N° d'ordre : 2016LYSEC29

Thèse de l'Université de Lyon

Délivrée par l'Ecole Centrale de Lyon

Thèse soutenue le 13/10/2016, par

M. Maxime Boksebeld

Ecole Doctorale : Electronique, Electrotechnique et Automatique – ED 160

Spécialité : Ingénierie pour le vivant

Elaboration et caractérisation de nanoparticules hybrides pour la microscopie multiphotonique et la thérapie ciblée du cancer

---

Thèse préparée à l'Institut des Nanotechnologies de Lyon

Sous la direction de Yann Chevolot et Virginie Monnier

Composition du jury

Dr. Jean-Olivier Durand, Institut Charles Gerhardt, Montpellier	**Rapporteur**
Dr. Alain Ibanez, Institut Néel, Grenoble	**Rapporteur**
Dr. Luigi Bonacina, Group of Applied Physics Biophotonics, Genève	**Examinateur**
Dr. Giacomo Ceccone, Institut for Health and Consumer Protection, Ispra	**Examinateur**
Dr. Alain Geloën, Laboratoire CarMeN, Villeurbanne	**Examinateur**
Dr. Vladimir Lysenko, Institut des Nanotechnologies de Lyon, Villeurbanne	**Invité**
Dr. Yann Chevolot, Institut des Nanotechnologies de Lyon, Ecully	**Directeur de Thèse (Invité)**
Dr. Virginie Monnier, Institut des Nanotechnologies de Lyon, Ecully	**Co-Directeur de Thèse**

N° d'ordre : 2016LYSEC29

Thèse de l'Université de Lyon

Délivrée par l'Ecole Centrale de Lyon

Thèse soutenue le 13/10/2016, par

M. Maxime Boksebeld

Ecole Doctorale : Electronique, Electrotechnique et Automatique – ED 160

Spécialité : Ingénierie pour le vivant

Elaboration et caractérisation de nanoparticules hybrides pour la microscopie multiphotonique et la thérapie ciblée du cancer

---

Thèse préparée à l'Institut des Nanotechnologies de Lyon

Sous la direction de Yann Chevolot et Virginie Monnier

Composition du jury

Dr. Jean-Olivier Durand, Institut Charles Gerhardt, Montpellier	**Rapporteur**
Dr. Alain Ibanez, Institut Néel, Grenoble	**Rapporteur**
Dr. Luigi Bonacina, Group of Applied Physics Biophotonics, Genève	**Examinateur**
Dr. Giacomo Ceccone, Institut for Health and Consumer Protection, Ispra	**Examinateur**
Dr. Alain Geloën, Laboratoire CarMeN, Villeurbanne	**Examinateur**
Dr. Vladimir Lysenko, Institut des Nanotechnologies de Lyon, Villeurbanne	**Invité**
Dr. Yann Chevolot, Institut des Nanotechnologies de Lyon, Ecully	**Directeur de Thèse (Invité)**
Dr. Virginie Monnier, Institut des Nanotechnologies de Lyon, Ecully	**Co-Directeur de Thèse**

Remerciements

Pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse, je souhaite remercier M. Franck DEBOUCK, directeur de l'Ecole Centrale de Lyon, les Dr Catherine BRU-CHEVALIER et Christian SEASSAL, directrice et directeur adjoint de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon ainsi que le Dr Gérard SCORLETTI, directeur de l'école doctorale EEA.

Je tiens à remercier tous les membres de mon jury de thèse, qui ont accepté d'évaluer ce travail. En premier lieu, les Dr Jean-Olivier DURAND et Alain IBANEZ qui, en leur qualité de rapporteurs, ont eu la lourde tâche d'évaluer ce travail ; le Dr Alain GELOEN, pour m'avoir fait l'insigne honneur de présider ce jury et pour son aide inestimable pour toutes les cultures cellulaires ; le Dr Luigi BONACINA, qui a toujours su être disponible, tant pour m'aider à comprendre les subtilités de l'optique non linéaire que pour m'avoir acceuilli au GAP, pour nos multiples sessions de microscopie ; le Dr Giacomo CECCONE, pour son expertise dans le domaine de la caractérisation de surface et enfin, le Dr Vladimir LYSENKO, pour toutes ses idées, pour son SiC, sa bonne humeur et son optimisme constant.

Je veux également adresser des remerciements tout particuliers à mes directeurs de thèse, les Dr Eliane SOUTEYRAND, Yann CHEVOLOT et Virginie MONNIER. Je ne saurai trop vous remercier d'avoir cru en moi et de m'avoir fait confiance au point de faire radicalement diverger l'objectif de cette thèse de son objectif initial. Un grand merci à Eliane, qui, comme son prénom l'indique, a su éclairer nos jours parfois gris de sa bonne humeur permanente et contagieuse. Un grand merci à Yann, qui a accepté de prendre la relève après le départ à la retraite d'Eliane, qui a également accepté de prendre la relève après le départ en « congés Martin » de Virginie. Tu as toujours été disponible, et il t'en a fallu de la disponibilité (probablement, même de la patience) lorsqu'il s'est agi de me conseiller, de parler d'XPS, de ToF-SIMS et de bien d'autres choses encore dont j'ignorais tout en commençant cette thèse. Enfin, Virginie, pour qui je n'aurai sans doute pas assez de mot pour décrire ma gratitude envers ta disponibilité et ta patience infinie : Toujours là pour écouter, échanger et conseiller. Un immense merci également pour toute la confiance que tu as accepté de placer en moi et pour m'avoir permis d'arpenter tous les chemins que ma curiosité a pu vouloir me faire emprunter.

Je souhaite également remercier toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de travailler durant ces 3 ans. Tout d'abord, toute l'équipe du GAP-Biophotonic qui m'a permis de faire, en pratique et dans la bonne humeur, toutes ces sessions de microscopie dans la pénombre souterraine du GAP : Aline ULDRY, Cedric SCHMIDT et les Dr Vasyl KILIN et Andrii ROGOV. Ensuite, le Dr Sergei ALEKSEEV, pour ces conseils nombreux sur la chimie du SiC et son analyse toujours pointue dans ce domaine. Enfin, l'équipe du SYMME, à savoir Jérémie RIPORTO, Mathias URBAIN, et les Dr Yannick MUGNIER et Ronan le DANTEC pour leur accueil et leur disponibilité.

Pendant ces 3 années, j'ai également eu la chance d'intégrer l'équipe Chimie et Nanobiotechnologies de l'Institut de Nanotechnologies de Lyon. J'ai ainsi pu cotoyer des gens très sympathiques, avec qui il fut toujours très agréable d'échanger et de travailler. J'ai également pu apprécier tous les moments de convivialité qui se sont déroulés au cours de ces 3 ans, entre les pauses café, les repas d'équipe… J'espère ne pas vous avoir trop exaspéré avec mes anecdotes aussi nombreuses que douteuses… Je souhaite également remercier nommément les membres de l'équipe que je n'ai pas encore

remerciés dans ces lignes. Tout d'abord, le Dr Thomas GEHIN, pour tous ses conseils techniques précieux, sa bonne humeur aléatoire et pour sa vosgitude si salvatrice dans cette équipe bien trop bretonnante ! Les Dr Magali PHANER-GOUTORBE, pour toutes ses anecdotes des RI et son alcool de Pêche, Emmanuelle LAURENCEAU pour toutes les odeurs douteuses qu'elle m'a permis de découvrir, entre l'herbe en décomposition, les tubes de levures, les oignons en salle de TP, et les plats trop riche en thiols et en amines… Merci pour cet enrichissement olfactif ainsi que pour les fous rires notoirement audibles ! Le Dr Jean-Pierre CLOAREC qui, malgré sa bretonnitude et ses blagues de qualité variable, a su distiller sa bonne humeur et ses multiples conseils pédagogiques, Maryline DI SERIO, pour tous les fous rires et son aide inestimable pour toutes les commandes et Isabel NABETH pour les rescousses salvatrices en TP et pour les commandes !

Je tiens également à remercier très chaleureseument tous les doctorants et ATER de l'équipe, pour la somme non mesurable de galères et de bon moments traversés ensembles, toujours dans la bonne humeur : Salomé ANSANAY-ALEX, Mathieu CAILLAU, Feixiong CHEN, Amandine CORNILLON, Lucie DUPIN, Marie GALVIN, Muchen LI, Francisco PALAZON, Liu SHI, Jian ZHANG, Francesca ZUTTION. Il ne m'a pas paru utile de signaler lesquels sont docteurs. A mes yeux, il mérite que je leur donne le meilleur des titres, celui d'amis. Salomé, que je pourrai qualifier de collègue de bureau, tant nous avons passé de temps dans le même bureau, alors que nous n'avions pourtant pas le même…. Merci pour ta bonne humeur, ta patience avec moi et pour tous ces bons moments passés ensembles. Les deux inséparables, Lucie et Francesca avec qui j'ai traversé à peu près simultanément les mêmes galères, que ce soit pour la thèse ou pour ECLAT. Merci à vous deux, pour votre bonne humeur, pour tous les échanges et les conseils. Un merci particulier à Lucie pour nous avoir noyé sous les cerises et les abricots et un autre merci particulier à Francesca, la plus compétente et la plus souriante des chimistes italiennes que je connaisse et pour ton soutien permanent dans les galères. Francisco et Amandine, pour l'avant-goût sur les galères de la thèse, pour votre gentillesse et pour tous vos conseils. Mathieu, l'homme qui lithographie des crevettes et qui a toléré que j'utilise de manière systématique son tableau pour mes reflexions picturales ! Merci pour ta patience, notamment pour mes blagues totalement dépourvues de tout potentiel comique. A Marie, qui a eu à ma supporter quotidiennement dans notre bureau, notamment pendant toute la rédaction de cette thèse, merci pour tous nos échanges, qu'il s'agisse de science, de tes histoires, disons étonnantes, et de ce babillage qui nous fut si caractéristique. A Liu, mon autre collègue de bureau, pour sa gentillesse, sa patience, et pour toutes tes recettes chinoises, que je suis malheureusement si peu capable de reproduire.

Je tiens également à remercier toutes les autres personnes que j'ai pu cotoyer durant cette thèse. Le Dr Guy STREMSDORFER, pour toutes ces histoires et tous les échanges que nous avons pu avoir ; le Dr Naoufel HADDOUR, pour sa bonne humeur et tous ses conseils ; le Dr Yves ROBACH, pour m'avoir offert l'opportunité d'enseigner à l'Ecole Centrale de Lyon, Sebastien CECILLON, pour ses conseils et son aide pratique et Ali JAFFAL, pour toutes les expériences réalisées, dans la bonne humeur. Il me semble important également de remercier tous les personnels de la Plateforme Nanolyon et administratifs pour leur aide précieuse : Emmanuelle, Jean-Louis, Laurent, Martine, Patricia, Radek, Raphaël, Sylvie et Thérèse. Enfin, un grand merci à tous les autres doctorants que j'ai cotoyé au sein d'ECLAT ou des enseignements, pour leur bonne humeur, Matthieu BABAZ, Corina BARBOS, Nasser BENALI, Robert CHAHINE, Marie MINVIELLE, Alberto PIACENTINI, Julie VERA, Marco VETTORE et bien d'autres…

Un immense merci à tous mes autres amis, pour leur présence durant toutes ces années, Elsa, Florian, Grégoire, Jean-Philippe, Julien, Laura, Laure, Lucie, Nicolas, Stéphane, Valentin, et tous les autres. Vous avez toujours été parfaits, ne changez surtout pas !

Enfin, je souhaite remercier tout particulièrement ma famille, auquel je joindrais Christiane et Jean-Claude. Ils sont tellement nombreux que, malgré leur importance, je ne pourrai pas tous les citer entre les Boks, les Laurent, les Marchall ni les remercier spécifiquement. Ce sont pourtant eux qui méritent le plus d'être remerciés, pour avoir toujours été là pour moi, sans jamais faillir, et ce depuis 25 ans déjà. Ils me disent tous qu'ils sont fiers de moi, d'avoir un savant (ce à quoi je répondrai que savant, nous le sommes tous, dans notre domaine) dans la famille, mais c'est surtout moi qui suis fier d'eux, fier d'être des leurs, et je ne pourrais jamais témoigner de la gratitude infinie que j'ai à leur égard. Je tiens tout de même à remercier tout particulièrement mes parents, pour m'avoir toujours soutenu, pour m'avoir transmis leurs valeurs, cette curiosité presque infinie, ce goût immodéré pour les sciences et toute forme de reflexion en général.

Le meilleur venant toujours pour la fin, je termine ces remerciements en remerciant tout particulièrement Céline. Tu as eu la lourde charge de me supporter au quotidien ; tu as toujours été là pour moi, dans les bons moments comme dans les galères, et ce durant la rédaction de mes 2 thèses ; tu as bien voulu relire mes thèses, écouter toute cette science, toi qui pourtant l'abhorre par essence. Je ne saurai pas être suffisamment reconnaissant pour tout ceci, mais du plus profond de mon cœur, merci à toi.

Merci à tous

Table des matières

Introduction générale 1

I. ETAT DE L'ART 5

I.1. Optique non linéaire : Théorie et application à la microscopie 8

I.1.1. Aspects théoriques de l'optique non linéaire 8

I.1.2. Application à l'imagerie cellulaire 11

I.1.3. Développement de nouveaux marqueurs SHG 12

I.1.4. Conclusions 14

I.2. Synthèse et propriétés des nanoparticules d'or 15

I.2.1. Propriétés plasmoniques 15

I.2.2. Propriétés thérapeutiques 18

I.2.3. Propriétés de luminescence 19

I.2.4. Synthèse des nanoparticules d'or 20

I.2.4.1. Synthèse de nanosphères d'or 20

I.2.4.2. Synthèse de nanorods d'or 24

I.2.5. Conclusions 28

I.3. Propriétés des suspensions colloïdales de nanoparticules 29

I.3.1. Définition de l'état colloïdal 29

I.3.2. Forces coulombiennes 30

I.3.2.1. Modèles de distribution du potentiel électrostatique dans l'environnement d'une particule chargée 30

I.3.2.2. Aspect pratique du modèle de la double couche : la mesure du potentiel zêta . 33

I.3.2.3. Forces de Van der Waals 34

I.3.2.4. La théorie DLVO 36

I.3.2.5. La théorie DLVO étendue 38

I.3.2.5.1. Les forces de Born 38

I.3.2.5.2. Les forces de solvatation 38

I.3.2.5.3. Conséquences des forces non DLVO 39
I.3.3. Conclusions 39
I.4. Fonctionnalisation des nanoparticules inorganiques 39
I.4.1. Fonctionnalisation de surface des nanoparticules inorganiques 40
I.4.1.1. Fonctionnalisation de surface des nanoparticules métalliques 41
I.4.1.2. Fonctionnalisation de surface des nanoparticules d'oxydes 42
I.4.1.3. Fonctionnalisation de surface des autres nanoparticules inorganiques 44
I.4.2. Réactions de greffage sur une surface fonctionnalisée 45
I.4.2.1. Greffage de molécules par physisorption 46
I.4.2.2. Greffage de molécules basé sur des systèmes biochimiques 46
I.4.2.2.1. Complexes biotine-streptavidine 47
I.4.2.2.2. Complexes basés sur l'hybridation de brins d'ADN 47
I.4.3. Réactions de greffage covalent 47
I.4.3.1. Greffage sur une amine 48
I.4.3.2. Réactions de greffage covalent sur un thiol 51
I.4.3.3. Autres réactions de greffage 53
I.4.3.3.1. Couplage par cycloaddition de Huisgen 53
I.4.3.3.2. Couplage par cycloaddition de Diels-Alder 54
I.4.4. Application à la synthèse de nanohybrides par couplage de nanoparticules 55
I.4.5. Conclusions 57
I.5. Objectifs de la thèse 57
II. SYNTHESE ET CARACTERISATION DES NANOPARTICULES DE SiC, $KNbO_3$ ET D'OR 61
II.1. Synthèse de nanoparticules d'or 63
II.1.1. Synthèse de nanosphères d'or 63
II.1.1.1. Méthode de Frens 63
II.1.1.2. Méthode par croissance de germes 65
II.1.2. Nanorods d'or 66
II.2. Résultats de caractérisation des nanoparticules d'or synthétisées 67

II.2.1. Nanoparticules obtenues par la méthode de Frens 67
II.2.2. Nanoparticules obtenues par croissance de germes 69
II.2.3. Nanorods d'or 73
II.2.3.1. Influence du lot de CTAB sur la synthèse de nanorods 73
II.2.3.2. Influence de la concentration en argent 74
II.3. Elimination sélective des nanosphères résiduelles issues des synthèses de nanorods 76
II.3.1. Procédure de purification 76
II.3.2. Résultats 78
II.4. Nanoparticules de SiC 82
II.4.1. Synthèse des nanoparticules de SiC 82
II.4.2. Résultats 83
II.4.2.1. Propriétés structurales des nanoparticules de SiC 83
II.4.2.2. Propriétés chimiques de surface des nanoparticules de SiC 86
II.4.2.2.1. Mesures de potentiel zêta 86
II.4.2.2.2. Spectroscopie Infrarouge 87
II.4.2.2.3. Analyses XPS 88
II.4.2.3. Conclusions sur la chimie de surface des nanoparticules de SiC 90
II.5. Nanoparticules de $KNbO_3$ 90
II.5.1. Synthèse des nanoparticules de $KNbO_3$ 90
II.5.2. Résultats 91
II.5.2.1. Propriétés structurales des nanoparticules de $KNbO_3$ 91
II.5.2.2. Propriétés chimiques de surface des nanoparticules de $KNbO_3$ 92
II.6. Conclusions 93
III. FONCTIONNALISATION ET COUPLAGE ENTRE NANOPARTICULES D'OR ET EMETTEURS SHG 95
III.1. Fonctionnalisation des nanorods d'or 97
III.1.1. Procédures de fonctionnalisation 97
III.1.2. Résultats 98
III.2. Fonctionnalisation des nanoparticules de SiC 98

III.2.1. Procédures de fonctionnalisation 98

III.2.1.1. Procédure de traitement de la verrerie utilisée pour la fonctionnalisation des nanoparticules de SiC par des silanes..... 99

III.2.1.2. Procédure de silanisation des nanoparticules de SiC..... 99

III.2.2. Résultats de caractérisation 100

III.2.2.1. Mesures de potentiel zêta..... 101

III.2.2.2. Spectroscopie infrarouge 101

III.2.2.3. Mesures par XPS..... 105

III.2.2.4. Dosage des fonctions de surface..... 110

III.2.2.5. Mesures en ToF-SIMS..... 112

III.2.3. Conclusions sur la fonctionnalisation des nanoparticules de SiC..... 113

