de petites tailles, 4 nm⁸² au minimum, et peuvent également encapsuler des molécules hydrophobes telles que des drogues. Comme les polymères ne disposent pas aisément de groupes réactifs supplémentaires, leur fonctionnalisation ultérieure par des entités biologiquement actives requiert généralement une encapsulation dans une matrice de silice ou d'autres polymères comme le polystyrène⁸³. Nous pouvons par exemple citer la coprécipitation de Pdots et d'un polymère fonctionnalisé, non fluorescent, pour obtenir des Pdots dopés par des fonctions acides carboxyliques, comme présenté ci-dessous⁸⁴. Une étape ultérieure de couplage peptidique a permis de greffer à la surface un anticorps spécifique. Zhang et *al* ont toutefois pu développer de nouvelles structures de polymère incorporant des motifs fonctionnels, nécessitant un effort important de synthèse malgré un manque de versatilité⁸⁵.

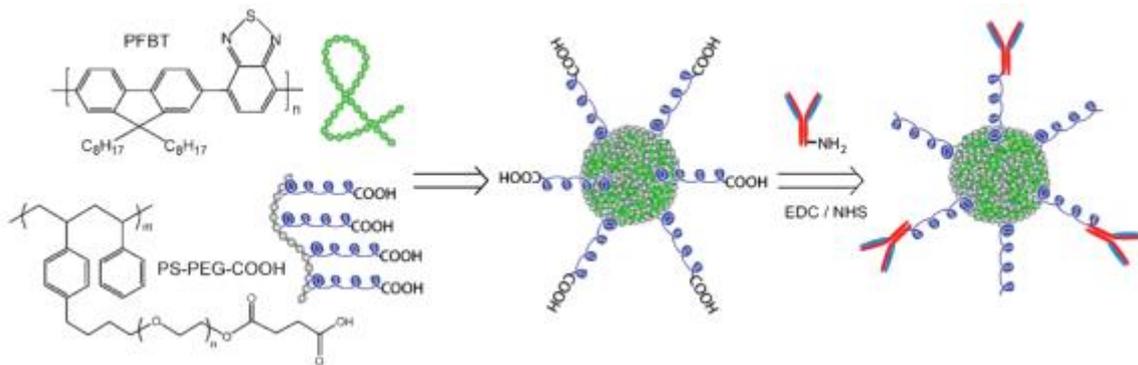


Figure 30 : Fabrication de Pdots dopés pour un greffage ultérieur d'anticorps en surface⁸⁴.

1.6.1.2 Les nanosphères organiques fluorescentes, les FON

Avant de décrire plus en détails ces nanosphères organiques, il semble intéressant de s'interroger sur l'avantage que présentent ces systèmes vis-à-vis de nanoparticules de type polymériques conjuguées, les Pdots précédents. En effet, une étude comparative⁸¹ entre le fluorène et le polyfluorène réalisée par Fischer et *al*, a montré que le choix d'une plateforme polymérique ou moléculaire semble dépendre de l'application envisagée. Alors que la plateforme polymérique permet d'encapsuler un élément d'intérêt, hydrophobe, ses propriétés d'émission sont diminuées comparées à celles de son analogue moléculaire. De plus, la capacité d'une nanosphère moléculaire à se désagréger une fois la cible atteinte, pour libérer une drogue est mieux contrôlable. En effet, la désagrégation de Pdots entraîne une augmentation locale de la viscosité très importante, malgré leurs tailles généralement plus faibles.

Cette classe d'agents fluorescents moléculaires, nommés en anglais « Fluorescent Organic Nanoparticles » (FON), a été largement développée ces dernières années comme nouvelle brique élémentaire pour des matériaux optiques⁸⁶⁻⁸⁸. En effet, comparées aux fluorophores moléculaires libres en solution décrits lors des parties précédentes, ces nanoparticules organiques sont constituées d'une densité de fluorophores inégalée à ce jour⁸⁹. Composées de molécules non liées de manière covalente, sans dilution dans une matrice inerte, les nanoparticules résultantes possèdent des coefficients optiques très élevés⁹⁰, à la hauteur de ceux généralement observés pour les macromolécules π -conjuguées et rigides, constituant les Pdots.

Nous allons pouvoir énoncer certains des pré-requis nécessaires à la formation de nanoparticules organiques fluorescentes dispersées dans l'eau, tant au niveau de la structure chimique utilisée que du mécanisme de formation. Nous nous limiterons toutefois à la formation de

1.6/ Auto-assemblages

nano-objets sphériques bien que d'autres géométries puissent être obtenues. Nous nous interrogerons ensuite sur la possibilité d'utiliser ces nanosphères non-covalentes comme plateformes d'assemblages hybrides.

Convention : Ces nanoparticules organiques fluorescentes (FON) seront dénommées nanosphères dans la suite de ce manuscrit par souci de clarté. Les nanoparticules feront alors référence à une composition inorganique alors qu'un assemblage sera un mélange de plusieurs nanosphères et/ou nanoparticules.

Principe et conditions d'obtention de nanosphères fluorescentes

Tout comme les PDots, les nanosphères de type FON sont très simplement synthétisées par nano-précipitation dans l'eau d'une solution organique de fluorophore à environ 1% massique⁹¹⁻⁹³, préparée dans un solvant miscible avec l'eau (acétone, tetrahydrofurane...). Lors de l'ajout d'un faible volume de cette solution organique « mère » miscible à un large excès d'eau (environ 1/50), le fluorophore choisi, hydrophobe, se retrouve dans un environnement très hydrophile déstabilisant. Afin de minimiser leurs énergies, les fluorophores s'auto-assemblent en nanosphères en développant des interactions de van der Waals dont les plus favorables sont les interactions de type π - π ⁹⁴. D'autres interactions de type soufre – soufre⁹⁵, donneur – accepteur ou par liaison hydrogène^{96,97}, peuvent également contribuer à structurer le réseau organique.

En contrôlant la quantité de matière nano-reprécipitée, il est possible d'ajuster le nombre de nuclei formés et donc leurs probabilités de rencontre par collision. Un processus de fusion se produit et des nanosphères de taille supérieure sont obtenues, selon le mûrissement d'Ostwald. Le choix du solvant est également important puisqu'il permet une solubilisation du fluorophore sous forme moléculaire, mais doit également être parfaitement miscible à l'eau. Ce solvant de nano-précipitation sera utilisé en quantité très faible (<2 %). Malgré cette faible contribution au volume total de solution, tous solvants considérés comme toxiques ou présentant une température d'ébullition élevée sont à écarter.

Exemples de structures moléculaires et pré-requis photophysiques

La structure chimique du composé n'est limitée que par l'imagination du chimiste, à condition de respecter certaines règles plutôt générales. Voici par exemple quelques molécules (Figure 31) de la littérature qui s'auto-assemblent sous forme des nanosphères, dispersées dans un milieu tant aqueux^{89,92,98-102} qu'organique.

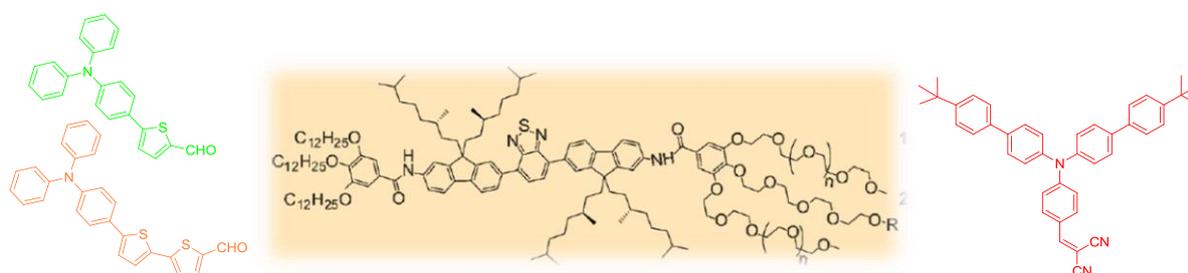


Figure 31: Molécules s'auto-assemblant sous forme de nanosphères dispersées dans l'eau^{89,92,98-102}.

Une émission à l'état solide résulte en partie d'un décalage spectral important entre la bande d'absorption et la bande d'émission du fluorophore. Le déplacement de Stokes permet ainsi d'éviter des phénomènes de réabsorption de la luminescence par une entité voisine. Plusieurs possibilités

sont alors envisageables pour augmenter ce déplacement de Stokes, comme un transfert de charge intramoléculaire accru couplé à l'existence de différences de géométrie importantes entre l'état fondamental et l'état excité. Eviter l'agrégation des molécules entre elles grâce à la présence de substituants encombrants tels que des *tert*-butyles ou de structures twistées comme les triphénylaminés est également bénéfique. Toutefois, dans certains cas, les molécules interagissent entre elles par formation d'agrégats π . Ces interactions peuvent stabiliser l'état excité et former des excimères qui émettent des photons de plus basse énergie¹⁰³(agrégats J), ou à plus haute énergie (agrégats H). Ce phénomène d'interaction à l'état excité a ainsi été très largement exploité pour obtenir des systèmes émissifs uniquement sous forme agrégée¹⁰⁴, nommé AIE, de l'anglais « aggregation induced emission ». De nombreuses avancées ont ainsi eu lieu dans les domaines des OLEDs, de l'anglais « Organic Light-Emitting Diode », et des sondes biologiques¹⁰¹.

Un dernier point reste à prendre en considération concernant les propriétés optiques des nanosphères. Si l'on se restreint à des applications en bio-imagerie, il peut être intéressant de former des nanosphères qui absorbent et/ou émettent dans le domaine de transparence des tissus¹⁰⁵. C'est dans le domaine du proche infrarouge que l'hémoglobine et l'eau possèdent les coefficients d'absorption les plus faibles (Figure 32). L'une des techniques pour exciter des nano-objets dans cette plage de transparence consiste à utiliser des fluorophores qui possèdent une section efficace d'absorption à deux photons importante. Comme l'installation de systèmes d'excitation à deux photons est désormais de plus en plus fréquente dans les laboratoires de biologie, il peut sembler intéressant de disposer de sondes excitables sous excitation biphotonique. Recourir à des nanoparticules émettant dans le proche infrarouge pourrait également représenter un grand intérêt. Leur utilisation se heurte actuellement à une faible sensibilité des détecteurs dans le proche infrarouge comparée à celle de leurs homologues dans le visible.

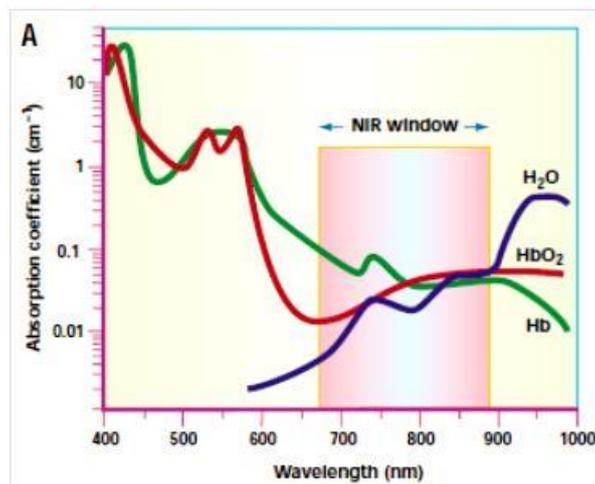


Figure 32 : Spectre d'absorption des tissus biologiques¹⁰⁵.

Relargage et post-fonctionnalisation

La nature chimique de chaînes latérales substituées le noyau aromatique des fluorophores influe considérablement sur les phénomènes de dissolution/agrégation des fluorophores ainsi que sur la composition des auto-assemblages formés par co-précipitation de fluorophores distincts¹⁰⁶. Ces phénomènes ont été étudiés au travers de fluorophores émettant dans le bleu (dérivés du naphthalène) et dans l'orange (benzothiadiazole) (Figure 33) substitués par des chaînes polaires ou apolaires. Un mélange d'« homo-nanosphères », ne comportant chacune qu'un seul type de

1.6/ Auto-assemblages

fluorophore apolaire (bleu ou orange), préalablement et séparément fabriquées, ne conduit à aucun échange de ligands. A l'inverse, un mélange d'« homo-nanosphères » comportant des substituants polaires évolue par solvatation et échange des fluorophores, conduisant à des hétéro-nanosphères », constituées d'émetteurs orange et bleu.

Par contre, lors d'une coprécipitation en solution aqueuse d'un mélange de deux fluorophores distincts, deux agencements sont alors obtenus, avec soit la création d'une organisation complètement aléatoire des deux entités, soit au contraire la formation de nano-domaines à l'intérieur de ces nanosphères.

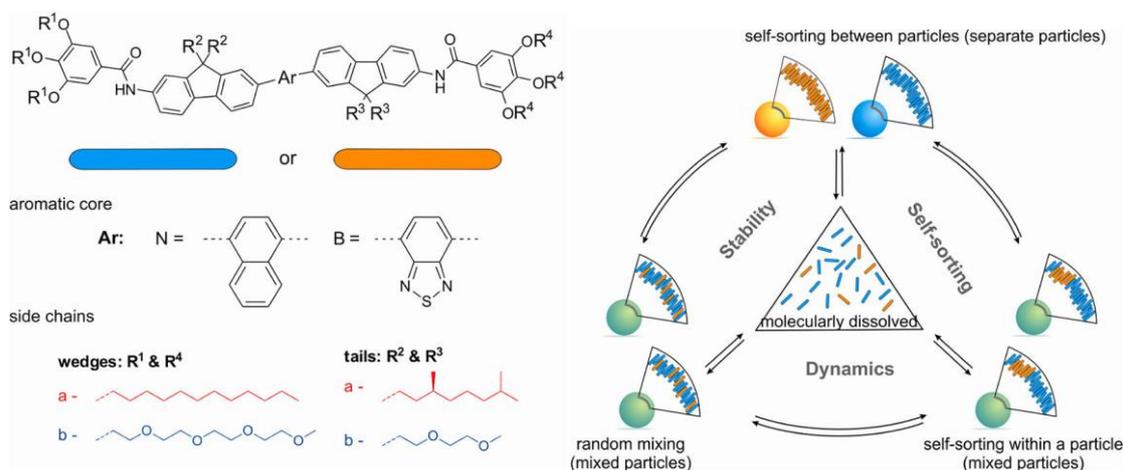


Figure 33 : Structures et agencements de fluorophores s'auto-assemblant sous la forme de nanosphères¹⁰⁶.

L'optimisation des paramètres expérimentaux autant que la structure même du fluorophore utilisé s'avère plus que décisive pour obtenir les nanosphères désirées.

1.6.2 Auto-assemblages d'entités magnétiques

L'augmentation des propriétés de luminescence a été réalisée par accumulation locale de fluorophores. Une approche similaire a été adoptée pour accroître la réponse magnétique des nanoassemblages utilisés. En effet, comme nous avons pu l'évoquer dans la partie consacrée aux rappels de magnétisme, le rapprochement de nanoparticules magnétiques peut s'accompagner d'interactions dipolaires magnétiques non délétères, conduisant à des nanoassemblages de forte aimantation et de relaxivité r_2 élevée.

Des liposomes, vésicules artificielles constituées de lipides amphiphiles, ont ainsi été développés pour encapsuler aisément des nanoparticules d'oxyde de fer¹⁰⁷⁻¹¹⁰. Ils sont simplement préparés par auto-assemblage de phospholipides en présence de solvant organique et d'un large excès d'eau. A l'intérieur de ces vésicules, une augmentation du rapport r_2/r_1 avec la charge magnétique a été observée. Cette augmentation génère un meilleur contraste en IRM, résultant d'un phénomène d'échange avec le milieu environnant par diffusion des molécules d'eau emprisonnées à l'intérieur des magnétoliposomes.

1.6.3 Auto-assemblages magnéto-fluorescents

Tout au long de ce chapitre, nous avons insisté sur la nécessité d'augmenter localement la concentration en entités magnétiques et fluorescentes, tout en conservant une rapidité et une simplicité d'élaboration des nanoassemblages. Nous allons maintenant présenter les systèmes qui permettent de combiner une réponse magnétique et optique accentuée. Dans un premier temps, l'utilisation et la préparation de liposomes seront explicitées avant de présenter des nanoassemblages utilisant des macromolécules amphiphiles. Dans un second temps, nous présenterons notre approche, utilisant des nanosphères organiques chélatantes comme plateformes d'assemblages multimodales.

1.6.3.1 Assemblages par interactions coulombiennes

Une méthode élégante consiste à assembler par dépôts successifs autour d'un cœur nanoparticulaire des systèmes chargés alternativement positivement et négativement. Cette méthode de dépôt « couche par couche » (en anglais « layer-by-layer ») s'inspire de celle développée au début des années 1990 pour réaliser des couches minces sur des substrats bidimensionnels. La cohésion entre les entités employées, des polyélectrolytes, résulte d'interactions coulombiennes fortes entre les polymères de charges opposées¹¹¹. L'élaboration de ce type d'architecture s'avère très simple et facile d'accès et peut utiliser comme plateformes d'assemblage des nanoparticules d'oxyde de fer ou des nanoparticules de silice, pour ne citer que ces deux exemples. Ce processus de dépôt successif a été appliqué à la couverture de billes de polystyrène, dopées en nanoparticules magnétiques, par des quantum dots. Trois polyélectrolytes distincts ont alors été utilisés¹¹² (Figure 34).

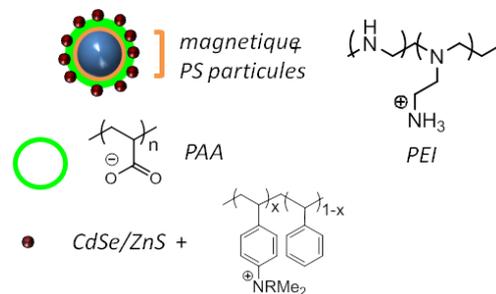


Figure 34 : Autoassemblage couche par couche¹¹².

Malgré l'universalité évidente de cette méthode de dépôt, des longs temps d'élaboration sont requis. En effet, après chaque dépôt, il est indispensable d'éliminer l'excès de polyélectrolyte utilisé, ce qui impose des étapes longues de lavage par centrifugation, pouvant s'accompagner d'une perte partielle de matière, de leur agglomération ou d'une contamination des nanoassemblages par transfert.

1.6.3.2 Assemblages hydrophobes : utilisation de liposomes

Comme indiqué précédemment, l'utilisation de liposomes représente une méthode simple d'encapsulation. Il est alors possible de rassembler simultanément au sein de liposomes des nanoparticules magnétiques et des luminophores sans que ceux-ci soient liés entre eux. D'autres substances, comme des drogues, peuvent être ajoutées si bien que les liposomes deviennent de véritables agents de transport, les agents d'imagerie servant à suivre leur biodistribution. Si leur

1.6/ Auto-assemblages

surface est en plus fonctionnalisée par des agents de ciblage (acide folique sur l'exemple présenté), une délivrance localisée de la drogue devient possible (Figure 36).

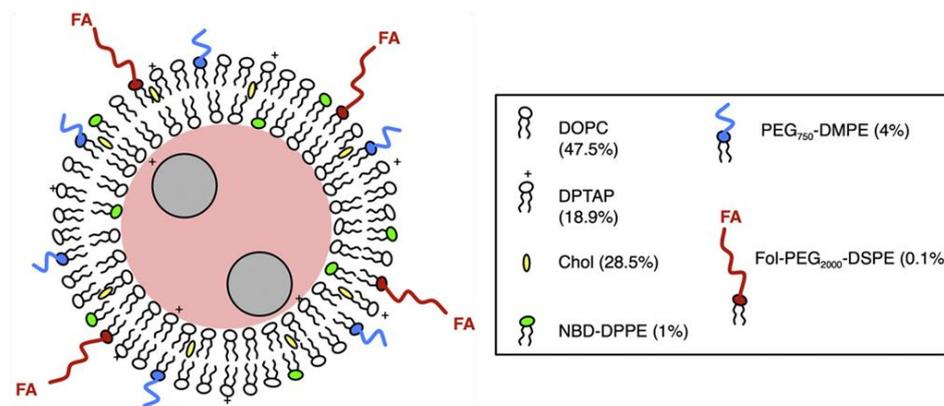


Figure 35 : Structure de liposomes multifonctionnels, constitués de deux phospholipides DOPC et DPTAP, dopés par des nanoparticules d'oxyde de fer (gris), un agent anticancéreux (rouge), un agent d'imagerie NBD-DPPE (vert) et fonctionnalisés en surface par un agent de ciblage, l'acide folique (FA)¹¹³.

Si la formation d'assemblages sous formes de liposomes est simple, rapide et permet l'encapsulation de tout type de molécules hydrophobes dans la bicouche lipidique, comme c'est le cas d'une grande partie des agents anti-cancéreux, ou de molécules hydrophiles au cœur, les liposomes peuvent être rapidement dégradés avant même d'atteindre leur cible. Cette dégradation ne permet pas la libération contrôlée de la drogue mais plutôt une diffusion passive. La stabilité et la porosité des phospholipides utilisés seront donc des paramètres importants. Cette dégradation s'accompagne d'une perte des agents de contraste ne permettant plus le suivi des agents libérés.

1.6.3.3 Utilisation de polymères amphiphiles

Les copolymères blocs amphiphiles ont été très largement exploités pour leurs aptitudes à s'auto-organiser dans l'eau sous forme de nano-structures. En effet, un copolymère dibloc, comportant une partie hydrophobe et une partie hydrophile, parvient à stabiliser des nanoparticules hydrophobes dans l'eau en exposant les parties hydrophiles de ses chaînes en surface (Figure 36). Des magnéto-micelles¹¹⁴ ont pu être fabriquées sur ce principe et utilisées comme agents d'imagerie multimodale après post-fonctionnalisation par un dérivé de fluorescéine en surface. Pour l'exemple présenté ci-dessous, une stabilité accrue a été obtenue après réticulation de la surface en utilisant un dérivé d'acide polyacrylique.

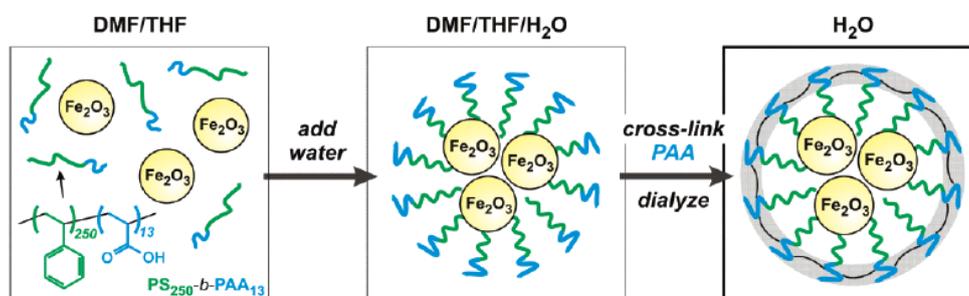


Figure 36 : Elaboration de magnéto-micelles réticulées¹¹⁴.

De nouvelles familles de polymères comme les hydrogels ont émergé ces dernières années¹¹⁵. Leur organisation en solution est gouvernée par la formation de liaisons H intra- et

intermoléculaires, si bien qu'un changement de proticité du solvant ou de la température génère des modifications structurales importantes. Ainsi, des hydrogels à base de poly(2-vinylpyridine-co-divinylbenzène), ne libèrent des agents encapsulés (en l'occurrence des nanoparticules thérapeutiques) que dans l'environnement des cellules cancéreuses¹¹⁶, connu pour son acidité supérieure à celle de l'environnement des cellules saines. De même, des hydrogels de type poly(N-isopropylacrylamide (PNIPAM) peuvent libérer de façon contrôlée un agent de diagnostic fluorescent, ainsi qu'un agent de thérapie^{117,118} sous l'effet d'un échauffement local par sollicitation optique ou magnétique. Ce relargage peut également être contrôlé par simple diffusion de l'intérieur vers le milieu environnant, facilitée ou non par une modification de la température locale¹⁰⁹. Il est également possible de combiner différentes sollicitations pour moduler l'organisation de pelotes d'hydrogels. Ici, des hydrogels à base de polymère bloc (poly(2-vinylpyridine-éthylène oxyde) encapsulant des nanoparticules magnétiques voient leur état d'agrégation modifié de manière réversible sous l'action d'un champ magnétique, d'une variation de la température ou du pH de la solution (Figure 37)¹¹⁹.

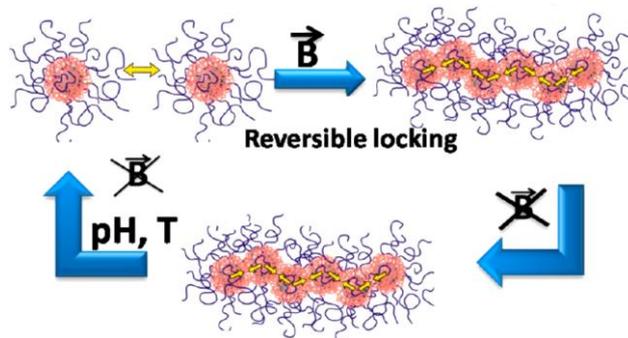


Figure 37 : Autoagrégation réversible de nanoparticules par application d'un champ magnétique¹¹⁹.

1.6.4 Notre approche : Utilisation de nanosphères fluorescentes comme plateformes

Comme décrit précédemment, l'utilisation d'un cœur fluorescent constitué d'un auto-assemblage de petites molécules organiques présente de nombreux avantages, mais nécessite une post-fonctionnalisation pour obtenir des nanoassemblages hybrides, via la présence d'entités complexantes. L'ajout d'une étape de pré-fonctionnalisation du fluorophore, avant l'étape de nanopréciipitation, permet d'obtenir un fluorophore présentant une fonction chimique d'accroche. Il sera ainsi possible de réaliser une co-précipitation avec le fluorophore non fonctionnalisé pour contrôler la quantité de groupes fonctionnels présents. Il s'agit toutefois d'études longues et délicates puisque certains des groupes fonctionnels pourraient ne pas être accessibles en surface des nanosphères⁹³. Malgré tout, ces nanosphères ont pu être utilisées comme agent de quantification par exaltation du signal de fluorescence mesuré lors d'un processus de complexation présent en surface¹²⁰.

Curieusement, la communauté scientifique ne s'est pas encore intéressée à l'utilisation de nanosphères organiques comme plateformes d'assemblage multimodales. En effet, la charge de surface intrinsèquement négative de ces nanosphères¹²¹ en solution aqueuse, due à la présence d'acides gras adsorbés à la surface, ouvre les portes vers une complexation par interactions électrostatiques. Il est alors possible de réaliser une auto-association d'entités chargées positivement

1.6/ Auto-assemblages

à la surface de ces nanosphères. Cette faisabilité a pu être démontrée en utilisant des nanoparticules d'oxyde de fer, chargées positivement.

Assemblages hybrides par liaisons électrostatiques

C'est dans ce contexte que les premiers systèmes magnéto-fluorescents ont pu être développés au sein de l'équipe. Le composé 4-di(4'-tert-butylbiphényl-4-yl)amino-4'-dicyanovinylbenzène (fvin)¹²² (1), présenté ci-dessous (Figure 38), possédant un groupe dicyanovinylène très électro-attracteur, émet un signal de fluorescence centrée sur 640 nm après excitation à 450 nm. Lors de sa nano-précipitation en milieu aqueux, le fluorophore fvin (1) s'auto-assemble sous forme de nanosphères, chargées négativement et présentant une intensité d'émission comparable à celle des fluorophores en solution organique. L'internalisation dans des cellules de nanosphères de fvin (1) a été réalisée avec succès et a donné lieu à un fort signal de fluorescence. Ces résultats nous ont conduit à exploiter les nanosphères de fvin comme de possibles plateformes d'assemblages bimodaux pour l'imagerie *in vitro* et *in vivo*. Le processus de nano-précipitation a alors été réalisé non plus dans l'eau mais dans une suspension de nanoparticules superparamagnétiques de maghémite, stabilisées en milieu acide nitrique par les ions nitrates et chargées positivement. Par attraction électrostatique, les nanosphères organiques se sont retrouvées décorées en surface par des nanoparticules d'oxyde de fer (assemblages de type 1) (Figure 38).

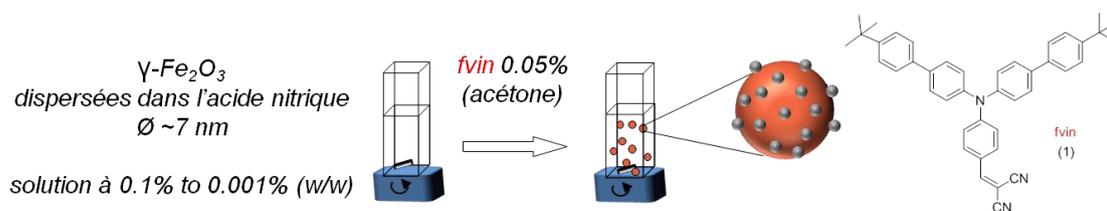


Figure 38: Elaboration d'assemblages magnéto-fluorescents par interactions électrostatiques.

Pour interagir efficacement avec les nanosphères, l'utilisation de nanoparticules chargées positivement est indispensable. Néanmoins, au-delà de la charge, l'absence de ligand trop complexant et stabilisant les nanoparticules d'oxyde de fer est bénéfique. En effet, aucun échange de ligand n'intervient, accélérant de ce fait les cinétiques de complexation. Dès la formation des nuclei organiques, les nanoparticules d'oxyde de fer interagissent avec leurs surfaces, bloquant de manière efficace le mûrissement d'Ostwald. La taille du nanoassemblage magnéto-fluorescent est alors fonction de la concentration en nanoparticules métalliques (Figure 39). Plus la concentration en nanoparticules magnétiques est élevée, plus la taille de l'assemblage, gouvernée par la taille de la nanosphère centrale, est réduite.

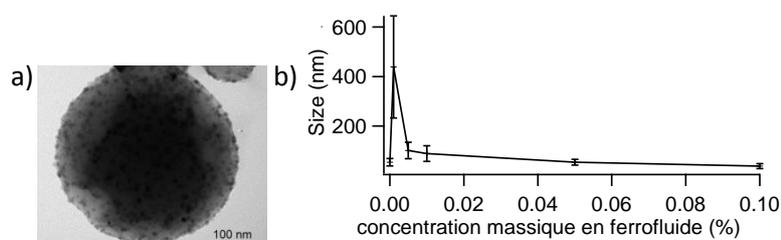


Figure 39: a) Image MET et b) dispersion en taille de l'assemblage en fonction de la concentration massique en ferrofluide.

Il a également été possible de réaliser la nano-précipitation d'une solution organique contenant fvin (1) et des nanoparticules d'oxyde de fer stabilisées par des ligands organiques à base d'esters phosphoniques (Beycostat®, Figure 40a). Les nanoassemblages alors obtenus apparaissent sous la forme d'un amalgame de nanoparticules d'oxydes métalliques liées à du matériel fluorescent grâce aux ligands Beycostat® (assemblage de type 2).

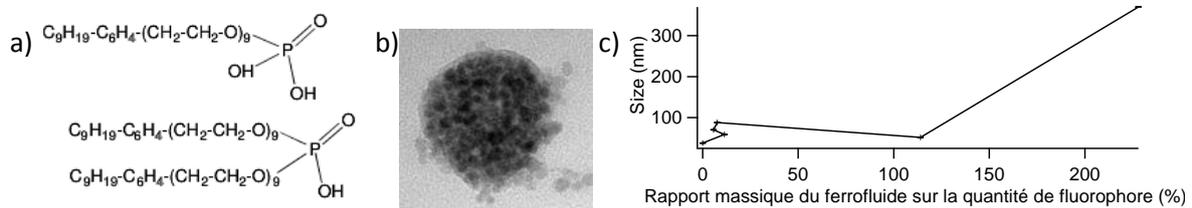


Figure 40: a) Stabilisant de type Beycostat® b) image MET et c) dispersion en taille de l'assemblage en fonction du rapport massique entre fluorophore et ferrofluide.

En effet, lorsque les nanoparticules métalliques sont localisées en surface de cet assemblage, les fluorophores proches de l'interface sont éteints, suite à un transfert d'électron à l'état excité ou à la formation d'un complexe non fluorescent. Comme le FRET, de l'anglais « Förster Resonance Energy Transfer », ce processus n'est probable qu'à courte distance, inférieure à quelques dizaines d'angströms. Cette fois-ci, une concentration élevée en nanoparticules d'oxyde de fer entraîne une augmentation de la taille globale des nanoassemblages.

Les deux types d'architecture ont été validés par mesure de fluorescence résolue en temps. Pour des nanosphères « décorées » en surface par des nanoparticules d'oxyde de fer (type 1), le signal de fluorescence décline plus rapidement au niveau des assemblages de petite taille (Figure 43a). Ce signal demeure en revanche constant pour des nanoassemblages formés d'un amalgame de nanoparticules magnétiques et de fluorophores (type 2), quelle que soit leur taille (Figure 41b). Ces résultats ont été interprétés à l'aide de transferts d'électron, dont l'efficacité diminue avec la distance entre le donneur et l'accepteur.

Pour les nanoassemblages de type 1, une réduction de la taille des nanoassemblages s'accompagne d'une augmentation du rapport surface/volume, au profit des molécules en surface. Celles-ci, plus sensibles à l'environnement extérieur que celles du cœur, subissent une extinction d'émission accrue en contact avec les nanoparticules d'oxyde de fer, d'où un déclin de fluorescence plus rapide pour des systèmes de petite taille (Figure 41a). A l'opposé, pour les nanoassemblages de type 2, les nanoparticules magnétiques et les fluorophores étant aléatoirement dispersés, leur distance moyenne demeure constante, d'où des déclin de fluorescence très similaires d'une taille à l'autre.

1.6/ Auto-assemblages

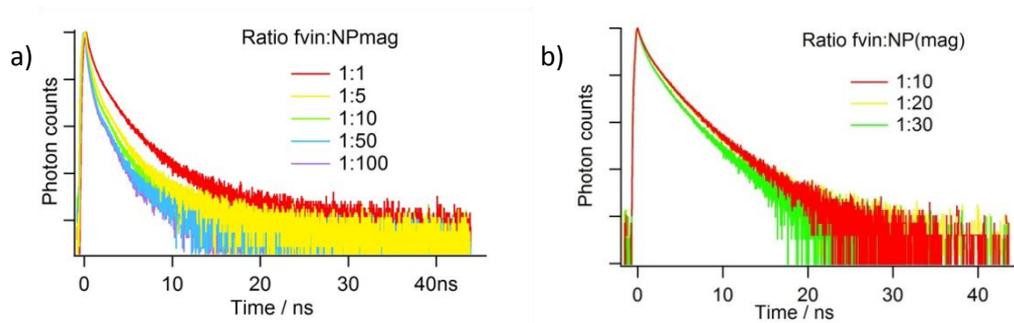


Figure 41: Déclins de fluorescence des nanoassemblages en fonction de la quantité de nanoparticules présentes en surface (type 1) (a) ou à l'intérieur (type 2) (b). Excitation à 513 nm et émission mesurée à 630 nm.

La limitation de ces systèmes est toutefois double. La première repose sur une stabilisation très partielle de l'assemblage due à la présence des ions nitrates en surface, uniquement possible en milieu acide. Une stabilisation en milieu neutre n'est donc pas envisageable dans ces conditions. De plus, la présence d'acide nitrique, stabilisant le ferrofluide original, entraîne une dégradation du composé organique dans les premières 24 heures, ainsi qu'une rupture de l'intégrité structurale de l'assemblage.

Cette preuve de concept nous a permis de démontrer la possibilité de réaliser une auto-association de deux entités, l'une magnétique et l'autre fluorescente au sein d'un même nano-objet en une seule étape. L'introduction de fonctions chélatantes en surface du cœur organique est donc appelée à accroître la force du lien avec les nanoparticules d'oxyde de fer en surface.

Stabilisation du lien cœur / coquille : nanosphères chélatantes

L'objectif principal de ces travaux de thèse repose sur l'élaboration de nouvelles architectures fluorescentes et magnétiques, stables d'un point de vue colloïdal, chimique et photochimique et dispersables en milieu neutre pour des applications ultérieures en biologie. Pour cela, une redéfinition du fluorophore fvin s'est imposée avec l'introduction nécessaire d'un ligand chélatant du fer. Le choix s'est ainsi porté sur la fonction acide phosphonique dont l'affinité vis-à-vis des ions fer est supérieure à celle des fonctions acides carboxyliques⁷⁸. Le squelette des nouvelles molécules complexantes synthétisées s'appuie sur celui de la molécule décrite précédemment, fvin (1). L'étude des propriétés de fluorescence de molécules chélatantes sera ainsi réalisée, l'objectif étant de ne pas favoriser une meilleure complexation au détriment de la fluorescence.

1.7 Conclusion

Durant ce premier chapitre, nous avons pu mettre en évidence l'importance de la nature du lien entre le luminophore et l'entité magnétique où des interactions peuvent entraîner une extinction de fluorescence. Afin d'améliorer la brillance et la réponse magnétique du nanoassemblage souhaité, il est nécessaire d'augmenter la concentration locale de ces deux entités. Pour cela, les nano-autoassemblages représentent la meilleure solution à ce jour. Malgré tout, il est important de développer des nanoassemblages stables, rapides et simples à élaborer.

Concernant la rapidité, l'utilisation de nanosphères organiques chélatantes comme plateformes permet en une étape de former cet assemblage, qu'il reste malgré tout à stabiliser. Concernant cette stabilité, il est crucial de pouvoir suivre le devenir de l'ensemble du nanoassemblage. En effet, beaucoup de systèmes actuels présentés précédemment permettent d'imager *in vivo* et *in vitro*, ainsi que de relarguer une drogue d'intérêt, sans parvenir toutefois à suivre le devenir de l'objet dans son ensemble. Nous nous sommes donc intéressés à développer des systèmes stables où le lien entre les entités fluorescente et magnétique est fort.

1.8 Références bibliographiques

- (10) Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; Wiley-VCH: Weinheim, 2001.
- (11) Stennett, E. M. S.; Ciuba, M. A.; Levitus, M. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1057–1075.
- (12) Göppert-Mayer, M. *Ann. Phys.* **1931**, *401*, 273–294.
- (13) Kaiser, W.; Garrett, C. G. B. *Phys. Rev. Lett.* **1961**, *7*, 229–231.
- (14) Pawlicki, M.; Collins, H. A.; Denning, R. G.; Anderson, H. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3244–3266.
- (15) Xu, C.; Webb, W. W. *J. Opt. Soc. Am. B* **1996**, *13*, 481–491.
- (16) Albota, M. A.; Xu, C.; Webb, W. W. *Appl. Opt.* **1998**, *37*, 7352–7356.
- (17) Uoyama, H.; Goushi, K.; Shizu, K.; Nomura, H.; Adachi, C. *Nature* **2012**, *492*, 234–238.
- (18) Xie, J.; Ménand, M.; Maisonneuve, S.; Métivier, R. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5980–5985.
- (19) Smolensky, E. D.; Park, H.-Y. E.; Zhou, Y.; Rolla, G. A.; Marjańska, M.; Botta, M.; Pierre, V. C. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 2818.
- (20) Lee, N.; Hyeon, T. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2575.
- (21) Lartigue, L. Synthesis and characterization of iron based nanoparticles, Université de Montpellier II, 2010.
- (22) Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064–2110.
- (23) Di Corato, R.; Gazeau, F.; Le Visage, C.; Fayol, D.; Levitz, P.; Lux, F.; Letourneur, D.; Luciani, N.; Tillement, O.; Wilhelm, C. *ACS Nano* **2013**, *7*, 7500–7512.
- (24) Lim, J.; Turkbey, B.; Bernardo, M.; Bryant, L. H.; Garzoni, M.; Pavan, G. M.; Nakajima, T.; Choyke, P. L.; Simanek, E. E.; Kobayashi, H. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 2291–2299.
- (25) Sandiford, L.; Phinikaridou, A.; Protti, A.; Meszaros, L. K.; Cui, X.; Yan, Y.; Frodsham, G.; Williamson, P. A.; Gaddum, N.; Botnar, R. M.; Blower, P. J.; Green, M. A.; de Rosales, R. T. M. *ACS Nano* **2013**, *7*, 500–512.
- (26) Arosio, P.; Thévenot, J.; Orlando, T.; Orsini, F.; Corti, M.; Mariani, M.; Bordonali, L.; Innocenti, C.; Sangregorio, C.; Oliveira, H.; Lecommandoux, S.; Lascialfari, A.; Sandre, O. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 5317.
- (27) Hickey, R. J.; Haynes, A. S.; Kikkawa, J. M.; Park, S.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1517–1525.
- (28) Lin, M.; Zhao, Y.; Wang, S.; Liu, M.; Duan, Z.; Chen, Y.; Li, F.; Xu, F.; Lu, T. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 1551–1561.
- (29) Min, Y.; Li, J.; Liu, F.; Padmanabhan, P.; Yeow, E.; Xing, B. *Nanomaterials* **2014**, *4*, 129–154.
- (30) D'Aléo, A.; Pompidor, G.; Elena, B.; Vicat, J.; Baldeck, P. L.; Toupet, L.; Kahn, R.; Andraud, C.; Maury, O. *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 2125–2132.
- (31) Pandya, S.; Yu, J.; Parker, D. *Dalton Trans.* **2006**, 2757–2766.
- (32) Hemmilä, I.; Webb, S. *Drug Discov. Today* **1997**, *2*, 373–381.
- (33) Parker, D. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *205*, 109–130.
- (34) Beeby, A.; Botchway, S. W.; Clarkson, I. M.; Faulkner, S.; Parker, A. W.; Parker, D.; Williams, J. A. G. *J. Photochem. Photobiol. B* **2000**, *57*, 83–89.
- (35) Somers, R. C.; Bawendi, M. G.; Nocera, D. G. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 579–591.
- (36) Zrazhevskiy, P.; Sena, M.; Gao, X. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4326–4354.
- (37) Lacroix, L.-M.; Delpech, F.; Nayral, C.; Lachaize, S.; Chaudret, B. *Interface Focus* **2013**, *3*, 20120103.
- (38) Gaponik, N.; Hickey, S. G.; Dorfs, D.; Rogach, A. L.; Eychmüller, A. *Small* **2010**, *6*, 1364–1378.
- (39) Smith, A. M.; Dave, S.; Nie, S.; True, L.; Gao, X. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2006**, *6*, 231–244.
- (40) Terai, T.; Nagano, T. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* **2013**, *465*, 347–359.
- (41) Ni, Y.; Zeng, L.; Kang, N.-Y.; Huang, K.-W.; Wang, L.; Zeng, Z.; Chang, Y.-T.; Wu, J. *Chem. – Eur. J.* **2014**, *20*, 2301–2310.
- (42) *Laser Photonics Rev.* **2009**, *3*, A1–A6.

- (43) Astruc, D.; Boisselier, E.; Ornelas, C. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1857–1959.
- (44) Majoros, I. J.; Thomas, T. P.; Mehta, C. B.; Baker, J. R. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5892–5899.
- (45) Esfand, R.; Tomalia, D. A. *Drug Discov. Today* **2001**, *6*, 427–436.
- (46) Terenziani, F.; Parthasarathy, V.; Pla-Quintana, A.; Maishal, T.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P.; Blanchard-Desce, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8691–8694.
- (47) Huhtinen, P.; Kivelä, M.; Kuronen, O.; Hagren, V.; Takalo, H.; Tenhu, H.; Lövgren, T.; Härmä, H. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2643–2648.
- (48) Wang, L.; Wang, K.; Santra, S.; Zhao, X.; Hilliard, L. R.; Smith, J. E.; Wu, Y.; Tan, W. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 646–654.
- (49) Bonacchi, S.; Genovese, D.; Juris, R.; Montalti, M.; Prodi, L.; Rampazzo, E.; Zaccheroni, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4056–4066.
- (50) Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62–69.
- (51) Giesche, H. *J. Eur. Ceram. Soc.* **1994**, *14*, 189–204.
- (52) Insin, N.; Tracy, J. B.; Lee, H.; Zimmer, J. P.; Westervelt, R. M.; Bawendi, M. G. *ACS Nano* **2008**, *2*, 197–202.
- (53) Li, L.; Choo, E. S. G.; Liu, Z.; Ding, J.; Xue, J. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *461*, 114–117.
- (54) Zhao, X.; Bagwe, R. P.; Tan, W. *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 173–176.
- (55) Gong, Y.-K.; Nakashima, K. *Chem. Commun.* **2001**, 1772–1773.
- (56) Ramchandani, M.; Robinson, D. *J. Controlled Release* **1998**, *54*, 167–175.
- (57) Makadia, H. K.; Siegel, S. J. *Polymers* **2011**, *3*, 1377–1397.
- (58) Lee, J.-H.; Jun, Y.; Yeon, S.-I.; Shin, J.-S.; Cheon, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 8160–8162.
- (59) Lapadula, G.; Bourdolle, A.; Allouche, F.; Conley, M. P.; del Rosal, I.; Maron, L.; Lukens, W. W.; Guyot, Y.; Andraud, C.; Bresselet, S.; Copéret, C.; Maury, O.; Andersen, R. A. *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 1062–1073.
- (60) Wu, W.; He, Q.; Jiang, C. *Nanoscale Res. Lett.* **2008**, *3*, 397–415.
- (61) Smolensky, E. D.; Park, H.-Y. E.; Berquó, T. S.; Pierre, V. C. *Contrast Media Mol. Imaging* **2011**, *6*, 189–199.
- (62) Bertorelle, F.; Wilhelm, C.; Roger, J.; Gazeau, F.; Ménager, C.; Cabuil, V. *Langmuir* **2006**, *22*, 5385–5391.
- (63) Queffélec, C.; Petit, M.; Janvier, P.; Knight, D. A.; Bujoli, B. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3777–3807.
- (64) Benyettou, F.; Lalatonne, Y.; Chebbi, I.; Benedetto, M. D.; Serfaty, J.-M.; Lecouvey, M.; Motte, L. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 10020–10027.
- (65) Wei, H.; Insin, N.; Lee, J.; Han, H.-S.; Cordero, J. M.; Liu, W.; Bawendi, M. G. *Nano Lett* **2011**, *12*, 22–25.
- (66) Smolensky, E. D.; Zhou, Y.; Pierre, V. C. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, *2012*, 2141–2147.
- (67) Sahoo, Y.; Goodarzi, A.; Swihart, M. T.; Ohulchanskyy, T. Y.; Kaur, N.; Furlani, E. P.; Prasad, P. N. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 3879–3885.
- (68) Pandey, C. M.; Sharma, A.; Sumana, G.; Tiwari, I.; Malhotra, B. D. *Nanoscale* **2013**, *5*, 3800.
- (69) Farimani, M. H. R.; Shahtahmasebi, N.; Rezaee Roknabadi, M.; Ghows, N.; Kazemi, A. *Phys. E Low-Dimens. Syst. Nanostructures* **2013**, *53*, 207–216.
- (70) Narita, A.; Naka, K.; Chujo, Y. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2009**, *336*, 46–56.
- (71) Cha, E.-J.; Jang, E. S.; Sun, I.-C.; Lee, I. J.; Ko, J. H.; Kim, Y. I.; Kwon, I. C.; Kim, K.; Ahn, C.-H. *J. Controlled Release* **2011**, *155*, 152–158.
- (72) Lu, Y.; Yin, Y.; Mayers, B. T.; Xia, Y. *Nano Lett.* **2002**, *2*, 183–186.
- (73) Ma, D.; Guan, J.; Dénommée, S.; Enright, G.; Veres, T.; Simard, B. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 1920–1927.
- (74) Dutz, S.; Andrä, W.; Hergt, R.; Müller, R.; Oestreich, C.; Schmidt, C.; Töpfer, J.; Zeisberger, M.; Bellemann, M. E. *J. Magn. Magn. Mater.* **2007**, *311*, 51–54.
- (75) Dan, M.; Scott, D. F.; Hardy, P. A.; Wydra, R. J.; Hilt, J. Z.; Yokel, R. A.; Bae, Y. *Pharm. Res.* **2012**.
- (76) Yoon, K. Y.; Kotsmar, C.; Ingram, D. R.; Huh, C.; Bryant, S. L.; Milner, T. E.; Johnston, K. P. *Langmuir* **2011**, *27*, 10962–10969.

1.8 / Références bibliographiques

- (77) Khurshid, H.; Hadjipanayis, C. G.; Chen, H.; Li, W.; Mao, H.; Machaidze, R.; Tzitzios, V.; Hadjipanayis, G. C. *J. Magn. Magn. Mater.* **2013**, *331*, 17–20.
- (78) Daou, T. J.; Grenèche, J. M.; Pourroy, G.; Buathong, S.; Derory, A.; Ulhaq-Bouillet, C.; Donnio, B.; Guillon, D.; Begin-Colin, S. *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 5869–5875.
- (79) Wu, C.; Bull, B.; Szymanski, C.; Christensen, K.; McNeill, J. *ACS Nano* **2008**, *2*, 2415–2423.
- (80) Wu, C.; Chiu, D. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3086–3109.
- (81) Fischer, I.; Kaeser, A.; Peters-Gumbs, M. A. M.; Schenning, A. P. H. J. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 10928–10934.
- (82) Wu, C.; Szymanski, C.; McNeill, J. *Langmuir* **2006**, *22*, 2956–2960.
- (83) Cheng, L.; Yang, K.; Chen, Q.; Liu, Z. *ACS Nano* **2012**.
- (84) Wu, C.; Schneider, T.; Zeigler, M.; Yu, J.; Schiro, P. G.; Burnham, D. R.; McNeill, J. D.; Chiu, D. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15410–15417.
- (85) Zhang, X.; Yu, J.; Wu, C.; Jin, Y.; Rong, Y.; Ye, F.; Chiu, D. T. *ACS Nano* **2012**, *6*, 5429–5439.
- (86) Patra, A.; Chandaluri, C. G.; Radhakrishnan, T. P. *Nanoscale* **2012**, *4*, 343–359.
- (87) Lei, T.; Pei, J. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 785.
- (88) Cui, Q. H.; Zhao, Y. S.; Yao, J. *Adv. Mater.* **2014**, n/a–n/a.
- (89) Zhao, Y. S.; Fu, H.; Peng, A.; Ma, Y.; Xiao, D.; Yao, J. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 2859–2876.
- (90) Gaiduk, A.; Yorulmaz, M.; Ishow, E.; Orrit, M. *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 946–951.
- (91) Faucon, A.; Lenk, R.; Hémez, J.; Gautron, E.; Jacquemin, D.; Le Questel, J.-Y.; Graton, J.; Brosseau, A.; Ishow, E. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 12748.
- (92) Ishow, E.; Brosseau, A.; Clavier, G.; Nakatani, K.; Tauc, P.; Fiorini-Debuisschert, C.; Neveu, S.; Sandre, O.; Léaustic, A. *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 6597–6599.
- (93) Petkau, K.; Kaeser, A.; Fischer, I.; Brunsveld, L.; Schenning, A. P. H. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17063–17071.
- (94) Palmer, L. C.; Stupp, S. I. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1674–1684.
- (95) Mas-Torrent, M.; Durkut, M.; Hadley, P.; Ribas, X.; Rovira, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 984–985.
- (96) De Greef, T. F. A.; Smulders, M. M. J.; Wolffs, M.; Schenning, A. P. H. J.; Sijbesma, R. P.; Meijer, E. W. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5687–5754.
- (97) Bong, D. T.; Clark, T. D.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 988–1011.
- (98) Amro, K.; Daniel, J.; Clermont, G.; Bsaibess, T.; Pucheault, M.; Genin, E.; Vaultier, M.; Blanchard-Desce, M. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 1903–1909.
- (99) Fischer, I.; Petkau-Milroy, K.; Dorland, Y. L.; Schenning, A. P. H. J.; Brunsveld, L. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 16646–16650.
- (100) Parthasarathy, V.; Fery-Forgues, S.; Campioli, E.; Recher, G.; Terenziani, F.; Blanchard-Desce, M. *Small* **2011**, *7*, 3219–3229.
- (101) Yao, H.; Ashiba, K. *RSC Adv.* **2011**, *1*, 834–838.
- (102) Balan, B.; Vijayakumar, C.; Ogi, S.; Takeuchi, M. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 11224.
- (103) Würthner, F.; Kaiser, T. E.; Saha-Möller, C. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3376–3410.
- (104) Hong, Y.; Lam, J. W. Y.; Tang, B. Z. *Chem Commun* **2009**, 4332–4353.
- (105) Weissleder, R. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 316–317.
- (106) Kaeser, A.; Fischer, I.; Abbel, R.; Besenius, P.; Dasgupta, D.; Gillisen, M. A. J.; Portale, G.; Stevens, A. L.; Herz, L. M.; Schenning, A. P. H. J. *ACS Nano* **2013**, *7*, 408–416.
- (107) Tilcock, C. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *37*, 33–51.
- (108) Martina, M.-S.; Fortin, J.-P.; Ménager, C.; Clément, O.; Barratt, G.; Grabielle-Madellmont, C.; Gazeau, F.; Cabuil, V.; Lesieur, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10676–10685.
- (109) Negussie, A. H.; Yarmolenko, P. S.; Partanen, A.; Ranjan, A.; Jacobs, G.; Woods, D.; Bryant, H.; Thomasson, D.; Dewhirst, M. W.; Wood, B. J.; Dreher, M. R. *Int. J. Hyperth. Off. J. Eur. Soc. Hyperthermic Oncol. North Am. Hyperth. Group* **2011**, *27*, 140–155.
- (110) Hickey, R. J.; Koski, J.; Meng, X.; Riggelman, R. A.; Zhang, P.; Park, S.-J. *ACS Nano* **2013**.
- (111) Wang, Y.; Angelatos, A. S.; Caruso, F. *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 848–858.

- (112) Allen, C. N.; Lequeux, N.; Chassenieux, C.; Tessier, G.; Dubertret, B. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 4420–4425.
- (113) Bothun, G. D.; Lelis, A.; Chen, Y.; Scully, K.; Anderson, L. E.; Stoner, M. A. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2011**, *7*, 797–805.
- (114) Kim, B.-S.; Qiu, J.-M.; Wang, J.-P.; Taton, T. A. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1987–1991.
- (115) Riedinger, A.; Pernia Leal, M.; Deka, S. R.; George, C.; Franchini, I. R.; Falqui, A.; Cingolani, R.; Pellegrino, T. *Nano Lett* **2011**, *11*, 3136–3141.
- (116) Tannock, I. F.; Rotin, D. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4373–4384.
- (117) Balasubramaniam, S.; Pothayee, N.; Lin, Y.; House, M.; Woodward, R. C.; St. Pierre, T. G.; Davis, R. M.; Riffle, J. S. *Chem Mater* **2011**, *23*, 3348–3356.
- (118) Kim, D.-H.; Vitol, E. A.; Liu, J.; Balasubramanian, S.; Gosztola, D. J.; Cohen, E. E.; Novosad, V.; Rozhkova, E. A. *Langmuir* **2013**.
- (119) Motornov; Minko. *Nano Lett.* **2012**.
- (120) Yan, H.; Su, H.; Tian, D.; Miao, F.; Li, H. *Sens. Actuators B Chem.* **2011**, *160*, 656–661.
- (121) Roger, K.; Cabane, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5625–5628.
- (122) Breton, M.; Prével, G.; Audibert, J.-F.; Pansu, R.; Tauc, P.; Pioufle, B. L.; Français, O.; Fresnais, J.; Berret, J.-F.; Ishow, E. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 13268–13276.

Chapitre II : Synthèse et caractérisation de fluorophores pour l'obtention de nanosphères

Chapitre II : Synthèse et caractérisation de fluorophores pour l'obtention de nanosphères	57
2.1 Introduction	59
2.2 Synthèse d'une chimiothèque de triarylaminés encombrés	60
2.2.1 Couplage par une réaction de Knoevenagel	61
2.2.2 Estérification en condition douce, de type Steglich	62
2.3 Synthèse d'une chimiothèque de triarylaminés complexants	63
2.3.1 Utilisation d'unités acides carboxyliques comme groupes chélatants	63
2.3.1.1 Synthèse de la chaîne latérale	63
2.3.1.2 Couplage sur le cœur fluorescent	64
2.3.1.3 Déprotection de l'acide protégé	64
2.3.2 Utilisation d'unités acides phosphoniques comme groupes chélatants	65
2.3.2.1 Synthèse de la chaîne latérale	66
2.3.2.2 Couplage sur le cœur fluorescent	67
2.3.2.3 Déprotection de l'acide phosphonique protégé	67
2.3.2.4 Optimisation de la structure de la chaîne latérale, en série polaire	68
2.3.2.5 Optimisation de la structure de la chaîne latérale, en série apolaire	70
2.3.3 Extension aux acides gem-hydroxy-biphosphoniques	72
2.4 Influence de la structure sur les propriétés de fluorescence	75
2.4.1 Influence du transfert de charge intramoléculaire	75
2.4.2 Influence des groupes chélatants	77
2.4.3 Etude des liaisons hydrogène intramoléculaires par analyse thermique	78
2.4.4 Analyses par spectroscopies infrarouge et RMN	79
2.4.5 Modélisation moléculaire et études conformationnelles	82
2.5 Repliements intramoléculaires des dérivés d'acides phosphoniques	84
2.5.1 Influence de la polarité de la chaîne latérale	84
2.5.2 Modification de la distance entre l'unité à transfert de charge intramoléculaire et le groupe chélatant	85
2.5.3 Etude des composés modèles avec des fonctions acides protégées	86
2.5.4 Influence de la chaîne latérale sur le déclin de fluorescence	88
2.6 Etude de complexation avec différents sels métalliques	91
2.6.1 Complexation en milieu organique avec des ions fer (III)	91
2.6.1.1 Etudes comparatives des complexes formés par spectroscopie d'absorption	93
2.6.1.2 Etudes comparatives des complexes formés par spectrofluorimétrie	94
2.6.1.3 Calcul des constantes d'extinction de Stern-Volmer et des constantes de complexation	95
2.6.2 Complexation en milieu organique avec des ions Ca (II)	99
2.6.3 Validation mécanistique par mesure de fluorescence résolue en temps	100
2.6.3.1 Mécanisme pour le composé acide carboxylique fdcooh (8)	101
2.6.3.2 Mécanisme pour les acides phosphoniques	102
Etude d'extinction de fluorescence pour le composé fpoh (13) :	102
Etude d'extinction de fluorescence en fonction de la polarité de la chaîne latérale :	103
Etude d'extinction de fluorescence lors de l'augmentation de la longueur de la chaîne latérale :	104
Etude d'extinction de fluorescence lors de l'ajout de sel de calcium (II) :	104
2.7 Conclusion	106
2.8 Références bibliographiques	107

2.1 Introduction

Un certain nombre de critères, décrits précédemment, doit être vérifié afin d'obtenir une dispersion de nanosphères en solution aqueuse. L'importance de la balance hydrophobe / hydrophile de la molécule nano-reprécipitée est sans équivoque et est contrôlée par la nature de la chaîne latérale. La présence de groupes encombrants, de type *tert*-butyle, permet d'éviter l'agrégation des molécules entre elles. Enfin, l'utilisation de molécules dotées de transfert de charge intramoléculaire permet de développer une chimiothèque de fluorophores émettant dans le rouge. Le fluorophore (2) peut ainsi être considéré comme une brique élémentaire-clé, dérivable aisément par addition nucléophile sur la fonction aldéhyde.

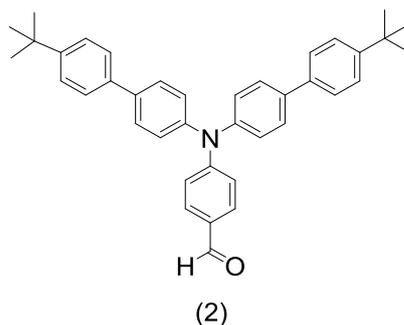


Figure 42 : Aldéhyde fcho (2), brique élémentaire pour la chimiothèque de triarylamines.

Nous allons tout d'abord nous intéresser à l'introduction de chaînes latérales, de taille et de polarité variables, et comportant des groupes complexants. L'influence du groupe chélatant et la nature du lien utilisé (longueur, polarité) sur les propriétés photophysiques seront ainsi étudiées pour anticiper les modifications photophysiques éventuelles causées par la complexation d'ions métalliques. De plus, il est nécessaire de comparer ces fluorophores complexants avec des composés modèles dont les unités chélatantes ont été « masquées ». Finalement, nous pourrions conclure sur les relations structure - propriétés photophysiques pour l'ensemble des fluorophores étudiés.

Ces études photophysiques seront nécessaires par la suite pour anticiper mais également pour comprendre les interactions mises en jeu entre un fluorophore, quelle que soit sa nature, et une nanoparticule inorganique.

Dans un premier temps, la synthèse organique de molécules fluorescentes chélatantes sera présentée. Dans un second temps, leurs études photophysiques ainsi que celles des molécules modèles seront réalisées afin d'étudier les interactions possibles entre fluorophore et un ion métallique.

2.2 Synthèse d'une chimiothèque de triarylamines encombrées

L'émission de fluorescence à l'état solide de la brique élémentaire-clé (2) apparaît dans le vert $\lambda_{em} = 484$ nm, due à un léger effet électroattracteur de la fonction aldéhyde. En effet, la présence d'un groupe électroattracteur (electron-withdrawing group en anglais, EWG) en position *para* du cœur triphénylamine entraîne l'apparition d'un état à transfert de charge⁹², d'autant plus stabilisé à l'état excité que le groupe EWG est très électroattracteur. Ainsi, dans le cas du composé (1) comportant un groupe dicyanovinylène connu pour son caractère électroattracteur très prononcé, l'état excité est situé à une énergie plus faible, conduisant à une émission centrée sur 630 nm, et donc décalée vers le rouge. Voici ci-dessous quelques exemples de fluorophores synthétisés par le passé au sein de l'équipe (Figure 43).

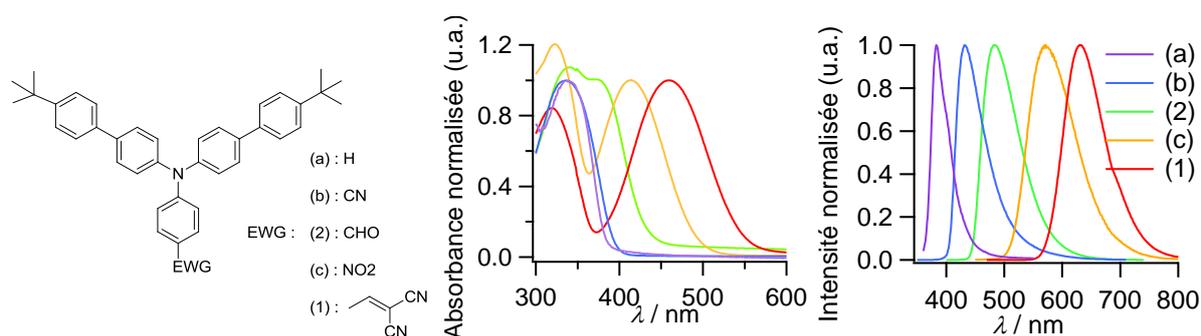


Figure 43 : Evolution de la longueur d'onde d'émission avec la force du groupe électroattracteur en position *para* de l'amine tertiaire⁹², en solution dans le toluène.

L'introduction d'une entité complexante peut être réalisée soit à partir des substituants encombrés, soit au niveau du groupe EWG. La première option a été rejetée pour des questions synthétiques. Les groupes *tert*-butyles assurent un caractère amorphe et hydrophobe, nécessaire à la formation de nanosphères par précipitation dans l'eau. Il ne serait donc pas judicieux de modifier cette partie, au risque de perdre la capacité des molécules à former des nanosphères. De plus, cela supposerait de repenser la stratégie de synthèse. La deuxième option, celle que nous avons choisie, est apparue plus simple grâce à l'introduction d'une fonction ester à partir de l'aldéhyde (2), solution qui n'avait pas encore été envisagée.

Dans un contexte de bio-imagerie, il est préférable de travailler avec des systèmes émettant dans le rouge, voire le proche infra-rouge, domaines spectraux où l'absorption des tissus est minimale. Nous avons donc opté pour le remplacement d'une des fonctions nitriles du composé fin (1) par une fonction ester, permettant le greffage d'un motif chélatant et l'obtention d'une émission centrée sur 600 nm.

Le développement de ces fluorophores est réalisé par deux réactions principales, un couplage de Knoevenagel sur l'aldéhyde (2) pour introduire une fonction acide carboxylique, et une réaction d'estérification.

2.2.1 Couplage par une réaction de Knoevenagel

La condensation de Knoevenagel met en jeu l'addition nucléophile d'un anion stabilisé par conjugaison sur le carbonyle d'une fonction aldéhyde pour conduire à la formation d'un système α,β -conjugué après déshydratation. Elle implique une réaction acide-base entre un composé à hydrogène acide (ici l'acide cyanoacétique) et une base adéquate (ici l'acétate d'ammonium). L'utilisation du malononitrile comme nucléophile a abouti au composé fvin (1) alors que l'utilisation de l'acide cyanoacétique génère le produit fcyac (3) (Figure 44).

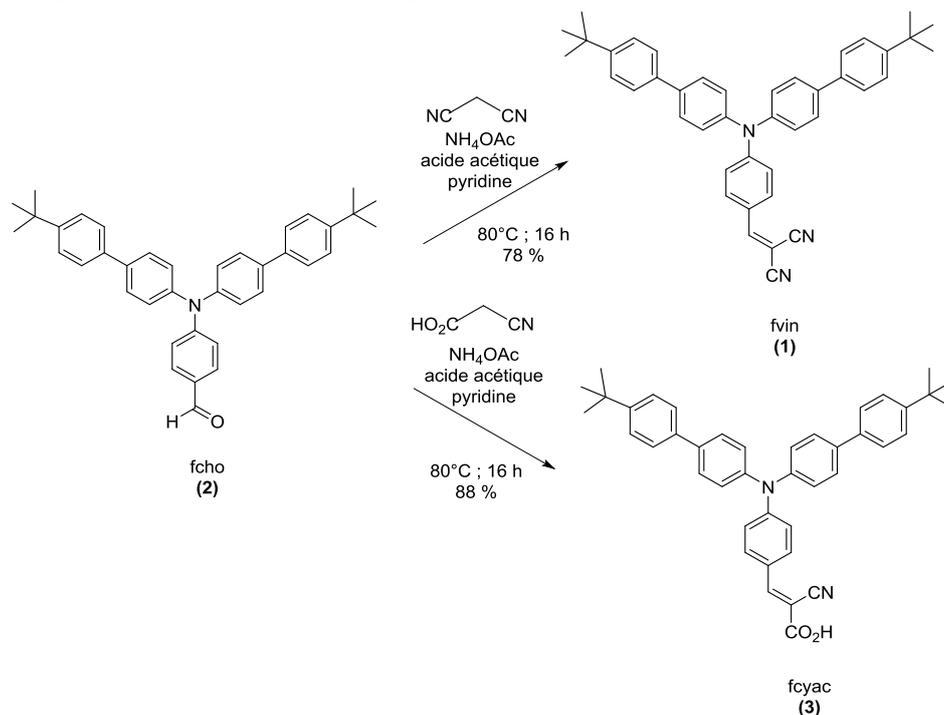


Figure 44 : Synthèse des molécules (1) et (3) à partir de l'aldéhyde initial fcho (2) servant de brique élémentaire clé.

Cette réaction de Knoevenagel a été également adoptée pour synthétiser un fluorophore modèle fC₂₀ (5), comportant une chaîne latérale inerte (Figure 45). Ce fluorophore, dépourvu de toute unité réactive, a servi de modèle pour comprendre l'influence de la présence d'un groupe ionisable, de type acide carboxylique ou phosphonique, sur les propriétés émissives de cette famille de fluorophores.

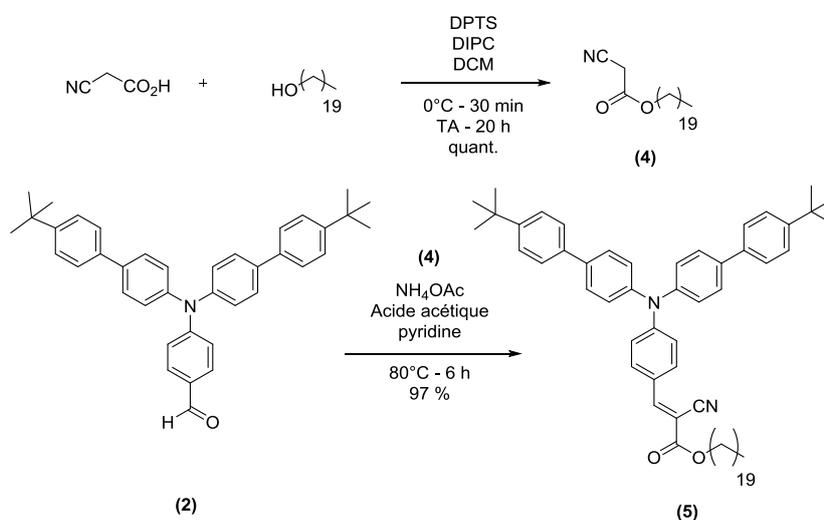


Figure 45 : Synthèse du composé fC₂₀ (5), un fluorophore modèle non chélatant.

2.2/ Synthèse d'une chimiothèque de triarylamines encombrées

2.2.2 Estérification en condition douce, de type Steglich

L'introduction de chaînes latérales (R) a été réalisée par une réaction d'estérification (Figure 46) sur l'acide carboxylique (3), en conditions douces, de type Steglich¹²³, à température ambiante et en utilisant un carbodiimide comme agent activant l'addition nucléophile des alcools. La première étape consiste en une déprotonation de l'acide carboxylique par le carbodiimide, suivie d'une attaque nucléophile du carboxylate sur l'atome de carbone électrophile de l'agent de couplage. Le nucléophile, ici un alcool, s'additionne sur le carbonyle de l'acide, ce qui entraîne l'élimination de l'agent activant sous forme d'urée. En fin de réaction, il est généralement possible d'observer cette urée sous forme d'une fine poudre blanche, insoluble dans le dichlorométhane (DCM). L'utilisation de la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) accélère la cinétique de réaction par formation d'un amide activé via l'atome d'azote du pyridinium de ce catalyseur, plus nucléophile que l'espèce à coupler. Dans le cas des réactions suivantes, un sel de la DMAP a été utilisé, le sel de l'acide *para*-toluène sulfonique (DPTS)¹²⁴. Cette catalyse en milieu acide empêche la formation de semi-urée, souvent responsable d'une chute du rendement et d'une perte irréversible de l'acide carboxylique.

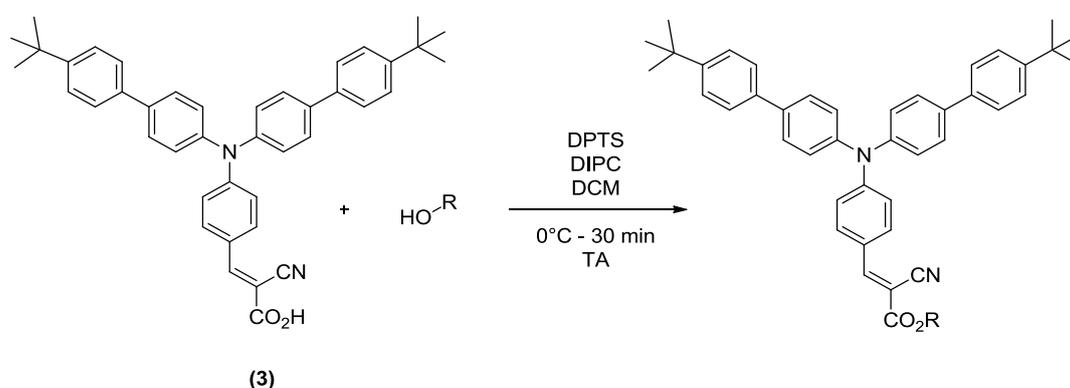


Figure 46 : Méthode générale d'estérification en conditions douces à partir du composé fcyac (3).

Nous avons privilégié comme espaceur un lien saturé pour éviter d'impacter l'état à transfert de charge et ainsi conserver une émission dans le rouge. Nous verrons par la suite que la longueur et la polarité de la chaîne seront des éléments également importants, influant sur les propriétés photophysiques de l'état radiatif.

2.3 Synthèse d'une chimiothèque de triarylamines complexantes

Comme explicité lors du chapitre précédent, de multiples groupes fonctionnels permettent de chélater les ions fer (III). Nous nous sommes principalement intéressés à deux fonctions complexantes de type acide phosphonique et acide carboxylique afin de comparer leur influence éventuelle sur l'état excité à transfert de charge. Des chaînes de longueur et de polarité variables ont été synthétisées, permettant de mettre en évidence des effets électroniques de l'environnement local sur les propriétés d'émission du fluorophore. Dans un premier temps, la nature polaire ou apolaire de la chaîne latérale a été étudiée au travers de deux séries de composés. Dans un second temps, l'impact de la longueur de cette chaîne a été examiné, ce qui a permis de montrer comment les interactions intramoléculaires entre la partie complexante et la partie fluorescente pouvaient être modulées à l'état fondamental comme à l'état excité.

L'objectif de cette partie est de réaliser la synthèse de fluorophores composés d'une chaîne latérale qui comprend une fonction acide protégée et non conjuguée. Le groupe acide sera ensuite déprotégé à la dernière étape de synthèse, facilitant ainsi les purifications, tout en évitant des réactions chimiques indésirables.

2.3.1 Utilisation d'unités acides carboxyliques comme groupes chélatants

La chimie des acides carboxyliques est une chimie très riche et bien connue¹²⁵. En effet, l'oxydation d'un alcool ou d'un aldéhyde, l'addition électrophile d'un sel organométallique sur du dioxyde de carbone ou encore l'hydrolyse de nitriles sont autant de méthodes possibles pour synthétiser ces acides carboxyliques. Nous avons privilégié l'utilisation d'acides carboxyliques disponibles commercialement et protégés sous forme d'esters silylés, ou alkylés, facilement clivables.

2.3.1.1 Synthèse de la chaîne latérale

Une addition nucléophile, de type Michael, d'un alcool sur un acrylate de *tert*-butyle permet d'obtenir l'hydroxy-ester¹²⁶ (6) (Figure 47). Une déprotonation partielle de l'éthylène glycol est réalisée grâce à du sodium métallique, utilisé en quantité catalytique (0,03 éq). Des tentatives d'optimisation du rendement de cette réaction en remplaçant le sodium par un équivalent d'hydrure de sodium ou en modifiant la température de réaction, se sont révélées infructueuses. Toutefois, malgré son faible rendement, cette réaction présente l'avantage d'être peu coûteuse en termes de réactifs et a donc été réalisée sur une échelle de l'ordre de plusieurs grammes.

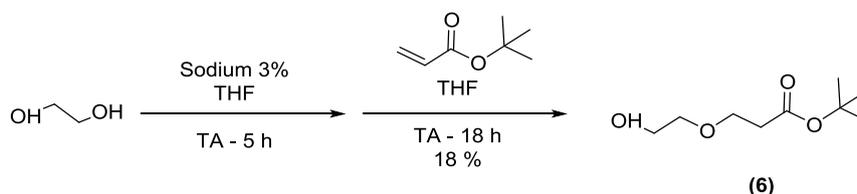


Figure 47 : Synthèse du composé (6) par addition nucléophile.

D'autres voies de synthèse avaient également été envisagées comme la protection de l'acide 3-bromopropionique par un dérivé silylé¹²⁷, suivie d'une substitution nucléophile de l'halogène par un alcoolate¹²⁸ obtenu par réaction acido-basique avec l'hydrure de sodium (NaH). Le choix de ce

2.3/ Synthèse d'une chimiothèque de triarylamines complexantes

groupe protecteur de la fonction acide carboxylique a été influencé par sa stabilité en milieu basique¹²⁹. Néanmoins, une réaction secondaire de β -élimination de l'atome de brome a conduit exclusivement à l'alcène α,β -conjugué et non au composé désiré (Figure 48).

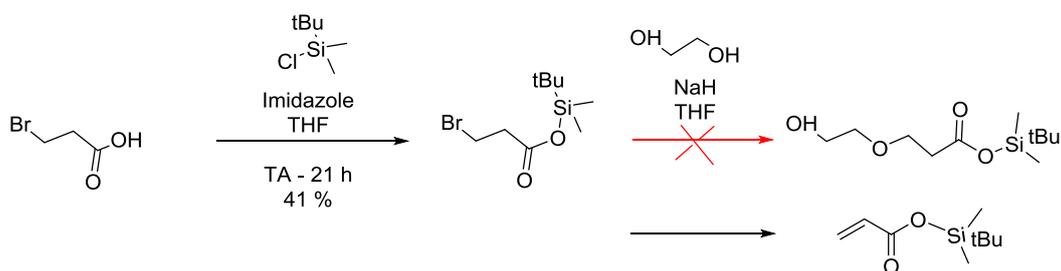


Figure 48 : Synthèse par protection de l'acide carboxylique puis substitution nucléophile.

2.3.1.2 Couplage sur le cœur fluorescent

Le couplage de la chaîne latérale sur le cœur fluorescent a été réalisé par une réaction d'estérification de Steglich entre le composé fcyac (3) et l'hydroxy-ester (6) pour aboutir à l'ester fluorescent (7) (Figure 49).

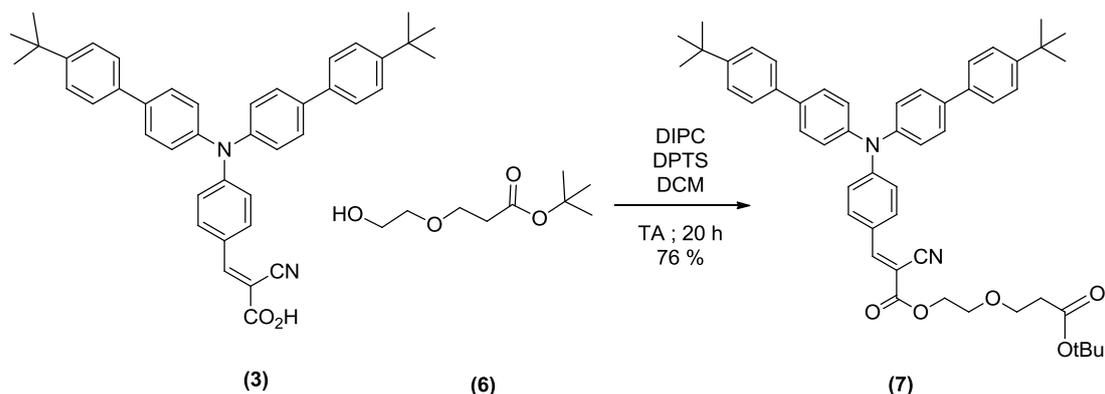


Figure 49 : Synthèse d'un ester fluorescent (7) par estérification de type Steglich.

2.3.1.3 Déprotection de l'acide protégé

La réaction de déprotection de l'ester de *tert*-butyle en acide carboxylique fdcooh (8) a été réalisée en utilisant de l'acide trifluoroacétique¹³⁰ (TFA) (Figure 50). Après protonation, le groupe *tert*-butyloxy est éliminé sous forme de *tert*-butanol par lavage. L'utilisation de conditions basiques comme de la soude est ici prohibée. En effet, la position vinylique est très sensible aux nucléophiles et peut subir une addition 1,4 de type Michael, rompant ainsi la conjugaison entre l'amine tertiaire et le groupe ester, électroattracteur. Une fluorescence bleue devient alors visible, révélant la rupture du transfert de charge.

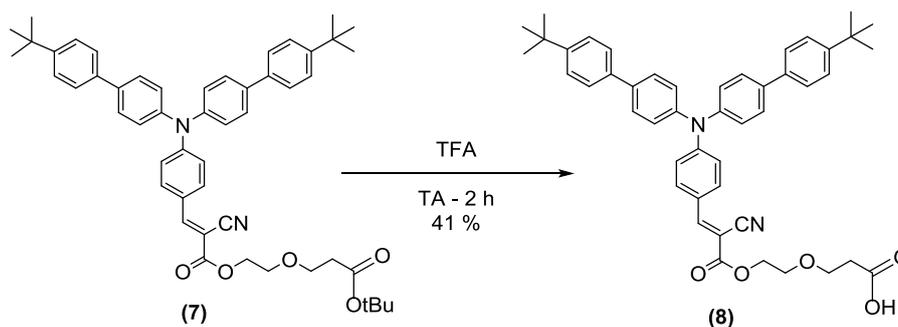


Figure 50 : Déprotection de l'ester fluorescent par addition d'acide trifluoroacétique (TFA).

2.3.2 Utilisation d'unités acides phosphoniques comme groupes chélatants

De manière à comparer entre eux les effets exercés par un groupe acide carboxylique et un groupe acide phosphonique, nous nous sommes efforcés de conserver la longueur de l'espaceur quasi-constante. Cela nous a amenés au squelette suivant pour le fluorophore possédant un acide phosphonique (13).

La méthode la plus utilisée pour synthétiser un phosphonate d'éthyle consiste à réaliser une substitution nucléophile¹³¹ d'un dérivé halogéné, généralement bromé, par des dérivés de type phosphite, $P(OR)_3$, ou $HPO(OEt)_2$ (réaction de Michaelis-Becker). L'utilisation de triéthylphosphite permet de chauffer à plus de 150 °C, sans solvant, et ainsi de déplacer l'halogène, selon la réaction de Michaelis-Arbuzov¹³². L'atome de phosphore dans la phosphite nucléophile étant au degré d'oxydation III, l'halogène libéré lors de la substitution nucléophile va pouvoir réaliser une attaque nucléophile en alpha de l'oxygène du groupe éthoxy. L'élimination résultante de l'halogénure d'alkyle entraîne l'oxydation de l'atome de phosphore au degré V. Pour former ces phosphonates, nous nous limiterons à l'utilisation de dérivés bromés comme réactifs. La réaction de Michaelis-Arbuzov doit également être réalisée avant le couplage de Knoevenagel, suite à la sensibilité de la position vinylique vis-à-vis des additions nucléophiles.

Deux possibilités sont alors envisageables pour la construction de cette chaîne latérale : soit une estérification d'un phosphonate obtenu sur le composé fcyac (3), soit une estérification sur l'acide cyanoacétique commercial d'une chaîne hydroxylée, suivie d'un couplage de Knoevenagel. La rétrosynthèse ci-dessous présente ces différentes possibilités (Figure 51).

2.3/ Synthèse d'une chimiothèque de triarylamines complexantes

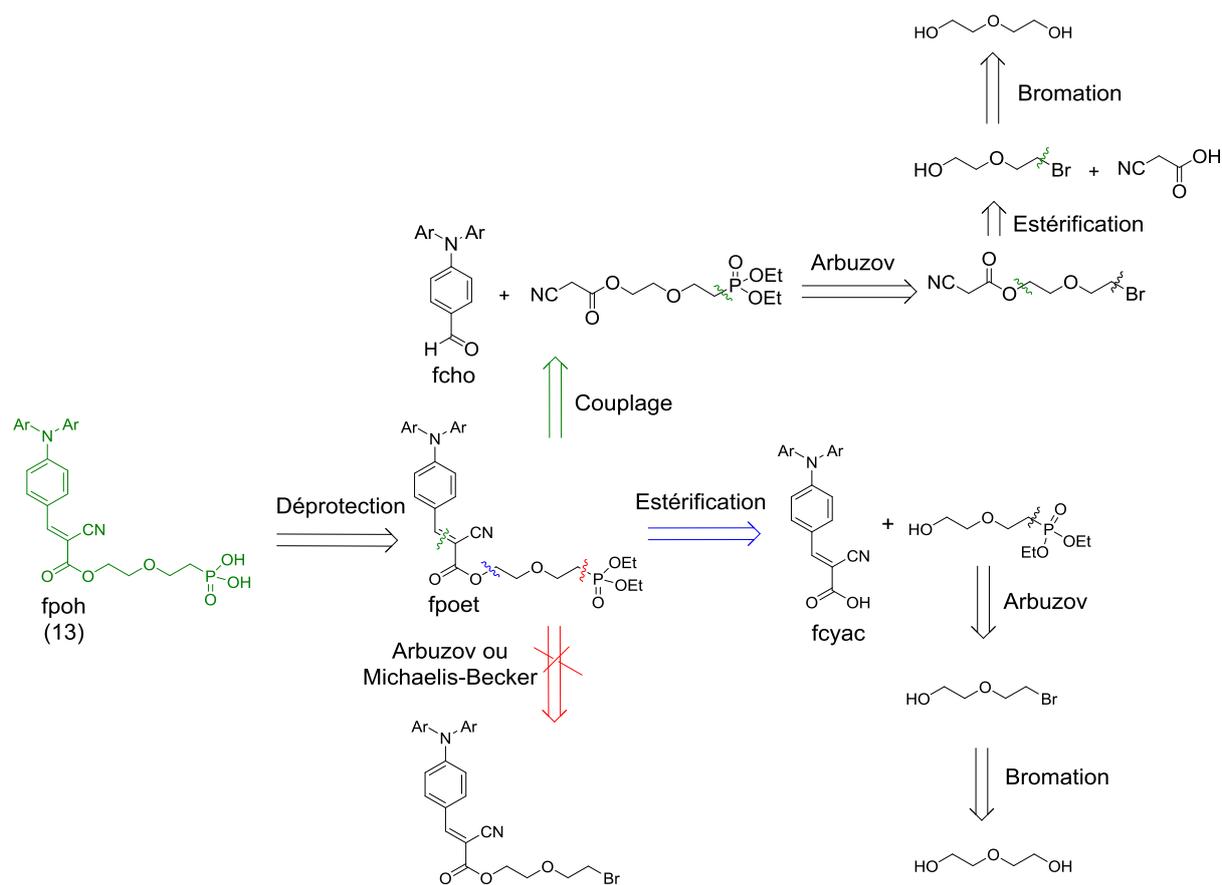


Figure 51 : Rétrosynthèse pour l'obtention du composé **fph (13)**, présentant une chaîne latérale comportant une fonction acide phosphonique

2.3.2.1 Synthèse de la chaîne latérale

Cette deuxième voie de synthèse, via une réaction de Knoevenagel finale, a été choisie au vu des résultats précédemment obtenus au sein de l'équipe pour permettre la synthèse de la molécule bromée (10). Le diéthylène glycol est alors mono-bromé pour obtenir le composé halogéné (9) (Figure 52).