III.3. Synthèse de nanoparticules hybrides par couplage de nanorods d'or aux nanoparticules de SiC ou de $KNbO_3$ 113

III.3.1. Synthèse de nanohybrides SiC@Au par couplage entre des nanoparticules de SiC et des nanorods d'or..... 113

III.3.1.1. Procédures de couplage..... 113

III.3.1.1.1. Couplage électrostatique 113

III.3.1.1.2. Couplage thiol-or..... 114

III.3.1.2. Résultats de caractérisation 114

III.3.2. Synthèse de nanohybrides $KNbO_3$@Au par Couplage entre des nanoparticules de $KNbO_3$ et des nanorods d'or..... 116

III.3.2.1. Procédure de couplage..... 116

III.3.2.2. Résultats de caractérisation 116

III.3.2.3. Conclusions..... 117

III.4. Développement d'une chimie pour le ciblage des cellules cancéreuses par les nanoparticules de SiC..... 118

III.4.1. Procédures de synthèse 118

III.4.1.1. Synthèse du ligand PEG-folate 118

III.4.1.2. Couplage du PEG-folate aux nanoparticules de SiC 120

III.4.2. Résultats de caractérisation 122
III.4.2.1. Synthèse du ligand PEG-folate 122
III.4.2.1.1. Spectroscopie infrarouge 122
III.4.2.1.2. RMN du proton 124
III.4.2.2. Couplage du PEG-folate aux nanoparticules de SiC 126
III.4.2.2.1. Spectroscopie d'absorption UV-Visible 126
III.4.2.2.2. Analyses XPS 127
III.4.2.2.3. Spectroscopie infrarouge 133
III.4.2.2.4. Analyses ToF-SIMS 135
III.4.3. Conclusions sur le greffage du PEG-folate 137
III.5. Conclusions 137
IV. UTILISATION DES NANOPARTICULES ET DES NANO-HYBRIDES POUR LE MARQUAGE CELLULAIRE 139
IV.1. Description des techniques de caractérisations ONL 141
IV.1.1. Description du microscope multiphotonique 141
IV.1.2. Description du montage HRS 143
IV.2. Imagerie par microscopie multiphotonique des cellules saines marquées par les nanoparticules et les nanohybrides 144
IV.2.1. Incubation des nanoparticules et des nanohybrides sur cellules saines 145
IV.2.2. Conditions expérimentales pour l'observation des cellules marquées et la réalisation des mesures spectrales 146
IV.2.3. Résultats en imagerie cellulaire 146
IV.2.3.1. Marquage de cellules saines par les nanoparticules de SiC et de $KNbO_3$ 146
IV.2.3.2. Détermination des propriétés de luminescence à deux photons et marquage de cellules saines par les nanorods d'or 148
IV.2.3.3. Marquage de cellules saines par les nanohybrides SiC@Au et $KNbO_3$@Au 150
IV.2.3.4. Conclusions sur le marquage des cellules par les nanoparticules et les nanohybrides 153

IV.3. Influence du couplage plasmonique sur les propriétés optiques non linéaires des nanohybrides 153
IV.3.1. Méthode utilisée pour évaluer l'influence du couplage plasmonique 153
IV.3.2. Résultats sur l'influence du couplage plasmonique SiC@Au 158
IV.3.3. Bilan sur les propriétés ONL des nanoparticules et des nanohybrides 160
IV.4. Ciblage de cellules cancéreuses par les nanoparticules SiC@PEG-Folate 160
IV.4.1. Procédures d'incubation des nanoparticules sur cellules 161
IV.4.2. Résultats de ciblage des cellules cancéreuses par l'acide folique 162
IV.5. Conclusions 166
V. TOXICITE ET PROPRIETES PHOTOTHERAPEUTIQUES DES NANO-PARTICULES ET DES NANOHYBRIDES 169
V.1. Description du système de mesure de toxicité en temps réel 171
V.2. Mesures de toxicité 172
V.2.1. Procédures d'incubation des nanoparticules 172
V.2.2. Résultats de toxicité pour les nanoparticules 173
V.2.3. Conclusions 176
V.3. Essais de photothérapie 176
V.3.1. Procédures d'incubation des nanoparticules et d'irradiation 176
V.3.2. Résultats de photothérapie 177
V.3.2.1. Phototoxicité des nanoparticules seules 177
V.3.2.2. Phototoxicité des nanohybrides 178
V.4. Conclusions 180
Conclusions Générales et Perspectives 183
ANNEXES 187
Annexe 1. Description des appareils et techniques de caractérisation 189
Annexe 1.1. Spectroscopie d'absorption UV-Visible 189
Annexe 1.2. Spectroscopie Infrarouge 189
Annexe 1.3. Microscopie Electronique à Balayage et en Transmission 190

Annexe 1.4. Diffusion dynamique de la lumière (DLS) et mesure du potentiel zêta 191
Annexe 1.5. Dosage des amines et thiols de surface par colorimétrie 191
Annexe 1.6. Spectroscopie par résonnance magnétique nucléaire (RMN) 193
Annexe 1.7. Spectroscopie de photoélectrons X (XPS) 194
Annexe 1.8. Diffraction de rayons X (XRD) 194
Annexe 1.9. Spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS) 195
Annexe 2. Comportement du vivant au contact de nanoparticules 196
Annexe 2.1. Interactions entre les nanoparticules et le vivant 196
Annexe 2.1.1. Principaux tests de toxicité utilisés 196
Annexe 2.1.2. Influence de la nature du matériau sur la toxicité 198
Annexe 2.1.3. Influence de la taille, de la forme et de la chimie de surface sur la toxicité. 199
Annexe 2.2. Contrôle des interactions entre nanoparticules et cellules, application au ciblage des cellules cancéreuses 202
Annexe 2.2.1. Ciblage passif 203
Annexe 2.2.2. Ciblage actif 204
Annexe 2.3. Conclusions 205
Annexe 3. Tests statistiques de comparaison de moyennes 206
Annexe 4. Liste des réactifs utilisés 208
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 211

Liste des figures

Figure I-1 : Représentation schématique de quelques processus optiques d'ordre 1 et 2 10
Figure I-2 : Image du volume excité en microscopie à un (Gauche) ou deux photons (Droite)[60] 11
Figure I-3 : Coefficient d'absorption de différentes molécules biologiques en fonction de la longueur d'onde[58] 13
Figure I-4 : Représentation du déplacement de l'oscillation des charges électriques lors de la résonnance plasmon de surface localisée[85] 15
Figure I-5 : Structures de nanohybrides possibles pour l'exaltation plasmonique de propriétés ONL. 17
Figure I-6 : Diagramme de LaMer[111] montrant l'évolution de la concentration en or métal en fonction du temps lors d'une réaction basée sur la réduction de sels d'or[112] 21
Figure I-7 : Clichés TEM de particules d'or issues d'un protocole de croissance en plusieurs étapes utilisant l'acide ascorbique comme réducteur[120] 22
Figure I-8 : Bandes plasmons de nanoparticules d'or de tailles croissantes issues d'un protocole de croissance en plusieurs étapes utilisant l'acide ascorbique comme réducteur, avant (- -) et après coating (—) avec une couche de silice de 20nm [121] 23
Figure I-9 : Positions des bandes plasmons de nanostructures d'or de différentes formes[86] 24
Figure I-10 : Représentation de la structure d'un nanorod[131] 25
Figure I-11 : Profil cinétique de la croissance de nanorods d'or dans le CTAB, en présence (a) et en l'absence (b) de sels d'argent[133] 26
Figure I-12 : Variation du maximum d'absorption de la bande plasmon en fonction de la concentration en sel d'argent (a) ou d'or (b)[129] 27
Figure I-13 : Représentation schématique du mécanisme de « zipping »[136] 28
Figure I-14 : Représentation des distributions de charge au voisinage de surfaces chargées positivement, de charge $+\sigma_0$ avec l'évolution du potentiel électrostatique en fonction de la distance pour les modèles d'Helmholtz (a), Gouy-Chapman (b) et Stern (c)[137] 31
Figure I-15: Evolution du potentiel électrostatique en fonction de l'éloignement à la surface[137]. 33
Figure I-16 : Evolution de l'énergie d'interaction de deux particules en fonction de la distance les séparant[143] 36
Figure I-17 : Structure générale d'une molécule de fonctionnalisation 41
Figure I-18 : Stabilité d'une couche de silane en fonction du matériau sous-jacent[201] 43
Figure I-19 : Equation générale d'une hydrosilylation 45
Figure I-20 : Activation d'un acide carboxylique par un carbodiimide 48
Figure I-21 : Stabilisation d'un carboxylate activé par le NHS 49
Figure I-22 : N-Acylurée 49

Figure I-23 : Réaction de couplage Amine-Isothiocyanate 50
Figure I-24: Réaction de couplage Aldéhyde-Amine 50
Figure I-25: Réaction de couplage Epoxyde-Amine 50
Figure I-26 : Représentation schématique d'une immunoglobuline de type G 51
Figure I-27 : Formation d'un disulfure à partir d'un thiol activé 52
Figure I-28 : Equation générale d'une réaction de Michael avec formation d'un thioether 53
Figure I-29 : Equation générale d'une cycloaddition de Huisgen 53
Figure I-30 : Equation générale d'une cycloaddition de Diels-Alder 54
Figure II-1 : Schéma récapitulatif de la synthèse de nanoparticules d'or par la méthode de Frens 64
Figure I-2 : Relation entre diamètre moyen attendu des nanosphères d'or et ratio molaire citrate/sel d'or, d'après Frens[113] 64
Figure I-3 : Schéma récapitulatif de la synthèse de nanoparticules d'or par croissance de germes 65
Figure I-4 : Schéma récapitulatif de la synthèse de nanorods d'or en présence de sels d'argent 66
Figure I-5 : Spectre d'absorption d'une suspension colloïdale de nanoparticules d'or obtenus par méthode de Frens – taille cible 150nm (ratio molaire citrate/$HAuCl_4$=0,43) 68
Figure I-6 : Cliché MEB de particules d'or obtenues par méthode de Frens, avec un ratio molaire citrate/$HAuCl_4$ de 0,43 (a) et distribution des tailles effectives mesurées sur les images MEB (b) 68
Figure I-7 : Cliché TEM de nanoparticules d'or obtenues après une l'étape de nucléation avec un ratio molaire citrate/$HAuCl_4$ de 2,8 (a) et distribution des tailles effectives mesurées au MEB (b) 70
Figure I-8 : Cliché MEB de nanoparticules d'or obtenues après une étape de croissance de germes (a) et distribution des tailles effectives mesurées au MEB (b) – V(germes)=780µL 70
Figure I-9 : Cliché MEB de nanoparticules d'or obtenues après deux étapes de croissance de germes (a) et distribution des tailles effectives mesurées au MEB (b) – V(particules, d=85nm)=3,7mL 71
Figure I-10 : Spectre d'absorption UV-Vis des nanoparticules d'or obtenues lors des différentes étapes d'une synthèse par croissance de germes. Diamètre moyen des germes : 24nm, après la 1ère étape de croissance : 89nm, après la 2ème étape de croissance : 163nm 72
Figure I-11 : Bandes plasmons de deux séries de nanorods obtenues avec 2 lots de CTAB différents 74
Figure I-12 : Bandes plasmons de trois séries de nanorods obtenues en variant la quantité de sels d'argent 75
Figure I-13 : Clichés TEM de nanorods d'or avec une bande plasmon centrée sur 790nm (AR=3,7) ... 76
Figure I-14 : Schéma représentant la séparation des nanoparticules, d'après Sharma[278]. Les nanosphères tombent au fond du tube tandis que les nanorods restent sur les parois. 77
Figure I-15 : Spectres d'absorption UV-Visible de nanorods d'or avant et après purification 79

Figure I-16 : Clichés TEM des échantillons avant (à gauche) et après (à droite) élimination des sphères d'or résiduelles dans des échantillons de nanorods de différents rapports d'aspect : 2,4 (A et B) ; 3,7 (C et D) ; 5,3 (E et F) 81
Figure I-17 : Diffractogramme de poudre des nanoparticules de SiC avant (SiC) et après recuit (SiC oxydé) et agrandissement sur la zone 30-40° 84
Figure I-18 : Diffractogramme de référence d'une poudre de SiC-3C[284] 85
Figure I-19 : Cliché MEB des nanoparticules de SiC obtenues après oxydation (a) et distribution des tailles effectives mesurées au MEB (b) 86
Figure I-20 : Spectres infrarouges de nanoparticules de SiC obtenus avant (a) et après traitements thermiques (b) et chimiques par KOH (c) 88
Figure I-21 : Spectres XPS des niveaux Si2p, C1s et N1s des nanoparticules de SiC avant (gauche) et après (droite) traitement thermique et alcalin 89
Figure I-22 : Diffractogramme des nanoparticules de $KNbO_3$ 91
Figure I-23 : Diffractogramme de référence de $KNbO_3$[292] 91
Figure I-24 : Cliché MEB de nanoparticules de $KNbO_3$ après tri en taille 92
Figure I-25 : Spectre infrarouge de nanoparticules de $KNbO_3$ après tri en taille 93
Figure III-1 : Potentiel zêta de différentes suspensions de nanorods d'or nus (c) ou fonctionnalisés par le MUA (a), le MUP (b), le MUAM (d) et le CTAB (e) 98
Figure III-2 : Structure générale des silanes utilisés 100
Figure III-3 : Montage à reflux utilisé pour la silanisation 100
Figure III-4 : Spectres IR des nanoparticules de SiC initiales non silanisées (a), après une étape de silanisation par l'APTES (b), après deux étapes de silanisation par l'APTES (c) et de l'APTES seul (d) 103
Figure III-5 : Agrandissement de la Figure III-4 sur la région spectrale située autour de 2900 cm^{-1}... 103
Figure III-6 : Agrandissement de la Figure III-4 sur la région spectrale située autour de 950 cm^{-1}..... 104
Figure III-7 : Spectres IR des nanoparticules de SiC non silanisées (a), après deux étapes de silanisation par le MPTES (b) et du MPTES seul (c) 104
Figure III-8 : Spectres XPS des niveaux Si2p, C1s et N1s des nanoparticules de SiC avant et après silanisation par l'APTES 108
Figure III-9 : Spectres XPS des niveaux Si2p, C1s et S2p des nanoparticules de SiC avant et après silanisation par le MPTES 110
Figure III-10 : Spectres d'absorbance UV-Vis obtenus après dosage par le bleu de Coomassie de nanoparticules de SiC non silanisées (a), après une étape de silanisation par l'APTES (b) et après deux étapes de silanisation par l'APTES (c) 111
Figure III-11 : Clichés MEB, obtenus par détection d'électrons rétrodiffusés, de nanohybrides SiC@Au basés sur des interactions électrostatiques (a) et thiol-or (b) 116

Figure III-12 : Cliché MEB, obtenu par détection d'électrons rétrodiffusés, de nanohybrides $KNbO_3$@Au basés sur des interactions Phosphore-Oxygène-Métal 117
Figure III-13 : Structure de l'acide folique 119
Figure III-14 : Schéma réactionnel simplifié du NHS avec l'acide folique 119
Figure III-15 : Schéma réactionnel simplifié d'un des isomères du NHS-folate avec le PEG-diamine 120
Figure III-16 : Schéma réactionnel simplifié des étapes d'activation par le butyldiisothiocyanate et de greffage du PEG-folate 121
Figure III-17 : Suivi de la réaction d'activation de l'acide folique par le NHS par spectroscopie infrarouge : spectre IR du NHS (a), de l'acide folique (b) et du NHS-folate synthétisé (c) 123
Figure III-18 : Suivi de la réaction de greffage du NHS-folate sur le PEG diamine par spectroscopie infrarouge : spectres IR du NHS-folate (a), du PEG diamine (b) et du PEG-folate (c) 124
Figure III-19 : Formule du PEG-folate, avec sa numérotation[300] 124
Figure III-20 : Spectre RMN ^{1}H du PEG-folate..... 125
Figure III-21 : Spectres d'absorption UV-Visible du PEG-folate (a), des nanoparticules de SiC fonctionnalisées par le PEG-folate (b) et des nanoparticules de SiC non silanisées (c). L'insert montre les spectres obtenus après élimination du bruit de fond de diffusion lié aux nanoparticules de SiC 127
Figure III-22 : Spectres XPS du PEG-folate seul pour le niveau C1s (gauche) et N1s (droite) 128
Figure III-23 : Spectres XPS du niveau C1s pour le PEG-folate, des nanoparticules de SiC silanisé 2 fois par l'APTES, et après le greffage du PEG-folate 130
Figure III-24 : Spectres XPS du niveau N1s pour le PEG-folate, des nanoparticules de SiC silanisées deux fois par l'APTES, et après le greffage du PEG-folate..... 131
Figure III-25 : Spectres XPS du niveau Si2p des nanoparticules de SiC silanisées deux fois par l'APTES, avant (gauche) et après (droite) le greffage du PEG-folate 132
Figure III-26 : Spectre XPS du niveau S2p des nanoparticules de SiC silanisées deux fois par l'APTES, après le greffage du PEG-folate..... 133
Figure III-27 : Spectres IR de du PEG-folate (a), des nanoparticules de SiC fonctionnalisées par le PEG-folate (b) et des nanoparticules de SiC aminées (c) 135
Figure III-28 : Structure probable des fragments m/z=16,04 (gauche) et m/z=176,04 (droite) 137
Figure IV-1 : Schéma du montage du microscope multiphotonique A1R-MP 142
Figure IV-2 : Puissance du laser en fonction de la longueur d'onde d'émission 142
Figure IV-3 : Schéma du montage HRS 143
Figure IV-4 : Cellules saines 3t3 marquées par des nanoparticules de $KNbO_3$ observées en microscopie multiphotonique SHG (λ_{ex}=800nm), Plage de détection : 390-642nm. 147
Figure IV-5 : Cellules saines 3t3 marquées par des nanoparticules de SiC observées en microscopie multiphotonique SHG (λ_{ex}=800nm), Plage de détection : 390-642nm 147