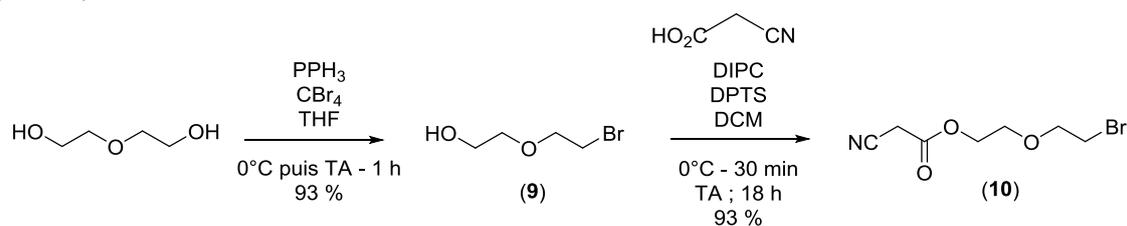


Figure 52 : Monobromation du diéthylène glycol, puis estérification avec l'acide cyanoacétique commercial.

Ensuite, la substitution nucléophile de l'halogène du composé (10) par la triéthylphosphite permet de synthétiser le bras espaceur (11) possédant le groupe phosphonate à son extrémité (Figure 53).

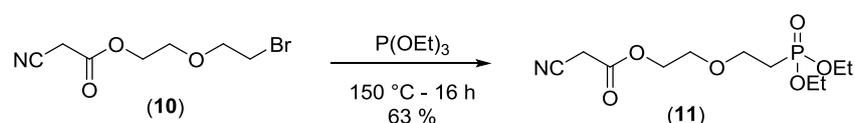


Figure 53 : Réaction de Michaelis-Arbuzov pour obtenir un bras espaceur avec un groupe phosphonate.

Le faible rendement obtenu provient avant tout de l'étape de purification sur silice polaire où une perte de produit est engendrée par adsorption sur le gel de silice.

2.3.2.2 Couplage sur le cœur fluorescent

La réaction de Knoevenagel entre le phosphonate (11) et l'aldéhyde (2) permet d'obtenir le fluorophore modèle (12) dénommé fpoet, possédant un acide phosphonique protégé en ester selon la réaction suivante (Figure 54).

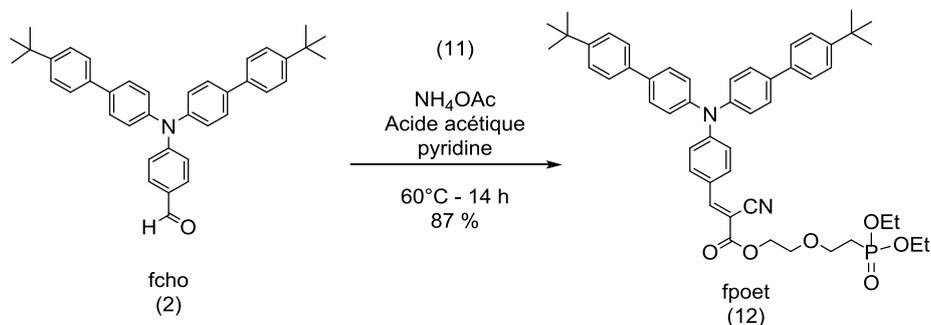


Figure 54 : Réaction de Knoevenagel pour obtenir le composé fpoet (12).

2.3.2.3 Déprotection de l'acide phosphonique protégé

Une dernière étape de déprotection permet d'aboutir au fluorophore cible fpoh (13) présentant un groupe acide phosphonique complexant. Plusieurs possibilités ont été envisagées. Dans le cas d'une solubilité complète ou partielle en milieu aqueux du composé à déprotéger, une solution d'acide chlorhydrique peut être utilisée¹³³. Il s'agit de conditions très drastiques qui ne conviennent pas à tous les types de substrats, notamment à fpoet (12), trop hydrophobe. Une seconde méthode, plus douce, utilise du bromure de triméthylsilane, selon la méthode développée par McKenna¹³⁴. La forte oxophilie du silicium entraîne la formation d'un phosphonate de triméthylsilyle selon la réaction ci-dessous, par addition sur le dérivé silylé de l'atome d'oxygène doublement lié à l'atome de phosphore¹³⁵ (Figure 55). Une élimination des groupes silylés sous forme de siloxanes est réalisée en présence de méthanol et permet d'aboutir au composé fpoh (13).

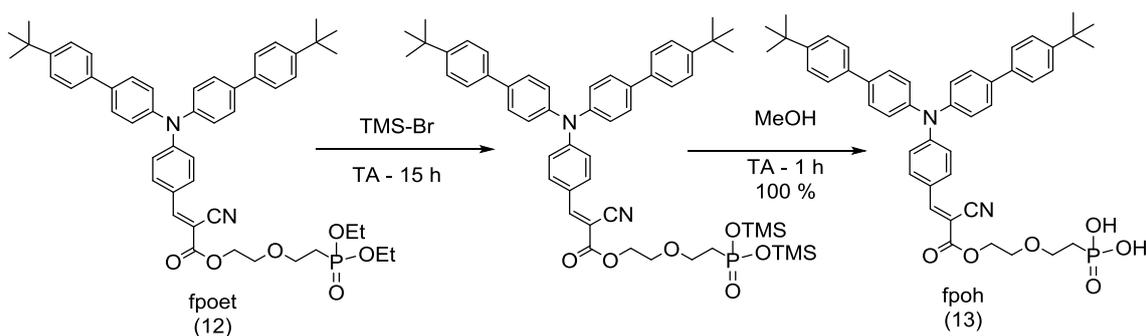


Figure 55 : Déprotection du phosphonate fpoet (12) pour obtenir le composé fpoh (13).

Il est toutefois important de noter qu'une reprecipitation de ce composé dans un mélange acétone – diéthyléther est nécessaire pour éliminer l'excès de siloxanes.

2.3/ Synthèse d'une chimiothèque de triarylamines complexantes

2.3.2.4 Optimisation de la structure de la chaîne latérale, en série polaire

Afin d'étudier l'influence de la polarité de la chaîne et de l'éloignement du groupe chélatant sur les propriétés d'émission du fluorophore fpoh (13), la nature chimique et la longueur de la chaîne latérale ont été modifiées. Les modulations de cette chaîne n'ont porté que sur les dérivés d'acides phosphoniques en raison de leur plus grande affinité pour les ions fer ainsi que pour expliquer le comportement particulier du composé fpoh (13), détaillé plus loin dans ce chapitre.

Dans un premier temps, le nombre d'unités éthylène glycol a été augmenté pour étudier l'influence de l'éloignement du groupe complexant sur les propriétés du système à transfert de charge intramoléculaire. Deux autres dérivés bromés (Figure 56) ont été synthétisés selon le mode opératoire adopté pour le composé (10), visant à désymétriser des chaînes éthylénoxy. Dans un premier temps nous allons réaliser une réaction d'estérification, suivie dans un second temps par une réaction d'Arbuzov. Finalement, une réaction de Knoevenagel sera suivie par une déprotection pour obtenir ces nouveaux fluorophores complexants en série polaire.

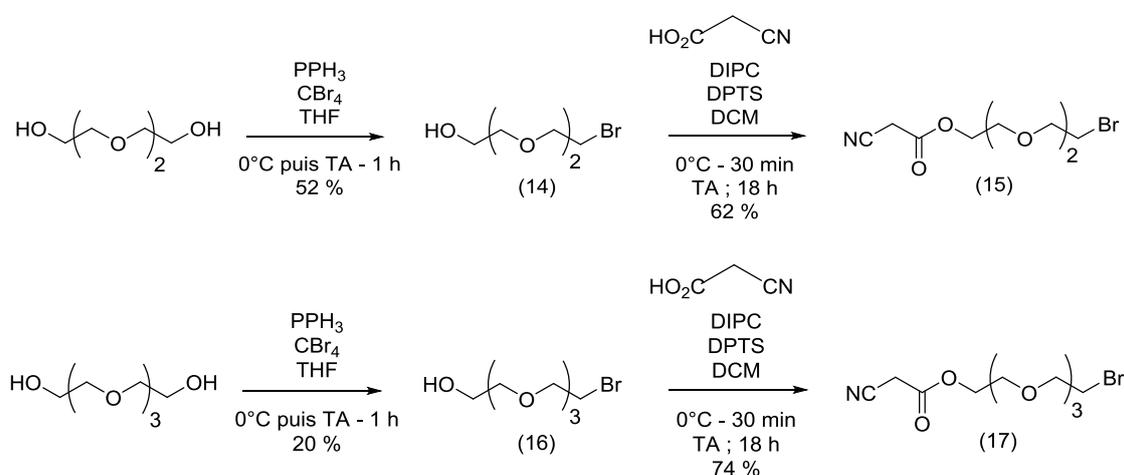


Figure 56 : Augmentation de la longueur des chaînes des hydroxy-esters, en série polaire.

Une baisse du rendement lors de la mono-bromation des dérivés d'éthylène glycol a été observée avec l'augmentation du nombre d'unités éthylénoxy, de 93% pour le diéthylène glycol (9) à 20% pour le trétraéthylène glycol. Cette diminution résulte d'une faible réactivité des chaînes polyéthylène glycol plutôt que de la formation parasite de dérivés dibromés. La réaction d'estérification est quant à elle moins sensible à la nature du substrat et s'accompagne d'une légère baisse du rendement.

La seconde étape correspond à une réaction d'Arbuzov conduisant aux dérivés de phosphonates (18) et (19) (Figure 57).

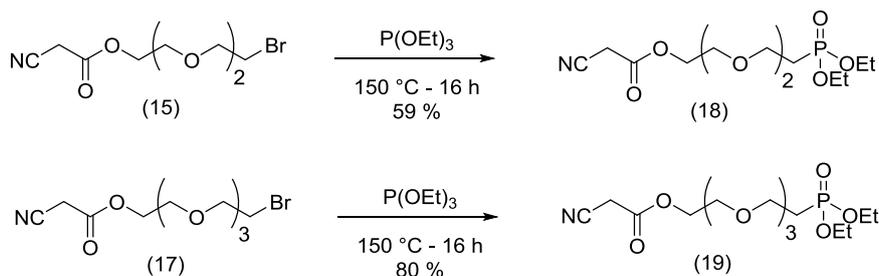


Figure 57 : Réaction de Michaelis-Arbusov pour obtenir différentes tailles de liens phosphonates, en série polaire.

Pour la molécule la plus polaire (19), un lavage par un solvant apolaire a permis de s'affranchir de l'étape de purification sur colonne et d'aboutir au composé (19) pur.

Les chaînes latérales phosphonates ont ensuite été couplées à l'aldéhyde fcho (2) par une réaction de Knoevenagel, pour aboutir aux phosphonates fluorescents désirés (Figure 58).

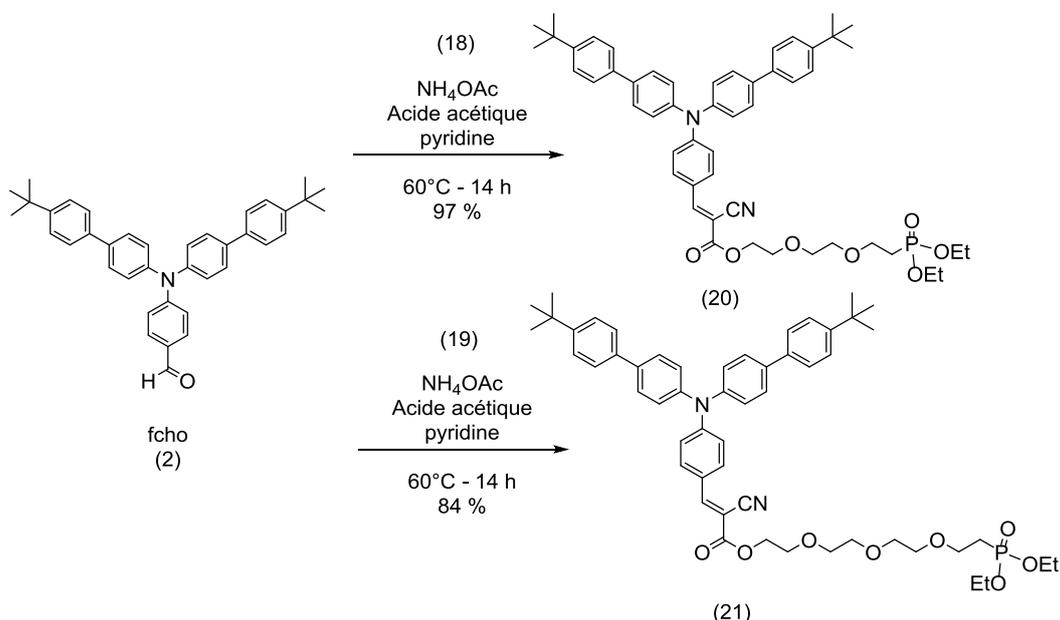


Figure 58 : Réaction de Knoevenagel pour l'obtention de phosphonates fluorescents, en série polaire.

Aucune influence de la chaîne latérale sur les rendements de réactions n'a été ici observée. Tous les composés ont été purifiés par chromatographie sur gel de silice grâce à l'hydrophobicité apportée par les groupes esters et les noyaux aromatiques.

Finalement, une dernière étape de déprotection à l'aide de bromure de triméthylsilyle a été réalisée pour obtenir les deux acides phosphoniques fluorescents (22) et (23), possédant respectivement 3 et 4 unités éthylèneoxy (Figure 59). L'étape de purification par reprécipitation s'est révélée infructueuse pour ces dérivés d'acide phosphonique. Afin d'éviter la présence de silanes résiduels, les composés ont été séchés une dizaine d'heures sous pression réduite, avant l'étape de méthanolyse. Des analyses par spectrométrie de masse et par spectroscopie RMN ¹H et ³¹P n'ont révélé aucune trace de dérivés silylés.

2.3/ Synthèse d'une chimiothèque de triarylamines complexantes

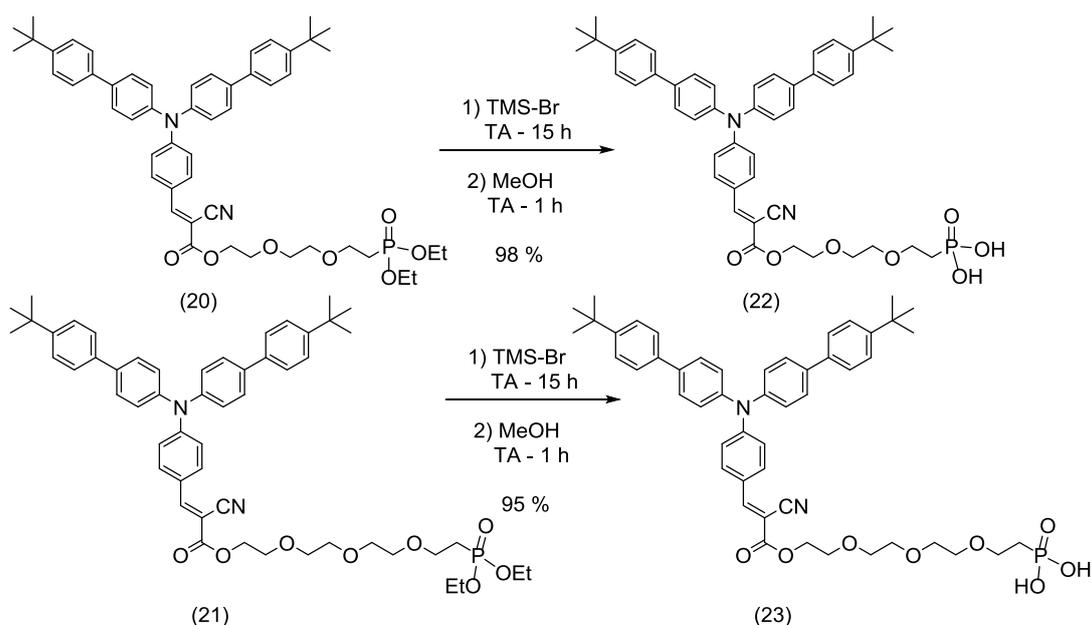


Figure 59 : Déprotection des phosphonates (20) et (21).

D'un point de vue synthétique, la modification de la chaîne latérale en série polaire n'entraîne pas de différence, excepté une légère perte de rendement par augmentation de la polarité globale de la molécule, due aux processus de purification.

2.3.2.5 Optimisation de la structure de la chaîne latérale, en série apolaire

Les chromophores impliquant un transfert de charge intramoléculaire voient leurs propriétés photophysiques influencées par la polarité du solvant. Le choix d'une chaîne hydrophobe saturée s'est donc avéré pertinent afin d'étudier l'influence de la polarité locale sur l'état à transfert de charge. En effet, des études spectroscopiques réalisées initialement au sein du groupe¹³⁶ ont mis en évidence une diminution du temps de vie de l'état excité en milieu polaire.

Deux nouveaux espaceurs hydrophobes (24) et (25) suivants ont ainsi pu être synthétisés, selon les méthodes développées précédemment (Figure 60).

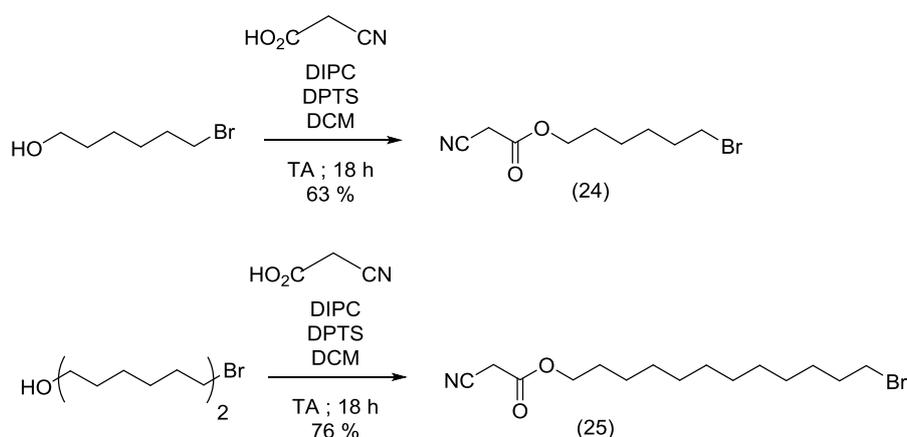


Figure 60 : Augmentation de la taille des halogéno-esters en série apolaire.

L'étape de monobromation a été inutile puisque les bromo-alcools correspondants sont commercialement disponibles, à des prix raisonnables. La présence d'une chaîne hydrophobe

n'entraîne pas de modification des conditions expérimentales, ou du rendement de couplage. La réaction de Michaelis-Arbuzov sur les dérivés bromés précédents a été également réalisée dans les mêmes conditions (Figure 61). De manière surprenante, une hydrolyse de la fonction ester a pu être observée après plusieurs mois de stockage à température ambiante.

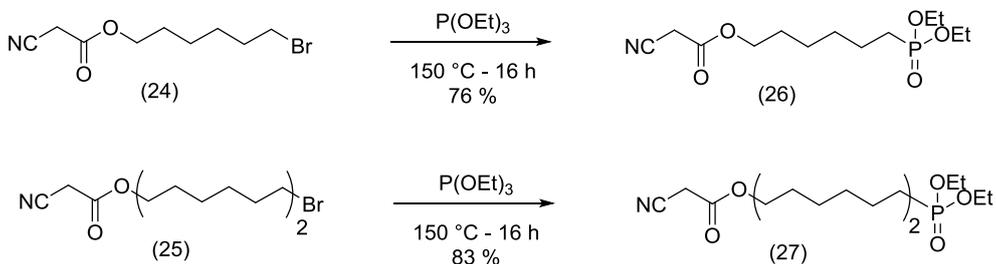


Figure 61 : Réaction de Michaelis-Arbuzov pour différentes longueurs d'espaces de liens phosphonates, en série apolaire.

Les dernières étapes de synthèse, correspondant à une réaction de Knoevenagel, suivie d'une étape de déprotection, permettent d'obtenir les acides phosphoniques fluorescents en série apolaire (28) et (29) (Figure 62).

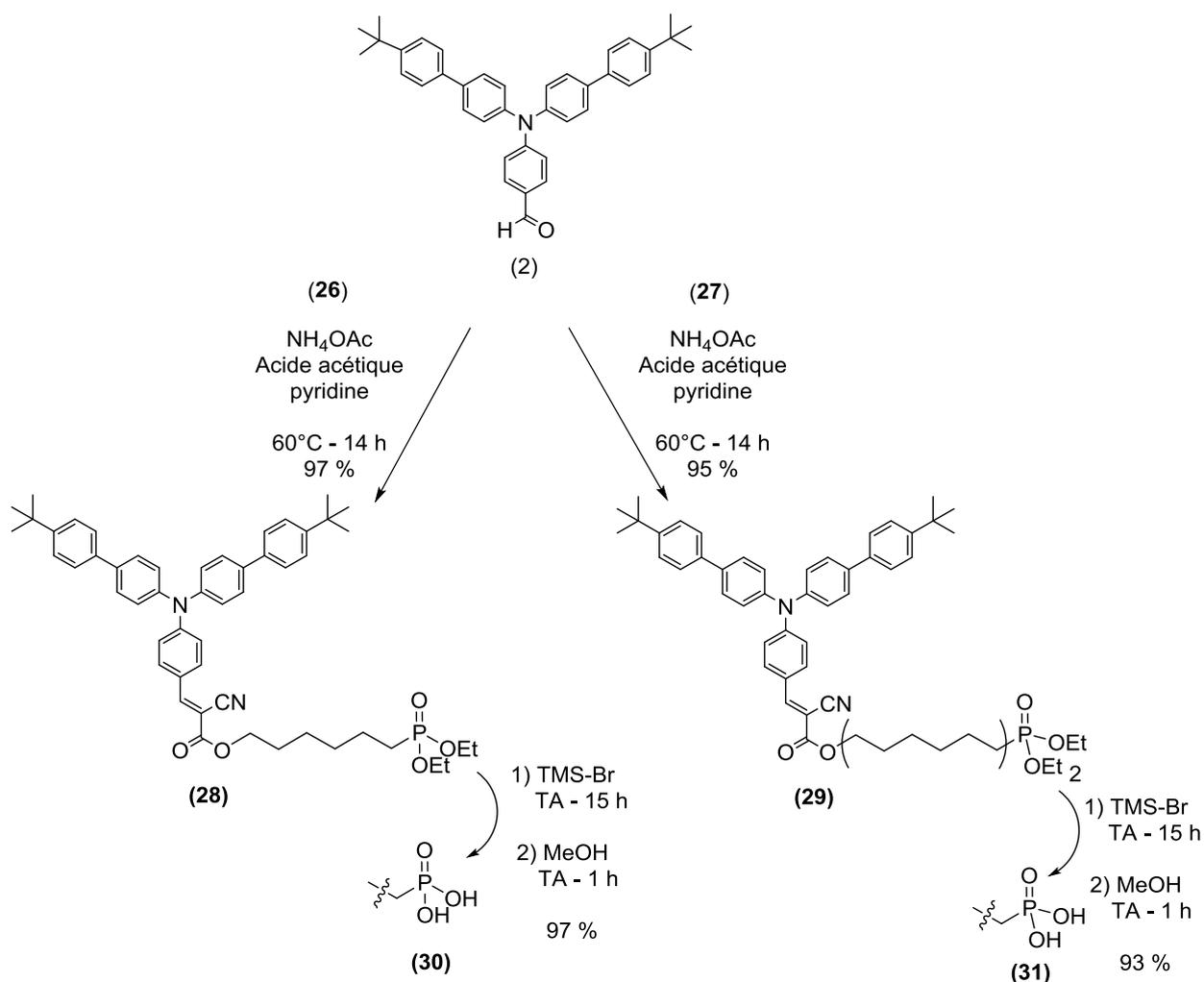


Figure 62 : Synthèse des acides phosphoniques fluorescents à partir de l'aldéhyde fcho (2) comportant des espaces apolaires.

2.3/ Synthèse d'une chimiothèque de triarylamines complexantes

2.3.3 Extension aux acides gem-hydroxy-biphosphoniques

Dans la littérature, il existe une classe de molécules dérivées des acides phosphoniques aptes à complexer des sels métalliques de façon efficace, les acides *gem*-hydroxy-biphosphoniques (HBP). Ce groupe fonctionnel peut cependant subir des transpositions par action d'une base ou par augmentation de la température¹³⁷ (Figure 63). Pour toute application *in vivo*, une attention particulière devra être apportée à la stabilité de cet HBP qui se transformera de manière irréversible en phosphonophosphate.

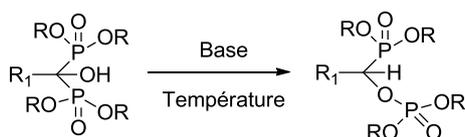


Figure 63 : Réarrangement d'un HBP en milieu basique ou par augmentation de la température.

La synthèse de ces acides HBP est toutefois loin d'être triviale et peut être réalisée de multiples façons. Dans le cadre des différents essais réalisés, nous nous sommes limités à la synthèse des HBP en utilisant des dérivés d'acides (chlorure d'acide, ester) comme précurseurs (Figure 64). L'utilisation de phosphites d'alkyle permet d'isoler et de purifier le phosphonate désiré, avant de réaliser l'étape de déprotection par addition de bromure de triméthylsilyle¹³⁸. Il est également possible d'utiliser des phosphites silylées, permettant de réaliser *in situ* une déprotection des phosphonates par ajout de méthanol¹³⁹. L'utilisation de phosphites mixtes, partiellement silylées, conduit à des acides HBP mono, di ou triesters d'alkyle. Dans un premier temps, une addition nucléophile de la phosphite sur le dérivé d'acide est réalisée, suivie d'une seconde attaque sur l'intermédiaire d'acétylphosphonate de dialkyle. Dans un second temps, une étape d'hydrolyse est nécessaire pour obtenir les acides HBP désirés.

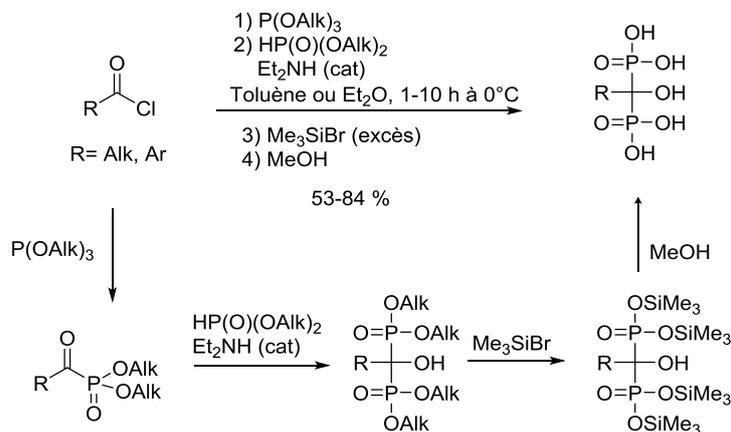


Figure 64 : Formation d'un HBP à partir d'un chlorure d'acide.

D'autres méthodes fondées sur l'utilisation de catéchols borane¹⁴⁰, développées récemment au sein du laboratoire, permettent également de générer en une seule étape un acide HBP par activation *in situ* de la fonction acide carboxylique (Figure 65).

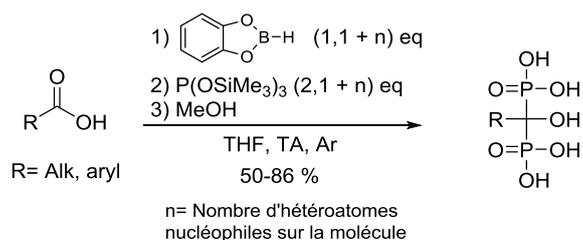


Figure 65 : synthèse d'acide HBP par activation *in situ* du groupe acide carboxylique par un catéchol borane.

Nous nous sommes donc intéressés à la synthèse d'un dérivé d'acide HBP en utilisant l'ester de *tert*-butyle (7) (Figure 66) ou l'acide correspondant (8) activé sous forme de chlorure d'acide. La présence d'un bon groupe partant comme le *tert*-butyle laissait espérer un déplacement du groupe alkoxy au profit de la formation de l'acide HBP correspondant. Malheureusement, quelques secondes après l'ajout de la phosphite, une décoloration de la solution a lieu, attribuée à une rupture de la conjugaison par une attaque nucléophile sur la position vinylique (Figure 66). Une diminution de la température en dessous de -45°C permet d'inhiber cette attaque nucléophile mais l'ester de *tert*-butyle n'est plus assez électrophile. Une activation du carbonyle par utilisation d'acide de Lewis (ZnBr_2) s'est également révélée infructueuse et ce quelle que soit la nature de la phosphite utilisée, silylée ou alkylée.

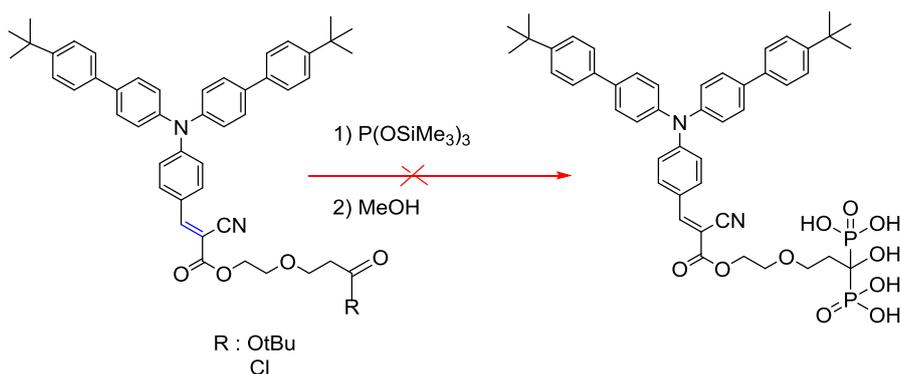


Figure 66 : Méthode de synthèse pour l'obtention d'acide HBP en utilisant un ester de *tert*-butyle comme réactif.

Une deuxième voie de synthèse a alors été explorée (Figure 67). La première étape correspond à une protection de l'alcool (6) en présence de dérivés silylés¹⁴¹, connus pour être clivables en milieu acide. Cette première étape a abouti au composé protégé mais avec un faible rendement. L'addition de la phosphite a conduit à un produit qui, caractérisé en RMN ^{31}P fournit un pic à environ 20 ppm, typique d'un environnement HBP, mais aucune extraction ou purification du composé déprotégé n'a pu être réalisée¹⁴². Des essais de déprotection *in situ* de l'alcool ont également été réalisés, sans succès, malgré l'utilisation de certaines conditions opératoires recommandées (acide fluorhydrique dans la pyridine).

2.3/ Synthèse d'une chimiothèque de triarylamines complexantes

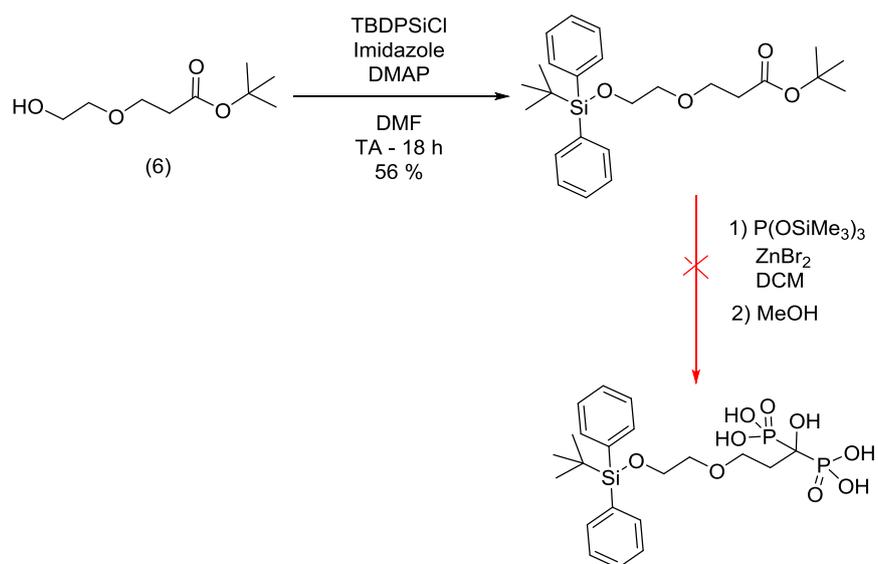


Figure 67 : Protection d'alcool primaire puis tentative de formation d'acide HBP.

2.4 Influence de la structure sur les propriétés de fluorescence

Lors de la partie précédente, nous avons décrit la synthèse de molécules fluorescentes dotées de groupes complexants, acide carboxylique ou phosphonique, ainsi que leurs modèles protégés. Nous avons alors étudié leurs propriétés photophysiques, pré-requis pour toute utilisation ultérieure en bioimagerie sous forme de nanosphères. Nous nous sommes intéressés dans cette partie à l'influence de la chaîne latérale sur les propriétés émissives. Toutes les études suivantes ont été réalisées en solution dans le toluène, de qualité spectroscopique. Ce solvant a été utilisé car il mime le mieux le comportement des molécules à l'état solide.

2.4.1 Influence du transfert de charge intramoléculaire

La présence d'un groupe acide directement conjugué avec la partie aromatique permet d'obtenir une molécule sensible à la quantité de base (par exemple la triéthylamine) présente en solution organique (Figure 68). Une évolution de la bande d'absorption (Figure 69a) ainsi que du spectre d'émission (Figure 69b) est obtenue par déprotonation de la fonction acide, entraînant une déstabilisation de l'orbitale moléculaire la plus basse vacante (BV). Un équilibre acido-basique, observé grâce à la présence d'un point isobestique à 334 nm, peut alors s'établir dans le toluène. Cet équilibre est toutefois moins visible à 415 nm, probablement dû à une modification de la polarité du solvant par ajout de base, puisque les composés à transfert de charge sont connus pour être sensibles à la polarité du solvant¹⁴³.

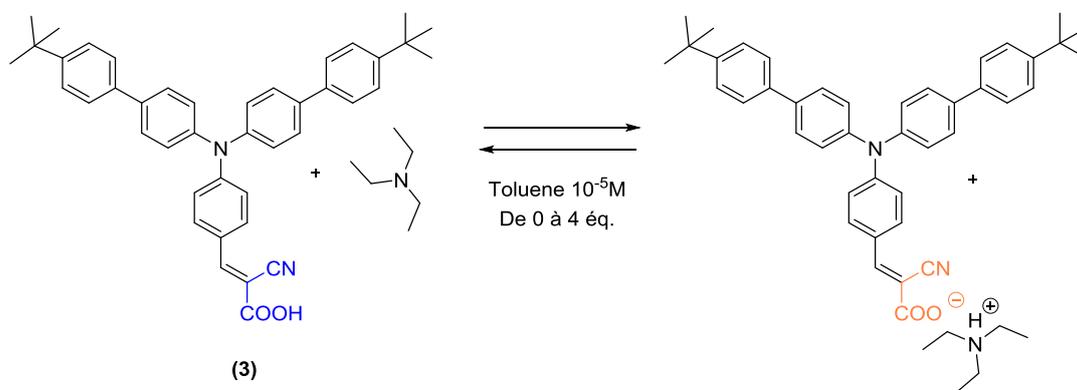


Figure 68 : Equilibre acido basique du composé (3) en solution organique.

2.4/ Influence de la structure sur les propriétés de fluorescence

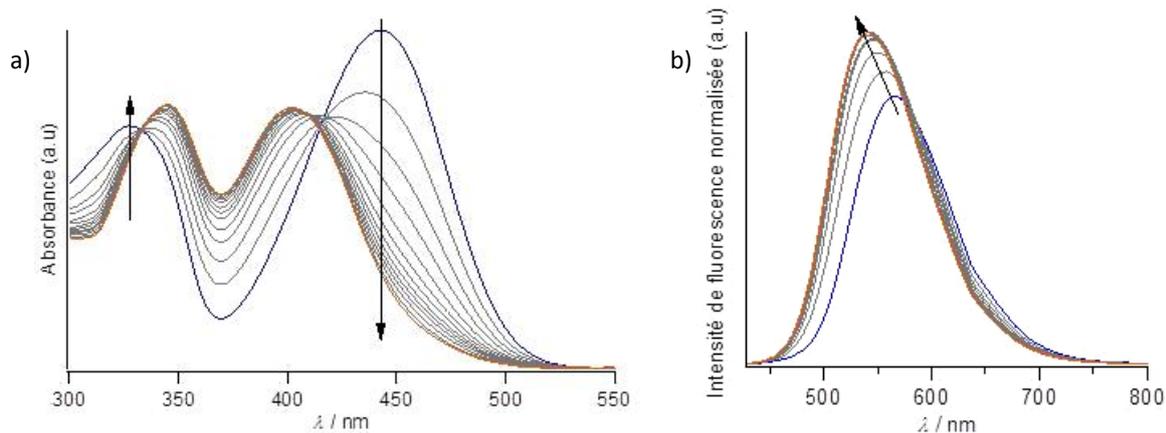
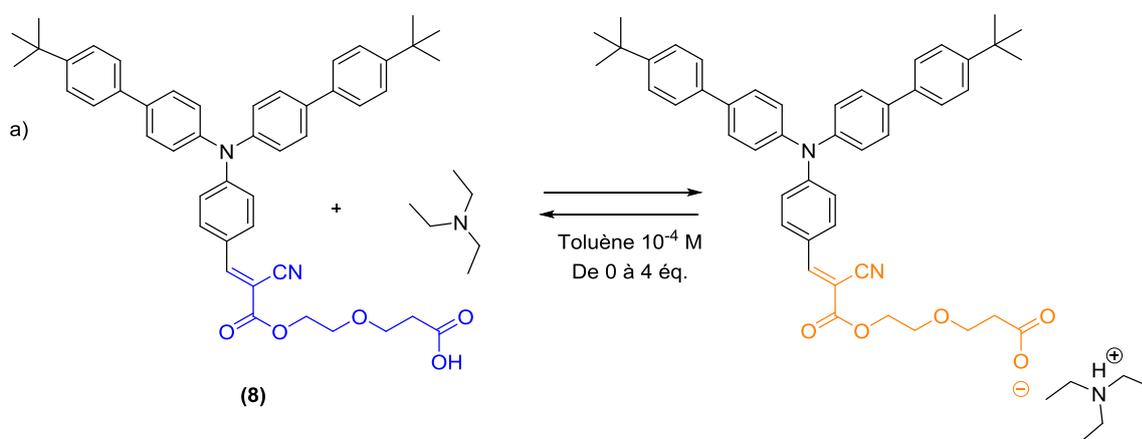


Figure 69 : Evolution des spectres a) d'absorption et b) d'émission ($\lambda_{\text{exc}} = 450$ nm) du composé (3) en solution dans le toluène en fonction de la quantité de matière en triéthylamine ajoutée (0 ; 0,4 ; 0,8 ; 1,1 ; 1,5 ; 1,8 ; 2,1 ; 2,5 ; 2,8 équivalents). Spectres d'émission non corrigés de la réponse du détecteur.

Lorsque le groupe complexant est éloigné de la partie aromatique, le caractère acido-basique n'influence plus le transfert de charge intramoléculaire. Dans ce cas, l'ajout de triéthylamine à une solution organique de l'acide carboxylique (8) dans le toluène (Figure 70a) ne conduit à aucune modification des bandes d'absorption et d'émission (Figure 70b). L'absence de conjugaison électronique entre l'unité acide carboxylique et le transfert de charge intramoléculaire est responsable de l'indépendance de la nature de l'état excité radiatif vis-à-vis du caractère acido-basique du fluorophore.



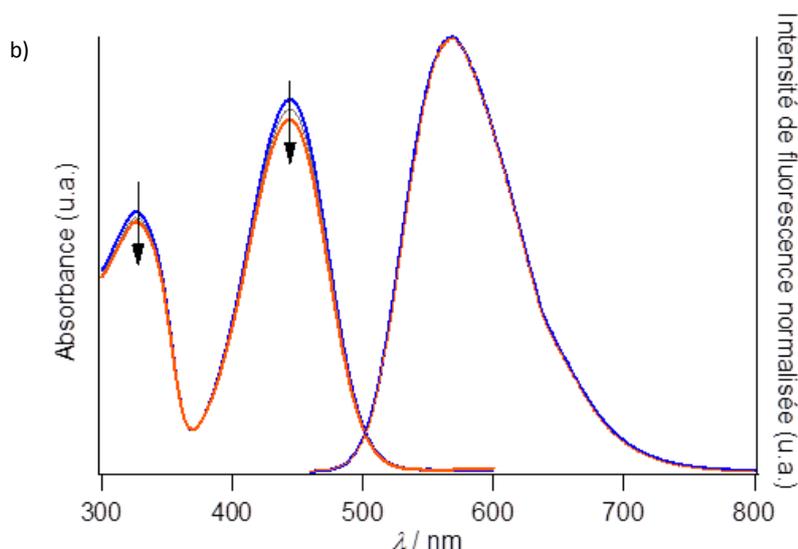


Figure 70 : Etude des propriétés acido-basiques du composé (8) en solution dans le toluène. a) Réaction acido-basique avec la triéthylamine et b) évolution des propriétés photophysiques selon le nombre d'équivalents de base ajoutés (de 0 à 2,8 équivalents, 5 paliers). Spectres d'émission non corrigés de la réponse du détecteur.

2.4.2 Influence des groupes chélatants

Commençons simplement par comparer les fluorophores dénommés fpoh (13) et fdcooh (8) (Figure 71c). Pour ces deux composés, les chaînes latérales sont formées d'unités éthylèneoxy (EO), polaires, où seules les unités complexantes diffèrent, l'une étant une fonction acide phosphonique (13) et l'autre une fonction acide carboxylique (8). Les spectres d'absorption et d'émission de ces deux fluorophores sont présentés ci-dessous (Figure 71). Deux bandes d'absorption sont ainsi présentes, l'une dans le domaine de l'UV, centrée sur les noyaux aromatiques, très peu sensible à l'environnement, et une deuxième bande dans le domaine du visible, propre au transfert de charge¹³⁶. Une légère différence apparaît à l'état fondamental au niveau de la bande d'absorption dans le visible, centrée à 444 nm. Celle-ci apparaît légèrement plus large pour fpoh (13) que pour fdcooh (8). Cet élargissement et le déplacement hypsochrome d'environ 3 nm du maximum d'absorption ont été attribués à une interaction entre le groupe $\text{PO}(\text{OH})_2$ et la partie conjuguée du fluorophore. Pour ce qui est des propriétés d'émission, le signal de fluorescence de fpoh est légèrement décalé vers le rouge de 10 nm. Nous avons tenté d'attribuer ce décalage à une stabilisation accrue de l'état excité à transfert de charge intramoléculaire par liaisons hydrogène avec l'unité $\text{PO}(\text{OH})_2$, due au caractère plus acide du groupe phosphonique.

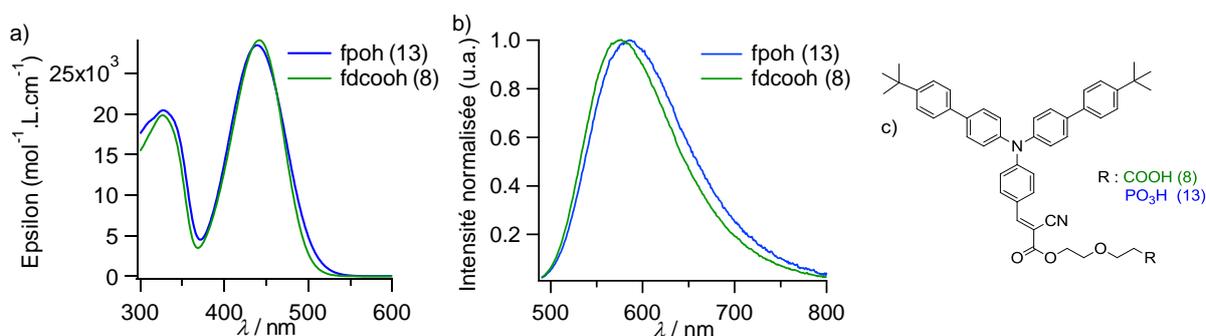


Figure 71 : Propriétés spectroscopiques des fluorophores en fonction de la nature du groupe chélatant. Spectres a) d'absorption et b) d'émission normalisés des composés (8) et (13). c) Structures moléculaires.

2.4/ Influence de la structure sur les propriétés de fluorescence

Pour ces deux groupes chélatants, les valeurs de rendement quantique de fluorescence sont en revanche très différentes. En effet, alors qu'une valeur de 0,19 est obtenue pour fdcooh (8), elle est inférieure à 0,01 pour fpoh (13). Une désactivation non radiative de l'état excité prédomine et est provoquée par la présence de l'unité acide phosphonique.

L'hypothèse d'un phénomène de repliement intramoléculaire entre le groupe acide et la partie à transfert de charge par formation de liaisons hydrogène intramoléculaires permettrait d'expliquer cette baisse du rendement quantique de fluorescence. La mesure de températures de fusion ou de transition vitreuse, des études par spectroscopie infrarouge (IR) ou encore des calculs de modélisation moléculaire sont autant d'analyses possibles caractérisant ce type de liaisons. Nous nous sommes donc intéressés à comprendre la différence de comportement entre ces deux groupes complexants avant d'étudier l'impact de la nature de la chaîne latérale.

2.4.3 Etude des liaisons hydrogène intramoléculaires par analyse thermique

La présence de groupes *tert*-butyles encombrants empêche les molécules de se rapprocher et de minimiser leur énergie par agrégation de leurs systèmes π . Les molécules à l'état solide ne forment alors pas de solide cristallin mais possèdent plutôt une structure amorphe, caractérisée par une température de transition vitreuse T_g . Tout comme pour les polymères, T_g représente la température à laquelle certains mouvements moléculaires de torsion ou de rotation deviennent possibles. Des études antérieures menées au sein du groupe ont montré que la valeur de T_g dépendait fortement de la nature des substituants autour du système à transfert de charge.

Si l'on s'intéresse dans un premier temps à l'influence de la chaîne latérale, la température de transition vitreuse diminue (Tableau 1), de 86°C pour le composé fvin (1), à 52-67°C pour les composés fpoet (12) et fotbu (7), respectivement. Cette diminution de la température de transition vitreuse provient d'une plus grande flexibilité ou d'un plus grand nombre de degrés de liberté du système comme ce peut être le cas en la présence de groupes *tert*-butyle, très encombrants.

Fluorophores	T_g (°C)
fvin ⁹² (1)	86
fpoet (12)	52
fotbu (7)	67

Tableau 1 : Températures de transition vitreuse en fonction de la nature du groupe chélatant.

L'allongement de la chaîne latérale en série polaire permet d'observer une diminution de la température de transition vitreuse à l'inverse des chaînes apolaires dont l'allongement provoque une augmentation de T_g . (Tableau 2). On peut donc conclure que l'introduction d'unités éthylèneoxy provoque une plus grande flexibilité que celle apportée par des groupes alkyles, en accord avec ce qui est observé pour les polymères de type poly(oxyde d'éthylène) ($T_g = -67$ °C) et polyéthylène ($T_g = -20$ °C). En effet, pour le polyéthylène, les chaînes aliphatiques interagissent via des interactions de

London, pouvant conduire jusqu'à la cristallisation du matériau. La valeur de T_g obtenue pour le fluorophore hydrophobe fC₂₀ (5), possédant une chaîne latérale inerte hydrophobe, confirme la présence de ce type d'interactions stabilisantes.

Fluorophores	T_g (°C)	Fluorophores	T_g (°C)
fpoet (12)	52	falpoet (28)	47
ftpoet (20)	17	fal2poet (29)	85
ftetrapoet (21)	16	fC ₂₀ (5)	86

Tableau 2 : Températures de transition vitreuse des esters en fonction de la longueur de la chaîne latérale en série polaire et apolaire.

Une fois les esters déprotégés en acides, les valeurs de T_g augmentent par formation de liaisons hydrogène intermoléculaires (Tableau 3). Une augmentation de 120 °C est obtenue pour fpoh (13) alors qu'elle n'est que de 15 °C pour fdcooh (8). Cette différence majeure est attribuée à la force des liaisons hydrogène entre les unités acides phosphoniques bien supérieure à celles développées entre les unités acides carboxyliques. Par analogie avec les esters, l'allongement de la chaîne augmente la flexibilité du système en série polaire, diminuant la température de transition vitreuse. En série apolaire, les interactions de London viennent s'ajouter aux liaisons hydrogène, et augmente la température de transition vitreuse, à l'exception du composé fal2poh (31) où la présence d'une chaîne trop grande provoque une désorganisation du système.

Fluorophores	T_g (°C)	Fluorophores	T_g (°C)
fpoh (13)	173	falpoh (30)	126
ftpoh (22)	67	fal2poh (31)	82
ftetrapoh (23)	67	-	-

Tableau 3 : Températures de transition vitreuse des acides libres en fonction de la longueur de la chaîne latérale en série polaire et apolaire.

2.4.4 Analyses par spectroscopies infrarouge et RMN

Les analyses thermiques précédentes ont pu mettre en évidence la présence de liaisons hydrogène pour les composés acides. Nous souhaitons maintenant comprendre comment se réalisent ces interactions et quelles sont les unités impliquées. L'étude des interactions par liaisons hydrogène est souvent réalisée au moyen de la spectroscopie infrarouge¹⁴⁴ donnant accès aux énergies de vibration des liaisons qui se trouvent modifiées par interactions inter- ou intramoléculaires. Comme nous le verrons plus tard, le composé fpoh (13) subit une extinction de fluorescence importante, comparée à celle du composé fdcooh (8). Nous supposons donc que la partie à transfert de charge doit être impliquée. Pour des questions de contraintes géométriques

2.4/ Influence de la structure sur les propriétés de fluorescence

entre la partie acide phosphonique et le reste du squelette, seule la partie cyanoester peut être concernée.

Pour des questions de complexité de l’empreinte digitale du spectre, il est très difficile de suivre l’évolution des bandes de vibration du groupe acide phosphonique en deçà de 800 cm^{-1} . Le groupe nitrile est en revanche un très bon label, facilement identifiable grâce son mode de vibration d’élongation fin et intense, résonant autour de 2220 cm^{-1} . Par ailleurs, ce groupe est connu dans la littérature comme un bon accepteur de liaisons hydrogène¹⁴⁵. Ni la forme, ni l’énergie des bandes de vibration de la liaison $\text{C}\equiv\text{N}$ ne sont modifiées en passant de l’acide carboxylique (8) à l’ester (7) en solution dans un solvant aprotique comme le chloroforme (Figure 72).

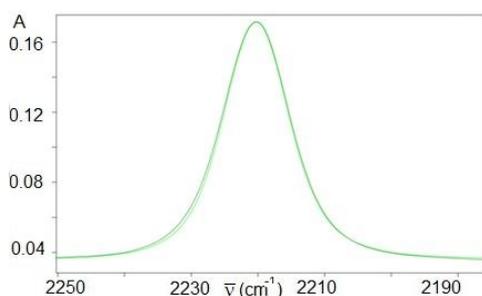


Figure 72 : Bandes d'absorption de la vibration de la liaison $\text{C}\equiv\text{N}$ du groupe nitrile pour les composés fdcooh (8) et fotbu (7) en solution dans le chloroforme, à 10^{-4} M .

En revanche, pour le couple acide phosphonique (13) / ester (12), cette bande s’élargit de manière significative, tout en demeurant centrée à la même énergie. Ces mesures ont été réalisées dans différents solvants aprotiques (CCl_4 , CHCl_3 , toluène), favorisant la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires entre les composés (Figure 73). Les mesures des largeurs à mi-hauteur des bandes à 2200 cm^{-1} sont rassemblées dans le tableau ci-dessous (Figure 73d).

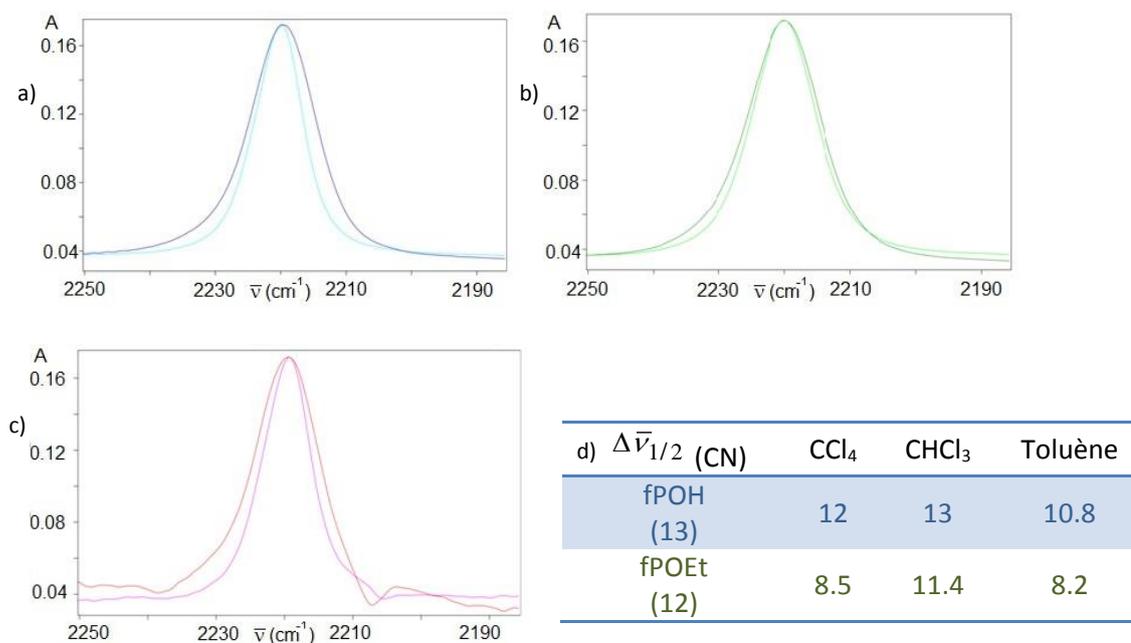


Figure 73 : Bandes d'absorption de la vibration de la liaison $\text{C}\equiv\text{N}$ du groupe nitrile pour les composés fPOH (13) et fPOEt (12) en solution (10^{-4} M) dans a) le tétrachlorure de carbone (CCl_4), b) le chloroforme (CHCl_3) et c) le toluène. d) Largeur à mi-hauteur de la bande de vibration de la liaison $\text{C}\equiv\text{N}$ du groupe nitrile.

Le groupe nitrile semble donc être impliqué dans la formation de liaisons hydrogène, probablement par repliement intramoléculaire de fpoh, comme décrit ci-dessous (Figure 74).

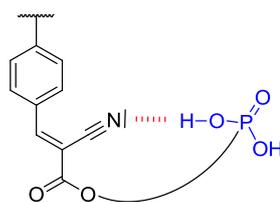


Figure 74: Représentation du repliement intramoléculaire entre le groupe nitrile et l'acide phosphonique.

Pour conforter cette hypothèse, une solution dans CCl_4 de fpoet (12) et de 4-fluorophénol (4FP)^{146,147}, connu pour ses propriétés de bon donneur de liaisons hydrogène, a été réalisée. On observe une légère stabilisation de 2 cm^{-1} du groupe CN en accord avec une « fragilisation » de la liaison $\text{C}\equiv\text{N}$ par liaisons hydrogène (Figure 75). Le spectre résultant de la soustraction des spectres avant et après ajout du 4FP met en évidence un élargissement de la bande de vibration comme obtenu pour le composé fpoh (13) (Figure 75).

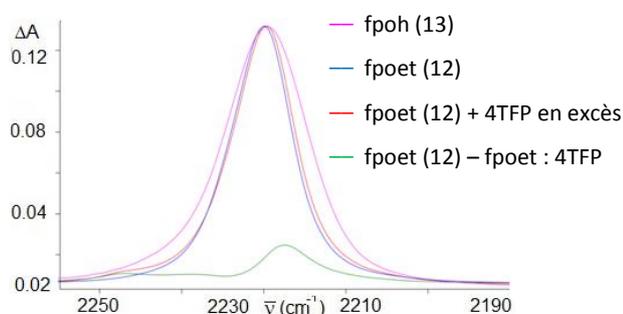


Figure 75 : Bandes de vibration de la liaison $\text{C}\equiv\text{N}$ du groupe nitrile en fonction de la présence d'un excès d'un fort donneur de liaisons hydrogène.

Des études RMN ^{31}P mettent en exergue le comportement à nouveau particulier de fpoh. Pour les dérivés esters, le déplacement chimique est d'environ 28-33 ppm tandis qu'il se situe généralement autour de 25-30 ppm pour les acides phosphoniques. Or dans le cas de fpoh (13), le déplacement chimique est ici de 21 ppm. Il s'agit donc d'un signal anormalement blindé, comme indiqué dans le tableau ci-dessous (Tableau 4). Ce blindage peut s'expliquer par la formation de liaisons hydrogène avec le groupe nitrile, ce qui entraîne une augmentation de la densité électronique autour de l'atome de phosphore. Lorsque la longueur de la chaîne latérale augmente comme pour ftpoh (22) et ftetrapoh (23) ou falpoh (30) et fal2poh (31), un déblindage relatif est observé. Lorsque les chaînes s'allongent, leur repliement devient entropiquement et enthalpiquement défavorable si bien que la fonction acide phosphonique s'associera préférentiellement avec des unités acides phosphoniques d'autres fluorophores par liaisons hydrogène intermoléculaires, formant ainsi des dimères ou des ensembles plus complexes.

2.4/ Influence de la structure sur les propriétés de fluorescence

Fluorophores	δ^{31P} (ppm)	Fluorophores	δ^{31P} (ppm)
fpoet (12)	28.5	fpoh (13)	21.8
ftpoet (20)	28.5	ftpoh (22)	25.8
ftetrapoet (21)	28.7	ftetrapoh (23)	32.4
falpoet (28)	32.4	falpoh (30)	30.3
fal2poet (29)	32.9	fal2poh (31)	25.3

Tableau 4 : Déplacement chimique de l'atome de phosphore en spectroscopie RMN 31P . Tous les spectres ont été enregistrés dans du $CDCl_3$, à l'exception de celui de fpoh (13), dans le méthanol deutéré.

2.4.5 Modélisation moléculaire et études conformationnelles

Des études théoriques ont été réalisées pour valider cette hypothèse de repliement intramoléculaire. Des calculs quantiques *ab initio* selon la théorie de la fonctionnelle de la densité ont été menés sur fdcooh (8) et fpoh (13), en collaboration interne avec le Professeur Denis Jacquemin. Ces calculs ont été réalisés en utilisant la fonctionnelle corrigée^{148,149} $\omega B97X-D$, qui a démontré son efficacité pour la modélisation d'interactions faibles comme les liaisons hydrogène¹⁵⁰. La base utilisée est la 6-311G(d,p) et le solvant, ici le toluène, a été modélisé par un continuum selon le modèle PCM^{151,152}.

L'optimisation de la géométrie de ces deux fluorophores a permis de mettre en évidence deux conformères de plus basse énergie¹⁵³ (Figure 76), l'un étendu et l'autre replié. La forme repliée apparaît être gouvernée par une liaison entre le proton labile de l'acide et l'atome d'azote du groupe nitrile.

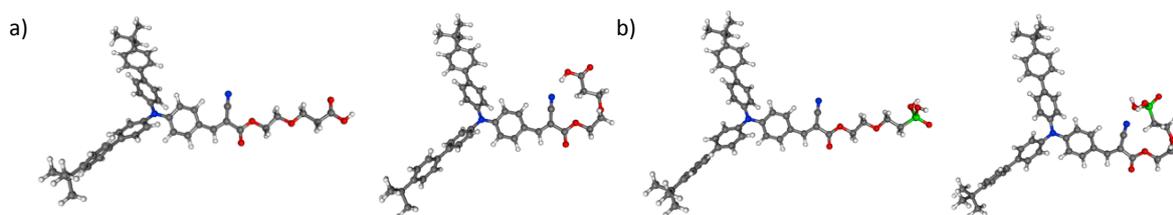


Figure 76 : Modélisation moléculaire des deux conformations possibles, étendues ou repliées pour a) fdcooh (8) et b) fpoh (13).

Pour le composé fdcooh (8) à l'état fondamental, la conformation la plus stable est la conformation étendue ($\Delta E = 1,29 \text{ kJ.mol}^{-1}$). En revanche, le fluorophore fpoh (13) adopte une conformation majoritairement repliée, stabilisée de $18,71 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Dans cette conformation, la distance entre l'atome d'azote et le proton labile du groupe acide est de $1,92 \text{ \AA}$ pour l'acide carboxylique contre $1,83 \text{ \AA}$ pour l'acide phosphonique, ce qui tend à renforcer la stabilité de la forme repliée pour fpoh. Des transitions verticales ont également été réalisées pour modéliser l'état excité. Aucune inversion en termes de stabilité relative n'a été observée (Figure 77). Le maintien à l'état excité de cette géométrie repliée pour le composé fpoh (13) tend à confirmer que l'extinction de

fluorescence trouve son origine dans l'interaction de l'acide phosphonique avec le système à transfert de charge.

Finalement, ce transfert de charge implique une délocalisation électronique de la triphénylamine vers la partie cyanovinylidène, comme le montrent les zones bleues (rouges) indiquant une diminution (augmentation) de la densité électronique lors de la transition. A l'état excité, la densité électronique est alors localisée sur le groupe électroattracteur, devenant naturellement la cible de ce repliement intramoléculaire.

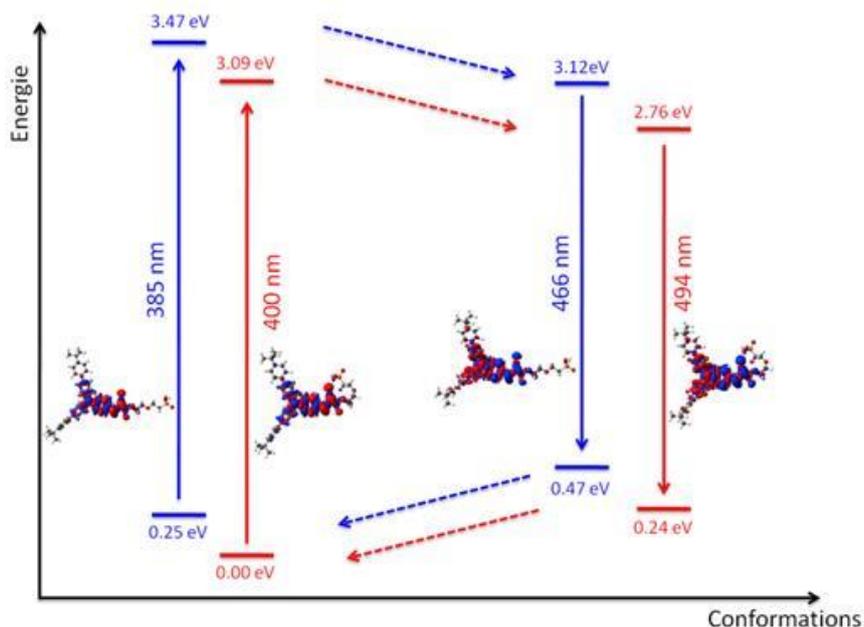


Figure 77 : Energies et géométries des conformations les plus stables à l'état fondamental et dans le premier état excité pour le composé fph (13) en utilisant l'approche SS-PCM(toluène)- ω B97X-D.

Les valeurs théoriques et expérimentales des énergies de transition sont légèrement différentes. Toutefois, les écarts énergétiques relatifs entre les conformations restent constants. Ces écarts peuvent s'expliquer par des réorganisations moléculaires opérant à l'état excité et non modélisées ici. En effet, il a été démontré par absorption transitoire femtoseconde pour des composés analogues (notamment pour fvin (1)) qu'une rotation du groupe aryle, liant l'amine tertiaire au groupe électroattracteur intervient en une dizaine de picosecondes seulement¹⁵⁴. Cette géométrie twistée des noyaux aromatiques entraîne une délocalisation plus importante du nuage électronique et donc une stabilisation de l'état excité qui relaxera par émission d'un photon de plus basse énergie.

2.5 Repliants intramoléculaires des dérivés d'acides phosphoniques

Les études précédentes ont mis en évidence un phénomène d'interaction entre la partie fluorescente et la partie complexante des dérivés de triarylamine via la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires. Afin de conforter l'hypothèse de repliement intramoléculaire, une modulation de la nature et de la longueur de la chaîne latérale, ainsi que des études de fluorescence résolues en temps ont été effectuées. Le caractère moins acide de l'acide carboxylique permettrait d'expliquer l'absence de repliement, malgré la plus grande polarisabilité de l'atome de phosphore, d'environ 25 contre 11 pour l'atome de carbone. Deux paramètres semblent alors pertinents pour augmenter ce rendement quantique de fluorescence : soit travailler avec un environnement local apolaire, connu pour augmenter ce rendement quantique, soit utiliser des chaînes plus longues. Ces deux options ont ainsi été étudiées.

2.5.1 Influence de la polarité de la chaîne latérale

Si l'on compare maintenant le composé fpoh (13) et son analogue apolaire falpoh (30) (Figure 78c), comportant une chaîne latérale saturée hydrophobe et de longueur similaire, le rendement quantique de fluorescence augmente de 0,002 pour fpoh (13) à 0,08 pour falpoh (30). L'utilisation de solvant comme le toluène permet de mieux solvater la chaîne alkyle qui adopte alors une géométrie étendue plutôt que repliée. De plus, les acides phosphoniques, comme les acides carboxyliques, peuvent former des dimères en solution. L'équilibre vers la formation de ces dimères est d'autant plus déplacé que les entités acides sont accessibles grâce à un dépliement de la chaîne. La comparaison des spectres d'absorption (Figure 78a) ne met en évidence aucune différence, excepté une légère augmentation du coefficient d'absorption molaire pour falpoh (30). En émission, un léger déplacement hypsochrome du maximum d'émission est observé pour falpoh (30), attestant un environnement plus hydrophobe du fluorophore, attribué au caractère apolaire de l'espaceur aliphatique (Figure 78b).

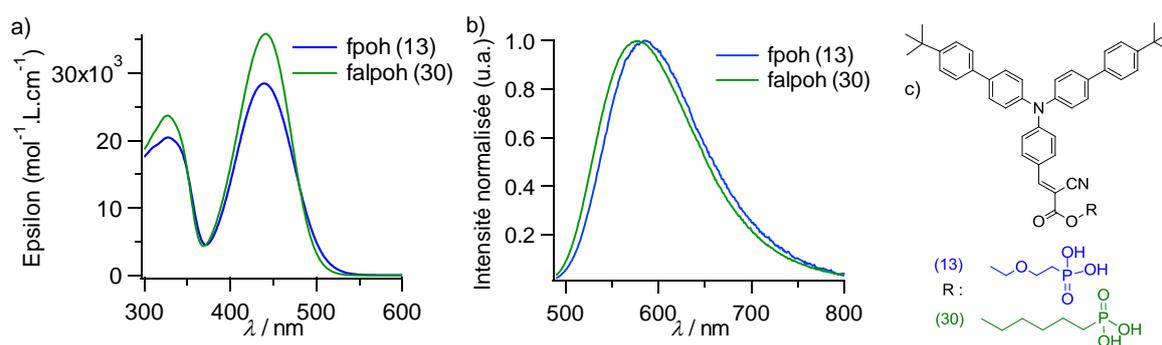


Figure 78 : Propriétés photophysiques des fluorophores en fonction de la polarité de la chaîne latérale. Spectres a) d'absorption, b) d'émission et c) structures moléculaires.

Il nous faut toutefois préciser que la présence résiduelle de silanes a été notée après hydrolyse du phosphonate, pouvant déplacer l'équilibre vers une conformation majoritaire étendue. En effet, l'étape de purification par reprecipitation n'a pas toujours été possible, conduisant à une augmentation de l'émission. Ce phénomène a pu être observé pour fpoh (13) lorsque l'acide n'avait pas été correctement purifié après hydrolyse de l'ester correspondant.

2.5.2 Modification de la distance entre l'unité à transfert de charge intramoléculaire et le groupe chélatant

Au vu de l'augmentation du rendement quantique de fluorescence en présence d'un lien apolaire, nous nous sommes maintenant intéressés à accroître la longueur du lien. Lorsque la distance entre l'unité à transfert de charge intramoléculaire et le groupe donneur de liaisons hydrogène (en l'occurrence $\text{PO}(\text{OH})_2$) augmente, les liaisons hydrogène intramoléculaires sont censées devenir entropiquement et enthalpiquement moins probables. En spectroscopie d'absorption, un déplacement hypsochrome de la bande à transfert de charge pour le composé fpoh (13) est systématiquement observé par rapport aux bandes des composés en série polaire, (22) et (23), ou en série apolaire (30) et (31) (Figure 79). Ce déplacement est attribué à une stabilisation accrue de l'état fondamental par repliement intramoléculaire.

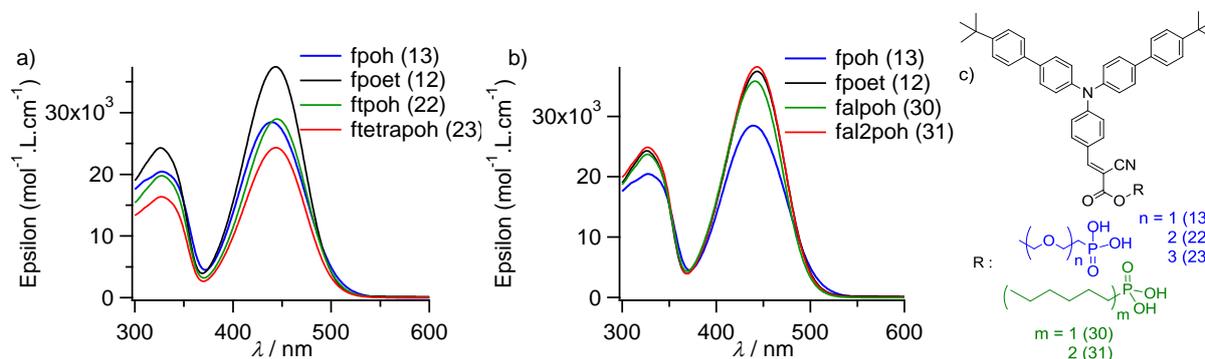


Figure 79 : Propriétés photophysiques des fluorophores chélatants acides en fonction de la polarité et de la longueur de la chaîne latérale. Spectres d'absorption a) en série polaire, b) en série apolaire et c) structures moléculaires.

Au niveau de l'intensité de fluorescence, le rendement quantique de fluorescence Φ_f augmente avec la distance entre l'unité à transfert de charge et le groupe acide (Tableau 5). En effet, Φ_f vaut 0,002 pour fpoh (13), 0,11 pour ftetrapoh (23) et 0,18 pour fal2poh (31). Cette évolution croissante conforte l'hypothèse d'un repliement intramoléculaire. Cette hypothèse est également renforcée par la valeur de Φ_f trouvée égale à 0,22 pour l'analogue modèle protégé fpoet (12). Dans ce cas, aucune repliement intramoléculaire via la formation de liaisons hydrogène n'est possible.

Les longueurs d'onde au maximum d'émission pour les composés en série polaire sont identiques et centrées sur 583 nm. Elles semblent être uniquement fonction de la polarité locale (Figure 80a). Un décalage hypsochrome de la bande d'émission (vers le vert) est toutefois observé pour les fluorophores en série apolaire pour des chaînes latérales de plus en plus longues (Figure 80b). Le maximum d'émission passe de 586 nm pour fpoh (13) à 558 nm pour fal2poh (29). Une fois encore, nous supposons que la présence d'une chaîne latérale aliphatique de taille croissante parvient à masquer la contribution polaire des acides phosphoniques.

2.5/ Replissements intramoléculaires des dérivés d'acides phosphoniques

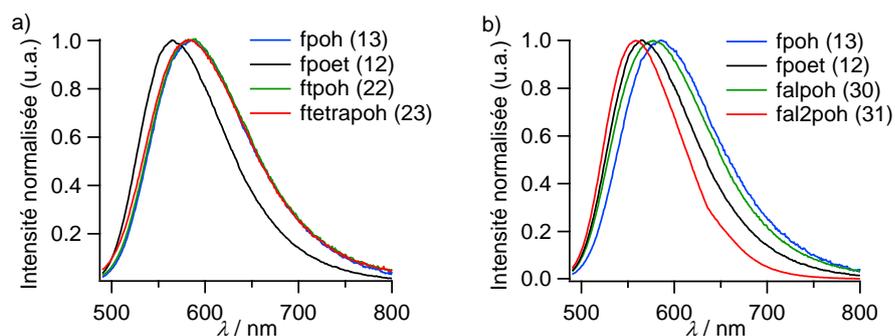


Figure 80 : Propriétés photophysiques des fluorophores en fonction de la polarité et de la longueur de la chaîne latérale. Spectres d'émission a) en série polaire, b) en série apolaire.

fluorophores	fpoet (12)	fpoh (13)	ftpoh (22)	ftetrapoh (23)	falpoh (30)	fal2poh (31)
Φ_f	0,22	0,002	0,06	0,11	0,08	0,18

Tableau 5 : Rendements quantiques de fluorescence mesurés en fonction de la polarité et de la longueur de la chaîne latérale pour les acides libres et le composé modèle fpoet (12).

2.5.3 Etude des composés modèles avec des fonctions acides protégées

Finalement, lorsque les fluorophores modèles (acides protégés sous forme d'esters), sont comparés entre eux, l'énergie et l'intensité des bandes d'absorption sont très semblables quelle que soit la taille et la polarité de la chaîne latérale (Figure 81). En l'absence de donneur de liaisons hydrogène intra- ou intermoléculaires, les chaînes latérales et l'unité à transfert de charge apparaissent totalement découplées à l'état fondamental.

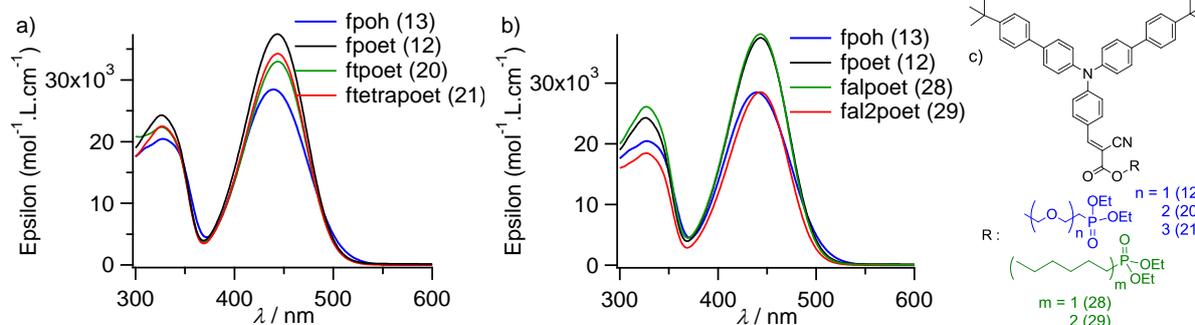


Figure 81 : Propriétés photophysiques des fluorophores modèles (acides protégés) en fonction de la polarité et de la longueur de la chaîne latérale. Spectres d'absorption a) en série polaire, b) en série apolaire et c) structures moléculaires.

L'émission de fluorescence est également très peu sensible à la longueur de la chaîne latérale (Figure 82). En effet, aucun déplacement de la longueur d'onde d'émission maximale n'est observé comme c'était le cas pour les fluorophores acides. De manière remarquable, l'intensité d'émission ne varie pas quel que soit le composé modèle, à l'exception du composé ftetrapoet (20), et est systématiquement supérieure à celles des acides libres (Tableau 6). Pour ftetrapoet (20), une plus grande flexibilité de la chaîne polaire dans un solvant peu solvatant comme le toluène peut éventuellement être à l'origine de la chute du rendement quantique de fluorescence qui n'est pas observée pour le modèle analogue en série apolaire fal2poet (29).

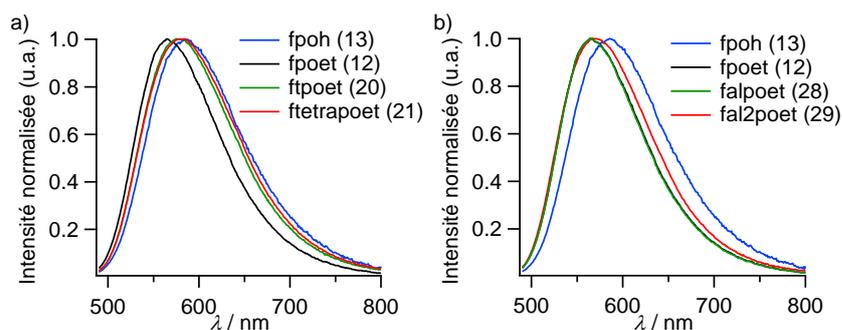


Figure 82 : Propriétés photophysiques des fluorophores modèles (acides protégés) en fonction de la polarité et de la taille de la chaîne latérale. Spectres d'émission a) en série polaire, b) en série apolaire.

fluorophores	fpoet (12)	ftpoet (20)	ftetraoet (21)	falpoet (28)	fal2poet (29)
Φ_f	0,22	0,23	0,20	0,24	0,25

Tableau 6 : Rendements quantiques de fluorescence mesurés en fonction de la polarité et de la longueur de la chaîne latérale pour les fluorophores protégés.

A l'inverse des dérivés d'acide phosphonique comme fpoh (13), l'acide carboxylique (8) présente des propriétés spectroscopiques analogues à celles des dérivés esters (7). Il est clair qu'aucune interaction n'intervient entre ce groupe acide carboxylique et l'état excité à transfert de charge (Figure 83). La présence de l'ester de *tert*-butyle encombré empêche toute formation de liaisons hydrogène et donc d'interactions intramoléculeaires. Le rendement quantique de fluorescence de l'acide libre (8) est ainsi égal à celui de l'acide protégé (7), soit 0,19.

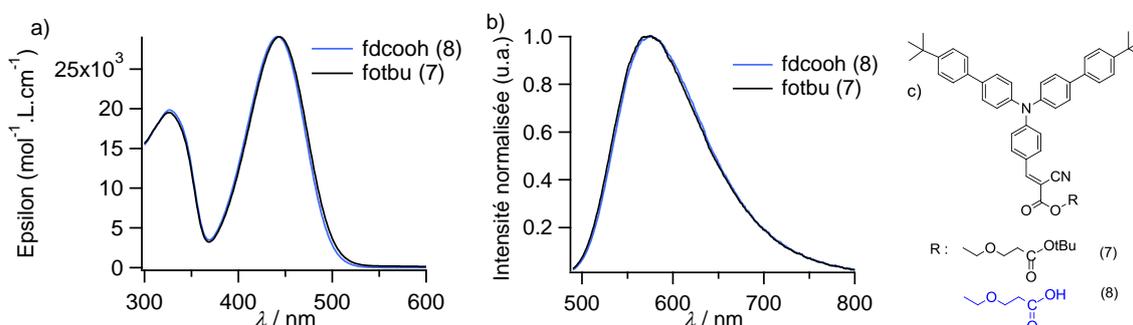


Figure 83 : Propriétés spectroscopiques des fluorophores avec une chaîne latérale possédant un groupe acide carboxylique, libre (8) ou protégé (7). Spectres a) d'absorption, b) d'émission et c) structures moléculaires.

Finalement, la similarité entre les propriétés spectroscopiques du composé modèle fc₂₀ (5), sans groupe fonctionnel à son extrémité, et des fluorophores protégés, ester ou phosphonate, confirme l'absence d'interactions de la chaîne latérale avec le cœur fluorescent (Figure 84 et Tableau 7).

2.5/ Replissements intramoléculaires des dérivés d'acides phosphoniques

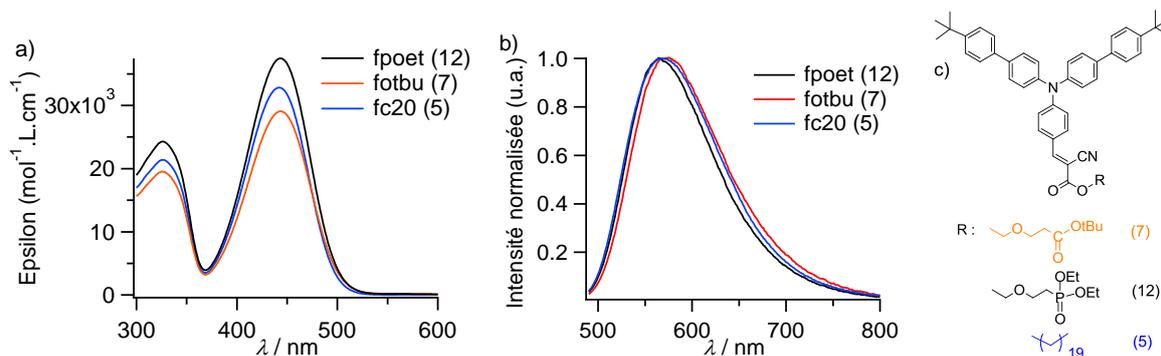


Figure 84 : Propriétés photophysiques des fluorophores modèles non chélatants pour différentes chaînes latérales. Spectres a) d'absorption, b) d'émission, c) structures moléculaires

fluorophores	fpoet (12)	fotbu (7)	fc20 (5)
Φ_f	0,22	0,19	0,25

Tableau 7 : Rendements quantiques de fluorescence mesurés en fonction de la nature de la chaîne latérale.

Grâce à l'étude des propriétés spectroscopiques des différents fluorophores acides et acides protégés, nous avons pu mettre en évidence un comportement fondamentalement distinct en fonction du groupe chélatant. En effet, alors que le groupe acide carboxylique semble n'exercer aucun effet sur la nature de l'état excité, le groupe acide phosphonique interagit par repliement en formant des liaisons hydrogène, fonction de la longueur et de la polarité de la chaîne latérale.

2.5.4 Influence de la chaîne latérale sur le déclin de fluorescence

L'une des techniques les plus utilisées pour étudier l'évolution et les propriétés de différentes conformations moléculaires de fluorophores en solution est la fluorescence résolue en temps. Cette technique consiste à suivre le déclin du signal de fluorescence au cours du temps après un pulse d'excitation. Elle a été largement appliquée au suivi de la dynamique conformationnelle de protéines¹⁵⁵.

Tous les déclins de fluorescence présentés dans ce chapitre ont été enregistrés à 580 nm, après excitation à 450 nm de solutions diluées de fluorophores dans le toluène. La méthode TCSPC a été utilisée (de l'anglais « Time Correlated Single Photon Counting ») avec un laser femtoseconde comme source excitatrice. Cette méthode repose sur la détection du temps nécessaire pour qu'un photon soit détecté après l'excitation. L'opération est alors répétée un grand nombre de fois jusqu'à obtenir un histogramme regroupant les photons dans différentes plages temporelles, avec une résolution maximale (IRTF) de 40 ps dans le cas des études présentées dans ce chapitre. Cet histogramme peut ainsi être modélisé par une loi mathématique (multi)exponentielle¹⁵⁶ (Équation 21) permettant de fournir une meilleure description microscopique que celle apportée par une exponentielle étendue¹⁵⁷ (Équation 22). L'affinement a été obtenu par la méthode des moindres carrés. Au maximum, trois constantes de temps, τ_i , ont ainsi été obtenues, pondérées par leurs facteurs pré-exponentiels a_i . La pondération des différentes constantes de temps par leurs valeurs d'intensités relatives ($a_i \cdot \tau_i$) est souvent utilisée dans le cas d'étude de processus dynamiques¹⁰. Ces déclins de fluorescence seront toujours décrits par l'ensemble des valeurs τ_i et f_i .

a) Déclin modélisé par une fonction multi(exponentielle) :

$$I_f(t) = \sum_i a_i \times \exp(-t/\tau_i), \quad \text{avec} \quad f_i = \frac{a_i \tau_i}{\sum_j a_j \tau_j} \quad (21)$$

b) Déclin modélisé par une exponentielle étendue :

$$I_f(t) = \exp(-(t/\tau)^\beta) \quad (22)$$

Le temps de vie de l'état excité S_1 va être directement fonction du milieu environnant. Cet état peut relaxer de manière radiative et non radiative. Une comparaison des déclins de fluorescence de l'acide protégé fpoet (12) et du composé fpoh (13) montre une décroissance mono-exponentielle du signal d'émission uniquement dans le cas de l'ester (Figure 85b), ce qui tend à prouver l'existence d'une seule espèce, ou conformation, en solution. Pour l'acide phosphonique fpoh (13), il a été nécessaire de recourir à une modélisation par une fonction tri-exponentielle, mettant en évidence la présence de trois systèmes à l'état excité, chacun relaxant avec des constantes de vitesse différentes vers l'état fondamental (Figure 85a). Nous avons alors supposé l'existence simultanée de trois types d'arrangements moléculaires : une structure étendue, une structure repliée et une structure dimérique.

A l'inverse du couple acide / ester phosphonique, l'acide carboxylique (8) terminal et l'ester correspondant (7) présentent des déclins de fluorescence très similaires et majoritairement mono-exponentiels (Figure 85a). Ces résultats rappellent ceux obtenus en fluorescence stationnaire, où les rendements quantiques de fluorescence avaient été trouvés identiques. L'acide carboxylique (8) ne semble donc être présent que sous la forme d'un seul système majoritaire à l'état excité, une conformation n'interagissant pas avec le cœur fluorescent.

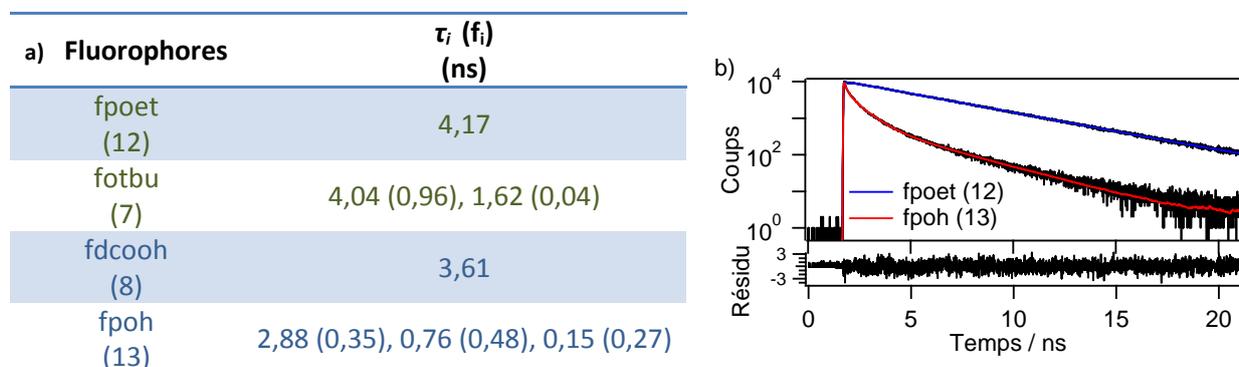


Figure 85 : a) Temps de vie de fluorescence obtenus après modélisation du déclin de fluorescence b) en fonction de la nature du groupe chélatant pour le composé fpoet (12) et fpoh (13).

Afin de valider l'hypothèse de différentes structures stabilisées par liaisons hydrogène, nous avons à nouveau étudié l'influence de la longueur et de la polarité de la chaîne. Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux composés esters. Pour tous les composés, un déclin de fluorescence mono-exponentiel est obtenu, permettant de valider la présence d'une seule structure à l'état excité (Tableau 8). Comme les esters ne comportent pas de fonctions acides, ces résultats confortent l'hypothèse de liaisons hydrogène pour les acides phosphoniques, influant sur les déclins de fluorescence.

2.5/ Replissements intramoléculaires des dérivés d'acides phosphoniques

Fluorophores	τ_i (f _i) (ns)
fpoet (12)	3,97
ftpoet (20)	4,01
ftetrapoet (21)	3,87
falpoet (28)	4,13
fal2poet (29)	4,14

Tableau 8 : Temps de vie de fluorescence obtenus après modélisation du déclin correspondant pour les fluorophores modèles protégés de type phosphonates.

Les études photophysiques en régime stationnaire des fluorophores déprotégés avait déjà permis de mettre en évidence un comportement dépendant de la nature et de la longueur de la chaîne latérale. Ici, dès que les fonctions acides sont libres, le déclin de fluorescence se complexifie (Figure 86b). Trois composantes sont alors nécessaires pour modéliser cette décroissance. Par rapport au composé fpoh (13), on peut noter l'évolution suivante avec l'accroissement de la longueur de la chaîne latérale (13) :

- une disparition quasi-complète de la composante la plus courte τ_3 ;
- une diminution de la contribution de la composante intermédiaire τ_2 ;
- un accroissement de la contribution de la composante la plus longue τ_1 (environ 3 ns), de 0,35 à presque 1.

a) Fluorophores	τ_i (f _i) (ns)
fpoh (13)	2,88 (0,35), 0,76 (0,48), 0,15 (0,27)
ftpoh (22)	2.59 (0,82), 1,4 (0,17), 0,07 (0,01)
ftetrapoh (23)	2.46 (0,77), 1,34 (0,22), 0,07 (0,01)
falpoh (30)	3.21 (0,96), 1,04 (0,03), 0,06 (0,01)
fal2poh (31)	2.99 (0,79), 1,56 (0,20), 0,09 (0,01)

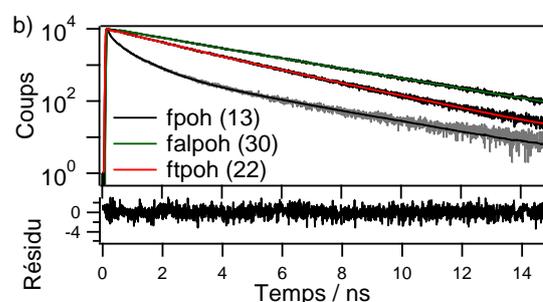


Figure 86 : a) Temps de vie de fluorescence obtenus après modélisation du déclin de fluorescence b) en fonction de la taille de la chaîne latérale pour les fluorophores complexants.

La constante de temps la plus longue τ_1 se rapproche de celle des esters et signerait la présence de structures étendues. A l'opposé, la constante de temps la plus courte τ_3 pourrait être attribuée à des structures repliées, provoquant une extinction de fluorescence¹⁵⁶ par couplage vibrationnel via la formation de liaisons hydrogène. La probabilité de former ce type de structure diminue d'autant plus que les chaînes sont longues pour des questions entropiques, d'où la diminution de la composante. Enfin, la composante intermédiaire τ_2 pourrait être reliée aux formes dimériques dont la formation est accentuée par dépliement des chaînes, dans le cas des longues chaînes.

2.6 Etude de complexation avec différents sels métalliques

Les différentes études spectroscopiques et théoriques précédentes ont permis de mettre en évidence un repliement intramoléculaire dû à la formation de liaisons hydrogène entre le proton labile de l'acide phosphonique et l'atome d'azote du groupe nitrile jouant le rôle d'accepteur de liaisons hydrogène. Nous avons également pu mettre en évidence la formation de dimères ou encore l'influence de la longueur et de la polarité de la chaîne latérale sur les propriétés émissives de ces molécules. La compréhension des propriétés physico-chimiques des nanoassemblages hybrides élaborés ultérieurement et constitués d'une plateforme d'acides phosphoniques recouverte de nanoparticules d'oxyde de fer, nécessite au préalable une étude complète du processus de complexation des fluorophores par les ions fer (III). Cette étude a été réalisée par spectroscopie de fluorescence stationnaire et résolue en temps. Les études photophysiques de l'impact de la chélation d'ions fer (III) a été réalisée en phase homogène, en utilisant un sel de fer soluble en milieu organique. Le solvant utilisé pour toutes les études suivantes est le toluène. Toutes les évolutions spectrales ont été réalisées à la longueur d'onde d'absorption ou d'émission maximale. Ces analyses ont été complétées par des études de complexation avec des ions modèles, à couche fermée et présentant également une forte interaction avec les acides phosphoniques. En effet, la présence de nanoparticules d'oxyde de fer au voisinage de fluorophores conduit généralement à des phénomènes d'extinction des états excités radiatifs^{158,159}.

2.6.1 Complexation en milieu organique avec des ions fer (III)

La constante de complexation de l'ion fer (III) par un acide carboxylique est connue pour être plus faible que celle par un acide phosphonique. Dans le cadre de ces études, le sel de fer (III) utilisé est un sel d'acétylacétonate, soluble en milieu organique. Deux solutions ont ainsi été préparées, à environ 10^{-5} M en composé organique contenant pour l'une d'entre elle 10^{-4} M en sel de fer (III), soit 10 équivalents. Dans un premier temps, ces deux solutions sont analysées afin d'anticiper l'ampleur de l'évolution jusqu'au point final. Dans un second temps, une quantité connue croissante de cette deuxième solution contenant les ions fer (III) est ajoutée à la solution de composé organique. En procédant de cette manière, aucune dilution du composé organique n'est réalisée et les évolutions observées ne peuvent provenir que de la présence des ions fer (III). De plus, une correction de l'intensité émise vis-à-vis des variations d'absorbance à la longueur d'onde d'excitation est réalisée au cours des ajouts, permettant d'obtenir une émission normalisée par rapport à la quantité de matière initiale en fluorophores. Cet effet de filtre interne est du à l'addition progressive des ligands acétylacétonate, absorbant la lumière excitatrice, à 450 nm.

L'ajout croissant d'une quantité connue d'ions fer (III) à une solution du composé fpoh (13) a permis de mettre en évidence un phénomène d'extinction de fluorescence (Figure 87b). L'émission résiduelle provient probablement de la conformation repliée où l'acide phosphonique engagé dans une liaison hydrogène n'est pas libre pour être complexé par les ions fer (III). L'augmentation de l'absorbance au cours de l'ajout est due en revanche à la présence seule du ligand acétylacétonate. Aucune modification de l'énergie de la bande d'absorption n'a été observée lors de la formation du complexe pour le composé fpoh (13) (Figure 87a).

2.6/ Etude de complexation avec différents sels métalliques

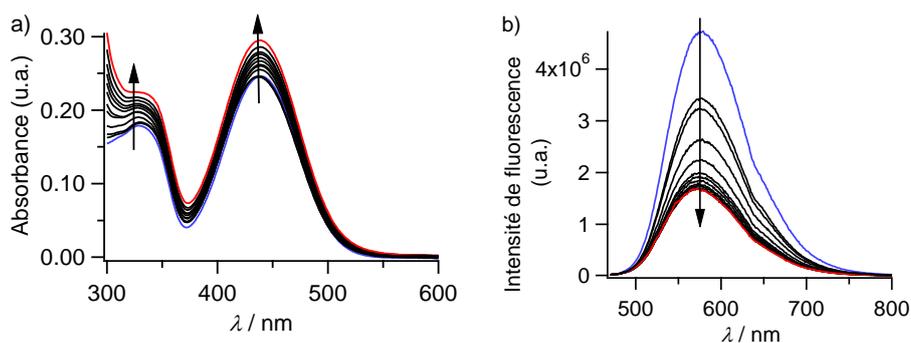


Figure 87 : Spectres d'absorption et b) d'émission du composé fpoh (13) lors de l'ajout croissant d'ions fer (III) (0 ; 0,06 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,7 ; 0,9 ; 1,0 ; 1,2 ; 1,5 ; 1,8 ; 2 éq). Les spectres d'émission ne sont pas corrigés de la réponse du détecteur.

Lorsque l'on augmente la longueur de la chaîne latérale, la probabilité de repliement intramoléculaire diminue, et la disponibilité des acides augmente vis-à-vis des ions fer (III). Le signal résiduel de fluorescence diminue, prouvant une complexation plus importante entre les ions fer (III) et les fonctions acides phosphoniques de ftpoh (22) (Figure 88). De manière surprenante, une diminution de l'absorption globale du système a été observée lors de l'ajout d'une quantité croissante d'ions fer (III). Cette diminution fera l'objet d'une analyse ultérieure.

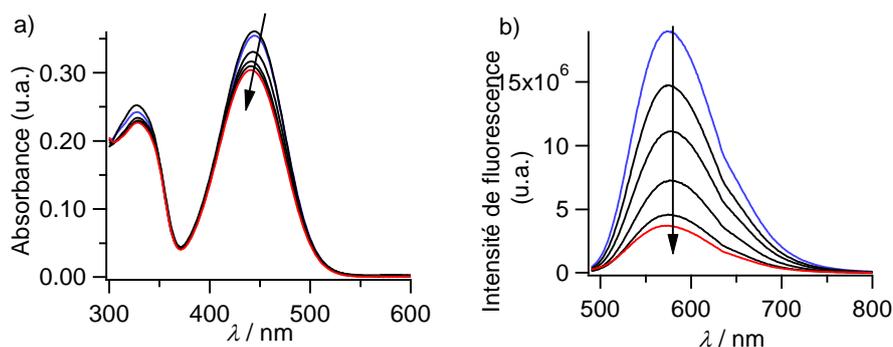


Figure 88 : Spectres d'absorption et b) d'émission du composé ftpoh (22) lors de l'ajout croissant d'ions fer (III) (0 ; 0,2 ; 0,5 ; 0,8 ; 1,3 ; 1,8 éq). Les spectres d'émission ne sont pas corrigés de la réponse du détecteur.

Un comportement similaire a été observé pour le fluorophore falpoh (28), comportant une chaîne latérale hydrophobe (Figure 89). Une extinction presque totale est alors obtenue, principalement due au solvant qui offre une meilleure solvatisation des chaînes hydrophobes, adoptant alors une géométrie dépliée.

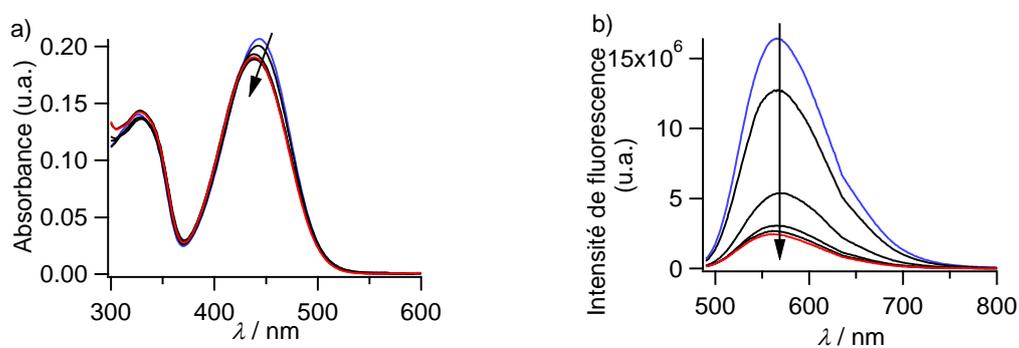


Figure 89 : a) Spectres d'absorption et b) d'émission du composé falpoh (30) lors de l'ajout croissant d'ions fer (III) (0 ; 0,1 ; 0,4 ; 0,6 ; 1,1 ; 1,4 éq). Les spectres d'émission ne sont pas corrigés de la réponse du détecteur.

2.6.1.1 Etudes comparatives des complexes formés par spectroscopie d'absorption

Une des méthodes les plus utilisées pour l'étude des complexes et leurs stœchiométries repose sur la variation du coefficient d'absorption molaire lors de la formation du complexe¹⁶⁰. En effet, l'absorbance totale du mélange n'est pas forcément la somme des absorbances des systèmes individuels, dû à la présence d'interactions qui modifient alors la valeur du coefficient d'absorption molaire intervenant dans la loi de Beer-Lambert (Équation 23). L'écart à l'idéalité (Y_λ) (Équation 24) est alors calculé et tracé en fonction de la fraction molaire en fer x_m , correspondant à la différence entre l'absorbance mesurée A_λ et l'absorbance théorique A'_λ en l'absence d'interactions.

$$A'_\lambda = x_l \varepsilon(\lambda)_l C_l d + x_m \varepsilon(\lambda)_m C_m l \quad (23)$$

$$Y_\lambda = A_\lambda - A'_\lambda \quad (24)$$

avec, x_l la concentration en ligand organique, C_i la concentration des espèces et l la longueur du trajet optique.

La formation d'un complexe provoque une modification de la valeur de Y qui devient non nulle. Après l'équivalence, l'absorbance globale sera alors déterminée comme étant la somme des absorbances des composants élémentaires. Toutefois, le tracé de cet écart Y ne permet pas forcément d'obtenir la stœchiométrie du complexe formé, quelle que soit la nature du groupe complexant (Figure 90a), ou la longueur de la chaîne latérale (Figure 90b). Par ailleurs, un écart non nul peut également s'expliquer par une modification de la polarité de la solution lors de l'ajout de sels organiques, stabilisés par des ligands polaires. En effet, nous avons pu démontrer précédemment qu'un léger changement de polarité, même local, génère une modification non négligeable des propriétés d'émission du système, mais également des propriétés d'absorption.

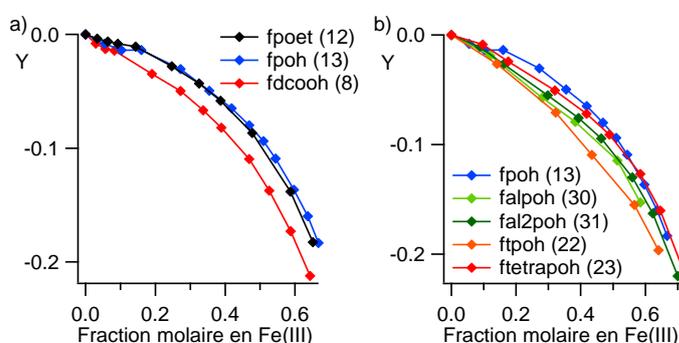


Figure 90 : Evolution de l'écart à l'idéalité (Y) lors de la formation d'un complexe en fonction de la fraction molaire en fer (III). a) Evolution en fonction du groupe chélatant et b) en fonction de la taille de la chaîne latérale.

L'étude des complexes peut également être réalisée par le suivi de l'évolution de la valeur de l'absorbance, normalisée par l'absorbance initiale A_0 du ligand fluorescent. Lors de l'ajout de sels de fer (III) à une solution de fpoh (13), de fdcooh (8) ou même de fpoet (12), censé ne pas complexer les ions fer (III), les évolutions relatives de l'absorbance sont très proches et ne permettent pas de distinguer de processus nets de complexation (Figure 91).

2.6/ Etude de complexation avec différents sels métalliques

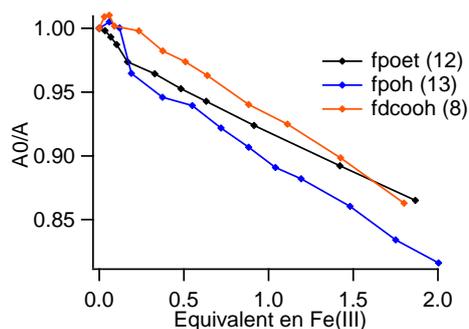


Figure 91 : Evolution du rapport des absorbances A_0/A en fonction du groupe chélatant. Etudes réalisées par modification du nombre d'équivalents d'ions fer (III) ajoutés.

En revanche, l'utilisation de composés comportant des chaînes latérales de longueur différentes permet d'observer des évolutions très différentes des spectres d'absorption (Figure 92). Ainsi, une diminution de l'absorbance globale d'une solution de ftetrapoh (23) est observée lors de l'addition de 0,5 équivalent d'ions fer (III). Après ce seuil, l'excès d'ions fer (III) ajouté entraîne une augmentation nette de l'absorbance, comme observée pour les fluorophores précédents. On peut ainsi supposer la formation d'un complexe de fer formé de deux ligands ftetrapoh (23). Une exception est toutefois notée pour le composé ftpoh (22) dont le complexe avec les ions fer (III) présenterait une stœchiométrie 1 :1.

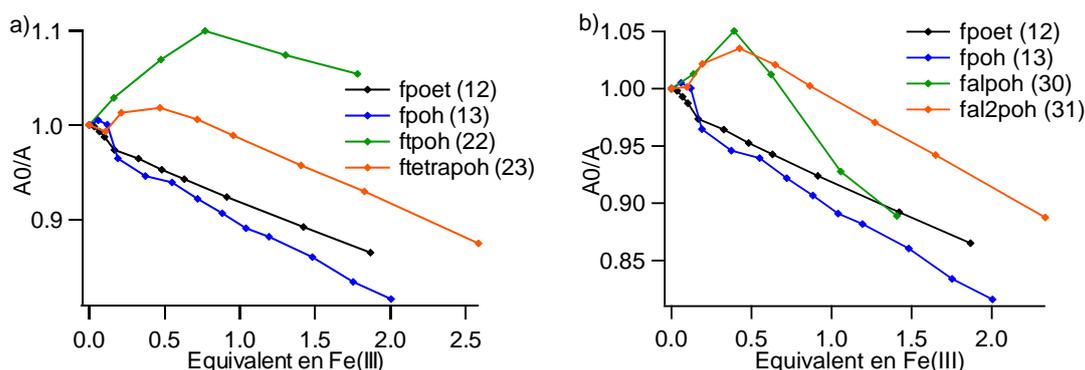


Figure 92 : Evolution du rapport des absorbances A_0/A pour les différents fluorophores complexants en fonction du nombre d'équivalent d'ions fer (III) ajoutés, a) en série polaire et b) en série apolaire.

2.6.1.2 Etudes comparatives des complexes formés par spectrofluorimétrie

L'étude de l'extinction de fluorescence résultant de la complexation des groupes acides par des ions fer (III) est une source d'information importante. Après correction de l'intensité émise par la valeur de l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation, cette émission a été normalisée par la valeur de l'intensité initiale I_0 pour les études suivantes. Pour le composé non complexant fpoet (12), l'intensité de fluorescence demeure constante alors qu'elle chute pour des composés comportant des fonctions acides carboxyliques et phosphoniques (Figure 93a). Le groupe acide carboxylique (8) permet de conserver 80 % de l'émission initiale alors que pour le groupe acide phosphonique (13), plus complexant, seulement 35% de l'intensité initiale de fluorescence demeurent. On remarque également la présence d'un palier à partir duquel la fluorescence n'est plus éteinte par l'ajout de sel de fer, indiquant la présence d'entités complexantes en solution non accessibles par les ions fer (III).

L'accroissement de la longueur de la chaîne latérale, entraînant une augmentation du nombre de molécules dépliées et donc d'unités acides phosphoniques plus facilement accessibles, conduit à une extinction de fluorescence plus efficace (Figure 93b). Le palier atteint après addition

d'un certain nombre d'équivalents d'ions fer (III) sera exploité dans le prochain paragraphe afin de déterminer les constantes de complexation, de quantifier la fraction de fonctions acides phosphoniques libres, et de calculer les constantes de vitesse des processus d'extinction de fluorescence. Ce palier, très visible pour fpoh (13), l'est beaucoup moins pour les autres composés acides.

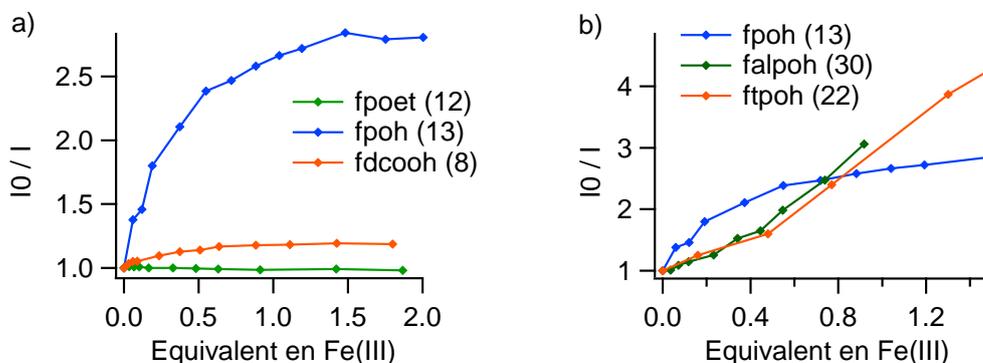


Figure 93 : Evolution du rapport des intensités d'émission I_0/I en fonction du nombre d'équivalents d'ions fer (III) ajoutés. a) Comparaison entre les groupes fonctionnels, et b) évolution en fonction de la longueur de la chaîne latérale.

Finalement, un accroissement supplémentaire de la distance entre le groupe acide et le groupe nitrile ne permet pas de modifier, ou d'accentuer, l'extinction de fluorescence obtenue. Le repliement intramoléculeux n'est de ce fait plus favorisé à partir de trois unités éthylèneoxy, comparé au processus de complexation.

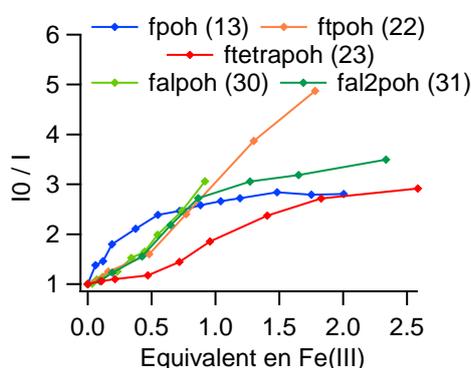


Figure 94 : Evolution du rapport des intensités d'émission I_0/I en fonction du nombre d'équivalents d'ions fer (III) ajoutés en fonction de la longueur (et de la polarité) de la chaîne latérale.

2.6.1.3 Calcul des constantes d'extinction de Stern-Volmer et des constantes de complexation

L'étude de l'évolution du rapport des intensités de fluorescence avant et après ajout d'ions fer (III) I_0/I permet de mettre en évidence un palier lors de l'ajout d'une quantité croissante d'ions fer (III). L'équation de Stern-Volmer, décrite lors du chapitre 1, est utilisée pour quantifier ces processus dynamiques d'extinction de fluorescence. Dans le cas présent, nous supposons que ce palier provient de la présence d'une partie des fluorophores inaccessibles par l'extincteur, et qui ne seront donc pas éteints, comme présenté sur le schéma ci-dessous (Figure 95).

2.6/ Etude de complexation avec différents sels métalliques

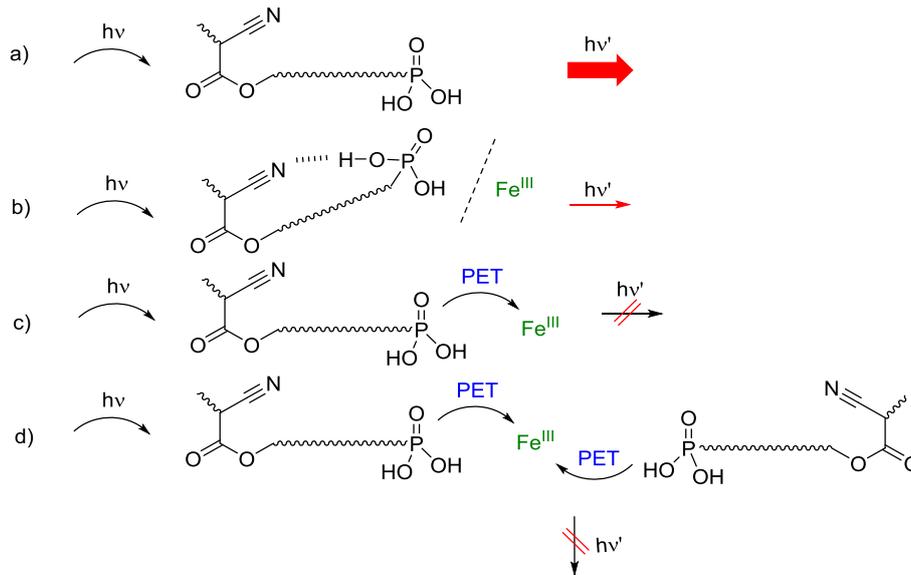


Figure 95 : Schéma des différents processus possibles une fois le fluorophore porté dans son état excité. Emission de fluorescence en l'absence d'ions fer (III) a) dans sa conformation étendue et b) dans sa conformation repliée ; c) extinction par transfert d'électron photoinduit (PET) du monomère et d) du dimère.

La relation de Stern-Volmer peut alors être modifiée et subdivisée en deux parties (Équation 25). Le premier terme I'_0 est relatif aux fluorophores libres et le deuxième terme I''_0 aux fluorophores repliés, non soumis à ce processus d'extinction de fluorescence^{161,162}, ou décrit par une constante d'extinction différente. Ce comportement est souvent observé dans le cas de protéines, où plusieurs entités fluorescentes, généralement des tryptophanes, se trouvent dans des environnements différents.

$$I = \frac{I'_0}{1+K'_{SV}[Q]} + \frac{I''_0}{1+K''_{SV}[Q]} \quad (25)$$

$$K_{SV} = k_q \cdot \tau_0^S$$

avec I'_0 et I''_0 les intensités de fluorescence relatives aux deux conformations possibles, $[Q]$ la concentration en extincteur de fluorescence Q et K'_{SV} et K''_{SV} les constantes de Stern-Volmer pour les deux conformations à l'état excité singulet. k_q représente la constante de vitesse d'extinction de fluorescence et τ_0^S , le temps de vie de l'état singulet du fluorophore en l'absence d'extincteur.

Si l'on suppose que l'une des conformations précédentes, par exemple celle relative au signal I''_0 , n'est pas susceptible d'être éteinte et que l'on appelle I_0^t l'intensité totale de fluorescence initiale sans extincteur, l'équation suivante peut être obtenue (Équation 26).

$$\frac{I_0^t}{I_0^t - I} = \frac{I_0^t}{I'_0} * \frac{1}{K_{SV}} * \frac{1}{[Q]} + \frac{I_0^t}{I''_0} \quad (26)$$

Le tracé de l'évolution de l'intensité de fluorescence $\frac{I_0^t}{I_0^t - I}$ en fonction de l'inverse de la concentration en extincteur permet d'obtenir les constantes K_{SV} , ainsi que le rapport $\frac{I_0^t}{I''_0}$, correspondant à la fraction de l'intensité de fluorescence globale qui a été éteinte, notée f (Tableau 9). De plus, la constante de vitesse d'extinction de fluorescence k_q peut être calculée, connaissant le temps de vie moyen $\langle \tau_0 \rangle$ du fluorophore à l'état excité. Ce temps de vie moyen correspond à la somme algébrique des constantes de temps, pondérées par la contribution de chaque population, $f_i * \tau_i$, obtenus plus tôt dans ce chapitre après modélisation des déclins de fluorescence.

	fdcooh (8)	fpoh (13)	ftpoh (22)	ftetrapoh (23)
log K_{sv} (L.mol⁻¹)	5,4	5,8	5,3	5,0
<τ₀> (ns)	3,61	1,41	2,36	2,19
log k_q (L.mol⁻¹.s⁻¹)	13,9	14,7	13,9	13,7
f	0,19	0,72	1,07	1,52
r²	0,995	0,982	0,992	0,950

Tableau 9 : Valeurs des constantes de Stern-Volmer et des constants de vitesse d'extinction de fluorescence dans le cas de molécules partiellement affectées par un extincteur de fluorescence, en série polaire.

Les acides phosphoniques et carboxyliques précédents possèdent une constante de Stern-Volmer similaire, quelle que soit la longueur de la chaîne latérale en série polaire. Les valeurs logarithmiques des constantes de vitesse k_q sont de l'ordre de $14 \text{ L.mol}^{-1}\text{s}^{-1}$, soit nettement supérieures à celles des constantes de vitesse maximales d'extinction de fluorescence par collision en solution de $10,3 \text{ L.mol}^{-1}\text{s}^{-1}$. Ces valeurs bien plus élevées semblent indiquer dans tous les cas la présence d'un mécanisme d'extinction de fluorescence très rapide qui ne peut avoir lieu que si un complexe statique est déjà formé à l'état fondamental. Vu la rapidité du processus, aucune fluorescence pour ce complexe ne peut être détectée dans le cadre des études présentées dans ce manuscrit et provient probablement d'un transfert d'électron photo-induit. De plus, des valeurs de fraction f inférieures à 1 indiquent une indisponibilité de certaines entités complexantes dans le cas de fdcooh (8) et de fpoh (13). Pour ftpoh (22) et ftetrapoh (23), une valeur de f supérieure à 1 a été trouvée, indiquant une complète disponibilité des fonctions acides phosphoniques et confortant l'absence de repliement intramoléculaire par rapport à fpoh (13).

Les analyses précédentes, appliquées à l'étude des composés chélatants en série apolaire, ont fourni des valeurs incohérentes (notamment des valeurs de f supérieures à 2) (Tableau 10). Nous avons donc préféré adopter la relation de Stern-Volmer classique (Équation 27). Après modélisation, les valeurs des constantes K_{SV} et k_q ont été trouvées très proches de celles calculées pour les composés en série polaire, mettant ainsi en exergue les différences de modèle à adopter en fonction de la solvation de l'état excité.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_Q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (27)$$

	fpoh (13)	falpoh (30)	fal2poh (31)
log K_{sv} (L.mol⁻¹)	5,8	5,8	5,3
<τ₀> (ns)	1,41	3,11	2,68
log k_q (L.mol⁻¹.s⁻¹)	14,7	14,3	13,9
f	0,72	-	-
r²	0,982	0,950	0,967

Tableau 10 : Détermination des constantes de Stern-Volmer dans le cas de molécules partiellement affectées par un extincteur de fluorescence, en série apolaire.

2.6/ Etude de complexation avec différents sels métalliques

Nous allons maintenant nous intéresser au palier observé en émission après ajout d'ions fer (III) à une solution organique de fluorophore. La présence d'un repliement intramoléculaire dans le cas des acides phosphoniques ne permet pas d'offrir une disponibilité optimale des fonctions acides phosphoniques, pour complexer ces ions fer (III). Ce palier, étudié par Scatchard, permet d'obtenir la constante d'association et le nombre de sites de fixation par objet analysé, à condition de considérer que cette constante reste identique tout au long de la complexation. Généralement utilisé pour des protéines qui possèdent des entités fluorescentes non accessibles ou placées dans un environnement différent^{163,164}, un modèle a été développé via l'équation suivante (Équation 28).

$$\log \frac{(I_0 - I)}{I} = n * \log K_A - n * \log \frac{1}{[Q] - \frac{(I_0 - I)}{I_0} [F]} \quad (28)$$

avec I_0 l'intensité de fluorescence initiale, I l'intensité de fluorescence pour une quantité de fer ajoutée, $[Q]$ la concentration de fer utilisée, $[F]$ la concentration en fluorophore, n le nombre de sites disponibles par molécule et K_A la constante d'association du complexe formé.

Pour un excès d'extincteur, l'équation précédente peut se simplifier (Équation 29).

$$\log \frac{(I_0 - I)}{I} = \log K_A + n * \log [F] \quad (29)$$

Le tracé de $\log [(I_0 - I)/I]$ en fonction de $[F]$ (Équation 28) permet d'obtenir les valeurs des constantes de complexation K_A entre les ions fer (III) et les groupes complexants (Tableau 11). La valeur de cette constante pour l'acide carboxylique (10^3) est bien inférieure à celles obtenues pour les acides phosphoniques (10^5 - 10^6), de près de deux ordres de grandeur. La valeur de n , comprise entre 0,12 et 0,59, a également pu être déterminée et fournit la proportion d'acides phosphoniques libres et accessibles (Tableau 11).

Ces valeurs de n semblent indiquer que les entités acides phosphoniques ne sont pas toutes susceptibles de complexer les ions fer (III), à l'exception de ftetrapoh (23), suite au dépliement de la chaîne latérale et à l'accessibilité des unités acides chélatantes. Pour fal2poh (31), comportant une longue chaîne apolaire, seulement la moitié des sites serait apte à complexer les ions fer (III). Puisque l'extinction de fluorescence résultante est quasi-complète, un ion fer (III) permettrait d'éteindre deux fluorophores formant un complexe sandwich autour de cet ion.

	fdcooh (8)	fpoh (13)	ftpoh (22)	ftetrapoh (23)	fal2poh (31)
n	0,4	0,12	0,59	1,06	0,52
log K_A	3,2	5,0	6,2	5,2	6,0
r^2	0,981	0,984	0,984	0,963	0,969

Tableau 11 : Détermination des constantes d'association K_A du complexe de fer (III) ainsi que la disponibilité des groupes acides.

Les faibles valeurs de n et de K_A obtenues pour l'acide carboxylique peuvent s'expliquer par une compétition entre le ligand acétylacétionate, accompagnant initialement l'ion fer (III), et l'unité acide carboxylique du fluorophore. Les structures chimiques des groupes complexants étant proches, leurs constantes d'association le sont également, d'où un équilibre partiellement déplacé et une extinction de fluorescence incomplète.

2.6.2 Complexation en milieu organique avec des ions Ca (II)

La présence d'oxyde de fer en contact avec des émetteurs est connue pour générer une extinction de fluorescence par transfert d'électron photo-induit¹⁵⁸. De manière à mettre en évidence ce type de transfert, nous avons utilisé des ions métalliques comme le calcium (II), possédant des orbitales d pleines, et chélatés fortement par les acides phosphoniques⁶³. Une étude a donc été réalisée en phase homogène en utilisant le stéarate de calcium.

Des études par spectroscopie d'absorption, similaires à celles en présence d'ions fer (III), ont été à nouveau effectuées. Aucun changement de l'absorbance n'a lieu pour les esters, ce qui n'est pas le cas pour les acides (Figure 96). De plus, une inflexion semble également apparaître vers 0,5 équivalents, comme noté précédemment lors de l'addition d'ions fer (III).

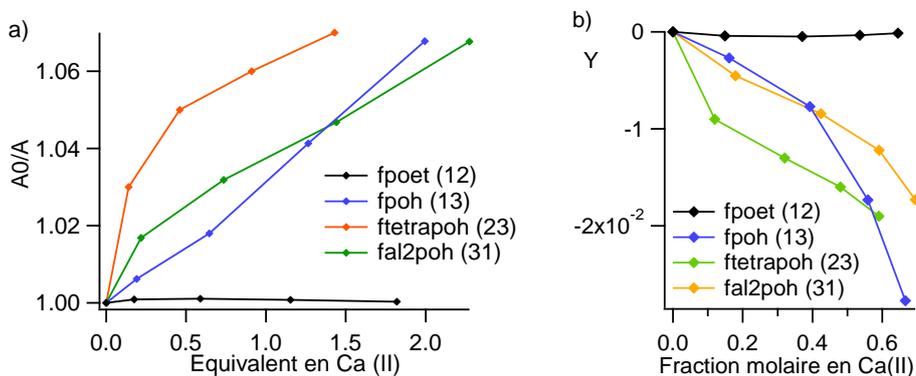


Figure 96 : a) Evolution du rapport des absorbances A_0/A pour différents fluorophores en fonction du nombre d'équivalents d'ions $Ca(II)$ ajoutés. b) Evolution de l'absorbance expérimentale par rapport à l'absorbance théorique, en fonction de la fraction molaire en ions $Ca(II)$.

Si l'on s'intéresse maintenant à l'évolution de l'intensité émise en solution, aucun changement du signal d'émission pour fpoet (12) n'est constaté à nouveau (Figure 97). Une faible extinction de fluorescence est observée pour les acides libres, sauf pour fpoh (13). Elle est caractérisée par un rapport I_0/I de 1,2, bien inférieur à ceux de 3 ou 4 obtenus lors de l'ajout de sels de fer (III). Cette plus faible extinction de fluorescence permet de mettre en évidence un mécanisme de transfert d'électron, due à la formation d'un complexe non fluorescent en présence d'ions fer (III).

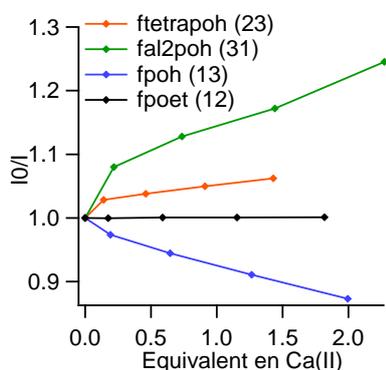


Figure 97 : Evolution du rapport des intensités d'émission I_0/I corrigée en fonction de la quantité d'ions $Ca(II)$ ajoutés en solution dans le toluène.

Dans le cas particulier de fpoh (13), l'addition croissante d'une quantité d'ions $Ca(II)$ conduit à une augmentation de l'intensité normalisée de fluorescence émise. Nous avons supposé que ce

2.6/ Etude de complexation avec différents sels métalliques

composé est majoritairement présent en solution sous forme repliée, entraînant une chute drastique de son rendement quantique. Ainsi, la présence de sel de calcium (II) peut entraîner un dépliement de la chaîne par la complexation de l'acide phosphonique, d'où une rupture des liaisons hydrogène intramoléculaires avec l'unité à transfert de charge, responsable de l'émission à l'état excité. Deux processus sont alors en compétition : le premier correspondant à la complexation du calcium (II) par l'acide phosphonique, et le deuxième correspondant au dépliement de la chaîne. Le premier processus génère une extinction du signal de fluorescence alors que le deuxième processus conduit à une exaltation. Au vu de l'augmentation globale de l'intensité émise, nous pouvons conclure que la valeur de la constante de complexation entre le calcium (II) et l'acide phosphonique est bien plus forte que la valeur de la constante d'équilibre de repliement intramoléculaire, dans le cas particulier de fpoh.

Les constantes de Stern-Volmer K_{SV} ont également pu être calculées après modélisation de l'extinction de fluorescence (Tableau 12a). Les valeurs sont très inférieures à celles obtenues en présence d'ions fer (III) et permettent de mettre en évidence un mécanisme d'extinction de fluorescence par un processus autre que le transfert d'électron à l'état excité. Une analyse selon le modèle de Scatchard aboutit à une constante d'association K_A bien plus faible que celle associée au complexe formé avec des ions fer (III) (Tableau 12b). Cette diminution est surtout observée pour le composé ftetrapoh (23), probablement due au choix du solvant. En effet, cette constante d'association est en réalité une constante d'échange entre l'acide phosphonique et le ligand stéarate, constitué d'une chaîne saturée de 17 atomes de carbone. Cette chaîne peut rendre difficile l'approche du groupe acide polaire vis-à-vis de l'ion calcium et l'échange de ligands.

a)	ftetrapoh (23)	fal2poh (31)	b)	ftetrapoh (23)	fal2poh (31)
$\log K_{SV}$	3.5	3.9	n	0,3	0,4
r^2	0,982	0,995	$\log k_A$	0,9	3,1
			r^2	0,964	0,969

Tableau 12 : Détermination des constantes des Stern-Volmer K_{SV} lors de l'ajout d'ions calcium (II) et b) détermination des constantes d'association K_A du complexe de calcium ainsi que la disponibilité des groupes acides.

2.6.3 Validation mécanistique par mesure de fluorescence résolue en temps

Afin de valider l'hypothèse de formation d'un complexe non fluorescent à l'état fondamental, selon un mécanisme d'extinction de fluorescence de type statique, et pas seulement à l'état excité selon un mécanisme de type dynamique, des études de fluorescence résolues en temps sont nécessaires. En effet, dans le cas d'un processus dynamique, le temps de vie de l'état excité décroît, dû à un processus compétitif d'extinction de fluorescence, $k_Q[Q]$ (Équation 30), provoquant ainsi un déclin de fluorescence plus rapide. Par contre, si le processus d'extinction de fluorescence est majoritairement statique, c'est-à-dire dû à la formation d'un complexe non fluorescent, aucune modification du temps de vie de l'état excité n'est observée.

$$\langle \tau_s \rangle = \frac{1}{k_f + k_{nr} + k_Q[Q]} \quad (30)$$

avec, k_f , la constante de vitesse de relaxation radiative, k_{nr} la constante de vitesse de relaxation non-radiative, k_Q la constante de vitesse d'extinction de fluorescence et $[Q]$ la concentration en extingueur de fluorescence.

Toutes les études suivantes sont réalisées en utilisant le toluène comme solvant et en commençant par comparer la nature du groupe acide, avec les composés fdcooh (8) et fpoh (13). Ensuite, l'accroissement de la chaîne latérale ainsi que l'influence de sa polarité sont étudiés à l'aide des composés ftpoh (22) et falpoh (30). Pour finir, les résultats sont comparés à l'évolution du déclin de fluorescence dans le cas de l'ajout d'ions calcium (II).

2.6.3.1 Mécanisme pour le composé acide carboxylique fdcooh (8)

Un contrôle négatif a tout d'abord été effectué. L'ajout de sel de fer (III) organique à une solution du composé fpoet (12), non complexant, ne provoque aucune modification du déclin de fluorescence.

Pour une même période d'acquisition, l'ajout d'ions fer (III) permet d'observer une légère diminution de l'intensité émise (Figure 98a). Une modélisation des différents déclins peut être réalisée grâce à une fonction bi-exponentielle et aboutit à une composante τ_1 longue et à une composante τ_2 courte. La valeur de la constante de temps τ_1 demeure inchangée tandis celle pour τ_2 , minoritaire ($f_2 = 0,01$), aux environs de 0,120 ns diminue légèrement jusqu'à 1 équivalent en fer (III) (Figure 98b). Cette faible diminution a été attribuée à une extinction de fluorescence de type dynamique.

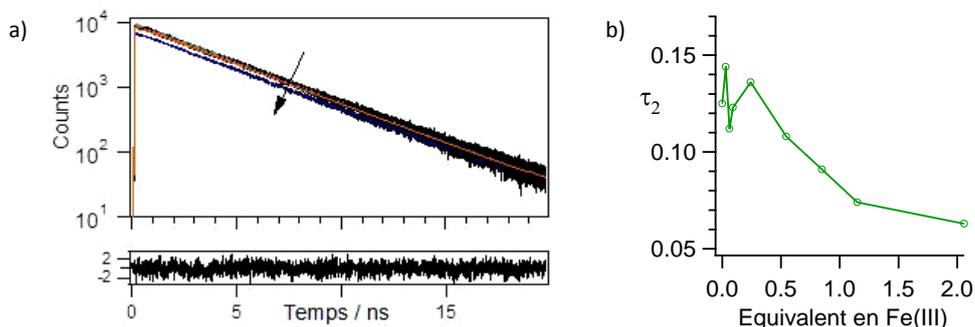


Figure 98 : a) Déclins de fluorescence obtenus par ajout d'ions fer (III) à une solution de fdcooh (8), ($10^{-4}M$). b) Evolution de la constante de temps la plus courte en fonction du nombre d'équivalents en ions fer (III).

Il est également possible de réaliser une analyse globale du système. Pour cela, au lieu de modéliser chaque déclin par une fonction multiexponentielle de manière indépendante, tous les déclins sont modélisés simultanément, en imposant au système de converger vers les mêmes constantes de temps. Lors d'une modélisation séquentielle des déclins, les évolutions des constantes de temps et de leurs proportions relatives, via les facteurs pré-exponentiels, sont alors comparées. Nous avons pris pour hypothèse que les deux constantes de temps obtenues précédemment, 3,61 ns (0,99) et 0,12 ns (0,01), demeurent constantes mais que leurs proportions évoluent. En effet, bien que la forme repliée de fdcooh (8) soit défavorisée, une proportion proche de 1 % pourrait être toutefois présente. L'ajout de sel de fer (III) provoque une diminution de la quantité de molécules libres fluorescentes, caractérisées par une constante de temps longue optimisée à 3,56 ns. En supposant que la forme repliée ne complexe pas les ions fer (III), une augmentation relative de la proportion de la constante de temps de cette forme, optimisée à 0,20 ns, est observée. Afin d'obtenir un facteur de corrélation acceptable, il a été nécessaire de compléter cette analyse globale

2.6/ Etude de complexation avec différents sels métalliques

en utilisant une fonction tri-exponentielle, avec une composante optimisée à 10 ps, probablement due à la présence résiduelle de l'impulsion laser utilisée pour l'excitation (IRTF : 40 ps) (Tableau 13).

Analyse globale du composé fdcooh (8) dans le toluène lors de l'ajout d'une quantité croissante de Fe(acac) ₃ (10 ⁻⁴ M)				
Conformations	τ_1 optimisé à 3,56 ns	τ_2 optimisé à 0,20 ns	τ_3 optimisé à 0,01 ns	χ^2
Allongée	- 30 %	-	-	1,07
Repliée	-	+ 20%	-	
-	-	-	+ 12%	

Tableau 13 : Analyse globale de l'extinction de fluorescence pour le composé fdcooh (8) par ajout de Fe(acac)₃ dans le toluène, après excitation à 450 nm et enregistrement des déclin à 580 nm.

2.6.3.2 Mécanisme pour les acides phosphoniques

Etude d'extinction de fluorescence pour le composé fpoh (13) :

L'ajout d'ions calcium (II) avait conduit à une augmentation de l'intensité de fluorescence pour le composé fpoh (13) et à une légère diminution pour les autres fluorophores chélatants. Lors de l'analyse par fluorescence résolue en temps, l'ajout de sel de fer (III) a conduit à une modélisation triexponentielle des déclin de fluorescence. Comme pour fdcooh (8), on observe l'évolution relative des trois constantes de temps correspondantes (Figure 99).

Dans le cas présent, le déclin évolue notablement avec la contribution de chacune des trois composantes (Figure 99c), plus qu'avec les valeurs des constantes de temps elles-mêmes (Figure 99b). Les facteurs pré-exponentiels évoluent jusqu'à 0,5 équivalent puis se stabilisent. Cette valeur de 0,5 équivalent correspondrait à la stœchiométrie du complexe formé, en accord avec les études en spectroscopie d'absorption rapportées dans la partie 2.6.1.1.

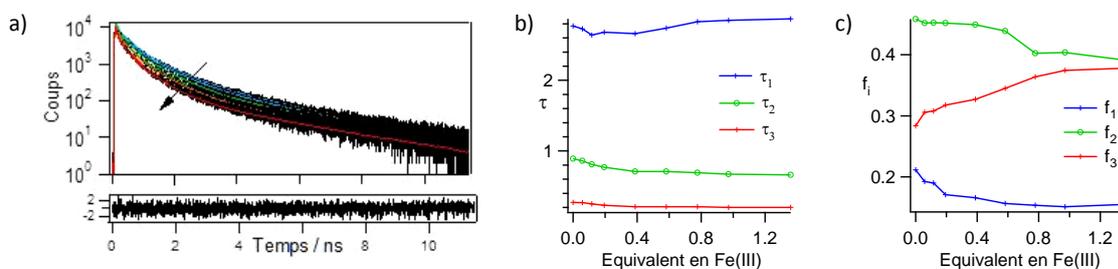


Figure 99 : a) Déclin de fluorescence obtenus par ajout d'ions fer (III) à une solution de fpoh (13) dans le toluène (10⁻⁴M). b) Evolution des constantes de temps à l'état excité en fonction du nombre d'équivalents en ions fer (III) et c) Evolution des proportions relatives des constantes de temps à l'état excité en fonction du nombre d'équivalents en fer (III).

De la même manière que précédemment, une analyse globale du déclin a été réalisée en laissant converger trois constantes de temps, relatives aux trois conformations possibles pour le composé fpoh (13), à savoir allongée (τ_1), repliée (τ_3) et dimérique (τ_2) (Tableau 14). Une diminution relative des contributions de la conformation allongée (2,7 ns) et de la forme dimérique (0,79 ns) est observée au profit de l'augmentation relative de la conformation repliée (0,25 ns), non réactive.

Analyse globale du composé fpoh (13) dans le toluène lors de l'ajout d'une quantité croissante de Fe(acac) ₃ (10 ⁻⁴ M)				
Conformations	τ_1 optimisé à 2,7 ns	τ_2 optimisé à 0,79 ns	τ_3 optimisé à 0,25 ns	χ^2
Allongée	- 55 %	-	-	1,13
Repliée	-		+ 38 %	
Dimérique	-	- 54 %	-	

Tableau 14 : Analyse globale de l'extinction de fluorescence pour le composé fpoh (13) par ajout de Fe(acac)₃ dans le toluène, après excitation à 450 nm et enregistrement des déclin à 580 nm.

L'extinction de fluorescence précédente pourrait alors être due à un mécanisme de type purement statique, puisque seule la proportion relative des conformères semble modifiée. Toutefois, il ne faut pas oublier qu'une légère diminution de la fluorescence a été observée lors des réactions de complexation avec les ions calcium (II) pour tous les acides sauf dans le cas particulier de fpoh (13) où la complexité initiale du système rend les interprétations délicates. Cette extinction de fluorescence plus faible pour les ions calcium (II) que pour les ions fer (III) indique la présence d'un second mécanisme d'extinction de type dynamique.

Etude d'extinction de fluorescence en fonction de la polarité de la chaîne latérale :

Nous avons pu observer par spectrofluorimétrie que le remplacement de chaînes polaires par des chaînes apolaires provoquait une augmentation du rendement quantique de fluorescence.

L'étude de la complexation du composé falpoh (30) avec des ions fer (III) a alors été réalisée. La quasi-constance des constantes de temps obtenues après modélisation du déclin par une fonction tri-exponentielle suggère bien un mécanisme d'extinction de fluorescence par formation d'un complexe non fluorescent à l'état fondamental. Toutefois, une légère diminution de la constante de temps la plus longue τ_1 , (Figure 100) a été observée, probablement due à un faible processus dynamique complémentaire. Les proportions relatives de ces constantes de temps permettent d'expliquer la diminution du déclin enregistré. Une augmentation relative de la contribution de la constante de temps intermédiaire τ_2 des dimères est observée. Elle peut être expliquée par une consommation des formes allongées, ce qui entraîne une diminution relative de la contribution de la composante longue τ_1 . Finalement, une légère augmentation relative de la contribution de la composante courte est observée, due à la faible réactivité et à la stabilité de cette forme repliée.

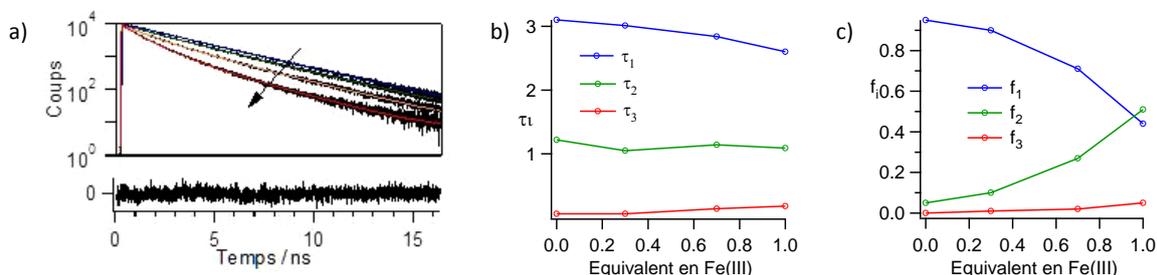


Figure 100 : a) Déclins de fluorescence obtenus par ajout d'ions fer (III) à une solution de falpoh (30) (10⁻⁴M). b) Evolution des constantes de temps à l'état excité en fonction du nombre d'équivalents en ions fer (III) et c) Evolution des proportions relatives des constantes de temps à l'état excité en fonction du nombre d'équivalent en ions fer (III).

2.6/ Etude de complexation avec différents sels métalliques

Etude d'extinction de fluorescence lors de l'augmentation de la longueur de la chaîne latérale :

Nous avons pu également montré par spectrofluorimétrie qu'un éloignement de l'unité acide phosphonique par rapport à l'unité cyanovinylidène la rendait plus disponible vis-à-vis des ions fer (III) ajoutés. Le signal de fluorescence diminuait alors fortement.

Lors de ces études résolues en temps, l'augmentation de la longueur de la chaîne latérale, en série polaire, provoque également une extinction de fluorescence par modification de la contribution relative des différentes constantes de temps. Comme précédemment, une augmentation de la contribution relative aux dimères est observée avec une diminution simultanée de la contribution propre aux formes étendues (Figure 101).

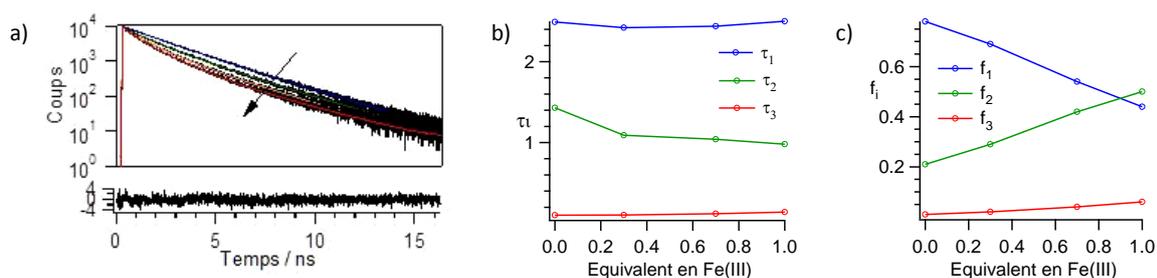


Figure 101 : a) Déclin de fluorescence obtenus par ajout d'ions fer (III) à une solution de ftpoh (22) (10^{-4} M). b) Evolution des constantes de temps à l'état excité en fonction du nombre d'équivalents en ions fer (III) et c) Evolution des proportions relatives constantes de temps à l'état excité en fonction du nombre d'équivalents en fer (III).

Etude d'extinction de fluorescence lors de l'ajout de sel de calcium (II) :

Les différentes études par spectrofluorimétrie ont mis en évidence l'existence d'une extinction de fluorescence importante dans le cas des ions fer (III) et plus faible pour les ions calcium (II). Aucune modification des déclins de fluorescence n'est observée en présence d'un excès d'ions calcium (II) pour les acides phosphoniques, fpoh (13) (Figure 102), ftpoh (22) et falpoh (30) (Figure 103). La constance des constantes de temps peut être corrélée à l'impossibilité de réaliser un transfert d'électron photo-induit à l'état excité, confortant notre hypothèse de formation d'un complexe non fluorescent à l'état fondamental. Or, pour les ions fer (III), une diminution simultanée de l'intensité de fluorescence émise et du déclin de fluorescence est observée. Ainsi, le processus d'extinction de fluorescence peut alors être caractérisé par la formation d'un complexe non fluorescent à l'état fondamental, complété par un transfert d'électron à l'état excité.

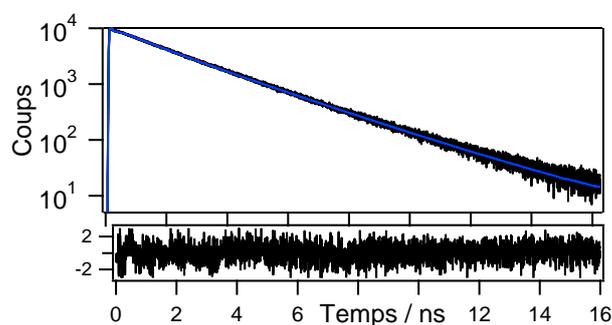


Figure 102 : Déclin de fluorescence obtenus par l'ajout d'un excès de stéarate de calcium à une solution de fpoh (13) dans le toluène (10^{-4} M).

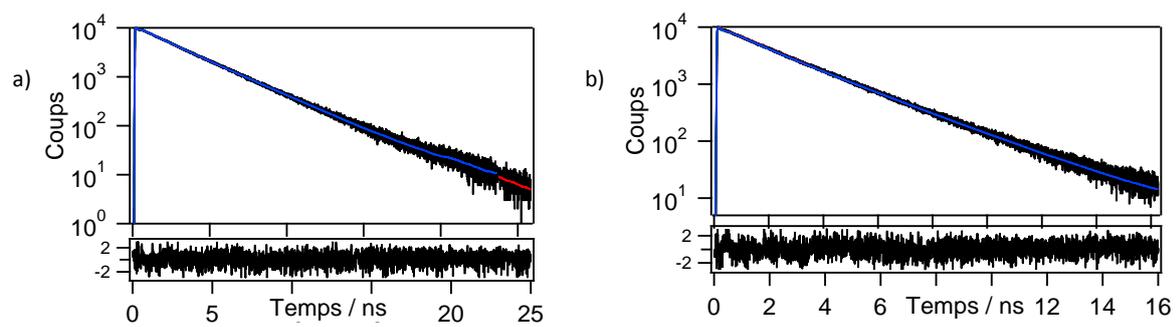


Figure 103 : Déclin de fluorescence obtenus par l'ajout d'un excès de stéarate de calcium à une solution de a) falpoh (30) ou b) ftpoh (22) dans le toluène ($10^{-4}M$).

2.7 Conclusion

Le développement d'une chimiothèque de dérivés de triarylamines a permis de synthétiser une variété de fluorophores comportant des unités acides phosphoniques liées par des espaceurs de longueur et de polarité variables. Différents composés modèles ont également été synthétisés comme des esters et un fluorophore constitué d'un espaceur alkyle inerte. La modulation du cœur fluorescent n'a pas généré de difficultés de synthèse, ouvrant ainsi la voie vers l'introduction d'autres fonctions chimiques comme des thiols ou des groupes polymérisables. Seule la synthèse de dérivés d'acides HBP s'est révélée infructueuse en raison d'additions nucléophiles parasites.

Les études spectroscopiques de cette chimiothèque de molécules ont permis de mettre en évidence, pour un composé en particulier fpoh (13), un phénomène de repliement intramoléculaire par formation de liaisons hydrogène. Des calculs quantiques couplés à de la spectroscopie infrarouge ont validé l'existence de ce repliement. L'éloignement du groupe complexant, ou sa protection sous forme d'ester, ont conduit à une diminution du processus d'extinction de fluorescence, induite par ce phénomène de repliement. Toutefois, lors de la complexation des fluorophores fpoh (13) avec des ions calcium (II), un dépliage de cette structure a été observé. La forte complexation des acides phosphoniques avec des ions fer (III) provoque une extinction de fluorescence par formation d'un complexe non fluorescent à l'état fondamental, et par transfert d'électron photo-induit à l'état excité, prouvant ainsi l'efficacité des fonctions acides phosphoniques à chélater les ions fer (III).

Il serait également intéressant de réaliser des études d'extinction de fluorescence dans des solvants protiques pour réduire la probabilité de repliement intramoléculaire. Toutefois, le faible rendement quantique obtenu en milieu polaire et protique limite ce type d'analyses. Différents sels métalliques pourraient également être utilisés afin d'étudier la sélectivité de la complexation des unités acides phosphoniques.

2.8 Références bibliographiques

- (123) Neises, B.; Steglich, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 522–524.
- (124) Moore, J. S.; Stupp, S. I. *Macromolecules* **1990**, *23*, 65–70.
- (125) Vollhardt, K. P. C.; Schore, N. E. *Traité de chimie organique*; De Boeck Supérieur, 2004.
- (126) Li, Z.; Yang, D.; Gabathuler, R.; Chen, Q. *Synth. Commun.* **2007**, *37*, 1899–1915.
- (127) Banville, J.; Bouthillier, G.; Plamondon, S.; Remillard, R.; Meanwell, N. A.; Martel, A.; Walker, M. A. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3170–3173.
- (128) Navarro, A. E.; Fages, F.; Moustrou, C.; Brisset, H.; Spinelli, N.; Chaix, C.; Mandrand, B. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 3947–3952.
- (129) Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. *Greene's protective groups in organic synthesis*; John Wiley and Sons, 2007.
- (130) Erixon, K. M.; Dabalos, C. L.; Leeper, F. J. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3561.
- (131) Michaelis, A.; Kaehne, R. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1898**, *31*, 1048–1055.
- (132) Bhattacharya, A. K.; Thyagarajan, G. *Chem. Rev.* **1981**, *81*, 415–430.
- (133) Narayanan, K. S.; Berlin, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 109–116.
- (134) McKenna, C. E.; Higa, M. T.; Cheung, N. H.; McKenna, M.-C. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 155–158.
- (135) Błażewska, K. M. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 408–412.
- (136) Ishow, E.; Clavier, G.; Miomandre, F.; Rebarz, M.; Buntinx, G.; Poizat, O. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 13922.
- (137) Turhanen, P. A.; Vepsäläinen, J. J. *Synthesis* **2005**, 2119–2121.
- (138) Nguyen Lan Mong; Niesor, E.; Bentzen, C. L. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1426–1433.
- (139) Lecouvey, M.; Mallard, I.; Bailly, T.; Burgada, R.; Leroux, Y. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8475–8478.
- (140) Egorov, M.; Aoun, S.; Padrines, M.; Redini, F.; Heymann, D.; Lebreton, J.; Mathé-Allainmat, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 7148–7154.
- (141) Ndonge, R. M.; Izmirian, D. P.; Dunn, M. F.; Yu, K. O. A.; Porcelli, S. A.; Khurana, A.; Kronenberg, M.; Richardson, S. K.; Howell, A. R. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10260–10270.
- (142) Rajeshwaran, G. G.; Nandakumar, M.; Sureshbabu, R.; Mohanakrishnan, A. K. *Org. Lett.* **2011**.
- (143) Seo, J.; Kim, S.; Park, S. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11154–11155.
- (144) Atkinson, A. P.; Planchat, A.; Gratton, J.; Renault, E.; Grégoire, G.; Le Questel, J.-Y. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 2272.
- (145) Fafarman, A. T.; Sigala, P. A.; Herschlag, D.; Boxer, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12811–12813.
- (146) Gurka, D.; Taft, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 4794–4801.
- (147) Arnett, E. M.; Joris, L.; Mitchell, E.; Murty, T. S. S. R.; Gorrie, T. M.; Schleyer, P. v. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 2365–2377.
- (148) *Phys. Chem. Chem. Phys.*
- (149) Jacquemin, D.; Perpète, E. A.; Ciofini, I.; Adamo, C. *Theor. Chem. Acc.* **2011**, *128*, 127–136.
- (150) Thanthiriwatte, K. S.; Hohenstein, E. G.; Burns, L. A.; Sherrill, C. D. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 88–96.
- (151) Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999–3094.
- (152) Improta, R.; Barone, V.; Scalmani, G.; Frisch, M. J. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 054103.
- (153) Kelly, C. P.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16066–16081.
- (154) Ishow, E.; Guillot, R.; Buntinx, G.; Poizat, O. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2012**, *234*, 27–36.
- (155) Alcalá, J. R.; Gratton, E.; Prendergast, F. G. *Biophys. J.* **1987**, *51*, 597–604.
- (156) Métivier, R.; Leray, I.; Valeur, B. *Chem. – Eur. J.* **2004**, *10*, 4480–4490.
- (157) Berberan-Santos, M. N.; Bodunov, E. N.; Valeur, B. *Chem. Phys.* **2005**, *315*, 171–182.
- (158) Katz, J. E.; Gilbert, B.; Zhang, X.; Attenkofer, K.; Falcone, R. W.; Waychunas, G. A. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 1372–1376.

2.8/ Références bibliographiques

- (159) Bissell, R. A.; de Silva, A. P.; Thilak, W.; Fernando, M. L.; Patuwathavithana, S. T.; Shantha, T. K.; Samarasinghe, D. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 425–428.
- (160) Bricks, J. L.; Kovalchuk, A.; Trieflinger, C.; Nofz, M.; Büschel, M.; Tolmachev, A. I.; Daub, J.; Rurack, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13522–13529.
- (161) Möller, M.; Denicola, A. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2006**, *30*, 175–178.
- (162) Azimi, O.; Emami, Z.; Salari, H.; Chamani, J. *Molecules* **2011**, *16*, 9792–9818.
- (163) Stan, D.; Matei, I.; Mihailescu, C.; Savin, M.; Hillebrand, M.; Baciou, I. *Molecules* **2009**, *14*, 1614–1626.
- (164) Zeng, H.; Qi, T.; Yang, R.; You, J.; Qu, L. *J. Fluoresc.* **2014**.

Chapitre III : Utilisation de nanosphères comme plateformes d'assemblages hybrides

Chapitre III : Utilisation de nanosphères comme plateformes d'assemblages hybrides	111
3.1 Introduction	113
3.2 Formation de nanosphères chélatantes par nano-précipitation	114
3.2.1 Principe	114
3.2.2 Propriétés physico-chimiques	117
3.2.3 Approche mécanistique	120
3.2.4 Etude d'extinction de fluorescence des nanosphères par ajout de sel métallique	122
3.2.4.1 Etude en fonction de sel de fer (III)	122
3.2.4.2 Etude en fonction d'autres sels métalliques	124
3.3 Formation d'assemblages hybrides magnéto-fluorescents	126
3.3.1 Synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer et stabilisation	126
3.3.1.1 Synthèse	126
3.3.1.2 Stabilisation	128
3.3.1.3 Notion de furtivité en condition physiologique	129
3.3.2 Greffage de nanoparticules d'oxyde de fer en surface de nanosphères	130
3.3.2.1 Formation in situ de nanoassemblages magnéto-fluorescents	130
3.3.2.2 Post-fonctionnalisation de nanosphères par des nanoparticules d'oxyde de fer	131
3.3.2.3 Etude d'extinction de fluorescence en présence de nanoparticules d'oxyde de fer	133
3.4 Stabilisation colloïdale d'assemblages hybrides	136
3.4.1 Utilisation de petites molécules chargées	136
3.4.1.1 Stabilisation à l'aide de citrate de sodium	136
3.4.1.2 Stabilisation à l'aide de petites molécules fluorescentes	138
3.4.2 Utilisation d'un polyélectrolyte	141
3.4.2.1 Stabilisation colloïdale de l'assemblage fluo@mag	141
3.4.2.2 Influence de la taille du polyélectrolyte	143
3.4.2.3 Caractérisation de la couche stabilisante	144
3.4.2.4 Lyophilisation, stockage et stabilité	145
3.5 Caractérisations structurales et physico-chimiques des nanoassemblages	148
3.5.1 Propriétés photophysiques	148
3.5.1.1 Etudes des nanoassemblages dans l'acide nitrique	148
3.5.1.2 Etudes des nanoassemblages stabilisés par le PAA dans l'eau	150
3.5.2 Etudes par spectrométrie de masse	152
3.5.3 Etudes des propriétés magnétiques et phénomène d'exaltation	156
3.5.3.1 Aimantation globale du système et sédimentation magnétique	156
3.5.3.2 Relaxivité et effets additifs	158
3.6 Conclusion et perspectives	160
3.7 Références bibliographiques	161

3.1 Introduction

Après avoir présenté différents systèmes nanométriques magnéto-fluorescents dans le chapitre 1, nous allons pouvoir nous intéresser à l'élaboration de nanosphères organiques fluorescentes comme plateformes d'assemblages hybrides. En effet, l'obtention de fluorophores hydrophobes dotés de fonctions de coordination hydrophiles laisse présager la formation par nano-précipitation dans l'eau de nanosphères présentant en surface des groupes chélatants hydrophiles.

Dans un premier temps, nous étudierons l'influence de la structure chimique des fluorophores sur la formation et les propriétés physico-chimiques des nanosphères fluorescentes obtenues. Nous nous intéresserons au mécanisme de formation de ces nanosphères avant d'étudier leurs propriétés de fluorescence en la présence et en l'absence d'extincteur de fluorescence.

Dans un second temps, nous présenterons la fabrication de nanoassemblages hybrides magnéto-fluorescents ainsi que les conditions nécessaires pour leur stabilisation colloïdale efficace.

Enfin, la structure et les propriétés physico-chimiques de ces nanoassemblages hybrides seront caractérisées afin de pouvoir les utiliser comme outils d'imagerie biologique ou de diagnostic.

3.2 Formation de nanosphères chélatantes par nano-précipitation

Il est tout d'abord nécessaire d'étudier l'influence de la structure chimique des fluorophores chélatants sur leurs capacités à s'autoassembler en milieu aqueux sous forme de nanosphères. La nature du solvant utilisé pour réaliser la nano-précipitation et la quantité de matière en fluorophores sont autant de paramètres à étudier pour appréhender le phénomène de nano-précipitation gouverné par la balance hydrophobe / hydrophile de la structure.

3.2.1 Principe

La synthèse de nanosphères organiques fluorescentes (FON) a été explicitée au chapitre 1. Elle est habituellement réalisée par nano-précipitation dans l'eau d'une solution organique de fluorophores à environ 1 % massique, préparée dans un solvant miscible avec l'eau. Lors de l'ajout d'un faible volume de cette solution organique « mère » à un large excès d'eau (environ 1/50, v/v), des nanosphères sont obtenues. Comparée aux premiers essais réalisés au sein de l'équipe sur le composé fvin (1), l'utilisation de fluorophores chélatants, protégés ou non, a nécessité la modification des conditions expérimentales. Parmi les différents solvants miscibles avec l'eau, seul le tétrahydrofurane (THF) a permis d'obtenir une nano-précipitation de fluorophores sous forme de nanosphères, comme présenté sur le schéma ci-dessous (Figure 104).



Figure 104 : Principe d'obtention de nanosphères organiques dispersées dans l'eau.

L'obtention de nanosphères n'a abouti que pour les fluorophores composés des chaînes polaires latérales courtes, avec un maximum de deux unités éthylèneoxy, à l'exception du composé modèle fC20 (5), non chélatant. L'importance de cette balance hydrophobe / hydrophile est donc sans équivoque.

De même qu'au chapitre 2, nous avons dans un premier temps comparé les comportements de fluorophores possédant des unités chélatantes et leurs modèles respectifs protégés, à longueur de chaîne latérale identique. Une solution organique mère ($[C_m] = 0,1 \text{ g/L}$) a alors été préparée et 50 μL de cette solution ont été ajoutés à 2,5 mL d'eau millipore sous agitation à l'aide d'un vortex. L'analyse par diffusion dynamique de la lumière (DLS) a permis d'obtenir les distributions du diamètre hydrodynamique moyen D_H , assimilé au vocable « taille » par la suite (Figure 105).

Des nanosphères de taille plus réduite sont obtenues en utilisant fdcooh (8) par comparaison avec celles issues de l'ester fotbu (7), c'est à dire l'acide protégé correspondant. La présence de fonctions partiellement déprotonées dans l'eau à $\text{pH} = 7$ entraîne une répulsion électrostatique entre les nuclei formés, réduisant la taille des nano-objets formés. En revanche, à l'issue de ces premiers essais, le composé fpoh (13) se comporte comme son analogue ester, ce qui peut s'expliquer par

l'existence d'un repliement intramoléculaire comme vu précédemment. Les groupes acides phosphoniques génèrent une répulsion électrostatique moindre du fait de leur engagement dans des liaisons hydrogène au sein des nuclei formés, si bien que le processus d'agrégation des nuclei n'est pas inhibé.

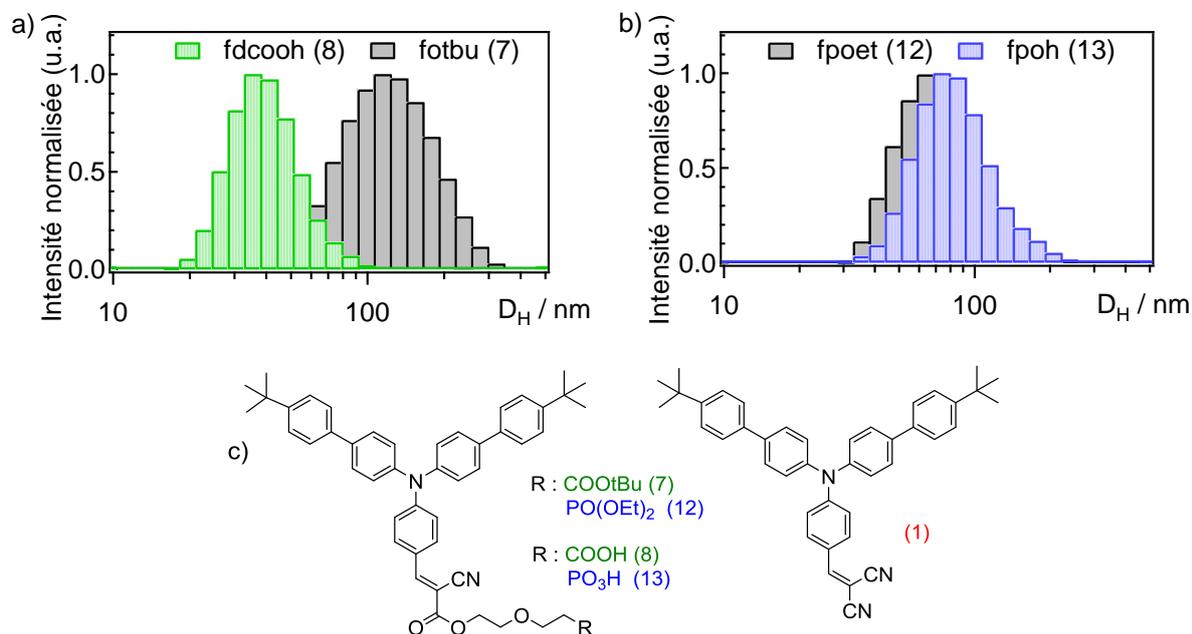


Figure 105 : Mesures en DLS de la distribution en taille de solutions de nanosphères organiques en fonction du groupe chélatant pour une même concentration en solution organique mère : a) dérivés d'acide carboxylique et b) d'acide phosphonique, pour une même longueur de chaîne latérale. c) Structures moléculaires étudiées.

Il est en général assez difficile d'obtenir des images de nanosphères organiques par microscopie électronique à transmission en raison des faisceaux d'électrons très énergétiques utilisés. De plus, les fluorophores organiques étant constitués d'éléments légers, un faible contraste électronique est obtenu par comparaison avec la grille support, souvent en cuivre. Toutefois, il est possible d'accroître ce contraste en teintant les nanosphères formées par du tétraoxyde de ruthénium. Un dégagement de RuO₄ gazeux, après oxydation d'un sel de ruthénium (RuCl₃) en présence d'eau oxygénée, interagit avec les doubles liaisons des cycles aromatiques des fluorophores. La présence d'un atome lourd permet ainsi d'augmenter le contraste tout en apportant un gain notable de stabilité, comme présenté sur les images ci-dessous où seules les nanosphères de fpoh (13) ont été teintées (Figure 106).

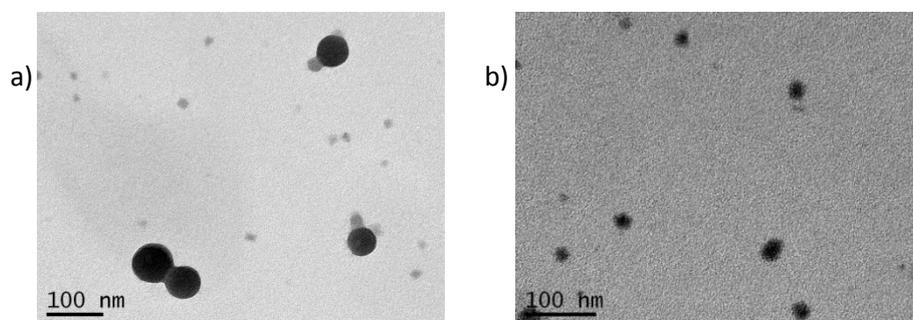


Figure 106 : Images MET de nanosphères composées de a) fpoh (13) et b) fdcooh (8). Les nanosphères ont été teintées à l'aide de RuO₄ afin d'augmenter le contraste pour l'image a).

3.2/ Formation de nanosphères chélatantes par nano-précipitation

Nous nous sommes ensuite intéressés à moduler le diamètre des nanosphères générées par modification de la quantité de matière nano-précipitée. Contrairement aux résultats obtenus pour le composé fvin (1), l'augmentation de la quantité initiale de nuclei ne permet d'obtenir qu'une faible variation du diamètre des nanosphères, d'environ 60 à 180 nm (Figure 107)¹²². Si l'on supprime la fonction chélatante terminale hydrophile, comme pour fc20 (5), il suffit d'utiliser dix fois moins de quantité de matière. Les nuclei hydrophobes ont plus tendance à s'autoassembler et à former des nanosphères plus grosses par rapport au nuclei plus polaires qui sont mieux solvatés par l'eau^{165,166}.

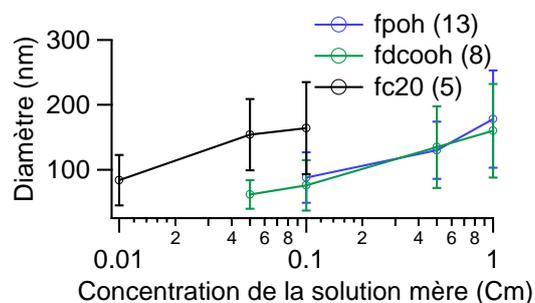


Figure 107 : Modification du diamètre moyen des nanosphères obtenues en fonction de la concentration massique de la solution mère.

Les caractéristiques des différentes nanosphères obtenues après nano-précipitation d'une solution organique mère ($C_m = 0,1 \text{ g.L}^{-1}$, THF) dans de l'eau millipore (2,5 mL) sont rassemblées dans le tableau ci-dessous (Tableau 15). Les diamètres les plus importants sont obtenus pour les fluorophores les plus hydrophobes, c'est-à-dire les moins solvatés par le milieu dispersant. De plus, comme décrit lors du chapitre 1, les nanosphères organiques présentent un potentiel de surface en général négatif, qui peut être corrélé avec le caractère acido-basique des fluorophores. Le composé fdcooh (8) présente ainsi le potentiel de surface ζ le plus important, dû à la déprotonation des acides libres en surface à pH 7. Le composé fpoh (13) possède un potentiel de surface identique à celui de son analogue protégé fpoet (12), probablement dû au repliement de la chaîne latérale à l'état solide, engageant les unités acides phosphoniques dans des liaisons hydrogène inter- et intramoléculaires.

Fluorophores	Diamètre moyen en nm	Potentiel zéta moyen en mV
fvin (1)	83 (40)	-43 (12)
fcyac (3)	42 (10)	-33 (10)
fpoet (12)	62 (23)	-36 (18)
foibu (7)	104 (47)	-
fpoh (13)	75 (30)	-33 (12)
fdcooh (8)	38 (12)	-61 (6)
fc20 (5)	164 (71)	-50 (6)

Tableau 15 : Propriétés structurales (D_H et ζ) des nanosphères obtenues après nano-précipitation d'une solution organique mère ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$, THF) dans de l'eau millipore (2,5 mL). La valeur entre parenthèses représente la largeur à mi-hauteur de la distribution mesurée.

3.2.2 Propriétés physico-chimiques

Contrairement à l'étude des fluorophores sous forme moléculaire, en solution, l'élargissement de la bande d'absorption responsable du transfert de charge intramoléculaire n'est plus observé pour le composé fpoh (13) comparé aux autres fluorophores (Figure 108a). Le repliement intramoléculaire semble moins favorisé, probablement dû à la présence des molécules d'eau en surface qui tendent à étendre la chaîne latérale de fpoh (13), par formation de liaisons hydrogène. Cette observation doit toutefois être nuancée puisqu'un élargissement global des bandes d'absorption intervient pour tous les composés, une fois assemblés sous forme de nanosphères. La forte concentration en molécules au sein d'une nanosphère favorise en effet des interactions intermoléculaires plutôt qu'intramoléculaires. L'interaction privilégiée des groupes complexants polaires avec les molécules d'eau en surface de la nanosphère se traduit par un léger effet hypsochrome (4-5 nm) de la bande d'absorption à transfert de charge, comparée à celle des fluorophores protégés.

Concernant les propriétés d'émission, un déplacement bathochrome notable du signal d'émission est tout d'abord observé pour les nanosphères par rapport à l'émission des fluorophores en solution dans le toluène (Figure 108b). Cet effet peut provenir de différences de polarité entre les deux solvants. Si l'on compare maintenant entre eux les fluorophores chélatants et leurs modèles protégés, deux évolutions opposées sont observées. Pour le couple ester fotbu (7) / fdcooh (8), le signal d'émission du fluorophore acide est décalé vers le rouge de près de 11 nm. En revanche, pour le couple ester fpoet (12) / fpoh (13), le signal d'émission de fpoh est décalé vers le bleu de 11 nm (Tableau 16).

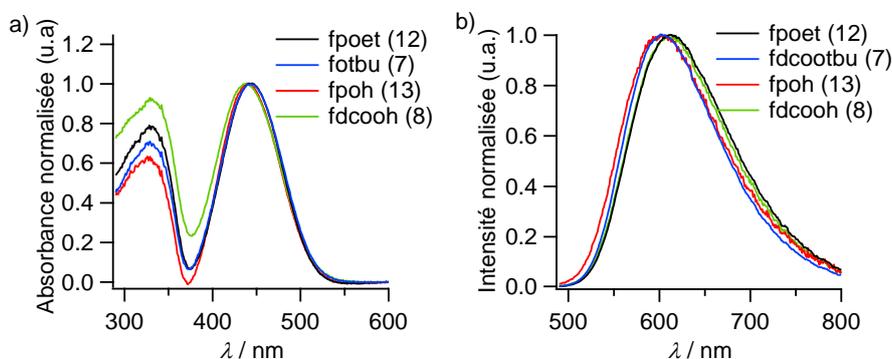


Figure 108 : Spectres a) d'absorption et b) d'émission d'une solution de nanosphères organiques fluorescentes dispersées dans l'eau. Spectres d'émission non corrigés de la réponse du détecteur.

Au niveau des rendements quantiques de fluorescence des nanosphères dispersées dans l'eau, une diminution globale de leurs valeurs est observée, comparées à celles des fluorophores en solution, à une exception près (Tableau 16). Malgré tout, la présence d'une concentration locale importante en fluorophores génère une valeur de brillance $\Phi_f \epsilon$ d'environ 10^7 , soit près de deux ordres de grandeur supérieure à celle des Qdots³⁹.

3.2/ Formation de nanosphères chélatantes par nano-précipitation

Fluorophores	Dissous dans le toluène			Nanoparticules dispersées dans l'eau		
	λ_{\max} (nm) (absorption)	λ_{\max} (nm) (émission)	Φ_f	λ_{\max} (nm) (absorption)	λ_{\max} (nm) (émission)	Φ_f
fvin (1)	453	585	0,19	456	632	0,06
fpoet (12)	443	575	0,22	444	613	0,04
fotbu (7)	441	584	0,19	443	601	0,1
fpoh (13)	442	595	0,002	440	602	0,01
fdcooh (8)	444	586	0,19	438	612	0,02

Tableau 16 : Propriétés photophysiques des fluorophores dissous dans le toluène et auto-assemblés sous forme de nanosphères. Les longueurs d'onde d'émission maximales ont été enregistrées après excitation à 450 nm.

En effet, le composé fpoh (13), sujet en solution aprotique à un repliement intramoléculaire de la fonction acide phosphonique vers le groupe nitrile, voyait son émission partiellement éteinte par couplage vibrationnel non radiatif. Une augmentation de l'émission sous forme de nanosphères laisse à nouveau suggérer l'existence de conformation étendues stabilisées par liaisons hydrogène entre deux fluorophores ou avec les molécules d'eau à la surface de la nanosphère (Figure 109).

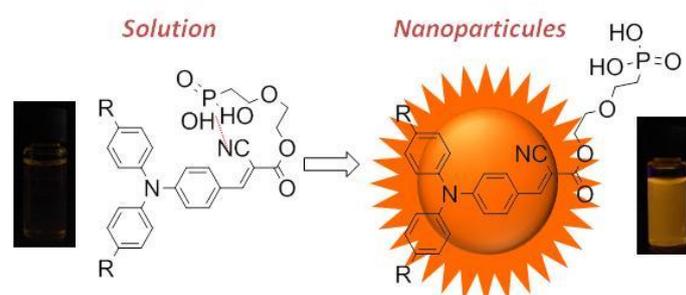


Figure 109 : Représentation schématique du composé fpoh (13) et signaux de fluorescence des solutions excitées à 365 nm (gauche) en solution sous forme moléculaire et (droite) auto-assemblé sous forme de nanosphère.

Sans ambiguïté, l'émission provient des nanosphères et non des fluorophores qui pourraient être dissous dans l'eau à des concentrations inférieures au seuil de solubilité. En effet, tous les fluorophores ont une émission éteinte dans des solvants polaires, hormis fC20 (5) qui présente un rendement quantique de fluorescence de 0,02 dans le THF. Néanmoins, comme fC20 (5) comporte des longues chaînes hydrophobes, les molécules peuvent être considérées comme quasi-exclusivement associées sous forme de nanosphères.