Figure IV-6 : Image (gauche) de nanorods d'or (AR=3,7) observés en microscopie multiphotonique (λ_{ex}=820nm), Plage de détection : 390-642nm et spectre d'émission associé (droite) 148
Figure IV-7 : Cellules 3t3 marquées par des nanorods d'or (AR=3,7) observées en microscopie multiphotonique (λ_{ex}=800nm), Plage de détection : 390-642nm 149
Figure IV-8 : Cellules saines 3t3 marquées par des nanohybrides observées en microscopie multiphotonique (λ_{ex}=800nm)..... 151
Figure IV-9 : Spectre d'émission non linéaire des nanorods d'or (a), des nanoparticules de SiC (b) et des nanohybrides SiC@Au (c) en fonction de la longueur d'onde (λ_{ex}=820nm), en insert : agrandissement de la zone 425nm-615nm 152
Figure IV-10 : Bande plasmon des nanorods (AR=3,7) utilisés pour réaliser le couplage plasmonique 154
Figure IV-11 : Représentation de l'intensité SHG émise par le SiC en fonction de la longueur d'onde d'excitation[71] 155
Figure IV-12 : Images obtenues en microscopie pour les nanohybrides SiC@Au avec une excitation à 800nm (gauche) et 900nm (droite). 157
Figure IV-13 : Images obtenues par microscopie multiphotonique (excitation à 800nm). Cellules marquées au Nile Red (en rouge, détection à 607 nm) et par des nanoparticules de SiC@PEG-Folate ou SiC@PEG (en bleu, détection à 395 nm) 163
Figure IV-14: Comparaison des pourcentages de cellules marquées : entre cellules cancéreuses et cellules saines exposées aux nanoparticules SiC@PEG-Folate (a), entre cellules cancéreuses exposées aux nanoparticules SiC@PEG-Folate sans et avec compétition par l'acide folique libre (b) et entre cellules cancéreuses exposées aux nanoparticules SiC@PEG-Folate et SiC@PEG (c). (*** p<0,0001) 165
Figure V-1 : Description de l'xCelligence et des plaques à puits utilisées pour évaluer la prolifération cellulaire 172
Figure V-2 : Impact de nanoparticules de SiC sur la prolifération de cellules 3t3 174
Figure V-3 : Impact de nanorods d'or sur la prolifération de cellules 3t3 175
Figure V-4 : Impact de nanohybrides SiC@Au sur la prolifération de cellules 3t3 175
Figure V-5 : Impact de l'irradiation sur la prolifération de cellules HuH7 incubées avec des nanoparticules (C=10µg/mL), irradiation de 12min à 40mW/cm² 177
Figure V-6 : Impact de nanohybrides SiC@Au sur la prolifération cellulaire de cellules HuH7 pour différentes conditions d'irradiation, [Or]=10µg/mL, irradiation à 40mW/cm² 178
Figure V-7 : Impact de nanohybrides SiC@Au sur la prolifération cellulaire de cellules HuH7, [Or]=10µg/mL, irradiation : 12min à 40mW/cm² 180
Figure A-1 : Structure du Bleu de Coomassie 191

Figure A-2 : Schéma récapitulatif de la méthode de dosage des amines par le bleu de Coomassie...192

Figure A-3 : Réaction entre un thiol libre et le réactif d'Ellman.....193

Figure A-4 : Schéma des principaux processus d'endocytose[309].....200

Figure A-5 : Impact de la taille et de la forme de nanoparticules d'or sur le nombre de nanoparticules internalisées[276] 201

Figure A-6 : Représentation schématique d'une tumeur et de sa perfusion[364] 203

Liste des tableaux

Tableau I-1 : Résumé de propriétés importantes de différents émetteurs fluorescents 7
Tableau I-2 : Récapitulatif des principaux nanomatériaux actifs en SHG utilisés pour l'imagerie..... 14
Tableau I-3 : Tableau récapitulatif des forces de Van der Waals 35
Tableau I-1 : Dimensions des nanoparticules composant les échantillons de nanorods de différents rapports d'aspect avant et après élimination des nanosphères par centrifugation 78
Tableau I-2 : Pourcentages de nanosphères dans des échantillons de nanorods de différents rapports d'aspect avant et après élimination des nanosphères par centrifugation..... 80
Tableau I-3 : Pourcentages atomiques, déterminés par XPS, de nanoparticules de SiC avant et après traitement thermique et alcalin 88
Tableau III-1 : Potentiel zêta des nanoparticules de SiC avant et après chaque étape de silanisation par l'APTES..... 101
Tableau III-2 : Pourcentages atomiques, déterminés par XPS, de nanoparticules de SiC avant et après deux silanisations par l'APTES 105
Tableau III-3 : Pourcentages atomiques, déterminés par XPS, de nanoparticules de SiC avant et après deux silanisations par le MPTES 108
Tableau III-4 : Principaux fragments positifs et négatifs obtenus en ToF-SIMS pour des nanoparticules de SiC avant silanisation et après silanisation par l'APTES..... 112
Tableau III-5 : Pourcentages atomiques, théoriques et déterminés par XPS du PEG-folate 127
Tableau III-6 : Pourcentages atomiques déterminés par XPS pour le PEG-folate et des nanoparticules de SiC, silanisées par l'APTES, et après greffage du PEG-folate 129
Tableau III-7 : Principaux fragments positifs et négatifs obtenus en ToF-SIMS pour le PEG-folate, et des nanoparticules de SiC silanisées à deux reprises par l'APTES, avant et après greffage de PEG-folate 136
Tableau IV-1 : Récapitulatif des nanoparticules et nanohybrides utilisés dans ce chapitre 145
Tableau IV-2 : Comparatif des techniques de caractérisation pour la mise en évidence de l'exaltation plasmonique 156
Tableau IV-3 : Résultats d'intensité SHG avec excitation pour les nanohybrides SiC@Au obtenus par détection par microscopie et en HRS 158
Tableau IV-4 : Récapitulatif des essais effectués lors des essais de ciblage 162
Tableau A-1 : Liste de quelques cibles couramment utilisées pour le ciblage de cellules tumorales.205

Glossaire

ADN : Acide Désoxyribonucléique

APTES : (3-Aminopropyl)triethoxysilane

AR : Aspect Ratio

ATR : Attenuated Total Reflectance

CTAB : Bromure de Cétyltriméthylammonium

DCC : Dicyclohexylcarbodiimide

DIC : Diisopropylcarbodiimide

DLS : Dynamic Light Scattering

DMF : Diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxide

EDC : N-Diméthylaminopropyl-N'-ethylcarbodiimide

EDCI: 1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide

EPR : Enhanced Permeability Retention

GFP : Green Fluorescent Protein

HRS : Hyper Rayleigh Scattering

IRM: Imagerie par Résonance Magnétique

MPTES : (3-Mercaptopropyl)triethoxysilane

MUA : Acide 11-mercaptoundecanoique

MUAM : Chlorhydrate de 11-mercaptoundecylamine

MUP : Acide 11-mercaptoundecanephosphonique

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NHS : *N*-Hydroxysuccinimide

ONL : Optique Non Linéaire

OTS : Octadécyltrichlorosilane

PDT : Photodynamic Therapy

PPT : Plasmonic Phothermal Therapy

PEG : Polyéthylène Glycol

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS : Reactive Oxygen Species

SHG : Second Harmonic Generation

TEM : Transmission Electronic Microscopy

ToF-SIMS : Time Of Flight – Secondary Ions Mass Spectrometry

TPEF : Two Photon Excited Fluorescence

XPS : X-ray Photoelectron Spectroscopy

XRD : X Ray Diffraction

Introduction générale

Avec 14 millions de nouveaux cas dans le monde (355000 en France) et 8,2 millions de morts (148000 en France) chaque année, le cancer constitue aujourd'hui l'une des principales causes de mortalité dans le monde[1,2]. Par ailleurs, l'OMS estime que le nombre de nouveaux cas de cancers devrait augmenter de 70% dans les prochaines années, atteignant ainsi le chiffre de 22 millions de nouveaux cas par an.

Le diagnostic précoce d'un cancer diminuant de moitié le risque de mortalité à priori, cette problématique revêt une importance considérable. La détection d'un cancer passant le plus souvent par l'utilisation d'une technique d'imagerie pour visualiser la tumeur, de nombreuses techniques d'imagerie sont utilisées pour le diagnostic du cancer. La plupart de ces techniques (exception faite des techniques d'échographies) sont basées sur l'analyse de différents signaux électromagnétiques. On pourra ainsi citer des techniques utilisant des signaux de basse énergie comme les ondes radio (IRM), des techniques utilisant des signaux de haute énergie comme les rayons X (radiographie, CT Scan) ou les rayons γ (PET-Scan). Ces techniques sont largement utilisées pour localiser des tumeurs, du fait de la transparence du corps humain à ces longueurs d'ondes. Pour les techniques basées sur l'analyse de lumière visible (ou proche UV/IR) comme l'imagerie optique ou l'imagerie de fluorescence, la non transparence du corps humain à ces longueurs d'onde peut être limitante. Parmi les applications *in vivo*, on pourra citer la chirurgie assistée par fluorescence ou bien l'imagerie par endoscopie qui permettent de contourner la non transparence du corps humain. Toutefois, le domaine principal d'utilisation de ces techniques optiques réside dans l'analyse de prélèvements issus de patients. Ainsi, l'examen histologique des biopsies est systématiquement réalisé par microscopie optique. En complément de l'imagerie optique, on peut pratiquer différentes techniques de marquage spécifique. Il s'agira dans ce cas de colorer les cellules par le biais de marqueurs couplés à un anticorps ou un ligand spécifique de certains marqueurs cellulaires. Le marquage fluorescent est très couramment employé mais d'autres alternatives existent basées, par exemple, sur des peroxydases. Ces colorations cellulaires spécifiques permettent ensuite de rechercher certains marqueurs protéiques pouvant être exprimées par les cellules cancéreuses. En fonction des marqueurs détectés, le praticien pourra, dans certains cas, évaluer l'agressivité potentielle de la tumeur et privilégier une option thérapeutique[3–5].

Parmi les options thérapeutiques, en plus de la chirurgie, on peut constater un panel toujours plus large de solutions, qu'il s'agisse de solutions médicamenteuses (cytotoxiques, thérapies anti-hormonales, anticorps) ou de solutions basées sur l'irradiation des cellules cancéreuses

(curiethérapie, radiothérapie, photochimiothérapie extracorporelle, hadronthérapie, etc…). Ces thérapies présentent, pour une majorité d'entre elles, des applications limitées ou des effets indésirables qui peuvent être lourds. Aussi, un second axe de recherche important dans le domaine du cancer vise t-il à améliorer ces thérapies, notamment en réduisant leurs effets secondaires. A ce titre, des recherches importantes sont menées dans le domaine de la vectorisation et du ciblage des cellules cancéreuses. Dans ce domaine, on pourra citer le cas plusieurs spécialités commerciales de cytotoxiques comme la doxorubicine ou la daunorubicine qui existent sous forme de liposomes pegylés (Caelyx®, Daunosome®, etc…) et qui ont pu démontrer un profil toxicologique légèrement plus favorable pour le patient[6]. On peut également citer les efforts importants réalisés pour cibler spécifiquement des cellules cancéreuses[7–10]. Enfin, d'importants efforts de recherche visent également à améliorer les thérapies par irradiation, notamment par le développement de nouvelles techniques telles que l'hyperthermie magnétique[11,12] ou par l'amélioration des techniques de photothérapie[13–19] ou de radiothérapie[20–23].

Les nanoparticules constituent des supports intéressants, compte tenu de la large palette de propriétés physiques et chimiques qu'elles peuvent offrir. De plus, elles peuvent être couplées entre elles et permettent également une grande variété de fonctionnalisations chimiques de surface. De telles propriétés offrent ainsi une très vaste gamme d'applications potentielles.

Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à l'élaboration de nanoparticules hybrides combinant propriétés optiques non linéaires et propriétés plasmoniques.

Le premier volet de cette thèse a consisté à synthétiser et caractériser les briques de base de ces nanoparticules hybrides, à savoir des nanoparticules d'or, de carbure de silicium et de niobate de potassium. Pour cela, les propriétés structurales et la chimie de surface de ces nanoparticules ont été étudiées afin de servir de socle de base pour une utilisation ultérieure.

Le second volet de cette thèse a concerné la fonctionnalisation de ces nanoparticules avec, pour double objectif, de greffer des biomolécules sur les nanoparticules pour permettre le ciblage de cellules cancéreuses et de pouvoir contrôler l'auto-assemblage de nanoparticules de natures différentes, sous la forme de nanohybrides combinant propriétés optiques et thérapeutiques.

Un troisième volet de cette thèse s'est intéressé aux propriétés optiques non linéaire de nos nanoparticules et leur utilisation pour le marquage cellulaire avec et sans ciblage spécifique des cellules cancéreuses.

Enfin, un dernier volet de cette thèse est consacré aux problématiques de toxicité de nos nanoparticules et de leur utilisation pour des applications thérapeutiques par photothérapie.

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans un contexte largement pluridisciplinaire, entre chimie, biologie et optique. En effet, le travail de chimie sur la synthèse, la fonctionnalisation et la caractérisation de nanoparticules a été réalisé à l'Institut des Nanotechnologies de Lyon mais l'étude des propriétés optiques, du comportement biologique et de la chimie de surface de nos nanoparticules n'auraient pas été possible sans les expertises respectives des équipes du GAP-Biophotonics (Group of Applied Physics – Biophotonics, Genève, Suisse), du Laboratoire CarMeN (Laboratoire de recherche en Cardiovasulaire, Métabolisme, diabétologie et Nutrition, Villeurbanne, France) et du Joint Research Center d'Ispra (Italie).

I. ETAT DE L’ART

Un point important des techniques d'imagerie est qu'elles nécessitent, pour la plupart, un marquage afin de pouvoir fournir une image informative pour le praticien. De nombreux travaux sont réalisés dans ce domaine afin d'améliorer les performances de ces techniques. Deux techniques d'imageries sont notamment concernées : l'IRM et l'imagerie par fluorescence.

Dans le cas de l'IRM, l'agent de contraste classiquement utilisé est un chélate de gadolinium. De multiples travaux cherchent à remplacer ce chélate par d'autres marqueurs, le plus souvent sous la forme de nanoparticules. Les nanoparticules d'oxyde de fer[24] ou de gadolinium[25] sont les plus étudiées dans ce domaine. Ainsi le LUMIREM®, est un agent de contraste IRM à base de nanoparticules d'oxyde de fer disposant d'une autorisation de mise sur le marché.

Dans le cas de l'imagerie par fluorescence, le marquage fluorescent peut être réalisé avec des fluorophores organiques (colorants, GFP, etc..) ou des nanoparticules fluorescentes qu'il s'agisse de nanoparticules dopées par des fluorophores organiques, des terres rares ou de nanoparticules semi-conductrices aussi appelées « quantum dots ». Chacun de ces fluorophores présente différentes propriétés qui sont résumées dans le Tableau I-1. Les nanoparticules semi-conductrices du groupe IV (principalement Si, nanodiamants et SiC), présentent des propriétés nettement différenciées, notamment en termes de rendement quantique de fluorescence et de toxicité, et sont donc classées séparément.

	Fluorophores organiques[26–28]	Terres rares[29–32]	Quantum Dots[33–35]	Quantum dots du groupe IV[36–39]
Sensibilité au photoblanchiment	+++	---	---	---
Rendement quantique de fluorescence	+/++	-	+++	-/+
Non toxicité	-/+	++	---	++
Accordabilité en longueur d'onde d'excitation	-	---	+++	++

Tableau I-1 : Résumé de propriétés importantes de différents émetteurs fluorescents

On peut constater que, dans ces deux domaines (IRM, fluorescence), de nombreuses recherches sont effectuées pour développer des sondes dont l'activité est portée par une nanoparticule. Les nanoparticules constituent en effet un socle à même de supporter différentes propriétés complémentaires. Il peut s'agir de propriétés physiques complémentaires (par exemple fluorescence

et magnétisme[27,40–44]) auxquelles peuvent s'ajouter des propriétés de ciblage[12,21,43–45], nécessaires pour ce rôle d'agent de marquage spécifique ou des propriétés thérapeutiques (chauffage localisé de cellules[12,21,43–47], délivrance de principes actifs[48–50]).

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au développement d'un nouveau type de nanosonde hybride, combinant un matériau actif en optique non linéaire et des nanostructures d'or, et à même de disposer de différentes fonctions, notamment une capacité de ciblage et une capacité thérapeutique.

Ce chapitre vise à présenter l'état de l'art dans les différents aspects de ce travail. Nous rappellerons donc dans un premier temps les principes de l'optique non linéaire ainsi que son intérêt pour la microscopie cellulaire. Nous décrirons dans un deuxième temps les voies de synthèse ainsi que les propriétés des nanostructures d'or. La troisième partie sera consacrée à l'état colloïdal qu'il est nécessaire de bien connaître et de contrôler afin d'obtenir des assemblages de nanoparticules stables dans le temps. Enfin, la dernière partie décrira les méthodes utilisées pour la fonctionnalisation chimique et biochimique des nanosondes.

I.1. Optique non linéaire : Théorie et application à la microscopie

Les techniques optiques classiques comme l'imagerie de fluorescence présentent différentes limites comme le photoblanchiment ou la nécessité d'utiliser des longueurs d'onde précises pour exciter les fluorophores. De plus, l'imagerie de fluorescence peut être perturbée par l'autofluorescence des cellules. Compte tenu des limites des techniques d'imagerie basées sur des processus d'optique linéaire, les techniques de microscopie optique non linéaire sont actuellement développées pour fournir des solutions alternatives.

Cette partie présentera donc, dans un premier temps, les bases fondamentales permettant d'expliquer certains processus non linéaires. Puis, nous nous intéresserons à l'utilisation de ces phénomènes en microscopie.

I.1.1. Aspects théoriques de l'optique non linéaire

Afin de comprendre le fonctionnement de ces techniques non linéaires, encore peu répandues, il est utile de partir d'un point largement connu : l'optique linéaire. Lorsque une onde électromagnétique

se propage dans un milieu, la réponse du milieu peut être exprimée sous la forme d'une polarisation, notée $\vec{P}$. Dans le cas de l'optique linéaire, il y a une relation directe entre cette polarisation et le champ électrique lié à la propagation de l'onde électromagnétique. Cette relation peut alors être exprimée de la manière suivante, avec ε_0 la permittivité électrique du vide, $\chi^{(1)}$ la susceptibilité électrique d'ordre 1 du matériau et $\vec{E}$, le champ électrique :

$$\vec{P} = \varepsilon_0 \chi^{(1)} \vec{E}$$

Toutefois, cette équation provient d'une équation plus générale[51], avec $\chi^{(n)}$, le tenseur de susceptibilité électrique d'ordre n :

$$\vec{P} = \underbrace{\varepsilon_0\ \chi^{(1)}\ \vec{E}}_{P_{Lin}} + \underbrace{\varepsilon_0\ \chi^{(2)}\ (\vec{E})^2 + \varepsilon_0\ \chi^{(3)}\ (\vec{E})^3 + \cdots + \varepsilon_0\ \chi^{(n)}\ (\vec{E})^n}_{P_{NLin}}$$

On constate alors, que dans le cas de l'optique linéaire, on néglige les termes d'ordre supérieur à 1 ou termes non linéaires. En effet, tant que le champ électrique demeure faible (typiquement inférieur à 10^5 V/m), les termes non linéaires sont négligeables devant le terme d'ordre 1. Au-delà, on pourra observer des effets non linéaires. Les phénomènes non linéaires possibles sont nombreux et nous nous limiterons à l'étude de certains phénomènes non linéaires. Il est important de noter que disposer d'un champ électrique intense est nécessaire mais non suffisant pour pouvoir observer des phénomènes non linéaires. En effet, pour observer un phénomène d'ordre n, le matériau doit posséder un $\chi^{(n)}$ suffisamment grand. Ainsi, par exemple, il n'est pas possible d'observer des phénomènes non linéaires d'ordre 2 dans des matériaux centrosymétriques, c'est-à-dire possédant un centre d'inversion dans leur structure cristalline, leur $\chi^{(2)}$ étant alors nul. En revanche, des phénomènes non linéaires d'ordre supérieur sont envisageables pour ces matériaux.