En effet, la fluorescence des fluorophores à transfert de charge est éteinte en milieu polaire, due à une stabilisation importante de l'état excité qui relaxe vers l'état fondamental essentiellement par conversion interne¹³⁶. Le rendement quantique de fluorescence le plus élevé a été obtenu pour des nanosphères hydrophobes composées de fotbu (7) ($\Phi_f = 0,1$) où la présence du groupe *tert*-butyle diminue la solvation en surface par les molécules d'eau et ainsi l'extinction de fluorescence.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence du pH sur les propriétés photophysiques des nanosphères constituées de fluorophores comportant des groupes acides, à savoir fdcooh (8) et fpoh (13). Pour cela, la nano-précipitation a été réalisée dans une solution aqueuse basique (NH_4OH ;

pH = 9) ou acide (HNO_3 ; pH = 1,2). Le choix de cet acide et de cette base est motivé par leur utilisation ultérieure dans la synthèse des nanoassemblages hybrides fluo@mag. Les spectres d'absorption ont été enregistrés quelques minutes après la formation des nanosphères (Figure 110). Pour le composé fdcooh (8) seul (Figure 110a), la présence de base entraîne la disparition de la bande à transfert de charge, ce qui a été attribué à une rupture de la conjugaison ainsi qu'à une dégradation du fluorophore (Figure 110b). A ce jour, nous n'avons pas trouvé d'explication à ce phénomène irréversible si ce n'est une réactivité diminuée vis-à-vis de toute addition nucléophile de la liaison vinylidène pour fpoh (13), suite au phénomène de repliement. Un milieu acide ne provoque aucun changement notable des spectres d'absorption, si ce n'est un élargissement des bandes à transfert de charge, dû à des interactions entre les nanosphères sous forme acide, pouvant conduire à leur agrégation.

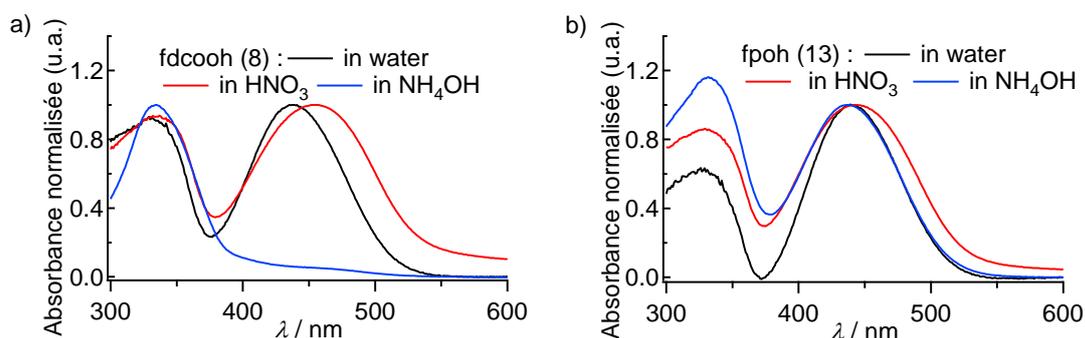


Figure 110 : Spectres d'absorption après nano-précipitation de a) fdcooh (8) et b) fpoh (13) en solution aqueuse acide (HNO_3 ; pH = 1,2), basique (NH_4OH ; pH = 9) et neutre.

L'étude des spectres d'émission confirme l'intégrité structurale des fluorophores malgré l'élargissement des bandes d'absorption, excepté pour le composé fdcooh (8) en milieu basique.

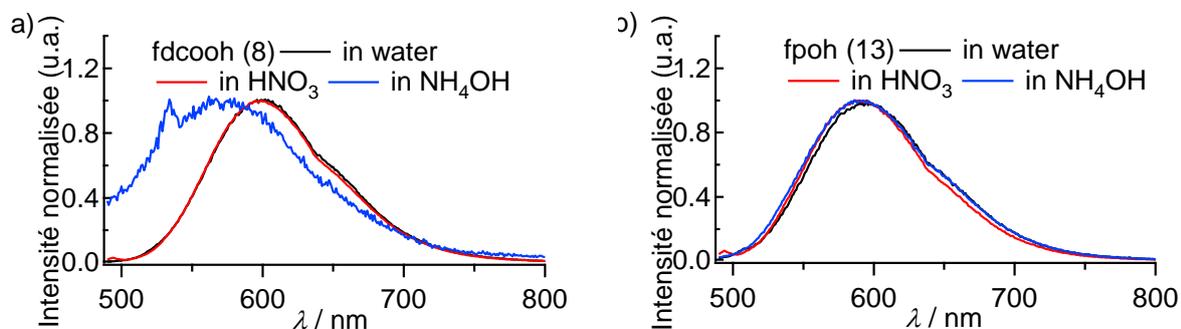


Figure 111 : Spectres d'émission après nano-précipitation de a) fdcooh (8) et b) fpoh (13) en solution aqueuse acide (HNO_3 ; pH = 1,2), basique (NH_4OH ; pH = 9) et neutre.

L'étude de la stabilité des nanosphères au cours du temps a également été réalisée en présence d'acide nitrique (pH = 1,2), utilisé par la suite comme milieu de nano-précipitation. La propriété oxydante de cet acide permet d'observer une dégradation du fluorophore après quelques heures seulement à température ambiante, ce qui sera néanmoins sans conséquence pour la suite. Le suivi de l'absorbance à 450 nm (Figure 112) confirme ce phénomène de dégradation par disparition de la bande à transfert de charge. La même étude a été réalisée en présence d'acide chlorhydrique (pH = 1,2) et aucune dégradation du composé n'a été notée. En revanche, une agrégation des nanosphères a été observée à cause de l'augmentation de la force ionique. Nous n'avons pas réussi à ce jour à rationaliser le mécanisme de dégradation des fluorophores par les ions nitrates.

3.2/ Formation de nanosphères chélatantes par nano-précipitation

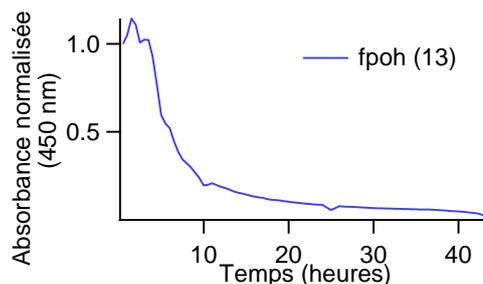


Figure 112 : Suivi de l'absorbance relative à 450 nm après formation de nanosphères de fpoh (13) dans une solution d'acide nitrique à pH = 1,2.

3.2.3 Approche mécanistique

Au chapitre 2, nous avons pu mettre en évidence l'importance de la modélisation du déclin de fluorescence pour étudier et comprendre le comportement particulier du composé fpoh (13). Les déclins de fluorescence enregistrés pour les nanosphères composées de fpoh (13) et fdcooh (8) sont présentés ci-dessous (Figure 113) aux côtés de ceux de leurs composés modèles estérifiés. Après modélisation de ces déclins par des fonctions multiexponentielles et comparaison avec les déclins en milieu homogène, différentes conclusions sont obtenues (Tableau 17).

Malgré la complexité de la modélisation utilisée, nécessitant jusqu'à 4 composantes, les résultats présentent une cohérence manifeste. Une constante de temps longue τ_1 est observée pour les deux esters carboxyliques et phosphoniques, qu'ils soient sous forme moléculaire ou sous forme de nanosphères. Pour les nanosphères, une nouvelle constante de temps intermédiaire τ_2 apparaît pour fpoet (12), d'une valeur de 1,8 ns, à rapprocher de celle déjà présente dans le cas de l'ester fotbu (7) sous forme moléculaire et valant 1,64 ns, issue probablement d'interactions intermoléculaires. Pour ces deux derniers composés, une troisième constante de temps courte τ_3 , ne représentant que 10% environ des contributions, est notée et peut être attribuée à la présence des molécules d'eau en surface, éteignant partiellement la couche superficielle des fluorophores.

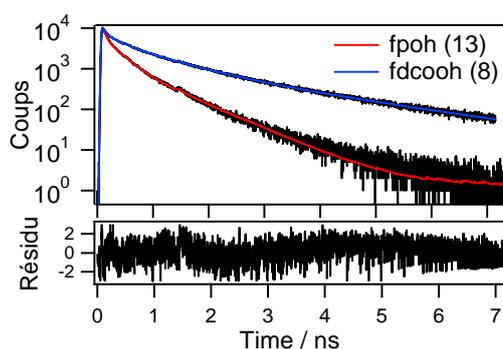


Figure 113 : Déclins de fluorescence enregistrés à 580 nm après excitation à 450 nm d'une solution de nanosphères composées de fpoh (13) ou de fdcooh (8).

Fluorophores	$\tau_i (f_i)$ (ns)	$\tau_i (f_i)$ (ns)
	Toluène	Nanosphères
fpoet (12)	4,17	4,17 (0,78), 1,80 (0,15), 0,29 (0,07)
foibu (7)	4,04 (0,96), 1,62 (0,04)	4,08 (0,64), 1,64 (0,31), 0,24 (0,05)
fdcooh (8)	3,61	2,25 (0,39), 0,80 (0,44), 0,19 (0,22), 0,03 (0,02)
fpoh (13)	2,88 (0,35), 0,76 (0,48), 0,15 (0,27)	1,43 (0,10), 0,55 (0,40), 0,18 (0,40), 0,03 (0,10)

Tableau 17 : Modélisation des déclin de fluorescence obtenus pour des fluorophores dissous dans du toluène ou nano-reprécipités dans l'eau sous forme de nanosphères ($\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 580 \text{ nm}$).

$$I(t) = \sum_i a_i \times \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \text{ avec } f_i = \frac{a_i \times \tau_i}{\sum_j a_j \times \tau_j}$$

La première conclusion au regard de ces déclin met en exergue une hétérogénéité importante en termes de densité et de conformations au sein des nanosphères. En effet, les molécules présentes à la surface et celles présentes à l'intérieur des nanosphères interagissent différemment avec leur environnement. Une fois nano-précipités en solution saturée, les nuclei pré-formés s'agrègent pour former des nanosphères jusqu'à ce que l'énergie du système soit minimisée. Les densités moléculaires au sein des nuclei et au niveau des joints de grains n'ont aucune raison d'être semblables. Voici ci-dessous un schéma récapitulatif du mécanisme supposé de formation de nanosphères organiques dispersées dans l'eau (Figure 114). De récentes études ont ainsi pu mettre en évidence un phénomène d'extinction de fluorescence par interactions intermoléculaires de fluorophores encapsulés dans une nanoparticule de silice¹⁶⁷⁻¹⁶⁹.

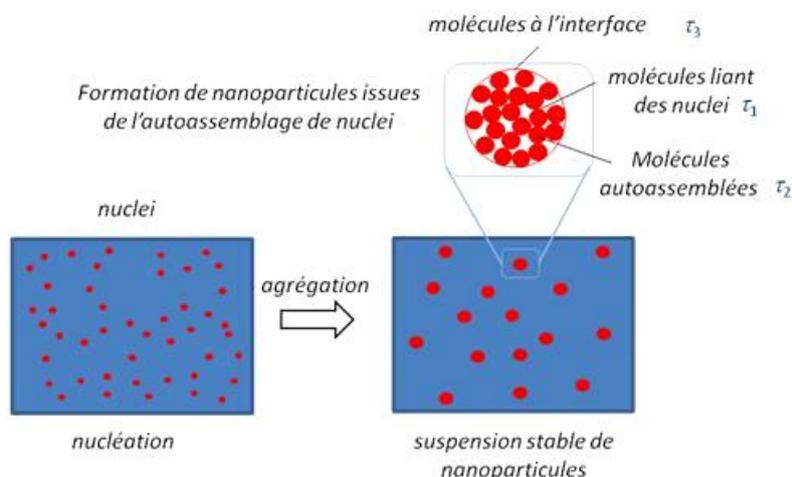


Figure 114 : Représentation schématique du mécanisme d'obtention de nanosphères et attribution des constantes de temps obtenues après modélisation des déclin de fluorescence.

Nous avons ainsi pu attribuer la constante de temps la plus grande τ_1 aux fluorophores libres présents au sein des nanosphères, probablement au niveau des joints de grains et assurant la cohésion entre les nuclei. La constante de temps courte τ_3 correspondrait aux fluorophores présents en surface et en contact avec les molécules d'eau extérieures. La constante de temps intermédiaire τ_2 a été attribuée aux molécules autoassemblées, fortement associées et formant les nuclei.

3.2/ Formation de nanosphères chélatantes par nano-précipitation

L'étude des déclins de fluorescence pour les composés acides libres permet d'aboutir à une deuxième conclusion. Lors du chapitre précédent, nous avons montré que l'interaction entre un fluorophore et des sels de fer (III) génère une extinction de fluorescence. L'extinction rencontrée ici se traduit par une réduction de la composante longue τ_1 du déclin qui décroît de 3,61 à 2,25 ns pour fdcooh (8) et de 2,88 à 1,43 ns pour fpoh (13). Ces constantes de temps sont alors attribuées aux fluorophores situés en surface des nanosphères, où pour l'instant seules les molécules d'eau sont susceptibles d'éteindre la fluorescence par couplage vibrationnel via des liaisons hydrogène. Contrairement aux esters précédents, il est plus difficile d'attribuer les constantes de temps à une conformation particulière. Cette attribution des constantes de temps pour les nanosphères complexantes s'appuie sur l'évolution des déclins de fluorescence engendrée par le greffage de nanoparticules d'oxyde de fer en surface et présentée plus loin dans ce chapitre. La constante de temps τ_3 peut être attribuée aux fluorophores présents à l'intérieur des nanosphères et constituant les nuclei et la constante τ_2 aux fluorophores présents aux joints de grains. Finalement, l'obtention après modélisation de composantes très courtes (30 ps) proviendrait d'artefacts, dû à la diffusion de la lumière excitatrice malgré le monochromateur et les fentes fines utilisées. La réponse instrumentale du système utilisé (IRTF) a été estimée à 40 ps.

3.2.4 Etude d'extinction de fluorescence des nanosphères par ajout de sel métallique

Avant de réaliser des nanoassemblages magnéto-fluorescents, il est indispensable d'étudier l'influence de la présence de sels de fer sur les propriétés de fluorescence. En effet, les études précédentes ont démontré une faible influence de l'environnement sur les propriétés émissives des nanosphères. L'utilisation de sels métalliques permet alors de modéliser au préalable le greffage des nanoparticules d'oxyde de fer sur les nanosphères. Celles constituées du fluorophore fpoh (13) (fdcooh (8)) seront notées (P)-FON ((C)-FON).

3.2.4.1 *Etude en fonction de sel de fer (III)*

Après formation de nanosphères par nano-précipitation (50 μL , $[\text{Cm}] = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, THF) dans de l'eau millipore (2,5 mL), une solution aqueuse de chlorure de fer (III) est ajoutée. Dans un premier temps, cette solution a été ajoutée (quelques μL) à une dispersion de nanosphères de fpoet (12). Aucune modification significative des spectres d'absorption et d'émission n'est observée (Figure 115), après correction de l'effet de dilution.

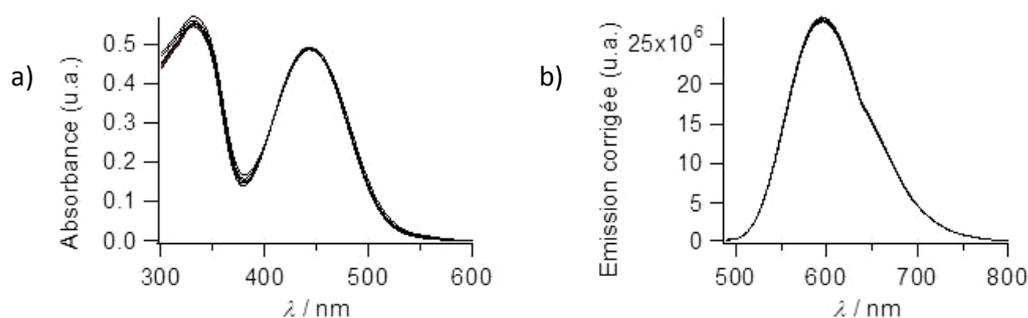


Figure 115 : Evolution des spectres a) d'absorption et b) d'émission en fonction de l'ajout de sel de FeCl_3 (0 à 0,7 éq) à une solution de nanosphères de fpoet (12). Spectres d'émission non corrigés de la réponse du détecteur mais corrigés de l'effet de dilution après ajout de la solution de sel de fer.

Cette observation résulte de l'absence de fonctions chélatantes sur la structure de fpoet (12), d'où une absence d'interactions entre les ions fer (III) et les nanosphères fpoet (12) et une fluorescence inchangée vis-à-vis de la composition du milieu environnant. En revanche, pour des nanosphères composées de fpoh (13), l'addition d'une solution de chlorure de fer (III) provoque non seulement une légère augmentation des bandes d'absorption (Figure 116a), mais surtout une extinction de fluorescence significative (Figure 116b), après correction de l'effet de dilution.

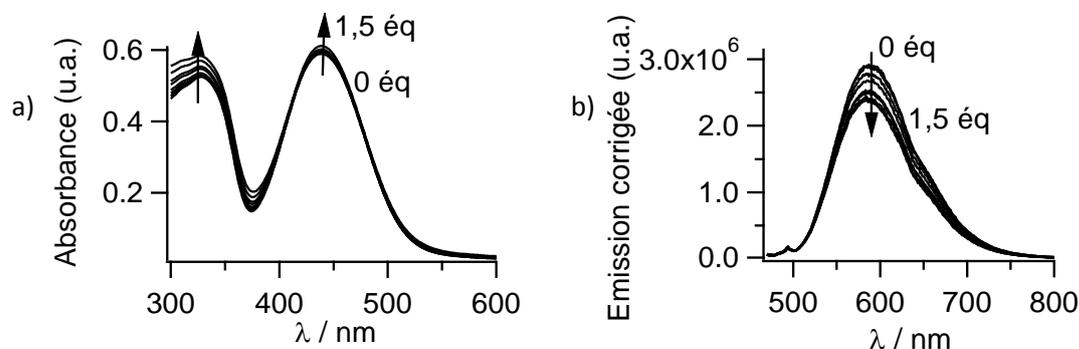


Figure 116 : Evolution des spectres a) d'absorption et b) d'émission en fonction de l'ajout de sel de FeCl_3 (0 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,8 ; 1,1 ; 1,5 éq) à une solution aqueuse de nanosphères de fpoh (13). Spectres d'émission non corrigés de la réponse du détecteur mais corrigés de l'effet de dilution après ajout de la solution de sel de fer.

Le tracé de l'absorbance relative A_0/A (l'émission relative I_0/I), avec A_0 (I_0) l'absorbance (l'émission) initiale en l'absence d'extincteur, en fonction de la quantité de sel de fer (III) ajoutée permet d'observer un comportement relativement similaire pour les nanosphères complexantes fpoh (13) et fdcooh (8) (Figure 117). Dans le cas de l'acide carboxylique fdcooh (8), une augmentation plus importante de l'absorbance et de l'extinction de fluorescence a été observée, en raison du plus grand rapport surface sur volume, et donc d'une plus grande sensibilité, liée au diamètre plus faible des nanosphères de fdcooh (8) comparé à celui des nanosphères à base de fpoh (13).

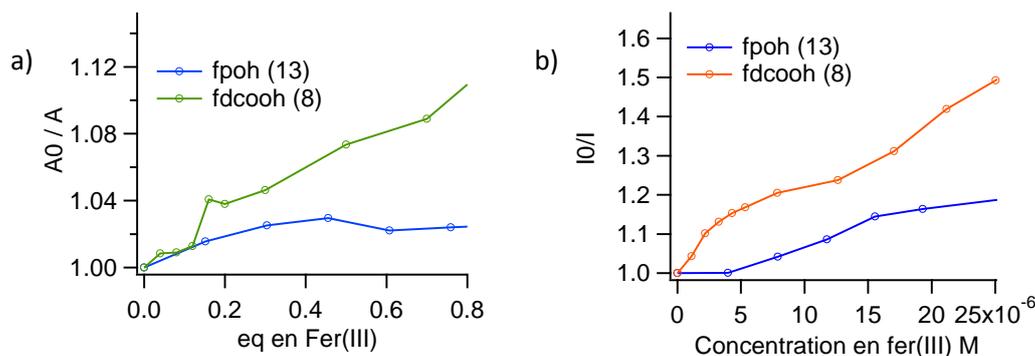


Figure 117 : Evolution de a) l'absorbance relative (A_0/A), b) l'émission relative (I_0/I) en fonction du nombre d'équivalents ou de la concentration en ions fer (III).

Après modélisation de cette extinction de fluorescence grâce à la loi de Stern-Volmer modifiée et en considérant une partie des fluorophores inaccessibles vis-à-vis de l'extincteur (cf. chap 2), les valeurs de constantes K_{SV} et k_q obtenues sont rassemblées dans le tableau suivant (Tableau 18a).

3.2/ Formation de nanosphères chélatantes par nano-précipitation

a)	(C)-FON	(P)-FON	b)	fdcooh (8)	fpoh (13)
$\log K_{sv}$ (L.mol ⁻¹)	2,7	3,2		5,4	5,8
f	0,4	0,5		0,19	0,72
r^2	0,977	0,920		0,995	0,982
$\langle \tau_0 \rangle$ (ns)	1,27	0,44		3,61	1,41
$\log k_q$ (L.mol ⁻¹ .s ⁻¹)	11,5	12,6		13,9	14,7

Tableau 18 : a) Constantes d'extinction de fluorescence déterminées à partir de la loi de Stern-Volmer modifiée. b) Rappel des valeurs de constantes obtenues pour les fluorophores dissous dans du toluène en présence de sel organique de fer (III) (chapitre 2).

L'analyse générale des constantes d'extinction de fluorescence (K_{sv}) ainsi que des constantes de vitesse (k_q) associées met en évidence un processus moins efficace pour les fluorophores autoassemblés sous formes de nanosphères. Cela peut s'expliquer simplement par la présence de fluorophores enfouis au sein de la nanosphère et donc protégés de l'extérieur. De plus, une proportion similaire de fluorophores semble interagir avec le sel métallique ($f = 0,4-0,5$) pour les deux types de nanosphères. Les valeurs toujours très élevées des constantes de vitesse d'extinction de fluorescence indiquent l'existence d'un mécanisme faisant intervenir un complexe non fluorescent ou d'un mécanisme de diffusion de l'extincteur jusqu'à une zone délimitée par une sphère effective d'extinction de fluorescence autour de la nanosphère organique.

La quantité d'ions pouvant être complexés à la surface de ces nanosphères s'est révélée difficile à déterminer à partir de ces études.

3.2.4.2 Etude en fonction d'autres sels métalliques

L'utilisation de nanosphères a également été rapportée pour sonder d'autres cations métalliques grâce à la modification des propriétés d'émission. Nous avons donc souhaité étudier l'influence du sel métallique sur l'extinction de fluorescence observée précédemment. Afin de comparer l'effet du cation métallique (Cd (II), Mg (II), Cu (II), Pb (II), Ca (II), Zn (II), Ni (II), Fe (III)), des contre-ions perchlorates non coordinants ont toujours été utilisés. L'ajout d'une solution aqueuse de sels métalliques à une dispersion de nanosphères composées de fpoh (13) ((P)-FON) conduit, pour les seuls ions possédant une sous-couche électronique d non totalement remplie (Fe (III) mis à part) à une extinction de fluorescence, sans changement d'énergie, suite à des transferts d'électron à l'état excité (Figure 118).

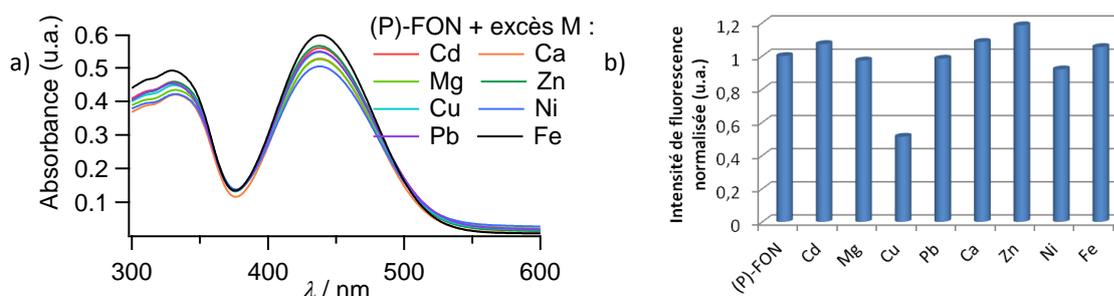


Figure 118 : a) Spectres d'absorption et b) histogramme représentant l'intensité de fluorescence émise à la longueur d'onde d'émission maximale après excitation à 450 nm de dispersions de (P)-FON en fonction de la nature du sel

métallique ajouté en excès ($M_x(ClO_4)_y$). Intensités d'émission non corrigées de la réponse du détecteur mais corrigées des changements d'absorbance à la longueur d'onde d'excitation.

La même étude a été réalisée avec des nanosphères composées de fdcooh (8) ((C)-FON) afin d'étudier l'influence de la nature du groupe complexant sur la chélation d'ions métalliques. La présence d'un groupe carboxylique fournit les mêmes effets que ceux obtenus avec un groupe acide phosphonique, à l'exception des sels de fer (III) qui provoque cette fois-ci une extinction de fluorescence. Il est très difficile de comparer avec précision ces extinctions de fluorescence en raison d'une taille différente des nanosphères, et donc d'une proportion également différente de fluorophores protégés à l'intérieur des cœurs organiques (Figure 119).

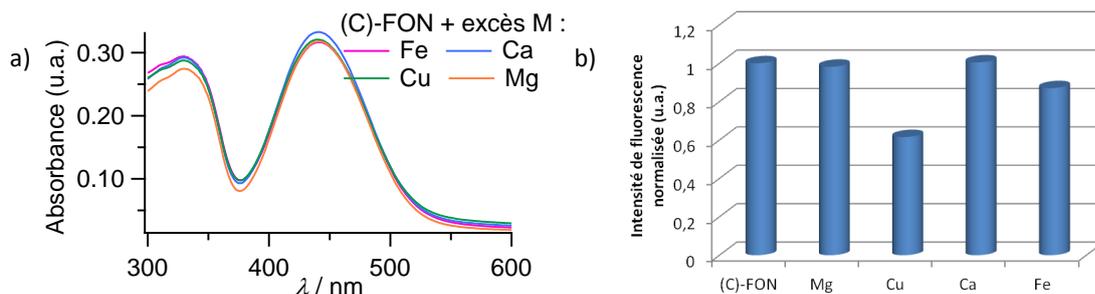


Figure 119 : a) Spectres d'absorption et b) histogramme représentant l'intensité de fluorescence émise à la longueur d'onde d'émission maximale après excitation à 450 nm de dispersions de (C)-FON en fonction de la nature du sel métallique ajouté en excès ($M_x(ClO_4)_y$). Intensités d'émission non corrigées de la réponse du détecteur mais corrigées des changements d'absorbance à la longueur d'onde d'excitation.

Bien que ces systèmes ne puissent pas être utilisés comme sondes de cations métalliques comme les fluoroionophores^{18,156,160,170,171} via l'étude de l'extinction de fluorescence, d'autres méthodes comme l'utilisation de nano-émulsions magnétiques peuvent également quantifier différents cations métalliques¹⁷². Une modélisation de l'extinction de fluorescence des nanosphères en présence de sels de cuivre (II) qui semble être les extincteurs les plus efficaces, selon le modèle de Stern-Volmer étendu, a abouti à des valeurs de constantes d'extinction de fluorescence supérieures à celles obtenues lors de l'utilisation de sel de fer (III), tout en conservant la même proportion de molécules inaccessibles (Tableau 19). Nous ne disposons pas d'éléments actuellement pour identifier les raisons de la complexation supérieure des ions cuivre (II).

a)	Perchlorate de cuivre (II)		b)	Chlorure de fer (III)	
	(C)-FON	(P)-FON		(C)-FON	(P)-FON
log K_{sv} (L.mol⁻¹)	5,4	5,4		2,7	3,2
f	0,45	0,45		0,40	0,50
r²	0,988	0,988		0,977	0,920

Tableau 19 : a) Constantes d'extinction de fluorescence K_{SV} en utilisant la loi de Stern-Volmer modifiée pour l'ajout de sel de cuivre (II). b) Rappel des valeurs de constantes obtenues précédemment lors de l'ajout de sel de chlorure fer (III).

3.3 Formation d'assemblages hybrides magnéto-fluorescents

Grâce à la synthèse de nouveaux fluorophores chélatants, nous avons pu obtenir des nanosphères dispersées dans l'eau. Nous allons maintenant nous intéresser à coupler ces nanosphères fluorescentes à des nanoparticules d'oxyde de fer. Dans un premier temps, quelques généralités sur les nanoparticules d'oxyde de fer seront présentées, puis dans un second temps le greffage de ces oxydes métalliques sur la surface des nanosphères sera détaillé.

3.3.1 Synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer et stabilisation

Avant de présenter les voies suivies pour greffer les nanoparticules d'oxyde de fer, il semble important de décrire leurs synthèses ainsi que leurs modes de stabilisation. De nombreux protocoles de synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer existent mais nous nous restreindrons à celui suivi au sein du laboratoire, tout en évoquant les avantages et les inconvénients des autres méthodes utilisées. La majeure partie des nanoparticules d'oxyde de fer qui seront utilisées par la suite ont été synthétisées par le laboratoire PECSA de l'Université de Paris Diderot, en collaboration avec le Dr. Jérôme Fresnais.

3.3.1.1 Synthèse

Initialement développée par Massart et al¹⁷³ dans les années 1980, la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer est réalisée par simple co-précipitation d'ions fer (II) et d'ions fer (III), en milieu alcalin (Figure 120), sous la forme d'hydroxyde de fer mixte, la magnétite. Cet oxyde de fer mixte (II et III) peut ensuite être oxydé à chaud en présence d'acide nitrique et de nitrate de fer (III) pour conduire à de la maghémite, constituée uniquement d'ions fer (III). Le diamètre des nanoparticules ainsi obtenues peut être diminué en augmentant la concentration en ammoniacque ou le ratio fer (III) / fer (II)¹⁷⁴, ce qui permet de balayer une gamme de quelques nanomètres à plus d'une centaine de nanomètres. D'autres paramètres vont modifier la taille et la cristallinité des nanoparticules obtenues, comme la température ou la vitesse d'addition de l'ammoniacque, mais ne seront pas discutés dans le cadre de ce manuscrit.

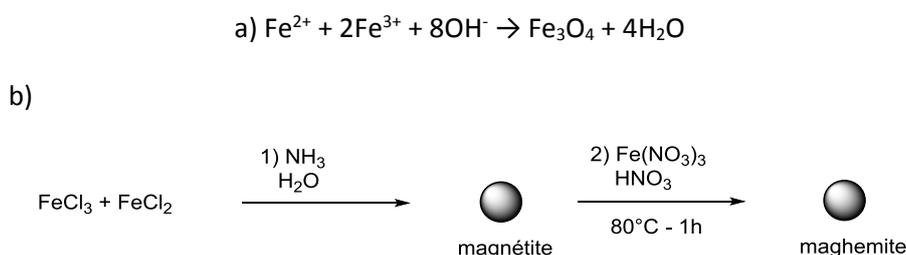


Figure 120 : Synthèse de nanoparticules de magnétite et de maghémite. a) Equation bilan pour la formation de magnétite et b) schéma de synthèse de maghémite, après oxydation.

Lors de la première étape de synthèse, de la magnétite est obtenue. Celle-ci peut ensuite être colloïdalement stabilisée grâce à du citrate de sodium. Les ions citrates complexent la surface des nanoparticules via un ou plusieurs groupes carboxylates, ce qui génère de la répulsion électrostatique entre les nanoparticules chargées négativement par les groupes carboxylates non coordinés.

La structure cristallographique de ces oxydes de fer est présentée sur la figure suivante (Figure 121). La magnétite possède une structure de type spinelle inverse où les atomes d'oxygène dessinent un réseau de type cubique à faces centrées. Les ions fer (III) sont répartis de manière équivalente entre les sites tétraédriques (8/64 sites A) et octaédriques (8/32 sites B). Les ions fer (II) sont quant à eux répartis sur les sites octaédriques restants (8/32 sites B). Les moments magnétiques de spin des ions fer (III) s'annulent deux à deux puisqu'ils sont disposés de manière antiparallèle entre deux sites adjacents A et B. Le moment magnétique de spin résultant est donc fonction des ions fer (II) seulement. Concernant la maghémite, les ions fer (III) occupent toujours pour moitié les sites octaédriques et tétraédriques de manière antiparallèles. Les lacunes, dues aux ions fer (II) dans les sites octaédriques, jouent un rôle important dans l'aimantation finale de par leurs agencements respectifs. La maghémite se comporte donc comme un matériau ferrimagnétique avec des spins opposés mais d'intensité différente. L'aimantation à saturation de la magnétite (matériau macrométrique : 92 emu/g) se révèle donc être plus importante que celle de la maghémite, composée intégralement d'oxyde de fer (III) (73,5 emu/g)¹⁷⁵.

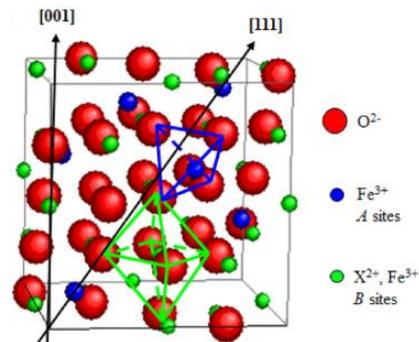


Figure 121 : Structure cristallographique de l'oxyde de fer, avec X désignant un atome bivalent, un ions fer (II) dans le cas de la magnétite, ou une lacune dans le cas de la maghémite¹⁷⁶.

Il est toutefois bien connu que l'oxyde de fer (II) s'oxyde naturellement en oxyde de fer (III) en présence de dioxygène, ce qui provoque la formation d'une couche de maghémite en surface de la magnétite. Il est donc nécessaire de déterminer l'épaisseur de cette couche relative grâce à des techniques spectroscopiques de type Mössbauer¹⁷⁷, utilisant un rayonnement gamma pour sonder les transitions nucléaires de l'élément fer. Afin de s'affranchir de ce phénomène d'instabilité chimique pouvant influencer sur les propriétés magnétiques de l'assemblage, tout l'assemblage est oxydé en maghémite.

Comme la maghémite est obtenue en milieu oxydant et acide, les nanoparticules résultantes se trouvent stabilisées par les ions nitrates, négativement chargés. Cette stabilisation purement électrostatique permet de conserver des nanoparticules de maghémite stables dans le temps et exemptes de tout ligand qui serait à échanger lors d'une fonctionnalisation en surface.

Méthode par décomposition thermique et autres méthodes

Il est également possible de préparer des nanoparticules d'oxydes de fer par décomposition thermique. Cette voie de synthèse utilise comme précurseurs de fer différents complexes organométalliques de fer (par exemple du Fe(acac)₃, Fe(CO)₅) dissous dans un solvant à très haute température d'ébullition. A haute température, une décomposition des précurseurs intervient et des nanoparticules de magnétite sont ainsi obtenues¹⁷⁸ par un mécanisme de nucléation-agrégation.

3.3/ Formation d'assemblages hybrides magnéto-fluorescents

De manière générale, le diamètre des nanoparticules est inférieur à celui obtenu lors d'une synthèse par coprécipitation, avec une distribution en taille plus fine. Une meilleure cristallinité est également observée, améliorant ainsi la réponse magnétique. Ce type de synthèse n'a toutefois pas été utilisé dans le cadre de ce projet puisque le greffage de ligands hydrophiles s'avère indispensable pour un transfert ultérieur vers une phase aqueuse. Par ailleurs, la reproductibilité, en terme de distribution de taille, est très sensible aux conditions expérimentales et l'influence du ligand utilisé pour stabiliser les nanoparticules durant le processus est également à prendre en considération¹⁷⁸.

L'utilisation de polyalcools^{22,179} (méthode polyol) comme solvants est également largement développée puisqu'ils permettent de solubiliser à haute température des précurseurs inorganiques de fer (III), grâce à leurs fortes constantes diélectriques. En effet, lors du chauffage du milieu réactionnel, les polyalcools jouent le rôle de réducteurs, en générant des nuclei, et de stabilisants en complexant la nanoparticule finale. L'augmentation de la taille des nanoparticules est obtenue grâce à un chauffage accru ou à un allongement de la chaîne des polyalcools.

Finalement, d'autres méthodes, plus exotiques, existent pour former ces oxydes de fer comme la lithographie par faisceau d'électrons. Bien que peu utilisées, ces méthodes permettent de contrôler la taille des objets obtenus à l'échelle nanométrique. Il est également intéressant de citer de nouvelles méthodes de fabrication des nanoparticules d'oxyde de fer comme la fermentation microbienne, la synthèse par voie sonochimique ou encore l'utilisation de solvant en conditions supercritiques¹⁸⁰.

3.3.1.2 Stabilisation

Comme tout système nécessite d'être stabilisé, une dispersion stable de nanoparticules ne peut être obtenue sans phénomènes de répulsion, stérique ou électrostatique, permettant d'éviter une agrégation. Intéressons-nous donc aux processus de stabilisation de nanoparticules d'oxyde de fer.

La maghémite non stabilisée peut être dispersée dans des milieux fortement acides ou basiques mais flocule et s'agrège à un pH proche de 7, de manière irréversible. Cette agrégation provient de la présence d'un potentiel de surface proche de zéro pour un pH neutre (Figure 122), inhibant toutes répulsions électrostatiques. La présence de groupes chargés et/ou encombrants permet ainsi d'améliorer cette stabilité sur une large gamme de pH.

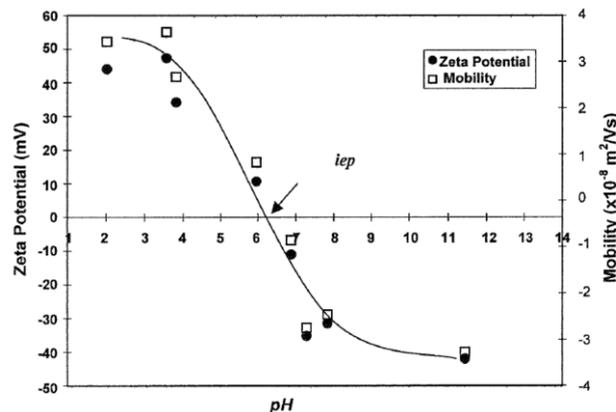


Figure 122 : Evolution de la stabilité colloïdale en fonction du pH de nanoparticules d'oxyde de fer (Malvern®).

Pour mieux comprendre ce phénomène de stabilité colloïdale, un rappel peut être nécessaire. Dans les années 1940, quatre scientifiques, Derjaguin, Verwey, Landau et Overbeek ont développé une théorie dénommée DVLO qui permet de décrire cette stabilité comme la résultante de deux groupes de forces majoritaires, pour un solvant donné : d'une part, des forces attractives, de type van der Waals et d'autre part, des forces répulsives, de type électrostatique (Figure 123). D'après les équations mathématiques issues de la distribution de Poisson–Boltzmann¹⁸¹ et en assimilant une particule à une sphère, on obtient une énergie de répulsion électrostatique qui décroît de manière exponentielle avec la distance entre deux particules. Cette répulsion est également proportionnelle au carré du potentiel de surface Zêta ζ (Figure 123), indicateur de la charge de surface de l'assemblage en contact avec le solvant, lui-même constitué de molécules et d'ions libres. Les ions en contact direct avec la surface sont presque adsorbés et ne pourront se mouvoir, créant ainsi une charge de surface. Une augmentation de la force ionique de la solution crée un écrantage des charges et diminue ainsi la barrière énergétique à franchir pour favoriser l'agrégation entre deux particules. De manière générale une valeur élevée pour ζ , tant négative que positive, est signe de stabilité.

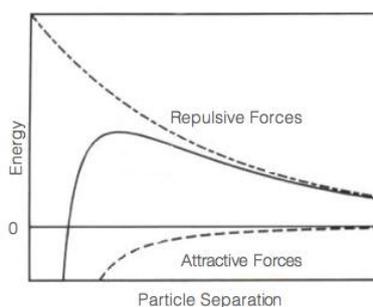


Figure 123 : Energie interne de nanoparticules en fonction de leurs distance respectives.

Certaines interactions, de type acide-base de Lewis ou stériques¹⁸², ne peuvent être modélisées par cette théorie bien qu'elles apportent un gain de stabilité supplémentaire important. En effet, il est alors nécessaire de considérer le solvant, majoritairement l'eau, comme jouant un rôle plus important que celui d'un simple milieu dispersant. Ces considérations ne seront toutefois pas développées dans le cadre de ce chapitre.

3.3.1.3 Notion de furtivité en condition physiologique

Après l'injection de nanoparticules dans le flux sanguin, une stabilité colloïdale des nanostructures est indispensable mais non suffisante. En effet, le système immunitaire va reconnaître ces objets comme des corps étrangers et chercher à les éliminer grâce au recrutement de macrophages, par adsorption préalable de protéines circulantes, les opsonines¹⁸³. Cette élimination est principalement réalisée par la voie hépatique ou rénale par le système réticuloendothélial (RES), réduisant le temps de circulation des nanoparticules dans le système sanguin à quelques minutes seulement.

Des groupes ionisés et chargés négativement comme des ions carboxylates ou chargés positivement comme des ions ammoniums permettent d'assurer une stabilité colloïdale sur une large gamme de pH et de force ionique. Les nanoparticules ainsi stabilisées sont toutefois inadaptées pour des applications *in vivo*, à cause de leur prise en charge comme agents étrangers ou pathogènes par le système RES. Afin de diminuer l'efficacité de ce processus de reconnaissance, des unités poly(éthylène glycol) (PEG), de tailles optimisées^{183,184}, sont greffées en surface des nano-objets, leur conférant ainsi un caractère furtif. Les chaînes PEG assurent non seulement une bonne mouillabilité

3.3/ Formation d'assemblages hybrides magnéto-fluorescents

des nanoparticules en solution aqueuse mais réduisent également les phénomènes d'opsonisation et inhibent le processus de phagocytose.

3.3.2 Greffage de nanoparticules d'oxyde de fer en surface de nanosphères

Préalablement à ce travail de thèse, le fluorophore fvln (1), mentionné au chapitre 1, avait permis de préparer des nanoassemblages magnéto-fluorescents grâce à la présence de fonctions nitriles au niveau du groupe dicyanovinylidène. Néanmoins, la faible cohésion entre la partie organique et la partie inorganique n'avait pas permis d'aboutir à des nanoassemblages colloïdalement stables pour des applications en bio-imagerie. Le recours à des fonctions acides phosphoniques ou carboxyliques connues pour interagir fortement avec les oxydes de fer nous a permis de résoudre ce problème de stabilité, tout en conservant la même approche.

3.3.2.1 *Formation in situ de nanoassemblages magnéto-fluorescents*

La nano-précipitation d'une solution composée de fpoh (13) ou de fdcooh (8) (50 μL , $[\text{Cm}] = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, THF) dans une solution de nanoparticules d'oxyde de fer ($[\text{Cm}] = 0,005 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 2,5 mL HNO_3 , $\text{pH} = 1,2$) a abouti à des nanoassemblages magnéto-fluorescents stables dont la taille est fonction de la concentration des deux solutions employées (Figure 124). Ces assemblages seront désormais notés (C)-fluo@mag ((P)-fluo@mag) pour un cœur constitué du composé fdcooh (8) (fpoh (13)).

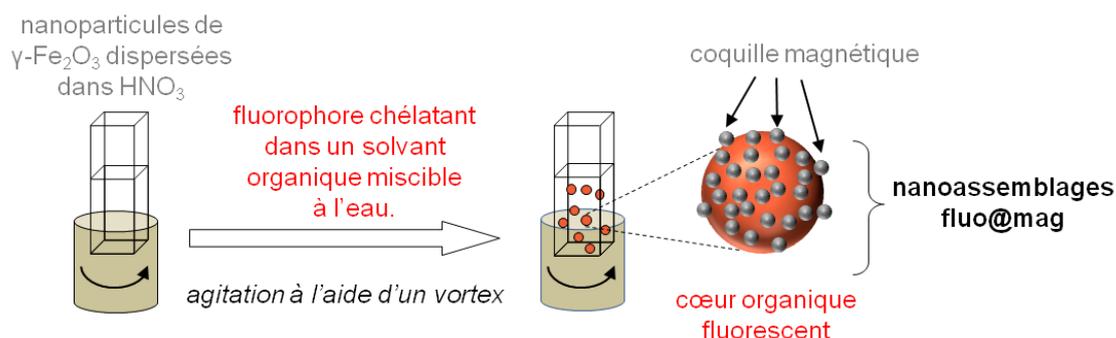


Figure 124 : Schéma de fabrication de nanoassemblages magnéto-fluorescents en une étape.

Quelle que soit la nature du groupe complexant, on observe bien une augmentation du diamètre hydrodynamique des nanosphères organiques, due au greffage en surface de nanoparticules d'oxyde de fer. L'augmentation est toutefois plus importante pour un cœur constitué de fdcooh (8) (Figure 125a) que pour un cœur constitué de fpoh (13) (Figure 125b), et a été attribuée à la protonation partielle des acides carboxyliques à pH acide.

Des clichés en microscopie électronique à transmission (Figure 125c-d) révèlent des structures semblables pour les deux types de nanoassemblages (cœur sphérique fluorescent @ coquille d'unités magnétiques), avec quelques nanoparticules d'oxyde de fer libres résiduelles.

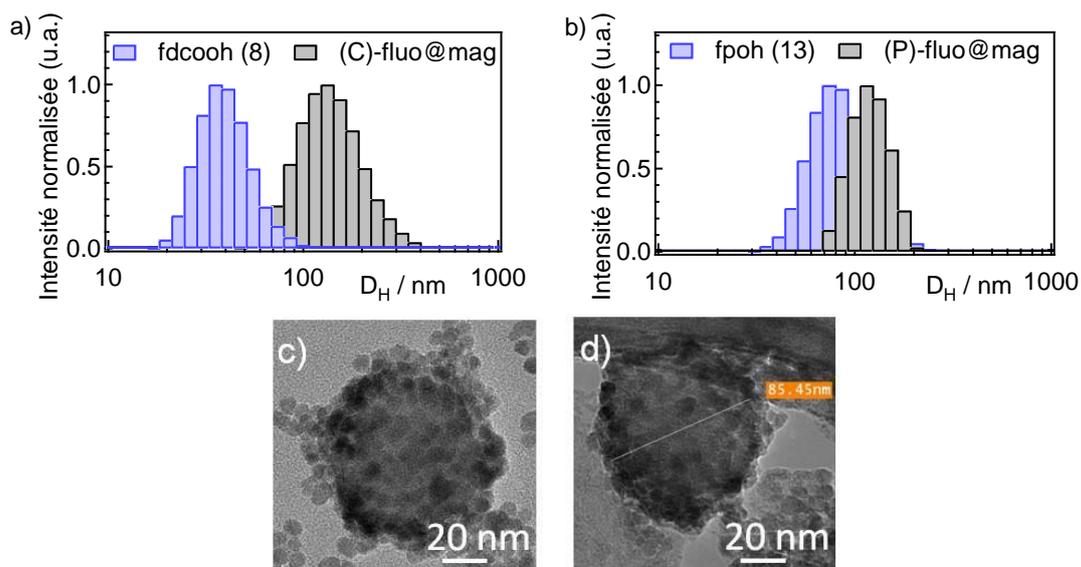


Figure 125 : Distribution du diamètre hydrodynamique moyen, mesuré par DLS, de nanoassemblages issus de la complexation de nanoparticules d'oxyde de fer dispersées dans l'acide nitrique par des nanosphères organiques constituées de a) fdcooh (8) ou de b) fpoh (13). Images TEM. c) (P)-fluo@mag et d) (C)-fluo@mag, déposés sur une grille support en or.

Peu de modifications du diamètre des nanoassemblages finaux ont été observées avec une augmentation de la concentration en nanoparticules d'oxyde de fer (Figure 126), contrairement à ce qui avait été obtenu lors de l'utilisation du composé fvin (1). Ce résultat peut s'expliquer par une cinétique de complexation plus rapide des oxydes de fer, comparée aux cinétiques des processus de diffusion et d'agrégation des nuclei. De manière surprenante, une forte augmentation du diamètre des nanoassemblages est observée pour des faibles concentrations en nanoparticules d'oxyde de fer, due à des phénomènes d'agrégation encore inexpliqués.

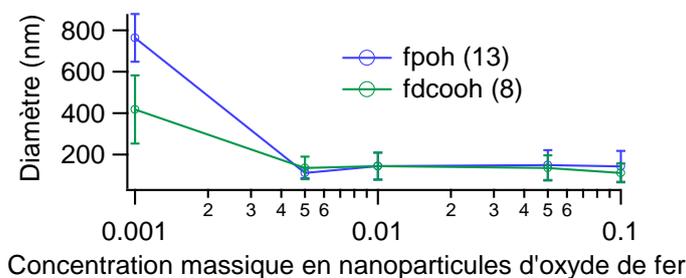


Figure 126 : Evolution du diamètre hydrodynamique moyen D_H avec la concentration en nanoparticules d'oxyde de fer en fonction de la nature du cœur organique.

3.3.2.2 Post-fonctionnalisation de nanosphères par des nanoparticules d'oxyde de fer

Nous avons également exploré la fabrication de nanoassemblages à partir de suspensions en milieu aqueux neutre de nanosphères et de nanoparticules d'oxyde de fer, stabilisées par des ions citrates. De cette manière, l'utilisation d'acide nitrique, incompatible avec des études en milieu vivant, est évitée. Comme les acides phosphoniques sont plus complexants que les acides carboxyliques, l'échange de ligands indispensable à la fabrication des objets fluo@mag sera thermodynamiquement favorisé. Deux étapes sont alors nécessaires. La première étape correspond à la formation de nanosphères organiques de taille déterminée ($[Cm] = 0,1 \text{ g.L}^{-1}$, 50 μL , fpoh (13), THF) par nano-précipitation dans de l'eau millipore (2,5 mL). Une deuxième étape de

3.3/ Formation d'assemblages hybrides magnéto-fluorescents

fonctionnalisation en surface de ces nanosphères est alors réalisée à l'aide d'un ferrofluide neutre stabilisé par des ions citrates ($[Cm] = 0,005 \text{ g.L}^{-1}$), générant ainsi les assemblages (P)-fluo@mag_citrate finalement stabilisés par des ions citrates en excès (Figure 127).

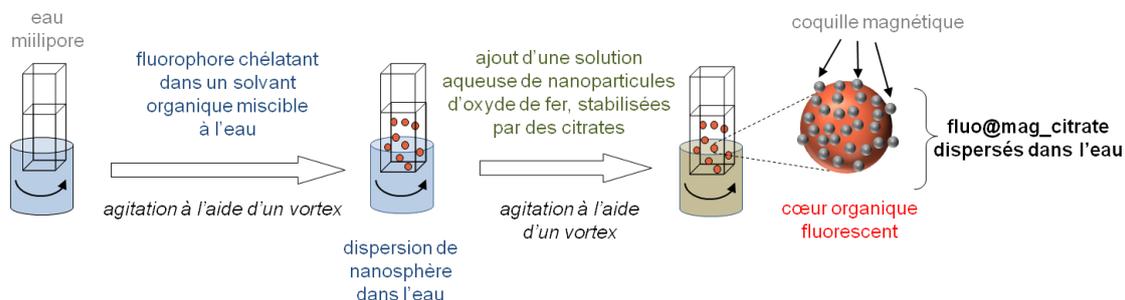


Figure 127 : Post-fonctionnalisation de nanosphères organiques chélatantes par échange de ligands avec des nanoparticules d'oxyde de fer stabilisées par des ions citrates.

En raison de la concentration élevée en ions citrates et du nombre réduit de fonctions acides phosphoniques disponibles, trois jours d'échanges s'avèrent nécessaires pour générer les nanoassemblages magnéto-fluorescents présentés ci-dessous. Une plus large distribution en taille est obtenue (Figure 128a), toujours centrée sur le diamètre hydrodynamique des nanosphères initiales. Cette hétérogénéité en taille est également observée par microscopie électronique à transmission (Figure 128b). Contrairement à l'élaboration de nanoassemblages en une étape, il a été impossible de contrôler la taille en faisant varier la concentration en ferrofluide. L'utilisation de nanoparticules d'oxyde de fer « nues », sans ligand complexant, permet d'éviter ce long phénomène d'échange, alors responsable de l'élargissement de la distribution en taille par pontage entre deux ou plusieurs nanoassemblages. De plus, le greffage continu de nanoparticules d'oxyde de fer à la surface des nanosphères entraîne au bout de quelques mois une agrégation et une sédimentation des (P)-fluo@mag_citrate.

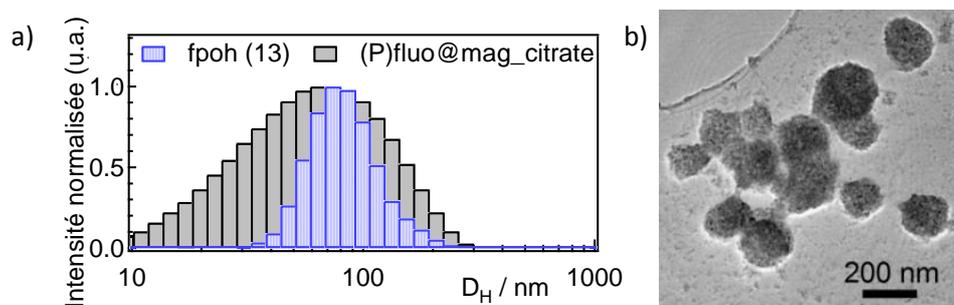


Figure 128 : a) Evolution du diamètre hydrodynamique, mesuré par DLS, lors de la post-fonctionnalisation de nanosphères par des nanoparticules d'oxyde de fer et b) observation par MET.

La cinétique d'échange de ligands à la surface des nanosphères entre les acides phosphoniques et les ions citrates a pu être approchée par microscopie électronique à transmission. Des clichés ont été enregistrés après 1 h, 24 h, et 1 mois de mise en contact des nanosphères et des nanoparticules. En suivant les mêmes conditions opératoires et en l'absence d'agitation, un mois se révèle nécessaire pour obtenir une couverture complète des nanosphères par des nanoparticules d'oxyde de fer (Figure 129).

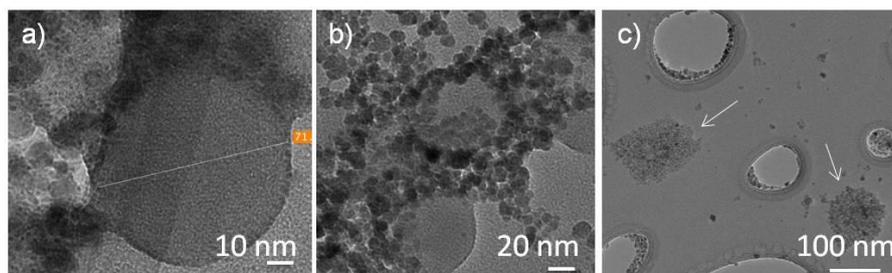


Figure 129 : Suivi de la fonctionnalisation de la surface des nanosphères organiques par des nanoparticules d'oxyde de fer citratées en fonction du temps par TEM. Clichés réalisés après a) 1h, b) 24h et c) 1 mois d'échange.

La cohésion des nanoassemblages a été mise en évidence grâce à un aimant (0,5 mT) et un suivi par microscopie optique de fluorescence, après excitation à 488 nm et observation vers 600 nm. Lorsqu'un aimant est approché d'une goutte de solution de (P)-fluo@mag_citrate, des lignes fluorescentes se forment parallèlement à la direction du champ magnétique. Le retrait de la sollicitation magnétique entraîne aussitôt une redispersion par agitation brownienne. Pour comprendre cette organisation magnéto-induite, nous avons laissé sécher une goutte de solution de nanoassemblages dispersés dans l'acide nitrique en présence d'un champ magnétique statique. Des clichés en microscopie électronique à balayage (MEB) montrent des microfils, d'une quinzaine de micromètres au plus proche de l'aimant (Figure 130). Un éloignement de l'aimant conduit à des microfils de plus en plus courts, de 0,8 μm . De manière inattendue, tous les microfils présentent un diamètre constant de 380 ± 40 nm, quelle que soit la position de l'aimant.

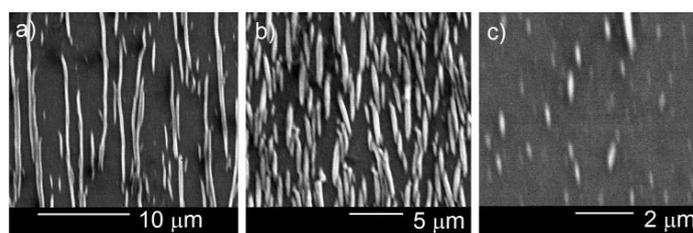


Figure 130 : Images de microscopie électronique à balayage (MEB) de microfils en fonction de l'éloignement de l'aimant, pour une même goutte de a) à c).

3.3.2.3 Etude d'extinction de fluorescence en présence de nanoparticules d'oxyde de fer

Nous pouvons maintenant nous demander si les nanoparticules d'oxyde de fer affectent l'émission des nanosphères fluorescentes. Nous avons donc préparé des nanosphères par nanoprecipitation ($[\text{Cm}] = 0,1 \text{ g.L}^{-1}$, 50 μL , THF) dans de l'acide nitrique (2,5 mL, pH = 1,2) et ajouté des incréments successifs de ferrofluide ($[\text{Cm}] = 0,1 \text{ g.L}^{-1}$, HNO_3 , pH = 1,2), réalisant ainsi un dosage de nanosphères par les nanoparticules d'oxyde de fer. Un suivi par spectroscopie d'absorption et d'émission a permis d'estimer le nombre de nanoparticules de maghémite complexées, connaissant le diamètre des nanoparticules, la densité et la concentration massique des nanoparticules de maghémite. Une analyse parallèle par spectrométrie de masse, détaillée par la suite, nous a permis d'estimer le nombre de nanosphères par millilitre et de pouvoir ainsi rapporter le nombre d'équivalents de nanoparticules d'oxyde de fer (NPs) ajoutées au nombre de nanosphères présentes en solution.

Pour les (P)-FON, deux régimes sont notés au niveau de l'absorption, une diminution puis une augmentation de l'absorbance de la bande à transfert de charge, propre aux entités organiques de la

3.3/ Formation d'assemblages hybrides magnéto-fluorescents

nanosphère (Figure 131a). En revanche, les spectres d'émission présentent une diminution continue de l'intensité émise au fur et à mesure des ajouts (Figure 131b).

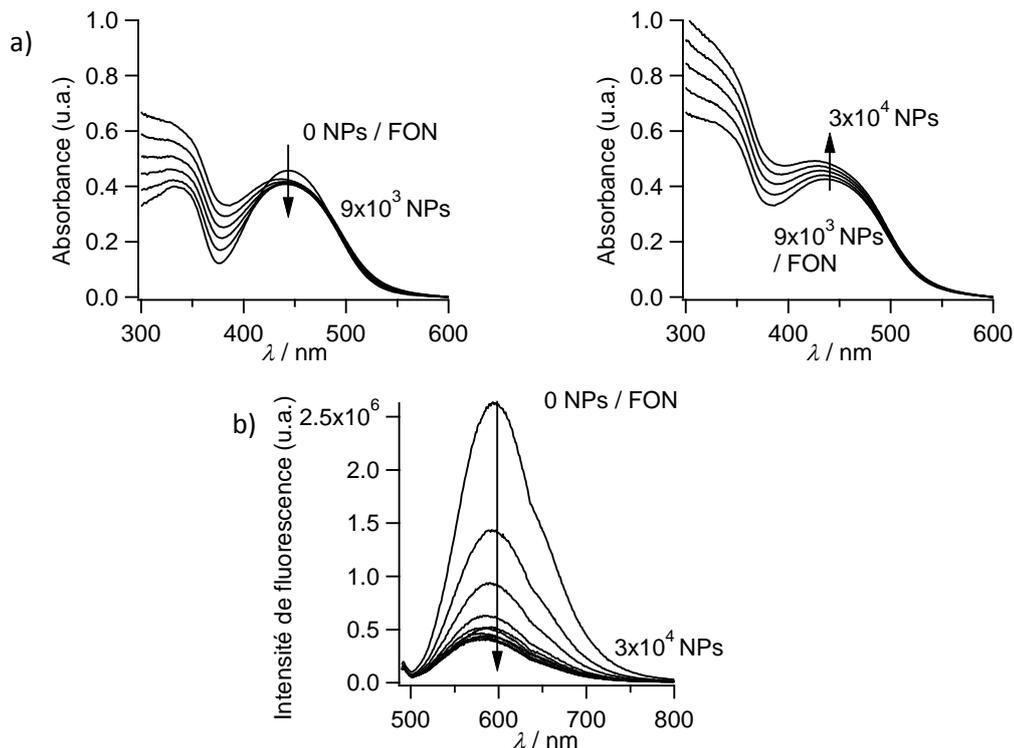


Figure 131 : a) Spectres d'absorption en fonction du nombre de nanoparticules d'oxyde de fer stabilisées dans l'acide nitrique avant et après le palier de 9000 nanoparticules d'oxyde de fer par nanosphère de fpoh (13). b) Evolution des spectres d'émission après excitation à 450 nm (non corrigés de la réponse du détecteur) dans les mêmes conditions. (1,3 ; 1,9 ; 3,7 ; 5,6 ; 7,4 ; 9,3 ; 11 ; 13 ; 15 ; 17 ; 35 $\cdot 10^3$ nanoparticules par nanosphère).

Pour (C)-FON, une évolution monotone tant de l'absorption (augmentation) que de l'émission (diminution) est observée lors de l'ajout de nanoparticules d'oxyde de fer (Figure 132).

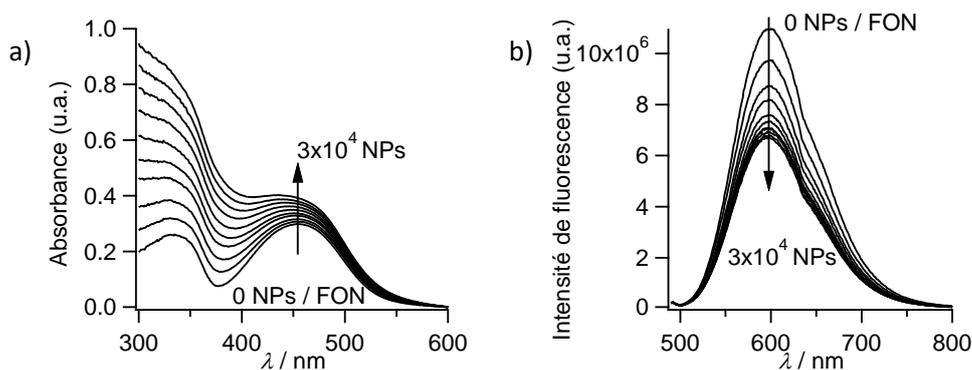


Figure 132 : a) Spectres d'absorption d'une suspension de (C)-FON en fonction de l'ajout du nombre de nanoparticules d'oxyde de fer stabilisées dans l'acide nitrique. c) Evolution des spectres d'émission, après excitation à 450 nm (non corrigés de la réponse du détecteur) dans les mêmes conditions. (1,3 ; 1,9 ; 3,7 ; 5,6 ; 7,4 ; 9,3 ; 11 ; 13 ; 15 ; 17 ; 35 $\cdot 10^3$ nanoparticules par nanosphère).

Comme exposé au chapitre précédent, nous avons suivi l'écart à l'idéalité Y entre la valeur théorique et la valeur expérimentale de l'absorbance en fonction du nombre de nanoparticules ajoutées par nanosphère. Dans le cas d'un cœur constitué de fpoh (13), cet écart évolue jusqu'à environ 10 000 nanoparticules par nanosphère puis demeure constant (Figure 133a). Le suivi du

rapport A_0/A ou I_0/I met également en évidence ce même constat : environ 10 000 nanoparticules sont nécessaires pour éteindre la surface des nanosphères composés de fpoh (13) (Figure 133b-c).

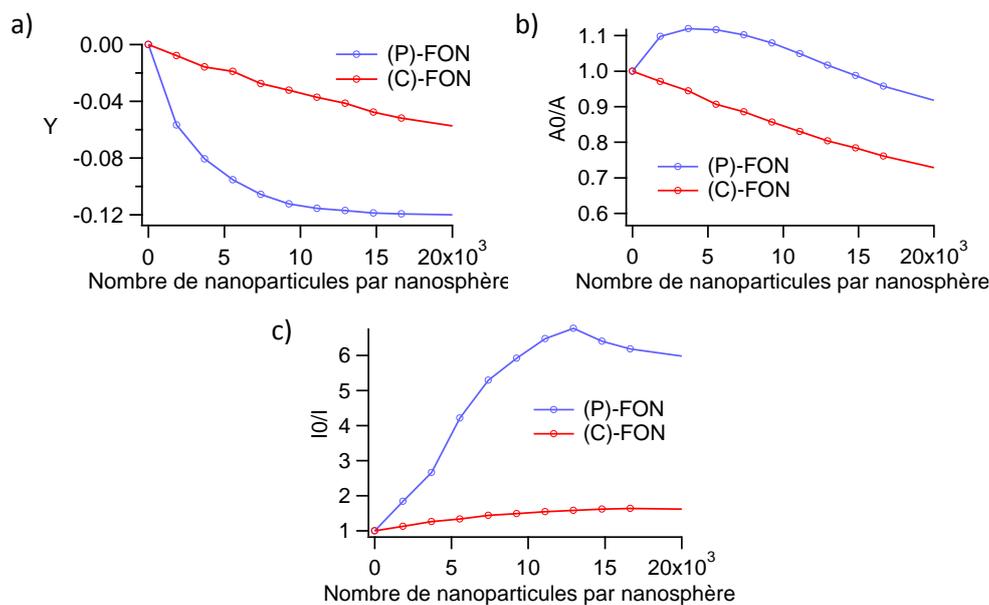


Figure 133 : Evolution de a) l'écart (Y) entre les absorbances théoriques, sans interaction, et expérimentales, b) l'absorbance normalisée par la quantité de matière initialement présente, et c) l'émission normalisée par la quantité de matière initialement présente.

Ces comportements d'extinction sont à rapprocher de ceux analysés au chapitre 2 entre un fluorophore et des sels métalliques en solution. Nous les avons attribués à une réaction de transfert d'électron oxydant à l'état excité de la partie amine vers les ions fer (III). Ce processus étant très sensible à la distance, quelques nanomètres au maximum, seule une monocouche de nanoparticules, d'environ 7 nm de diamètre, à la surface des nanosphères pourra générer cette extinction de fluorescence. Ces mesures représentent ainsi un moyen simple pour obtenir un ordre de grandeur du nombre de nanoparticules d'oxyde de fer greffées sur la surface des (P)-fluo@mag.

Un comportement différent a malgré tout été obtenu pour les (C)-FON et a été attribué à la protonation des fonctions acides carboxyliques en solution, offrant probablement une constante de complexation moins importante. Ce résultat s'oppose à celui obtenu pour des solutions d'ions métalliques où contre toute attente, les (C)-FON complexaient mieux les ions fer (III) que les P-(FON) (partie 3.2.4.1).

3.4 Stabilisation colloïdale d'assemblages hybrides

Grâce à la synthèse de fluorophores complexants et après optimisation des conditions expérimentales, nous avons pu élaborer des nanoassemblages magnéto-fluorescents avec un lien cœur-coquille stable. Malgré tout, deux problèmes restent entiers. Le premier problème réside dans l'utilisation de l'acide nitrique qui dégrade le fluorophore, et le deuxième souci est lié à l'agrégation des nanoassemblages dès qu'ils sont transférés en milieu aqueux neutre.

3.4.1 Utilisation de petites molécules chargées

L'utilisation des ions citrates a été envisagée pour stabiliser les nano-objets préalablement formés en une étape dans l'acide nitrique. Expérimentalement, l'acide nitrique est éliminé par dialyse (seuil de coupure de 8-10 KDa) en présence d'une solution aqueuse de citrate de sodium (50 mM) (Figure 134). Plusieurs heures de dialyse en présence d'ions citrates permettent de neutraliser le pH de la suspension des nanoassemblages et favorisent la substitution des ions nitrates par les ions citrates. Une dernière dialyse sur deux jours en présence d'eau millipore permet d'éliminer l'excès d'ions citrates utilisés, et une dispersion de fluo@mag@citrate est obtenue en milieu neutre.

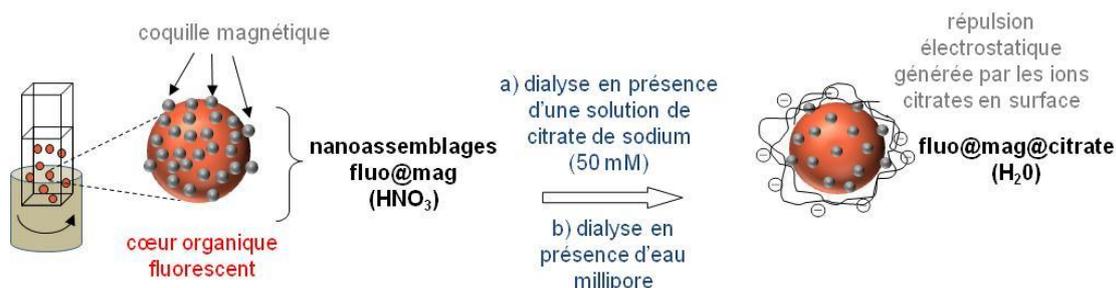


Figure 134 : Stabilisation de fluo@mag dispersées dans l'acide nitrique par des ions citrates en milieu neutre.

3.4.1.1 Stabilisation à l'aide de citrate de sodium

La force de complexation du ligand stabilisant est un paramètre primordial à contrôler. En effet, la stabilité du lien cœur – coquille doit être supérieure à la stabilité du lien coquille – ligand afin d'éviter un relargage des nanoparticules d'oxyde de fer dans le milieu environnant. L'influence de la force du lien cœur-coquille a été étudiée en utilisant un cœur composé de fpoh (13) ou de fdcooh (8) ([Cm] = 0,1 g.L⁻¹, 50 μL, THF), nano-reprécipité dans une solution de nanoparticules d'oxyde de fer ([Cm] = 0,005 g.L⁻¹, HNO₃, pH = 1,2). La dispersion de nanoassemblages est alors dialysée en présence de citrate de sodium (50 mM) pendant 24 h, puis en présence d'eau millipore pendant 48 h.

Dans le cas d'un cœur composé de fpoh (13), la présence de (P)-fluo@mag@citrate dispersés mais aussi agrégés est observée (Figure 135), probablement suite au caractère plus complexant de fpoh, conduisant à un pontage entre nanoassemblages par réduction de l'interaction électrostatique maghémite / citrate et donc de leur potentiel de surface.

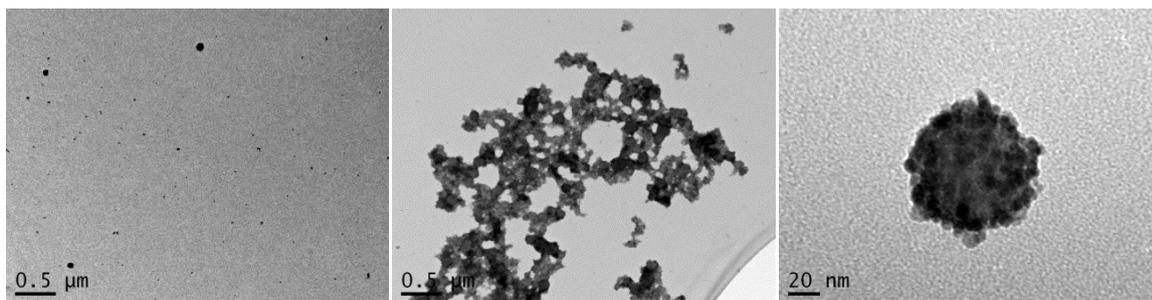


Figure 135 : Images MET de (P)-fluo@mag@citrate, dispersés dans l'eau millipore.

Pour un cœur fdcooh (8), une dispersion stable de (C)-fluo@mag@citrate est observée en milieu aqueux à pH neutre (Figure 136a). La distribution en taille des nanoassemblages avant stabilisation (C)-fluo@mag, et après stabilisation (C)-fluo@mag@citrate, n'est pas modifiée. La présence de petites molécules hydrophiles en surface ne modifie donc pas de façon significative le diamètre hydrodynamique moyen des nanoassemblages (Figure 136b).

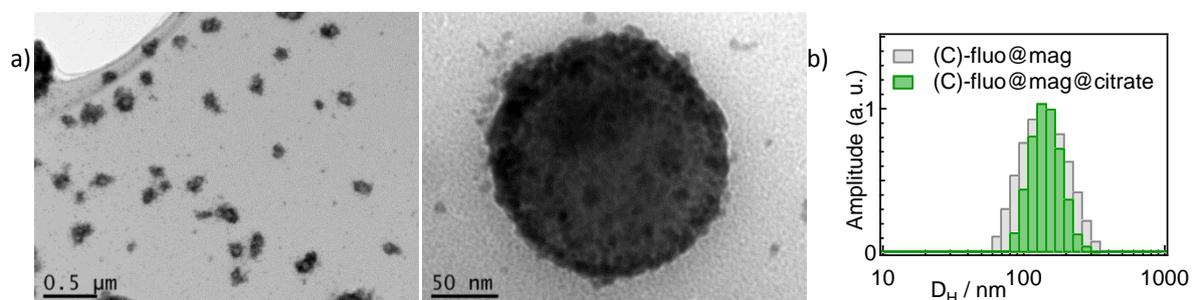


Figure 136 : a) Images MET de (C)-fluo@mag@citrate, dispersés dans l'eau millipore. b) Mesure DLS de la distribution en taille avant et après stabilisation par une couche d'ions citrates.

Au bout d'un mois, on remarque que la quantité de nanoparticules d'oxyde de fer libres, non greffées à la surface des nanoassemblages a diminué, au profit de nanoassemblages plus denses en maghémite (Figure 137).

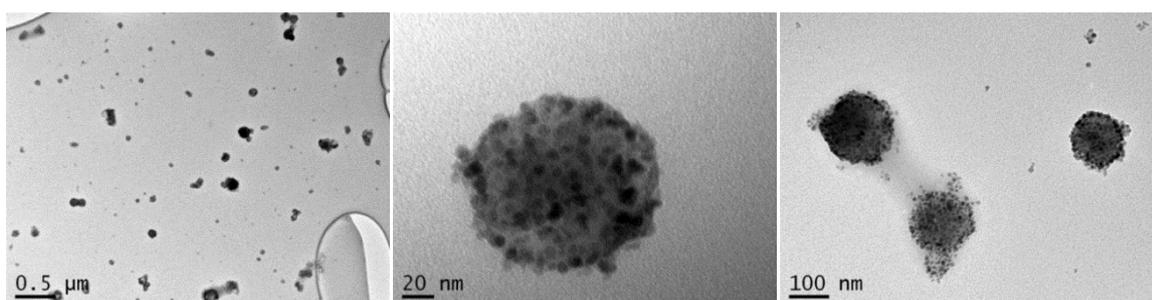


Figure 137 : Images MET de (C)-fluo@mag@citrate après 1 mois, dispersés dans l'eau millipore.

Après 3 mois, un relargage des nanoparticules d'oxyde de fer a été observé, comme le montrent les « bavures » autour des nanoassemblages (Figure 138).

3.4/ Stabilisation colloïdale d'assemblages hybrides

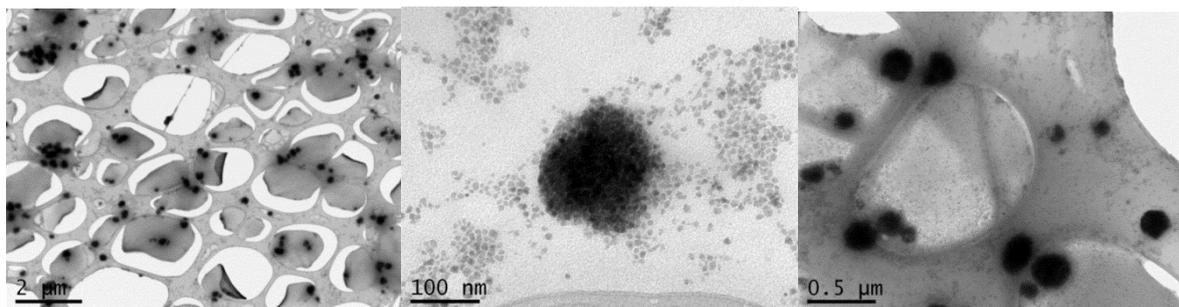


Figure 138 : Images MET de (C)-fluo@mag@citrate après 3 mois, dispersés dans l'eau millipore.

Ce relargage provient d'un échange dynamique d'ions citrate en surface en raison de stabilités similaires des liens cœur-coquille et coquille-ligand. Le relargage de nanoparticules d'oxyde de fer est confirmé par diffusion dynamique de la lumière après 5 mois, montrant une légère diminution du diamètre hydrodynamique moyen, d'environ 130 nm à 120 nm (Figure 139).

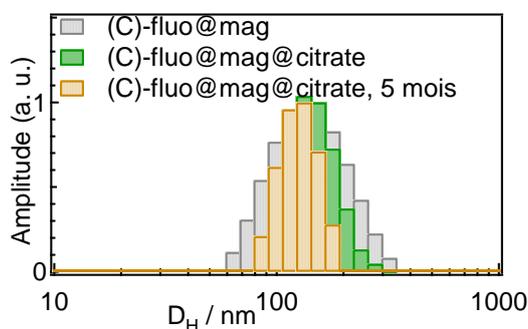


Figure 139 : Evolution du diamètre hydrodynamique, mesuré par DLS, de (C)-fluo@mag@citrate en fonction du temps.

3.4.1.2 Stabilisation à l'aide de petites molécules fluorescentes

L'utilisation d'une petite molécule fluorescente complexante telle que l'acide folique (FA, Figure 140a), comportant des unités acides carboxyliques, représente un moyen astucieux pour mettre en évidence le processus d'échange de ligands en surface des nanoassemblages.

Dans une première expérience, la fonctionnalisation des nanoparticules de maghémite a été réalisée par simple ajout d'acide folique (solide, quelques milligrammes) à une solution de ferrofluide dans l'acide nitrique. L'augmentation du pH jusqu'à une valeur proche de 9 conduit à une déprotonation des acides carboxyliques, facilitant ainsi la complexation des nanoparticules d'oxyde de fer et neutralisant l'acide nitrique par la même occasion. Une étape de dialyse permet d'éliminer l'acide folique, ajouté en excès, et est poursuivie jusqu'à ce que les eaux de lavages ne soient plus fluorescentes. Afin d'obtenir une dispersion colloïdalement stable, une dialyse en présence de citrate de sodium (50 mM) est réalisée, puis en présence d'eau millipore pour éliminer les citrates non complexés. Dans une seconde expérience, l'acide folique a été ajouté à une dispersion de (P)-fluo@mag, préalablement préparés dans l'acide nitrique. Selon le même protocole que précédemment, une dispersion (P)-fluo@mag@FA en milieu neutre a ainsi été obtenue.

L'étude des spectres d'absorption (Figure 140a) confirme la présence d'acide folique sur les assemblages mag@FA et (P)-fluo@mag@FA puisque l'absorbance caractéristique de l'acide folique, dans le domaine des UV, augmente.

Pour les nanoparticules mag@FA, en solution aqueuse, le spectre d'émission après excitation à 350 nm est identique à celui de l'acide folique libre (Figure 140b), bien que très faible en termes

d'intensité comme le montre la présence de la bande de vibration Raman de l'eau. Pour les assemblages (P)-fluo@mag@FA, une excitation à 350 nm fournit une faible émission bleue. Deux raisons peuvent expliquer la faible amplitude de cette émission de fluorescence. La première explication repose sur une absorption compétitive de l'excitation par le cœur organique fluorescent, relaxant avec une émission centrée à 620 nm. La deuxième explication implique un phénomène de transfert d'énergie de type Förster (FRET) où l'émission générée par l'acide folique, centrée à 440 nm, est ré-absorbée par le cœur organique, émettant quant à lui à 620 nm.

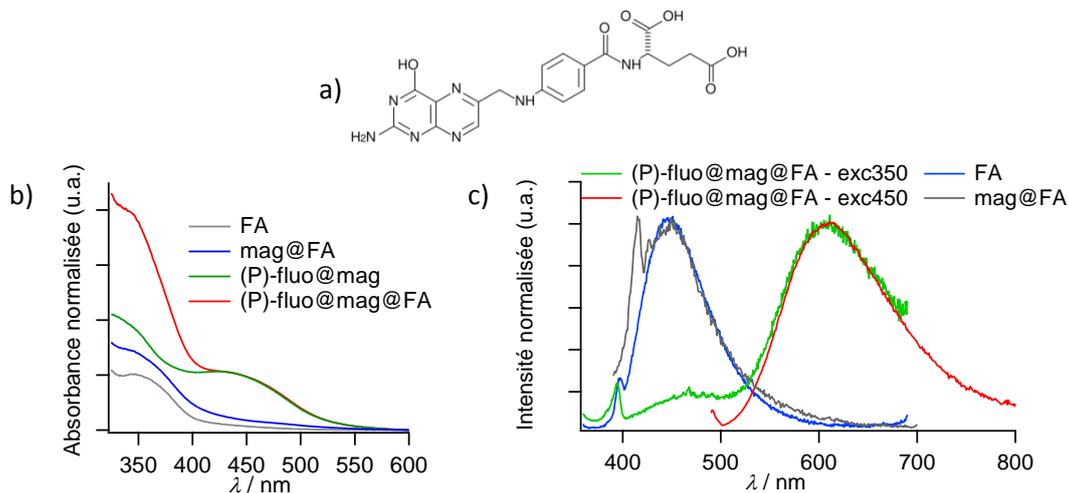


Figure 140 : Spectres normalisés b) d'absorption et c) d'émission de nanoassemblages stabilisés par a) l'acide folique (FA).

Afin de mieux comprendre les interactions en présence, des études photophysiques de fluorescence résolue en temps, après excitation à 365 nm, permettent d'analyser avec précision la modification de l'environnement des fluorophores FA lors de leur complexation à des nanoparticules. La modélisation du déclin de fluorescence pour l'acide folique dissous dans l'eau nécessite l'utilisation d'un modèle biexponentiel. On obtient une constante de temps longue τ_1 (8,63 ns) responsable de l'émission de la forme libre et une composante courte τ_2 (0,73 ns) probablement due à la présence de molécules agrégées entre elles ($f_2 = 0,06$) par interactions hydrophobes ou par liaisons hydrogène intermoléculaires.

Au vu de la faible fluorescence observée précédemment en spectrofluorimétrie, une chute importante du déclin doit être observée dans le cas d'une extinction dynamique. Seule une légère diminution de la contribution de la composante courte τ_2 , de 0,06 à 0,03 est observée. Nous pouvons alors supposer que l'émission de fluorescence détectée provient uniquement des molécules libres qui sont relarguées de la surface, en faible quantité, suite au phénomène d'échange dynamique des ions citrates assurant la stabilité de l'assemblage. Les analyses de fluorescence résolue en temps s'avèrent ainsi indispensables pour comprendre les interactions à l'interface entre les deux domaines, l'eau et les oxydes de fer.

Pour les nanoassemblages (P)-fluo@mag@FA, une diminution significative de la vitesse du déclin de fluorescence de l'acide folique a été observée, issue d'une proportion plus importante de la composante de temps courte τ_2 ($f_2 = 0,30$ contre 0,06 pour les nanoparticules mag@FA). Il est ainsi possible d'attribuer cette augmentation à un accroissement du nombre d'unités acide folique greffées en plus grand nombre à la surface des nanoassemblages hybrides (P)-fluo@mag@FA du fait de leur plus grande taille. La présence de la constante de temps longue τ_1 confirme bien également

3.4/ Stabilisation colloïdale d'assemblages hybrides

un relargage des unités acide folique. Nous pouvons également noter que l'émission de fluorescence du cœur organique n'est pas impactée par ces phénomènes intervenant en surface puisqu'une émission est bien observée après excitation à 470 nm.

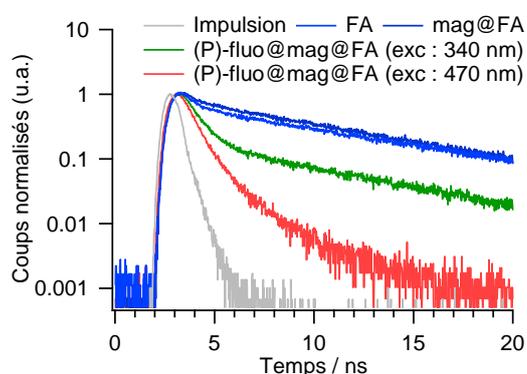


Figure 141 : Déclins de fluorescence enregistrés à 450 nm (580 nm) après excitation à 365 nm (470 nm) de (P)-fluo@mag@FA ainsi que des différents modèles (déclins enregistrés sur le système quanta-tau, Hamamatsu, équipé de LED et non décrit dans la partie expérimentale).

	τ_i (fs)	χ^2
Acide folique (FA)	8,63 (0,94), 0,73 (0,06)	1,07
mag@FA	7,98 (0,97), 0,69 (0,03)	1,06
(P)-fluo@mag@FA	7,40 (0,70), 0,74 (0,30)	1,12

Tableau 20 : Modélisation des déclins de fluorescence enregistrés à 450 nm après excitation à 365 nm par une fonction biexponentielle.

$$I(t) = \sum_i a_i \times \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \text{ avec } f_i = \frac{a_i \times \tau_i}{\sum_j a_j \times \tau_j}$$

L'utilisation de petites molécules comme agents stabilisants nous a permis d'obtenir les premiers systèmes magnéto-fluorescents, stables en milieu neutre dans le cas de (C)-fluo@mag@citrate, grâce à l'utilisation de petites molécules stabilisantes comme les ions citrates. Toutefois, l'utilisation de sondes fluorescentes, l'acide folique, a mis en évidence un relargage des molécules complexantes présentes en surface de ces assemblages. En effet, quelques jours à température ambiante suffisent pour observer une fluorescence bleue intense, signifiant la présence de fluorophores non liés aux nanoparticules d'oxyde de fer, comme présenté sur les spectres d'émission suivants (Figure 142).

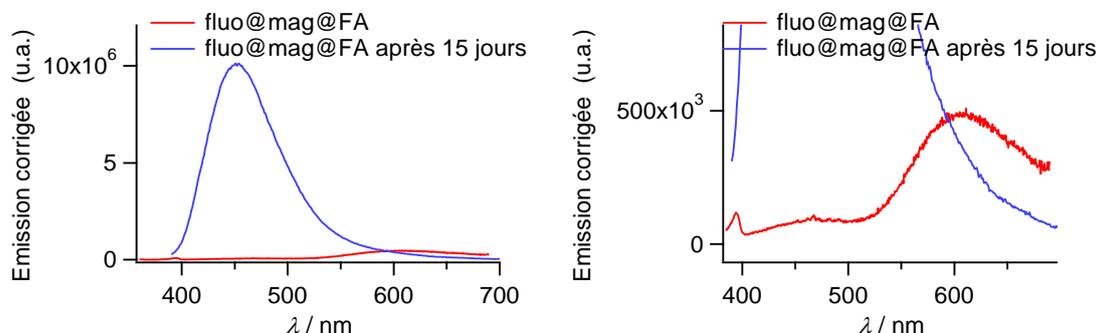


Figure 142 : Spectres d'émission de (P)-fluo@mag@FA directement après formation et après 15 jours à température ambiante (zoom présenté à droite).

3.4.2 Utilisation d'un polyélectrolyte

L'utilisation de petites molécules complexantes ne semble pas être suffisamment efficace pour stabiliser un nanoassemblage au cours du temps, suite à des phénomènes d'échange dynamique en surface. Deux solutions peuvent accroître la force du lien coquille–ligand. La première possibilité consiste à utiliser un ligand possédant une constante de complexation plus importante, non réalisable dans notre cas en raison du risque de décrochage des nanoparticules d'oxyde de fer du cœur fluorescent. Cette possibilité avait été envisagée mais nécessiterait de remplacer la fonction acide phosphonique du fluorophore par une unité HBP pour renforcer le lien cœur-coquille et éviter le décrochage des nanoparticules par un ligand plus complexant que les ions citrates. La synthèse de ce composé s'est malheureusement révélée infructueuse. La deuxième possibilité vise à utiliser un polyélectrolyte, possédant un grand nombre de sites de fixation. Ainsi, même si quelques unités ne sont plus coordonnées, le polyélectrolyte reste greffé à la surface grâce aux autres entités présentes sur la chaîne. De plus, la présence d'un grand nombre d'unités chargées par macromolécule permet d'améliorer la stabilité colloïdale des assemblages par répulsion électrostatique.

3.4.2.1 Stabilisation colloïdale de l'assemblage fluo@mag

Le choix du polyélectrolyte s'est porté sur un acide polyacrylique (PAA) de petite masse molaire (environ 2 kDa), en raison de la présence de fonctions complexantes de type acide carboxylique et de sa biocompatibilité^{7,185}.

Les nanoassemblages fluo@mag sont alors préparés comme habituellement à partir d'une solution mère de composé organique (50 μL , $[\text{Cm}] = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, THF) reprécipitée dans une solution acide de nanoparticules d'oxyde de fer ($[\text{Cm}] = 0,005 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, HNO_3 pH = 1,2), sous agitation. Quelques milligrammes de PAA (2,1 kDa) sont alors ajoutés ainsi qu'une goutte d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH , 25 %) pour atteindre un pH d'environ 12. La stabilité des fluo@mag est alors assurée en milieu basique grâce aux ions carboxylates du PAA. Aucun agrégat de nanoparticules d'oxyde de fer n'a été observé. Ces dispersions sont finalement dialysées (8-10 kDa) en présence d'eau millipore pour éliminer l'excès de PAA utilisé et obtenir une dispersion stable en milieu neutre.

La réalisation d'une couverture de PAA sur un nanoassemblage (C)-fluo@mag ne conduit pas à une dispersion et à une stabilisation aussi efficaces que celles obtenues avec des ions citrates, dues à une force de complexation du PAA probablement supérieure à celle des nanosphères de fdcooh (8). La présence de plusieurs entités carboxyliques par PAA augmente la constante de complexation globale des macromolécules et entraîne un relargage des nanoparticules d'oxyde de fer (Figure 143).

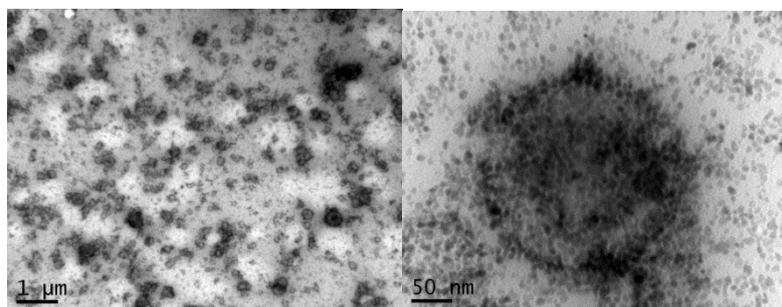


Figure 143 : Images MET de (C)-fluo@mag@PAA, dispersés en milieu neutre.

3.4/ Stabilisation colloïdale d'assemblages hybrides

A l'opposé, l'utilisation d'un cœur de fpoH (13) génère des nanoassemblages (P)-fluo@mag@PAA très stables, où la constante de complexation cœur-coquille apparaît plus élevée que celle entre la coquille et le polyélectrolyte. On observe toutefois sur les images MET suivantes (Figure 144) la présence de nanoparticules d'oxyde de fer libres, non agrégées, qui nécessite d'être éliminées.

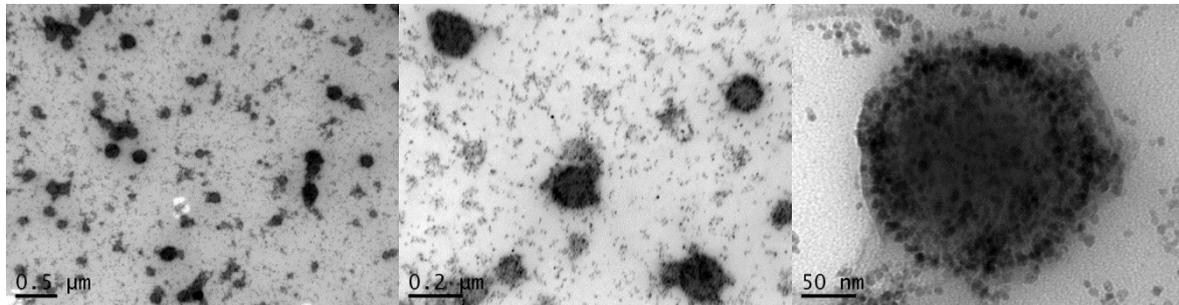


Figure 144 : Images MET de (P)-fluo@mag@PAA, dispersés en milieu neutre.

Une optimisation de la procédure expérimentale a permis de réduire considérablement le nombre de nanoparticules d'oxyde de fer libres en solution. Pour cela, l'ajout de base, NH_4OH , a été réalisé en utilisant une solution diluée (1 M) pour favoriser une cinétique progressive de complexation. De plus, avant l'étape de purification par dialyse, la dispersion de nanoassemblages a été agitée à température ambiante pendant 30 min afin d'aboutir à une complexation efficace de l'ensemble des nanoparticules d'oxyde de fer comme observé par MET sur les images suivantes (Figure 145).

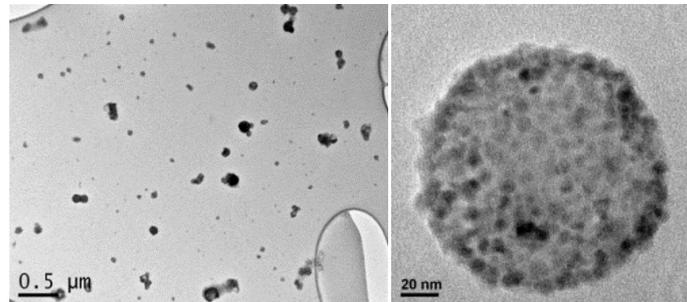


Figure 145 : Images MET de (P)-fluo@mag@PAA préparés par ajout de NH_4OH dilué (1M), sous agitation.

Une analyse par MET a également été réalisée 1 mois après la formation des nanoassemblages et stockage en solution aqueuse à température ambiante, sans précaution particulière. Seulement quelques nanoparticules d'oxyde de fer libres sont encore présentes (Figure 146).

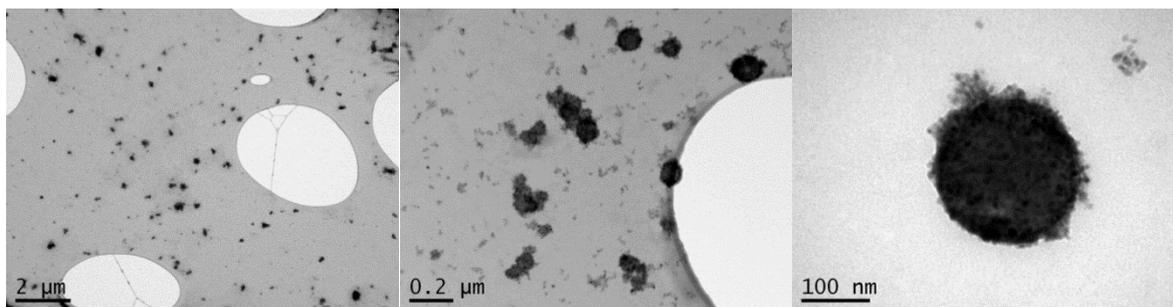


Figure 146 : Images MET de (P)-fluo@mag@PAA après 1 mois, dispersés en solution aqueuse à pH neutre.

3.4.2.2 Influence de la taille du polyélectrolyte

La constante de complexation globale du polyélectrolyte dépend de son nombre d'unités complexantes. En présence d'un nombre élevé d'unités complexantes, on risque d'entraîner un phénomène de relargage des nanoparticules d'oxyde de fer de la surface vers le milieu environnant. De plus, des polyélectrolytes à longue chaîne peuvent ponter plusieurs nanoassemblages et ainsi favoriser une agrégation. Ces deux phénomènes ont été mis en évidence grâce à la stabilisation des (P)-fluo@mag@PAA par des polyélectrolytes de taille variable. Pour un polyélectrolyte de longueur légèrement plus faible (1,7 KDa) que celui initialement utilisé (2,1 KDa), aucune différence significative n'est notée (Figure 147a). Pour un polyélectrolyte de longueur de chaînes environ 10 fois plus élevée (15 KDa), des agrégats sont formés (Figure 147b). Enfin, pour des polyélectrolytes très longs (100 KDa), les nanoassemblages sont totalement détruits (Figure 147c).

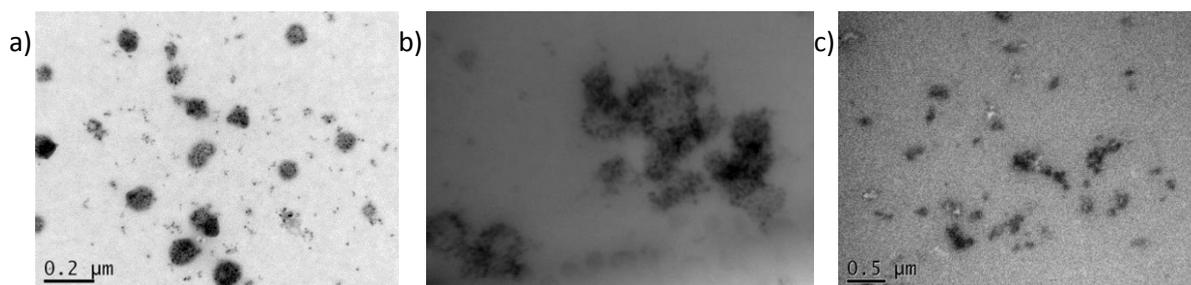


Figure 147 : Images MET après stabilisation de nanoassemblages (P)-fluo@mag par de l'acide polyacrylique de taille différentes. a) 1,7 kDa, b) 15 kDa, et c) 100 kDa. L'étape de dialyse n'a pas pu être effectuée en raison des seuils de coupures non adaptés des membranes de dialyse utilisées.

L'utilisation d'un polyélectrolyte composé d'ions sulfonates et donc négativement chargé, abouti aux mêmes résultats que ceux obtenus avec du PAA. Ces essais ont été réalisés avec du PSS (polystyrène sulfonate de sodium) de masse molaire égale à 70 KDa. Les chaînes relativement longues ne parviennent pas à stabiliser les nanoassemblages individuellement mais tendent à les agréger. De plus, l'excès de polyélectrolyte, visible par MET, n'a pas pu être éliminé par dialyse (Figure 148).

3.4/ Stabilisation colloïdale d'assemblages hybrides

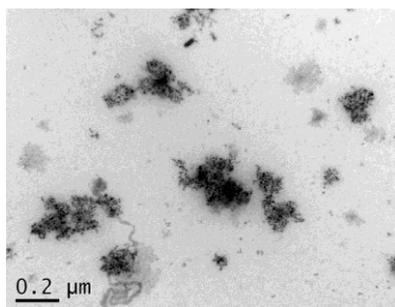


Figure 148 : Images MET après stabilisation de nanoassemblages (P)-fluo@mag avec un polyélectrolyte constitué de polystyrène de sulfonate (70 kDa).

L'utilisation de polyélectrolytes composés d'acide polyacrylique a donc permis de stabiliser colloïdalement les nanoassemblages mais également d'accentuer leur stabilité structurale. En effet, alors que l'application d'ultrasons détruisait les nanoassemblages élaborés précédemment, les (P)-fluo@mag@PAA demeurent intacts et sont considérés comme les nanoassemblages de choix pour toutes les applications de bio-imagerie prévues.

3.4.2.3 Caractérisation de la couche stabilisante

Classiquement, des études de thermogravimétrie sont réalisées pour caractériser et quantifier la quantité de ligands organiques fonctionnalisant la surface de nanoparticules inorganiques. Dans notre cas, les échantillons sont trop dilués pour obtenir des résultats cohérents.

Nous avons donc eu recours à des études de spectroscopie infrarouge, fournissant des informations sur la nature des fonctions chimiques présentes au sein de cet objet. Après lyophilisation (voir partie suivante) et dispersion de l'échantillon dans une matrice de bromure de potassium, le spectre IR présente deux bandes à 1715 cm^{-1} et 1559 cm^{-1} . Par comparaison avec le spectre IR de PAA seul présentant une seule bande à 1715 cm^{-1} , nous pouvons raisonnablement attribuer la bande de vibration de plus basse énergie aux acides complexés sur la surface des nanoassemblages, et celle à de plus haute énergie aux acides libres, responsables de la stabilité des assemblages en solution (Figure 149).

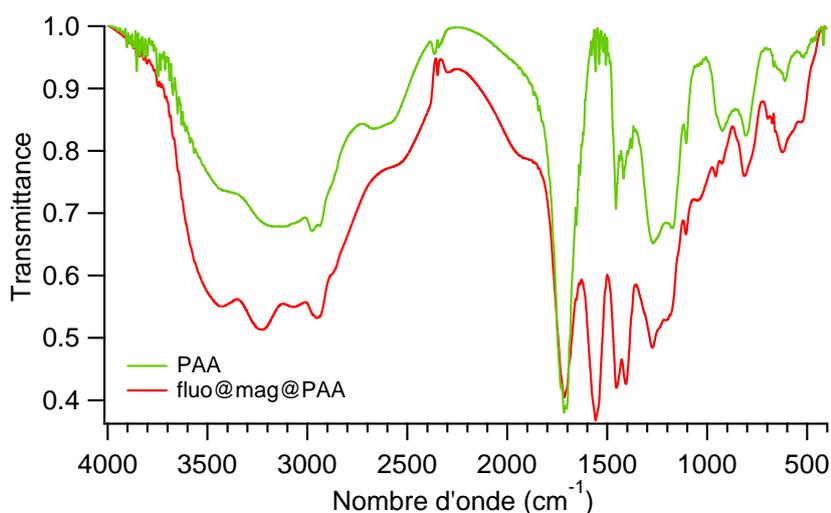


Figure 149 : Spectres infrarouge de (P)-fluo@mag@PAA, comparé au polyélectrolyte utilisé (PAA).

3.4.2.4 Lyophilisation, stockage et stabilité

Le suivi temporel de la distribution en taille des nanoassemblages (P)-fluo@mag@PAA met en évidence une stabilité colloïdale sur plusieurs mois (Figure 150). De plus, l'augmentation de 140 nm à 190 nm du diamètre hydrodynamique des (P)-fluo@mag après stabilisation par le PAA est à corréluer à la forte solvatation des chaînes PAA.

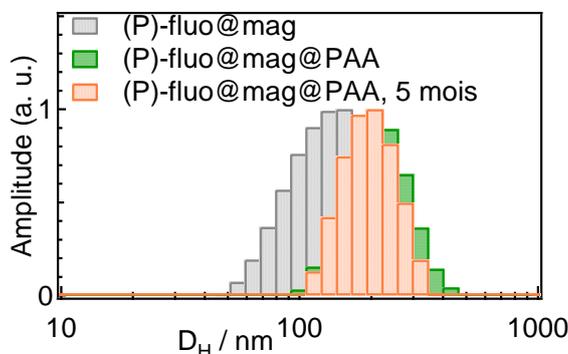


Figure 150 : Mesure DLS de la distribution en taille de (P)-fluo@mag@PAA en fonction du temps.

Le diamètre hydrodynamique et le potentiel de surface ont été mesurés sur une large gamme de pH (3-12) et de force ionique ($[NaCl] = 0-350$ mM). Leur faible évolution démontre la stabilité colloïdale des nanoassemblages dans des conditions comparables à celles des milieux biologiques (154 mM en NaCl) (Figure 151). Cette stabilité provient des ions carboxylates de la couche extérieure, apportant suffisamment de répulsion électrostatique entre les nanoassemblages.

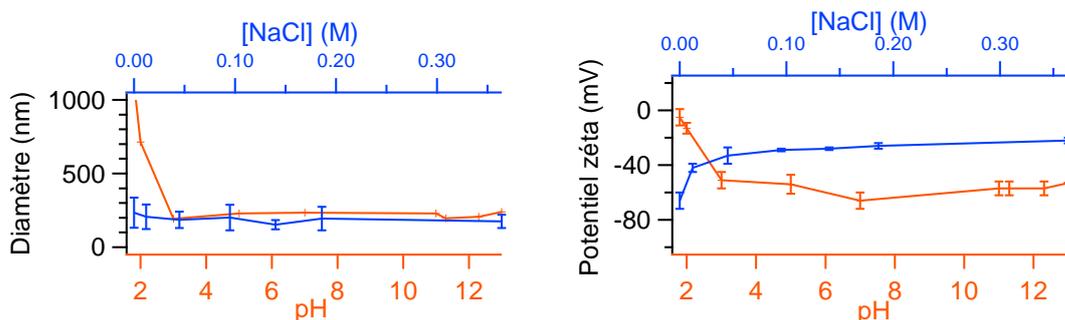


Figure 151 : Stabilité colloïdale des (P)-fluo@mag@PAA en fonction de la force ionique et du pH. a) Suivi du diamètre hydrodynamique et b) suivi du potentiel zéta de surface. Le pH a été ajusté par l'utilisation d'une solution d'acide nitrique (1 M) ou d'ammoniaque (1 M).

Grâce à cette couche stabilisante, nous avons pu réaliser la lyophilisation des (P)-fluo@mag@PAA en conditions douces et les stocker sur une période de plusieurs dizaines de mois, à $-18^{\circ}C$, sans modification significative des diamètres hydrodynamiques moyens après redispersion dans des solvants alcooliques, comme l'éthanol (Figure 152).

3.4/ Stabilisation colloïdale d'assemblages hybrides

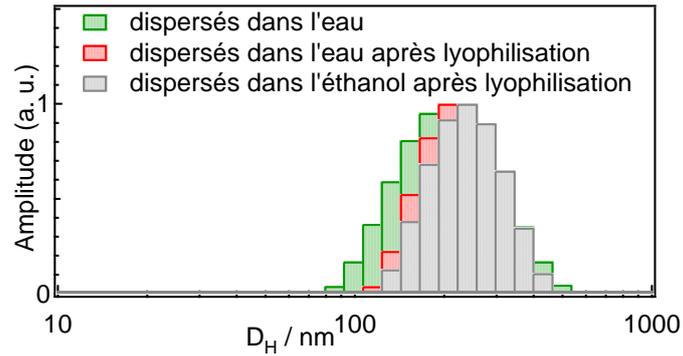


Figure 152 : Mesure DLS de la distribution en taille de (P)-fluo@mag@PAA dispersés dans différents milieux avant et après lyophilisation.

Pour des applications *in vitro*, l'utilisation de ces nanoassemblages requiert une stabilité de leurs dispersions dans des tampons physiologiques. Une force ionique élevée peut en effet entraîner une sédimentation des nano-objets par écrantage des charges de surface. Une redispersion des nanoassemblages lyophilisés dans un tampon HBSS, à des concentrations égales ou 3 fois supérieures à celles avant lyophilisation, conduit à une légère diminution du diamètre hydrodynamique moyen, prouvant la stabilité des édifices (Figure 153).

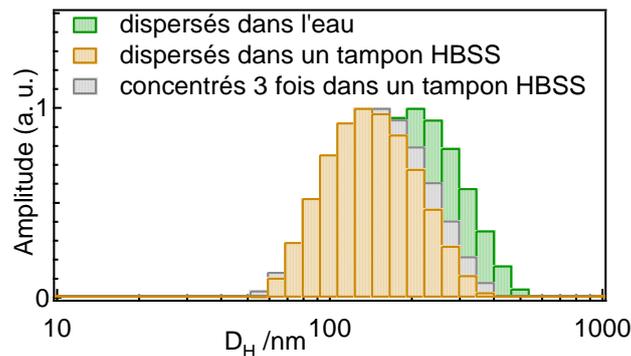


Figure 153 : Mesure DLS de la distribution en taille de (P)-fluo@mag@PAA dispersés dans un tampon HBSS après lyophilisation et concentration par 3.

Le suivi de l'absorbance permet d'observer un phénomène de sédimentation par diminution du signal mesuré à 450 nm, correspondant au cœur organique fluorescent (Figure 154). En tampon HBSS, aucune sédimentation n'est observée, 11 jours après dispersion, comme le montre l'enregistrement sur une période de 14 h de l'absorbance à 450 nm.

L'utilisation d'un tampon phosphate (PBS) conduit en revanche à une diminution de l'absorbance de l'ordre de 5 %, 2 h après la préparation de la solution. Cette diminution provient de la décantation d'une faible quantité de nanoassemblages, suite à la présence d'ions phosphates qui possèdent une affinité non négligeable pour les oxydes de fer de la suspension, et peuvent favoriser l'agrégation des nanoassemblages.

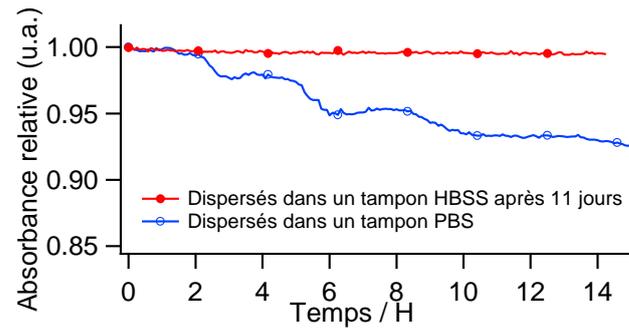


Figure 154 : Evolution de l'absorbance à 450 nm en fonction du temps pour des solution de fluo@mag@PAA lyophilisés puis redispersés dans des tampons physiologique. Tampon HBSS : Mesure après 11 jours de solution concentré 3 fois. Tampon PBS : Mesure juste après préparation.

3.5 Caractérisations structurales et physico-chimiques des nanoassemblages

Avant d'utiliser ces nanoassemblages magnéto-fluorescents pour des applications en bio-imagerie, nous avons souhaité quantifier leurs propriétés de fluorescence et de magnétisme ainsi qu'évaluer le nombre d'unités actives et leur agencement spatial. Les propriétés d'émission de fluorescence sont d'abord étudiées, puis sont suivies d'études par spectrométrie de masse afin de déterminer la proportion relative de chaque composante, fluorescente et magnétique. Enfin, l'étude des propriétés magnétiques conclura ces caractérisations.

Convention : Pour toutes les études suivantes, les nanoassemblages fluo@mag@PAA seront constitués d'un cœur fpoh (13) alors que les nanoassemblages fluo@mag@citrate seront constitués d'un cœur fdcooh (8). Dans tous les cas, ces nanoassemblages sont dispersés dans de l'eau millipore à l'exception des nanoassemblages non stabilisés (P)-fluo@mag ou (C)-fluo@mag qui sont dispersés dans l'acide nitrique. Les nanosphères organiques, dispersées dans de l'eau millipore, seront notées (P)-FON dans le cas d'un cœur organique constitué de fpoh (13) ou (C)-FON pour un cœur constitué de fdcooh (8).

3.5.1 Propriétés photophysiques

Afin de bien comprendre les propriétés d'émission de ces assemblages magnéto-fluorescents il nous a été nécessaire de diviser cette étude en deux parties. La première partie correspond à l'étude des nanoassemblages non stabilisés, en milieu acide, tandis que la deuxième partie portera sur les nanoassemblages stabilisés en milieu aqueux neutre.

3.5.1.1 Etudes des nanoassemblages dans l'acide nitrique

L'étude des spectres d'absorption permet de mettre en évidence des différences entre un cœur constitué de fpoh (13) (Figure 155a) et un cœur constitué de fdcooh (8) (Figure 155b). L'absorbance d'un système étant une propriété additive, le spectre d'absorption de (P)-fluo@mag devrait correspondre, en l'absence d'interactions, à la somme des spectres de (P)-FON et du ferrofluide pour donner le spectre représenté en pointillé. Cette additivité est observée dans le cas d'assemblages (C)-fluo@mag mais pas dans le cas des (P)-fluo@mag. Cet écart traduit l'existence d'interactions à l'état fondamental, induites par la formation de complexes statiques.

Pour les spectres d'émission des cœurs fluorescents, leur énergie demeure inchangée après complexation bien que l'intensité soit réduite de moitié uniquement pour fdcooh (8) (Figure 155c), après correction du signal d'émission par la valeur de l'absorbance du système. Cette diminution ne peut être imputée à un effet de filtre interne, exercé par les nanoparticules d'oxyde de fer, puisque leur spectre d'absorption ne se recouvre pas avec le spectre d'émission des nanosphères fluorescentes.

Ces différences comportementales s'expliquent par le comportement spécifique de fpoh (13) dont le processus de repliement, extincteur de fluorescence, se retrouve finalement en compétition avec un deuxième processus d'interaction, où les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent entraîner un dépliement de la chaîne. Il est également intéressant de noter que peu de travaux dans la littérature

se sont intéressés à l'étude de l'extinction de fluorescence de plateformes fluorescentes, générée par le greffage de nanoparticules inorganiques¹⁶⁸.

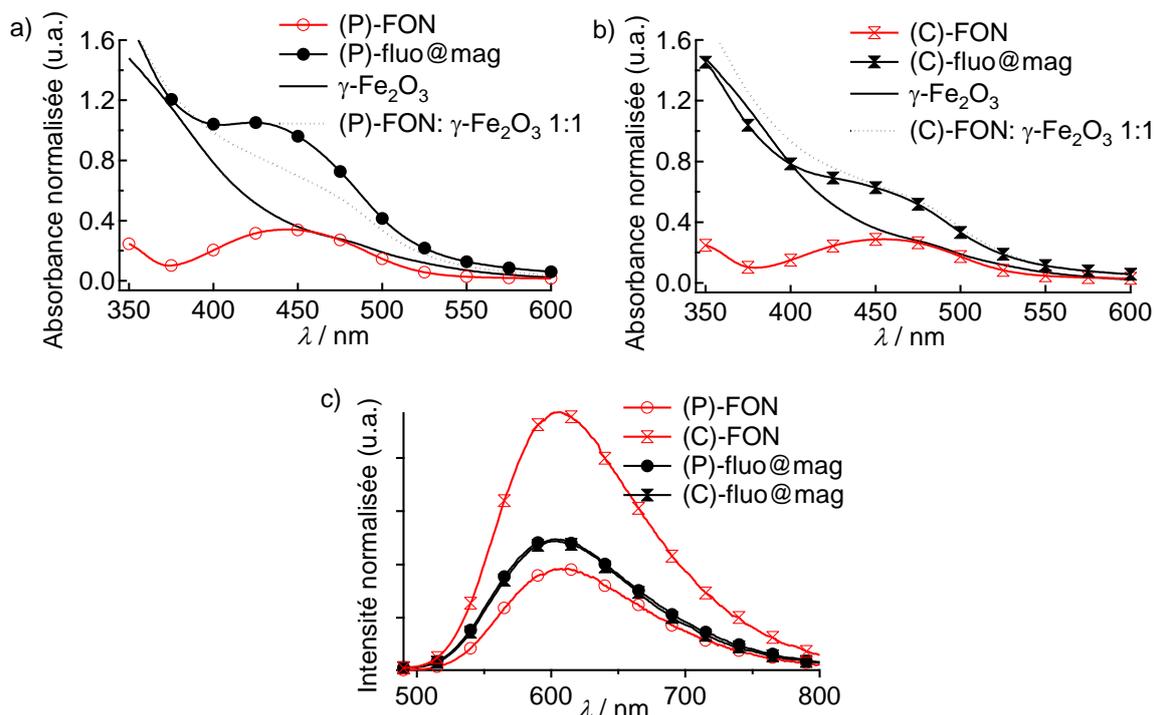


Figure 155 : Spectres d'absorption pour les nanosphères composées du fluorophore a) fpoh (13), et b) fdcooh (8). c) Spectres d'émission après excitation à 450 nm, normalisés par la valeur de l'absorbance du système.

La modification des propriétés d'absorption et d'émission des nanosphères par greffage d'entités magnétiques permet d'appréhender le degré d'interaction électronique entre le cœur et la coquille. La mesure des rendements quantiques de fluorescence (Tableau 21) ne permet pas d'observer de différences majeures entre les nanosphères et les nanoassemblages, excepté une légère diminution globale.

L'étude des déclins de fluorescence, modélisés par une fonction multi-exponentielle, permet d'observer deux faits marquants (Tableau 21). Le premier fait correspond à une diminution importante de la constante de temps la plus grande τ_1 lors de la complexation de nanoparticules d'oxyde de fer. Cette constante de temps peut ainsi être raisonnablement attribuée aux molécules présentes en surface, comme ce fut le cas pour les nanosphères constituées de fpoh (13) et fdcooh (8). Elle chute de manière plus importante pour (P)-FON que pour (C)-FON après complexation, respectivement de 1,49 à 0,08 ns et de 2,81 à 2,37 ns, et permet de mettre en évidence une force de liaison plus importante entre l'acide phosphonique et les nanoparticules d'oxyde de fer.

Le deuxième fait marquant correspond à une conservation d'environ 70 % du signal de fluorescence après complexation, malgré la formation d'une couche peu émissive en surface. En effet, peu de modifications sont obtenues pour les deux autres constantes de temps τ_2 et τ_3 attribuées aux composantes du cœur : 0,6-0,8 ns (τ_2) et 0,2-0,1 ns (τ_3) pour fpoh (13) et 1,0-0,8 ns (τ_2) et 0,3-0,2 ns (τ_3) pour fdcooh (8) respectivement. Finalement la constante de temps la plus courte peut être attribuée à la présence résiduelle de l'impulsion excitatrice avec une réponse du système (IRTF) de 40 ps.

	λ_{\max} (abs) nm	λ_{\max} (em) nm	Φ_f	τ_i (f_i) / ns	$\langle \tau_s \rangle$ / ns
(P)-FON	443	609	0,01	1,49 (0,07), 0,63 (0,43), 0,20 (0,42), 0,04 (0,08)	0,46
(P)-fluo@mag	443	604	0,01	0,77 (0,34), 0,24 (0,48), 0,08 (0,14), 0,04 (0,04)	0,39
(C)-FON	454	607	0,02	2,81 (0,24), 1,00 (0,52), 0,25 (0,20), 0,03 (0,04)	1,26
(C)-fluo@mag	458	604	0,01	2,37 (0,24), 0,81 (0,48), 0,20 (0,23), 0,03 (0,05)	0,99

Tableau 21 : Propriétés photophysiques et modélisation des déclinés de fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$) des nanoassemblages fluo@mag et des nanosphères organiques (FON), dispersées dans l'acide nitrique (pH = 1,2).

$$I(t) = \sum_i a_i \times \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \text{ avec } f_i = \frac{a_i \times \tau_i}{\sum_j a_j \times \tau_j}$$

L'avantage de ces nanoassemblages, composés d'un cœur organique fluorescent, réside dans une émission de fluorescence du cœur insensible à l'environnement, du fait de la densité élevée en fluorophore, générant une brillance très importante. De plus, ces nanoassemblages sont avantageusement fabriqués de manière simple et rapide.

3.5.1.2 Etudes des nanoassemblages stabilisés par le PAA dans l'eau

L'étude des objets bimodaux nous a permis de mettre en évidence le degré d'interaction entre les entités fluorescentes et magnétiques, mais également la conservation de la quasi-totalité de la fluorescence provenant du cœur. Nous allons maintenant nous intéresser à l'influence de la couche stabilisante qui est indispensable pour toutes les applications de bio-imagerie envisagées.

L'ajout de cette couche stabilisante provoque une légère diminution de l'absorbance (Figure 156a), au niveau de la bande de transfert de charge, ainsi qu'un léger déplacement hypsochrome de la bande d'émission (Figure 156b) comparé aux nanoassemblages (P)-fluo@mag ou (C)-fluo@mag. La stabilisation colloïdale des nanoassemblages, à l'aide de petites molécules pour les assemblages (C)-fluo@mag@citrate ou de polyélectrolytes pour les assemblages (P)-fluo@mag@PAA conduit donc bien à une insensibilité de la fluorescence des nanoassemblages vis-à-vis du milieu de dispersion.

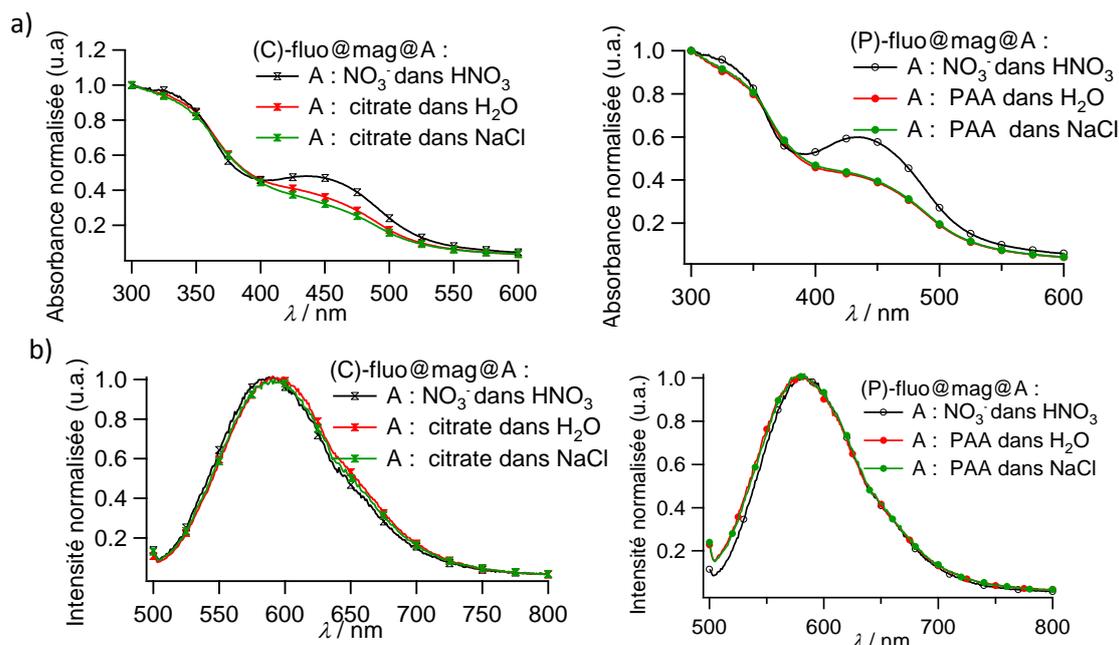


Figure 156 : a) Spectres d'absorption de nanoassemblages dérivés de (C)-fluo@mag et ou de (P)-fluo@mag en fonction de l'environnement. b) Spectres d'émission enregistrés après excitation à 450 nm pour des dérivés de (C)-fluo@mag ou de (P)-fluo@mag en fonction du milieu environnant.

En effet, l'enregistrement des déclin de fluorescence, à 580 nm après excitation à 450 nm, présente un comportement très similaire à l'état excité, quelle que soit la nature des molécules présentes en surface (Figure 157).

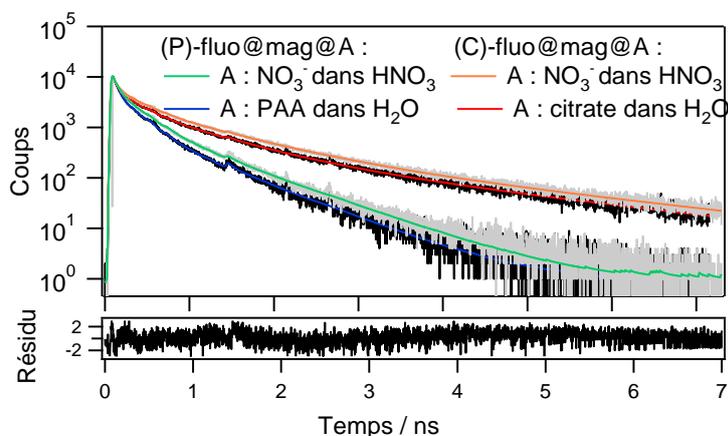


Figure 157 : Déclins de fluorescence enregistrés à 580 nm après excitation à 450 nm, pour les nanoassemblages avant et après stabilisation.

La modélisation de ces déclin (Tableau 22) met en évidence une faible diminution des constantes de temps lors de la fonctionnalisation de la surface des nanoassemblages et élimination de l'acide nitrique, ce qui tend à renforcer l'hypothèse d'une très faible influence de la couche stabilisante sur les propriétés photophysiques du cœur des nanoassemblages.

	λ_{\max} (abs) nm	λ_{\max} (em) nm	τ_i (f_i) / ns	$\langle \tau_s \rangle$ / ns
(C)-fluo@mag	458	604	2,37 (0,24), 0,81 (0,48), 0,20 (0,23), 0,03 (0,05)	0,99
(C)-fluo@mag@citrate	458	604	2,25 (0,23), 0,71 (0,45), 0,18 (0,24), 0,02 (0,08)	0,88
(P)-fluo@mag	443	604	0,77 (0,34), 0,24 (0,48), 0,08 (0,14), 0,04 (0,04)	0,39
(P)-fluo@mag@PAA	443	604	0,7 (0,29), 0,2 (0,52), 0,04 (0,19)	0,31

Tableau 22 : Propriétés photophysiques et modélisation des déclin de fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$) en fonction de la couche stabilisante.

$$I(t) = \sum_i a_i \times \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \text{ avec } f_i = \frac{a_i \times \tau_i}{\sum_j a_j \times \tau_j}$$

Voici ci-dessous les propriétés d'absorption et d'émission générales du système (P)-fluo@mag@PAA qui seront utilisées par la suite pour les applications en bio-imagerie *in vivo*, où le déplacement de Stokes permet d'éviter toute réabsorption de l'émission par les nanoparticules d'oxyde de fer (Figure 158).

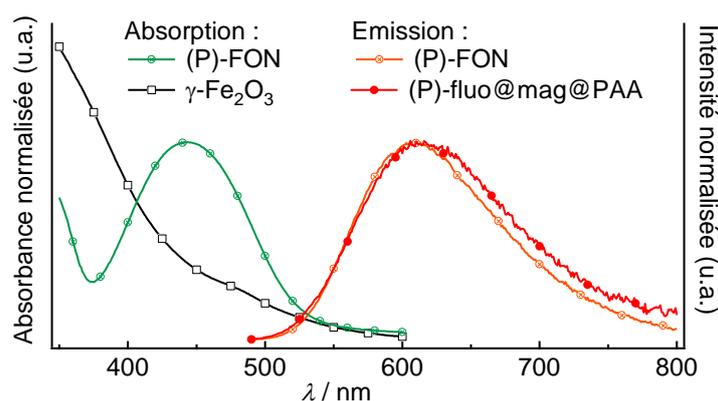


Figure 158 : Spectres d'absorption et d'émission de nanoassemblages (P)-fluo@mag@PAA dispersés dans de l'eau millipore.

3.5.2 Etudes par spectrométrie de masse

Vu l'émergence continue de nanosystèmes complexes, de nouvelles techniques de caractérisation ont été développées afin de comprendre leurs mécanismes de formation et de quantifier leurs compositions. Bien que la caractérisation de précurseurs moléculaires ou polymériques soit en général relativement aisée, la détermination de la masse molaire moyenne en nombre M_n de nanoparticules est plus délicate, due à la présence d'un système dispersé nécessitant de s'appuyer sur une distribution pour aboutir à M_n .

Actuellement, la valeur de M_n est généralement déduite de manière indirecte des dimensions de l'objet, mesurées par microscopie électronique ou par diffusion de la lumière. Grâce à une évaluation du volume et à la connaissance de la densité du système, on parvient à remonter à la masse molaire moyenne de l'assemblage. Toutefois, pour des assemblages complexes, l'agencement

des différentes unités entre elles n'est pas toujours connu, d'où des incertitudes sur la densité utilisée.

Grâce aux développements de techniques d'ionisation en condition douce, MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) ou ESI (electrospray ionization), la spectrométrie de masse est devenue un outil de choix pour déterminer la masse molaire moyenne d'un polymère en solution. Evaluer la masse de nanoassemblages, atteignant des valeurs de plusieurs mégadaltons (MDa), est en revanche plus délicat. La technique de spectrométrie de masse à détection de charge¹⁸⁶ (Figure 159) est parvenue à résoudre ce défi grâce au piégeage de nanoparticules ionisées¹⁸⁷ et à des mesures simultanées du ratio masse/charge (m/z) et de la charge (z). Une fois ionisés, les nanoassemblages chargés pénètrent dans un tube métallique relié à un détecteur de charge. Leur entrée déclenche un signal proportionnel à la charge effective z de l'objet. Le temps de traversée du tube (flight time en anglais), sous l'influence d'un champ magnétique constant, est fonction de la vitesse de la nanoparticule et donc de m/z . Ce temps correspond au décalage entre les deux détections, à l'entrée et à la sortie du tube. Des études sur une grande variété de poly(oxyde d'éthylène) ont ainsi permis de déterminer leurs masses molaires moyennes¹⁸⁸. Les analyses de nos systèmes ont été réalisées en collaboration avec l'Institut Lumière-Matière de Lyon, par le Dr. Tristan Doussineau.

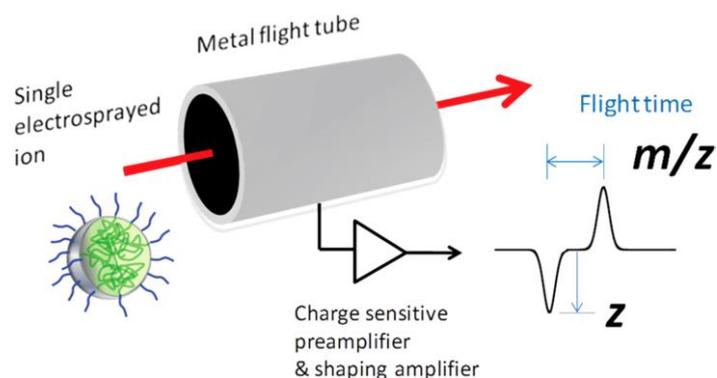


Figure 159 : Principe de la détection de charge par spectrométrie de masse, collaboration avec le Dr Tristan Doussineau¹⁸⁶.

Les masses molaires moyennes des nanosphères et des nanoassemblages ainsi que leurs polydispersités ont été mesurées par spectrométrie de masse à détection de charge. Dans un premier temps, des nanosphères de fpoH (13) ont été préparées par précipitation (50 μL , $[\text{Cm}] = 0,1 \text{ g.L}^{-1}$, THF) dans de l'eau millipore (2,5 mL). Dans un second temps, ces nanosphères ont été recouvertes de nanoparticules d'oxyde de fer stabilisées par des ions citrates ($[\text{Cm}] = 0,001 \text{ g.L}^{-1}$) après un échange de ligand.

3.5/ Caractérisations structurales et physico-chimiques des nanoassemblages

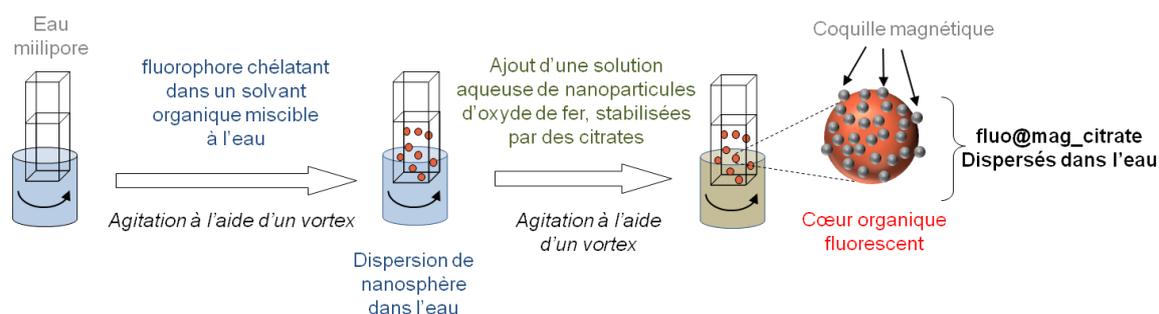


Figure 160 : Principe de préparation d'assemblages magnéto-fluorescents en deux étapes pour une analyse par spectrométrie de masse à détection de charge.

L'analyse en mode négatif des nanosphères de fpoh (13) a abouti à une valeur de M_n d'environ 250 MDa (Figure 161). En supposant une géométrie sphérique et une densité des nanosphères égale à 1, on peut déduire de M_n un diamètre moyen de 103 nm, en cohérence avec celui obtenu par diffusion harmonique de la lumière, centré sur 75 ± 30 nm. Connaissant la masse molaire du composé fpoh (13), nous pouvons déterminer le nombre de molécules, estimées à $3-5 \cdot 10^5$ par nanosphère. Nous pouvons alors estimer le nombre de nanosphères présentes en solution à environ $4 \cdot 10^{10}$ par millilitre, connaissant la quantité de matière initialement introduite.

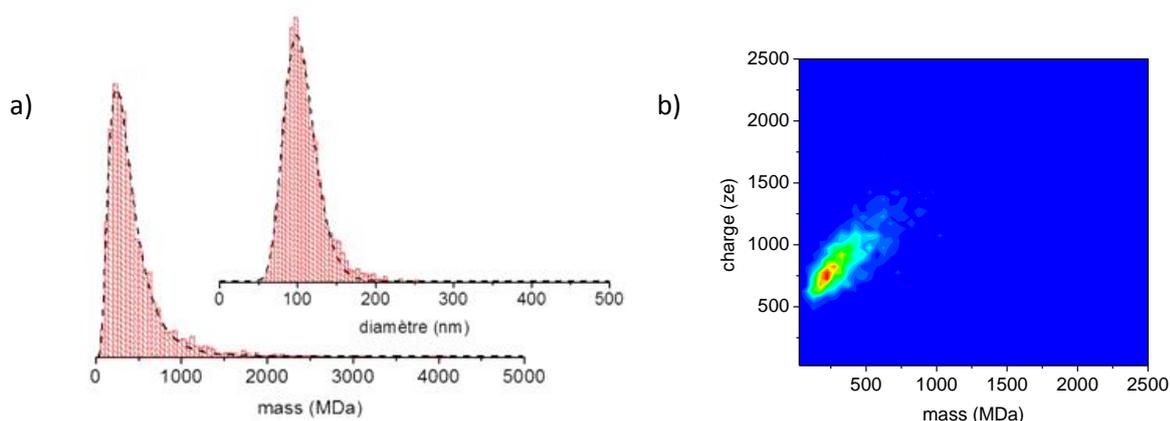


Figure 161 : a) Distribution en masse et en taille des nanosphères composées de fpoh (13) et b) représentation de la charge de surface en fonction de la masse des nanosphères. La conversion de la masse en diamètre a été réalisée pour une géométrie sphérique et une densité de 1.

La fonctionnalisation de la surface des nanosphères par les nanoparticules d'oxyde de fer a provoqué une augmentation de masse de 86 MDa. En assimilant les nanoparticules à des sphères de 7 nm de diamètre, on obtient une couverture d'environ $2 \cdot 10^4$ nanoparticules par nanoassemblage. L'augmentation de la charge de surface est liée à la présence des ions citrates venant stabiliser l'édifice, ce qui prouve le greffage en surface des nanoparticules d'oxyde de fer.

	a	b	c	d	<z>
	$m_{MedDist}$	$m_{MaxDist}$	$D_{MedDist}$	$D_{MaxDist}$	
(P)-FON	336	243	103	99	766
(P)-fluo@mag_citrate	419	303	-	-	900

Tableau 23 : Valeurs des masses (MDa) et des diamètres (nm) obtenus après modélisation de la dispersion par une loi de type lognormal. a) masse médiane, b) valeur maximale issue de la fonction lognormal, c) diamètre médian et d) diamètre maximal issu de la fonction logNormal. <z> représente la charge moyenne de surface.

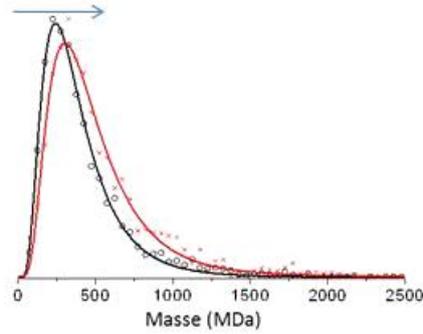


Figure 162 : Distribution des masses obtenues pour les nanosphères (P)-FON et les nanoassemblages (P)-fluo@mag_citrate stabilisés par des ions citrates.

Nous avons comparé l'effet de la couche de stabilisation sur la distribution en taille en étudiant les nanoassemblages fluo@mag@PAA et fluo@mag@citrate. La présence des ions citrates provoque une charge de surface moins importante et une distribution en taille légèrement plus large que celles obtenues en présence du PAA (Figure 163a). Une des explications possibles repose sur un équilibre dynamique de complexation / décomplexation des ions citrates à la surface des nanoparticules, conduisant à une augmentation de la taille moins homogène des nanoassemblages (Figure 163b).

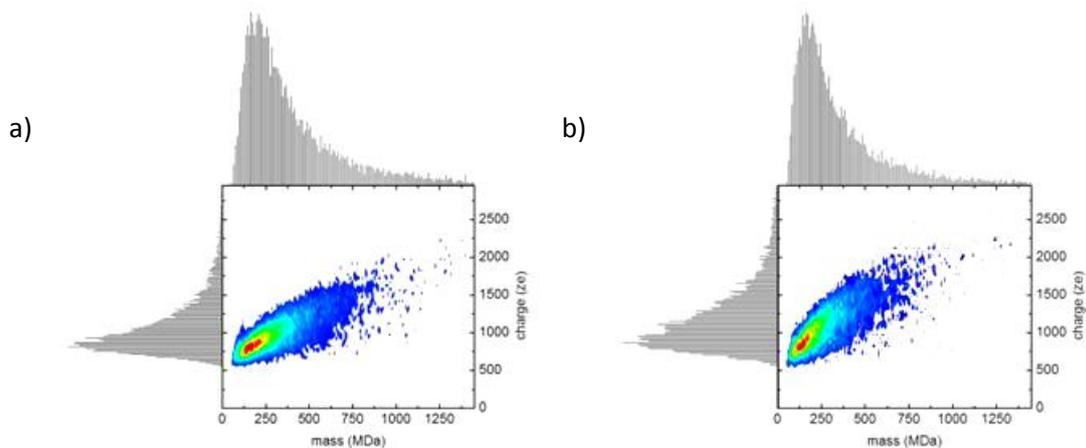


Figure 163 : Représentation de la charge en fonction de la masse des nanoassemblages. a) fluo@mag@citrate et b) fluo@mag@PAA dispersés dans de l'eau millipore.

Après modélisation des distributions de masse par une loi lognormal, on obtient en effet une valeur de la masse molaire moyenne légèrement supérieure pour l'assemblage (C)-fluo@mag@citrate (Figure 164b). A l'inverse, la distribution plus fine et décalée vers de plus petites masses pour les nanoassemblages (P)-fluo@mag@PAA résulte probablement d'une complexation plus uniforme des nanoparticules d'oxyde de fer par les nanosphères, à concentration en fluorophores identique.

3.5/ Caractérisations structurales et physico-chimiques des nanoassemblages

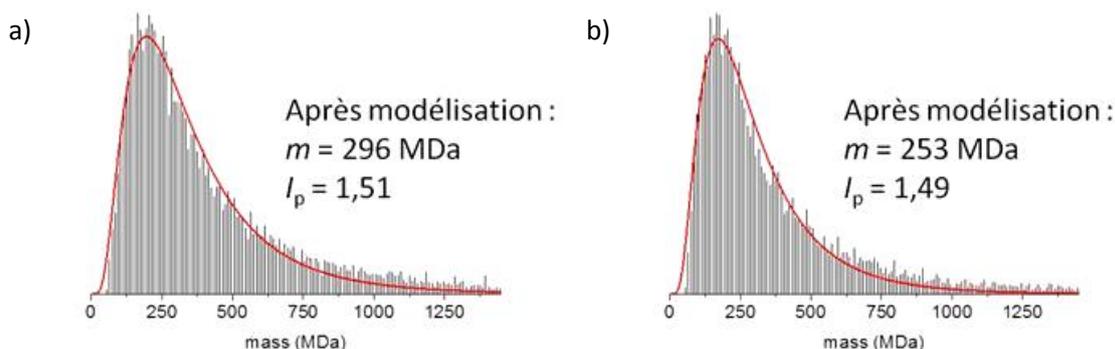


Figure 164 : Distribution des masses obtenues et modélisation de la distribution pour a) fluo@mag@citrate et b) fluo@mag@PAA. I_p représente l'indice de polydispersité.

Les études par spectrométrie de masse ont ainsi établi le greffage d'environ 20 000 nanoparticules d'oxyde de fer à la surface de ces nanoassemblages, ce qui devrait permettre d'accroître la réponse magnétique de ces systèmes par effet additif.

3.5.3 Etudes des propriétés magnétiques et phénomène d'exaltation

Après avoir étudié les propriétés de fluorescence des nanoassemblages fluo@mag@PAA et fluo@mag@citrate, nous allons maintenant nous intéresser à leurs propriétés magnétiques. Seules les nanoparticules d'oxyde de fer contribueront à la réponse magnétique du système en raison du caractère diamagnétique du coeur. Dans un premier temps, nous avons réalisé des mesures du moment magnétique par SQUID pour quantifier l'aimantation à saturation des nanoassemblages et nous nous sommes intéressés dans un second temps aux propriétés de relaxivité, paramètres-clés pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

3.5.3.1 Aimantation globale du système et sédimentation magnétique

La réponse magnétique des nanoassemblages a été étudiée en collaboration avec le laboratoire PECSA à Paris par le Dr Jérôme Fresnais et tout récemment au sein de l'équipe par le Dr Lénéaïc Lartigue. Il s'agit de suivre l'aimantation d'une solution en fonction de l'intensité du champ magnétique appliqué jusqu'à atteindre une valeur palier, nommée aimantation à saturation M_s et correspondant à l'alignement maximal de tous les spins électroniques (Figure 165).

L'analyse préliminaire des nanoassemblages (P)-fluo@mag et (C)-fluo@mag, stabilisés par des ions nitrates, génère une valeur de M_s relativement faible, de 23 emu/g, comparée à la valeur obtenue pour les nanoassemblages fluo@mag@PAA, d'environ 70 emu/g. Cette différence peut être expliquée par une interaction délétère des ions nitrates sur les propriétés magnétiques des nanoassemblages, où tous les spins ne peuvent plus s'aligner lors d'une sollicitation magnétique, ou tout simplement au manque de stabilité colloïdale inhérent aux nanoassemblages en l'absence de stabilisant efficace. En effet, l'aimantation à saturation des nanoparticules d'oxyde de fer seules est d'environ 70 emu/g. Une plus faible aimantation pour les nanoassemblages fluo@mag@citrate a également été estimée à environ 50 emu/g, provenant probablement de la formation de multicouche de nanoparticules en surface, entraînant une frustration importante des moments magnétiques de spin qui ne peuvent plus s'aligner.

L'utilisation d'un ligand acide carboxylique ou acide phosphonique pour le cœur fluorescent devrait également influencer la réponse magnétique du système, comme cela a pu être décrit dans la littérature⁷⁸. Toutefois, aucune différence notable entre les propriétés magnétiques de (P)-fluo@mag et (C)-fluo@mag n'a pour l'instant été détectée. D'autres études sont actuellement en cours.

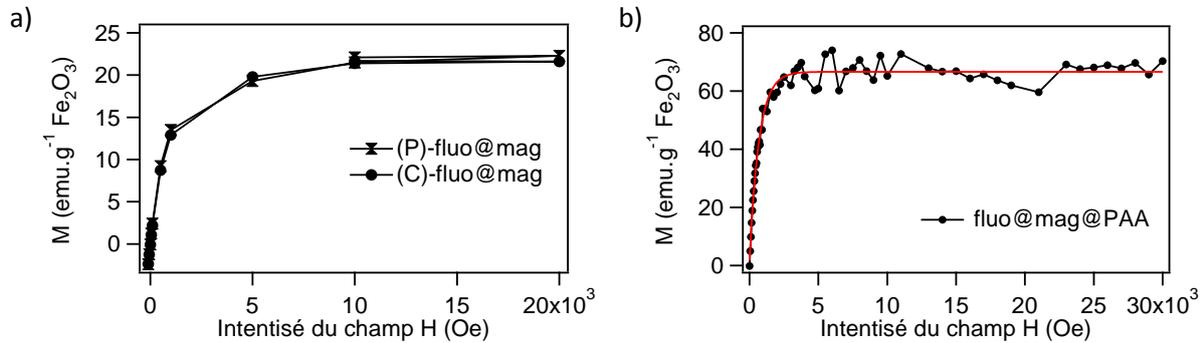


Figure 165 : Courbes d'aimantation a) des assemblages fluo@mag dispersés dans l'acide nitrique et b) des fluo@mag@PAA, en fonction de l'intensité du champ magnétique à température ambiante.

La superposition des courbes d'aimantation pour des nanoassemblages composé d'un cœur fpoH (13) et fdcooh (8) permet d'établir un diamètre des domaines magnétiques de 7,29 nm, $\sigma = 0,25$, en accord avec la dimension des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques initialement utilisées.

Le nombre de nanoparticules d'oxyde de fer présentes en surface des nanoassemblages peut également être déterminé par sédimentation magnétique. En effet, le positionnement d'un aimant permanent sous une cuve contenant une solution de fluo@mag provoque la sédimentation des composants magnétiques à des vitesses dépendant du champ (B) et donc de la distance (d) à l'aimant (Figure 166a). Cette sédimentation entraîne une diminution de l'absorbance globale du système, qui peut être suivie par spectroscopie d'absorption UV-visible. Après sédimentation, l'absorbance à 446 nm, propre au cœur fluorescent, diminue jusqu'à une valeur proche de zéro prouvant alors que toutes les nanosphères sont recouvertes de nanoparticules d'oxyde de fer.

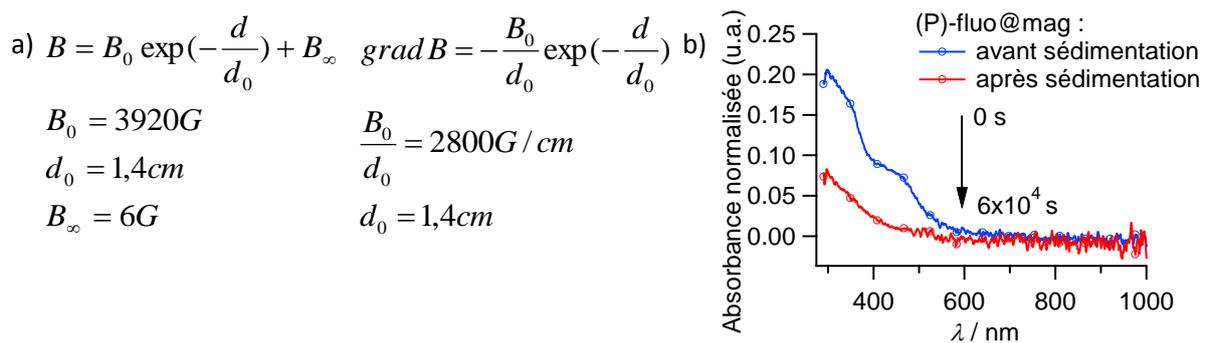


Figure 166 : a) Expression du champ magnétique utilisé et évolution de l'intensité du champ magnétique avec la distance d avec d_0 distance entre l'aimant et la cuve, B intensité du champ magnétique, B_0 intensité du champ à une distance d_0 , B_∞ l'intensité du champ à une distance infinie. b) Evolution de l'absorbance à 446 nm avant et après sédimentation magnétique (de 0 à $6 \cdot 10^4$ s).

L'évolution relative de l'absorbance à 446 nm décroît selon une loi monoexponentielle. L'absorbance à 552 nm d'une solution de nanoparticules d'oxyde de fer seules décroît beaucoup plus lentement. Après modélisation, une sédimentation 23 fois plus rapide est observée pour les nanoassemblages fluo@mag@PAA comparée à celle des nanoparticules d'oxyde de fer libres (Figure

3.5/ Caractérisations structurales et physico-chimiques des nanoassemblages

167). Comme la vitesse de sédimentation est proportionnelle au nombre de nanoparticules par agrégat élevé au cube, on obtient environ $1,2 \cdot 10^4$ nanoparticules d'oxyde de fer par nanoassemblage.

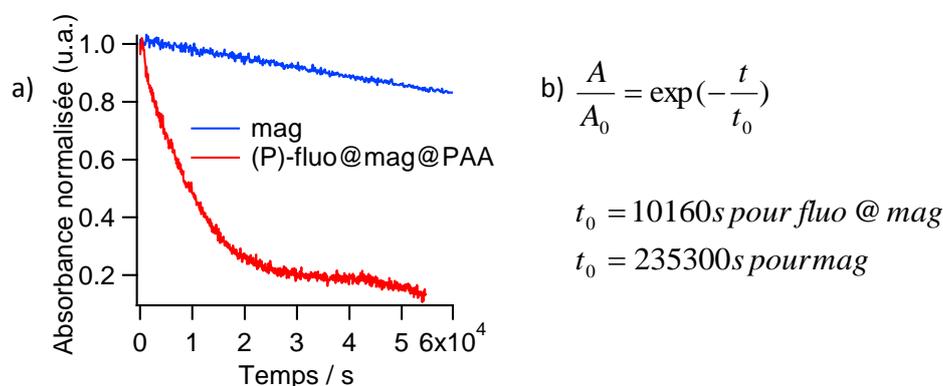


Figure 167 : a) Evolution relative de l'absorbance enregistrée à 446 nm pour une solution de (P)-fluo@mag@PAA et à 552 nm pour une solution de nanoparticules d'oxyde de fer nues. b) Modèle mathématique appliqué pour le suivi de cette absorbance.

Cette valeur est légèrement inférieure à celle obtenue par spectrométrie de masse. La mesure par sédimentation magnétique donne directement le nombre de nanoparticules par assemblage alors que l'étude par spectrométrie de masse repose sur une différence de masse et de charge de nanoparticules ionisées. De plus, l'utilisation de PAA comme stabilisant empêche la formation de multicouches trop importantes. Ces résultats montrent néanmoins une excellente cohérence malgré l'utilisation de techniques de mesures très différentes les unes des autres.

3.5.3.2 Relaxivité et effets additifs

Afin d'obtenir un agent de contraste IRM efficace en mode T_2 ou T_2^* , il est nécessaire d'obtenir un rapport des relaxivités r_2/r_1 le plus élevé possible, avec r_2 la relaxivité transversale et r_1 la relaxivité longitudinale. Ces mesures de relaxivité ont été réalisées en collaboration avec les départements de physique de l'Université de Pavie et de l'Université de Milan, par Tomas Orlando et le Prof. Alessandro Lascialfari, sur une gamme de fréquences comprises entre 10 MHz et 60 MHz pour les mesures de T_2 et 15 MHz et 60 MHz pour les mesures de T_1 .

Contrairement aux études réalisées par application d'un champ magnétique statique, où la réponse magnétique est fonction de l'orientation et de l'amplitude des moments magnétique de spin, l'étude des relaxivités s'intéresse à la relaxation des spins nucléaires des protons aux voisinages des nanoassemblages dispersés en solution aqueuse. Cette relaxivité comprend une composante statique, dépendante de l'aimantation au carré, et une composante dynamique, dépendante du système étudié.

Comparée à une solution de nanoparticules d'oxyde de fer seules mag@PAA, la solution de nanoassemblages fluo@mag@PAA préparée dans le même solvant et à des concentrations en fer identique, présente une augmentation maximale de la relaxivité r_2 à 7 MHz, de 99 à 238 $s^{-1} \cdot mol^{-1}$ et une diminution de la relaxivité r_1 à 5,6 MHz selon l'axe (0z), de 52 à 39 $s^{-1} \cdot mol^{-1} \cdot L$ (Figure 168). Aux faibles fréquences, la relaxivité est fonction de l'anisotropie magnétique seule du système, dépendant de la géométrie et de l'aimantation des domaines magnétiques, ici les nanoparticules d'oxyde de fer. Une augmentation de la fréquence met en évidence des effets additifs des nanoparticules d'oxyde de fer, probablement dus aux interactions dipôle-dipôle magnétiques non

délétères, suite à la proximité des nanoparticules d'oxyde de fer en surface. Ces effets additifs ont déjà été rapportés dans la littérature, comme présenté au chapitre 1.

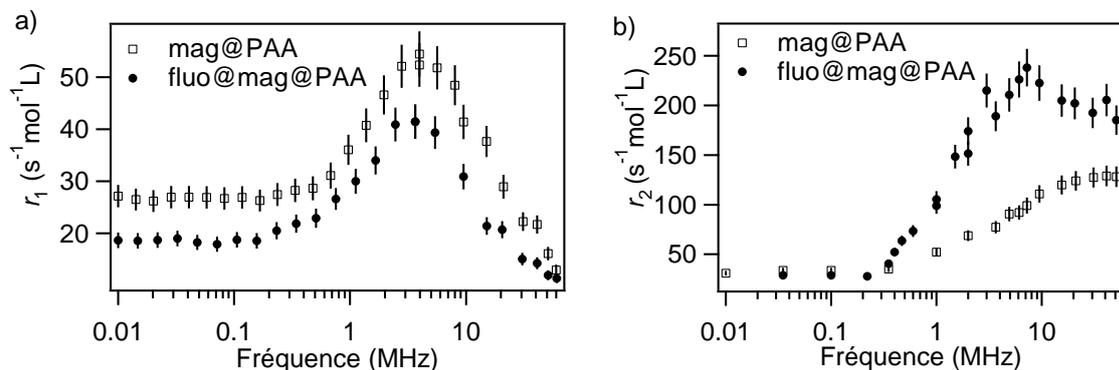


Figure 168 : Mesure de la relaxivité r_1 a) l'axe (Oz) pour r_1 et b) dans le plan (Oxy) pour r_2 , en fonction de la fréquence du champ magnétique utilisée, à température ambiante pour une couverture composée de PAA.

L'augmentation du rapport r_2/r_1 , de 2 à 6 à une fréquence de 7 MHz, ou de 3 à 10 à une fréquence de 15 MHz lorsque l'on passe de nanoparticules superparamagnétiques isolées à des nanoparticules assemblées, prouve la cohésion et l'organisation des nanoparticules d'oxyde de fer à la surface des nanosphères. Le concept d'assemblage de nanoparticules de fer montre donc tout son intérêt pour réduire les doses injectées en IRM tout en disposant d'un contraste significatif.

Sans surprise, une cohésion plus faible est obtenue lors de l'étude dans les mêmes conditions de nanoassemblages fluo@mag@citrate, comparé aux nanoparticules d'oxyde de fer seules, mag@citrate (Figure 169). Une augmentation pour r_2 , de 140 à 170 s⁻¹.mol⁻¹.L à 15 MHz ainsi qu'une diminution des valeurs de relaxivité pour r_1 , de 46 à 21 s⁻¹.mol⁻¹.L à 15 MHz est observée, indiquant un léger effet additif. Toutefois, la présence de multicouches, souvent délétère pour les propriétés magnétiques provoque une augmentation moindre du rapport r_2/r_1 de 3 à 8 à une fréquence de 15 MHz quand les nanoparticules magnétiques sont assemblées.

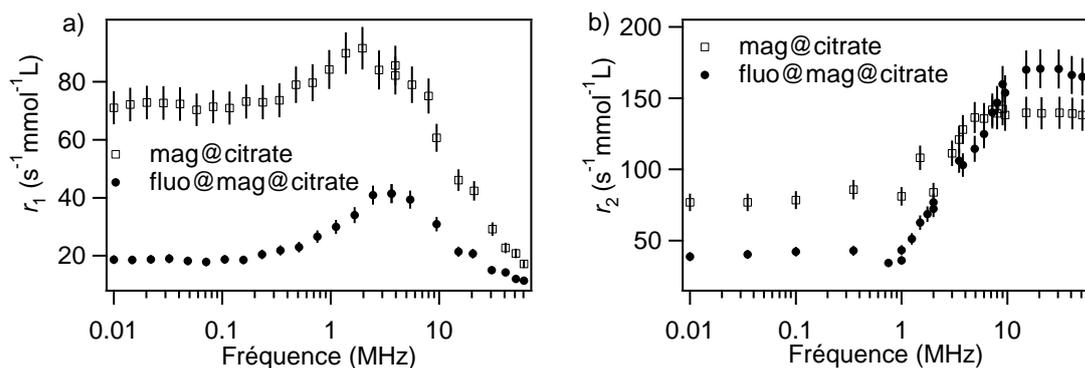


Figure 169 : Mesure de la relaxivité r_1 a) selon l'axe (Oz) pour r_1 et b) dans le plan (Oxy) pour r_2 , en fonction de la fréquence du champ magnétique utilisée, à température ambiante, pour une couverture composée d'ions citrates.

3.6 Conclusion et perspectives

Tout au long de ce chapitre, nous avons présenté différents procédés de fabrication de nanoassemblages magnéto-fluorescents à partir d'un cœur fluorescent complexant et de nanoparticules d'oxyde de fer.

Les nanoassemblages les plus stables se sont révélés être constitués d'un cœur organique de fpoH, d'une couronne de nanoparticules de maghémite, et de chaînes PAA de petite taille comme couche stabilisante. Différentes études ont montré l'importance de la nature chimique de la couche de stabilisation influant directement sur la stabilité colloïdale des nanoassemblages. Ces nanoassemblages fluo@mag@PAA ont pu être lyophilisés et redispersés après concentration dans toute sorte de tampon physiologique, sans montrer d'agrégation notable.

Des études photophysiques et magnétiques ont permis de démontrer les fortes interactions développées entre le cœur et les nanoparticules magnétiques au sein des nanoassemblages. Elles ont abouti à une complète caractérisation de ces systèmes, prêts à être utilisés comme sondes bimodales pour la bio-imagerie.

3.7 Références bibliographiques

- (165) Yasukuni, R.; Sliwa, M.; Hofkens, J.; Schryver, F. C. D.; Herrmann, A.; Müllen, K.; Asahi, T. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2009**, *48*, 065002.
- (166) Stevens, A. L.; Kaeser, A.; Schenning, A. P. H. J.; Herz, L. M. *ACS Nano* **2012**, *6*, 4777–4787.
- (167) Lebret, V.; Raehm, L.; Durand, J.-O.; Smaïhi, M.; Gérardin, C.; Nerambourg, N.; Werts, M. H. V.; Blanchard-Desce, M. *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 2174–2183.
- (168) Turro, N. J.; Lakshminarasimhan, P. H.; Jockusch, S.; O'Brien, S. P.; Grancharov, S. G.; Redl, F. X. *Nano Lett.* **2002**, *2*, 325–328.
- (169) Kim, S.; Huang, H.; Pudavar, H. E.; Cui, Y.; Prasad, P. N. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 5650–5656.
- (170) Ding, J.; Yuan, L.; Gao, L.; Chen, J. *J. Lumin.* **2012**, *132*, 1987–1993.
- (171) Queirós, C.; Silva, A. M. G.; Lopes, S. C.; Ivanova, G.; Gameiro, P.; Rangel, M. *Dyes Pigments* **2012**, *93*, 1447–1455.
- (172) Mahendran, V.; Philip, J. *Langmuir* **2013**.
- (173) Massart, R. *Magn. IEEE Trans. On* **1981**, *17*, 1247–1248.
- (174) Bee, A.; Massart, R.; Neveu, S. *J. Magn. Magn. Mater.* **1995**, *149*, 6–9.
- (175) Saravanan, P.; Alam, S.; Mathur, G. N. *J. Mater. Sci. Lett.* **2003**, *22*, 1283–1285.
- (176) Moussy, J.-B. *J. Phys. Appl. Phys.* **2013**, *46*, 143001.
- (177) Baaziz, W.; Pichon, B. P.; Fleutot, S.; Liu, Y.; Lefevre, C.; Greneche, J.-M.; Toumi, M.; Mhiri, T.; Begin-Colin, S. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 3795–3810.
- (178) Yin, M.; Willis, A.; Redl, F.; Turro, N. J.; O'Brien, S. P. *J. Mater. Res.* **2011**, *19*, 1208–1215.
- (179) Fievet, F.; Lagier, J. P.; Blin, B.; Beaudoin, B.; Figlarz, M. *Solid State Ion.* **1989**, *32–33, Part 1*, 198–205.
- (180) Reddy, L. H.; Arias, J. L.; Nicolas, J.; Couvreur, P. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 5818–5878.
- (181) Israelachvili. Intermolecular and surface forces
<http://www.scribd.com/doc/120792323/Israelachvili-Intermolecular-and-surface-forces-1992>
(accessed Apr 18, 2014).
- (182) Grasso*, D.; Subramaniam, K.; Butkus, M.; Strevett, K.; Bergendahl, J. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2002**, *1*, 17–38.
- (183) Barreto, J. A.; O'Malley, W.; Kubeil, M.; Graham, B.; Stephan, H.; Spiccia, L. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, H18–H40.
- (184) Maldiney, T.; Richard, C.; Seguin, J.; Wattier, N.; Bessodes, M.; Scherman, D. *ACS Nano* **2011**, *5*, 854–862.
- (185) Kim, J.-H.; Park, K.; Nam, H. Y.; Lee, S.; Kim, K.; Kwon, I. C. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 1031–1053.
- (186) Doussineau, T.; Bao, C. Y.; Antoine, R.; Dugourd, P.; Zhang, W.; D'Agosto, F.; Charleux, B. *ACS Macro Lett* **2012**, *1*, 414–417.
- (187) Doussineau, T.; Yu Bao, C.; Clavier, C.; Dagany, X.; Kerleroux, M.; Antoine, R.; Dugourd, P. *Rev. Sci. Instrum.* **2011**, *82*, 084104–084104–8.
- (188) Doussineau, T.; Kerleroux, M.; Dagany, X.; Clavier, C.; Barbaire, M.; Maurelli, J.; Antoine, R.; Dugourd, P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 617–623.

Chapitre IV : Nanoassemblages hybrides comme outils d'imagerie et de diagnostic médical

Chapitre IV : Nanoassemblages hybrides comme outils d'imagerie et de diagnostic médical	163
4.1 Introduction	165
4.2 Internalisation <i>in vitro</i> d'assemblages hybrides	166
4.2.1 Influence de la stabilisation des nanoassemblages : petites molécules vs polyélectrolytes	166
4.2.1.1 Internalisation en fonction du temps.	167
4.2.1.2 Etude de toxicité	170
4.2.1.3 Localisation des assemblages à l'intérieur des cellules	172
4.2.1.4 Quantification des nanoassemblages internalisés	175
4.2.1.5 Etude par microscopie électronique	177
4.2.1.6 Etudes photophysiques intra-cellulaires	178
4.2.2 Etudes d'internalisation en fonction de la nature des nanosphères	180
4.2.2.1 Internalisation de nanosphères ionisables	180
4.2.2.2 Internalisation de nanosphères non ionisables hydrophobes	182
4.2.2.3 Etude de dégradation de nanosphères hydrophobes en présence de macrophages.	184
4.3 Internalisation <i>in vivo</i> d'assemblages hybrides	187
4.3.1 Imagerie par résonance magnétique (IRM)	187
4.3.2 Analyse <i>ex vivo</i> de la biodistribution des nanoassemblages injectés	189
4.3.2.1 Etudes par microscopie de fluorescence à excitation monophotonique	189
4.3.2.2 Etudes par microscopie de fluorescence à excitation biphotonique	191
4.3.2.3 Etudes par microscopie électronique à transmission (MET)	193
4.4 Conclusion	195
4.5 Références bibliographiques	196

4.1 Introduction

Après avoir fabriqué et caractérisé des nanoassemblages hybrides magnéto-fluorescents, colloïdalement stables dans le temps et dans une grande variété de milieux dispersants (eau, alcool), nous allons maintenant nous intéresser à leur internalisation dans différentes lignées cellulaires. Ces expériences seront complétées d'investigations structurales et d'études comparatives sur d'autres nanoparticules afin d'appréhender l'influence des différentes unités (cœur, coquille, ligand stabilisant) sur le devenir des nanoassemblages, une fois internalisés. Des études de viabilité cellulaires des nanoassemblages et de leurs unités constitutrices seront également réalisées.

Après des premières études *in vitro* révélant une absence de toxicité significative, nous nous sommes intéressés à des expériences d'imagerie sur petit animal par IRM. Les tissus extraits ont été observés par microscopie de fluorescence *ex vivo* sous excitation mono- et biphotonique, ce qui a permis de suivre les fluo@mag@PAA injectés, d'une échelle millimétrique à une échelle nanométrique.

4.2 Internalisation *in vitro* d'assemblages hybrides

Pour toutes les études d'internalisation dans différentes lignées cellulaires, nous avons choisi les nanoassemblages fluo@mag@PAA au vu de leur stabilité structurale et colloïdale, en les comparant aux nanoassemblages stabilisés par des petites molécules, les ions citrates. Nous allons par la suite étudier l'influence de plusieurs paramètres, comme la nature, le temps et la concentration en nanoassemblages. La localisation intracellulaire des assemblages après internalisation sera également un paramètre d'étude, pour comprendre le devenir de ces nano objets une fois internalisés.

Protocole général : les études d'imagerie *in vitro* présentées ci-après ont été réalisées après une incubation préalable de cellules pendant 24 h sur un support adapté, généralement des plaques 8 puits de type Ibidi. Pour des études supérieures à 72 h, 5000 cellules (10 000 cellules) sont incubées pour des plaques 96 puits de 300 μL chacun (8 puits de 300 μL chacun). Le milieu de culture utilisé dépend de la lignée cellulaire et contient toujours des antibiotiques à hauteur de 1 %. Les nanoassemblages, préalablement fabriqués dans de l'eau Millipore, sont dilués au 20^{ème} et ajoutés au milieu de culture. La concentration en composés organiques vaut environ 0,5 μM et celle en en fer, 15 μM . Après incubation pendant une durée fonction de chaque type d'expérience, les puits sont imagés en épifluorescence par microscopie confocale sous excitation à 488 nm, ou microscopie plein champ sous excitation à 482 nm. Les signaux d'émission détectés aux environs de 600 nm ont été attribués aux nanoassemblages, représentés en fausses couleurs sur les clichés, sauf contre-indication. Les clichés obtenus par microscopie plein champ représentent une zone d'intérêt de 1121 μm x 946 μm , à l'exception de la détection par caméra couleur qui représente une zone d'intérêt de 67 μm x 90 μm .

Les cellules utilisées sont issues de deux lignées humaines. La première lignée de cellules, MDA-MB-468*, provient d'un mélanome (cancer de la peau) métastaté et qui a créé une tumeur mammaire. La deuxième lignée de cellules, HEK 293†, est issue du système hépatique.

4.2.1 Influence de la stabilisation des nanoassemblages : petites molécules vs polyélectrolytes

Les ligands constituant la couche périphérique des nanoassemblages sont les premiers éléments exposés vis-à-vis de la membrane cellulaire, impliquée dans le processus d'internalisation. Sa nature chimique peut donc provoquer des différences au niveau du temps d'internalisation. Nous avons donc mené des études parallèles entre les systèmes fluo@mag@PAA stabilisés par un polyélectrolyte, et les systèmes fluo@mag@citate, stabilisés par des ions citrates.

* Etudes réalisées en collaboration avec le laboratoire UFIP UMR CNRS 6286 de l'Université de Nantes, dirigé par le Prof. Charles Tellier, au sein de l'équipe du Prof. Fabrice Fleury et sous la tutelle du Dr. Houda Benhelli-Mokrani.

† Etudes réalisées en collaboration avec la plateforme MicroPICell de l'IRS-Université de Nantes pilotée par le Dr. Philippe Hulin et le Dr Steven Nedellec, sous la responsabilité du Prof. Jacques Le Pendu.

4.2.1.1 Internalisation en fonction du temps.

L'étude de l'internalisation des systèmes fluo@mag@PAA a tout d'abord été réalisée sur la lignée MDA où un minimum de 6 h d'incubation s'est révélé nécessaire pour observer une émission intracellulaire significative. La présence en surface de ligands chargés négativement ralentit généralement le processus d'internalisation par rapport à celui de systèmes chargés positivement, attirés par la membrane cellulaire de phospholipides alors chargée négativement (Figure 170). Toutefois, une toxicité également plus importante peut être observée en raison d'interaction possible avec l'ADN du noyau¹⁸⁹. La vraie couleur de l'émission, donnée par une caméra couleur, est trouvée dans l'orange, en accord avec la gamme spectrale d'émission des nanoparticules en solution, centrée à 600 nm (Figure 170c). Cette observation semble indiquer une conservation des propriétés de fluorescence des nanoassemblages après internalisation.

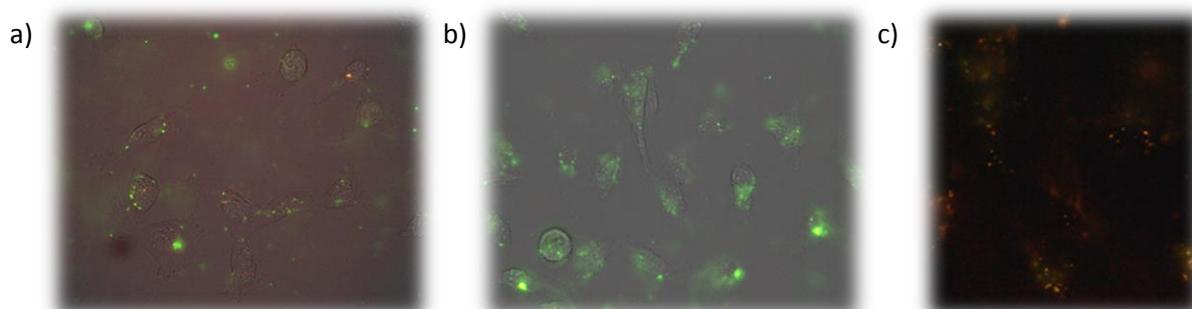


Figure 170 : Imagerie par microscopie plein champ à épifluorescence de cellules MDA vivantes incubées avec des nanoassemblages fluo@mag@PAA après a) 2 h, b) 8 h 30 et c) 23 h, après élimination de l'excès de nanoassemblages et en utilisant une détection par caméra couleur.

L'utilisation de polyélectrolytes ou de petites molécules en surface des nanoassemblages ne modifie pas la cinétique d'internalisation, avec un minimum nécessaire de 6 h pour les systèmes fluo@mag@citrate (Figure 171). Cette fois-ci, la vraie couleur de l'émission au sein des cellules apparaît verte (Figure 171c). On peut également observer des nanoassemblages fixés sur la plaque support, bien visibles dans une gamme spectrale plutôt orangée. Cette différence de couleur émise a été attribuée à une modification structurale des nanoassemblages puisque les systèmes fluo@mag@PAA conservaient un signal d'émission dans la même gamme spectrale, indépendamment du milieu environnant. Nous avons noté au chapitre précédant une cohésion structurale moindre des fluo@mag@citrate. La dissociation des unités constitutrices du nanoassemblage lors du passage de la membrane lipidique apolaire, pourrait expliquer ce phénomène.

Ce processus de « dissolution » des nanosphères organiques a déjà été mis en évidence dans la littérature pour des nanosphères purement organiques, composées de fluorophores solvatochromes, similaires à ceux utilisés pour les systèmes fluo@mag¹²². En effet, dans un environnement apolaire (lipides, hydrocarbures), l'émission est décalée à plus haute énergie tandis qu'elle est apparaît à plus basse énergie dans des solvants ou matrices polaires (nanoparticules) du fait de la stabilisation énergétique de l'état excité à transfert de charge, l'énergie de l'émission est alors abaissée.