Nous nous limiterons à la description de deux phénomènes non linéaires : la génération de second harmonique (SHG) et la fluorescence excitée à deux photons (TPEF). On peut toutefois noter que d'autres phénomènes non linéaires peuvent également être utilisés, comme la génération de troisième harmonique par exemple. Les mécanismes et les spectres typiques obtenus en SHG et TPEF sont décrits dans la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**.

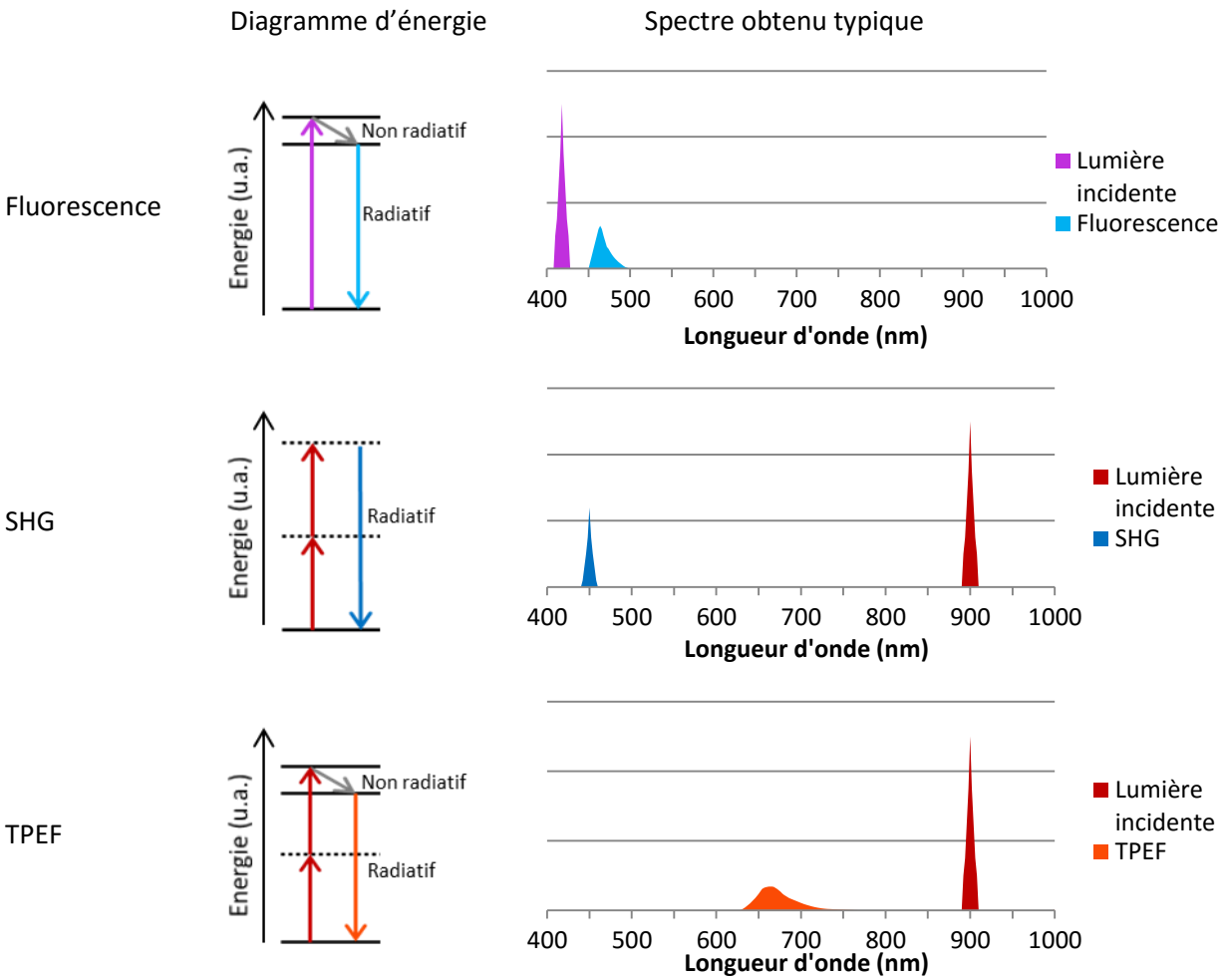


Figure I-1 : Représentation schématique de quelques processus optiques d'ordre 1 et 2

La SHG, parfois appelée doublage de fréquence, consiste en la conversion de deux photons de longueur d'onde λ en un photon unique de longueur d'onde λ/2. On obtient alors un spectre présentant un pic d'émission unique et étroit à λ/2 (Figure I-1). Ce phénomène se caractérise par des états intermédiaires tous virtuels.

La TPEF consiste en une première étape d'absorption, simultanée, de deux photons de longueur d'onde λ afin d'atteindre un niveau électronique réel d'énergie. Puis, dans un second temps, cette énergie va être réémise en partie sous forme radiative. On obtiendra alors un photon de longueur d'onde comprise entre λ et λ/2 : le spectre présentera ainsi un large massif d'émission dans cette région spectrale (Figure I-1). Pour le cas particulier des particules métalliques, un mécanisme similaire peut également avoir lieu mais on parlera dans ce cas de luminescence à deux photons[52–55].

I.1.2. Application à l'imagerie cellulaire

Certains processus non linéaires peuvent être utilisés en remplacement de processus linéaires comme la fluorescence pour améliorer les techniques d'imagerie. Toutefois, pour pouvoir utiliser ces techniques de microscopie non linéaire sur du matériel vivant, il est nécessaire de pouvoir disposer de sources lumineuses puissantes mais non destructives pour les échantillons. Il a donc fallu attendre les années 90 pour voir se développer la microscopie optique non linéaire[56,57] grâce au développement de lasers pulsés comme les lasers femtosecondes. Ces lasers sont en effet capables de produire des champs électriques très importants mais pendant des durées si brèves que l'énergie transférée aux cellules demeure faible et donc sans impact majeur sur leur durée de vie. Par ailleurs, la probabilité d'excitation biphotonique est proportionnelle au carré de l'intensité incidente[58,59]. Ainsi l'intensité émise sous excitation à deux photons est d'autant plus importante que le faisceau laser est bien focalisé. Par conséquent, l'excitation à deux photons est naturellement confinée spatialement dans un petit volume de l'ordre d'1 μm^3 (Figure I-2, droite), limitant ainsi les émissions parasites hors du point focal. On obtient ainsi une résolution spatiale et un rapport signal/bruit comparables à ceux d'un microscope confocal, mais sans avoir à utiliser de « pinhole ». A l'inverse en optique linéaire, la fluorescence parasite, hors du point focal, est importante (Figure I-2, gauche).

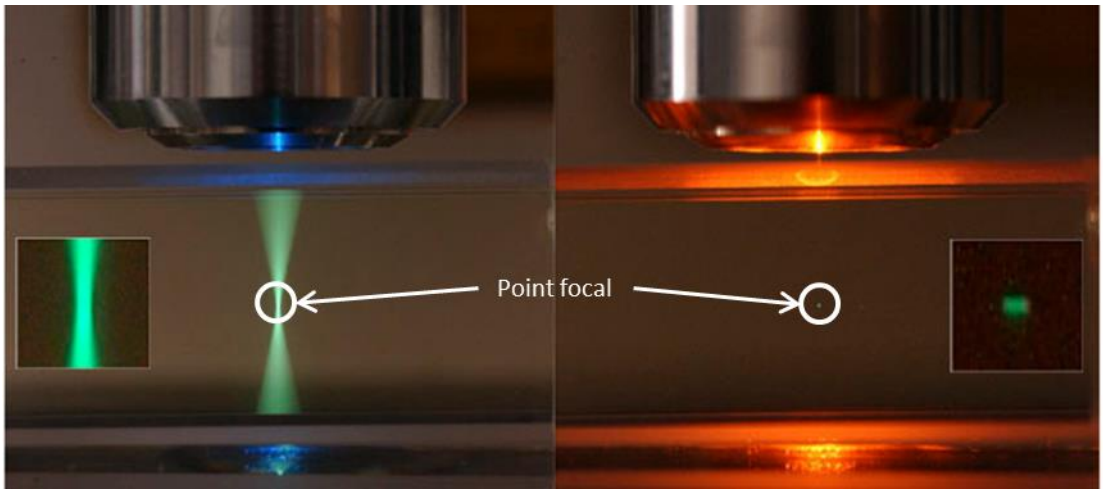


Figure I-2 : Image du volume excité en microscopie à un (Gauche) ou deux photons (Droite)[60]

Cette technique d'imagerie peut être utilisée directement sur les cellules. En effet, les membranes cellulaires et certaines molécules comme le collagène ou le NADH présentent une activité en TPEF ou en SHG. Même si ces marqueurs naturels non linéaires peuvent être utilisés pour caractériser les

cellules[61–63] voire réaliser un diagnostic[64,65], leur signal reste faible, ce qui nécessite de travailler avec des champs électriques élevés, induisant alors un bruit de fond à même de diminuer le rapport signal/bruit. Le recours à des marqueurs extrinsèques permet d'améliorer ce signal tout en travaillant à champ plus faible.

Ainsi, différents marqueurs ont été développés, principalement des molécules organiques et des nanoparticules. Les marqueurs organiques actifs en optique non linéaire ont été rapidement et largement utilisés, notamment grâce à leurs propriétés de TPEF, pour marquer les membranes cellulaires[18,44,66–68]. Pour maximiser leur activité optique, ces molécules sont non centrosymétriques et, le plus souvent, organisées autour d'une architecture « push-pull ». Cette organisation interne de la molécule se traduit par une division de la molécule en deux zones, la première captant l'énergie lumineuse et la transmettant, via des électrons conjugués, à la seconde, qui réémet ensuite la lumière dans un second temps. Cependant l'utilisation de ces molécules reste limitée par le bruit de fond en TPEF issu des membranes cellulaires et par leur photoblanchiment[59]. De plus, ces molécules ne sont actives que pour des plages de longueurs d'onde limitées. En conséquence, certains auteurs se sont intéressés au développement de nouveaux marqueurs, actifs en SHG et plus stables sous excitation lumineuse.

I.1.3. Développement de nouveaux marqueurs SHG

Le développement de nouveaux marqueurs SHG vise à compenser les lacunes principales des émetteurs actifs en TPEF : le photoblanchiment et l'accordabilité en longueur d'onde limitée.

Les nanoparticules sont largement étudiées en tant que marqueurs alternatifs. En effet, ces systèmes présentent de multiples avantages, notamment une très grande photostabilité et une très grande efficacité en SHG. A titre d'exemple, on pourra remarquer que la section efficace de la fluorescence à deux photons d'une nanoparticule est supérieure de un à deux ordres de grandeur à celle de marqueurs comme la rhodamine ou la GFP[58,69]. Il est aussi intéressant de noter que la taille des particules influe directement sur leurs propriétés optiques non linéaires. En effet, l'intensité du signal de TPEF émis est proportionnelle au volume de la particule alors que l'intensité de SHG émise est proportionnelle au carré du volume de la particule[58,59].

Par ailleurs, les propriétés SHG de ces particules ne sont impactées que de manière très limitée par un changement de la longueur d'onde d'excitation[59,70]. Cette propriété leur permet ainsi d'être utilisées dans de larges gammes de longueurs d'onde tout en conservant une activité constante. Ceci s'explique par la très faible taille de ces nanoparticules. En effet, la taille de ces particules est

inférieure à la longueur de cohérence de leurs matériaux « bulk » et il n'existe donc aucune interférence destructive, et ce quelle que soit la longueur d'onde étudiée[58]. Certains auteurs[71] ont toutefois rapporté une dépendance partielle à la longueur d'onde d'excitation, notamment pour des excitations en deçà de 750nm.

Cette liberté dans le choix de la plage d'excitation permet d'adapter la longueur d'onde de travail, afin de minimiser l'absorption de la lumière par les tissus biologiques. On constate ainsi sur la Figure I-3 que l'absorbance des tissus vivants diminue de plusieurs ordres de grandeurs dans la fenêtre 800-1000nm. Cette fenêtre de transparence biologique peut alors être mise à profit pour obtenir davantage de signal ou travailler à plus grande profondeur dans l'échantillon. Par exemple, pour les phénomènes non linéaires d'ordre 2, compte tenu de la relation quadratique[58,59] entre intensité reçue et émise, un signal reçu 10 fois plus intense se traduira par un signal émis 100 fois plus intense.

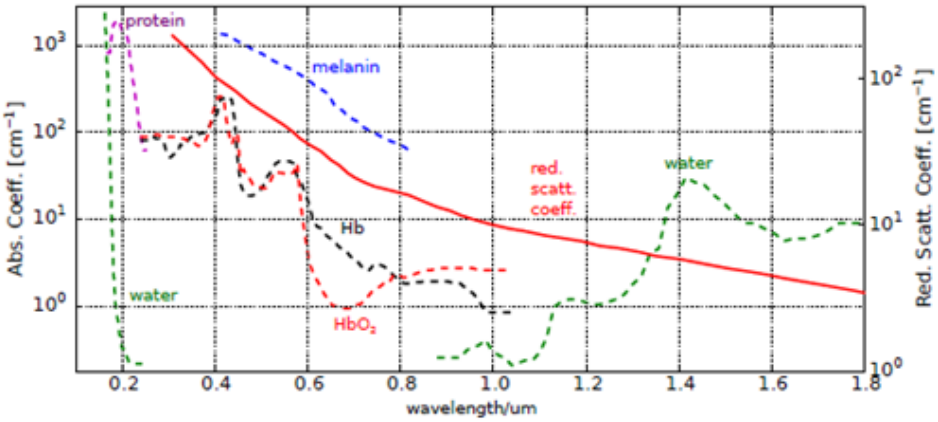


Figure I-3 : Coefficient d'absorption de différentes molécules biologiques en fonction de la longueur d'onde[58]

L'étude de ces nanoparticules possédant des propriétés SHG s'est développée à partir du début des années 2000. Dans la littérature, on retrouve ces nanoparticules sous les termes, principalement, de Harmonic Nanoparticles (HNP) et Second Harmonic Radiation Imaging Probes (SHRIMP). Différents matériaux sont étudiés, avec comme point commun, leur non-centrosymétrie. Le

Tableau I-2 répertorie les principaux matériaux utilisés sous forme de nanoparticules pour des applications d'imagerie.

Matériau	Structure cristalline	Références
$KNbO_3$	Orthorhombique – mm2	[72–76]
$LiNbO_3$	Trigonal – 3m	[74,75]
$BaTiO_3$	Tetragonal – 4mm	[69,71,74–78]
ZnO	Hexagonal – 6mm	[71,74–76]
$KTiPO_4$	Orthorhombique – mm2	[74–76]
$BiFeO_3$	Rhomboédrique – 3m	[58,68,75]
SiC	Cubique – $\bar{4}$3m	[58,71,79]

Tableau I-2 : Récapitulatif des principaux nanomatériaux actifs en SHG utilisés pour l'imagerie

Au-delà de leurs propriétés optiques, ces émetteurs SHG doivent également être les moins toxiques possibles pour pouvoir être utilisés sur des cellules vivantes. Quelques études portant sur la toxicité aiguë de ces différents émetteurs ont été réalisées. Il en ressort que certains matériaux comme le ZnO ou le $KTiPO_4$ présentent une toxicité relativement importante ce qui réduit l'intérêt de tels marqueurs[74]. Aussi, les travaux sur le développement de nouveaux marqueurs se focalisent sur des marqueurs réputés comme biocompatibles tels que le $BaTiO_3$, le SiC ou le $KNbO_3$. On peut également remarquer que certaines particules métalliques, principalement d'or, sont aussi étudiées et utilisées pour leurs propriétés de luminescence à deux photons[52–55] et présentent des avantages similaires aux émetteurs SHG cités ci-dessus, notamment en termes d'intensité d'émission et de photostabilité. Les propriétés des nanoparticules d'or seront décrites plus en détail dans les paragraphes I.2.1 et I.2.2.

I.1.4. Conclusions

Cette partie a permis de présenter les avantages de l'imagerie par microscopie non linéaire pour l'imagerie cellulaire. Ces avantages ont entrainé le développement de différentes nanoparticules actives en SHG. L'intérêt grandissant pour l'imagerie non linéaire pousse également différentes équipes à développer des structures plus complexes et multifonctionnelles à partir de ces émetteurs SHG. Les principales fonctions complémentaires recherchées sont des fonctions de ciblage[52,68,80] ou d'internalisation[81] via le greffage de différents ligands ainsi que des fonctions thérapeutiques[18,82] via le greffage de molécules photosensibilisantes ou de nanoparticules d'or. Nous allons maintenant nous intéresser plus précisément à la synthèse et aux propriétés des nanoparticules d'or qui seront ensuite couplées aux émetteurs SHG.

I.2. Synthèse et propriétés des nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or disposent de nombreuses propriétés, largement utilisées dans différents domaines. On peut citer, notamment, leurs propriétés plasmoniques, thérapeutiques, catalytiques ou de luminescence. Leurs propriétés optiques et thérapeutiques sont ainsi particulièrement étudiées pour des applications au domaine biomédical.

Les nanoparticules d'or possèdent des propriétés plasmoniques et de luminescence également très utiles à leur caractérisation. Aussi, dans un premier temps, cette partie présentera ces différentes propriétés et fera le lien avec les propriétés thérapeutiques de ces particules. Cette partie abordera ensuite les méthodes employées pour synthétiser des nanoparticules d'or.