4.2/ Internalisation *in vitro* d'assemblages hybrides

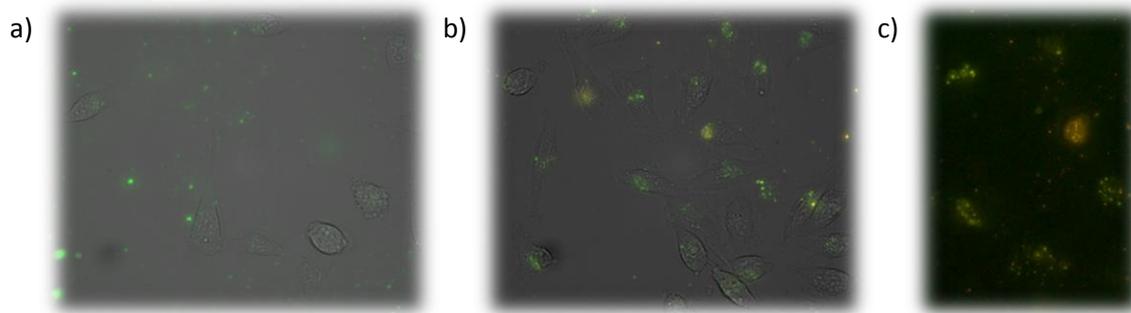


Figure 171 : Imagerie par microscopie plein champ à épifluorescence de l'internalisation de cellules MDA vivantes incubées avec des nanoassemblages fluo@mag@citrate après a) 2 h, b) 8 h 30 et c) 8 h 30, en utilisant une détection par caméra couleur.

Afin d'étudier l'influence de la lignée cellulaire sur les processus d'internalisation et l'intégrité des édifices après internalisation, de nouvelles expériences ont été réalisées avec la lignée cellulaire HEK. La cinétique d'internalisation, suivie par microscopie de fluorescence, demeure inchangée. Les deux systèmes fluo@mag@PAA et fluo@mag@citrate sont efficacement internalisés (respectivement Figure 172a et Figure 172b). Comme précédemment avec les cellules MDA, un comportement similaire est observé pour les assemblages fluo@mag@citrate (Figure 172a) ou pour les fluo@mag@PAA (Figure 172b). L'émission détectée par caméra couleur s'est avérée également plus décalée vers le vert dans le cas des assemblages fluo@mag@citrate (Figure 172a'), comparé aux fluo@mag@PAA (Figure 172b') qui présentent une fluorescence inchangée.

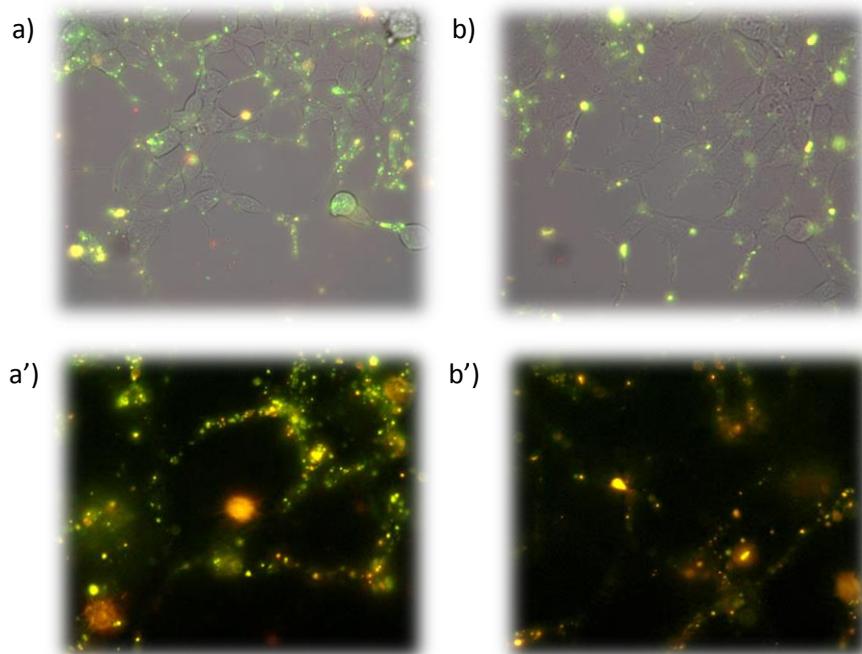


Figure 172 : Imagerie par microscopie plein champ à épifluorescence de cellules HEK vivantes incubées avec des nanoassemblages a) fluo@mag@citrate et b) fluo@mag@PAA après 72 h et élimination de l'excès de nanoassemblages. a') et b') correspondent aux images a) et b) mais en utilisant une détection à l'aide d'une caméra couleur.

Des études par microscopie confocale[‡] ont été effectuées pour les deux types d'assemblages, fluo@mag@citrates (Figure 173a) et fluo@mag@PAA (Figure 173b), mis en incubation avec des cellules HEK pour gagner en résolution et notamment s'assurer de la présence des nanoassemblages à l'intérieur et non à la surface de cellules. Une reconstitution en trois dimensions des coupes optiques d'un amas de cellules montre sans ambiguïté la présence de nanoassemblages non agrégés, regroupés dans des zones spécifiques qui ont pu être identifiées par immunomarquage, détaillé plus loin dans ce chapitre.

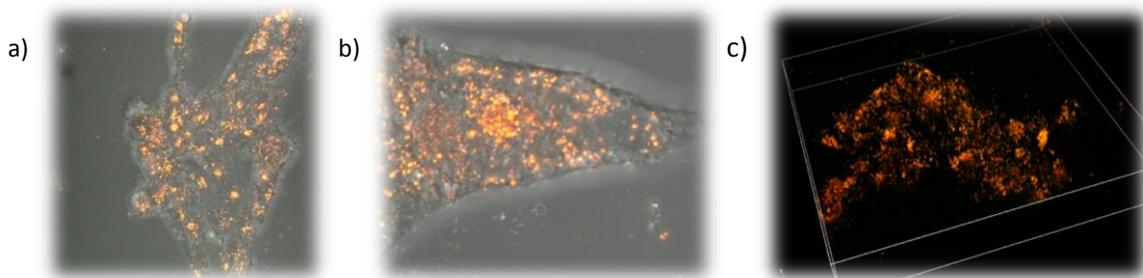


Figure 173 : Imagerie par microscopie confocale de cellules HEK vivantes incubées avec des nanoassemblages a) fluo@mag@citrates (212 μm x 212 μm), b) fluo@mag@PAA après environ 18h (53 μm x 53 μm), et c) reconstitution 3D (212 μm x 212 μm) de cellules de type HEK-293 incubées avec les nanoassemblages fluo@mag@PAA pendant 24 h.

Les études d'imagerie par fluorescence étant réalisées sur des cellules vivantes, nous nous sommes intéressés à induire le déplacement de ces cellules par application d'un champ magnétique statique, ou le cas échéant, à observer une accumulation plus localisée des nanoassemblages à l'intérieur d'un compartiment cellulaire selon la direction des lignes de champ.

Pour cela, nous avons internalisé les systèmes fluo@mag@PAA dans des cellules HEK, et enregistré le signal de fluorescence pendant plusieurs minutes en l'absence puis en la présence d'un aimant, avec un champ magnétique d'environ 0,5 mT. L'ensemble des images est projeté sur un même plan, fournissant les trois images ci-dessous sur différentes périodes d'acquisition (Figure 174). Selon le code couleur, les zones les plus (moins) intenses en émission sont représentées en rouge (bleu). L'évolution majeure concerne la diminution du nombre de zones de forte intensité sous l'application du champ magnétique, au profit d'une localisation plus accrue. Nous attribuons ce phénomène à une concentration plus localisée des nanoassemblages, observée par exemple dans la partie inférieure gauche lors des premières minutes ou dans la partie centrale lors de la rotation des lignes de champ à 90° (Figure 174).

[‡] Etudes réalisées en collaboration avec la plateforme MicroPICell de l'IRS-Université de Nantes pilotée par le Dr. Philippe Hulin et le Dr Steven Nedellec, sous la responsabilité du Prof. Jacques Le Pendu.

4.2/ Internalisation *in vitro* d'assemblages hybrides

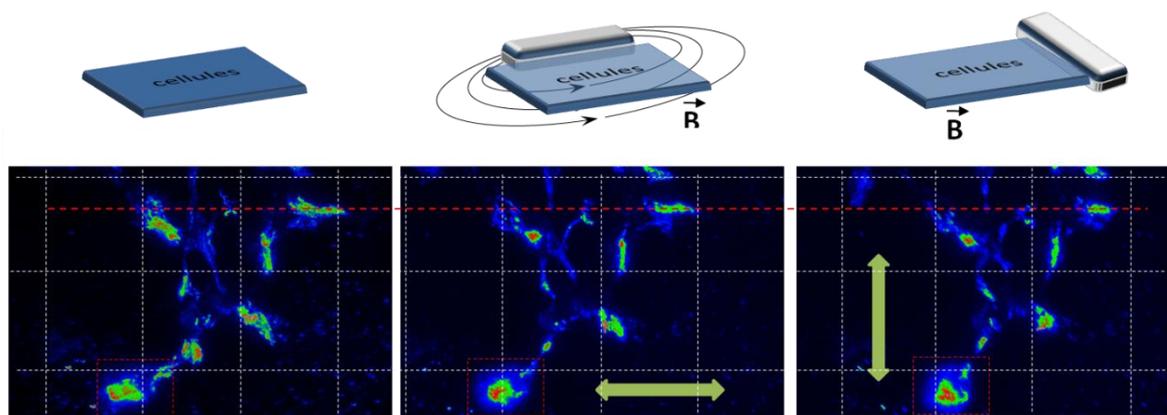


Figure 174 : Imagerie par microscopie à épifluorescence de fluo@mag@PAA dans des cellules HEK après une nuit d'internalisation. Déformation de la cellule par application d'un champ magnétique. Projection en 2D du mouvement des nanoassemblages sur une période de quelques minutes, respectivement 1, 6 et 3 min.

Ces deux premières expériences nous ont permis de confirmer l'internalisation efficace des deux types de nanoassemblages fluo@mag@PAA et fluo@mag@citrate après 6 heures d'incubation. La nature du ligand stabilisant ne semble pas modifier la vitesse de capture par les cellules mais influe sur la cohésion architecturale des nanoassemblages après internalisation.

4.2.1.2 Etude de toxicité

Après l'internalisation des nanoassemblages qui ne montre pas de toxicité apparente, une étude de la viabilité cellulaire apparaît primordiale pour imaginer l'utilisation de ces nanoassemblages comme outil de bio-imagerie *in vivo*⁵. Dans un premier temps, 5 000 cellules MDA sont incubées pendant 24h, puis une solution de nanoassemblages dispersés dans l'eau Millipore est ajoutée. L'internalisation dans des cellules MDA a été réalisée en fonction de la concentration en nanoassemblages au niveau du surnageant, par modification du volume de nanoassemblages ajoutés et permettant d'obtenir des concentrations de 3 à 30 μM en fer. Pour obtenir une concentration de 300 μM , une étape de lyophilisation préalable doit être réalisée, suivie d'une redispersion dans du milieu de culture de la poudre obtenue. Cette étape supplémentaire n'a pu être réalisée que pour les nanoassemblages fluo@mag@PAA et est nécessaire pour ne pas entraîner une trop grande modification de la force ionique du milieu de culture par ajout d'un trop grand pourcentage d'eau Millipore. Après une période donnée, le surnageant est éliminé et les cellules sont successivement lavées par du PBS puis à nouveau incubées en présence de milieu de culture seul, afin d'étudier l'impact de l'internalisation des sondes hybrides sur le développement cellulaire.

Le test de viabilité utilisé est un test colorimétrique, reposant sur la réduction d'un chromophore, le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT), par des enzymes de type réductases (Figure 175). Lorsque la cellule est active, le chromophore est alors réduit en un composé insoluble et de couleur violette, le formazan. Après dissolution des cristaux de formazan dans du diméthylesulfoxyde (DMSO), l'absorbance de la solution est mesurée à 570 nm où le formazan absorbe. Cette valeur permet de quantifier le nombre de cellules vivantes, proportionnel à la quantité en formazan généré. La normalisation par un contrôle négatif, en l'absence de substances étrangères, permet de remonter à une viabilité cellulaire. Certaines études dans la

⁵ Etudes réalisées en collaboration avec le laboratoire UFIP UMR CNRS 6286 de l'Université de Nantes, dirigé par le Prof. Charles Tellier, au sein de l'équipe du Prof. Fabrice Fleury et sous la tutelle du Dr. Houda Benhelli-Mokrani.

littérature¹⁹⁰ relatent la présence d'interférences entre les tests de type MTT et les nanoparticules, phénomène non observé dans notre cas. De plus, l'absorbance du formazan se situe au-delà de l'absorbance des nanoassemblages fluo@mag@PAA ou fluo@mag@citrate internalisés, d'où notre choix pour cette technique.

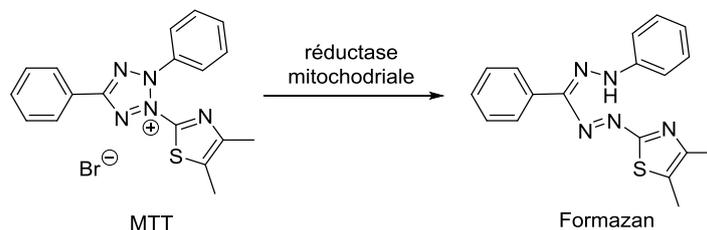


Figure 175 : Réduction du MTT en formazan par l'intermédiaire de réductases mitochondriales.

La viabilité cellulaire présentée pour chaque valeur de concentration est le résultat d'une moyenne de quatre expériences. Les barres d'erreur indiquent l'écart relatif observé entre ces mesures. Un contrôle par ajout d'eau Millipore a été également réalisé et ne montre aucun impact sur la viabilité mesurée.

Quelle que soit la nature du ligand stabilisant, aucune toxicité significative n'a été observée pour des cellules MDA après 6h d'incubation en présence de nanoassemblages, suivies de 60h de post-incubation après élimination du surnageant, lavage et remplacement par du nouveau milieu de culture (Figure 176). De manière surprenante, l'utilisation du ligand citrate a provoqué une légère augmentation de la quantité de cellules présentes, sans toutefois parvenir à être rationalisée au-delà d'une interaction des ions citrates avec le formazan. Les mêmes tests de viabilité ont été réalisés après internalisation de nanoparticules d'oxyde de fer seules, stabilisées par des ions citrates ou du PAA, sans montrer à nouveau de toxicité significative.

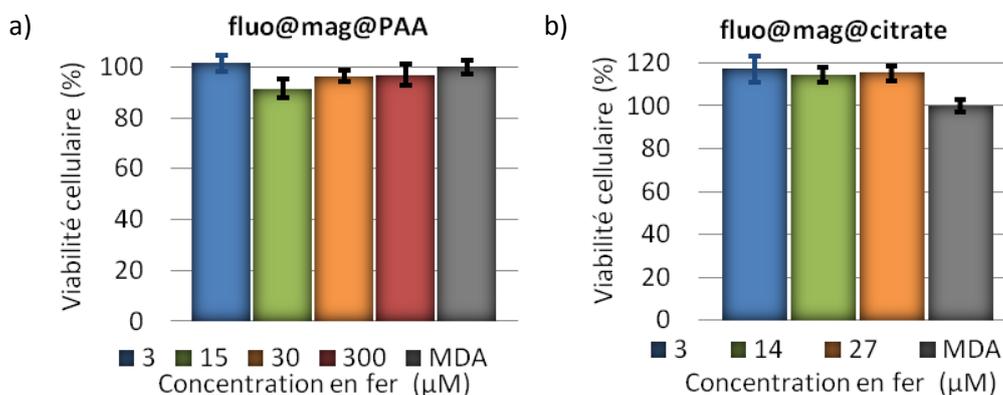


Figure 176 : Tests de viabilité cellulaire (MTT) après internalisation de nanoassemblages dans des cellules MDA. 5000 cellules ont été incubées 24 h avant l'ajout des nanoassemblages a) fluo@mag@PAA ou b) fluo@mag@citrate pour une période de 6-8 h, suivie d'une étape de lavage. La lecture de l'absorbance à 570 nm est réalisée 60 h après l'étape de lavage.

Afin de comparer l'influence de la lignée cellulaire utilisée, les mêmes études ont été réalisées en présence de cellules HEK. Pour une concentration en fer de 15 μM, aucune toxicité n'est observée (Figure 177). En revanche, une augmentation de la concentration par un facteur 20 entraîne une mortalité cellulaire non négligeable d'environ 40 %, ce qui n'avait pas été observé pour les cellules MDA. Ces résultats mettent en exergue l'importance du choix de la lignée cellulaire utilisée pour réaliser les tests de cytotoxicité, chaque lignée présentant une sensibilité propre vis-à-vis de substances étrangères.

4.2/ Internalisation *in vitro* d'assemblages hybrides

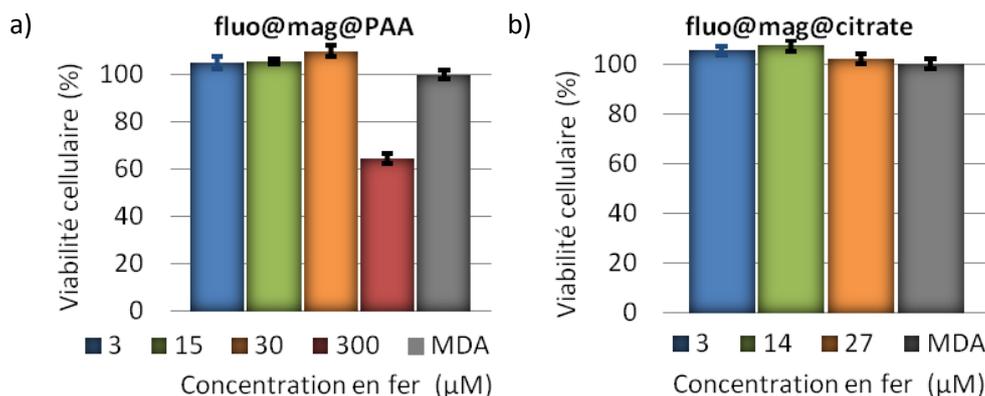


Figure 177 : Tests de viabilité cellulaire (MTT) après internalisation de nanoassemblages dans des cellules HEK. 5000 cellules ont été incubées 24 h avant l'ajout des nanoassemblages a) fluo@mag@PAA ou b) fluo@mag@citrate pour une période de 6-8 h, suivie d'une étape de lavage. La mesure de l'absorbance à 570 nm est réalisée 60 h après l'étape de lavage.

Finalement, nous avons souhaité étudier l'influence du temps d'incubation sur la viabilité cellulaires. Pour cela, nous avons incubé les cellules MDA avec les deux types de nanoassemblages pendant 60 h, soit dix fois plus longtemps que précédemment. Dans les conditions classiques d'observation à 15 µM, décrites lors de la présentation du protocole général, aucune toxicité n'est observée, mais l'augmentation de la concentration en nanoassemblages conduit à une légère diminution de la viabilité cellulaire (<20 %), probablement due à un stress prolongé pour les cellules (Figure 178). Il est tout de même nécessaire de relativiser la mortalité induite par la présence continue des nanoassemblages pendant un temps aussi long, loin de représenter les conditions d'injection *in vivo* où les substances sont aussitôt dispersées.

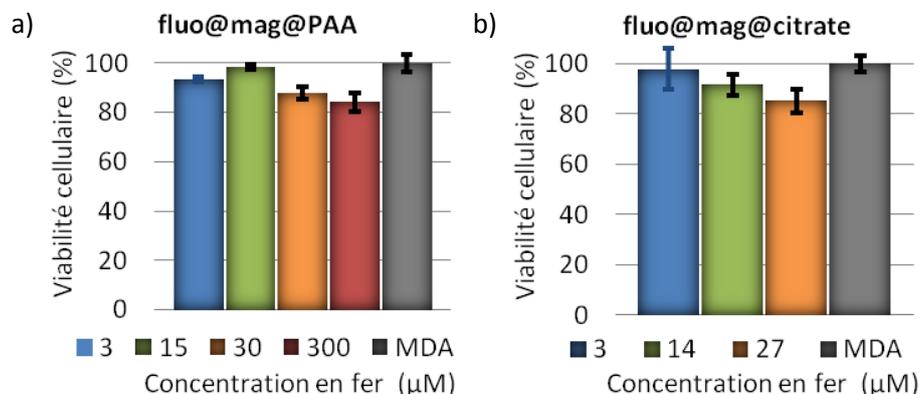


Figure 178 : Tests de viabilité cellulaire (MTT) après internalisation de nanoassemblages dans des cellules MDA. 5000 cellules ont été incubées 24 h avant l'ajout des nanoassemblages a) fluo@mag@PAA ou b) fluo@mag@citrate pour une période de 60 h, suivie d'une étape de lavage. La lecture de l'absorbance à 570 nm est réalisée directement après l'étape de lavage.

4.2.1.3 Localisation des assemblages à l'intérieur des cellules

Après avoir étudié l'internalisation et la cytotoxicité des nanoassemblages, nous nous sommes attachés à déterminer leur localisation précise à l'intérieur des cellules. Il existe de très nombreuses façons de marquer certains compartiments cellulaires, comme par exemple l'utilisation d'anticorps spécifiques, de sondes de pH ou encore de polarité. Ces marquages peuvent être effectués sur cellules vivantes ou sur cellules fixées en fonction des sondes utilisées. Dans un premier

temps, les noyaux de cellules HEK vivantes ont été marqués à l'aide d'une sonde fluorescente bleue, le Hoechst 33342 se liant à la double hélice de l'ADN (Figure 179a-b).

L'ADN des noyaux peut également être marqué en utilisant des cellules fixées, dans notre cas de type MDA. Pour cela, les cellules sont incubées en présence de nanoassemblages, puis lavées à l'aide de PBS. Une solution de paraformaldéhyde (3,7 %) est ensuite ajoutée afin de réticuler la structure cellulaire par création de liaisons entre les amines des protéines et les fonctions aldéhydes ajoutées. Le temps de fixation (ici 10 min) dépend de l'étude à réaliser puisqu'il s'agit d'une technique de fixation lente et progressive. Une étape de marquage spécifique, détaillée au prochain paragraphe, peut alors être réalisée. Pour finir, un milieu de montage contenant un marqueur nucléaire (le DAPI émettant dans le bleu) est ajouté permettant de conserver les cellules fixées sur une période de plusieurs mois (Figure 179a). Après une période minimale de 48 h, les milieux de montage, (Mowiol ou Prolong®) forment des gels semi-rigides par polymérisation du glycérol contenu dans le mélange. La présence additionnelle d'azoture de sodium dans le milieu de montage permet de diminuer le photoblanchiment des fluorophores sous irradiation lumineuse.

Que ce soit sur cellules vivantes ou sur cellules fixées, le marquage révèle l'absence de colocalisation entre les agents bleu fluorescent de l'ADN et les nanoassemblages fluo@mag@PAA. Ces derniers ne pénètrent donc pas dans les noyaux cellulaires, en accord avec leurs dimensions bien supérieures à celles des pores des membranes nucléaires (< 20 nm).

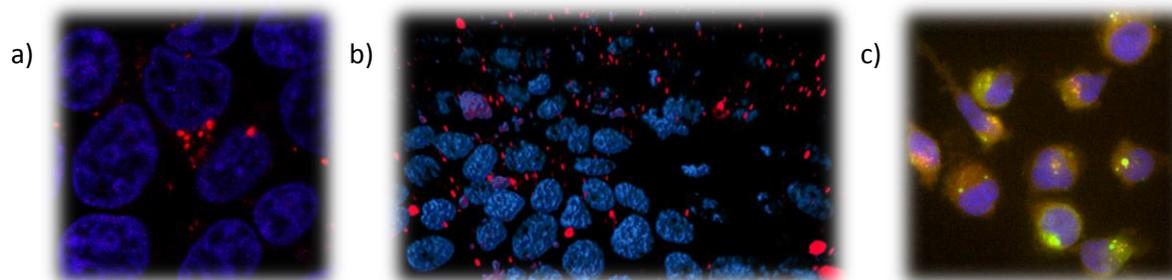


Figure 179 : Imagerie par microscopie confocale des nanoassemblages fluo@mag@PAA internalisés dans des cellules vivantes de type MDA-MB-468 pendant 24 h. Marquage des noyaux à l'aide de Hoechst ($\lambda_{exc} = 346 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 497 \text{ nm}$). a) Projection 2D et b) reconstitution 3D. c) Internalisation dans des cellules MDA fixées fluo@mag@citrate avec un marquage des noyaux à l'aide de DAPI (Bleu).

Afin de gagner en résolution sur la localisation des nanoassemblages, des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées à l'aide d'anticorps primaires, spécifiques des lysosomes chez la souris mais compatibles avec des lignées cellulaires humaines (H4B4 to Lamp2). Des anticorps secondaires anti-souris, fabriqués chez la chèvre, ont alors été utilisés, couplés à un fluorophore. Le protocole d'immunomarquage se déroule en cinq étapes.

La première étape est une perméation de la membrane cytoplasmique sur des cellules fraîchement fixées (< 48 h), effectuée à l'aide de triton (0,3 %) pendant une dizaine de minutes. La seconde étape consiste à saturer les sites de fixation possibles à l'aide de sérum physiologique, pour éviter toute interaction non spécifique entre l'anticorps secondaire et l'anticorps primaire utilisés ultérieurement. Le choix du sérum est alors primordial. En effet, la fluorescence est apportée par l'anticorps secondaire couplé à un fluorophore, et non par l'anticorps primaire, si bien qu'il faut éviter de marquer l'ensemble des entités pour ne pas récupérer de faux positifs. Une reconnaissance spécifique de l'anticorps primaire par l'anticorps secondaire est donc indispensable. Dans notre cas, l'anticorps secondaire étant produit chez la chèvre, l'étape de blocage est réalisée à l'aide de sérum

4.2/ Internalisation *in vitro* d'assemblages hybrides

de chèvre (10 %), dilué dans du triton (0,1 %). L'anticorps primaire, dilué au 1/200 dans une solution de sérum de chèvre et de triton, est alors ajouté et l'ensemble est incubé pendant une nuit à 4°C. Après plusieurs étapes de lavage à l'aide de PBS, l'anticorps secondaire est ajouté dans les mêmes conditions de concentration et de tampon physiologique pendant 1 h à température ambiante. L'anticorps secondaire est de type anti-souris (IgG (H+L)) afin de provoquer une fixation sélective. Une dernière étape de lavage est effectuée et peut être suivie par d'autres protocoles de marquage comme par exemple l'utilisation d'un marqueur nucléaire, le DRAQ5 émettant dans le rouge à une longueur d'onde supérieure à 665 nm après excitation à 647 nm. Finalement dans une cinquième et dernière étape, le montage des lames est réalisé par ajout de Prolong® ou de Mowiol.

Les clichés de fluorescence ci-dessous obtenus** par microscopie confocale montrent les noyaux marqués en bleu, les lysosomes marqués en vert et les nanoassemblages fluo@mag@PAA en rouge (Figure 180). Ces marquages confirment l'absence de nanoassemblages dans les noyaux et montrent une colocalisation des lysosomes avec les nanoassemblages. A l'évidence, les nanoassemblages sont pris en charge par les endosomes puis par les lysosomes après internalisation. Ces résultats permettent de comprendre la distribution inhomogène de la fluorescence à l'intérieur des cellules puisque les fluo@mag@PAA se retrouvent piégés au sein de ces lysosomes.

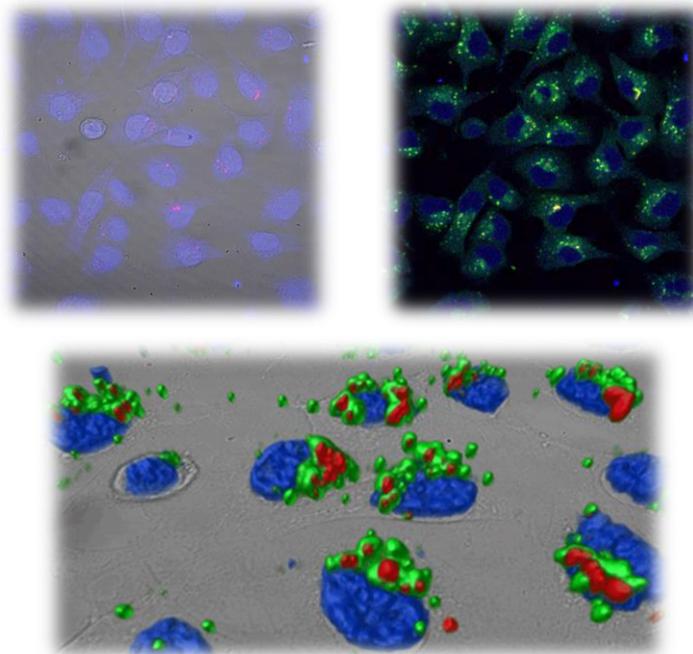


Figure 180 : Reconstruction 3D de cellules de type MDA-MB-468 internalisées avec les assemblages fluo@mag@PAA pendant 24 h. Les cellules ont été fixées puis les membranes des lysosomes ont été marquées (anticorps Anti-LAMP2 [H4B4] couplé au fluorophore Alexa488 ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} < 525 \text{ nm}$)) et colorés en vert, les noyaux ont été marqués (Draq5 ; $\lambda_{exc} = 650 \text{ nm}$; $\lambda_{em} < 750 \text{ nm}$) et colorés en bleu. Les fluo@mag@PAA sont colorés en rouge.

Une analyse quantitative de la colocalisation peut être réalisée en déterminant le coefficient de Pearson. Il s'agit de mesurer l'intensité du signal émis par pixel et de reporter chaque pixel sur un graphique (Oxy) en fonction de sa composante rouge (axe (Ox)) et de sa composante verte (axe (Oy)) (Figure 181). Dans le cas d'une colocalisation, des pixels orange et/ou jaunes apparaissent le long de la diagonale du fait de la contribution additive des deux composantes, ici rouge (nanoassemblages)

** Etudes réalisées en collaboration avec la plateforme APEX de l'INRA, pilotée par le Dr Laurence Dubreil et dirigée par le Prof Marie-Anne Colle.

et verte (lysosomes). L'analyse est alors effectuée par reconstitution 3D d'un grand nombre de cellules comportant des nanoassemblages internalisés. De manière qualitative, nous pouvons observer que la majorité des pixels s'aligne le long de la diagonale et que très peu d'entre eux sont localisés proches de l'axe (Ox), correspondant à la couleur des nanoassemblages. Concernant le marquage des lysosomes, la présence de points verts alignés le long de l'axe (Oy) indique un excès de lysosomes. Le calcul du coefficient de Pearson permet d'appréhender le degré de colocalisation. Ce coefficient varie entre -1 (parfaite exclusion) et +1 (parfaite colocalisation), avec une valeur de 0 signifiant une distribution aléatoire des systèmes. Nous avons ainsi abouti à un coefficient de colocalisation supérieur à 0,6 pour les lysosomes et les nanoassemblages, et inférieur à 0,1 pour les noyaux et les nanoassemblages, confirmant la prise en charge des nanoassemblages par les lysosomes dès leur internalisation.

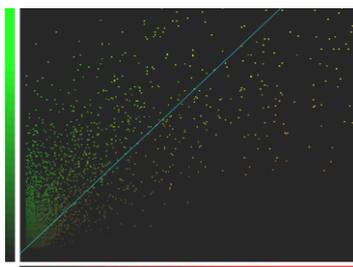


Figure 181 : Représentation de chaque pixel des images précédentes (Figure 180) en fonction de leurs intensités et de leurs couleurs.

Les lysosomes peuvent également être détectés par l'utilisation d'une sonde fluorescente sensible au pH, dû à un environnement au sein des lysosomes plus acide que celui du cytoplasme. Ces marquages peuvent alors être réalisés sur des cellules vivantes. Après incubation de cellules MDA en présence des nanoassemblages fluo@mag@PAA et lavage du surnageant, une sonde fluorescente est ajoutée (LysoTracker® Red DND-99, concentration finale 50 nM). Une durée de 30 min d'incubation est suffisante pour obtenir un marquage des lysosomes qui confirme les observations précédentes, à savoir la prise en charge des nano-objets par les lysosomes.

4.2.1.4 Quantification des nanoassemblages internalisés

Après avoir localisé les nanoassemblages au sein des cellules, la question sur leurs quantités internalisées reste encore entière. L'internalisation des nanoassemblages dépend-elle de la concentration en nanoassemblages mis en incubation avec les cellules et/ou un palier est-il observé ? Pour réaliser cette quantification, il est essentiel de cultiver les cellules dans un milieu dit blanc qui n'absorbe pas dans le domaine du visible pour ne pas interférer avec les nanoassemblages. Les milieux de culture habituels contiennent un indicateur de pH, le rouge de phénol, qui permet de contrôler visuellement leur acidité au cours du temps. Un milieu de culture RPMI incolore, dont le spectre d'absorption est présenté ci-dessous (Figure 182), a donc été utilisé pour les cellules de type MDA. Seuls les nanoassemblages fluo@mag@PAA ont été étudiés, en raison de leur stabilité architecturale durant le processus d'internalisation, garantissant une proportionalité entre propriétés d'absorption et/ou d'émission et quantité de nanoassemblages.

4.2/ Internalisation *in vitro* d'assemblages hybrides

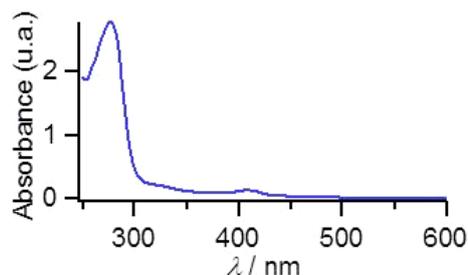


Figure 182 : Spectre d'absorption UV-vis du RPMI incolore, sans indicateur de pH.

La chute de l'absorbance de la bande à transfert de charge des nanoassemblages avant et après internalisation du surnageant est à relier à une diminution de la quantité de matière en nanoassemblages (Figure 183a). Etant donnée la stabilité de ces nanoassemblages, la quantité de matière en fluorophore est liée à la quantité de fer présent. Ainsi, un dosage du fer par spectroscopie d'émission atomique (ICP) a permis de relier la valeur d'absorbance de cette même bande, correspondant au cœur fluorescent, à une concentration en fer, présent en surface. Deux concentrations en fer du surnageant ont ainsi été utilisées, correspondant à une dilution par 10 (0,024 mM) ou par 20 (0,012 mM) de la suspension initiale des nanoassemblages fluo@mag@PAA lors de l'ajout au milieu de culture. Le dosage de la quantité de matière internalisée n'a pu être réalisé que par mesure de l'absorbance. En effet, malgré la faible absorbance du milieu de culture, un signal d'émission non négligeable est détecté sur la même plage spectrale que celle des nanoassemblages (Figure 183b), empêchant toute quantification.

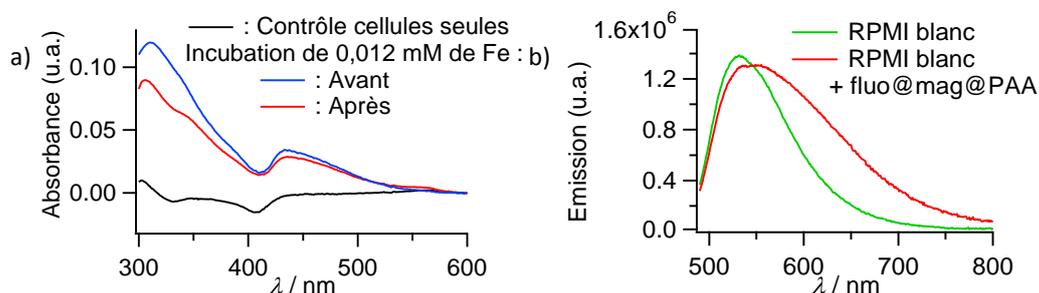


Figure 183 : Spectres a) d'absorption et b) d'émission des nanoassemblages fluo@mag@PAA avant et après internalisation pendant 24 h dans des cellules de type MDA. Concentration molaire en fer.

Les cellules présentes au moment du dosage ont été dénombrées à l'aide d'une grille de malassez. Ainsi, environ exactement 600 000 cellules étaient présentes dans chaque puits lors du dosage. Les valeurs présentées ci-dessous sont issues d'une moyenne sur deux mesures à chaque fois (Tableau 24). Les concentrations molaires et massiques sont données pour l'élément fer et le nombre de nanoassemblages par cellule a été estimé grâce aux analyses par spectrométrie de masse détaillées au chapitre 3, ayant fourni un nombre de environ 10^{10} nanosphères par millilitre.

	Incubation 0,024 mM Fe	Incubation 0,012 mM Fe
Dosage du surnageant après internalisation mM Fe	0,019	0,011
Fraction internalisée	0,21	0,08
Quantité internalisée pmole Fe / cellule	0,024	0,009
Quantité internalisée pg Fe / cellule	1,3	0,5
Quantité internalisée Nombre de fluo@mag@PAA / cellule	1200	400

Tableau 24 : Détermination de la quantité de nanoassemblages fluo@mag@PAA internalisés en fonction de la concentration utilisée.

Ces dosages montrent une augmentation linéaire de la quantité de nanoassemblages internalisés avec la concentration du surnageant. En effet, lors de l'augmentation de la concentration par deux, environ deux fois plus de nanoassemblages sont internalisés, indiquant que les cellules ne sont pas saturées en systèmes fluo@mag@PAA dans les conditions d'observation.

4.2.1.5 Etude par microscopie électronique

La preuve ultime de l'internalisation reste la microscopie électronique à transmission. En effet, la réalisation de coupes ultrafines (< 70 nm) permet d'imager l'intérieur des compartiments cellulaires et ainsi obtenir une localisation très précise de ces nanoassemblages^{††}. La réalisation de ce type d'imagerie électronique n'est possible que pour deux raisons. La première raison repose sur la présence de maghémite qui apportera le contraste nécessaire pour imager ces nanoassemblages. La deuxième raison repose quant à elle sur la stabilité du lien cœur/coquille, mise en évidence lors des chapitres précédents et qui permet de certifier que la détection de nanoparticules d'oxyde de fer sous-entend la présence concomitante de nanosphères organiques. Cette question de cohésion structurale est primordiale puisque le mode opératoire aboutissant à des coupes ultrafines de cellules implique de multiples étapes de lavages à l'aide de bains d'éthanol de concentrations croissantes, qui désagrègeraient les nanosphères organiques seules. Ce protocole, décrit lors du chapitre VI, a permis d'imager des nanoassemblages fluo@mag@PAA internalisés dans des cellules HEK. En effet, la stabilité relative des nanoassemblages fluo@mag@citrate n'a sûrement pas été suffisante puisque l'inclusion est restée infructueuse.

Classiquement, le protocole procède par la gélification d'une suspension de cellules dans une solution d'agar-agar à température ambiante. Une étape de fixation par du glutaraldéhyde est ensuite réalisée, suivie d'une étape de coloration à l'aide de tétraoxyde d'osmium, permettant d'apporter le contraste nécessaire à l'imagerie d'entités biologiques, majoritairement constituées d'atomes légers. Une étape de déshydratation est finalement effectuée à l'aide de bains d'éthanol et d'eau, de concentration croissante en éthanol avant une dernière étape de polymérisation dans une résine mixte d'oxyde de propylène et d'EPON, constituée d'un mélange d'unités époxydes et éthylène oxyde. Les kits de gélification sont également complétés par différents additifs comme des

^{††} Etudes réalisées en collaboration avec la plateforme BIBS de l'INRA, pilotée par Brigitte Bouchet et dirigée par le Dr Hélène Rogniaux. Les inclusions et les coupes ont été réalisées par Camille Alvarado.

4.2/ Internalisation *in vitro* d'assemblages hybrides

durcisseurs (anhydride de dodécényle succinique), et des accélérateurs (benzyltriméthylamine). L'observation est réalisée sur des coupes de 70 nm d'épaisseur coupées au cryotome et exposées à de l'acétate d'uranyle pour une ultime étape de fixation (Figure 184).

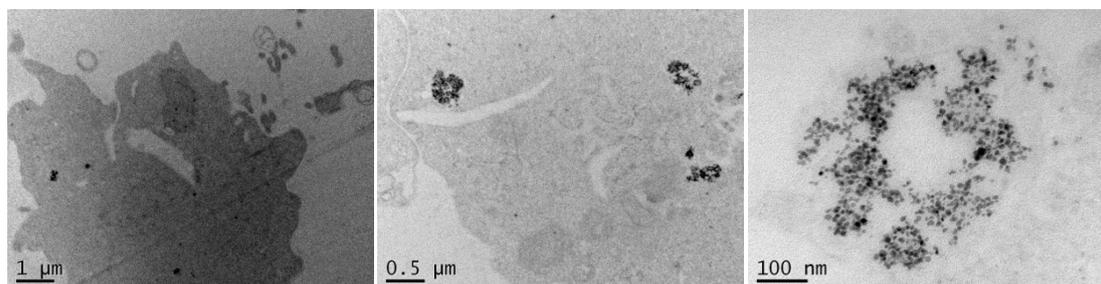


Figure 184 : Images MET obtenues après inclusion en résine oxyde de propylène / EPON de cellules de type MDA-MB-468 préalablement incubées en présence de nanoassemblages fluo@mag@PAA.

Les nanoassemblages apparaissent encapsulés dans des compartiments cellulaires spécifiques, caractéristiques d'endosomes. Cette observation confirme les expériences d'immunofluorescence, mettant en évidence une localisation des nanoassemblages dans des endosomes tardifs (lysosomes). L'architecture sphérique de type cœur-coquille semble bien avoir été conservée lors de l'internalisation, confirmant l'absence de désagrégation de ces systèmes en condition physiologique, pré-requis indispensable pour des études croisées *in vitro* et *in vivo*.

4.2.1.6 Etudes photophysiques intra-cellulaires

Afin de mieux comprendre le devenir et la stabilité des nanoassemblages à l'intérieur des cellules, une étude spectrale en microscopie de fluorescence a été réalisée^{††}. Le spectre d'émission de fluorescence des nanoassemblages internalisés a été comparé à celui des nanoassemblages situés à l'extérieur des cellules MDA.

Dans un premier temps, on observe un déplacement hypsochrome du maximum d'émission de 18 nm pour les systèmes fluo@mag@PAA internalisés, probablement dû au caractère plus hydrophobe de l'environnement intracellulaire (Figure 185a). En revanche, pour les nanosphères organiques FON composées de fpoH seul (13) ce décalage est bien plus important et s'accompagne d'un élargissement significatif du spectre d'émission (Figure 185b), suggérant une distribution de géométries de fluorophores, issues de nanosphères probablement désagrégées. Les maxima d'émission centrés vers 525 nm et 590 nm pour les nanosphères et les nanoassemblages internalisés confirment les émissions respectivement verte et orange observées sous microscope plein champ à l'aide de la caméra couleur.

^{††} Etudes réalisées en collaboration avec la plateforme MicroPICell de l'IRS-Université de Nantes pilotée par le Dr. Philippe Hulin et le Dr Steven Nedellec, sous la responsabilité du Prof. Jacques Le Pendu.

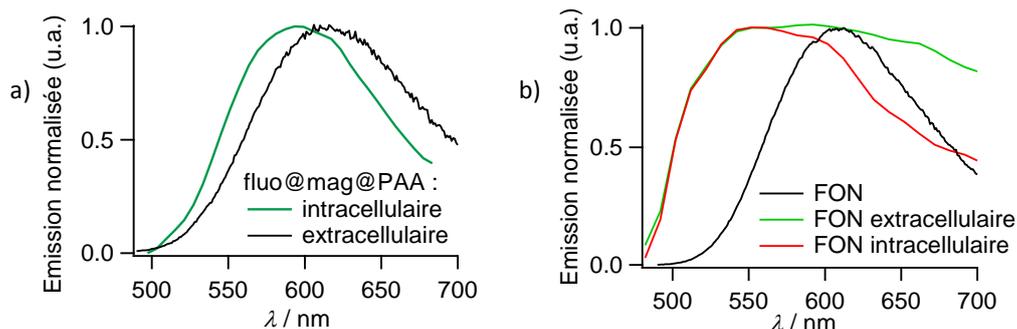


Figure 185 : Spectres d'émission mesurés sur des cellules MDA incubées avec des a) nanoassemblages fluo@mag@PAA et b) nanosphères (FON) de fpoh (13).

Des mesures de fluorescence résolue en temps par la technique FLIM (*fluorescence life-time Imaging* – $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 550 \text{ nm}$) mettent également en évidence un comportement légèrement différent entre les nanosphères et les nanoassemblages hybrides, provenant probablement de la présence d'un environnement différent dans le cas de la présence ou non des ligands PAA (Figure 186). Ces mesures semblent potentiellement confirmer les observations précédentes avec une désagrégation des nanosphères organiques, non observée pour les nanoassemblages fluo@mag@PAA.

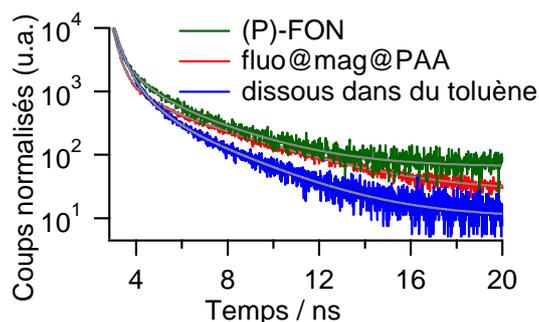


Figure 186 : Déclins de fluorescence par FLIM de nanosphères et de nanoassemblages internalisés dans des cellules vivantes MDA, et des fluorophores correspondants en solution dans le toluène.

De la même manière, les déclins de fluorescence ont pu être enregistrés après internalisation dans des cellules HEK, selon les mêmes conditions d'observation et d'enregistrement (Figure 187). Un comportement identique est alors obtenu.

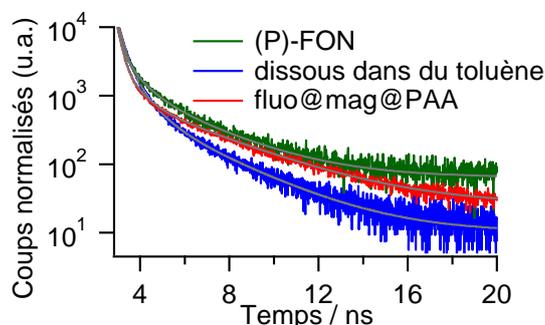


Figure 187 : Déclins de fluorescence par FLIM de nanosphères et de nanoassemblages internalisés dans des cellules vivantes HEK, et des fluorophores correspondants en solution dans le toluène.

Ces différentes études ont permis de mettre en évidence un point crucial, l'effet stabilisant exercé par la couche de polyélectrolytes sur les nanoassemblages lors des processus

4.2/ Internalisation *in vitro* d'assemblages hybrides

d'internalisation. La dynamique de complexation-décomplexation des ligands à la surface des nanoparticules d'oxyde de fer rend les petites molécules, comme les citrates, inadaptées pour assurer une forte cohésion des assemblages et éviter leur désagrégation lors du processus d'internalisation cellulaire. De même, en l'absence de stabilisant à base de polyélectrolytes comme c'est le cas pour les nanosphères organiques seules, la modification de leur spectre d'émission après internalisation laisse supposer une dissociation du cœur organique. Nous allons maintenant nous intéresser plus spécifiquement aux nanosphères organiques seules, afin d'appréhender le comportement de toutes les couches constitutives des nanoassemblages hybrides finaux.

4.2.2 Etudes d'internalisation en fonction de la nature des nanosphères

Les nanosphères organiques fluorescentes (FON) peuvent être classées en deux catégories, en fonction de la nature du groupe en surface, hydrophobe ou polaire ionisable.

4.2.2.1 *Internalisation de nanosphères ionisables*

Intéressons nous dans un premier temps à l'internalisation de nanosphères ionisables constituées des fluorophores fdcooh (8) et fpoh (13).

L'internalisation de nanosphères de fpoh (13) ((P)-FON) (Figure 188) et de fdcooh ((C)-FON) (Figure 189) dans des cellules de type MDA se déroule en seulement 2 h, comparé aux 6 h requises pour les nanoassemblages. L'imagerie de fluorescence par microscopie plein champ à l'aide d'une caméra couleur (Figure 188b et Figure 189c) révèle des points brillants orangés ainsi qu'une émission plus diffuse décalée dans le vert. Nous avons attribué cet effet hypsochrome du maximum d'émission à des fluorophores désagrégés de la nanosphère et confinés dans un environnement apolaire tandis que les nanosphères non dissociées sont responsables des points brillants. Il nous faut également signaler une photostabilité moindre pour les nanosphères, non protégés par la couronne inorganique, par rapport aux nanoassemblages.

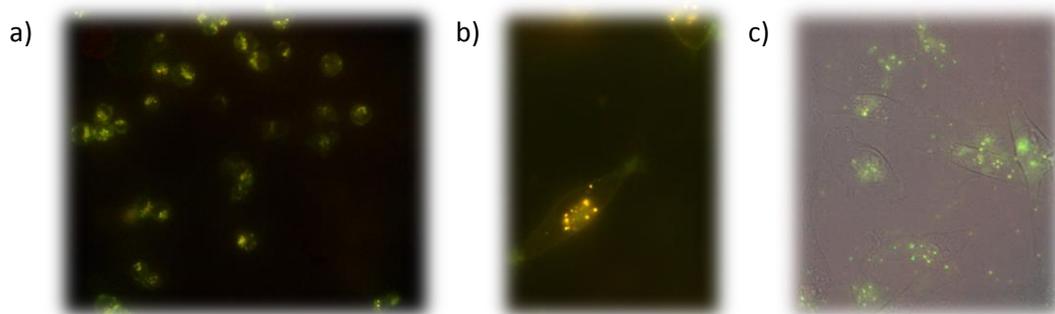


Figure 188 : Imagerie couleur par microscopie à épifluorescence de l'internalisation de (P)-FON dans des cellules MDA vivantes après a) 2 h 10, b) 5h (caméra couleur) et c) 8 h 30.

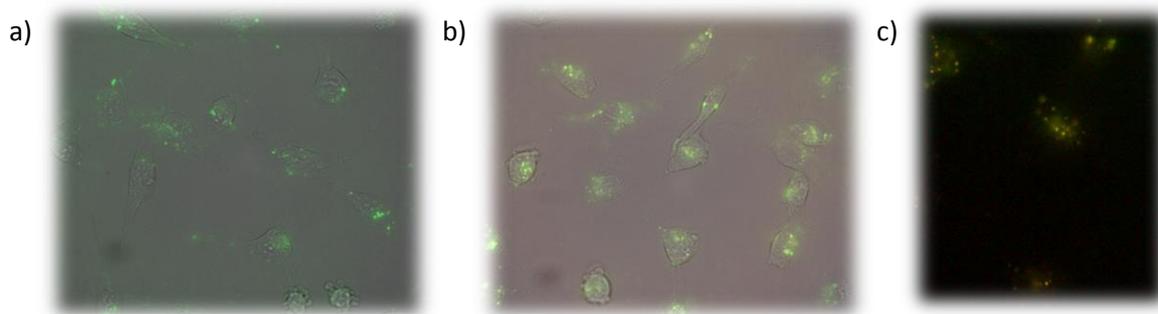


Figure 189 : Imagerie couleur par microscopie à épifluorescence de l'internalisation de (C)-FON dans des cellules MDA vivantes après a) 2 h, b) 8 h 30 et c) en utilisant une caméra couleur.

De même que pour les nanoassemblages, aucune nanosphère n'a pu être trouvée à l'intérieur des noyaux, alors marqués par du DAPI lors du processus de fixation des cellules MDA après 16 h d'incubation (Figure 190).

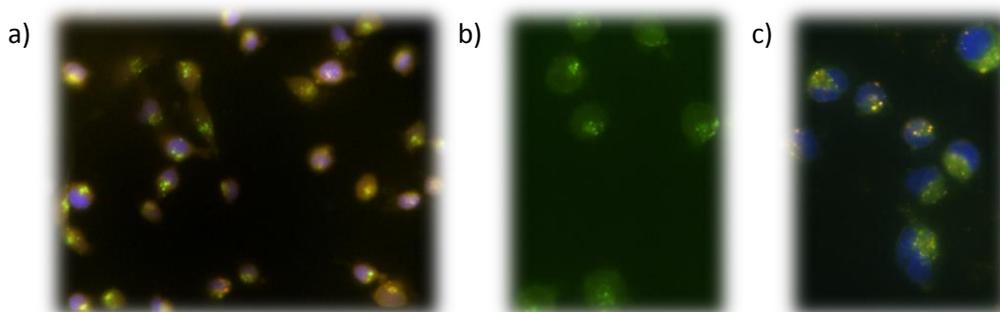


Figure 190 : Imagerie par microscopie à épifluorescence de cellules MDA fixées avec des nanosphères (P)-FON après 16 h a) avec les noyaux marqués au DAPI et b) en utilisant une caméra couleur. c) Internalisation des nanosphères (C)-FON après 15 h avec les noyaux marqués au DAPI.

Le gain de résolution apporté par la microscopie confocale est visible sur les clichés obtenus ci-dessous après incubation de nanosphères (P)-FON (Figure 191) et de (C)-FON (Figure 192), dans des cellules de type HEK.

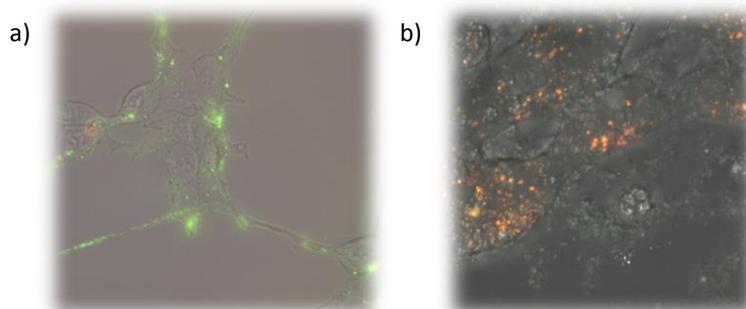


Figure 191 : Imagerie de l'internalisation de cellules HEK vivantes avec des nanosphères (P)-FON par a) microscopie plein champ après 8 h 30, et b) par microscopie confocale après environ 12 h (53 μm x 53 μm).

4.2/ Internalisation *in vitro* d'assemblages hybrides

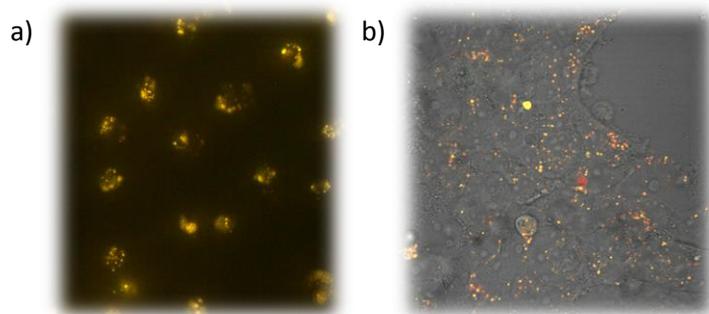


Figure 192 : Imagerie de l'internalisation de cellules HEK vivantes avec des nanosphères (C)-FON par a) microscopie plein champ après 25 h et b) par microscopie confocale après environ 12 h (53 µm x 53 µm).

Au vu du manque de stabilité des nanosphères organiques lors de leur traversée de la membrane cytoplasmique, nous pouvons nous interroger sur leur toxicité due à un relargage éventuel d'une grande quantité de fluorophores. Les tests de viabilité cellulaire, réalisés sur deux lignés cellulaires incubées avec des nanosphères de (P)-FON (1 µM) pendant 8 h, ne montrent à nouveau aucune cytotoxicité (Figure 194).

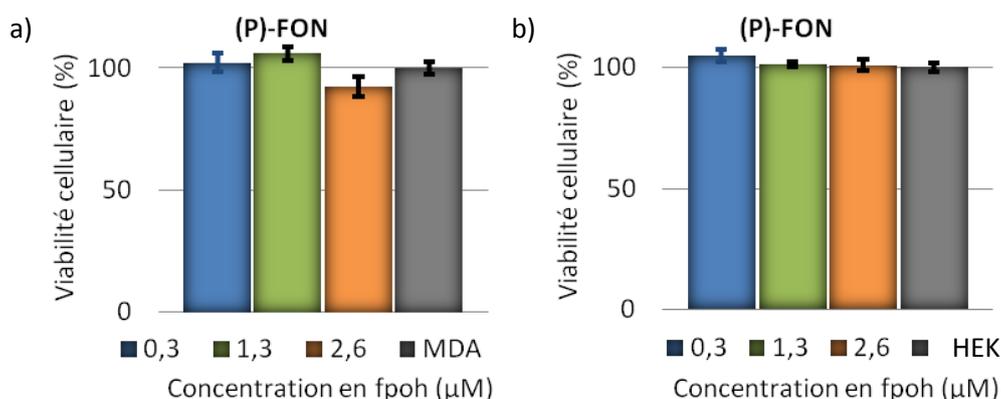


Figure 193 : Test de viabilité cellulaire (MTT) après internalisation de (P)-FON dans des cellules a) MDA-MB-468 et b) HEK-293. 5000 cellules ont été incubées 24 h avant l'ajout (P)-FON pour une période de 6-8 h, suivis d'une étape de lavage. La lecture de l'absorbance à 570 nm 60 h après lavage.

L'étude de l'internalisation de nanosphères organiques a mis en évidence un phénomène de désagrégation lors de l'internalisation, dû au passage au travers de la membrane lipidique, apolaire. La fluorescence émise par les molécules dissociées est alors décalée vers les plus hautes énergies et apparaît sous forme diffuse aux niveaux des compartiments intracellulaires et de la membrane.

4.2.2.2 Internalisation de nanosphères non ionisables hydrophobes

La deuxième classe de nanosphères étudiées implique les fluorophores modèles formés d'esters phosphoniques.

De précédentes études réalisées au sein de l'équipe¹²² avaient déjà mis en évidence une désagrégation des nanosphères organiques, initialement composées du fluorophore fvin (1), lors de leur internalisation dans des cellules murines de type NIH3T3. De nouvelles expériences avec des cellules MDA présentent une fluorescence diffuse verte à l'intérieur des cellules, caractéristique de molécules fvin dissociées (Figure 194a) tandis que les nanosphères intègres, situées à l'extérieur des cellules, donnent lieu à un signal brillant orangé (Figure 194b).

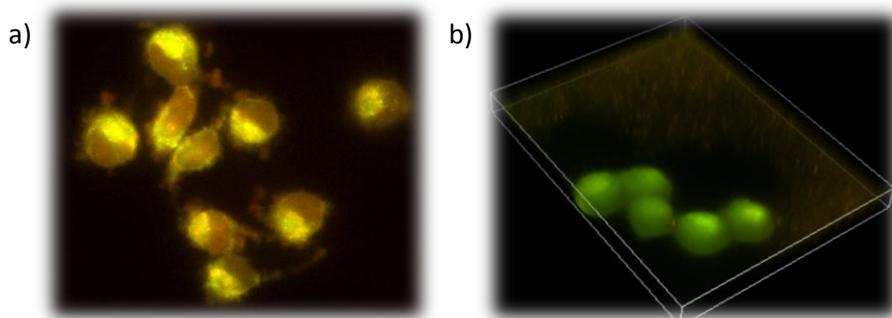


Figure 194 : Imagerie par microscopie à épifluorescence plein champ de de cellules MDA fixées après incubation avec des nanosphères composées de fvin (1) après 16h a) en 2D et b) par reconstruction 3D (107*143*11 μm) en utilisant une caméra couleur.

L'internalisation de l'ester fotbu (7), nano-reprécipité sous forme de nanosphères, conforte l'hypothèse de désagrégation, avec la présence de points brillants, principalement en dehors des cellules et des zones d'émission plus diffuses à l'intérieur (Figure 195).

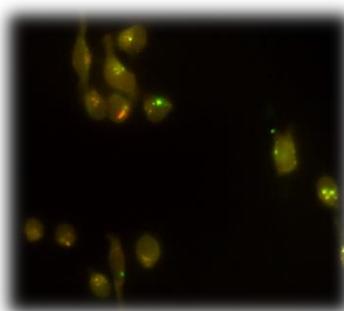


Figure 195 : a) Imagerie par microscopie à épifluorescence plein champ de cellules MDA fixées incubées avec des nanosphères composées de fotbu (7) après 16 h.

Quelle que soit la structure de l'ester utilisé ou le type de cellules utilisées, une fluorescence diffuse au sein des cellules est observée. Par rapport aux nanosphères ionisables, l'intensité de fluorescence diffuse est plus prononcée, comme le montre le cliché de microscopie de fluorescence de nanosphères à base phosphonate fpoet (12) (Figure 196).

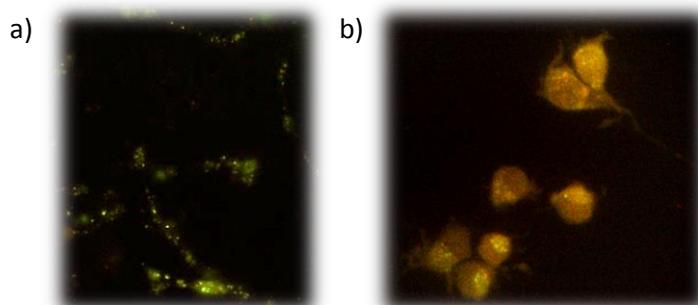


Figure 196 : a) Imagerie par microscopie à épifluorescence plein champ de de cellules HEK vivantes incubées avec des nanosphères composées de fpoet (12) après environ 16 h. b) imagerie par microscopie à épifluorescence de cellules MDA fixées après 16 h.

Finalement, aucune influence de la chaîne latérale et de la présence d'un groupe complexant protégé n'est observée par l'internalisation de nanosphères de composé fc20 (5), constitué d'une chaîne latérale hydrophobe inerte (Figure 197).

4.2/ Internalisation *in vitro* d'assemblages hybrides

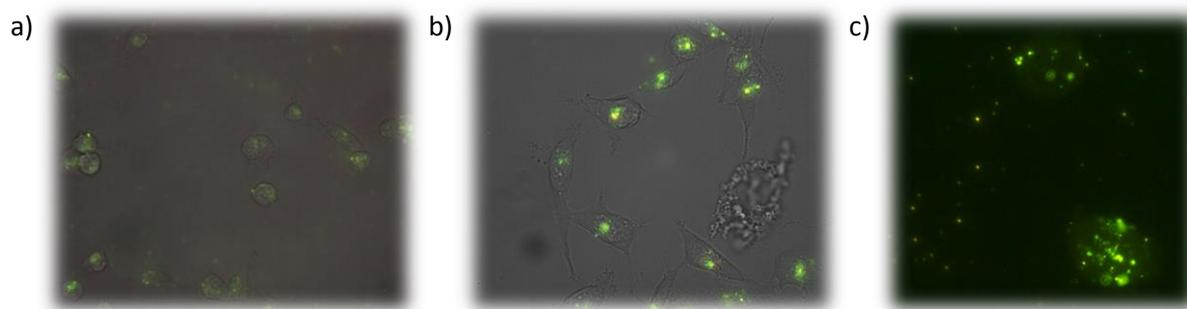


Figure 197 : Imagerie par microscopie à épifluorescence plein champ de cellules MDA vivantes incubées avec des nanosphères composées de fC₂₀ (5) après a) 2 h 10, b) 5 j. c) imagerie de cellules fixées après 15 h en utilisant une caméra couleur.

Pour conclure, l'internalisation de nanosphères organiques, constituées de fluorophores non liés de manière covalente provoque une dissociation de l'assemblage au profit de la libération de molécules libres. Cette désagrégation contrôlée pourrait s'avérer très importante dans le futur afin de délivrer de fortes concentrations de principes actifs préalablement encapsulés lors de la nanoprecipitation. Une étape de fonctionnalisation ultérieure pour gagner en spécificité de ciblage restera encore à développer.

4.2.2.3 Etude de dégradation de nanosphères hydrophobes en présence de macrophages.

Nous avons souhaité voir dans quelle mesure les études d'internalisation menées sur des cellules cancéreuses pouvaient s'étendre à des macrophages. Une collaboration avec le Dr. Luis Cordova Jara^{§§} nous a permis de tester ces mécanismes en utilisant des nanosphères fc20 (5) dont la chaîne alkyle en C₂₀ permettait de mimer le comportement de nanoparticules de polyéthylène issues de l'abrasion continue de prothèses de hanche constituées de polyéthylène réticulé. Après 7 jours de culture de monocytes humains, des macrophages M0 ont été obtenus, pouvant se différencier en macrophages pro-inflammatoires M1 selon la nature de l'environnement, détaillé dans le chapitre VI.

Dans un premier temps, le suivi de l'internalisation a été réalisé par cytométrie de flux grâce aux propriétés de fluorescence des nanosphères fc20 (5). L'internalisation des nanosphères est détectée après seulement une heure (Figure 198) et atteint un palier après un jour. Les graphiques de cytométrie de flux présentent en ordonnée le nombre de cellules détectées et en abscisse l'intensité de fluorescence par cellule. Cette détection par fluorescence a été réalisée en utilisant deux canaux de détection, l'un centré sur 525 nm (« gamme verte », Figure 198a) et l'autre sur 575 nm (« gamme rouge », Figure 198a), après excitation à 488 nm. La similarité des intensités de fluorescence pour ces deux canaux semble indiquer une désagrégation immédiate des nanosphères (canal vert) ainsi qu'une internalisation continue des nanosphères via l'augmentation de l'intensité de fluorescence du canal « rouge ».

^{§§} Etudes réalisées en collaboration avec le laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, UMR_S 957, Université de Nantes, dirigé par le Prof. D. Heymann.

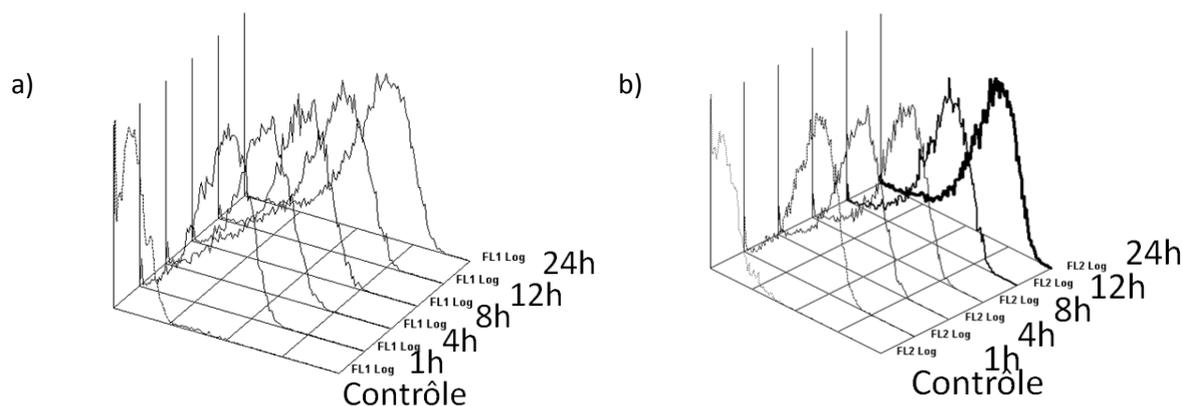


Figure 198 : Analyse par cytométrie de flux de l'internalisation de nanopshères de fc20 (5) dans des macrophages. L'axe (Oy) représente le nombre de cellules et l'axe (Ox) l'intensité de fluorescence par cellule. La détection a été réalisée selon deux canaux a) FL1 (environ 500-550 nm) et b) FL2 (environ 550-600) après excitation à 488 nm.

Afin de mieux comprendre l'évolution précédente, une fixation de macrophages de type M0 et M1 a été réalisée après internalisation des nanopshères pendant 48 h. Les macrophages sont préalablement marqués au niveau de leur cytosquelette (Phalloïdin Alexa Fluor 546, émettant dans le rouge) et de leurs noyaux (DAPI, émettant dans le bleu). Les clichés de microscopie confocale de fluorescence révèlent des nanopshères à l'extérieur de la cellule ainsi que des vésicules de dimension micrométrique, émettant un vert brillant à l'intérieur des cellules (Figure 199). Ce type de vésicule est totalement absent pour des macrophages seuls, exempts de nanopshères. Le spectre d'émission de nanopshères extracellulaires présente un maximum centré sur 580 nm alors que qu'il est centré aux alentours de 540 nm pour les vésicules excrétées par les macrophages. Ces valeurs rappellent celles observées après internalisation de nanopshères fluorescentes dans différentes cellules. Compte tenu des expériences précédentes, nous pouvons raisonnablement proposer que les fluorophores, une fois dissociés, se retrouvent emprisonnés dans des vésicules, et finissent par être éjectés. Et ce d'autant que cette sécrétion d'exosomes a été mise en évidence par le suivi du devenir des macrophages en microscopie de fluorescence.

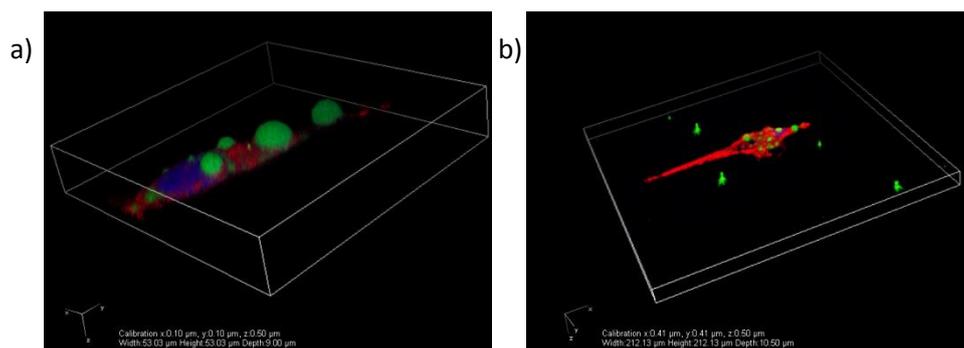


Figure 199 : Imagerie par microscopie confocale de l'internalisation (après 48 h) de nanopshères de fc20 (5), après excitation à 488 nm, dans des macrophages de type a) M0 et b) M1.

Ces différences spectrales se retrouvent également au niveau des déclin de fluorescence du fluorophore fc20 sous forme de nanopshères (extracellulaire) ou sous forme moléculaire à l'intérieur des vésicules (intracellulaire) (Figure 200). Le temps de vie moyen à l'état excité croît en effet de 2,3 ns à 2,8 ns pour les nanopshères et les vésicules respectivement. Ce dernier temps du composé dissous se rapproche des constantes de temps mesurées en solvant organique comme le toluène par exemple.

4.2/ Internalisation *in vitro* d'assemblages hybrides

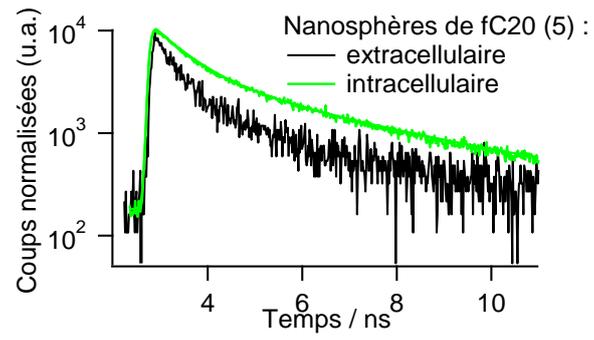


Figure 200 : Déclinés de fluorescence enregistrés à environ 550 nm après excitation à environ 450 nm, en fonction de la localisation du composé fc20 (5) dans les macrophages.

4.3 Internalisation *in vivo* d'assemblages hybrides

Les études *in vitro* précédentes ont démontré une cohésion très élevée pour les assemblages magnéto-fluorescents fluo@mag@PAA, contrairement aux nanoassemblages fluo@mag@citrates présentant des petites molécules de type citrate comme stabilisants. Toutes les études d'imagerie présentées jusque là ont été réalisées par microscopie de fluorescence, sans recourir aux propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer. Les différentes études physico-chimiques, détaillées lors des chapitres précédents, avaient également établi une forte complexation entre les entités magnétiques et fluorescentes, d'où le fait que la détection des uns informe sur la présence des autres. Nous nous sommes ainsi intéressés à valider ces nanoassemblages hybrides comme sondes bimodales *in vivo*. La complexité d'un milieu biologique peut entraîner en effet une rupture du lien cœur / coquille, entraînant des difficultés importantes pour détecter soit la fluorescence, soit le magnétisme, soit les deux.

Trois études ont alors été réalisées sur un total de 5 souris femelles (BALB/C de 5 semaines), issues d'une même portée, pour assurer une reproductibilité des résultats. L'imagerie par IRM nous a permis de détecter les nanoassemblages fluo@mag@PAA injectés par la veine caudale. Une fois les souris sacrifiées, les organes ont été prélevés et fixés dans des conditions permettant l'analyse de coupes fines par microscopie de fluorescence excitée à un ou deux photons et par microscopie électronique.

4.3.1 Imagerie par résonance magnétique (IRM)

Les expériences suivantes ont été réalisées dans le strict cadre des règles de protection des animaux, édictées par l'INSERM. L'injection, le sacrifice des animaux et le prélèvement des organes ont été réalisés au sein du laboratoire PARCC***.

Dans un premier temps, avant injection, l'imagerie de chaque animal a été réalisée, fournissant une référence du contraste négatif naturel des organes d'études. La présence de charge négative en surface des nanoassemblages prédit une prise en charge très rapide par le RES et une accumulation au niveau des organes de nettoyage, le foie et la rate¹⁸³. L'optimisation du temps d'écho (TE) a été réalisée sur ces deux organes et une valeur de 5 ms a été choisie. La coupe témoin du foie (Figure 201a) présente un contraste similaire à celui obtenu avec un tube contrôle contenant de l'eau et placé à côté de l'animal lors de l'enregistrement. L'injection d'une solution de fluo@mag@PAA dans la veine caudale (250 μ L, 1.30 μ mol.mL⁻¹ fer, soit 0.73 mg fer / kg souris) permet d'augmenter ce contraste 25 min après injection (Figure 201b). L'imagerie de cette même souris après 3h50 présente un contraste identique, indiquant une capture efficace des nanoassemblages par le foie et l'absence de relargage.

*** Etudes réalisées en collaboration avec le Dr Thomas Maldiney, de la plateforme d'imagerie du petit animal de l'Université de Paris-Descartes du laboratoire de Paris-centre de recherche Cardiovasculaire (PARCC) de l'hôpital européen Georges-Pompidou (HEGP). La plateforme est dirigée par le Prof. Olivier Clément et l'enregistrement des séquences a été réalisée par le Dr. Gwennael Autret.

4.3/ Internalisation *in vivo* d'assemblages hybrides

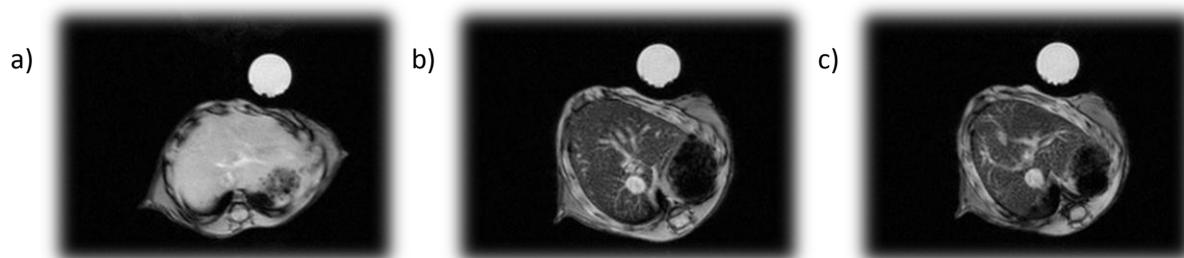


Figure 201 : Coupes IRM (4 cm x 4 cm) a) avant, b) 25 min après injection et c) 3h50 après injection. Séquence T2*, (4.7 Tesla, Biospec 47/40 USR Bruker), TR = 300 ms, echo time TE = 5 ms, flip angle 30°.

Le contraste obtenu peut être quantifié par le calcul du facteur ENH (%), défini par l'équation (Équation 31) ci-dessous, où l'intensité du signal mesurée après injection (S) est comparée à cette même intensité avant injection (S_{ref}). Une augmentation du contraste de près de 49 %, moyennée sur 4 souris, a alors été obtenue et provient de l'accumulation de nanoparticules au sein du foie. Cette valeur est comparable à celles obtenues dans la littérature mais pour des doses généralement injectées 10 fois plus faibles.

$$ENH (\%) = \left(S - S_{ref} \right) - \frac{100}{S_{ref}} \quad (31)$$

La rate étant également susceptible de piéger ces nanoassemblages, des coupes en IRM ont été réalisées, avant (Figure 202a) et après (Figure 202b) injection. Un faible contraste négatif naturel est observé au niveau de la rate, présente en haut à droite de la coupe. Une augmentation du contraste de 13 % (ENH) est alors obtenue, due à la présence des nanoparticules d'oxyde de fer. Ce plus faible contraste, comparé à celui obtenu pour le foie, provient d'une capture des nanoassemblages moins efficace par la rate.

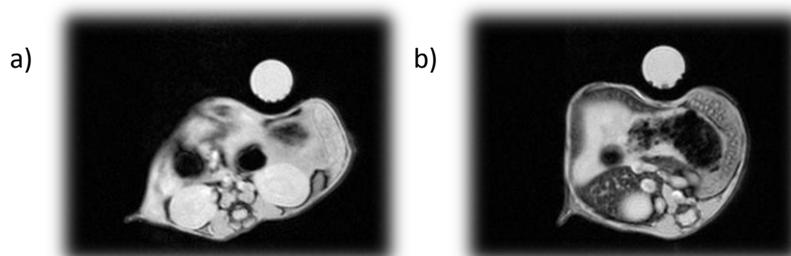


Figure 202 : Coupes IRM (4 cm x 4 cm) a) avant et b) 25 min après injection. Séquence T2*, (4.7 Tesla, Biospec 47/40 USR Bruker), TR = 300 ms, echo time TE = 5 ms, flip angle 30°.

Afin de rationaliser ces études d'imagerie par IRM, deux points importants doivent être discutés. Le premier point repose sur l'absence de propriété de furtivité, généralement apportée par la présence de PEG, greffés en surface. En effet, dans le cas présent, presque toute la quantité injectée va parvenir jusqu'au foie pour contribuer à l'augmentation du contraste. De plus, le temps de circulation étant très court, il y a peu de chance que les nanoassemblages se soient déposés dans d'autres tissus ou organes. L'ajout d'une propriété de furtivité et de ciblage permettra bien évidemment de cibler une zone d'intérêt mais sous-entend également une diminution du contraste obtenu.

Le deuxième point concerne les propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer. Pour contrebalancer le point précédent, les nanoparticules utilisées pour l'imagerie IRM ne sont pas celles présentant les meilleures propriétés de relaxivité ou encore d'aimantation à saturation. En

effet, des nanoparticules de magnétite ou des nano-objets magnétiques comme des cubes ou des nano-fleurs^{191,192} pourraient être utilisés, présentant une meilleure réponse magnétique, ce qui nécessitera dans le futur d'adapter le protocole de synthèse actuel.

4.3.2 Analyse ex vivo de la biodistribution des nanoassemblages injectés

L'étude des différents tissus potentiellement en contact avec les nanoassemblages a nécessité le sacrifice des souris après 24 h. Les cinq principaux organes foie, rate, rein, poumons et cœur ont alors été extraits puis immergés successivement dans un bain de fixation contenant du zinc (Pharmingen, France) pendant 48 h à 4°C pour éviter une dégradation des fluorophores et un bain de formaldéhyde (3,7 %) contenant du sucrose (20 %) pendant 24 h à 4°C. Les tissus sont alors congelés dans de la paraffine (OCT, Tissue-Tek) en utilisant des vapeurs de diazote liquide, puis stockés pour plusieurs mois à -79°C.

4.3.2.1 *Etudes par microscopie de fluorescence à excitation monophotonique*

L'étude des tissus^{†††} par microscopie de fluorescence nécessite la réalisation de coupes d'environ 20 µm d'épaisseur à l'aide d'un cryotome opérant à -20°C. Ces coupes sont déposées sur une lame de microscope de type SuperFrost puis séchées à température ambiante pendant 2 h. Un milieu de montage est alors ajouté pour une conservation optimale des tissus, contenant ou non un marqueur nucléaire, ici le DAPI. Les tissus de la souris 4 ont d'abord été utilisés (S4) et deux niveaux de coupe ont été préparés, N1 en périphérie de l'organe et N2 en son centre. L'imagerie à l'aide d'un microscope plein champ (Figure 203b) nous permet de détecter aisément les nanoassemblages fluo@mag@PAA grâce à leur brillance élevée malgré la forte autofluorescence de tissus comme le foie. Il est possible également de visualiser ces nanoparticules à l'extérieur des noyaux, dans des zones plutôt sombres, correspondant probablement à des vaisseaux sanguins.

Afin d'attribuer sans ambiguïté les points aux nanoassemblages, une observation par microscopie confocale couplée à une détection spectrale a été effectuée. De nouveau, (Figure 203a) les nanoassemblages (points oranges) sont observés sans ambiguïté sur un fond intense d'autofluorescence vert.

^{†††} Etudes réalisées en collaboration avec les plateformes Micromorph et MicroPICell, dirigé par le Prof. Jacques Le Pendu, avec respectivement Myriam Robard et Stéphanie Blandin ; Dr. Philippe Hulin et le Dr Steven Nedellec

4.3/ Internalisation *in vivo* d'assemblages hybrides

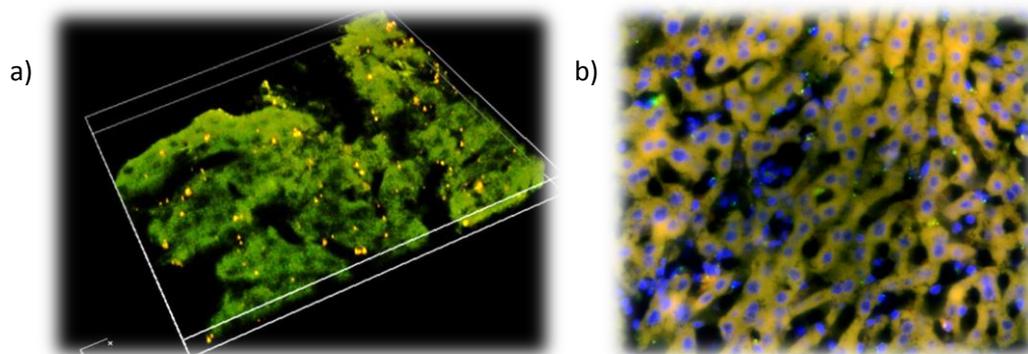


Figure 203 : a) Reconstitution 3D (212 x 212 x 14 μm) par microscopie confocale d'une coupe de foie de souris (S4N2) et b) imagerie par microscopie à épifluorescence (1121 x 946 μm) avec les noyaux marqués en bleues (DAPI), l'autofluorescence en orange et les nanoassemblages en vert.

Une détection spectrale montre que l'émission des points brillants apparaît à plus basse énergie que celle de l'autofluorescence (Figure 204a). L'attribution de l'émission orange aux nanoassemblages a été confortée par la similarité de l'émission provenant de nanoassemblages fluo@mag@PAA dispersés dans l'OCT, milieu d'imprégnation du foie avant congélation. Toute contribution due à de la lipofuscine, pigment présent dans le foie en assez faible quantité toutefois vu le jeune âge des souris sacrifiées, et émettant dans la même gamme spectrale que celle des nanoassemblages a été écartée grâce à des mesures de fluorescence résolue en temps¹⁹³.

Aucune contribution aux alentours de 1,34 ns propre à la lipofuscine n'a été détectée par mesure du déclin de fluorescence (Figure 204b). En revanche, les déclins de fluorescence entre les points brillants dans le foie et les nanoassemblages dans l'OCT ont été trouvés très similaires, tout en étant significativement distincts de ceux du foie. Ces mesures nous permettent définitivement de confirmer l'accumulation des nanoassemblages et de statuer sur l'intégrité des architectures duales dans le foie en dépit de leur prise en charge par des protéines depuis leur injection *in vivo*.

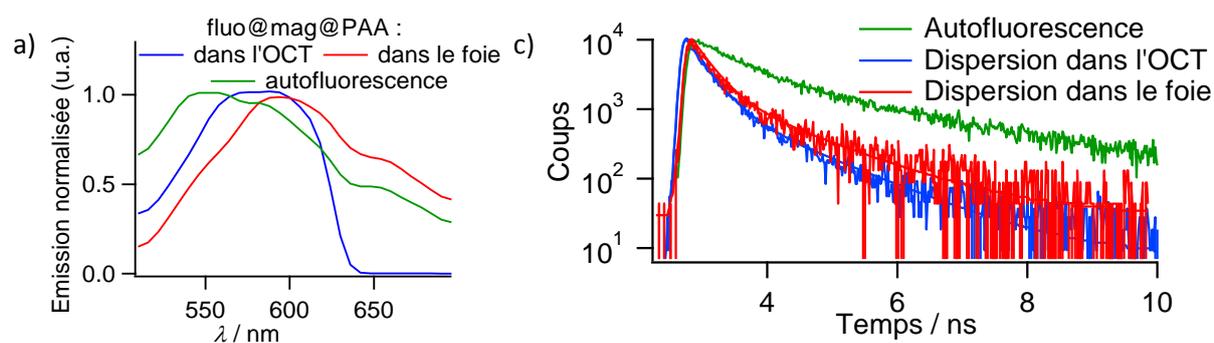


Figure 204 : a) Etudes spectrales après excitation à 488 nm d'une coupe de foie après injection (S4N2) et b) mesure des déclins de fluorescence à environ 550 nm par FLIM, après excitation à environ 450 nm.

L'utilisation de sondes fluorescentes pour imager le foie est généralement très peu utilisée en raison de l'autofluorescence très intense de cet organe. La détection aisée des nanosphères au sein des coupes de foie provient de leur forte brillance et de leur déclin de fluorescence très distinct de celui de l'autofluorescence.