I.2.1. Propriétés plasmoniques

La résonnance plasmonique de surface est un phénomène que l'on peut rencontrer à l'interface entre un milieu diélectrique et un milieu métallique. Ce phénomène est lié à l'oscillation collective des électrons libres à la surface du métal sous irradiation lumineuse. Le phénomène de résonnance se produira alors pour une longueur d'onde spécifique. Il en résulte une polarisation de la surface et l'apparition d'un champ électromagnétique évanescent dans le milieu diélectrique. Ce champ décroit alors exponentiellement avec la distance à la surface[83,84].

On peut parler de résonnance de plasmon de surface localisée lorsque le métal considéré est sous la forme de nanoparticules dont la taille est inférieure à la longueur d'onde de la lumière incidente. Dans ce cas, on peut considérer la particule comme un dipôle (Figure I-4) et cette résonnance se caractérise, en spectroscopie UV-Vis, par une bande d'extinction nommée bande plasmon.

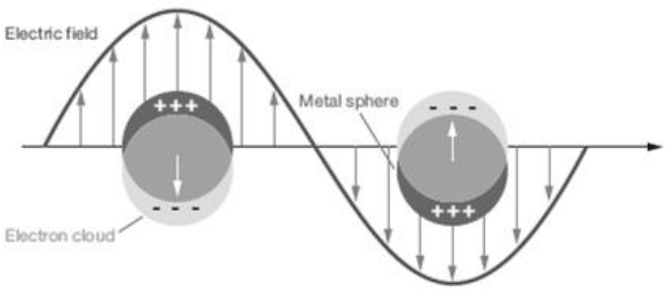


Figure I-4 : Représentation du déplacement de l'oscillation des charges électriques lors de la résonnance plasmon de surface localisée[85]

Le maximum d'extinction de cette bande plasmon correspond à la longueur d'onde permettant d'obtenir une résonnance pour un maximum de nanoparticules. La structure et la position de cette bande dépendent de différents paramètres. La taille, la forme et l'environnement chimique des nanoparticules sont des paramètres importants. Ainsi, la largeur de la bande plasmon d'une population de nanoparticules sera d'autant plus grande que l'hétérogénéité en taille et en forme seront importantes[85–87].

Par ailleurs, le matériau composant les particules joue un rôle capital sur la position de cette bande plasmon. C'est pour cette raison que les nanoparticules d'or, d'argent ou leurs alliages sont les plus largement étudiés pour des applications biomédicales. En effet, ces métaux possèdent des bandes plasmons facilement excitables et caractérisables se situant dans le domaine du visible ou du proche infrarouge (dans le cas des nanoparticules d'or). Compte tenu des propriétés plasmoniques spécifiques de l'or et de la fenêtre de transparence du vivant dans le proche infrarouge, la synthèse de nanoparticules aux propriétés plasmoniques adaptées à ces longueurs d'onde est largement étudiée.

Les utilisations possibles de ce champ évanescent sont multiples :

La première utilisation est liée au fait que la position de la bande plasmon est influencée par l'environnement immédiat de la surface. En effet, le phénomène de résonnance dépend directement de l'écart entre les indices optiques du métal et du diélectrique à sa surface. Ainsi, en utilisant des surfaces métalliques présentant des systèmes de reconnaissance *ad hoc*[9,88–90], il est possible de détecter le changement d'indice lié à la fixation des biomolécules d'intérêt. Cette fixation se traduira alors par un décalage vers le rouge de la bande plasmon. Cette méthode, nommée détection SPR (pour Surface Plasmon Resonnance), présente l'avantage majeur de ne nécessiter aucun marquage sur l'échantillon tout en étant rapide à mettre en œuvre (quelques minutes).

Une deuxième utilisation de ce champ évanescent est liée au fait que les rendements de différents phénomènes optiques sont augmentés si le système optiquement actif se situe au sein du champ. Cet effet est largement utilisé, notamment pour exalter des signaux de fluorescence[30,91–94] ou Raman[95,96]. Dans le cas de la fluorescence, le gain de signal peut atteindre deux ordres de grandeurs tandis que dans le cas du Raman, cette exaltation est encore supérieure de plusieurs ordres de grandeurs. On parle alors de « Metal Enhanced Fluorescence » et de « Surface Enhanced Raman Scattering ».

L'application de ce principe aux phénomènes optiques non linéaires comme la fluorescence à deux photons[97–102] ou la génération de seconde harmonique[72,78,100,103] est également étudiée. Ce

phénomène a été étudié sur des surfaces 2D pour des émetteurs placés à proximité d'îlots métalliques nanométriques[79,98,103]. Ce phénomène a également été étudié en 3D et notamment le couplage d'émetteurs ONL et de nanostructures métalliques au sein d'une même nanoparticule, les structures étudiées sont soit constituées d'un cœur d'or entouré d'émetteurs ONL (Figure I-5a) soit d'un cœur émetteur ONL entouré de nanostructures d'or (Figure I-5b), sous la forme de nanoparticules dispersées ou de coquilles recouvrant la surface du cœur ONL (Figure I-5c).

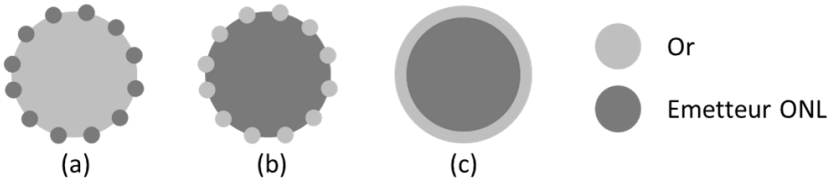


Figure I-5 : Structures de nanohybrides possibles pour l'exaltation plasmonique de propriétés ONL

La structure (a) est principalement rencontrée pour des émetteurs ONL de très petites tailles, à savoir des émetteurs organiques[99–103] ou des quantum dots de très petite taille[97] (quelques nm de diamètre). Pour les émetteurs ONL de plus grandes dimensions, les structures (b) ou (c) sont utilisées[72,78,104], car elles permettent à un plus grand volume de l'émetteur ONL d'être exposé au champ plasmon. Afin de mesurer l'exaltation, il sera alors possible de comparer, les intensités des signaux non linéaires émis avec et sans plasmon ou bien de mesurer la section efficace à deux photons (qui décrit la probabilité d'interaction lumière matière dans le cas de phénomènes non linéaires) avec et sans plasmon. Dans le cas de mesures de sections efficaces, il conviendra toutefois de nuancer les valeurs obtenues. En effet, une interaction lumière-matière accrue n'impliquera pas nécessairement une émission de lumière accrue. De plus, la plupart des études comparent des valeurs obtenues pour des hybrides or-émetteurs ONL et pour les émetteurs ONL seuls. Les nanoparticules d'or ayant une activité en optique non linéaire (en luminescence à deux photons notamment), il convient alors de tempérer les résultats présentés puisque l'or peut lui-même accroitre ces résultats par simple addition de ses propriétés optiques à celles de l'émetteur ONL.

Dans le cas d'émetteurs organiques greffés à la surface de nanoparticules d'or (Figure I-5a), Clark *et al*[100] ont étudié l'impact des nanoparticules d'or et ont comparé la réponse non linéaire d'un colorant en présence et en l'absence de particules d'or. Ils décrivent ainsi un signal ONL augmenté d'un facteur 20, en utilisant le colorant fixé sur des nanoparticules d'or. D'autres études[99,101,102] se sont intéressées aux évolutions de section efficace. Dans ces conditions, les facteurs d'exaltation varient entre 4 et 150. Ces résultats d'accroissement de la section efficace peuvent toutefois être nuancés et considérés comme des résultats indirects en comparaison de la mesure directe du signal optique. En

comparaison des résultats obtenus en 3D, les systèmes 2D paraissent plus favorables avec un accroissement de signal SHG allant jusqu'à un facteur 80[98].

Dans cette même configuration mais avec un coeur d'argent (aux propriétés plasmoniques similaires) entouré de nanoparticules (et non plus de molécules organiques), Jais *et al*[97] ont pu démontrer que des hybrides Ag-CdS émettaient 7 fois plus de SHG que des quantum dots de CdS pris isolément. Là encore, le cas 2D est plus favorable, Zakharko *et al*[79] ont ainsi montré que le signal SHG pouvait être exalté d'un facteur compris entre 20 et 50 pour des particules de SiC déposées sur une surface d'argent.

Dans le cas d'émetteurs SHG de nature inorganique entourés de structures d'or (Figure I-5b et c), le nombre d'études disponibles est limité et se base sur l'analyse de particules uniques. Richter *et al*[72] ont ainsi montré qu'un nanobâtonnet de $KNbO_3$ nu émettait 240 fois moins de SHG qu'un nanobâtonnet de $KNbO_3$ recouvert d'or. Des structures similaires mais basées sur un cœur de $BaTiO_3$ ont également été étudiées[78] et montrent un accroissement de la section efficace à deux photons d'un facteur compris entre 50 et 70. Toutefois ces résultats sont issus de l'analyse de nanoparticules uniques déposés sur substrat. Aussi est-il risqué d'extrapoler ce résultat sur de plus grandes populations de nanoparticules, à fortiori en solution.

Enfin, différentes simulations[78,79,104] ont été réalisées pour déterminer les facteurs théoriques d'exaltation dans les différentes configurations. Ces facteurs varient entre deux et trois ordres de grandeurs selon les conditions choisies. On constate toutefois un net écart entre les valeurs observées et les valeurs théoriques.

I.2.2. Propriétés thérapeutiques

Les nanoparticules d'or possèdent une capacité importante à interagir avec la lumière, notamment au travers de leurs propriétés plasmoniques. Une fois cette énergie absorbée, les nanoparticules d'or vont pouvoir dissiper cette énergie sous forme de chaleur, d'un rayonnement secondaire ou bien sous la forme d'espèces réactives en fonction du niveau d'énergie de la radiation absorbée. C'est cette capacité de l'or à convertir de l'énergie qui va pouvoir être mise à profit pour déclencher, de manière active, des effets thérapeutiques.

Les propriétés d'absorption importantes de l'or dans le visible/proche IR, qui sont liées à ses propriétés plasmoniques se traduisent au niveau cellulaire par une conversion de cette énergie en chaleur. Cette augmentation localisée de la température peut permettre une éventuelle imagerie par

thermographie[15]. Par ailleurs, si l'énergie apportée est suffisante, des effets cytotoxiques peuvent s'exercer[13–18,21,105]. On peut noter deux processus à l'œuvre dans ces effets cytotoxiques. Un premier effet consiste en une hausse localisée de la température, parfois au-delà de 42°C induisant une dénaturation des protéines et une destruction des membranes voire des microthromboses. Un second effet est lié à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour « reactive oxygen species »), très toxiques pour les cellules. L'effet thermique est mis en œuvre pour la thérapie dite photothermique (notée PPT) et l'effet oxydant est mis en œuvre pour la thérapie dite photodynamique (notée PDT). Il est d'ailleurs à noter que l'effet PDT se manifestera préférentiellement en utilisant une source d'irradiation pulsée[106].

L'intérêt majeur de l'or dans cette application est à relier à sa capacité d'absorber le rayonnement infrarouge, lequel peut pénétrer relativement profondément dans les tissus vivants.

Les propriétés d'absorption de l'or se manifestent également dans le domaine des rayons X du fait de son numéro atomique élevé. Les nanoparticules d'or peuvent alors être utilisées comme agent de contraste lors d'imageries X[21,43,107] (radiographies ou CT Scan) ou comme agent radiosensibilisant lors de radiothérapies[20–23]. En effet, bien que les rayons X seuls soient à même d'induire des lésions mortelles aux cellules, il est préférable d'éviter l'exposition des patients à des doses importantes impliquant des effets indésirables lourds voire l'apparition de nouveaux cancers. L'or, en tant qu'agent radiosensibilisant peut augmenter localement et de manière importante l'absorption des rayons X. Cette quantité supplémentaire d'énergie absorbée sera ensuite restituée au milieu environnant en induisant des effets toxiques. Les mécanismes les plus évoqués sont la formation de ROS ainsi que l'émission localisée de photons de haute énergie et d'électrons secondaires[108].

I.2.3. Propriétés de luminescence

Les nanoparticules d'or peuvent également être utilisées pour leurs propriétés de luminescence. Il peut s'agir de propriétés optiques linéaires ou non linéaires. La capacité de l'or à émettre de la luminescence, qu'il s'agisse de luminescence[22,43] à un ou deux photons[52,53,109] est certes limitée en comparaison d'émetteurs comme des fluorophores ou des « quantum dots » mais reste tout de même largement supérieur à l'autofluorescence cellulaire (environ 4000 fois[52]) et ce plus faible rendement est compensé par d'autres propriétés.

Parmi ces propriétés, on peut citer l'innocuité à l'égard du vivant, la stabilité chimique et une excellente photostabilité. En comparaison, les émetteurs efficaces classiques tels que les « quantums dots » ou les fluorophores organiques sont affublés d'au moins un des défauts cités. Par ailleurs, la

fonctionnalisation de l'or est largement maitrisée et il est ainsi possible de greffer, par exemple, des systèmes de ciblages des cellules cancéreuses et ainsi obtenir des marqueurs spécifiques pour l'imagerie optique[52].

I.2.4. Synthèse des nanoparticules d'or

Il existe de nombreux types de nanostructures d'or possibles : sphères, bâtonnets, etc… La structure la plus anciennement connue et la plus largement décrite est la nanosphère d'or. Aussi, dans un premier temps, nous nous intéresserons aux mécanismes qui régissent la croissance de telles structures. Puis, nous pourrons ensuite étudier les mécanismes à l'œuvre pour des structures plus complexes.

I.2.4.1. Synthèse de nanosphères d'or

La synthèse de nanoparticules d'or est basée sur la réduction de sels d'or. La source d'or la plus utilisée est l'acide tétrachloroaurique, $HAuCl_4$, ou un de ses sels tels que $KAuCl_4$.

Les premières synthèses de nanoparticules par ces procédés de réduction ont été réalisées par Turkevich[110] au moyen de multiples réducteurs : phosphore blanc, acide oxalique, hydroxylamine, monoxyde de carbone, acétylène.

Dans ces réactions de réduction, on pourra décomposer le mécanisme de croissance de la manière suivante. L'espèce Au°, issue de la réaction de réduction, va s'accumuler, de manière métastable, dans le milieu, au-delà de la solubilité (notée C_s sur la Figure I-6) de Au°. Toutefois, pour que cet or précipite sous forme de particules, une concentration en Au° supérieure doit être atteinte. Cette concentration permettant la nucléation est notée C_{min}^{nu} (palier de nucléation) sur la Figure I-6. Une fois cette concentration dépassée, le Au° en sursaturation est consommé et converti en germes.

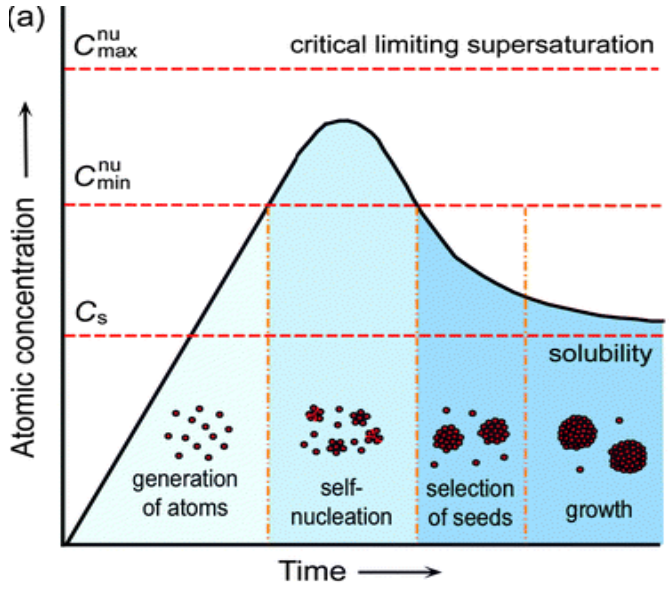


Figure I-6 : Diagramme de LaMer[111] montrant l'évolution de la concentration en or métal en fonction du temps lors d'une réaction basée sur la réduction de sels d'or[112]

Par la suite, la méthode basée sur l'acide citrique a été développée par Frens[113]. Cette méthode permet de contrôler la taille moyenne des nanosphères d'or obtenues en modifiant le rapport [réducteur]/[sel d'or]. Plus ce rapport est élevé, plus la taille des nanoparticules est faible. En effet, dans ces conditions, la cinétique de la réaction est augmentée, ce qui provoque la formation simultanée de nombreux germes dont la croissance reste très limitée puisque la quantité d'or restante est à répartir entre davantage de germes. Avec cette méthode, la gamme de taille accessible est d'environ 5 à 150 nm. Toutefois, pour les particules de grands diamètres (>40-50 nm), on constate que cette méthode ne permet pas d'obtenir des particules homogènes en forme et en taille[114,115]. En effet, l'obtention de grandes nanosphères nécessite un ratio [réducteur]/[sel d'or] très faible. Dans ces conditions, la formation des germes est lente. Par conséquent, la croissance des germes démarre à des temps différents, ce qui conduit à des dimensions différentes pour chaque nanoparticule. Enfin, pour de telles tailles de nanoparticules, le comportement de l'or tend à se rapprocher du comportement de l'or « bulk ». Les propriétés cristallines du matériau peuvent donc imposer une structure et des faces de croissance privilégiées aux nanoparticules, aboutissant à des formes non sphériques.

Ainsi, afin d'obtenir des nanoparticules de grandes tailles tout en favorisant la monodispersité et le maintien de la forme sphérique, la concomitance des phases de nucléation et de croissance doit être empêchée.

Afin de parvenir à ce résultat, il est nécessaire d'utiliser une propriété électrochimique de l'or. En effet, la réduction de l'or Au(III) en Au° passe par un état intermédiaire Au(I). Or le potentiel

électrochimique du couple Au°/Au(I) est influencé par la présence ou non de surfaces métalliques (d'or par exemple). En effet, le potentiel du couple $Au°/Au^+$ en solution est de +1,68V en présence d'une surface d'or et de -1,5V en l'absence de surface[116]. Ainsi, en utilisant un réducteur de potentiel intermédiaire comme l'acide ascorbique[86,116] (0,125V) ou l'hydroquinone[117] (-0,7 V), on peut réaliser spécifiquement la croissance des nanoparticules à condition de disposer dans la solution de germes préalablement synthétisés. Ces germes vont amener des surfaces d'or métalliques qui vont permettre l'abaissement localisé du potentiel redox du couple Au^0/Au^+. L'or Au° formé se situe à proximité directe des germes, il va ainsi participer directement à leur croissance. Il a par ailleurs été démontré que l'or Au° n'est pas présent en solution dans ces conditions[118].

On peut alors réaliser une première étape consistant à produire des nanoparticules d'or de très petites tailles, par exemple à l'aide de quantités importantes de citrate de sodium[116,119,120] à chaud (100°C) ou d'hydroxylamine[114] à température ambiante. Puis, dans un second temps, on réalise la croissance en mettant en contact une solution contenant du CTAB, le réducteur et du $HAuCl_4$ avec la solution de germes synthétisés auparavant. Le CTAB, un tensioactif cationique, permet de stabiliser les nanoparticules et notamment d'éviter leur coalescence lors de la croissance. Par cette action, il permet d'améliorer la monodispersité des nanoparticules obtenues.

Cette étape de croissance peut alors être répétée plusieurs fois si nécessaire. Plus la taille finale visée est importante, plus il sera intéressant de multiplier le nombre d'étapes afin de conserver une bonne homogénéité en taille et en forme. A l'aide de ces procédés de synthèse de nanosphères d'or, il est donc possible de produire des nanoparticules allant jusqu'à environ 200nm[119,117] de diamètre avec une très bonne monodispersité (Figure I-7). Ce gain de taille est notamment intéressant pour produire un décalage vers le rouge de la bande plasmon vers 700 nm pour des nanoparticules de 140nm de diamètre (Figure I-8).

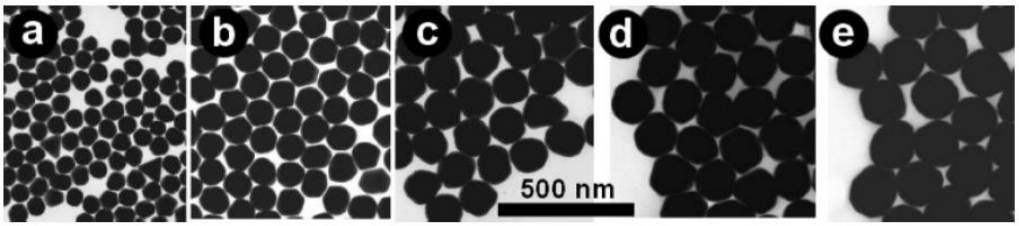
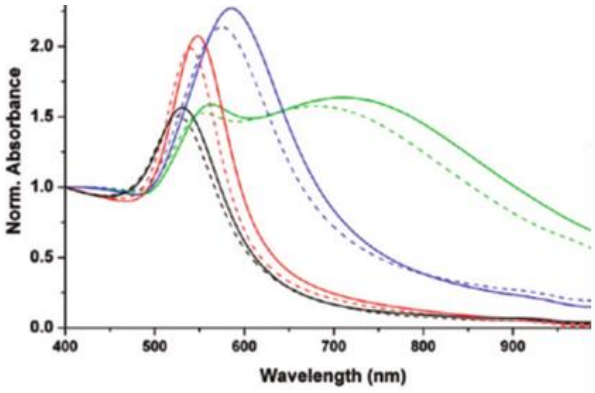


Figure I-7 : Clichés TEM de particules d'or issues d'un protocole de croissance en plusieurs étapes utilisant l'acide ascorbique comme réducteur[120]



Diamètre des nanoparticules :

15,5nm (noir)

60,4nm (rouge)

98,5nm (bleu)

142,8nm (vert)

Figure I-8 : Bandes plasmons de nanoparticules d'or de tailles croissantes issues d'un protocole de croissance en plusieurs étapes utilisant l'acide ascorbique comme réducteur, avant (- -) et après coating (—) avec une couche de silice de 20nm [121]

Toutefois, pour des nanoparticules de grandes tailles (>140nm), on constate une atténuation et un élargissement important de la bande plasmon[119,121] (Figure I-8, courbe verte). En effet, une petite particule sphérique et isotrope se comporte comme un dipôle n'absorbant qu'à une longueur d'onde unique. Ainsi la population absorbera très majoritairement à cette longueur d'onde. Inversement, les nanoparticules de grandes tailles perdent leur sphéricité parfaite et deviennent donc des multipôles absorbant à des longueurs d'ondes multiples. Cette somme d'absorptions se traduit par un massif large et peu intense plutôt qu'en un pic étroit et intense. De plus, l'augmentation de la taille des particules s'accompagne d'une perte progressive de leurs propriétés plasmoniques. En effet, plus le volume de la particule augmente plus les propriétés de l'or tendent vers celles de l'or massif, qui ne possède pas ces propriétés de résonnance plasmonique.

Afin d'obtenir des bandes plasmons plus fines ou davantage décalées vers le rouge, il est nécessaire de modifier la forme des nanoparticules[13] (Figure I-9). De multiples formes ont pu être produites, on peut citer, de manière non exhaustive, les nanobâtonnets, les nanoprismes[122], les nanofleurs[123], les nanoétoiles[124], les nanocubes[125], les nanocages[125,126] ou les nanosphères creuses[127].

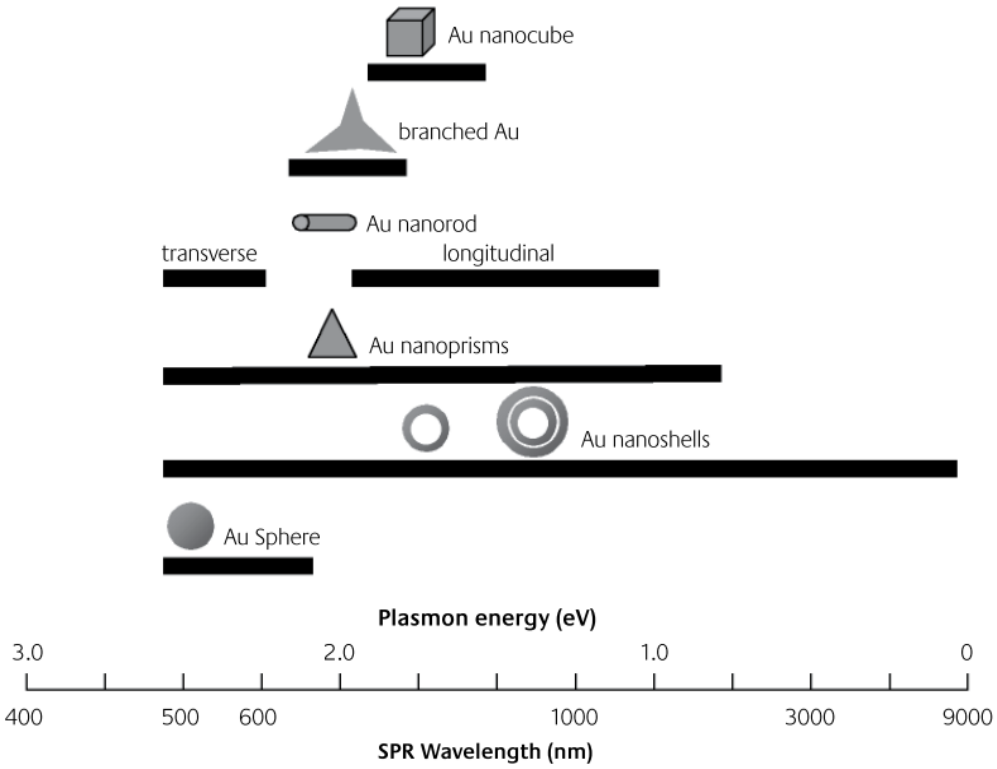


Figure I-9 : Positions des bandes plasmons de nanostructures d'or de différentes formes[86]

Parmi toutes ces formes, les nanobâtonnets[88,94,115,121,128,129] sont les plus largement représentés du fait de leur synthèse, plus simple, et permettant une bonne répétabilité et de bons rendements. De plus, l'ajustement des conditions de synthèse permet de faire varier le rapport d'aspect (noté AR, pour « Aspect Ratio ») des nanobâtonnets (ou « nanorods ») obtenus, ce qui conduit à une grande variabilité des propriétés optiques. Pour rappel, le rapport d'aspect correspond au quotient de la grande longueur par la petite longueur de la structure considérée. Il est donc possible d'obtenir une large gamme d'AR pour les nanobâtonnets d'or, permettant ainsi d'avoir à disposition une large gamme de propriétés, notamment au niveau de leurs bandes plasmons[24].

I.2.4.2. Synthèse de nanorods d'or

Comme nous l'avons vu auparavant, les nanorods peuvent constituer une alternative intéressante pour disposer de structures présentant une bande plasmon largement décalée vers le rouge, par exemple, centrée sur 800nm. Ces propriétés plasmoniques particulières sont fondamentales dans l'idée de pouvoir utiliser ces nanoparticules *in vivo*, compte tenu de la fenêtre de transparence du vivant située vers 800-1000nm. De plus, les nanorods présentent l'avantage d'être aisément synthétisables, avec de bons rendements et une bonne reproductibilité, tout en étant suffisamment résistants pour supporter de nombreuses étapes de synthèses, purification, etc… Ces points, bien

que non déterminants sont également intéressants pour permettre des synthèses de nanostructures complexes en maintenant des rendements corrects.

La synthèse de nanorods est basée sur l'utilisation de germes de très faible taille produits à l'aide de tétraborohydrure de sodium ($NaBH_4$) qui est un réducteur très fort et par l'ajout éventuel de quantités catalytiques de sels d'argent lors de la phase de croissance[88,94,115,121,128,129] . L'ajout de sels d'argent permet d'obtenir de meilleurs rendements et une plus grande homogénéité en taille et en forme pour les nanorods au prix d'une gamme d'AR accessible plus restreinte[19]. Le rôle des différents produits mis en jeu dans cette synthèse a été particulièrement étudié et a fait l'objet de nombreuses hypothèses. A l'heure actuelle, bien qu'un consensus se dégage, il n'y a pas de résultats démontrant avec certitude la validité d'une ou de plusieurs de ces hypothèses. L'hypothèse la plus largement rencontrée est expliquée ci-après.

Afin de comprendre les mécanismes de croissance des rods, il faut tout d'abord définir leur structure. Différentes études[130–132] tendent à démontrer que les rods ont une structure en prisme maclé pentagonal (Figure I-10).

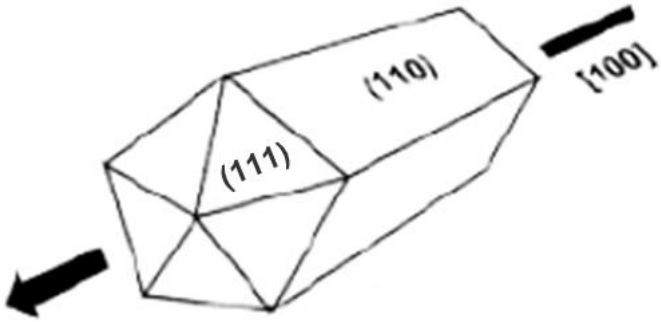


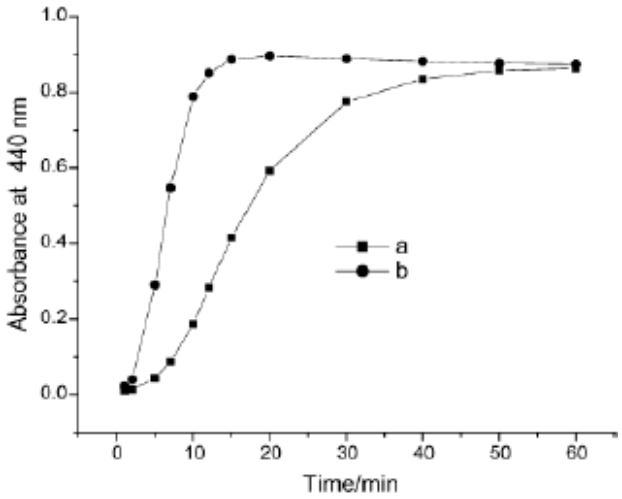
Figure I-10 : Représentation de la structure d'un nanorod[131]

Le mécanisme de croissance en présence d'argent peut ensuite être expliqué comme suit :

Les rôles du CTAB et des ions argent doivent être envisagés de manière commune. En effet, il a été démontré que le complexe [$AgBr_2^-$ + CTA^+] a une très forte affinité pour les nanorods d'or, supérieure à celle du seul CTAB d'environ 50%[118]. Ce complexe dispose d'une affinité importante pour les surfaces d'or, particulièrement pour les surfaces (110) qui constituent les faces allongées des rods. Ce surcroit d'affinité s'explique par l'énergie de surface plus élevée des faces (110) qui rend la fixation d'un tensioactif plus favorable sur ces faces que sur les autres[131].

Ces faces encombrées sont alors moins favorables pour réaliser la croissance, ainsi la croissance des faces terminales se fait préférentiellement selon l'axe [100]. Par ailleurs, une telle inhibition se

traduit également par un ralentissement de la vitesse de croissance en présence de sels d'argent (Figure I-11). La synthèse étant plus lente, cela favoriserait la croissance des faces minimisant le plus l'énergie de surface, c'est à dire les faces sommitales (111)[19,132,133].



Remarque : la mesure d'extinction est effectuée à 440nm, c'est-à-dire à une longueur d'onde où l'extinction n'est affectée que par la concentration en nanoparticules, et pas par la taille des particules.

Figure I-11 : Profil cinétique de la croissance de nanorods d'or dans le CTAB, en présence (a) et en l'absence (b) de sels d'argent[133]

Inversement, la présence d'ions iodures à l'état de traces dans le CTAB va induire la formation d'iodure d'argent AgI, lequel se dépose préférentiellement sur les faces (111) bloquant ainsi la croissance dans cette direction[134,135]. Cette inhibition de la croissance est telle que 50ppm d'ions iodures suffisent pour bloquer la synthèse de nanobâtonnets[134,135]. Le CTAC (chlorure de cétyltriméthylammonium) induit également une réduction de l'AR des nanorods, sans que le mécanisme n'ait été étudié[136]. Par ailleurs, l'absence de CTAB et donc d'ions bromures transforme le caractère « rod-inducer » des sels d'argent en un caractère « sphere-inducer »[116].

Enfin, de nombreuses variantes de cette synthèse ont été étudiées notamment afin de mieux contrôler l'AR. Ainsi des protocoles similaires mais ajoutant de l'hydroxyde de sodium ou de l'heptane ont permis d'obtenir des AR pouvant atteindre 25[19]. Toutefois, les protocoles permettant d'obtenir les meilleures monodispersités limitent la fourchette d'AR atteignables entre 1 et 8. De la même manière, le choix du tensioactif a une grande importance sur l'AR. Ainsi, l'utilisation de tensioactifs de type CTAB mais à plus courte chaîne carbonée ne permet pas d'atteindre des AR aussi élevés que ceux obtenus avec le CTAB[136]. Inversement un mélange CTAB-BDAC (chlorure de benzyldimethylammonium) permet d'obtenir des rods de plus grande taille qu'avec le CTAB seul[129]. Les causes expliquant ces différentes variations ne sont pas clairement identifiées mais une modification du comportement de la couche de tensioactif (notamment sa rigidité) ou bien une affinité préférentielle des tensioactifs alternatifs pour d'autres faces favorisant d'autres directions de

croissance sont les hypothèses le plus souvent proposées[129]. Ces tensioactifs alternatifs étant chlorés, l'impact de ce changement de composition ionique est aussi à envisager.

Enfin, la quantité de sels en solution influe également. Ainsi, une augmentation de la quantité de sels d'or ou de sels d'argent présents en solution permet de décaler la bande plasmon vers le rouge[129]. Toutefois, ces phénomènes ne sont pas linéaires, et l'on constate que pour une augmentation continue de la concentration, le maximum de la bande plasmon se décale vers le rouge, atteint un maximum pour une valeur critique puis se décale vers le bleu (Figure I-12). Nikoobakht *et al* émettent l'hypothèse qu'au-delà de cette valeur critique en sels, la force ionique devient suffisamment importante pour modifier la densité de charge au niveau du CTAB et ainsi lui faire perdre une partie de sa capacité « rod-inducer ». L'ajout de sels dans la solution tels que NaCl, $NaNO_3$ ou NaBr conduit également à ces mêmes résultats[128].

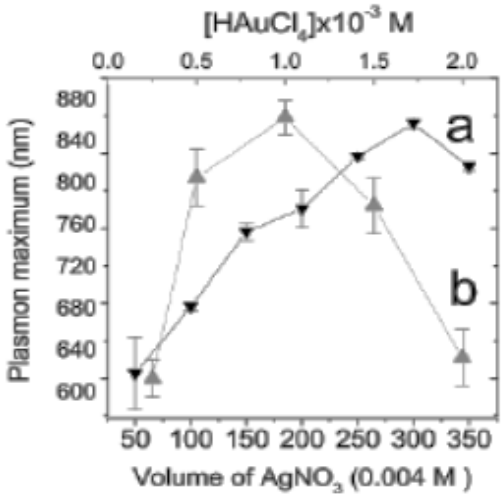


Figure I-12 : Variation du maximum d'absorption de la bande plasmon en fonction de la concentration en sel d'argent (a) ou d'or (b)[129]

Le mécanisme de croissance en l'absence d'argent n'est pas connu avec certitude. L'hypothèse la plus largement admise est celle du mécanisme de « zipping »[128,136]. Ce mécanisme s'explique de la manière suivante (Figure I-13) :

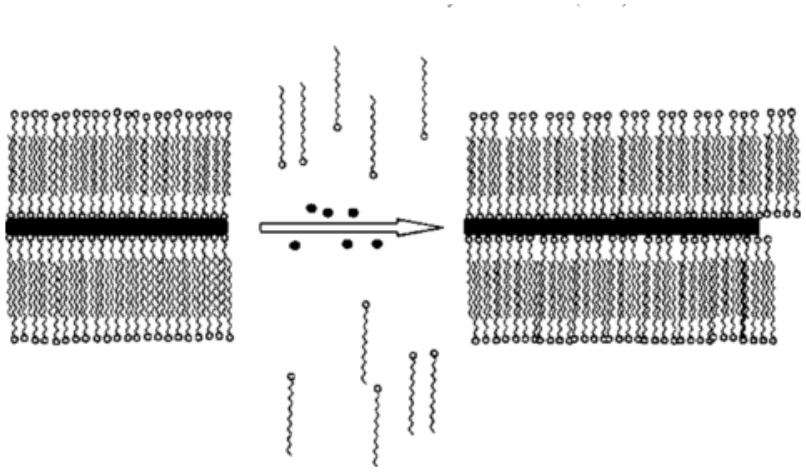


Figure I-13 : Représentation schématique du mécanisme de « zipping »[136]

Durant l'apparition des nanoparticules, des faces présentant une plus grande affinité pour le CTAB apparaissent. Elles vont alors servir de support pour la formation de bicouches de CTAB. Le CTAB (ou d'autres tensioactifs dont le côté hydrophobe est plus marqué) va permettre de former des bicouches particulièrement stables et favorables à une élongation unidirectionnelle de la micelle. La direction de croissance des nanoparticules « capturées » par ces micelles va alors être dictée par les micelles déjà en place en amont de la zone de croissance des particules, en imposant aux sels d'or une approche par les faces sommitales des rods.