4.3.2.2 Etudes par microscopie de fluorescence à excitation biphotonique

Afin de gagner en sensibilité et en résolution dans la localisation des nanoassemblages, les coupes de tissus ont également été imagées par fluorescence excitée à deux photons^{†††}, les nanoassemblages absorbant de manière significative sur la plage 800-950 nm ($\sigma_{\text{TPE}} > 10^5$ GM par assemblage – études non détaillées dans le cadre de ce manuscrit). En effet, l'excitation biphotonique s'accompagne d'une largeur spectrale d'excitation plus fine et d'une excitation dans le proche infrarouge où les tissus absorbent le moins, d'où une autofluorescence limitée. Les coupes des organes extraits, d'une épaisseur de 10 μm , ont été imagées sous excitation biphotonique à 830 nm en utilisant une détection spectrale à l'aide d'une barrette de photomultiplicateurs GaAsP, représentant les « vraies » couleurs émises. Cette longueur d'onde d'excitation offre un meilleur rapport signal sur bruit comparé à celui obtenu par excitation au maximum de la section efficace d'absorption à deux photons à 920 nm, due à une puissance plus élevée délivrée par le laser à 830 nm. Les images 2D (91 x 91 μm) représentent l'ensemble des couleurs émises tandis que sur les images 3D (130 x 130 x 10 μm), seuls deux canaux d'émission ont été activés, l'un dans le rouge ($\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}758$ nm) pour les nanoassemblages fluo@mag@PAA, et l'autre dans le bleu ($\lambda_{\text{em}} = 411\text{-}490$ nm) pour les noyaux, en éliminant la composante due à l'autofluorescence. L'observation des coupes des autres souris a été réalisée mais n'est pas présentée dans le cadre de ce manuscrit puisque sensiblement identique.

L'image du foie (Figure 205a) fournit toujours un fond d'autofluorescence verte. Outre les noyaux teintés émettant dans le bleu, nous pouvons distinguer les nanoassemblages sous forme de petits points émettant dans le jaune orangé (rouge sur l'image 3D) systématiquement localisés près de zones sombres (Figure 205b).

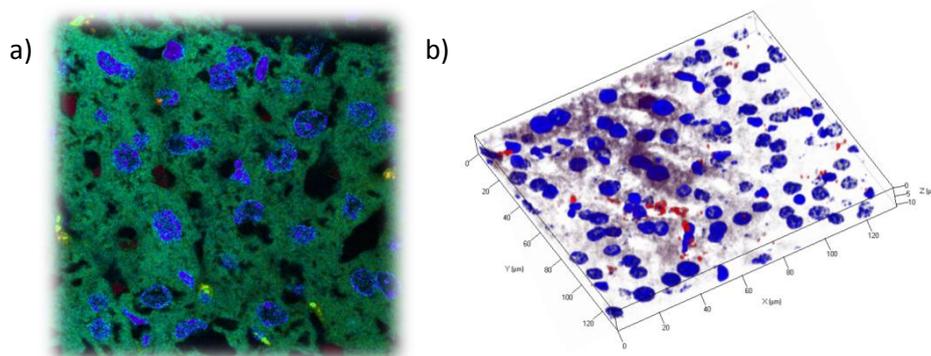


Figure 205 : Imagerie de fluorescence *ex vivo* de coupe du foie de souris (S4N2) par microscopie confocale sous excitation biphotonique (830 nm) a) détection spectrale et b) reconstitution 3D en fausse couleur. Les noyaux ont été marqués à l'aide de DAPI (bleu) et les nanoparticules sont observées en rouge.

L'enregistrement des spectres d'émission propre à chaque zone (tissu non marqué, noyaux marqués, points brillants caractéristiques des nanoassemblages fluo@mag@PAA) après excitation à deux photons, révèle les mêmes profils spectraux que ceux obtenus sous excitation monophotonique (Figure 206).

^{†††} Etudes réalisées en collaboration avec le département de chimie et de bio-science-ingénierie de l'université de KULeuven en Belgique avec le Prof. Koen Clays, le Dr. Evelien De Meulenaere et le Prof. Pieter Vanden Berghe.

4.3/ Internalisation *in vivo* d'assemblages hybrides

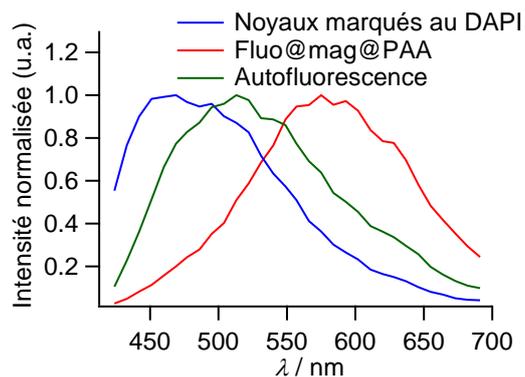


Figure 206 : Etude spectrale après excitation à 830 nm de la coupe de foie (S4N2).

En accord avec une augmentation du contraste négatif au sein de la rate, dû à l'accumulation de nanoparticules d'oxyde de fer et donc de nanoassemblages, on peut observer la présence de points jaune orangé brillants, caractéristiques des nanoassemblages. Leur nombre est cependant bien inférieur à celui trouvé dans le foie, en cohérence avec l'accumulation moindre des nanoparticules dans la rate (Figure 207). Il est également impressionnant d'observer la chute drastique de l'autofluorescence par comparaison avec celle provenant du foie.

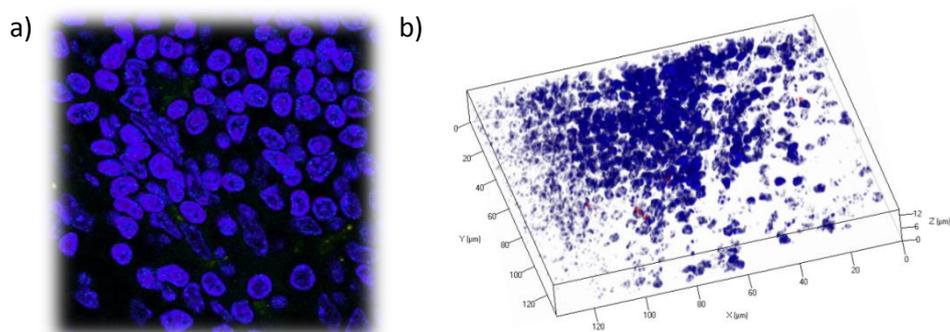


Figure 207 : Imagerie de fluorescence *ex vivo* de rate de souris (S4N2) par microscopie confocale sous excitation biphotonique (830 nm) a) détection spectrale et b) reconstitution 3D en fausse couleur. Les noyaux ont été marqués à l'aide de DAPI (bleus) et les nanoparticules sont observées en rouge.

Une fois injectées, les nanoparticules de petite taille (souvent inférieure à 5 nm) sont généralement éliminées par filtration du flux sanguin au niveau des reins¹⁸³. En raison de la taille plus importante des nanoassemblages fluo@mag@PAA utilisés, peu d'entre eux devraient se retrouver au niveau des reins. Cela se confirme par l'observation des coupes de reins issus de plusieurs souris où une seule coupe a révélé la présence d'un nanoassemblage isolé (Figure 208).

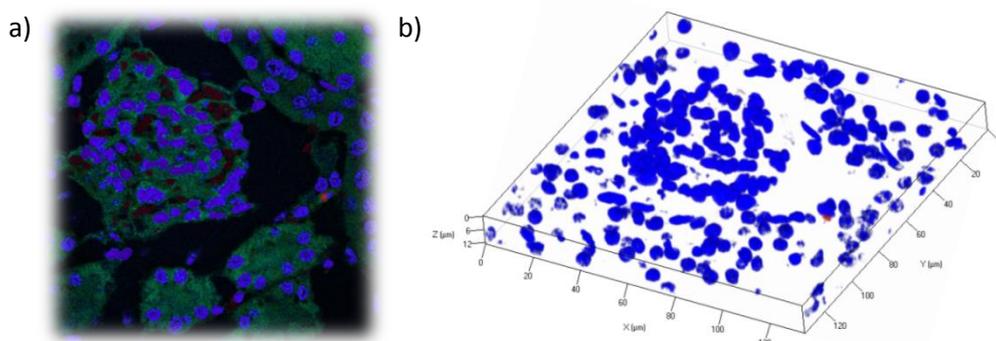


Figure 208 : Imagerie de fluorescence *ex vivo* de rein de souris (S4N2) par microscopie confocale sous excitation biphotonique (830 nm) a) détection spectrale et b) reconstitution 3D en fausse couleur. Les noyaux ont été marqués à l'aide de DAPI (bleus) et les nanoparticules sont observées en rouge.

En cas d'agrégation après injection systémique, les nanoassemblages se seraient retrouvés dans les poumons, où des nanoparticules micro et millimétriques peuvent se déposer et ainsi causer le décès de l'animal par embolie pulmonaire. Ici, aucun nanoassemblage n'a pu être imagé par microscopie de fluorescence, ce qui prouve de manière indirecte la haute stabilité colloïdale des nanoassemblages dans le flux sanguin (Figure 209). De même, des coupes du cœur ne présentent aucun nanoassemblage, celui-ci n'ayant pas de raison physiologique de s'y accumuler.

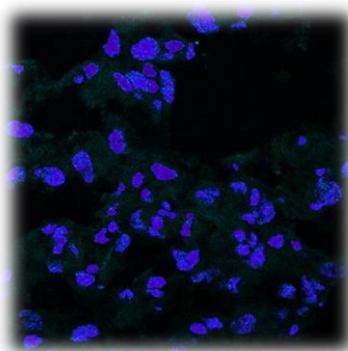


Figure 209 : Imagerie de fluorescence *ex vivo* de poumons de souris (S4N2) par microscopie confocale sous excitation biphotonique (830 nm) en utilisant une détection spectrale. Les noyaux ont été marqués à l'aide de DAPI (bleus).

4.3.2.3 Etudes par microscopie électronique à transmission (MET)

Le greffage de nanoparticules d'oxyde de fer sur les cœurs fluorescents ouvre la possibilité de détecter les nanoassemblages jusqu'à une résolution nanométrique, offrant ainsi une détection possible à toutes les échelles, du corps entier à l'échelle nanométrique. Bien que les nanoparticules d'oxyde de fer génèrent un contraste suffisant, les tissus doivent subir une suite de traitements pour éviter leur désagrégation lors de coupes ultra-fines et augmenter leur contraste intrinsèquement faible. La préparation des coupes a été réalisée en collaboration avec Myriam Robard et Stéphanie Blandin de l'Université de Nantes^{§§§}. Dans un premier temps, les organes sont fixés à l'aide de glutaraldéhyde avant d'être lavés avec un tampon contenant de l'acide cacodylique (ou acide diméthylarsénique), utilisé classiquement pour des observations en microscopie électronique à transmission. Une deuxième étape de coloration est réalisée à l'aide de tétraoxyde d'osmium, suivie d'étapes de déshydratation et d'encapsulation dans une résine thermopolymérisable à 60°C pendant 48 h. Des coupes ultrafines de 70 nm ont alors été réalisées à l'aide d'un cryo-ultramicrotome et teintées une dernière fois par une solution d'acétate d'uranyle et de citrate de plomb.

L'imagerie de ces coupes par microscopie électronique à transmission a mis en évidence la présence de nanoassemblages intacts (Figure 210). L'agencement sphérique apparaît effectivement conservé 24 h après injection systémique chez la souris, malgré toutes les étapes de traitement, de lavage, et de coloration de ces tissus.

^{§§§} Etudes réalisées en collaboration avec la plateforme Micromorph de la Faculté de Médecine de l'Université de Nantes.

4.3/ Internalisation *in vivo* d'assemblages hybrides

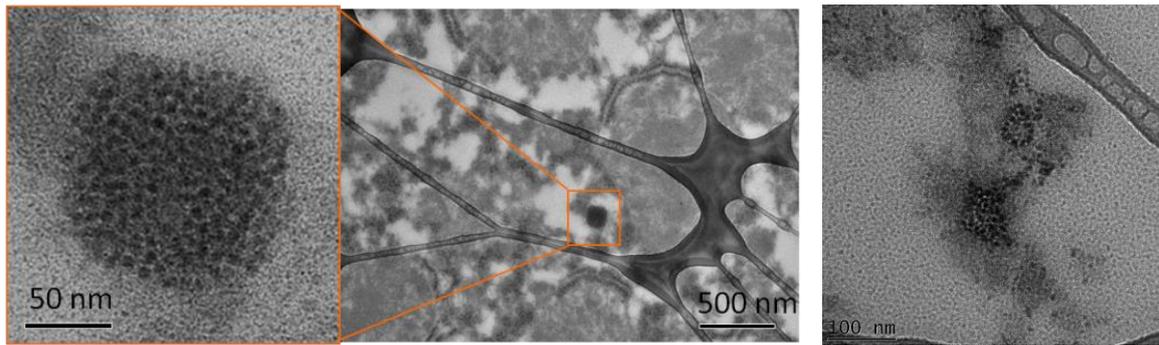


Figure 210 : Coupe ultrafine (70 nm) de tissu du foie de souris (S4N4) pour une observation par MET.

Cet agencement pourrait rappeler celui de la ferritine, protéine de stockage du fer, généralement située à l'intérieur des cellules et régulant la concentration en ions fer dans l'organisme. Toutefois, ces agglomérats de protéines sont généralement observés avec des doses en fer injectées 5 fois plus importantes et près de dix jours après injection¹⁹⁴, écartant ainsi la possibilité d'agrégats de ferritine et confortant par la même occasion toutes les observations faites précédemment sur la stabilité architecturale des nanoassemblages.

4.4 Conclusion

L'internalisation autant de nanoassemblages hybrides magnéto-fluorescents que de nanosphères organiques seules s'avère sans influence sur le développement cellulaire, et non cytotoxique dans les conditions normales d'utilisation de sondes bimodales en termes de concentration. La stabilité structurale de l'ensemble du nanoassemblage dépend de la nature du ligand stabilisant présent en surface. Alors que des polyélectrolytes stabilisent fortement les nanoassemblages, l'utilisation de petites molécules provoque une désagrégation, au profit de fluorophores libres. Cette désagrégation ouvre des possibilités de relargage de molécules d'intérêt à l'intérieur d'une cellule cible, obtenant ainsi un agent théranostique.

La présence d'un lien fort entre chaque composante de l'assemblage final fluo@mag@PAA a permis de réaliser des études d'imagerie sur petit animal avec une détection multiéchelle du micromètre au nanomètre (Figure 211). Au niveau de l'IRM, un contraste deux fois supérieur au contraste naturel des tissus a été obtenu tout en utilisant une quantité en nanoparticules d'oxyde de fer injectées jusqu'à 10 fois inférieure à celle usuellement employée avec d'autres agents de contraste à base d'oxyde de fer. L'imagerie par microscopie de fluorescence sous excitation monophotonique ou biphotonique nous a permis de localiser sans ambiguïté les nanoassemblages dans des organes extrêmement pigmentés comme le foie. Finalement, l'imagerie par microscopie électronique à transmission a confirmé l'intégrité de l'architecture de type cœur-coquille, 24 h après injection intraveineuse chez la souris.

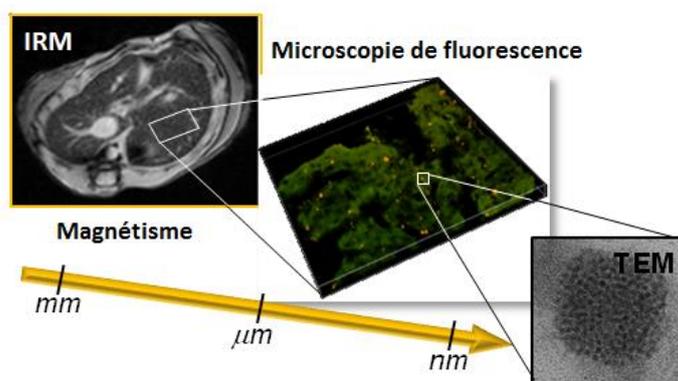


Figure 211 : Imagerie des fluo@mag@PAA par IRM, microscopie de fluorescence et par MET.

4.5 Références bibliographiques

- (189) Kim, S. T.; Saha, K.; Kim, C.; Rotello, V. M. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 681–691.
- (190) Holder, A. L.; Goth-Goldstein, R.; Lucas, D.; Koshland, C. P. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 1885–1892.
- (191) Lartigue, L.; Hugounenq, P.; Alloyeau, D.; Clarke, S. P.; Lévy, M.; Bacri, J.-C.; Bazzi, R.; Brougham, D. F.; Wilhelm, C.; Gazeau, F. *ACS Nano* **2012**, *6*, 10935–10949.
- (192) Hugounenq, P.; Levy, M.; Alloyeau, D.; Lartigue, L.; Dubois, E.; Cabuil, V.; Ricolleau, C.; Roux, S.; Wilhelm, C.; Gazeau, F.; Bazzi, R. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 15702–15712.
- (193) Berezin, M. Y.; Achilefu, S. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2641–2684.
- (194) Lartigue, L.; Alloyeau, D.; Kolosnjaj-Tabi, J.; Javed, Y.; Guardia, P.; Riedinger, A.; Péchoux, C.; Pellegrino, T.; Wilhelm, C.; Gazeau, F. *ACS Nano* **2013**, *7*, 3939–3952.

Chapitre V : Vers une post-fonctionnalisation et un assemblage bimétallique

<i>Chapitre V : Vers une post-fonctionnalisation et un assemblage bimétallique</i>	199
5.1 Introduction	201
5.2 Post fonctionnalisation et ciblage	202
5.2.1 Fonctionnalisation des macromolécules de PAA	202
5.2.2 Stabilisation des nanoassemblages à l'aide de PAA fonctionnalisé	206
5.2.3 Greffage sur les nanoassemblages	209
5.3 Conclusion	213
5.4 Références bibliographiques	214

5.1 Introduction

Lors du chapitre précédent, il nous a été possible d'imager les nanoassemblages fluo@mag@PAA internalisés dans différentes lignées cellulaires ou dans différents organes après injection systémique dans des souris. Les nanoassemblages ont été visualisés au sein du foie par IRM mais également par microscopie de fluorescence, malgré la très forte autofluorescence des tissus hépatiques¹⁹⁵. L'intégrité structurale des nano-objets hybrides a été confirmée grâce à l'imagerie par microscopie électronique à transmission de coupes ultrafines, ainsi qu'à un arsenal de caractérisations physico-chimiques.

La validation de la preuve de concept de bimodalité pour ces sondes hybrides nous conduit maintenant à envisager l'ajout d'une propriété de ciblage en surface des nanoassemblages. Cette fonctionnalisation ultérieure a pour objectif de créer des interactions spécifiques entre les nanoassemblages et les sites ou les entités biologiques, limitant ainsi leur accumulation aléatoire dans les tissus.

Les groupes acides carboxyliques du polyélectrolyte en surface ouvrent la voie vers une fonctionnalisation aisée via la formation de liaisons amides, plus stables que les liaisons esters *in vivo*. La formation de ces liaisons amides est bien établie dans la littérature et peut être réalisée dans tout type de solvant, incluant des milieux aqueux¹⁹⁶.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à démontrer la faisabilité d'un greffage en surface, tout en étudiant son influence sur les propriétés des nouveaux nanoassemblages fonctionnalisés.

5.2 Post fonctionnalisation et ciblage

L'objectif de cette première partie repose sur l'étude de la réactivité des chaînes de PAA vis-à-vis d'un couplage peptidique à l'aide de carbodiimide. Ensuite, les résultats obtenus ont été mis à profit pour fonctionnaliser directement la surface des nanoassemblages fluo@mag@PAA. Deux possibilités ont été envisagées, à savoir la fonctionnalisation des chaînes de PAA avant leur greffage sur les nanoassemblages fluo@mag ou la fonctionnalisation des chaînes déjà greffées. Ces deux voies de fonctionnalisation à l'aide d'une molécule modèle, la 7-amino-4-méthylcoumarine (AC), seront détaillées. Les propriétés de fluorescence de cette molécule nous permettront de sonder l'influence du greffage sur les propriétés physico-chimiques, et notamment photophysiques, des nanoassemblages fonctionnalisés.

5.2.1 Fonctionnalisation des macromolécules de PAA

Commençons tout d'abord par la fonctionnalisation des chaînes de PAA avant l'étape de stabilisation des nanoassemblages fluo@mag. Ainsi, une grande quantité de polymère peut être préparée, facilitant les étapes de caractérisation.

A l'inverse des synthèses organiques présentées au chapitre 1, il ne s'agit pas ici de fonctionnaliser toutes les unités acides carboxyliques des chaînes PAA, et ce pour deux raisons principales. La première raison repose sur l'utilisation du PAA comme agent stabilisant des nanoassemblages fluo@mag. Après fonctionnalisation, le PAA doit conserver suffisamment d'entités acides carboxyliques libres pour complexer les nanoparticules d'oxyde de fer. La seconde raison implique la nécessité de conserver suffisamment de répulsions électrostatiques entre les nanoassemblages. Or, la sonde fluorescente que nous avons choisie d'utiliser est apolaire et diminuera le potentiel de surface des nanoassemblages finaux. Nous avons donc souhaité convertir 20 % au maximum des fonctions acides carboxyliques des macromolécules de PAA en fonctions amides.

La fonctionnalisation des chaînes de PAA a d'abord nécessité l'activation de l'acide carboxylique à l'aide de l'agent de couplage, le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC, 0,2 éq) avant de former un ester activé par ajout de N-hydroxysuccinimide (NHS, 0,7 éq) selon la réaction suivante (Figure 212). Une sonde fluorescente, ici la 7-amino-4-méthylcoumarine (AC, 0,4 éq), disposant d'une fonction amine primaire, est alors ajoutée pour former une fonction amide. Le taux de fonctionnalisation a pu être déterminé par intégration des protons aromatiques en spectroscopie RMN ^1H , rapportés aux protons des chaînes de PAA. Un taux de 1 % a alors été obtenu dans les conditions expérimentales pré-citées et après plusieurs lavages à l'aide de dichlorométhane pour éliminer les fluorophores non liés de manière covalente.

5.2/ Post fonctionnalisation et ciblage

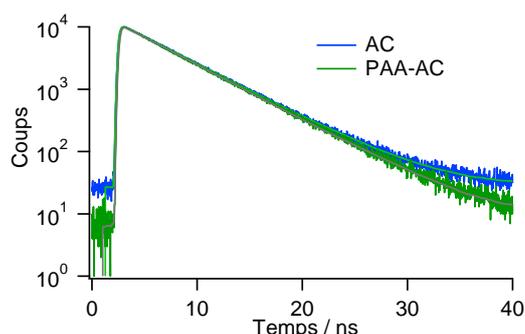


Figure 214 : Déclins de fluorescence de l'AC avant et après greffage sur des chaînes PAA dans l'eau ($\lambda_{exc} = 337 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$).

Les déclins demeurent monoexponentiels après greffage, ce qui fournit après modélisation des temps de vie de l'état excité de l'AC, de 4,97 ns sous forme libre et de 4,88 ns une fois greffée. Le mélange d'AC et de PAA réalisé en l'absence d'agent de couplage ne provoque aucune modification de du déclin de fluorescence de l'AC seule (Tableau 25).

Composés	$\tau_1 \tau_2$ / ns	χ^2
AC	4,97	1,03
PAA-AC	4,88	1,04

Tableau 25 : Temps de vie de l'état excité τ_1 de l'AC seule, greffée aux chaînes PAA et ajoutée à une solution de PAA ($\lambda_{exc} = 337 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$).

Une augmentation du taux de fonctionnalisation conduit à des élargissements des spectres RMN ^1H , rendant les analyses quantitatives très délicates. Des études d'analyses élémentaires ou de spectrométrie de masse n'ont également pas permis de déterminer la quantité d'AC greffée.

Toutefois, les analyses par spectroscopie IR permettent de mettre en évidence une augmentation relative des bandes de δ (N-H) à 736 cm^{-1} , normalisées par rapport à la bande de vibration du carbonyle à 1717 cm^{-1} , supposée constante (Figure 215). Même si le taux de fonctionnalisation n'a pas pu être déterminé, ces analyses confirment l'augmentation relative de ce taux de façon quasi linéaire avec la quantité d'AC ajoutée lors du couplage, par un facteur 2 (PAA-ACx2) ou par un facteur 4 (PAA-ACx4) (Tableau 26).

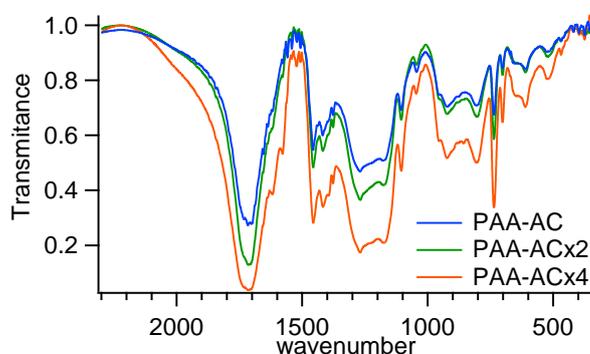


Figure 215 : a) Spectres IR du PAA après fonctionnalisation par l'AC en quantité croissante, dispersés dans une matrice de KBr.

Composés	ν (C=O)	δ (N-H)	Ratio des bandes	Augmentation relative
PAA-AC	0,28259	0,68319	2,4	1,0
PAA-ACx2	0,13629	0,59699	4,4	1,8
PAA-ACx4	0,04033	0,35029	8,7	3,6

 Tableau 26 : Intensités des bandes δ (N-H) à 736 cm^{-1} normalisées par les bandes de vibration du carbonyle à 1717 cm^{-1}

Nous nous sommes donc contentés d'analyses qualitatives en recourant à des mesures photophysiques. L'intensité émise par le PAA fonctionnalisé par de l'AC augmente avec la concentration en AC greffée jusqu'à un certain seuil. En effet, lors de l'utilisation d'une quantité de matière en AC 4 fois supérieure par rapport à la première expérience de fonctionnalisation, le polymère obtenu (PAA-ACx4) voit son émission diminuer (Figure 216b), corrigée par la valeur de l'absorbance. Par ailleurs, un épaulement de plus en plus prononcé apparaît à plus haute énergie (375 nm) lorsque la quantité en fluorophores augmente. Ces différentes observations suggèrent la formation d'agrégats H par interactions hydrophobes entre les noyaux aromatiques, afin de minimiser leur énergie de solvation en milieu aqueux, visible sur les spectres d'absorption par l'apparition d'une nouvelle bande autour de 330 nm (Figure 216a). L'enregistrement des spectres d'excitation à 440 nm (Figure 216c) et à 375 nm (Figure 216d) semble confirmer la présence de ces agrégats intermoléculaires. Alors que le spectre d'excitation enregistré pour une émission à 440 nm présente peu de modifications spectrales lors de l'ajout d'une quantité croissante d'AC, l'enregistrement de ce même spectre pour une émission à 375 nm met clairement en évidence l'apparition d'agrégats moléculaires par l'apparition d'une nouvelle bande d'excitation à 325 nm.

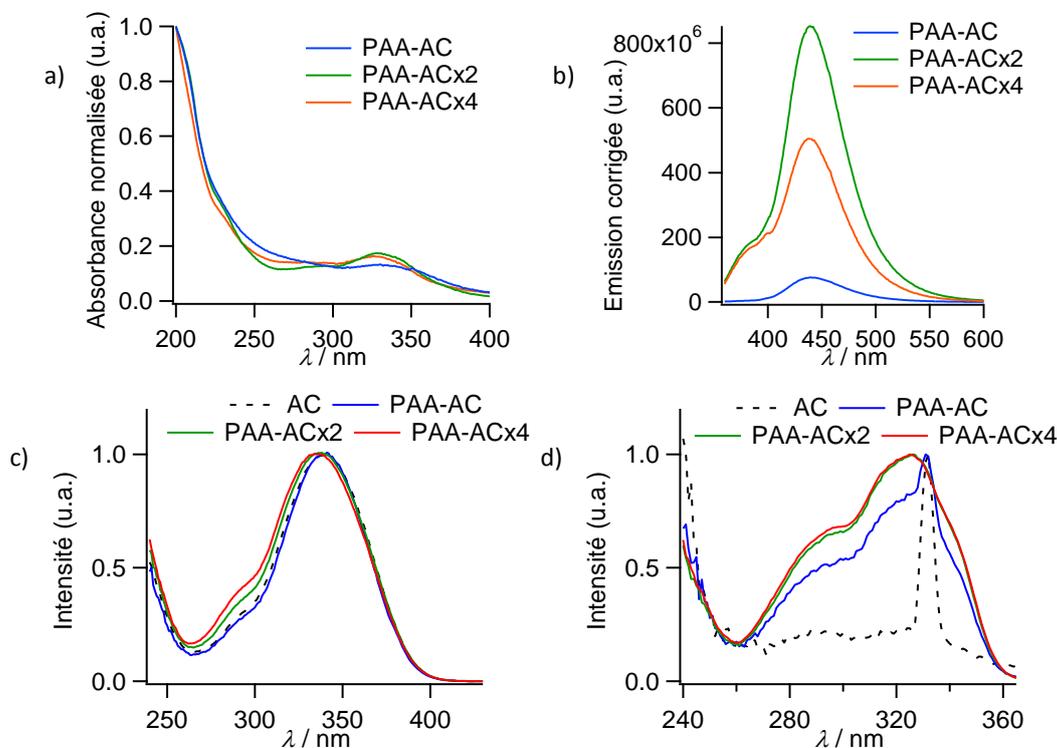


Figure 216 : Spectres a) d'absorption et b) d'émission après excitation à 350 nm de PAA fonctionnalisés dans l'eau. Spectres d'excitation enregistrés pour une émission à a) 440 nm et b) 375 nm.

5.2/ Post fonctionnalisation et ciblage

L'enregistrement de déclin de fluorescence à 440 nm, après excitation à 337 nm, montre des cinétiques de déclin de plus en plus rapides avec l'augmentation de la quantité d'AC greffée sur le PAA (Figure 217a). Cette modification des propriétés photophysiques de la sonde greffée sur les macromolécules de PAA est d'autant plus visible lors de l'enregistrement des déclin de fluorescence à 375 nm au niveau des agrégats intermoléculaires, après excitation à 337 nm, présentant un déclin de fluorescence plus rapide (Figure 217b).

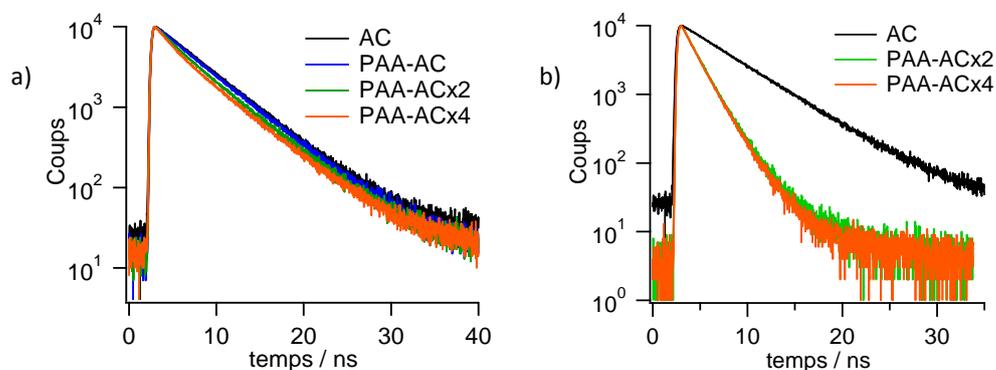


Figure 217 : Déclins de fluorescence enregistrés a) à 440 nm et b) 375 nm, après excitation à 337 nm pour ces mêmes polymères fonctionnalisés dissous dans l'eau.

La modélisation des déclin de fluorescence enregistrés à 440 nm requiert désormais l'utilisation d'une loi biexponentielle (Tableau 27). Une composante plus courte aux environs de 1,6-1,7 ns apparaît. Sa contribution s'accroît presque d'un facteur 2 avec l'utilisation d'une quantité d'AC greffées deux fois plus importante et valide la présence d'interactions intermoléculaires entre les unités AC¹⁹⁷.

Composés	$\tau_i (f_i)$ / ns	χ^2
PAA-AC	4,88 (1)	1,04
PAA-AC*2	4,93 (0,91), 1,67 (0,09)	0,96
PAA-AC*4	4,91 (0,85), 1,58 (0,15)	0,96

Tableau 27 : Constantes de temps du déclin de fluorescence de PAA fonctionnalisé par de l'AC pour différents taux de greffage, après modélisation mono- ou biexponentielle ($\lambda_{exc} = 336$ nm, $\lambda_{em} = 440$ nm).

$$I(t) = \sum_i a_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \text{ avec } f_i = \frac{a_i \tau_i}{\sum_j a_j \tau_j}$$

La modélisation des déclin de fluorescence enregistrés à 375 nm requiert également l'utilisation d'une loi bi-exponentielle, avec deux constantes de temps d'environ 1.5 ns et 2.6 ns, signalant la présence de différents types d'interactions et conduisant à différents types d'agrégats.

5.2.2 Stabilisation des nanoassemblages à l'aide de PAA fonctionnalisé

Après avoir fonctionnalisé les chaînes de PAA à l'aide d'entités fluorescentes (AC), nous nous sommes intéressés à utiliser ces nouveaux polymères comme agents stabilisants. Une solution de (P)-fluo@mag est alors préparée dans les mêmes conditions que celles décrites au chapitre 3, avec toutefois une étape de stabilisation réalisée en présence des PAA fonctionnalisés. Deux taux de

fonctionnalisation PAA-AC et PAA-AC*2 ont été utilisés. L'étape de dialyse finale est poursuivie jusqu'à ce que les eaux de lavage ne soient plus fluorescentes, signifiant ainsi l'absence de toute sonde encore libre. L'analyse des spectres d'absorption révèle l'apparition d'une bande à 327 nm, caractéristique de l'unité AC et d'intensité croissante avec la quantité d'AC greffées en surface des nanoassemblages (Figure 218a).

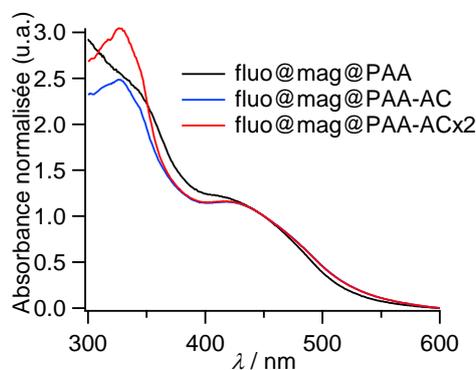


Figure 218 : Spectres d'absorption pour les assemblages (P)-fluo@mag@PAA-AC.

Après excitation du cœur organique à 450 nm, un déplacement hypsochrome d'environ 30 nm du spectre d'émission est observé (Figure 219a). Ce fait assez surprenant a été attribué à une interaction forte à l'état excité entre le cœur fluorescent f_{poh} (13) et les unités AC présentes en surface. A l'inverse, le spectre d'absorption était très peu modifié au niveau de la bande à transfert de charge, ne laissant présager aucune interaction particulière à l'état fondamental. En raison du caractère aromatique et apolaire de la 7-amino-4-méthylcoumarine, nous supposons une réorganisation de la chaîne polymère à la surface des nanoassemblages, les AC étant positionnées vers l'intérieur pour interagir avec les parties hydrophobes non complexées du cœur tandis que les unités acides carboxyliques sont déployées vers l'extérieur de l'assemblage. De manière surprenante, cette interaction génère une extinction partielle de fluorescence du cœur organique de près d'un facteur 6, comparée au signal de fluorescence de nanoassemblages stabilisés par des chaînes de PAA non fonctionnalisées.

Après excitation à 350 nm, au niveau de la bande d'absorption des unités AC, un déplacement hypsochrome de 50 nm est observé, confirmant la présence d'interactions non seulement avec le cœur fluorescent mais également via la formation d'agrégats de type H (Figure 219b). De plus, comparé à l'émission des chaînes de PAA-AC seules, une extinction de fluorescence de l'AC d'un facteur 8 (66) est observée pour les nanoassemblages fluo@mag@PAA-AC (fluo@mag@PAA-ACx2). Finalement, aucun transfert d'énergie n'a lieu vers le cœur fluorescent au vu de l'absence d'émission à 600 nm.

5.2/ Post fonctionnalisation et ciblage

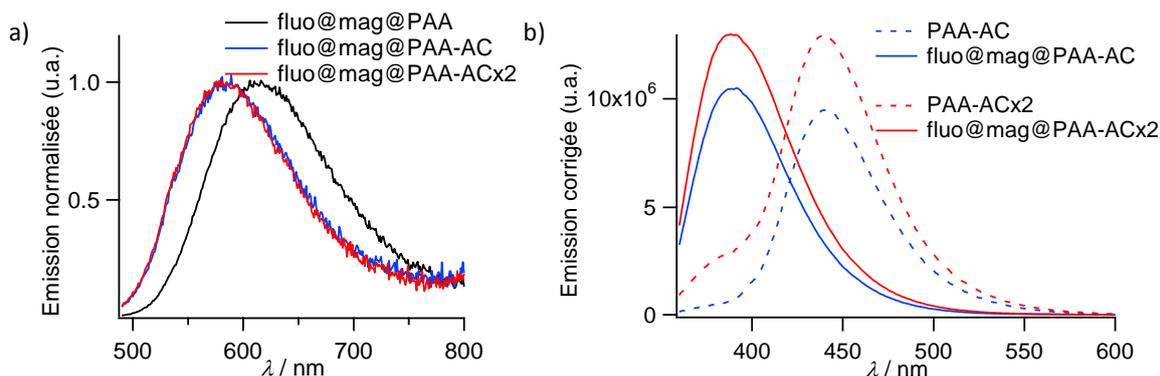


Figure 219 : Spectres d'émission pour les nanoassemblages (P)-fluo@mag@PAA-AC après excitation à a) 450 nm et b) 350 nm ; spectres normalisés par la valeur de l'absorbance pour les nanoassemblages fluo@mag@PAA-AC.

Pour valider la présence d'un environnement particulier des AC, supposées enfouies entre les nanoparticules d'oxyde de fer et les chaînes de PAA, les déclin de fluorescence ont été enregistrés à 600 nm après excitation à 450 nm dans la bande à transfert de charge du cœur fpoH et à 440 nm après excitation à 350 nm dans la bande d'absorption de l'AC (Figure 220). Quelle que soit la longueur d'onde d'excitation, les déclin de fluorescence sont nettement plus rapides pour les nanoassemblages fluo@mag@PAA-AC comparés à ceux des nanoassemblages fluo@mag@PAA ou encore aux chaînes de PAA-AC utilisées comme stabilisant.

Comme évoqué lors des études par spectrofluorimétrie, la formation d'agrégats par interactions intermoléculaires entraîne une chute de l'intensité de fluorescence émise, ce qui conduit à une diminution bien plus rapide du déclin de fluorescence de l'AC une fois greffée (Figure 220a). Une modélisation de ce déclin fait en effet apparaître une composante très courte τ_2 , désormais majoritaire, similaire à celle rencontrée pour le polyélectrolyte fonctionnalisé PAA-AC et attribuable à des interactions homo-intermoléculaires. La seconde composante τ_1 est fortement raccourcie par rapport à celle trouvée pour les chaînes PAA-AC et voit plus son origine dans les interactions intermoléculaires avec le cœur fluorescent (Tableau 28).

En revanche, le déclin significativement plus court pour le cœur fluorescent des nanoassemblages fluo@mag@PAA-AC est plus difficilement interprétable, et provient probablement d'une interaction spécifique de type π - π entre le cœur et les entités AC de surface (Figure 220b).

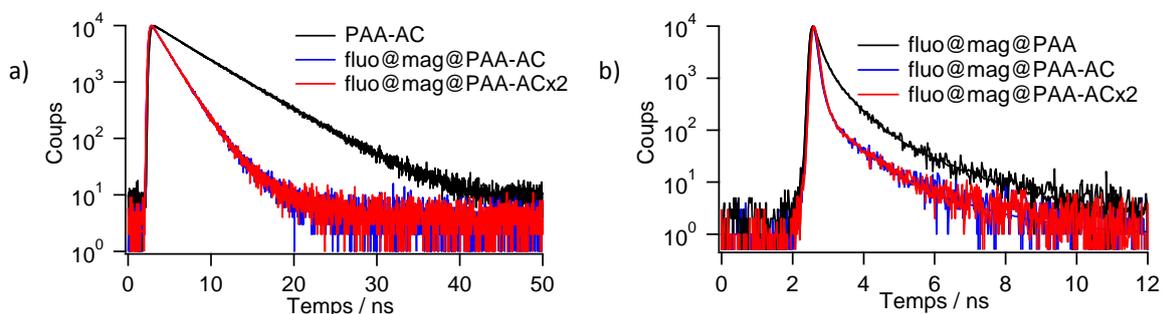


Figure 220 : Déclin de fluorescence des polyélectrolytes fonctionnalisés PAA-AC et des nanoassemblages (P)-fluo@mag post-stabilisés par du PAA-AC enregistrés a) à 440 nm, après excitation à 336 nm, et b) à 600 nm, après excitation à 449 nm.

	$\tau_i (f_i)$ / ns	χ^2
PAA-AC	4,88 (1)	1,04
PAA-AC*2	4,93 (0,91), 1,67 (0,09)	0,96
fluo@mag@PAA-AC	3,50 (0,09), 1,72 (0,91)	0,93
fluo@mag@PAA-AC*2	3,41 (0,08), 1,71(0,92)	0,95

Tableau 28 : Propriétés photophysiques résolues en temps de nanoassemblages (P)-fluo@mag stabilisés avec un polymère fluorescent, PAA-AC et de polyélectrolytes fonctionnalisés PAA-AC pour différents taux de greffage en AC ($\lambda_{exc} = 337$ nm, $\lambda_{exc} = 440$ nm)

$$I(t) = \sum_i a_i * \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \text{ avec } f_i = \frac{a_i * \tau_i}{\sum_j a_j * \tau_j}$$

Ainsi l'utilisation d'un polyélectrolyte partiellement fonctionnalisé par des unités hydrophobes provoque une ségrégation des parties apolaires qui se positionnent vers l'intérieur du nanoassemblage alors que les parties polaires vont s'étendre dans le milieu environnant. Ainsi, lors du greffage d'entités biologiquement actives sur ce polymère, il sera indispensable de contrôler non seulement le taux de greffage mais également l'accessibilité de l'unité ainsi greffée. Afin d'éviter ces complications d'agencement structural, nous nous sommes intéressés au greffage cette fois-ci des chaînes PAA après le processus de stabilisation, en surface des nanoassemblages.

5.2.3 Greffage sur les nanoassemblages

De manière générale, les réactions chimiques réalisées sur des nanoassemblages nécessitent une quantité de matière élevée d'agents de greffage^{198,199,200}. Nous avons choisi de travailler avec 5 équivalents d'agents de couplage par rapport à la quantité de PAA initialement introduite durant l'étape de stabilisation, soit un nombre d'équivalent effectif bien supérieur. Parallèlement à la fonctionnalisation des nanoassemblages fluo@mag@PAA, le greffage d'AC sur des nanoparticules d'oxyde de fer de type mag@PAA a également été réalisé afin de générer des systèmes modèles facilitant les interprétations. Ces réactions ont été conduites en gardant constantes les concentrations en fer, soit environ 0,3 mM et en utilisant l'EDC comme agent de couplage ainsi que la NHS pour former les esters activés

Le protocole général est le suivant. Le pH d'une solution de nanoassemblages fluo@mag@PAA ou de mag@PAA est abaissé à l'aide d'une solution d'acide nitrique (1 M) jusqu'à une valeur de 4. Puis de l'EDC (5 éq) et de la NHS (5 éq) sont ajoutés et le milieu est agité pendant 2 h 30. Le pH est ensuite augmenté jusqu'à une valeur de 9 à l'aide d'une solution d'ammoniaque (1 M) pour éviter de protoner l'amine à coupler. L'AC (20 éq) est alors ajoutée et le milieu est agité pendant 16 h supplémentaires. Les nanoassemblages sont finalement dialysés et lavés par aimantation plusieurs fois, jusqu'à ce que les eaux de lavages ne soient plus fluorescentes. Les nanoassemblages ainsi fonctionnalisés sont notés mag@PAA@AC et fluo@mag@PAA@AC.

Aucune différence au niveau des spectres d'absorption avant et après greffage n'est observée pour les nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées mag@PAA, contrairement aux nanoassemblages fluo@mag@PAA. Pour ces derniers, une légère modification du spectre

5.2/ Post fonctionnalisation et ciblage

d'absorption après greffage est observée (Figure 221), et provient probablement d'interactions à l'état fondamental entre les sondes (AC) et les nanoassemblages. L'absence de modification pour les nanoparticules mag@PAA provient essentiellement de la faible absorbance de l'AC, due au très faible coefficient d'absorption molaire au dessus de 300 nm et à la quantité restreinte d'unités AC greffées.

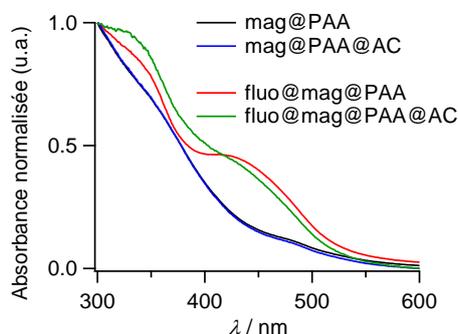


Figure 221 : Spectres d'absorption des nanoparticules mag@PAA et des nanoassemblages fluo@mag@PAA avant et après greffage d'AC.

Le spectre d'émission des nanoparticules mag@PAA@AC, centré à 441 nm, est également très similaire à celui de l'AC seule, avec à nouveau un léger épaulement à plus haute énergie signalant le greffage et l'extinction des sondes fluorescentes en surface des nanoparticules (Figure 222a). Pour les fluo@mag@PAA@AC, une émission centrée sur 602 nm est observée, correspondant à celle provenant du cœur fluorescent (Figure 222a). Comme l'excitation a été réalisée à 336 nm, à savoir dans la bande d'absorption des unités AC, il est possible de distinguer un résidu d'émission de ces unités. Cette faible émission a été attribuée à un transfert d'énergie de l'AC greffée en surface vers le cœur fluorescent, dû à un recouvrement spectral de la bande d'émission de l'AC et de la bande d'absorption du cœur fph (13). L'hypothèse d'un transfert d'électron vers les nanoparticules d'oxyde de fer peut être écartée puisque le spectre d'émission pour le système mag@PAA@AC demeure inchangé par rapport à celui de mag@PAA, en supposant également l'absence de relargage au cours du temps des unités AC greffées¹⁶⁸.

Comme précédemment, une modification importante des déclin de fluorescence par excitation de la coumarine à 336 nm et détection à 440 nm est obtenue suite au greffage des unités AC (Figure 222b). A l'opposé, le simple ajout d'AC à une solution de mag@PAA ou de fluo@mag@PAA sans agent de couplage n'entraîne aucune modification des déclin de fluorescence enregistrés. La diminution significative du déclin de fluorescence propre aux unités AC tend donc à confirmer le greffage des unités AC à la surface des nanoparticules d'oxyde de fer.

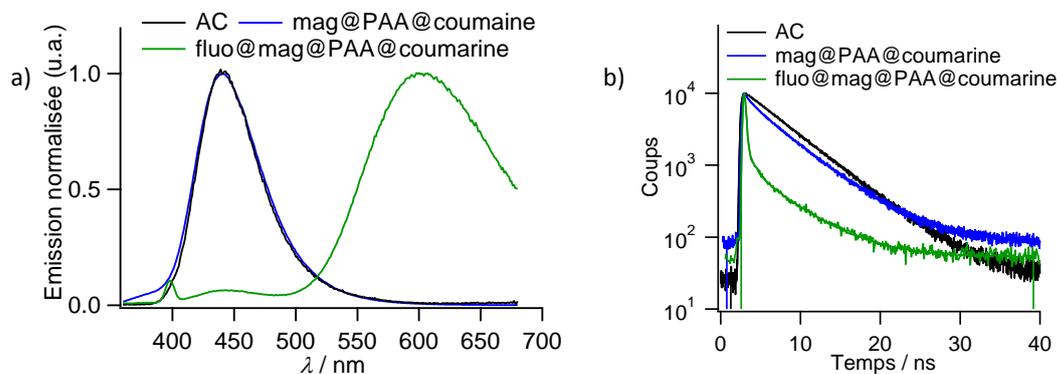


Figure 222 : a) Spectre d'émission après excitation à 350 nm de nanoassemblages fonctionnalisés, et b) déclin de fluorescence associés enregistrés à 440 nm après excitation à 336 nm.

La modélisation des déclin de fluorescence, liés à la relaxation de l'état excité des unités AC, confirme l'existence d'interactions avec le cœur organique fpoh (13). En effet, une composante beaucoup plus courte est obtenue pour les nanoassemblages fluo@mag@PAA@AC ($\tau_2 = 0,66$ ns) par rapport aux nanoparticules d'oxyde de fer mag@PAA@AC (Tableau 29).

	$\tau_i (f_i)$ / ns	χ^2
AC	4,97	1,03
mag@PAA@AC	4,91 (0,93), 1,10 (0,07)	1,03
fluo@mag@PAA@AC	4,85 (0,78), 0,66 (0,22)	1,19

Tableau 29 : Propriétés photophysiques des mag@PAA et fluo@mag@PAA fonctionnalisés en surface par l'AC et dispersés dans l'eau, ($\lambda_{exc} = 337$ nm, $\lambda_{exc} = 440$ nm).

$$I(t) = \sum_i a_i * \exp(-\frac{t}{\tau_i}) \text{ avec } f_i = \frac{a_i * \tau_i}{\sum_j a_j * \tau_j}$$

L'interaction entre les unités AC greffées en surface et le cœur fluorescent peut également être mise en évidence de manière qualitative par l'enregistrement du déclin de fluorescent du cœur organique à 600 nm après excitation à 450 nm. Les déclin présentent une augmentation du temps de vie moyen de l'état excité lors du greffage de l'AC (Figure 223). D'autres études seraient à réaliser pour rationaliser cette augmentation. Néanmoins, des études préliminaires semblent indiquer que seule la constante de temps la plus longue τ_1 s'accroît, probablement due au caractère plus hydrophobe de cette surface après fonctionnalisation et répulsion des molécules d'eau, désactivant la surface par couplage vibrationnel.

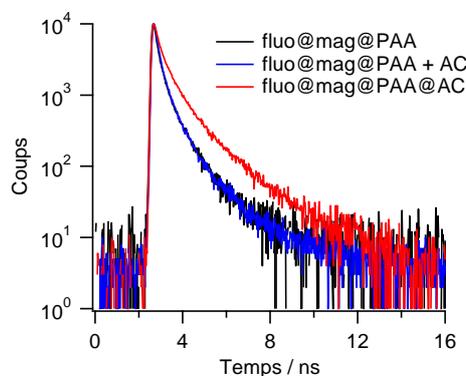


Figure 223 : Déclin de fluorescence de nanoassemblages fluo@mag@PAA fonctionnalisés par l'AC. fluo@mag@PAA + AC correspond à un mélange du nanoassemblage fluo@mag@PAA avec l'AC sans agent de couplage.

Finalement, l'hypothèse d'une hydrophobicité locale renforcée semble être confirmée par la mesure du rayon hydrodynamique de ces nouveaux nanoassemblages (Figure 224). En effet, lors de la stabilisation des nanoparticules fluo@mag à l'aide de PAA, une augmentation conséquente de 50 nm avait été observée, attribuée à la solvataion des chaînes PAA en milieu aqueux. En revanche, lors du greffage en surface des sondes fluorescentes AC, une légère diminution du diamètre hydrodynamique est observée, indiquant une mouillabilité moindre de la surface par les molécules d'eau, et conduisant à une réduction des processus de relaxation non radiatifs du cœur fluorescent.

5.2/ Post fonctionnalisation et ciblage

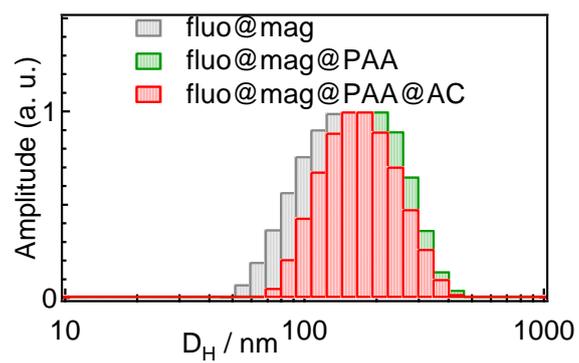


Figure 224 : Distribution en taille mesurée par DLS pour les nanoassemblages fluo@mag@PAA avant et après fonctionnalisation par de l'AC, dispersés dans l'eau.

5.3 Conclusion

Les différentes études décrites dans ce chapitre ont mis en évidence deux points importants. Le premier point repose sur la possibilité de greffer une sonde fluorescente hydrophobe sur les chaînes de PAA via la formation d'une liaison amide. Une faible réactivité a toutefois été obtenue, pouvant être attribuée au choix du solvant (l'eau) et à la nucléophilie réduite de l'AC dont le doublet non liant de l'atome d'azote est désactivé par conjugaison avec le cycle aromatique. Le polymère fluorescent résultant parvient toujours à stabiliser les nanoassemblages fluo@mag et aucun relargage du polymère n'a été observé au cours du temps.

Le deuxième point soulevé est l'importance du moment de fonctionnalisation. En effet, une fonctionnalisation préalable du polymère avant complexation et stabilisation des nanoassemblages provoque un repliement des chaînes polymères tel que les entités greffées se retrouvent à l'intérieur du nanoassemblage. A l'inverse, lorsque cette fonctionnalisation est réalisée sur les chaînes de PAA déjà complexées sur les assemblages, les entités greffées sont exposées vers l'extérieur. Ces différences d'organisation ouvrent de nouvelles potentialités pour vectoriser des molécules d'intérêt biologique, comme des anticancéreux souvent hydrophobes, tout en fonctionnalisant la surface des nanoassemblages par des chaînes PEG pour apporter les propriétés de furtivité. Les molécules hydrophobes se retrouveraient bloquées entre le cœur organique et la couche stabilisante, alors que les PEG, pouvant comporter également des entités de ciblage, s'étendraient dans le milieu aqueux.

De plus, vu la modification du signal d'émission du cœur fluorescent par des molécules hydrophobes greffées en surface, il devient possible de suivre le relargage de ces molécules (si le lien envisagé est facilement clivable) grâce au déplacement bathochrome de la fluorescence émise par le cœur qui s'ensuivra. Ce relargage pourra alors être passif par diffusion, en fonction du lien choisi, ou actif en exploitant les propriétés d'échauffement des nanoparticules d'oxyde de fer. En effet, ces dernières peuvent générer un échauffement local, induisant une destruction des cellules avoisinantes ou tout simplement une désagrégation du nanoassemblage sous l'action d'un champ magnétique alternatif de hautes fréquences, quelques centaines de mégahertz. De grandes avancées dans ce domaine ont récemment émergé^{192,201} avec l'utilisation en conditions précliniques et cliniques²⁰² de l'hyperthermie comme traitement non invasif de tissus tumoraux.

Finalement, toutes ces applications pourront être envisageables après caractérisation complète des nanoassemblages fonctionnalisés. En effet, nous n'avons pas réussi à ce jour à évaluer avec précision la quantité de sondes fluorescentes liées en surface. Le greffage d'entités biologiques comme des protéines, provoquant des différences structurales majeures (masse, taille), devrait résoudre ce problème d'autant que de nombreux outils plus spécifiques de reconnaissance des entités biologiques ont été développés.

5.4 Références bibliographiques

- (195) Van der Vorst, J. R.; Hutteman, M.; Mieog, S. D.; de Rooij, K. E.; Kaijzel, E. L.; Lowik, C. W. G. M.; Putter, H.; Kuppen, P. J. K.; Frangioni, J. V.; van de Velde, C. J. H.; Vahrmeijer, A. L. *J. Surg. Res.* **2012**, *174*, 266–271.
- (196) Sapsford, K. E.; Algar, W. R.; Berti, L.; Gemmill, K. B.; Casey, B. J.; Oh, E.; Stewart, M. H.; Medintz, I. L. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1904–2074.
- (197) Métivier, R.; Leray, I.; Lefèvre, J.-P.; Roy-Auberger, M.; Zanier-Szydłowski, N.; Valeur, B. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, *5*, 758.
- (198) Bolley, J.; Guenin, E.; Lievre, N.; Lecouvey, M.; Soussan, M.; Lalatonne, Y.; Motte, L. *Langmuir* **2013**, *29*, 14639–14647.
- (199) Qu, H.; Caruntu, D.; Liu, H.; O'Connor, C. J. *Langmuir* **2011**, *27*, 2271–2278.
- (200) Miguel-Sancho, N.; Bomatí-Miguel, O.; Colom, G.; Salvador, J.-P.; Marco, M.-P.; Santamaría, J. *Chem Mater* **2011**, *23*, 2795–2802.
- (201) Hilger, I.; Franke; Kettering; Lange; Kaiser. *Int. J. Nanomedicine* **2013**, 351.
- (202) Wust, P.; Hildebrandt, B.; Sreenivasa, G.; Rau, B.; Gellermann, J.; Riess, H.; Felix, R.; Schlag, P. *Lancet Oncol.* **2002**, *3*, 487–497.

Conclusion générale

La recherche effectuée actuellement dans le domaine de la bio-imagerie, et par extension dans le domaine de la nanomédecine, tend à développer de nouveaux systèmes multifonctionnels par auto-assemblage. L'utilisation d'entités, tant magnétiques que fluorescentes, de manière individuelle et indépendante a dévoilé leurs limitations en termes de sensibilité, de résolution mais également de localisation et de biodistribution *in vivo*. En revanche, la combinaison de ces propriétés au sein d'une même plateforme, de taille nanométrique, ouvre le champ des possibles vers des applications de diagnostic et de thérapie non envisagées jusqu'à ce jour. Différentes architectures ont ainsi été développées avec une préférence de plus en plus marquée pour les nanoassemblages à haute densité en matériaux actifs. Durant la première partie de ce manuscrit, nous avons pu développer des nanosphères organiques fluorescentes (FON), composées d'un auto-assemblage très dense de petites molécules fluorescentes, des dérivés de triarylamine. La modification structurale de cette famille de molécules nous a permis de générer des nano-plateformes fluorescentes chélatantes, grâce à la présence d'unités complexantes. La présence de ces groupes fonctionnels au niveau de la chaîne latérale des fluorophores à transfert de charge n'est pas sans conséquence sur les propriétés d'émission et a nécessité une étude précise des fluorophores obtenus.

Des études physico-chimiques et structurales de ces systèmes nous ont permis de proposer un mécanisme de formation des nanosphères fluorescentes. De plus, une hétérogénéité intrinsèque de ces nanoparticules préparées par précipitation a été mise en évidence par des analyses photophysiques, domaine encore peu étudié dans la littérature.

La formation de nanoassemblages hybrides a alors été réalisée par nano-précipitation dans une solution de nanoparticules d'oxyde de fer, en une seule étape. L'étude des interactions entre la composante magnétique et la composante fluorescente a mis en évidence une forte cohésion entre ces deux types d'entités dont la quantité de matière a été déterminée par spectrométrie de masse. La stabilisation de nanoassemblages résultants a ainsi pu être contrôlée dans une grande variété de milieux dispersants, tant aqueux qu'organiques. La grande stabilité des nanoassemblages obtenus après stabilisation à l'aide d'acide polyacrylique (PAA) autorise une étape de lyophilisation, permettant une conservation des nano-objets sur une période de temps d'une dizaine de mois à ce jour. De plus, la dynamique d'échange en surface lors de la stabilisation des nanoassemblages à l'aide de petites molécules n'est plus observée, diminuant ainsi le risque de relargage de nanoparticules d'oxyde de fer, tout en assurant une stabilité architecturale du nanoassemblage. Une fonctionnalisation du polyélectrolyte PAA stabilisant les nanoassemblages a été réalisée et mis en évidence l'importance de la procédure de greffage sur les propriétés finales de l'objet, à savoir la disponibilité effective des entités nouvellement couplées.

L'internalisation de ces sondes bimodales dans une grande variété de lignées cellulaires n'a provoqué aucune toxicité significative dans les conditions normales d'observation. Malgré la complexité des milieux biologiques, l'émission de fluorescence reste quasi-indépendante de l'environnement dans lequel les nanoassemblages stabilisés par des polyélectrolytes évoluent. En effet, une stabilisation des nanoassemblages fluo@mag@PAA s'avère suffisante pour contrebalancer le caractère hydrophobe des membranes ou encore les processus biologiques qui vont tendre à dégrader en quelques heures cet agent étranger. Ce même phénomène de « désagrégation » des

Conclusion générale

nanoparticules a également été observé pour des nanoparticules organiques fluorescentes seules, conduisant à des différences de la couleur émise selon l'état agrégé ou dissocié des fluorophores.

La stabilité colloïdale des nanoassemblages hybrides fluo@mag@PAA sur une large gamme de force ionique et de pH nous a encouragés à réaliser leur injection systémique dans des souris. Nous nous sommes alors intéressés au devenir des nanoassemblages grâce à un suivi par IRM, puis par microscopie de fluorescence *ex vivo* et finalement par microscopie électronique à transmission. L'absence d'agents de furtivité comme des chaînes PEG a entraîné la capture de ces dispersions de fluo@mag@PAA par le foie, organe extrêmement autofluorescent, sans que ces systèmes magnéto-fluorescent ne soient masqués, du fait de leur très forte brillance.

Perspectives :

Les perspectives de ce travail de thèse sont nombreuses et peuvent être classées selon l'état d'avancement des études actuelles ou leur faisabilité à ce jour. Dans un premier temps, le greffage d'entités biologiques en surface des nanoassemblages devra être développé et pleinement caractérisé, sa faisabilité ayant été démontrée par le couplage de sondes fluorescentes. Dans un second temps, le contrôle de la quantité de matière greffée ainsi que la possibilité de développer une bi-fonctionnalisation, comprenant un agent de ciblage et un agent de furtivité, correspondent à des enjeux prioritaires.

L'élucidation du mécanisme d'internalisation et l'étude du devenir de ces nanoassemblages hybrides sur de longues périodes de temps est indispensable pour imaginer l'utilisation de ces systèmes pour des applications en théranostique. Ce devenir pourra toutefois être influencé par la nature chimique de la surface, fonction des entités greffées.

Outre les nanoparticules d'oxyde de fer, les nanoparticules d'or sont également très utilisées dans le domaine de la bio-imagerie pour deux raisons principales. La première raison repose sur la facilité de bioconjuguer une surface d'or à l'aide de protéines par exemple et la deuxième raison sur la possibilité d'imager les tissus par diffusion de rayonnement dans le proche infrarouge. Tout comme les nanoparticules d'oxyde de fer, les nanoparticules d'or peuvent générer un échauffement local par photothermie, grâce à une sollicitation optique et non plus magnétique. De plus, la combinaison de propriétés magnétique et plasmonique n'a été que très peu étudiée dans la littérature en tant que domaine de recherche fondamentale. Pour ces raisons, les nanoassemblages fluo@mag ont pu être stabilisés par des germes d'or de 2 nm, eux-mêmes stabilisés par de l'acide thiomalique, composé d'une part de deux unités acides carboxyliques pour un greffage sur le fer et d'autre part d'un groupe thiol pour chélater des germes d'or. Des nanoassemblages bimétalliques ont ainsi été obtenus et différents essais de croissance des germes d'or en surface ont débuté dans le groupe pour former des coquilles d'or, caractérisées par l'apparition d'une bande plasmonique de surface localisée décalée dans le proche infrarouge.

L'amélioration des propriétés magnétiques du système représente également un point important qui peut paraître simple mais qui nécessite la formation de nanoparticules en l'absence de ligand complexant pour faciliter la formation des nanoassemblages fluo@mag. La synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer par décomposition thermique fournit en général des nanoparticules avec un degré élevé de cristallinité, augmentant la valeur de l'aimantation à saturation, mais nécessitant une étape de transfert en phase aqueuse en l'absence de ligand complexant

Chapitre VI : Partie expérimentale

Chapitre VI : Partie expérimentale	219
6.1 Méthodes générales	221
6.2 Instrumentations	222
6.2.1 Analyses moléculaire	222
6.2.2 Analyses et caractérisations de nanoparticules	224
6.2.3 Microscopie de fluorescence	225
6.3 Synthèse organique de fluorophores	226
6.4 Fonctionnalisation de polymères et biomolécules	241
6.5 Synthèse de nanoparticules et stabilisation	242
6.6 Etudes biologiques <i>in vitro</i>	244
6.7 Etudes biologiques <i>in vivo</i>	248
6.8 Références bibliographiques	250

6.1 Méthodes générales

General procedures. All chemical reagents and solvents were purchased from commercial sources (Aldrich, Acros, SDS) and used as received. Spectroscopic grade solvents purchased from Aldrich were used for spectroscopic measurements. 4-bis(4'-tert-butylbiphenyl-4-yl)aminobenzaldehyde⁹² was synthesized according to literature procedures.

All air-sensitive reactions were performed under argon or nitrogen using a vacuum line. Analytical TLC was performed on Kieselgel F-254 precoated plates. Visualization was done with UV lamp. Flash chromatography was carried out with silica gel 60 (230-400 mesh) from SDS.

6.2 Instrumentations

6.2.1 Analyses moléculaire

NMR Spectroscopy. ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{31}P NMR spectra were recorded on Bruker 300 MHz or 400 MHz spectrometers. Chemical shifts δ were reported in ppm and referenced to the residual solvent.

Low resolution mass spectroscopy. LRMS were recorded on a DSQII (ThermoFisher Scientific) after chemical ionization (ammoniac gas) or electronic ionization (electron accelerated at 70 eV). Analysis were performed using quadripolar analyser.

High resolution mass spectroscopy. HRMS were recorded on three different instruments:

- LTQ-Orbitrap (ThermoFisher Scientific, LABERCA laboratory, ONIRIS, Nantes, France), using positive electrospray ionization,
- LC-Q-ToF (Synapt-G2 HDMS, Waters, IRS, Nantes) using positive or negative electrospray ionization,
- MALDI-TOF-TOF (Autoflex III, Bruker, INRA (BIBS), Nantes) using positive ionization. Two different matrices can be used, DHB (dihydroxybenzoic acid or Dithranol) or DCTB (T-2-(3-(4-*tert*-butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene) malononitrile).

Photophysical experiments. UV-visible absorption spectra were recorded using a Varian Model Cary 5E spectrophotometer equipped with an integrating sphere DRA 2500. Molar absorption coefficients were obtained by an average of at least two measurements with less than 10% variation.

Two spectrofluorimeters were used (Jobin-Yvon/Horiba, Fluoromax 3 and Fluorolog 2). One of them (Fluoromax 3) was unequipped with correction for the emission spectra with regard to the spectral response of the detector. Unless explicitly written, corrected emission spectra were obtained otherwise. Fluorescence quantum yields were determined in solution from f_{vin} (1) ($\phi_{\text{f}} = 0.22$)¹⁵⁴ in toluene, referred to coumarine 540 A in EtOH ($\phi_{\text{f}} = 0.38$)²⁰³.

Fluorescence intensity decays. Fluorescence intensity decays were measured by the time-correlated single-photon counting method (TCSPC) using two different systems:

- For fast fluorescent decays, the lifetime measurements were performed with a femtosecond laser excitation at 450 nm at a magic angle provided by a Spectra-Physics setup composed of a Titanium-Sapphire Tsunami laser pumped by a doubled YAG laser (Millennia), pumped itself by a two-laser diode array, and doubling LBO crystals. Light pulses at 900 nm were selected by optoacoustic crystals at a repetition rate of 4 MHz, and then doubled at 450 nm. Fluorescence photons were detected at 580 nm through a monochromator by means of a Hamamatsu MCP R3809U photomultiplier, connected to a constant-fraction discriminator. The time-to-amplitude converter was from Tennelec. Pulse deconvolution was performed from the time profile of the exciting pulse recorded under the same conditions by using a Ludox solution. The fluorescence data were analyzed by a nonlinear least-squares global method using the Globals software package developed at the Laboratory for Fluorescence Dynamics at the University of Illinois at Urbana-Champaign (Globals software, Irvine, CA, USA).
- For longer fluorescence decays, a fully automated spectrofluorimeter (Fluotime 300 ,PicoQuant), was employed to access lifetimes from the picosecond to the second ranges.

Excitation was performed using a laser diode at 449 nm or a LED at 336 nm, with a full width at half maximum of respectively 70 ps and 500 ps for the excitation pulse. Fluorescent decays were recorded using a Hybrid-PMT detector combined with an acquisition temporal resolution up to 25 ps.

Two-photon absorption cross section. Two-photon excited fluorescence measurements (TPEF) were performed using a confocal laser scanning microscope DMI 6000 (Leica) with a SP5-AOBS unit equipped with an oil immersion objective (63×, NA = 1.4), and a Chameleon Ti:Sapphire laser delivering pulses in the 100–200 fs range at an 80 MHz repetition rate with a tunability ranging from 705 to 980 nm. Fluorescein in 0.01 mol.L⁻¹ sodium hydroxide solution was employed as a reference for two-photon excitation. Quadratic dependence of the collected emission with the laser pump beam power as well as spectral matching between the one-photon and two-photon emission maxima were checked. The TPA cross-sections of the sample $\sigma_{\text{TPA}}^{\text{s}}$ were calculated from the following expression:

$$\sigma_{\text{TPA}}^{\text{s}} = \frac{\varphi_{\text{F}}^{\text{ref}} c_{\text{ref}} I_{\text{s}}}{\varphi_{\text{F}}^{\text{s}} c_{\text{s}} I_{\text{ref}}} \sigma_{\text{TPA}}^{\text{ref}}$$

where $\varphi_{\text{F}}^{\text{i}}$ designates the fluorescence quantum yield of compound i, c_{i} the concentration of compound i deduced from UV-vis absorption measurements in solution, I_{i} the integrated fluorescence signal emitted by the compound i and detected at each wavelength¹⁶.

Infrared experiments

Anhydrous and spectroscopic grade solvents (CCl₄, CHCl₃, and toluene) were used for all experiments. A 0.5 mm-long CaF₂ cell was filled with the solution prepared in a glove box to avoid moisture. The spectra were recorded using an infrared Bruker Tensor 27 spectrometer.

Ab initio calculations – methods. All calculations have been performed with the Gaussian09.A.02 program²⁰⁴, using default procedures, algorithms and integration grids, except when noted below. We have applied the range-separated dispersion-corrected hybrid functional ω B97X-D, developed by Head-Gordon and coworkers¹⁴⁸, throughout the calculations. Such a choice was motivated by recent benchmarks that demonstrated the efficiency of this functional for simulating both weak interactions (including hydrogen bonds)¹⁵⁰, and spectroscopic properties, especially for excited states presenting a charge-transfer nature¹⁴⁹. The ground and excited state structures have been optimized using analytic DFT and TD-DFT gradients, respectively. For the former, analytic Hessian calculations have been performed to ascertain the nature (true minimum) of each optimized structure. These force minimizations have been performed until the residual mean square force was smaller than 1×10^{-5} a.u. The SCF convergence threshold was systematically tightened to at least 10^{-8} a.u. For determining the relative stabilities of the different conformers (listed in the main text), we have performed conformational search starting for both fPOH (X) and fdCO₂H (X) from several chemically sound conformers corresponding to extended (H-bond free), or folded (H-bond towards the cyano or the carbonyl groups) structures. To reach accurate relative free energies in solution, we have followed a procedure similar to the one of Truhlar and coworkers¹⁵³. In short, geometry optimizations have been performed (in gas phase) at the ω B97X-D/6-311G(d,p) level and the same level of theory was used to determine the free energies (G). These values were next corrected for both basis set effects [ω B97X-D/6-311++G(d,p)] and solvent effects [SMD²⁰⁵- ω B97X-D/6-311++G(d,p)] through single point

6.2/ Instrumentations

calculations. TD-DFT was used to probe the nature of the excited states of the two fluorophores. For these simulations, the gas phase geometries have been reoptimized at the PCM¹⁵¹- ω B97X-D/6-311G(d,p) level, using toluene as a solvent. Next the vertical transition energies have been determined at the PCM-TD- ω B97X-D/6-311++G(d,p) level, within the linear-response vertical TD model. The fluorescence signatures have been determined at the same level, using excited state geometries optimized at the PCM-TD- ω B97X-D/6-311G(d,p) level. For determining the excited state energies, we applied the most accurate state-specific (SS) PCM model that allows for correct polarization of the solvent cavity surrounding the dye in the excited state in the continuum model¹⁵². The CT parameters have been computed using a density-based models determining the barycenters of density increase/decrease upon electronic transitions²⁰⁶.

Thermal scanning calorimetry analyses. Thermal properties were measured by using differential scanning calorimetry (Netzsch- Maia DSC 200 F3) in alumina caps under a nitrogen flow at a scan rate of 20 °C.min⁻¹ over the temperature range [-10°C - 250°C].

6.2.2 Analyses et caractérisations de nanoparticules

Nanoparticles diameter and surface potential characterisation. The hydrodynamic diameter and size dispersion of the nanoparticles were determined by dynamic light scattering (DLS) by means of a nanoparticle size analyzer Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments) equipped with a 4 mW He-Ne laser, operating at 633 nm, and a photomultiplier detector collecting backscattered light at an angle of 175°. Measurements were carried out at 20 °C on aqueous solutions of NPs. For each sample, intensity measurements were carried out in a multi-acquisition mode implying automatically adjusted correlograms, and averaged measurements on 3 acquisitions. Nanoparticle mean sizes and distribution widths were obtained by fitting each correlogram with a Cumulants algorithm.

Measurements of surface potential ζ were carried out by means of a Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern). The samples were placed in quartz cells. Several measurements were realized for each sample according to a predefined operating procedure.

Infrared experiments

Nanoparticles were lyophilizing before adding dried potassium bromide (1/10). After adding pressure in order to obtain a solid flat sample, the transmission spectra were recorded using an infrared Bruker Tensor 27 spectrometer.

Electronic microscopy. Nanoparticle morphology was investigated by transmission electron microscopy (TEM, Hitachi HF2000-FEG (100 kV) or MO-Jeol 1230 (80 kV)). Solutions of nanoparticles were deposited onto holey carbon-coated copper grids (300 mesh) for all compounds except for the fluo@mag nanoparticles prepared out of the naked γ -Fe₂O₃ nanoparticles dispersed in diluted nitric acid, which were deposited onto holey carbon-coated gold grids (300 mesh).

Scanning electron microscopy was carried out after deposition of a sample drop on an ultra-smooth silicon wafer (ACM-France) using a JEOL 6400F, operating at a 8 mm working distance under a 7 kV voltage.

Magnetic characterizations. Temperature dependent magnetization experiments on the colloidal suspension of fluo@mag nanoparticles ($[\text{Fe}] \sim 6.5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) were collected with a Quantum Design MPMS-5S SQUID magnetometer working at the temperature of 298 K and in the magnetic field range 0–2 T. The samples were diluted enough to avoid magnetic dipole–dipole interactions. The hysteresis loops were performed at 298 K in ZFC samples.

Magnetic relaxometry. Measurements of ^1H NMR longitudinal (T_1) and transverse (T_2) relaxation times at different frequencies ν were performed at room temperature on water diluted solutions of nanoassemblies compared to free iron oxide nanoparticles in the range $10 \text{ kHz} \leq \nu \leq 60 \text{ MHz}$ for T_1 and $15 \text{ MHz} \leq \nu \leq 60 \text{ MHz}$ for T_2 . Generation and detection of the NMR signal involved a Smartracer Stellar relaxometer (using the Fast-Field-Cycling technique) for $10 \text{ kHz} \leq \nu \leq 10 \text{ MHz}$, a Stellar Spinmaster spectrometer for $\nu > 10 \text{ MHz}$. In the second case, the standard radio frequency excitation sequences Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)-like (T_2) and saturation recovery (T_1) were used. The efficiency of samples as MRI contrast agents was determined from the measured T_1 and T_2 by calculating the nuclear longitudinal r_1 and transverse r_2 relaxivities as given by the following equation:

$$r_i = [(1/T_i) - (1/T_i)_{\text{water}}] / c$$

where $(1/T_i)$ is the measured value for the sample, c is the concentration of magnetic centers (in mmol.L^{-1}) and $(1/T_i)_{\text{water}}$ refers to the nuclear relaxation rate of diamagnetic water molecules. r_1 and r_2 relaxivities measure the increase of the nuclear spin-lattice and spin-spin relaxation rates respectively, due to the presence of a magnetic system in the solvent.

6.2.3 Microscopie de fluorescence

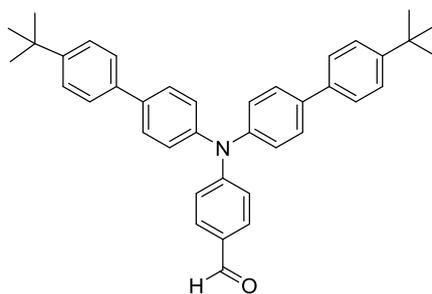
Fluorescent microscopy. Widefield fluorescence microscopy was performed by means of a Nikon Eclipse Ti working in the inverted mode (oil-immersion objective Plan Apo, 60x, NA = 1.4.) Excitation was performed using a Hamamatsu Xenon-mercury lamp with appropriate long-pass filter (>515 nm) and excitation wavelength at 482 nm.

Confocal fluorescence microscopy was performed in the confocal mode by means of two kinds of laser-scanning microscopy (LSM) working in the inverted mode:

one-photon confocal fluorescence imaging: Nikon A1R Si equipped with Ar+ and He-Ne lasers as excitation sources (use of an oil-immersion objective Plan Apo, 60x, NA = 1.4, $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$).

two-photon fluorescence imaging: Zeiss LSM 780 AxioObserver equipped with a tunable mode-locked Ti:Sapphire femtosecond laser (Mai Tai DeepSee, Spectra-Physics 690-1060 nm), a 32-channel QUASAR GaAsP detector array allowing for spectral imaging, and a water immersion objective C-Apochromat (63x, NA = 1.15). The samples were excited with 1% of the 830 nm light (2.86 W maximum power at 830 nm) and their emission spectra were observed either as 32 separate spectral channels with about 10 nm intervals covering a total range of 411-758 nm (lambda mode) or as 2 channels combining the detectors in the range 411-490 and 550-758 nm, respectively (channel mode). All image acquisition was performed using the Zeiss Zen2012 software.

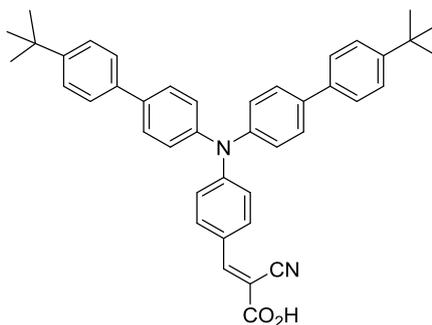
6.3 Synthèse organique de fluorophores



(2)

C₃₉H₃₉NO – Mw: 537.73 g/mol

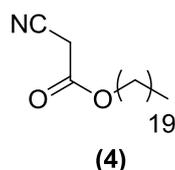
4-di(4'-tert-butylbiphenyl-4-yl)aminobenzaldehyde (2)⁹². Procedure adapted from literature in 4 steps, starting from diphenylamine. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 9.83 (s, 1H), 7.72 (d, ³J(H-H) = 8.8 Hz, 2H), 7.57 (d, ³J(H-H) = 8.8 Hz, 4H), 7.53 (d, ³J(H-H) = 9.1 Hz, 4H), 7.47 (d, ³J(H-H) = 8.6 Hz, 4H); 7.25 (d, ³J(H-H) = 8.6 Hz, 4H), 7.13 (d, ³J(H-H) = 8.7 Hz, 2H), 1.37 (s, 18H) ppm. ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ = 190.6, 153.3, 150.5, 145.2, 137.9, 137.5, 131.5, 129.5, 128.3, 126.7, 126.5, 125.9, 120.0, 34.7, 31.5 ppm.



(3)

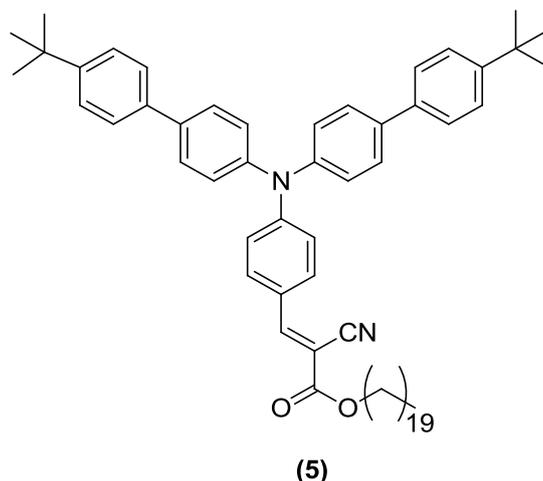
C₄₂H₄₀N₂O₂ – Mw: 604.78 g/mol

(E)-3-{4-[bis(4'-tert-butylbiphenyl-4-yl)amino]phenyl}-2-cyanopropen-2-ic acid (3). Under argon atmosphere, (2) (500 mg, 0.93 mmol, 1 eq.) and cyanoacetic acid (119 mg, 1.40 mmol, 1.5 eq.) were dissolved in anhydrous pyridine (10 mL). Acetic acid (2 mL) and ammonium acetate (cat) were added. The reaction mixture was then heated at 80°C for 16 h. After cooling down to room temperature, the solution was poured into water (50 mL) under stirring to precipitate a red compound. This crude product was filtered and washed with water, slightly acidic and finally with petroleum ether to yield compound (3) as a red powder (496 mg; 88 %). T_g: 123 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ = 8.15 (s, 1H), 7.96 (d, ³J(H-H) = 9.1 Hz, 2H), 7.70 (d, ³J(H-H) = 8.6 Hz, 4H), 7.60 (d, ³J(H-H) = 8.6 Hz, 4H), 7.48 (d, ³J(H-H) = 8.6 Hz, 4H), 7.29 (d, ³J(H-H) = 8.6 Hz, 4H), 7.01 (d, ³J(H-H) = 9.1 Hz, 2H), 1.37 (s, 18H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ = 164.0, 153.1, 151.4, 149.9, 144.3, 137.1, 136.4, 132.9, 130.1, 128.0, 126.5, 126.2, 125.7, 123.4, 119.0, 117.0, 98.5, 34.2, 31.1 ppm. UV-Vis (toluene), λ_{max} (ε_{max} (mol⁻¹ L cm⁻¹)): 443 (2.17×10⁴), 327 (1.89×10⁴) nm. λ_{em} (Φ_f): 567 (0.18) nm. HRMS (MALDI-TOF), m/z (M⁺, 100%): for C₄₂H₄₀N₂O₂ calculated 604.3084, found 604.3070.



$C_{23}H_{43}NO_2$ – Mw: 365.59 g/mol

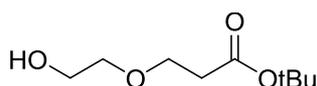
Icosyl 2-cyanoacetate (4). Adapted procedure from compound (10) using a solution of cyanoacetic acid (282 mg, 3.32 mmol, 1.5 eq.), 4-(dimethylamino)pyridinium 4-toluenesulfonate (326 mg, 1.11 mmol, 0.5 eq.), eicosanol (660 mg, 2.21 mmol, 1 eq.) in dichloromethane (15 mL). Then, *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (684 μ L, 4.42 mmol, 2 eq) in dichloromethane (20 mL) was added dropwise. After removing the white solid and washing it with cold dichloromethane, purification by silica gel column chromatography (dichloromethane:petroleum ether, 4:6) afforded compound (4) as a white solid (810 mg, 100 %). 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 4.20 (t, $^3J(H-H)$ = 6.6 Hz, 2H), 3.45 (s, 2H), 1.70-1.65 (m, 2H), 1.38-1.25 (m, 34H), 0.88 (t, $^3J(H-H)$ = 6.4 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ = 163.1, 113.1, 67.3, 32.1, 29.6, 29.5, 29.3, 28.5, 25.8, 24.9, 22.8, 14.3 ppm. HRMS (ESI+), m/z ($[M+Na]^+$, 100%): for $C_{23}H_{43}O_2NNa$ calculated: 388.31860; found: 388.31873.



$C_{62}H_{80}N_2O_2$ – Mw : 885.31 g/mol

(E)-icosyl 3-(4-(bis(4'-(tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)-2-cyanoacrylate (5). Adapted procedure from (9) using a solution of (1) (200 mg, 0.372 mmol, 1 eq.) and (4) (204 mg, 0.56 mmol, 1.5 eq.) in anhydrous pyridine (4 mL), glacial acetic acid (1 mL) and ammonium acetate (cat). Purification by silica gel column chromatography (petroleum ether:dichloromethane, 7:3) afforded compound (5) as a red fluorescent solid (322 mg, 97 %). T_g : 85.8°C. 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 8.10 (s, 1H), 7.89 (d, $^3J(H-H)$ = 9.1 Hz, 2H), 7.59-7.46 (m, 12H), 7.28-7.26 (m, 4H), 7.09 (d, $^3J(H-H)$ = 9.1 Hz, 2H), 4.28 (t, $3J$ = 6.6 Hz, 2H), 1.77-1.72 (m, 2H), 1.37 (s, 18H, t-Bu), 1.25 (m, 32H), 0.87 (t, $3J$ = 6.7 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ = 207.0, 163.9, 154.0, 152.4, 150.6, 144.8, 138.3, 137.5, 133.3, 128.4, 126.7, 126.4, 126.0, 119.8, 116.8, 97.7, 66.5, 34.7, 32.1, 31.5, 31.1, 29.9, 29.7, 29.7, 29.5, 29.4, 28.8, 27.0, 22.8, 14.3 ppm. UV-vis (toluene), λ_{max} (ϵ_{max} ($mol^{-1}Lcm^{-1}$): 443 (3.28×10^4), 330 (2.12×10^4) nm, λ_{em} (Φ_f): 569 (0.25) nm. HRMS (MALDI-TOF), m/z ($[M+Na]^+$, 100%): for $C_{62}H_{80}N_2O_2$ calculated 884.6214, found 884,6212.