I.2.5. Conclusions

Cette partie a permis de présenter les nombreuses propriétés des nanoparticules d'or et différentes méthodes pour parvenir à produire ces nanoparticules en contrôlant précisément ces propriétés. Les nanoparticules d'or peuvent ainsi être considérées comme un excellent complément fonctionnel, permettant, par couplage à d'autres types de nanoparticules, d'obtenir des systèmes multiplexés pour l'imagerie ou la thérapie.

Toutefois pour parvenir à la réalisation de tels nanohybrides, il est nécessaire de comprendre les mécanismes physico-chimiques qui régissent les interactions entre nanoparticules.

I.3. Propriétés des suspensions colloïdales de nanoparticules

I.3.1. Définition de l'état colloïdal

La dispersion de particules dans un liquide permet d'obtenir une suspension, instable thermodynamiquement, à cause des phénomènes de sédimentation ou d'agrégation. Inversement, la dispersion de molécules dans ce même liquide permet d'obtenir une solution, stable thermodynamiquement. On voit ainsi, par cette opposition que la taille des objets dispersés fixe un certain nombre de propriétés de ce mélange. Ainsi, la question de l'évolution des propriétés d'une dispersion de particules en fonction de leur taille a été largement étudiée.

L'effet de la diminution en taille des particules se manifeste principalement au niveau du mouvement brownien. En effet, d'après la formule d'Einstein décrivant le mouvement brownien, le coefficient de diffusion D d'une particule dans un fluide s'exprime de la manière suivante :

$$D = \frac{k_B.T}{6\pi\eta r}$$

Avec k_B la constante de Boltzmann, η la viscosité dynamique du liquide et T la température. On constate donc que le mouvement Brownien des nanoparticules augmente de manière inversement proportionnelle au rayon des nanoparticules. Ce faisant, en deçà d'un diamètre de 1µm, on considère que cette agitation thermique devient suffisante pour compenser la sédimentation résultant de la force de gravité et caractérisant les suspensions « classiques ». Ces dispersions possédant des propriétés différentes des suspensions « classiques », elles sont qualifiées de suspensions colloïdales. Ces suspensions se caractérisent par une stabilité importante dans le temps. Cependant, cette stabilité est essentiellement cinétique et la suspension pourra évoluer. Les particules dispersées peuvent alors être qualifiées de colloïdes. Il est à noter que cette définition peut être élargie à de nombreux autres systèmes biphasiques comme, par exemple, les émulsions, les aérosols ou les mousses.

De plus, pour des particules sphériques, la réduction de leur rayon r, à masse égale m, entraîne une augmentation de la surface spécifique des particules ($A_{spé}$) de la manière suivante, avec r le rayon des particules, n le nombre de particules et ρ la masse volumique de ces particules:

$$A_{spé} = \frac{A}{m} = \frac{n.4\pi r^2}{n.\frac{4}{3}\pi r^3\rho} = \frac{3}{r\rho}$$

Cette diminution en taille des particules et cette forte augmentation de la surface spécifique de l'échantillon vont se manifester au niveau des forces d'attraction et de répulsion à l'œuvre entre particules. En effet, de multiples forces de surface sont en action entre les surfaces des particules. Compte tenu de la surface spécifique très importante des nanoparticules, l'effet de ces forces est magnifié de sorte qu'il doit être étudié en détail afin de bien comprendre les équilibres en jeu. La partie suivante présentera les principales forces mises en jeu, leurs propriétés et les théories utilisées pour calculer la résultante de ces différentes forces et les conséquences de cet équilibre sur la stabilité des suspensions colloïdales.

I.3.2. Forces coulombiennes

Les forces coulombiennes sont des forces s'appliquant entre les charges de surface des différentes particules. Pour deux particules de même nature (donc de même charge de surface), cette force induira une répulsion entre les particules. Toutefois, pour étudier ce phénomène dans une solution électrolytique (comme le sont les solutions aqueuses), il est important de tenir compte de l'influence des charges de surface des particules sur leur environnement proche. En effet, ces surfaces ionisées vont naturellement attirer les ions de charges opposées (aussi appelés contre-ions) et repousser les ions de même charge. Différents modèles ont été développés pour modéliser cette distribution de charge.

I.3.2.1. Modèles de distribution du potentiel électrostatique dans l'environnement d'une particule chargée

Le premier modèle développé pour modéliser la distribution de charge est le modèle d'Helmholtz. Dans ce modèle, la répartition de charge se fait selon deux plans parallèles : le premier plan constituant la surface de la particule et le second plan étant constitué de contre-ions adsorbés à la surface (Figure I-14a). Ce modèle est très similaire à celui d'un condensateur et on peut donc écrire que le potentiel électrostatique décroit linéairement avec la distance. Ce modèle simple ne tient en revanche pas compte de l'agitation thermique, ce qui le rend approximatif.

Dans un esprit de simplification, les schémas des différents modèles sont représentés sous la forme de surfaces planes chargées positivement. La distribution de charges correspondante est donnée sur la Figure I-14.

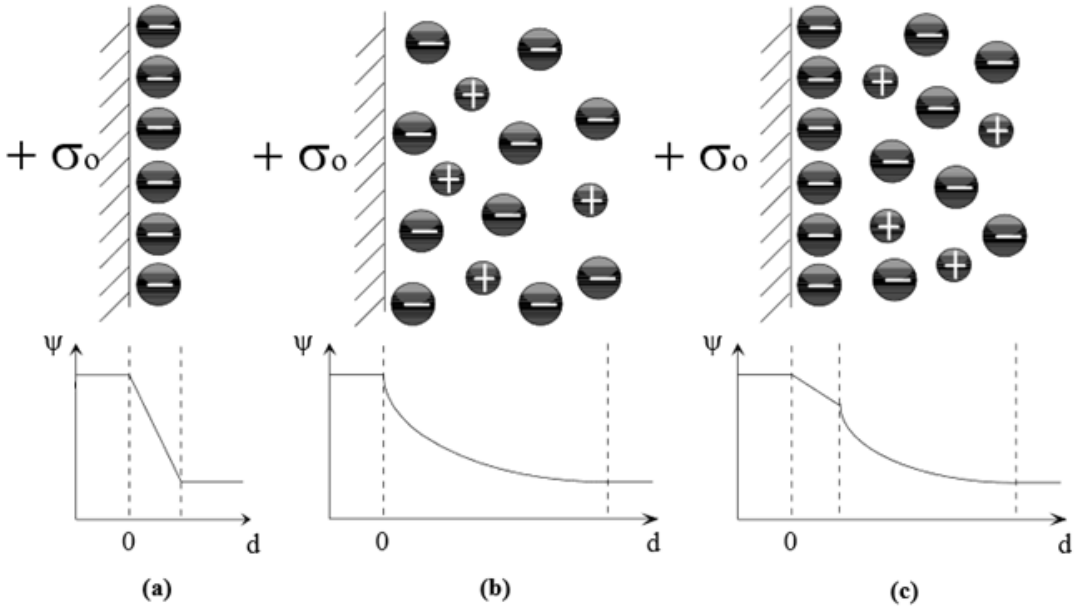


Figure I-14 : Représentation des distributions de charge au voisinage de surfaces chargées positivement, de charge $+\sigma_0$ avec l'évolution du potentiel électrostatique en fonction de la distance pour les modèles d'Helmholtz (a), Gouy-Chapman (b) et Stern (c)[137]

Comme alternative à ce modèle, Gouy et Chapman ont proposé un modèle tenant compte de cette agitation thermique. Dans ce modèle, le potentiel électrostatique décroit exponentiellement avec la distance en suivant l'équation de Poisson-Boltzmann (Figure I-14b). Cependant, pour parvenir à ce modèle, Gouy et Chapman considèrent les ions comme ponctuels et le solvant comme un continuum. Or ces hypothèses ne peuvent pas être satisfaisantes à très grande proximité des surfaces. Une traduction physique de cette limite est l'absence de couche de contre-ions parallèlement à la surface chargée.

Afin de résoudre ce problème, Stern proposa de combiner ces deux modèles en un seul, aboutissant à un modèle en double couche. La première couche, nommée couche de Stern, est une couche dense en contre-ions, identique à la couche du modèle d'Helmholtz (Figure I-14c). La décroissance du potentiel électrostatique avec la distance est linéaire dans ce domaine. La seconde couche, nommée couche diffuse, permet de tenir compte de la notion d'agitation thermique, et se traduit, comme dans le modèle de Gouy-Chapman par une décroissance exponentielle du potentiel électrostatique avec la distance. Ce modèle de Stern, bien qu'approximatif, est largement utilisé pour décrire les phénomènes électrostatiques en solution. Il existe cependant des modèles plus avancés, faisant notamment intervenir les phénomènes d'hydratation et introduisant des couches supplémentaires pour décrire le système. Le modèle de Stern-Grahame peut par exemple être évoqué ici. Toutefois,

compte tenu de l'efficacité suffisante du modèle de Stern, ces modèles plus complexes ne seront pas abordés ici.

Le calcul des valeurs de potentiel électrostatique pour le modèle de Stern et de Gouy-Chapman nécessite de résoudre l'équation de Poisson - Boltzmann. Cette équation n'ayant pas de solution générale, des approximations sont nécessaires à sa résolution. Ainsi, pour des cas de nanoparticules où les potentiels électrostatiques ψ sont faibles (<50mV), et l'énergie liée à l'agitation thermique supérieure à l'énergie électrique (approximation de Debye-Hückel), on peut obtenir une expression de la forme :

$$\psi = \psi_0 \frac{r}{d} . \exp(-\frac{d-r}{\kappa^{-1}})$$

$$\text{avec } \kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\varepsilon_r k_B T}{e^2 . \sum C_i z_i^2}} = \sqrt{\frac{\varepsilon_r k_B T}{2e^2 . N_A C}} \text{ pour un sel monovalent (NaCl)}$$

Avec k_B la constante de Boltzmann, T la température, e la charge élémentaire, ψ le potentiel électrostatique, ε_r la permittivité diélectrique de la solution, z la valence des ions, N_A le nombre d'Avogadro, C la concentration molaire en électrolytes (ou force ionique), r le rayon des particules et d la distance à la particule chargée. Sans rentrer dans le détail du calcul, il est intéressant de noter que la résolution de cette équation fait apparaître un paramètre important : la longueur de Debye, notée κ^{-1} et dépendant, pour un électrolyte donné, uniquement de la force ionique du milieu.

On peut ensuite, à partir de cette équation modélisant le potentiel, approximer l'énergie potentielle d'interaction (E) entre deux particules chargées. Différentes méthodes mathématiques permettent de résoudre approximativement l'équation. On peut alors retrouver une équation simplifiée, sous la forme suivante, pour décrire le comportement entre deux particules identiques[138] :

$$E = 32\pi\varepsilon_r r . \left(\frac{k_B T}{e}\right)^2 . \left(\tanh \frac{ze\psi_0}{4k_B T}\right)^2 . \exp(-\kappa d)$$

Dans le cas de sphères de diamètre différents, r doit être remplacé par l'expression $r_1 r_2/(r_1+r_2)$ avec r_1 et r_2, les rayons respectifs des deux sphères. On pourra également tenir compte de la présence d'électrolytes multivalents par l'emploi du facteur multiplicatif suivant :

$$X = \frac{C_{Tot}}{\sum_i C_i {z_i}^2}$$

avec C la concentration en ions et z la valence des ions.

I.3.2.2. Aspect pratique du modèle de la double couche : la mesure du potentiel zêta

On l'a vu, toute particule chargée en solution dispose d'une double couche électrolytique constituée de la couche de Stern et d'une couche diffuse. La couche de Stern étant intimement liée à la particule, la couche d'ions est solidaire de la surface chargée lors du mouvement de la particule dans le solvant. En revanche, la couche diffuse est moins liée à la surface des particules et est ainsi exposée aux forces de frottement issues de la viscosité du solvant. Par conséquent, lors des déplacements des particules en solution, un gradient de vitesse se crée dans l'environnement extérieur de la couche de Stern. Ce gradient va se traduire physiquement par l'existence d'un plan de cisaillement dont la valeur de potentiel est notée ζ (Figure I-15). Pour des systèmes simples, le plan de cisaillement est situé à grande proximité de l'interface entre les deux couches. On a donc $\zeta \approx \psi_S$, avec ψ_S le potentiel de Stern (Figure I-15). En revanche, pour des systèmes plus complexes, notamment dans le cas de particules fonctionnalisées par des polymères, ce plan de cisaillement est moins net et repoussé à plus grande distance de l'interface. Dans ce cas, $\zeta << \psi_S$.

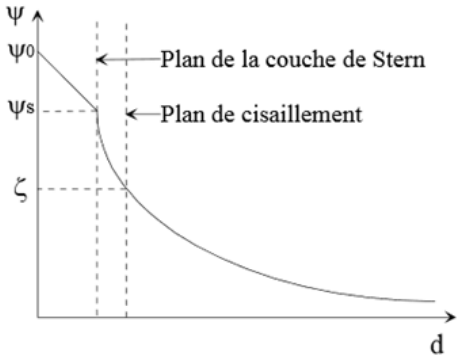


Figure I-15: Evolution du potentiel électrostatique en fonction de l'éloignement à la surface[137].

La valeur du potentiel zêta d'une particule peut être obtenue expérimentalement par mesure de la mobilité électrophorétique de cette particule dans un champ électrique. On a alors deux cas possibles en fonction de la valeur du produit du rayon des particules R par l'inverse de la longueur de Debye κ.

Lorsque le rayon des particules est petit devant la longueur de Debye (κR petit), on obtient l'équation de Hückel :

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon_r \zeta}{3\eta}$$

Lorsque le rayon des particules est grand devant la longueur de Debye (κR grand), on obtient l'équation de Helmholtz-Smoluchowski :

$$\mu_e = \frac{\varepsilon_r \zeta}{\eta}$$

avec μ_e la mobilité électrophorétique, ζ le potentiel zêta, ε_r la permittivité diélectrique de la solution et η la viscosité cinématique de la solution.

Les valeurs limites pour κR ne sont pas définies précisément. Selon les auteurs[137,139,140], les seuils bas oscillent entre 0,1 et 0,5 et les seuils hauts entre 20 et 300. Le calcul du potentiel zêta étant sujet à diverses hypothèses de calcul, cette grandeur a surtout un rôle qualitatif. Il permettra ainsi, principalement, de déterminer le signe de la charge de surface des colloïdes et la stabilité potentielle de la suspension colloïdale. En effet, on estime que des particules dont le potentiel dépasse 30mV (en valeur absolue) présentent une bonne stabilité en solution. Toutefois, la réciproque n'est pas vérifiée et des structures telles que des liposomes ou des colloïdes pegylés peuvent présenter des potentiels ζ nettement inférieurs à 30mV en valeur absolue tout en présentant des stabilités satisfaisantes à long terme.

D'un point de vue expérimental, pour déterminer le potentiel zêta, on peut mesurer la vitesse électrophorétique v_e ($\mu_e = v_e/E$). La plupart des appareils commerciaux sont basés sur une mesure de cette vitesse au moyen de l'effet Doppler. Les particules sont donc mises en mouvement entre deux électrodes sous l'effet d'un champ électrique puis on mesure ensuite le décalage entre la fréquence du laser source et la fréquence du laser après diffusion par les particules. L'utilisation pratique d'un tel appareil est décrite en annexe 1.

Compte tenu de l'influence des électrolytes, le pH joue également un rôle prépondérant qui doit être pris en compte, notamment lors des comparaisons entre différents échantillons. On peut par ailleurs, dans le cas de particules, utiliser une mesure de potentiel ζ selon une gamme de pH pour déterminer le point isoélectrique de ces particules, point pour lequel on observe ζ=0mV.

I.3.2.3. Forces de Van der Waals

Les forces de Van der Waals sont des forces attractives décrivant les interactions entre molécules. Dans le cadre de cette théorie, les molécules sont alors considérées comme des dipôles, pouvant être permanents ou induits. On peut alors rencontrer trois types d'interactions (Tableau I-3) :

Forces	Dipôles mis en jeu	Expression de l'énergie d'interaction
Keesom	Permanent – Permanent	$E_K = -\frac{\mu_1^2 \mu_2^2}{3.(4\pi\varepsilon_o)^2.k_B T.d^6}$
Debye	Permanent – Induit	$E_D = -\frac{\alpha_{e2}\mu_1^2 + \alpha_{e1}\mu_2^2}{(4\pi\varepsilon_o)^2.d^6}$
London	Induit – Induit	$E_L = -\frac{3\Delta.\alpha_{e1}\alpha_{e2}}{4(4\pi\varepsilon_o)^2.d^6}$
Total VdW		$E_{VdW} = E_K + E_D + E_L = -\frac{C}{d^6}$

Tableau I-3 : Tableau récapitulatif des forces de Van der Waals

avec μ le moment dipolaire, ε_0 la permittivité électrique du vide, k_B la constante de Boltzmann, T la température, d la distance interdipoles, α_e la polarisabilité électronique et Δ l'énergie d'extraction d'un électron.

On pourra également noter que la somme des forces de Van der Waals ne dépend que de la distance interdipoles, C étant une constante.

Les valeurs de ces interactions varient nettement d'un système à l'autre, toutefois, pour des particules dont la surface présente une polarisation permanente, on retrouve généralement $E_K > E_L$.

Ces différentes interactions étant calculées pour des dipôles et non pour des particules, il est nécessaire d'intégrer ces interactions sur l'ensemble de la surface des nanoparticules.

On obtient alors, dans le cas de deux sphères, une énergie totale s'exprimant sous la forme[137,139,140] :

$$E_{Tot} = \frac{A}{6d}.\frac{r_1 r_2}{r_1 + r_2}$$

Avec r le rayon d'une particule, A la constante d'Hamaker, telle que $A = \pi^2 C.q_1 q_2$ et q le nombre d'atomes par unité de volume.

Ainsi, pour deux particules identiques, on obtient une énergie de la forme suivante :

$$E_{Tot} = \frac{C(\pi q)^2 r}{12d}$$

I.3.2.4. La théorie DLVO

La théorie DLVO, développée par Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek[141,142] vise à décrire le comportement de particules colloïdales en interaction en fonction de la distance d les séparant. Pour parvenir à cette description, cette théorie réalise les hypothèses suivantes :

- Les seules forces en présence sont les forces d'attraction de Van der Waals et les forces de répulsion coulombiennes.