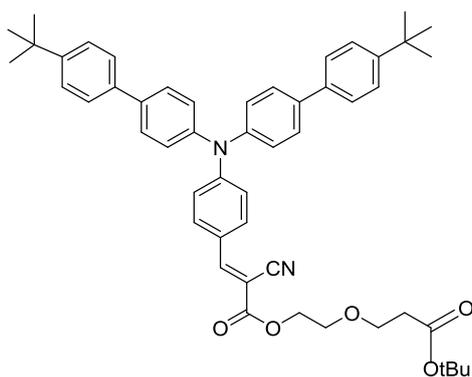
6.3/ Synthèse organique de fluorophores



(6)

$C_9H_{18}O_4$ – Mw: 190.24 g/mol

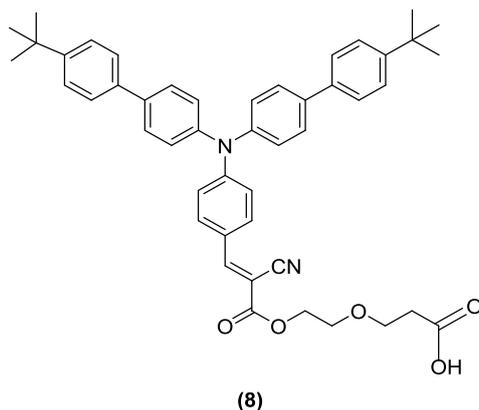
Tert-butyl 3-(2-hydroxyethoxy)propanoate (6). To a solution of anhydrous ethylene glycol (2.540 g, 40.95 mmol, 3 eq.) in tetrahydrofuran was added a portion of oil-free sodium (9.4 mg, 0.41 mmol, 0.03 eq.). The resulting mixture was stirred for 2 h at room temperature and heated at 40 °C for a further 2.5 h. After cooling down to room temperature, *tert*-butylacrylate (1.75 g, 13.7 mmol, 1 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for an additional 18 h. After solvent removal under vacuum, the oily residue was washed with brine and extracted 6 times with ethyl acetate. The combined organic extracts were dried over anhydrous sodium sulfate. A crude colorless oil was obtained after solvent removal under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography with ethyl acetate: petroleum ether as an eluent (1:1) afforded compound (6) as a colorless oil (0.549 mg, 18 %). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.73 (t, $^3J(H-H)$ = 6.2 Hz, 2H), 3.72 (t, $^3J(H-H)$ = 4.8 Hz, 2H), 3.58 (t, $^3J(H-H)$ = 4.8 Hz, 2H), 2.51 (t, $^3J(H-H)$ = 6.2 Hz, 2H), 1.46 (s, 9H, *t*-Bu) ppm. ^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 171.4, 81.0, 72.0, 66.5, 61.7, 36.2, 28.2 ppm. HRMS (ESI+), m/z ($[M+Na]^+$, 100%): for $C_9H_{18}O_4Na$ calculated 213.1097, found 213.1101.



(7)

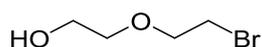
$C_{51}H_{56}N_2O_5$ – Mw: 777.00 g/mol

(E)-2-(3-(tert-butoxy)-3-oxopropoxy)ethyl 3-{4-[bis(4'-tert-butylbiphenyl-4-yl)amino]phenyl}-2-cyanopropen-2-oate (7). To a solution of (3) (200 mg, 0.331 mmol, 1 eq.), 4-(dimethylamino)pyridinium 4-toluenesulfonate (48.7 mg, 0.166 mmol, 0.5 eq.) and (6) (64.9 mg, 0.331 mmol, 1 eq.) in anhydrous dichlorometane (23 mL) was slowly added *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (83.5 mg, 0.662 mmol, 2 eq.) over 10 min. After stirring for 20 h at room temperature, the solution was concentrated under reduced pressure to provide a crude red solid. Purification by silica gel column chromatography (ethylacetate:petroleum ether, 8:2) afforded compound (7) as a bright red solid (196 mg, 76 %). T_g : 67 °C. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.12 (s, 1H), 7.90 (d, $^3J(H-H)$ = 8.6 Hz, 2H), 7.59-7.46 (m, 12H), 7.28-7.26 (m, 4H), 7.10 (d, $^3J(H-H)$ = 8.6 Hz, 2H), 4.42 (t, $^3J(H-H)$ = 4.7 Hz, 2H), 3.79-3.75 (m, 4H), 2.51 (t, $^3J(H-H)$ = 6.5 Hz, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.37 (s, 18H) ppm. ^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.9, 163.8, 154.3, 152.5, 150.6, 144.7, 138.1, 137.4, 133.4, 128.4, 126.7, 126.5, 126.0, 123.7, 119.7, 116.7, 97.2, 80.8, 68.7, 67.2, 65.4, 43.5, 36.4, 34.7, 31.5, 28.2, 22.7, 21.2 ppm. UV-vis (toluene), λ_{max} (ϵ_{max} (mol $^{-1}$ L cm $^{-1}$): 439 (2.88 $\times 10^4$), 330 (1.93 $\times 10^4$) nm, λ_{em} (Φ_f): 584 (0.19) nm. HRMS (MALDI-TOF), m/z (M^+ , 100%): for $C_{51}H_{56}N_2O_5$ calculated 776.4184, found 776.4156.



$C_{47}H_{48}N_2O_5$ – Mw : 720.89 g/mol

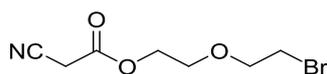
(E)-3-{2-[(3-{4-[bis(4'-tert-butylbiphenyl-4-yl)amino]phenyl}-2-cyanoacryloyl)oxy]ethoxy} propanoic acid (8). A solution of (7) (170 mg, 0.219 mmol) in neat trifluoroacetic acid (10 mL) was stirred for 2 h at room temperature. The dark red crude mixture was added to a large volume of cold water (100 mL) and extracted with ethyl acetate. The combined extracts were washed with sodium hydrogenocarbonate to remove the excess of trifluoroacetic acid. The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate. After solvent removal under reduced pressure, the crude red solid was purified by silica gel column chromatography (dichlorometane:methanol, 95:5) to afford compound (8) as a red fluorescent solid (98 mg, 41 %). T_g : 82 °C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.11 (s, 1H), 7.89 (d, $^3J(H-H)$ = 9.1 Hz, 2H), 7.58 (d, $^3J(H-H)$ = 8.6 Hz, 4H), 7.53 (d, $^3J(H-H)$ = 8.6 Hz, 4H), 7.47 (d, $^3J(H-H)$ = 8.6 Hz, 4H), 7.26 (d, $^3J(H-H)$ = 8.6 Hz, 4H), 7.09 (d, $^3J(H-H)$ = 9.1 Hz, 2H), 4.43 (t, $^3J(H-H)$ = 4.8 Hz, 2H), 3.84 (t, $^3J(H-H)$ = 5.9 Hz, 2H), 3.79 (t, $^3J(H-H)$ = 4.8 Hz, 2H), 2.65 (t, $^3J(H-H)$ = 5.9 Hz, 2H), 1.37 (s, 18H,) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 175.2, 163.8, 154.5, 152.6, 150.6, 144.7, 138.4, 137.4, 133.5, 128.4, 126.7, 126.0, 123.7, 119.7, 116.8, 96.9, 68.9, 66.7, 65.2, 34.7, 31.5, 29.9 ppm. UV-Vis (toluene), λ_{max} (ϵ_{max} (mol $^{-1}$ Lcm $^{-1}$): 445 (2.89 $\times 10^4$), 327 (1.98 $\times 10^4$) nm, λ_{em} (Φ_f): 586 (0.19) nm. HRMS (MALDI-TOF), m/z (M^+ , 100%): for $C_{47}H_{48}N_2O_5$ calculated 720.3558, found 720.3577.



$C_4H_9BrO_2$ – Mw: 169.02 g/mol

2-(2-bromoethoxy)ethanol (9). To a solution of diethylene glycol (5.53 g, 52.1 mmol, 3 eq.) and triphenylphosphine (4.35 g, 16.6 mmol, 1 eq.) in anhydrous tetrahydrofuran (10 mL), previously cooled at 0°C, was added carbon tetrabromide (5.5 g, 16.6 mmol, 1 eq.) portionwise to avoid overheating of the solution. The reaction mixture was allowed to stir at room temperature for 1 h. After solvent removal under reduced pressure, the crude oil was purified by silica gel chromatography (ethyl acetate:petroleum ether, 1:1) to obtain compound (9) as a colorless oil (2.87 g, 93 %). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.82 (t, 2H, $^3J(H,H)$ = 5.8 Hz), 3.75 (m, 2H, $^3J(H,H)$ = 4.2 Hz), 3.62 (m, 2H, $^3J(H,H)$ = 4.2 Hz), 3.49 (t, 2H, $^3J(H,H)$ = 5.9 Hz) ppm. ^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 72.2, 71.0, 61.8, 30.6 ppm. LRMS (CI-NH $_3$), m/z ($[M+NH_4]^+$, 100 %): for $C_4H_9BrO_2NH_4$ calculated 186.01, found 186.11.

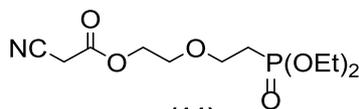
6.3/ Synthèse organique de fluorophores



(10)

$C_7H_{10}BrNO_3$ – Mw: 236.06 g/mol

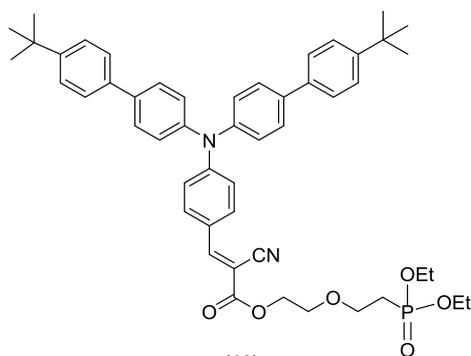
2-(2-bromoethoxy)ethyl 2-cyanoethanoate (10). A solution of cyanoacetic acid (377mg, 2.95 mmol, 1.5 eq.), 4-(dimethylamino)pyridinium 4-toluenesulfonate (434 mg, 1.47 mmol, 0.5 eq.) and (9) (500 mg, 2.95 mmol, 1 eq.) in tetrahydrofuran (15 mL) was cooled down to 0°C. A solution of *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (744 mg, 5.90 mmol, 2 eq.) in dichloromethane (30 mL) was added dropwise. The reaction mixture was allowed to stir at room temperature for 19 h. After solvent removal under reduced pressure, the crude yellow oil was purified by silica gel column chromatography (dichloromethane:petroleum ether, 99:1) to obtain compound (10) as a colorless oil (652 mg, 93 %). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.40-4.37 (m, 2H), 3.82 (t, $^3J(H-H)$ = 5.9 Hz, 2H), 3.78-3.75 (m, 2H), 3.51 (s, 2H), 3.47 (t, $^3J(H-H)$ = 6.1 Hz, 2H) ppm. ^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 163.0, 112.9, 71.2, 68.5, 65.7, 30.3, 24.5 ppm. LRMS (CI- NH_3), m/z ($[M+NH_4]^+$, 100%): for $C_7H_{10}BrNO_3NH_4$ calculated 253.01, found 253.15.



(11)

$C_{11}H_{20}NO_6P$ – Mw: 293.25 g/mol

2-[2-(diethoxyphosphoryl)ethoxy]ethyl 2-cyanoethanoate (11). A solution of compound (10) (700 mg, 2.97 mmol, 1 eq.) and triethylphosphite (0.600 mL, 593 mg, 1.2 eq.) was deaerated and heated at 150°C during 16 h under argon atmosphere. After cooling down to room temperature, the crude mixture was purified by column chromatography (ethyl acetate:petroleum ether, 1:1) to afford compound (11) as a colorless oil (554 mg, 63 %). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.35-4.34 (m, 2H), 4.12-4.08 (m, 4H), 3.75 (dt, $^3J(H-H)$ = 7.3 Hz, $^2J(H-P)$ = 12.5 Hz, 2H), 3.67-3.72 (m, 2H), 3.51 (s, 2H), 2.09 (dt, $^3J(H-H)$ = 7.5 Hz, $^2J(H-P)$ = 18.3 Hz, 2H), 1.32 (t, $^3J(H-H)$ = 7.2 Hz, 6H) ppm. ^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 163.1, 113.0, 68.1, 65.6, 65.3, 61.8 (d, $^2J(C-P)$ = 6 Hz), 27.0 (d, $^1J(C-P)$ = 140 Hz), 24.8, 16.5 ppm. ^{31}P NMR (160 MHz, $CDCl_3$): δ = 28.1 ppm. HRMS (MALDI-TOF), m/z ($[M+H]^+$, 100%): for $C_{11}H_{21}NO_6P$ calculated 294.1106, found 294.1112.

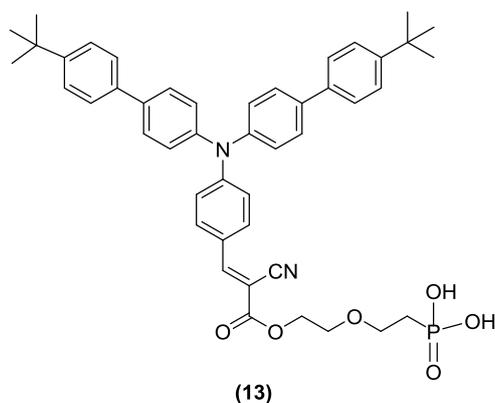


(12)

$C_{50}H_{57}N_2O_6P$ – Mw: 812.97 g/mol

(E)-2-[2-(diethoxyphosphoryl)ethoxy]ethyl 3-{4-[bis(4'-tert-butylbiphenyl-4-yl)amino]phenyl}-2-cyanopropen-2-oate (12). To a solution of (2) (150 mg, 0.270 mmol, 1 eq.) and (11) (123 mg, 0.410

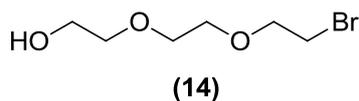
mmol, 1.5 eq.) in anhydrous pyridine (2 mL) were added glacial acetic acid (0.4 mL) and ammonium acetate (cat). The reaction mixture was heated at 60°C for 14 h. After cooling down to room temperature, the reaction mixture was poured into water (15 mL) and the crude red solid was filtered. Purification by silica gel column chromatography (dichloromethane:ethyl acetate, 3:7) afforded compound (12) as a red fluorescent solid (197 mg, 87 %). T_g : 52°C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.12 (s, 1H), 7.89 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 9.0Hz, 2H), 7.58 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 8.5Hz, 4H), 7.54 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 8.5Hz, 4H), 7.47 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 8.4Hz, 4H), 7.27 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 8.5Hz, 2H), 7.09 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 8.9Hz, 2H), 4.44-4.42 (m, 2H), 4.13-4.09 (m, 4H), 3.80-3.75 (m, 4H), 2.13 (td, $^3J(\text{H-H})$ = 7.3Hz, $^2J(\text{P-H})$ = 18.7Hz, 2H), 1.37 (s, 18H), 1.32 (t, 6H, $^3J(\text{H-H})$ = 7.1Hz) ppm. ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ = 163.9, 154.6, 152.7, 150.7, 144.8, 138.5, 137.6, 133.6, 128.5, 126.8, 126.1, 123.8, 119.8, 116.9, 97.2, 68.7, 65.6, 65.3, 62.0 (d, $^2J(\text{C-P})$ = 6.2 Hz), 34.8, 31.6, 27.3 (d, $^1J(\text{C-P})$ = 138.8 Hz), 16.7 (d, $^3J(\text{C-P})$ = 5 Hz) ppm. ^{31}P NMR (160 MHz, CDCl_3): δ = 28.5 ppm. UV-Vis (toluene), λ_{max} (ϵ_{max} ($\text{mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$): 443 (3.74×10^4), 325 (2.43×10^4) nm, λ_{em} (Φ_f): 575 (0.22) nm. HRMS (MALDI-TOF), m/z ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100%): for $\text{C}_{50}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_6\text{PNa}$ calculated 835.3846, found 835.3852.



$\text{C}_{46}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$ – Mw: 756.86 g/mol

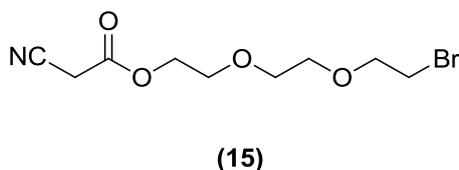
(E)-(2-{2-[(3-{4-[bis(4'-(tert-butyl)biphenyl-4-yl)amino]phenyl)-2-cyanoacryloyl]oxy}ethoxy}ethyl)phosphonic acid (13). Trimethylsilyl bromide (1.18 g, 7.57 mmol, 30 eq.) was added to a solution of (9) (200 mg, 0.24 mmol, 1 eq.) in anhydrous dichloromethane (6 mL). The reaction mixture was allowed to stir for 15 h at room temperature under argon atmosphere. Excess of trimethylsilylbromide and solvent were removed under reduced pressure to give a crude red solid which was further dissolved in anhydrous methanol. The mixture was then stirred for an additional 2 h and methanol was removed under reduced pressure. The crude red phosphonic acid was then dissolved in excess of diethyl ether and methanol was added in order to precipitate compound (13) as an orange solid (181 mg, 100 %). T_g : 173 °C. ^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 8.20 (s, 1H), 7.94 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 9.1 Hz, 2H), 7.66 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 8.6 Hz, 4H), 7.57 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 8.6 Hz, 4H), 7.48 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 8.6 Hz, 4H), 7.29 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 8.6 Hz, 4H), 7.07 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 9.1 Hz, 2H), 4.43 (t, $^3J(\text{H-H})$ = 4.8 Hz, 2H), 3.81-3.77 (m, 4H), 2.09 (td, $^3J(\text{H-H})$ = 7.7Hz, $^2J(\text{H-P})$ = 18.8 Hz, 2H), 1.36 (s, 18H,) ppm. ^{31}P NMR (160 MHz, MeOD): δ = 21.8 ppm. UV-Vis (toluene), λ_{max} (ϵ_{max} ($\text{mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$): 442 (2.83×10^4), 327 (2.70×10^4) nm, λ_{em} (Φ_f): 595 (0.002) nm. HRMS (MALDI-TOF), m/z ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100%): for $\text{C}_{46}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_6\text{PNa}$ calculated 779.3220, found 779.3247.

6.3/ Synthèse organique de fluorophores



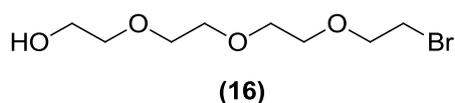
$C_6H_{13}BrO_3$ – Mw: 213,07 g/mol

2-(2-(2-bromoethoxy)ethoxy)ethanol (14). Adapted procedure from compound (9) using a solution of triethylene glycol (4.98 g, 33.2 mmol, 2 eq), triphenylphosphine (4.35 g, 16.6 mmol, 1 eq) and carbon tetrabromide (5.5 g, 16.6 mmol, 1eq). Compound (14) was obtained as a colorless oil (3.07 g, 52 %) containing 45 % weight of triphenylphosphine oxide. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.81 (t, $^3J(H-H)$ = 6.4 Hz, 2H), 3.75-3.72 (m, 2H), 3.69-3.67 (m, 4H), 3.63-3.60 (m, 2H), 3.47 (t, $^2J(H-H)$ = 6.2 Hz, 2H) ppm. ^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 72.6, 71.3, 70.7, 70.5, 61.9, 30.6 ppm. LRMS (CI- NH_3), m/z ($[M+NH_4]^+$, 100 %): for $C_6H_{13}BrO_3$ calculated 212.00, found 230.08.



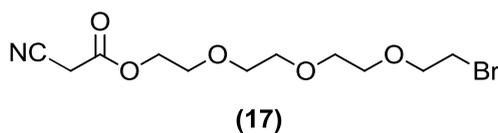
$C_9H_{14}BrNO_4$ – Mw: 280,12 g/mol

2-(2-(2-bromoethoxy)ethoxy)ethyl 2-cyanoacetate (15). Adapted procedure from compound (10) using a solution of cyanoacetic acid (382 mg, 4.49 mmol, 1.9 eq.), 4-(dimethylamino)pyridinium 4-toluenesulfonate (441 mg, 1.49 mmol, 0.65 eq.), (14) (500 mg, 2.35 mmol, 1 eq.) in tetrahydrofuran (15 mL). Then, a solution of *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (745 mg, 5.9 mmol, 2.5 eq.) in dichloromethane (30 mL) was added dropwise. Purification by silica gel column chromatography (ethyl acetate:dichloromethane, 3:97) afforded compound (15) as a colorless oil (409 mg, 62 %). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.39-4.36 (m, 2H), 3.82 (t, $^3J(H-H)$ = 6.1 Hz, 2H), 3.77-3.74 (m, 2H), 3.70-3.67 (m, 4H), 3.51 (s, 2H), 3.48 (t, $^3J(H-H)$ = 6.3 Hz, 2H) ppm. ^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 163.1, 113.0, 71.4, 70.8, 70.7, 68.8, 66.0, 30.5, 24.9 ppm. HRMS (MALDI-TOF), m/z ($[M+Na]^+$, 100%): for $C_9H_{14}BrNO_4$ calculated 301.9998, found 302.0008.



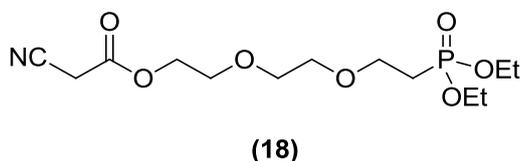
$C_8H_{17}BrO_4$ – Mw: 257.12 g/mol

2-(2-(2-(2-bromoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethanol (16). Adapted procedure from compound (9) using a solution of tetraethylene glycol (3.00 g, 15.4 mmol, 2 eq), triphenylphosphine (2.02 g, 7.70 mmol, 1 eq) and carbon tetrabromide (2.55 g, 7.70 mmol, 1eq). Compound (16) was obtained as a colorless oil (1.59 g, 20 %) containing 50 % weight of triphenylphosphine oxide. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.79 (t, $^3J(H-H)$ = 6.4 Hz, 2H), 3.72-3.69 (m, 2H), 3.67-3.63 (m, 8H), 3.60-3.57 (m, 2H), 3.46 (t, $^2J(H-H)$ = 6.1 Hz, 2H) ppm. ^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 72.6, 71.3, 70.7, 70.5, 70.4, 61.7, 30.4 ppm. HRMS (ESI+), m/z ($[M+Na]^+$): for $C_8H_{17}BrO_4Na$ calculated: 279,0208 ; found : 279,0213.



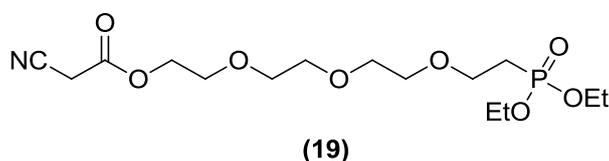
$C_{11}H_{18}BrNO_5$ – Mw: 324.17 g/mol

2-(2-(2-(2-bromoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 2-cyanoacetate (17). Adapted procedure from compound (10) using a solution of cyanoacetic acid (138 mg, 1.9 mmol, 1 eq), 4-(dimethylamino)pyridinium 4-toluenesulfonate (265 mg, 0.950 mmol, 0.5 eq), (16) (500 mg, 1.90 mmol, 1 eq) in dichloromethane (40 mL). Then, *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (480 mg, 3.80 mmol, 2 eq.) was added dropwise over the course of 5 minutes. Purification by silica gel column chromatography (ethyl acetate:petroleum ether, 6:4) afforded compound (17) as a colorless oil (457 mg, 74 %). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.38-4.34 (m, 2H), 3.81 (t, $^3J(H-H)$ = 6.1 Hz, 2H), 3.77-3.72 (m, 2H), 3.68-3.65 (m, 8H), 3.51 (s, 2H), 3.48 (t, $^3J(H-H)$ = 6.3 Hz, 2H) ppm. ^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 163.2, 113.1, 71.3, 70.8, 70.7, 68.7, 66.0, 30.5, 24.9 ppm. HRMS (MALDI-TOF), m/z ($[M+Na]^+$, 100%): for $C_{11}H_{18}BrNO_5Na$ calculated 346.0261, found 346.0246.



$C_{13}H_{24}NO_7P$ – Mw: 337,31 g/mol

2-(2-(2-(diethoxyphosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethyl 2-cyanoacetate (18). Adapted procedure from compound (11) using a solution of triethylphosphite (500 μ L, 3.52 mmol, 9.8 eq) and (15) (100 mg, 0.36 mmol, 1 eq). Purification by column chromatography (ethyl acetate:dichloromethane, 3/7 to ethyl acetate:methanol, 96/4) afforded compound (18) as colorless oil (74 mg, 59 %). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.32-4.29 (m, 2H), 4.12-3.98 (m, 4H), 3.75-3.53 (m, 8H), 3.51 (s, 2H), 2.08 (dt, $^3J(H-H)$ = 7.5 Hz, $^2J(H-P)$ = 18.6 Hz, 2H), 1.27 (t, $^3J(H-H)$ = 7.3 Hz, 6H) ppm. ^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 163.2, 113.1, 70.6, 70.1, 68.6, 65.7, 65.2, 61.7 (d, $^2J(C-P)$ = 6.6 Hz), 60.4, 27.0 (d, $^1J(C-P)$ = 139.1 Hz), 24.7, 16.5 (d, $^3J(C-P)$ = 6.2 Hz) ppm. ^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$): δ = 28.6 ppm. HRMS (MALDI-TOF), m/z ($[M+H]^+$, 100%): for $C_{13}H_{25}NO_7P$ calculated 338.1363, found 338.1375.

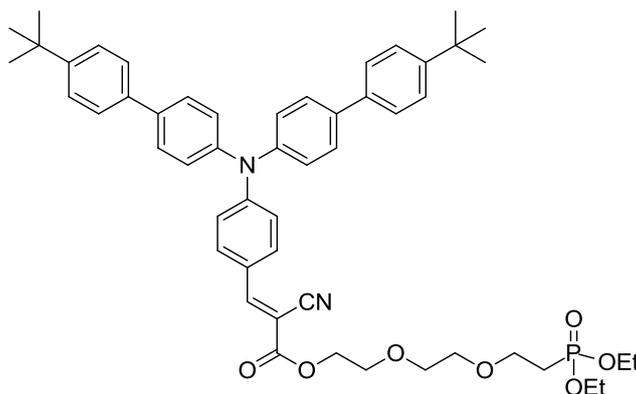


$C_{15}H_{28}NO_8P$ – Mw: 381.36 g/mol

2-(2-(2-(2-(diethoxyphosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 2-cyanoacetate (19). Adapted procedure from compound (11) using a solution of triethylphosphite (850 μ L, 4.90 mmol, 8 eq) and (17) (200 mg, 0.600 mmol, 1 eq). The compound purification involved a simple washing step using petroleum ether instead of a separation on column chromatography. Compound (19) was obtained as a colorless oil (185 mg, 80 %). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.41-4.32 (m, 2H), 4.18-4.03 (m, 4H), 3.81-3.56 (m, 12H), 3.52 (s, 2H), 2.12 (dt, $^3J(H-H)$ = 7.7 Hz, $^2J(H-P)$ = 18.8 Hz, 2H), 1.32 (t, $^3J(H-H)$ = 7.1 Hz, 6H) ppm. ^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 164.7, 113.9, 72.6, 70.6, 70.5, 70.3, 70.2, 65.0, 62.2 (d, $^2J(C-P)$ = 6.7 Hz), 61.7, 26.8 (d, $^1J(P-C)$ = 140.4 Hz), 24.8, 16.4 (d, $^3J(P-C)$ = 6.1 Hz) ppm. ^{31}P NMR (121

6.3/ Synthèse organique de fluorophores

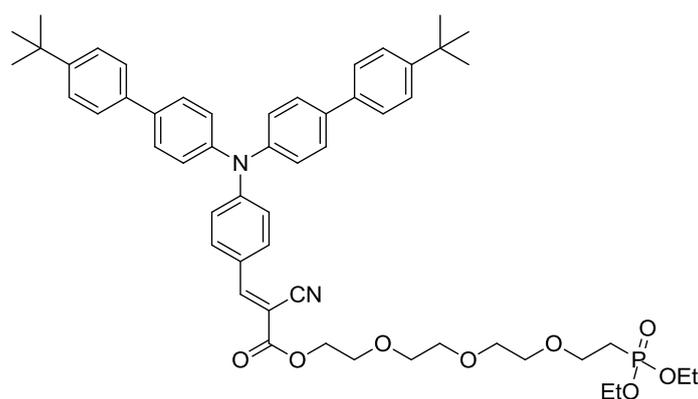
MHz, CDCl₃): δ = 28.6 ppm. HRMS (MALDI-TOF), m/z ([M+H]⁺, 100%): for C₁₅H₂₈NO₈P calculated 382.1625, found 382.1620.



(20)

C₅₂H₆₁N₂O₇P – Mw: 857.02 g/mol

(E)-2-(2-(2-(diethoxyphosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethyl 3-(4-(bis(4'-(tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)-2-cyanoacrylate (20). Adapted procedure from compound (12) using a solution of (2) (63 mg, 0.12 mmol, 1 eq.) and (18) (60 mg, 0.18 mmol, 1.5 eq.) in anhydrous pyridine (1.2 mL), glacial acetic acid (0.3 mL) and ammonium acetate (cat). No purification was needed after precipitation in water and compound (20) was obtained as an orange solid (0.100g, 97 %). T_g: 17°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.11 (s, 1H), 7.89 (d, ³J(H-H) = 9.4 Hz, 2H), 7.63-7.44 (m, 12H), 7.30-7.24 (m, 4H), 7.10 (d, ³J(H-H) = 9.0 Hz, 2H), 4.48-4.40 (m, 2H), 4.16-4.04 (m, 4H), 3.85-3.60 (m, 8H), 2.14 (dt, ³J(H-H) = 18.7 Hz, ²J(H-P) = 7.3 Hz, 2H), 1.37 (s, 18H), 1.32 (t, ³J(H-H) = 7.1 Hz, 6H) ppm. ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ = 163.9, 154.4, 152.6, 150.6, 144.7, 138.4, 137.4, 133.5, 128.4, 126.7, 126.0, 123.7, 119.7, 116.8, 97.1, 70.8, 70.4, 69.0, 65.5, 65.3, 61.8 (d, ²J(C-P) = 6.4 Hz), 34.7, 31.5, 27.1 (d, ¹J(C-P) = 139.3 Hz), 16.6 ppm. ³¹P NMR (160 MHz, CDCl₃): δ = 28.5 ppm. UV-Vis (toluene), λ_{\max} (ϵ_{\max} (mol⁻¹Lcm⁻¹): 444 (3.30×10⁴), 327 (2.23×10⁴) nm, λ_{em} (Φ_f): 577 (0.23) nm. HRMS (MALDI-TOF), m/z ([M+Na]⁺, 100%): for C₅₂H₆₁N₂O₇PNa calculated 879.4109, found 879.4138.

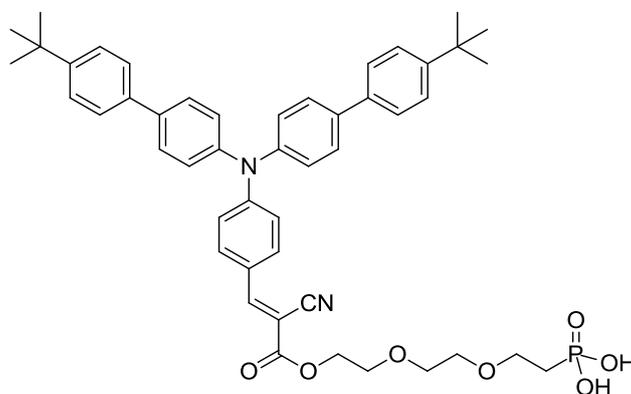


(21)

C₅₄H₆₅N₂O₈P – Mw: 901.08 g/mol

(E)-2-(2-(2-(2-(diethoxyphosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 3-(4-(bis(4'-(tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)-2-cyanoacrylate (21). Adapted procedure from compound (12) using a solution of (2) (100 mg, 0.190 mmol, 1 eq.) and (19) (100 mg, 0.280 mmol, 1.5 eq.) in anhydrous

pyridine (1.9 mL), glacial acetic acid (0.5 mL) and ammonium acetate (cat). The dark red crude mixture was added to a hydrochloric acid solution (10 mL, 1 M) and extracted with dichloromethane. The organic layer was washed with dilute hydrochloric acid solution (1 M) and dried over anhydrous sodium sulfate. After solvent removal under reduced pressure, the crude red solid was purified by silica gel column chromatography (ethylacetate:petroleum ether, 7:3) to afford compound (21) as a red fluorescent solid (144 mg, 84 %). T_g : 16°C. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.12 (s, 1H), 7.89 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 8.6 Hz, 2H), 7.59-7.46 (m, 12H), 7.27 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 8.6 Hz, 4H), 7.11 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 8.8 Hz, 2H), 4.47-4.31 (m, 2H), 4.17-4.02 (m, 4H), 3.87-3.57 (m, 12H), 2.13 (dt, $^3J(\text{H-H})$ = 18.6 Hz, $^2J(\text{H-P})$ = 7.72 Hz, 2H), 1.37 (s, 18H), 1.32 (t, $^3J(\text{H-H})$ = 6.9 Hz, 6H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ = 163.8, 154.4, 152.5, 150.6, 144.7, 138.4, 137.4, 133.4, 128.4, 126.7, 126.0, 123.7, 119.7, 116.8, 97.1, 71.0, 70.8, 70.7, 70.3, 69.0, 65.5, 65.3, 61.8 (d, $^2J(\text{C-P})$ = 6.5 Hz), 34.7, 31.5, 27.1 (d, $^1J(\text{C-P})$ = 139.7 Hz), 16.6 ppm. $^{31}\text{P NMR}$ (121 MHz, CDCl_3): δ = 28.7 ppm. UV-Vis (toluene), λ_{max} (ϵ_{max} ($\text{mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$): 444 (3.43×10^4), 327 (2.25×10^4) nm, λ_{em} (Φ_f): 580 (0.20) nm. HRMS (MALDI-TOF), m/z ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): for $\text{C}_{54}\text{H}_{65}\text{N}_2\text{O}_8\text{P}$ calculated 923.4371, found 923.4370.

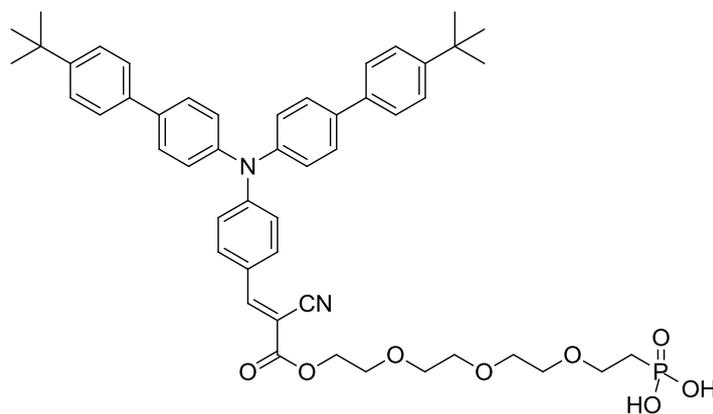


(22)

$\text{C}_{48}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}_7\text{P}$ — Mw: 800.92 g/mol

(E)-(2-(2-(2-((3-(4-(bis(4'-(tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)-2-cyanoacryloyl)oxy)ethoxy)ethyl)phosphonic acid (22). Adapted procedure from compound (13) using a solution of trimethylsilylbromide (560 mg, 3.64 mmol, 60 eq.) and (20) (50 mg, 0.06 mmol, 1 eq.) in anhydrous dichloromethane (3 mL). No precipitation was obtained using a mixture of diethyl ether and methanol or acetone. No further purification was then performed and compound (22) was obtained as an orange solid (47 mg, 98 %). T_g : 67°C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD): δ = 8.21 (s, 1H), 7.95 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 9.0 Hz, 2H), 7.67 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 8.54 Hz, 4H), 7.58 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 8.5 Hz, 2H), 7.49 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 8.5 Hz, 4H), 7.29 (d, $J(\text{H-H})$ = 8.5 Hz, 4H), 7.09 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 8.9 Hz, 2H), 4.47-4.40 (m, 2H), 3.86-3.60 (m, 8H), 2.07 (dt, $^3J(\text{H-P})$ = 18.71 Hz, $^2J(\text{H-H})$ = 7.50 Hz, 2H), 1.37 (s, 18H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO): δ = 162.7, 153.9, 151.8, 149.9, 144.1, 137.3, 136.4, 133.2, 128.0, 126.7, 126.2, 125.7, 123.0, 118.6, 116.4, 96.5, 69.7, 69.2, 68.1, 66.7, 65.1, 34.2, 31.1, 29.0 ppm. $^{31}\text{P NMR}$ (160 MHz, CDCl_3): δ = 25.8 ppm. UV-vis (toluene), λ_{max} (ϵ_{max} ($\text{mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$): 445 (2.90×10^4), 327 (2.11×10^4) nm, λ_{em} (Φ_f): 585 (0.06) nm. HRMS (MALDI-TOF), m/z ($[\text{M}]^+$, 100%): for $\text{C}_{48}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}_7\text{P}$ calculated 800.3585, found 800.3600.

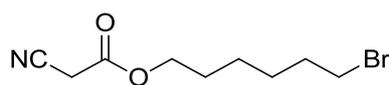
6.3/ Synthèse organique de fluorophores



(23)

$C_{50}H_{57}N_2O_8P$ – Mw: 844,97 g/mol

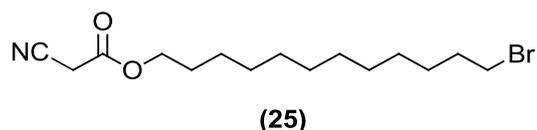
(E)-(15-(4-(bis(4'-(tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)-14-cyano-13-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-en-1-yl)phosphonic acid (23). Adapted procedure from compound (13) using a solution of trimethylsilylbromide (714 mg, 4.70 mmol, 60 eq.) and compound (21) (70 mg, 0.08 mmol, 1 eq.) in anhydrous dichloromethane (3 mL). No precipitation was obtained using a mixture of diethyl ether and methanol or acetone. No further purification was then performed and compound (23) was obtained as an orange solid. (62 mg, 95 %). T_g : 67°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO): δ = 8.20 (s, 1H), 7.98 (d, $^3J(H-H)$ = 9.1 Hz, 2H), 7.70 (d, $^3J(H-H)$ = 8.5 Hz, 4H), 7.60 (d, $^3J(H-H)$ = 8.2 Hz, 4H), 7.47 (d, $^3J(H-H)$ = 8.5 Hz, 4H), 7.29 (d, $^3J(H-H)$ = 8.8 Hz, 4H), 6.99 (d, $^3J(H-H)$ = 8.8 Hz, 2H), 4.36 (t, $^3J(H-H)$ = 4.0 Hz, 2H), 3.71-3.44 (m, 12H), 1.70-1.66 (m, 2H), 1.31 (s, 18H) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO): δ = 162.7, 153.9, 151.8, 149.9, 144.1, 137.3, 136.4, 133.2, 128.0, 126.6, 126.2, 125.7, 123.0, 118.6, 116.5, 96.5, 69.8, 69.7, 69.1, 68.1, 67.1, 65.1, 60.2, 34.2, 31.1, 29.8 ppm. ^{31}P NMR (160 MHz, $CDCl_3$): δ = 32.4 ppm. UV-vis (toluene), λ_{max} (ϵ_{max} (mol $^{-1}Lcm^{-1}$): 444 (2.69 $\times 10^4$), 327 (1.80 $\times 10^4$) nm, λ_{em} (Φ_f): 583 (0.11) nm. HRMS (ESI-), m/z ([M-H] $^-$): for $C_{50}H_{56}N_2O_8P$ calculated 843.3774, found 843.3790.



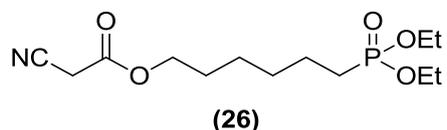
(24)

$C_9H_{14}BrNO_2$ – Mw: 248.12 g/mol

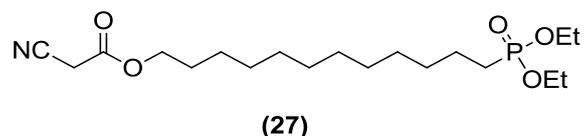
6-bromohexyl 2-cyanoacetate (24). Adapted procedure from compound (10) using a solution of cyanoacetic acid (282 mg, 3.32 mmol, 1.5 eq.), 4-(dimethylamino)pyridinium 4-toluenesulfonate (326 mg, 1.11 mmol, 0.5 eq.), 6-bromo-hexan-1-ol (400 mg, 2.21 mmol, 1 eq.) in dichloromethane (35 mL). Then, a solution of *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (684 μ L, 4.42 mmol, 2 eq.) in dichloromethane (20 mL) was added dropwise. Purification by silica gel column chromatography (dichloromethane:petroleum ether, 3:7) afforded compound (24) as a colorless oil (345 mg, 63 %). 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 4.22 (t, $^3J(H-H)$ = 6.7 Hz, 2H), 3.46 (s, 2H), 3.41 (t, $^3J(H-H)$ = 6.7, 2H), 1.90-1.83 (m, 2H), 1.76-1.66 (m, 2H), 1.52-1.35 (m, 4H) ppm. ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ = 163.0, 113.1, 67.0, 33.7, 32.6, 28.3, 27.8, 25.1, 24.9 ppm. HRMS (ESI+), m/z ([M+Na] $^+$): for $C_9H_{14}O_2NBrNa$ calculated: 270.01001 ; found : 270,01004.



12-bromododecyl 2-cyanoacetate (25). Adapted procedure from compound (10) using a solution of cyanoacetic acid (135 mg, 1.90 mmol, 1eq), 4-(dimethylamino)pyridinium 4-toluenesulfonate (277 mg, 0.900 mmol, 0.5 eq), 12-bromododecan-1-ol (500 mg, 1.90 mmol, 1 eq) in dichloromethane (40 mL). Then, *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (580 μL , 3.80 mmol, 2 eq) was added dropwise over the course of 10 minutes. Purification by silica gel column chromatography (dichloromethane:petroleum ether, 3:7) afforded compound (25) as a yellow oil (482 mg, 76 %). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.20$ (t, $^3J(\text{H-H}) = 6.9$ Hz, 2H), 3.45 (s, 2H), 3.41 (t, $^3J(\text{H-H}) = 6.9$ Hz, 2H), 1.92-1.79 (m, 2H), 1.74-1.62 (m, 2H), 1.32-1.22 (m, 16H) ppm. ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): $\delta = 163.1, 113.2, 67.3, 34.2, 32.9, 29.6, 29.2, 28.9, 28.4, 28.3, 25.8, 24.9$ ppm. HRMS (ESI+), m/z ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): for $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{BrNO}_2\text{NBrNa}$ calculated: 354,1045 ; found : 354,1036



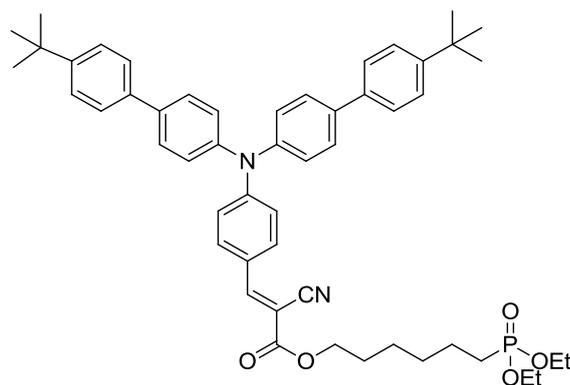
6-(diethoxyphosphoryl)hexyl 2-cyanoacetate (26). Adapted procedure from compound (11) using a solution of triethylphosphite (400 μL , 2.22 mmol, 1.2 eq) and compound (24) (460 mg, 1.85 mmol, 1 eq). Purification by column chromatography (ethyl acetate:petroleum ether, 1/1 to 1/0) afforded compound (26) as a colorless oil (428 mg, 76 %). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): $\delta = 4.18$ (t, $^3J(\text{H-H}) = 6.7$ Hz, 2H), 4.13-4.06 (m, 4H), 3.45 (s, 2H), 1.80-1.39 (m, 10H), 1.32 (t, $^3J(\text{H-H}) = 7.1$ Hz, 6H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.5 MHz): $\delta = 163.1, 113.1, 67.0, 61.6$ (d, $^2J(\text{C-P}) = 6.2$ Hz), 30.2 (d, $^2J(\text{C-P}) = 16.1$ Hz), 28.2, 25.7 (d, $^1J(\text{C-P}) = 140$ Hz), 25.4, 24.8, 22.4 (d, $^3J(\text{C-P}) = 4.3$ Hz), 16.6 (d, $^3J(\text{C-P}) = 5.5$ Hz) ppm. ^{31}P NMR (CDCl_3 , 160 MHz): $\delta = 32.3$ ppm. HRMS (ESI+), m/z ($[\text{M}+\text{H}]^+$): for $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{O}_5\text{NP}$ calculated: 306.14649; found: 306.14655.



12-(diethoxyphosphoryl)dodecyl 2-cyanoacetate (27). Adapted procedure from compound (11) using a solution of triethylphosphite (825 μL , 4.82 mmol, 8 eq) and compound (25) (200 mg, 0.600 mmol, 1 eq). Purification by column chromatography (ethyl acetate:methanol, 98/2) afforded a yellow oil. Additional washing using sodium hydrogenocarbonate and extraction using diethyl ether were necessary to remove phosphorus-based impurities. Organic solvent was removed under reduced pressure to yield the desired compound (27) (193 mg, 83 %). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.20$ (t, $^3J(\text{H-H}) = 6.9$ Hz, 2H), 4.16-4.01 (m, 4H), 3.45 (s, 2H), 1.77-1.57 (m, 4H), 1.32 (t, $^3J(\text{H-H}) = 6.9$ Hz, 6H), 1.39-1.25 (m, 18H) ppm. ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): $\delta = 163.1, 113.2, 67.3, 61.9$ (d, $^2J(\text{C-P}) = 6.8$ Hz), 30.7 (d, $^2J(\text{C-P}) = 17.4$ Hz), 29.6, 29.5, 29.5, 29.2, 29.2, 28.4 (d, $^1J(\text{C-P}) = 143.5$ Hz), 25.8, 24.8,

6.3/ Synthèse organique de fluorophores

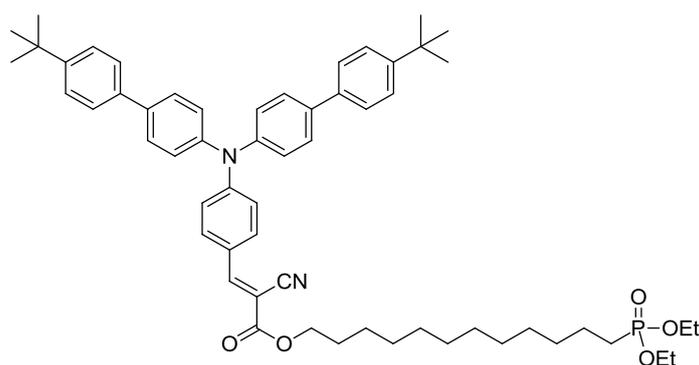
16.5 (d, $^2J(\text{C-P}) = 6.0$ Hz) ppm. ^{31}P NMR (121 MHz, CDCl_3): $\delta = 32.8$ ppm. HRMS (MALDI-TOF), m/z ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%): for $\text{C}_{19}\text{H}_{37}\text{NO}_5\text{P}$ calculated 390.2404, found 390.2403.



(28)

$\text{C}_{52}\text{H}_{61}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$ – Mw : 825.02 g/mol

(E)-6-(diethoxyphosphoryl)hexyl 3-(4-(bis(4'-(tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)-2-cyanoacrylate (28). Adapted procedure from compound (12) using a solution of (2) (200 mg, 0.372 mmol, 1 eq.) and compound (26) (170 mg, 0.558 mmol, 1.5 eq.) in anhydrous pyridine (4 mL), glacial acetic acid (1 mL) and ammonium acetate (cat). Purification by silica gel column chromatography (dichloromethane:ethyl acetate, 8:2) afforded compound (28) as a red fluorescent solid (322 mg, 97 %). Tg: 47°C. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): $\delta = 8.10$ (s, 1H), 7.89 (d, $^3J(\text{H-H}) = 9.1$ Hz, 2H), 7.59-7.46 (m, 12H), 7.28-7.26 (m, 4H), 7.09 (d, $^3J(\text{H-H}) = 9.1$ Hz, 2H), 4.28 (t, $^3J(\text{H-H}) = 6.5$ Hz, 2H), 4.16-4.03 (m, 4H), 1.79-1.62 (m, 10H), 1.37 (s, 18H), 1.32 (t, $^3J(\text{H-H}) = 7.0$ Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta = 164.0$, 154.1, 152.6, 150.6, 144.7, 138.3, 137.4, 133.4, 128.4, 126.7, 126.0, 123.8, 119.7, 116.9, 97.4, 66.2, 61.5 (d, $^2J(\text{C-P}) = 6.6$ Hz), 34.7, 31.5, 31.1, 28.5, 25.8 (d, $^1J(\text{C-P}) = 141$ Hz), 25.6, 22.5 (d, $^2J(\text{C-P}) = 5.1$ Hz), 16.6 (d, $^3J(\text{C-P}) = 6.2$ Hz) ppm. ^{31}P NMR (CDCl_3 , 121 MHz): $\delta = 32.4$ ppm. UV-Vis (toluene), λ_{max} (ϵ_{max} ($\text{mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$): 443 (3.81×10^4), 326 (2.61×10^4) nm, λ_{em} (Φ_f): 565 (0.24) nm. HRMS (MALDI-TOF), m/z ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): for $\text{C}_{52}\text{H}_{61}\text{N}_2\text{O}_5\text{PNa}$ calculated 847.4210, found 847.4236.

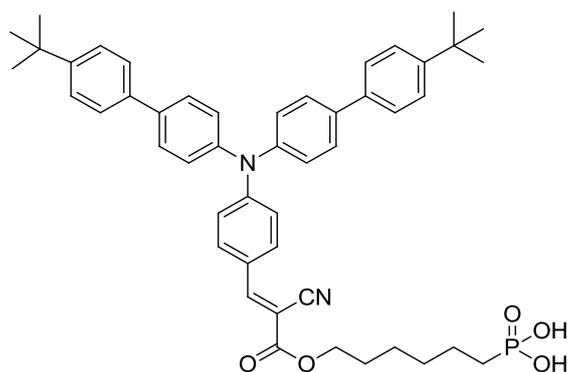


(29)

$\text{C}_{58}\text{H}_{73}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$ – Mw: 909.18 g/mol

(E)-12-(diethoxyphosphoryl)dodecyl 3-(4-(bis(4'-(tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)-2-cyanoacrylate (29). Adapted procedure from compound (12) using a solution of (2) (100 mg, 0.190 mmol, 1 eq.) and (27) (94 mg, 0.28 mmol, 1.5 eq.) in anhydrous pyridine (1.9 mL), glacial acetic acid (0.5 mL) and ammonium acetate (cat). Purification by silica gel column chromatography (ethyl

acetate:petroleum ether, 7:3) afforded compound (29) as a red fluorescent solid (164 mg, 95 %). T_g : 85°C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.10 (s, 1H), 7.89 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 8.9 Hz, 2H), 7.62-7.44 (m, 12H), 7.27 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 8.6 Hz, 4H), 7.10 (d, $^3J(\text{H-H})$ = 8.8 Hz, 2H), 4.28 (t, $^3J(\text{H-H})$ = 6.9 Hz, 2H), 4.18-4.02 (m, 4H), 1.82-1.66 (m, 2H), 1.37 (s, 18H), 1.32 (t, $^3J(\text{H-H})$ = 7.0 Hz, 6H), 1.46-1.22 (m, 20H) ppm. ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ = 164.9, 154.1, 152.5, 150.6, 144.7, 138.3, 137.4, 133.3, 128.4, 126.7, 126.6, 126.0, 124.9, 119.8, 116.9, 97.6, 66.5, 61.5 (d, $^2J(\text{C-P})$ = 6.6 Hz), 34.7, 31.5, 30.9, 30.2 (d, $^2J(\text{C-P})$ = 16.6 Hz), 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 28.7, 26.0, 25.8 (d, $^1J(\text{C-H})$ = 140.0 Hz), 22.6 (d, $^3J(\text{C-P})$ = 5.2 Hz), 16.6 (d, $^3J(\text{C-P})$ = 6.1 Hz) ppm. ^{31}P NMR (121 MHz, CDCl_3): δ = 32.9 ppm. UV-Vis (toluene), λ_{max} (ϵ_{max} ($\text{mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$)): 443 (2.85×10^4), 327 (18.5×10^4) nm, λ_{em} (Φ_f): 570 (0.25) nm. HRMS (MALDI-TOF), m/z ($[\text{M}]^+$): for $\text{C}_{58}\text{H}_{73}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$ calculated 908.5252, found 908.5250.

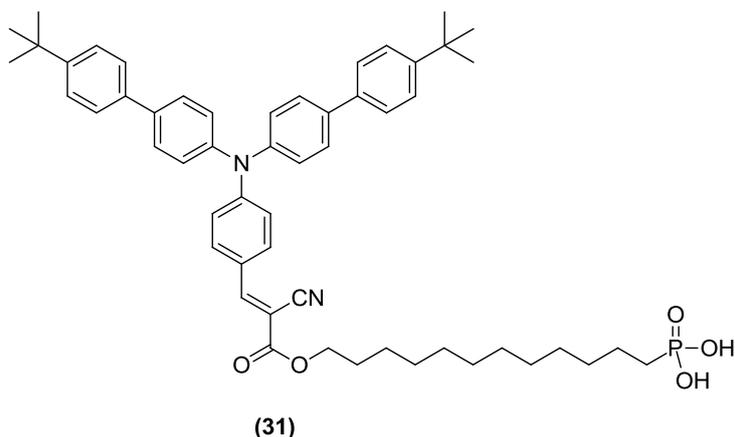


(30)

$\text{C}_{48}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$ – Mw : 768,92 g/mol

(E)-(6-((3-(4-(bis(4'-(tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)-2-cyanoacryloyl)oxy)hexyl)phosphonic acid (30). Adapted procedure from compound (13) using a solution of trimethylsilylbromide (557 mg, 3.64 mmol, 30 eq.) and compound (28) (100 mg, 0.121 mmol, 1 eq.) in anhydrous dichloromethane (3 mL). No precipitation was obtained using a mixture of diethyl ether and methanol or acetone. No further purification was then performed and compound (30) was obtained as a red solid. (90 mg, 97 %). T_g : 126°C. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 8.17 (s, 1H), 7.94 (d, $3J(\text{H-H})$ = 9.0 Hz, 2H), 7.67 (d, $3J(\text{H-H})$ = 8.6 Hz, 4H), 7.58 (d, $3J(\text{H-H})$ = 8.6 Hz, 4H), 7.48 (d, $3J(\text{H-H})$ = 8.6 Hz, 4H), 7.28 (d, $3J(\text{H-H})$ = 8.6 Hz, 4H), 7.08 (d, $3J(\text{H-H})$ = 9.0 Hz, 2H), 4.30 (t, $3J(\text{H-H})$ = 6.4 Hz, 2H), 1.79-1.65 (m, 6H), 1.53-1.44 (m, 4H), 1.36 (s, 18H, t-Bu) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ = 164.8, 155.2, 153.9, 151.6, 146.1, 139.7, 138.5, 134.4, 129.2, 127.8, 127.5, 126.9, 125.0, 120.6, 98.4, 67.2, 35.4, 31.7, 31.2, 29.5, 28.0 (d, $1J$ = 138.9 Hz), 26.6, 23.9 ppm. ^{31}P NMR (CDCl_3 , 160 MHz): δ = 30.3 ppm. UV-vis (toluene), λ_{max} (ϵ_{max} ($\text{mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$)): 441 (3.58×10^4), 328 (2.37×10^4) nm, λ_{em} (Φ_f): 577 (0.08) nm. HRMS (ESI+), m/z ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): for $\text{C}_{48}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}_5\text{NaP}$ calculated 791.35843, found 791,35870.

6.3/ Synthèse organique de fluorophores



C₅₄H₆₅N₂O₅P – Mw: 853.08 g/mol

(E)-12-((3-(4-(bis(4-(tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)-2-cyanoacryloyloxy)dodecyl)phosphonic acid (31). Adapted procedure from compound (13) using a solution of trimethylsilylbromide (830 mg, 5.40 mmol, 60 eq.) and compound (29) (82 mg, 0.09 mmol, 1 eq.) in anhydrous dichloromethane (3 mL). No precipitation was obtained using a mixture of diethyl ether and methanol or acetone. No further purification was then performed and compound (31) was obtained as an orange solid. (71 mg, 93 %). T_g: 82°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.09 (s, 1H), 7.88 (d, ³J(H-H) = 8.6 Hz, 2H), 7.63-7.42 (m, 12H), 7.25 (d, ³J(H-H) = 8.3 Hz, 4H), 7.09 (d, ³J(H-H) = 8.6 Hz, 2H), 4.32-4.21 (m, 2H), 1.80-1.60 (m, 2H), 1.36 (s, 18H), 1.43-1.16 (m, 20H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ = 162.7, 151.8, 149.9, 144.1, 137.3, 136.4, 133.2, 128.0, 126.6, 126.2, 125.7, 123.1, 118.7, 96.7, 66.0, 34.2, 31.1, 29.0, 28.9, 28.8, 28.5, 28.0, 25.2, 23.1 ppm. ³¹P NMR (160 MHz, CDCl₃): δ = 25.3 ppm. UV-vis (toluene), λ_{max} (ε_{max} (mol⁻¹Lcm⁻¹): 443 (3.85×10⁴), 327 (2.50×10⁴) nm, λ_{em} (Φ_i): 558 (0.18) nm. HRMS (MALDI-TOF), m/z ([M+Na]⁺, 100%): for C₅₄H₆₅N₂O₅PNa calculated 875.4523, found 875.4705

6.4 Fonctionnalisation de polymères et biomolécules

Synthesis of PAA@AC. To a solution of polyacrylic acid (120 mg, 550 μmol , 1 eq.) in ethanol (3.8 mL) were added N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (1.6 mg, 10 μmol , 0.18 eq.) and N-hydroxysuccinimide (4.5 mg, 40 μmol , 0.72 eq.). The reaction mixture was then allowed to stir for 30 min before adding 7-amino-4-methylcoumarin (3.5 mg, 20 μmol , 0.18 eq.). After 12 h of stirring at room temperature, the solvent was removed under reduced pressure and dichloromethane was added to precipitate the mixture and obtain the functionalized polymer PAA@AC (1 %, with about 1 functionalized carboxylic acid over the 23 units) after several washing using dichloromethane.

Synthesis of PAA@AC \times 2. Adapted procedure from (PAA@AC) using polyacrylic acid (120 mg, 550 μmol , 1 eq.), N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (3.5 mg, 25 μmol , 0.45 eq.) and N-hydroxysuccinimide (5.5 mg, 50 μmol , 0.91 eq.) in ethanol (3.8 mL). Then 7-amino-4-methylcoumarin (8.8 mg, 50 μmol , 0.91 eq.) was added, yielding PAA@AC \times 2. No accurate identification of the functionalized polymer could be obtained.

Synthesis of PAA@AC \times 4. Adapted procedure of (PAA@AC) using polyacrylic acid (120 mg, 550 μmol , 1 eq.), N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (7 mg, 50 μmol , 0.91 eq.) and N-hydroxysuccinimide (11 mg, 100 μmol , 1.8 eq.) in ethanol (3.8 mL). Then 7-amino-4-methylcoumarin (8.8 mg, 50 μmol , 0.91 eq.) was added, yielding PAA@AC \times 4. No accurate identification of the functionalized polymer could be obtained.

6.5 Synthèse de nanoparticules et stabilisation

Nitrate-stabilized magnetic nanoparticles. Maghemite ($\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_3$) nanoparticles were prepared according to a procedure described by Massart et al.²⁰⁷. Briefly, Fe(II) and Fe(III) salts were mixed in dilute hydrochloric acid. Quick alkalization of the medium by adding concentrated ammonia enabled the coprecipitation of magnetite Fe_3O_4 nanoparticles which were separated. The acidification of $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ with nitric acid, followed by chemical oxidation with ferric nitrate at 80 °C, yielded $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_3$ nanoparticles. After magnetic decantation, the red precipitate was dispersed in nitric acid (pH = 1.2) since nitrate ions act as stabilizing counter-ions of the positively charged surface of the colloidal dispersion ($\zeta = +25$ mV).

PAA-stabilized magnetic nanoparticles (mag@PAA). To a solution of maghemite nanoparticles in nitric acid (2.5 mL, 0.006 wt. %, pH = 1.2) was added polyacrylic acid (2.1 kDa, 5 mg) as a powder. Then, ammonium hydroxide (1 mol.L^{-1}) was added dropwise under stirring until pH = 9 was reached. The resulting solution was allowed to stir for a further 30 min and dialyzed using a Spectra Por membrane (Standard Grade Regenerated Cellulose; cut-off: 8-10 kDa) against Millipore water (600 mL) over 24 h until the final pH solution of the *fluo@mag@PAA* nanoassemblies reaches a value of 7.

Fluorescent organic nanosphere (FON). Stock solutions of fpoh (13), fpoet (12), fcooh (8), or fotbu (7) in spectrophotometric grade THF were prepared at a 0.1 wt. % concentration. 50 μL of the stock solution were added under vigorous stirring into 2.5 mL of ultra-pure deionized water by means of a vortex to avoid collapse of nanoparticles onto a Teflon stirring bar if a magnetic stirrer were used.

Fluo@mag nanoassemblies. A stock solution of fluorophores (0.1 wt%, THF, 50 μL) was injected into a solution of maghemite nanoparticles in nitric acid (2.5 mL, 0.006 wt%, pH = 1.2) stirred by means of a vortex in order to obtain instantaneously the nanoassemblies *fluo@mag*.

Fluorophore stands for compounds fdcooh (8), fpoh (13) or any ester derivative. As for fvin (1), a stock solution in acetone is required to obtain stable nanospheres with a weight concentration of 0.05%.

Synthesis and stabilization of (C)-fluo@mag@citrate nanoassemblies. A solution of fluorescent fdcooh (8) dissolved in THF (50 μL , 0.1 wt. %) was added under vigorous stirring to a solution of maghemite nanoparticles in nitric acid (2.5 mL, 0.006 wt. %, pH = 1.2). After a few seconds, the magnetofluorescent nanoassemblies (C)-fluo@mag were formed. The resulting translucent solution was allowed to dialyze using a Spectra Por membrane (Standard Grade Regenerated Cellulose; cut-off: 8-10 kDa) against sodium citrate (50 mmol.L^{-1} , 600 mL) over 24 h and then against Millipore water (600 mL) over 48 h until the final pH solution of the (C)-fluo@mag@citrate nanoassemblies reaches a value of 7. Nanoassemblies were finally stored at 4°C.

Synthesis of (P)-fluo@mag@FA nanoassemblies. A solution of fpoh (13) dissolved in THF (50 μL , 0.1 wt. %) was added under vigorous stirring to a solution of maghemite nanoparticles in nitric acid (2.5 mL, 0.006 wt. %, pH = 1.2). After a few seconds, the magnetofluorescent (P)-fluo@mag were formed. Folic acid (>5 eq, 1 mg) was added to the mixture, followed by the dropwise addition of ammonium hydroxide (1 mol.L^{-1}) under magnetic stirring until pH = 8 was reached. The resulting translucent solution was allowed to stir for a further 30 min. and dialyzed using a Spectra Por membrane (Standard Grade Regenerated Cellulose; cut-off: 8-10 kDa) against Millipore water (600 mL) over 3-4 h to remove the excess of folic acid. Once the (P)-fluo@mag nanoparticles started agglomerating, the

dialysis was performed in the presence of trisodium citrate salt (50 mmol.L^{-1}) for a few hours. A final dialysis step was performed against Millipore water (600 mL) to remove the excess of citrate ions. The resulting functionalized (P)-fluo@mag@FA nanoassemblies were stored at 4°C to avoid decomplexation of the folic acid units over time.

Synthesis and stabilization of (P)-fluo@mag@PAA nanoassemblies. A solution of fluorescent fph (13) dissolved in THF ($50 \mu\text{L}$, 0.1 wt. %) was added under vigorous stirring to a solution of maghemite nanoparticles in nitric acid (2.5 mL, 0.006 wt. %, $\text{pH} = 1.2$). After a few seconds, the magnetofluorescent nanoassemblies (P)-fluo@mag were formed. Polyacrylic acid (2.1 kDa, 5 mg) was added as a powder and then, ammonium hydroxide (1 mol.L^{-1}) was added dropwise under stirring until $\text{pH} = 9$ was reached. The resulting translucent solution was allowed to stir for a further 30 min and dialyzed using a Spectra Por membrane (Standard Grade Regenerated Cellulose; cut-off: 8-10 kDa) against Millipore water (600 mL) over 24 h until the final pH solution of the (P)-fluo@mag@PAA nanoassemblies reaches a value of 7. Nanoassemblies were finally stored at 4°C

Synthesis and stabilization of (P)-fluo@mag@PAA-AC nanoassemblies. Modified Polyacrylic acid (PAA-AC) (2.1 kDa, 5 mg) was added as a powder to a solution of (P)-fluo@mag previously prepared. Ammonium hydroxide (1 mol.L^{-1}) was added dropwise under stirring until $\text{pH} = 9$ was reached. The resulting translucent solution was allowed to stir for a further 30 min and dialyzed using a Spectra Por membrane (Standard Grade Regenerated Cellulose; cut-off: 8-10 kDa) against Millipore water (600 mL) over 24 h until the final pH solution of the (P)-fluo@mag@PAA-AC nanoassemblies reaches a value of 7 and no blue fluorescence was detected. Nanoassemblies were finally stored at 4°C

Synthesis of fluo@mag@PAA@AC nanoassemblies. Dilute nitric acid ($\text{pH} = 1.2$) was added to a solution of fluo@mag@PAA assemblies, dispersed in Millipore water ($0.7 \mu\text{mole Fe}$, $<1 \mu\text{mole PAA}$, 2.5 mL) until $\text{pH} = 4$ was reached. N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (1.4 mg, $10 \mu\text{mol}$, 10 eq.) and N-hydroxysuccinimide (1.1 mg, $10 \mu\text{mol}$, 10 eq.) were added to the mixture under vigorous stirring using a vortex. The nanoassemblies were stirred for an extra 2 h before adding ammonium hydroxide (1 mol.L^{-1}) until $\text{pH} = 9$ was reached. Then, 7-amino-4-methylcoumarin (7.0 mg, $40 \mu\text{mol}$, 40 eq.) was added to the nanoparticle dispersion and the resulting solution was stirred for a further 16 h. The resulting translucent solution was dialyzed using a Spectra Por membrane (Standard Grade Regenerated Cellulose; cut-off: 8-10 kDa) against Millipore water (600 mL) over 72 h until no more blue fluorescent emission was observed in the dialysis bath. The functionalized (P)-fluo@mag@PAA@AC nanoassemblies were stored at 4°C .

Lyophilization. In order to store the resulting fluo@mag@PAA nanoassemblies over a long period of time in the solid state, volumes (1 mL to 3 mL) of nanoparticle solutions were placed in glass vials such that the height of the liquid was not higher than 1 cm. The solution was allowed to freeze using liquid nitrogen. Lyophilization was performed over 9 h to 12 h to yield a dark red powder that was stored at -18°C under nitrogen.

Re-dispersion procedures. fluo@mag@PAA nanoassembly redispersion was easily performed by adding the adequate solvent (water, physiological media, and alcoholic solvents such as ethanol) to the lyophilized sample. No ultrasound treatment was required since the nanoassemblies undergo no aggregation upon redispersion. Iron concentration in the range of $0.6\text{-}3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ could be obtained depending of the added amount of re-dispersing solvent.

6.6 Etudes biologiques *in vitro*

Cell culture and incubation. The cells were incubated for at least 24 h on an appropriate support, usually Ibidi 8-well plate, at 37.7°C in 5% CO₂ atmosphere before any experiment. 5000 cells were incubated for experiments running over 72 h.

MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™) cells were grown in RPMI media (Gibco, by life technology) containing 10% of fetal bovin serum and 1% of penicillin and streptomycin. 0.6 mL of trypsin (0,25 %, phenol red, Gibco, by life technology) is used to disperse the cells and dilute them with RPMI media.

HEK (Human Embryonic Kidney) 293 were grown in DMEM media (Gibco, by life technology) containing high glucose 4.5 g.L⁻¹, 0.11 g.L⁻¹ de Sodium Pyruvate, with 1% L-glutamine 200 mM 100X. Then, 10% of fetal bovin serum and 1% of penicillin and streptomycin was added. 0.6 mL of trypsin EDTA 1X 0,05% (Gibco, by life technology) is used to disperse the cells and dilute them with DMEM media.

The CD14+ human monocyte/macrophages were purified from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from healthy donors (EFS, Etablissement Français du Sang) by positive selection using the MACS system (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) and then seeded in 6-well plates and cultured for 3 days in 2 mL of minimum essential medium alpha (MEM-α, Lonza, Belgium) supplemented with 10 % Fetal Bovine Serum (FBS, Ozyme, France) and 1 % of antibiotics (conditioned media). Adherent monocytes were differentiated into M0 macrophages by culturing them for 7 days in conditioned media supplemented with 25 ng/mL of human macrophage colony stimulating factor (hM-CSF, R&D systems, Minneapolis, MN, USA).

Nanoassemblies internalization. Internalization was performed by adding to the cell medium (300 μL) a solution of fluo@mag@PAA nanoassemblies dispersed in water (10-20 μL) such that the final concentrations of fluorescent dyes and iron were respectively about 1×10⁻⁶ mol.L⁻¹ and 2×10⁻⁵ mol.L⁻¹. The suspension was incubated for at least 6 h, unless detailed otherwise, to ensure efficient cell uptake of the nanoassemblies.

Viability assays (MTT assay). 5000 cells were grown in the appropriate culture medium (200 μL) for 24 h. They were then incubated for various periods of time with a solution of nanoassemblies dispersed in Millipore water. The cell viability was evaluated by using MTT assays. A solution of MTT (20 μL; 5 mg.mL⁻¹) was added to the cells which were incubated for a further 2 h-2 h 30 at 37°C. The supernatant solution was removed and DMSO (200 μL) was added to dissolve the colored oxidized product. Absorbance read-out at 570 nm provides viability of the incubated cells by comparison with reference cells.

TEM imaging of internalized nanoassemblies in HEK Cells

Summarized procedure:

- Addition of HEK cells in agar solution at 45-50 °C
- Fixation for 2 h at 4°C of small pieces of agar gel using a phosphate 0.1 M solution and 3 % glutaraldehyde
- Washing with phosphate buffer and Millipore water

- Post-staining using osmium tetroxide (1%) in Millipore water for 1 h and repeated washings using Millipore water
- Dehydration using an ethanol bath for 1 h with increasing concentrations in ethanol (30%, 50%, 70%, 85%, 95%, 100%)
- Dehydration using a 100% ethanol bath (2 h and overnight at 4°C)
- Exchange of ethanol with propylene oxide
- Inclusion in EPON resine
- Polymerization for 1 day at 55°C and 60 h at 72°C.
- Staining after slicing for 30 min in uranyl acetate and washing using Millipore water

Fluorescence microscopy of internalized nanoassemblies in living cells. Fluorescence microscopy was performed in the confocal mode by means of a LSM working in the inverted mode (Nikon A1R Si, oil-immersion objective Plan Apo, $\times 60$, 1.4, $\lambda_{exc} = 488$ nm), or in the wide-field mode by means of an inverted microscope (Nikon Eclipse Ti, oil-immersion objective Plan Apo, $\times 60$, 1.4, $\lambda_{exc} = 482$ nm).

Time-lapse video microscopy:

Cells were cultured in 8 well culture plate (u-Slide 8 well, Ibidi, Germany) and then transferred and maintained into the culture chamber of wide-field microscope (Leica DMI 6000B) for 72 hrs. The images were acquired using light background and fluorescence by 40x lens.

Cell fixation procedure.

- After internalization, the supernatant solution was removed and the cells washed twice with PBS;
- 300 μ L of paraformaldehyde were added (3.8 % in PBS) at 37.7°C and the solution stood for 10 min;
- The supernatant was removed again and the cells washed three times with PBS;
- Storage of fixed cells was possible in PBS at 4°C for 1 week maximum;
- Addition of mounting components to preserve fluorescence over a large period of time was eventually performed.

Immunolabelling.

- Elimination of the PBS solution;
- Sample treatment with Triton (0.3 % - PBS) for 10 min;
- Washing three times with PBS added for 10 min ;
- Blocking of non specific sites with goat serum (10 % in 10% triton) for 20 min;
- Negative control exclusion : several cells non treated by the primary antibody were kept aside;
- Primary incubation procedure : the primary antibody mouse H4 B4 to Lamp2, (25631-100, abcam) was diluted 200 times in a incubation buffer composed of 0.1% Triton and 10% goat serum;
- The cells were incubated with the resulting primary antibody solution (200 μ L) for one night at 4°C;
- Washing three times with PBS let in contact for 10 min ;
- Secondary incubation procedure : the secondary antibody anti-mouse IgG (H+L), obtained in goat (BA-9200) and coupled with Alexa 555, was diluted 800 times in a incubation buffer composed of 0.1% Triton and 10% goat serum;

6.6/ Etudes biologiques *in vitro*

- Incubation of 200 μL for 1 h at room temperature
- Washing three times with PBS let in contact for 10 min
- Optionally: nuclei stained using DRAQ5 (1/1000) in PBS for 1 h.
- Washing with PBS let in contact for 10 min
- Addition of antifading mountants and polymerization at 4°C for 48 h.

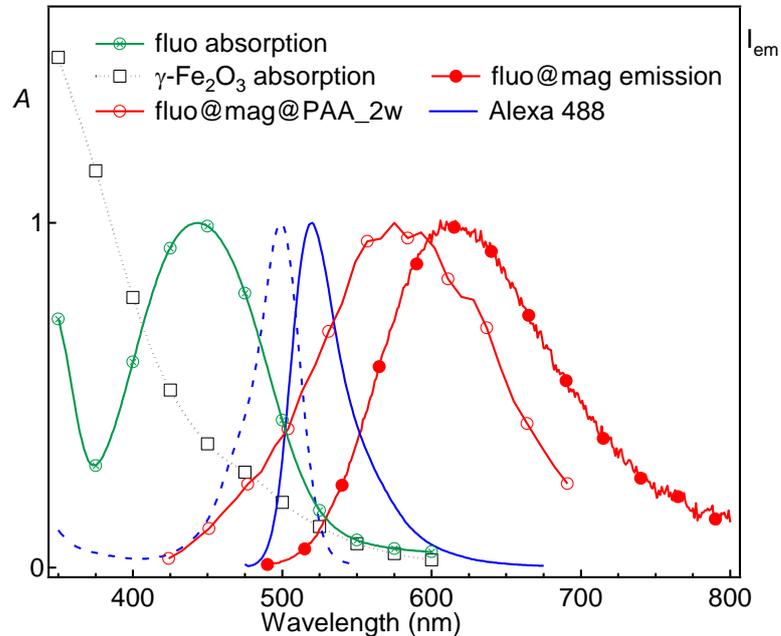


Figure 225 : Spectres d'absorption et d'émission ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$) des différents composants présents lors de l'immunomarquage. 2w correspond au spectre d'émission obtenu suite à une excitation biphotonique intracellulaire à 830 nm.

Labelling of endosomes using LysoTracker® in living cells

- Warm up the solution of LysoTracker® Red DND-99 (1 mM) to room temperature;
- Centrifuge briefly to removed the DMSO layer, collect the superntatant layer and dilute it to 1 μM ;
- Remove the current culture media for a new one in order to avoid any additional acidity;
- Addition of 15 μL of the previous solution into 300 μL of culture media (final concentration of lysoTracker : 50 nM);
- Incubation at 37.7°C for 30 min;
- Optionally: nuclei stained using DRAQ5 by addition of 1 μL (stock solution : 5 μM) per milliliter of culture media, 15 min before the end of the LysoTracker staining procedure;
- Replace the current culture media with a new one in order to avoid any remaining extracellular staining agent.

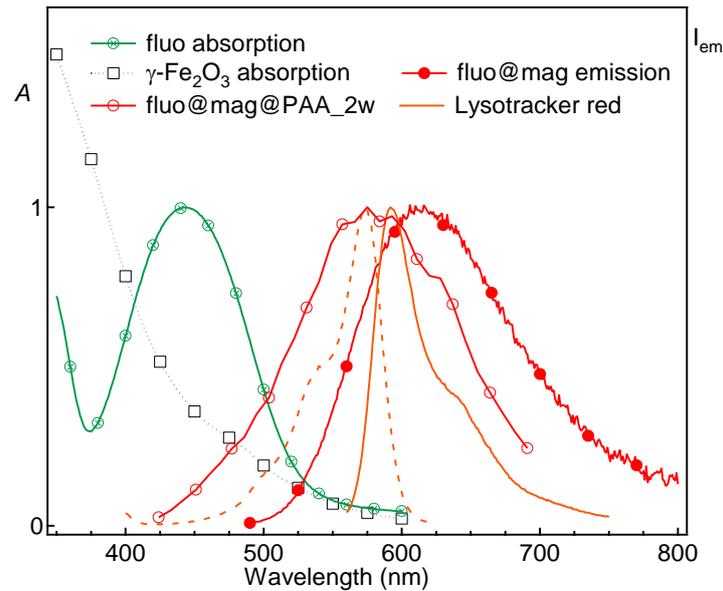


Figure 226 : Spectres d'absorption et d'émission ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$) des différents composants présents lors du marquage des lysosomes sur cellules vivantes. 2w correspond au spectre d'émission obtenu suite à une excitation biphotonique intracellulaire à 830 nm.

Fixed-cell imaging semi-quantification - flow cytometry

The mean fluorescence intensity (MFI) due to the nanoparticles uptaken by CD14+ monocyte/macrophages was detected using flow cytometer (FC500 Beckman Coulter, Inc. Brea, CA, US) after cell fixation (paraformaldehyde 4%). The results were expressed as the relative MFI fold-change, corresponding to the ratio: MFI of the fluorescent nanoparticles uptaken by the macrophages in each condition / MFI of the control isotype.

6.7 Etudes biologiques *in vivo*

Animal experiments were performed in accordance with the INSERM animal protection guidelines and approved by local governmental authorities.

Experiments were carried out on five female BALB/C mice (5-week old) (Iffa Credo, L'Arbresle, France), weighing between 25 and 31 g. Animals were anaesthetized using isoflurane gas at a concentration allowing for 30 heartbeats per minute. A suspension of fluo@mag@PAA nanoassemblies in HBSS buffer (250 μ L, 1.3 μ mol.mL⁻¹ Fe concentration) was injected in the mouse caudal vein.

Magnetic Resonance Imaging. MRI experiments *in vivo* were conducted on a MRI spectrometer BioSpect 4.7 T (Bruker). Two sequences of imaging on each animal were performed before and with a 25-30 min-delay after each injection. Animals were placed into a custom-built 3-cm diameter Helmholtz coil used for emission and reception. The echo time TE and the repetition time TR of the sequence (T₂* mode) were set at 5 ms and 300 ms respectively after sequence optimization. Regions of interest (ROI) were defined by using the freeware image processing tool ImageJ. The signal intensity of the ROI was normalized by the signal from a water phantom in a tube placed next to the mouse into the coil. Enhancement (ENH) between normalized signals of imaged animals before (SI_{ref}) and after injection (SI) was calculated in each ROI as: $ENH (\%) = (SI - SI_{ref}) - 100/SI_{ref}$.

Organ extraction procedure. The mice were sacrificed 24 h after the injection. Five organs (liver, spleen, kidney, lung and heart) were removed for *ex vivo* analyses in order to assess the biodistribution of the fluo@mag@PAA nanoassemblies. They were successively immersed in a bath of zinc-containing fixatives (Pharmingén, France) at 4°C for 48 h, and 4 wt. % paraformaldehyde - 20 wt. % sucrose solution at 4°C for 24 h. They were frozen in OCT (Tissue-Tek) by using vapors of liquid nitrogen. Zinc-containing fixatives avoid fluorophore destruction during the fixing process. The frozen organs were stored at -78°C for 30 days before use.

Tissue sectioning procedure for optical imaging. They were cut in 10 μ m-thick sections at -20 °C using a cryotome cryostat (Leica Biocut 2030). The sections were immediately deposited on superfrost glass slides, let dry for 2 h before being treated with Prolong (containing or not DAPI as a cell nucleus staining agent) and protected with an upper coverslit to allow for microscopy imaging. The sections were left at 4 °C for at least 72 h before observation.

Tissue sectioning procedure for transmission electronic microscopy.

Sodium cacodylate buffer 0.2 mol.L⁻¹, pH = 7.4 (storage over 1 year – 500 mL). Trihydrate sodium cacodylate (21.4 g), dihydrate calcium chloride (25 mg), and hexahydrate magnesium chloride (50 mg) were dissolved in distilled water (450 mL). The pH mixture was adjusted upon adding a 0.5 mol.L⁻¹ HCl solution under magnetic stirring. Distilled water was eventually added to adjust the total volume to 500 mL.

Tissue fixation. The tissues were primarily fixed with glutaraldehyde (2.5 wt. % / vol) for 2 h to preserve their structure. The tissues were subsequently washed with cacodylate buffer for 10 min and postfixed with 2 % tetroxide osmium for 1 h. They were washed twice in two baths of cacodylate buffer for 5 min each.

Dehydration. Tissue dehydration was performed as follows: 50 % ethanol for 10 min, 70 % ethanol for 10 min, 90 % ethanol for 15 min, 100 % ethanol – 2 changes for 15 min each, propylene oxide – 3 changes for 15 min each.

Resin embedding. Resin infiltration was performed using a succession of a 1:2 mix of resin:propylene oxide for 30 min, a 1:1 mix of resin:propylene oxide for 30 min, and a 2:1 mix of resin:propylene oxide for 30 min. All samples were placed in fresh resin at ambient temperature overnight or at 4°C for 1-2 days. Polymerization was performed in an oven at 60°C for 48 h.

Sample (block) cutting. All blocks were cut as 70 nm-thin sections using a cryo-ultramicrotome (model Reichert Ultracut S) mounted with a diamond knife (Diatome). The sections were placed on the dark side of a holey carbon-coated copper grid (Delta Microscopies).

Post-staining. The grids were floated in a saturated solution of uranyl acetate in 50 % ethanol for 25 min at room temperature and rinsed briefly twice over distilled water. They were left on a drop of lead citrate for 10 min, washed twice with 0.1 mol.L⁻¹ sodium hydroxyde and finally twice with distilled water.

6.8 Références bibliographiques

- (203) Reynolds, G. A.; Drexhage, K. H. *Opt. Commun.* **1975**, *13*, 222–225.
- (204) Frisch, M. J. Gaussian 09 Revision A.0, 2009.
- (205) Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6378–6396.
- (206) Jacquemin, D.; Bahers, T. L.; Adamo, C.; Ciofini, I. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 5383–5388.
- (207) Ménager, C.; Sandre, O.; Mangili, J.; Cabuil, V. *Polymer* **2004**, *45*, 2475–2481.

Résumé :

L'objectif de ces travaux de thèse repose sur l'élaboration, les études structurales et physico-chimiques de nanomatériaux combinant propriétés d'émission sous excitation à un ou deux photons, et magnétisme. L'association de ces deux propriétés distinctes, fluorescence et magnétisme, permettent d'aboutir à des objets bimodaux, très sollicités pour des applications autant en bio-imagerie, dans le traitement par hyperthermie de cellules cancéreuses que dans celui du stockage optique. Ces objets bimodaux sont réalisés par auto-assemblage de nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer avec des composés organiques fluorescents aptes à former des nanosphères par nano-précipitation, conduisant à des nano-assemblages de type cœur-coquille. Le développement et les études de nano-objets organiques, composés de petites molécules, est en pleine expansion grâce à leur forte densité en unités actives. Toutefois, à notre connaissance, ce type d'association non covalente entre un cœur organique fluorescent non dopé et une coquille de nanoparticules d'oxyde de fer n'a été que rarement étudié.

Avant d'utiliser ces nano-objets magnéto-fluorescents, il est nécessaire de mener au préalable une analyse complète des propriétés photophysiques des composés émissifs en solution comme à l'état solide. Une fois obtenus et stabilisés en milieu physiologique, ces nano-assemblages seront utilisés pour des études en imagerie biologique, tant *in vitro* qu'*in vivo*, en portant une attention toute particulière au devenir des objets ainsi qu'à leur bio-distribution.

Mots clés : nanoparticules, fluorescence, magnétisme, photophysique, bio-imagerie

The aim of this PhD work deals with the development, the structural and physico-chemical characterizations of nanomaterials which can combine emission properties after excitation using one or two photons, and magnetism. The association of these two distinct properties, fluorescence and magnetism, allowed us to obtain bimodal functional materials. Over the past years, this kind of nano-objet has raised a large interest in bio-imaging, cancer treatment using hyperthermia, as well as in optical data storage. The bimodal nanomaterials are elaborated by self-assembling iron oxide nanoparticles with small organic fluorophores able to form nanospheres upon nano-precipitation, yielding core-shell nanoassemblies. The development and studies of organic nano-objects, based on small molecules, represent an expanding field, mainly due to the high density of active units. To the best of our knowledge, this tight non-covalent association between a non-doped fluorescent core and a shell composed of iron oxide nanoparticles has never been studied.

Before using such magneto-fluorescent nanoassemblies, several studies have to be performed in order to fully understand and characterize the photophysical properties of the fluorophores in solution as well as in the solid state. After a stabilization process compatible with physiological conditions, the resulting nanoassemblies will be used for *in vitro* and *in vivo* bioimaging studies. The studies of the biodistribution and the possible degradation of the assemblies will also be performed.

Keywords: nanoparticles, fluorescence, magnetism, photophysics, bioimaging