- Ces forces sont additives et on peut donc écrire : $E_{tot} = E_{VdW} + E_{Cb}$

De manière simplifiée, on pourra alors écrire, pour deux particules identiques :

$$E_{tot} = \frac{K_{VdW}}{d} + K_{Cb}e^{-\kappa d}$$

On constate alors une différence importante opposant les forces, attractives, de Van der Waals aux forces, répulsives, coulombiennes. En effet, lorsque la distance d augmente, les forces coulombiennes décroissent de manière exponentielle alors que les forces de Van der Waals décroissent de manière hyperbolique. Ainsi, on obtient un profil général (Figure I-16) pour l'énergie totale d'interaction quels que soient les valeurs des facteurs K_{VdW} et K_{Cb}. On peut également noter le rôle prépondérant de la force ionique (au travers de la longueur de Debye κ^{-1}).

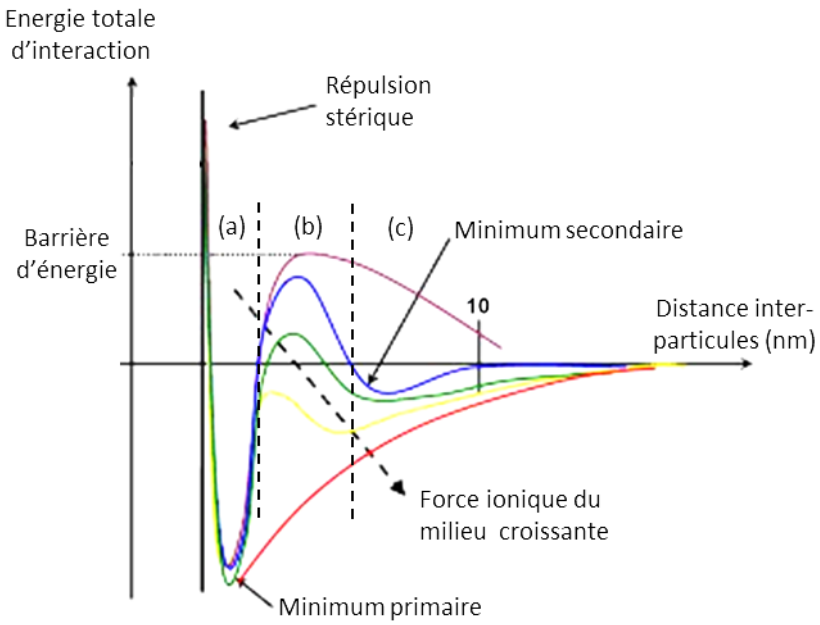


Figure I-16 : Evolution de l'énergie d'interaction de deux particules en fonction de la distance les séparant[143].

On peut ensuite remarquer que l'énergie totale change à plusieurs reprises de signe. Pour des valeurs positives, on constatera une répulsion entre particules et une attraction pour des valeurs négatives. On constate également le rôle de la force ionique du milieu de dispersion dans l'attraction des particules entre elles. Par ailleurs, on remarque la présence de deux minima séparé par une barrière d'énergie ou d'un seul minimum lorsque le milieu est de forte force ionique.

On peut ainsi distinguer trois zones (notées a, b et c) : ce découpage permet d'expliquer différents comportements colloïdaux. Le minimum secondaire (c) est une zone où l'attraction est favorisée, aboutissant à la formation de structures agrégées. Compte tenu de la faible profondeur de ce puits de potentiel, ces agrégats sont faciles à briser, avec un faible apport d'énergie, permettant de reformer, réversiblement, des particules isolées. D'un point de vue structurel, ces agrégats vont présenter une structure mésooporeuse avec des distances interparticules comprises entre 5 et 10nm, comme on peut le constater sur la Figure I-16. On remarque que ce puits de potentiel est très sensible à la force ionique et peut ainsi disparaître très facilement, avec l'augmentation de la force ionique.

Le minimum primaire (a) constitue, quant à lui, un puits de potentiel de grande profondeur. En conséquence, quand des particules se rapprochent jusqu'à des distances de l'ordre de 0,5 nm, l'attraction entre particules devient suffisante pour provoquer la formation d'agrégats très stables. Dans ces conditions, la redispersion des particules n'est plus possible et cette agrégation est donc irréversible. Ce puits de potentiel est très peu affecté par les paramètres environnementaux, notamment la force ionique.

Enfin, le maximum local que constitue la barrière d'énergie explique quant à lui les propriétés spécifiques des suspensions colloïdales. En effet, ce pic représente la quantité d'énergie à fournir au système pour qu'il retombe dans un état où l'agrégation sera favorisée. Ainsi, plus sa valeur sera élevée plus le système sera stable. On remarquera l'influence de la force ionique sur la valeur de ce pic.

En conclusion, la théorie DLVO permet de bien expliciter le rôle des différentes forces dans la stabilité colloïdale ainsi que l'influence de la force ionique dans ces systèmes. Toutefois, les hypothèses sur lesquelles elle est basée font que cette théorie est insuffisante dans certaines conditions, notamment à courte distance. L'hypothèse sur les forces en présence peut ainsi être prise en défaut et a nécessité le développement d'une théorie tenant un compte plus détaillé des forces à l'œuvre: la théorie DLVO étendue (ou théorie X-DLVO).

I.3.2.5. La théorie DLVO étendue

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la théorie DLVO, de par sa simplicité, omet différentes forces qui peuvent jouer un rôle prépondérant. A grande distance, les hypothèses de la théorie DLVO sont suffisantes pour décrire les systèmes colloïdaux.

En revanche, les calculs sur lesquels sont basées les forces de Van der Waals et coulombiennes font l'hypothèse de milieux continus, caractérisés par des propriétés de volume. Or, pour de faibles longueurs, le système ne peut plus se baser sur cette simplification et doit tenir compte de la nature discrète de la matière (i.e. la répartition des ions et molécules de solvant). Ce changement implique la prise en compte de nouvelles forces, qui seront nommées forces non-DLVO qu'il faudra ajouter au bilan des forces de la théorie DLVO.

I.3.2.5.1. Les forces de Born

Les forces de Born sont des forces répulsives de grande proximité qui s'opposent à l'interpénétration des nuages électroniques. On parle également de répulsion stérique dans ce cas. Compte tenu de l'origine de cette force, on considère qu'elle est négligeable au-delà de 0,5-1nm. Il n'existe aucune équation générale à même de décrire cette force, seuls des modèles empiriques sont utilisés. Compte tenu de leur grand nombre, ils ne seront pas évoqués ici.

I.3.2.5.2. Les forces de solvatation

On considèrera ici le cas de l'eau. Il s'agit de forces de très courte portée en lien avec la structure des molécules d'eau directement à l'interface avec la particule. En effet, cette couche d'hydratation présente une structure ordonnée sur une épaisseur de quelques molécules. Cette organisation maximise la formation de liaisons faibles, ce qui rend cette couche d'hydratation favorable. Ainsi lorsque les couches d'hydratation de deux particules s'interpénètrent, les molécules sont contraintes et le nombre de liaisons possibles diminue. Par conséquent, la déformation de ces couches est défavorable énergétiquement. Physiquement, cela se traduit par une répulsion entre particules.

A l'inverse, pour des particules présentant des surfaces hydrophobes, les molécules d'eau n'interagissent pas ou peu avec la surface, ne formant aucune couche d'hydratation organisée. Cette répulsion sera donc absente. De plus, dans le cas de surfaces hydrophobes, l'exclusion des molécules d'eau entre deux surfaces hydrophobes est favorisée puisqu'elle permet de minimiser les énergies de surface. Cet efflux de solvant va donc produire une force attractive rapprochant les particules hydrophobes.

I.3.2.5.3. Conséquences des forces non DLVO

Le bilan des forces non DLVO tend à aboutir à une force totale répulsive entre particules. Ce qu'apporte la théorie DLVO étendue par rapport à la théorie DLVO classique n'est visible qu'à très faible portée (≈1nm) et explique ainsi pourquoi un agrégat compact de nanoparticules n'évolue pas, par effondrement, vers une particule unique. L'agrégat est stable mais à l'échelle nanométrique chacune des particules le composant conserve sa structure.

I.3.3. Conclusions

Cette partie a cherché à montrer le large nombre de paramètres à même d'influer sur la stabilité de ces suspensions colloïdales. Par la suite, chaque étape de chimie ou de purification sera à même de perturber ces équilibres, provoquant ainsi une agrégation potentiellement irréversible. Il est ainsi fondamental de garder à l'esprit la complexité des mécanismes à l'œuvre pour appréhender la spécificité et les limites cachées derrière la fonctionnalisation et la purification des suspensions colloïdales.

De la même manière, la mise en contact de différentes nanoparticules entre elles pour réaliser des nanohybrides multifonctionnels va également être régie par ces mêmes paramètres.

I.4. Fonctionnalisation des nanoparticules inorganiques

L'utilisation de nanoparticules nécessite souvent l'ajout de nouvelles fonctionnalités chimiques pour garantir leur stabilité, pour synthétiser des nanoparticules hybrides ou pour de nombreuses applications comme la vectorisation. A ce titre, la fonctionnalisation des nanoparticules a été largement étudiée.

Ainsi, la fonctionnalisation de surface des nanoparticules permet d'introduire de nouvelles fonctions chimiques à la surface des nanoparticules, fonctions qui peuvent soit favoriser la répulsion électrostatique ou stérique, soit permettre le greffage de molécules notamment de biomolécules pour le ciblage ou la formation de nanoparticules hybrides stables. La fonctionnalisation des nanoparticules inorganiques est à l'interface de deux pans de la chimie : la chimie inorganique qui va permettre de lier durablement des fonctions chimiques simples à la surface de ces nanoparticules et la chimie organique qui va permettre d'accéder à une chimie à façon, afin de faire le lien entre les biomolécules et ces surfaces inorganiques.

De fait, cette partie s'articulera sur cette même division avec une première partie sur la fonctionnalisation de surface des nanoparticules inorganiques puis une seconde partie sur les réactions de couplage pouvant être mises en jeu pour greffer des molécules d'intérêt sur ces surfaces. Enfin, une dernière partie présentera le détournement de ces différentes chimies pour réaliser le couplage, non plus de molécules, mais de nanoparticules entre elles.

Un grand nombre de protocoles décrits sont des extrapolations directes de protocoles de chimie de surface classiques. Toutefois, la nature colloïdale de la surface à fonctionnaliser va ajouter deux contraintes additionnelles à ces protocoles. Tout d'abord, la purification de ces échantillons est plus complexe que pour de simples surfaces. En effet, il est simple de retirer un échantillon macroscopique d'un milieu de réaction liquide pour ensuite le laver. Dans le cas de nanoparticules, la purification est plus complexe. Deux solutions sont envisageables. La première consiste à culoter les nanoparticules, soit par centrifugation, soit au moyen d'aimants si les nanoparticules sont magnétiques afin d'ôter le milieu de réaction pour ensuite les redisperser dans un nouveau milieu. La seconde possibilité est d'utiliser des membranes pour purifier la dispersion de nanoparticules, soit par filtration, soit par dialyse. Ensuite, le second problème réside dans l'agrégation des nanoparticules au cours des étapes de réaction et de purification. Ce problème de perte de stabilité de la suspension colloïdale est le plus souvent le point clé à maitriser afin de parvenir à une fonctionnalisation efficace et il conviendra de le garder à l'esprit tout au long de ce travail.

Du point de vue cinétique, la courbure des surfaces des nanoparticules peut influer sur la cinétique de fonctionnalisation des particules de très petites tailles[144]. Ainsi, pour des particules de moins de 4-5nm de diamètre, on pourra effectivement constater un taux de greffage supérieur à celui d'une surface plane. A l'inverse, pour des nanoparticules de grandes dimensions, les différences entre surfaces courbes et planes sont plus limitées voire négligeables.

I.4.1. Fonctionnalisation de surface des nanoparticules inorganiques

Dans le cadre de la fonctionnalisation de surface de nanoparticules inorganiques, on peut distinguer plusieurs types de matériaux différents, chacun présentant des solutions différentes en termes de chimie : les métaux, les oxydes et les autres composés. Cette partie suivra ce même enchaînement. Nous n'aborderons pas ici le cas des nanoparticules organiques.

Malgré les différences de chimie, les molécules utilisées pour ces fonctionnalisations vont présenter une structure générale (Figure I-17) commune en trois segments qui peut explicitée ainsi : une

fonction d'accroche, un espaceur et une fonction terminale qui permettra de développer une chimie de surface ultérieure.

Figure I-17 : Structure générale d'une molécule de fonctionnalisation

La fonction d'accroche va être choisie en fonction de la nature des matériaux des nanoparticules et plus particulièrement en fonction de leurs états de surface comme par exemple la présence ou l'absence d'oxyde. L'espaceur quant à lui va jouer un rôle important au niveau de l'accessibilité de la fonction terminale mais aussi, parfois, au niveau de l'organisation des molécules. Un exemple typique, largement décrit, réside dans la formation de monocouches auto-assemblées de ligands présentant un espaceur de type alcane. Cet exemple sera développé dans la suite de cet exposé. Il est important de noter que l'espaceur tout comme la fonction terminale peut avoir un rôle important dans la stabilité colloïdale. Ainsi l'ajout de PEGs en surface des nanoparticules est connu pour favoriser la stabilité des nanoparticules dans les solvants polaires. Enfin, parmi les fonctions terminales les plus couramment utilisées, on peut citer les fonctions amines[27,29,31–33,35,77,88,145–156], carboxyliques[33,145,157–161], azotures[152,162–164], maléimides[45,156,165,166], thiols[34,35,167], phosphonyles[35,168], alcynes[157,160,169–171], epoxydes[153,154,172,173] ou bien des chaînes aliphatiques terminées par une biotine[29,31,33].

I.4.1.1. Fonctionnalisation de surface des nanoparticules métalliques

Cette partie abordera le cas des nanoparticules métalliques présentant une surface de nature métallique. Les cas des métaux avec une couche d'oxyde natif en surface ou intégralement constitués d'oxydes seront abordés dans la partie suivante.

L'utilisation de métaux sous forme de nanoparticules est principalement liée aux propriétés spécifiques de ces métaux à ces faibles échelles de tailles. Ainsi, comme nous l'avons abordé dans la partie portant sur les nanoparticules d'or, ces nanoparticules métalliques peuvent présenter des propriétés plasmoniques et thérapeutiques qui seront utilisées, notamment, dans le domaine biomédical et des surfaces spécifiques importantes, utiles en catalyse par exemple. On retrouvera ainsi un petit nombre de métaux concernés, à même de présenter ces propriétés : principalement l'or, l'argent et certains métaux du groupe du platine. Ces métaux présentent pour la plupart une grande inertie chimique. Cette stabilité rend plus difficile la formation de liaisons métal-hétéroatome stables en milieu aqueux. On retrouve alors un nombre limité de fonctions chimiques à même de se

lier à la surface de ces métaux, notamment les ligands thiolés (ou leurs formes oxydées disulfures) et aminés. La fonction thiol [45,88,145–151,157,158,162–167,174–181] est plus couramment rencontrée que la fonction amine[168,170,182,183]. En effet, l'énergie d'une liaison R-S-Au est estimée à environ 120-160kJ/mol[144,180], ce qui est très supérieur aux 33kJ/mol[184] d'une liaison R-N-Au. Certains auteurs privilégient l'utilisation de ligands possédant plusieurs fonctions terminales identiques afin de rendre cette liaison plus stable[33,147,151,161,166,174–178,183]. Ces ligands peuvent avoir une structure polymérique ou être simplement polydentates.

A partir de ces différentes fonctions d'accroche, différents types d'espaceurs peuvent être rencontrés. Il peut s'agir de molécules de petite taille mettant en jeu de courtes chaînes carbonées afin de relier les différentes fonctions de la molécule. On peut citer par exemple la cysteamine[145,146,148,149], l'éthylènediamine[170] ou l'acide mercaptopropanoïque[145,185]. Des chaînes carbonées plus longues telles que l'acide 11-mercapto-undecanoïque[88,158], le 11-amino-1-undecanethiol[150] (ou 11-mercaptoundecylamine) ou l'acide lipoïque[165,166] peuvent également être utilisées. Il a pu être démontré, sur des surfaces 2D, qu'une chaîne carbonée de longue taille (plus de 10 atomes de carbone) accroit la stabilité de la monocouche[144] par rapport à des chaînes carbonées courtes. Des molécules aux structures de plus grande taille comme des dendrimères[147,167,185], des polymères[45,100,151,157,181,186] ou des brins d'ADN modifiés chimiquement par des fonctions amines ou thiols[177,178,187,188] peuvent également être employées.Enfin, la fonction d'espaceur peut être assurée par un assemblage à une échelle supramoléculaire. Une couche de silice pourra, par exemple, jouer un tel rôle d'espaceur entre fonctions d'accroche et fonctions de terminaison[121,181,189,190]. On peut également remarquer que ces différentes solutions peuvent être couplées les unes aux autres[145,185].

I.4.1.2. Fonctionnalisation de surface des nanoparticules d'oxydes

Les particules constituées d'oxydes sont largement rencontrées, qu'il s'agisse de particules intégralement constituées d'oxydes ou de particules oxydées en surface. Hormis la silice, on peut citer le cas des oxydes d'aluminium, de fer, de titane, de niobium, de zinc, etc… Un point important à prendre en compte dans le cas des oxydes est que la nature chimique de la surface peut varier selon son hydratation ou le pH du milieu. Par exemple, une surface métallique oxydée pourra présenter des liaisons M-O-M, M-O-H ou M-O^-. La présence prédominante de telle ou telle forme pourra favoriser ou réduire la fixation de ligands sur la surface des particules. Par exemple, la réaction entre oxydes et silanes nécessite la présence de liaisons O-H en surface de l'oxyde pour que la réaction puisse avoir lieu de manière optimale. Il est donc parfois nécessaire de traiter la surface au préalable.

Dans l'exemple ci-avant, un traitement acide des nanoparticules permettra de régénérer des liaisons O-H en surface.

Une première voie de fonctionnalisation est basée sur l'utilisation de ligands comportant une fonction carboxylate ou phosphonate. Les ligands de type phosphonate ont ainsi été utilisés pour stabiliser des nanoparticules d'oxydes d'aluminium[191], de fer[40,41,159,160,171,192,193] , de zirconium[191,194], de titane[77,191,195,196], de zinc[197] ou de terres rares[198]. Les ligands carboxylates sont également utilisés, notamment pour stabiliser les oxydes de fer[193,199]. Toutefois, la stabilité de la liaison M-O-C est inférieure[192,193] à celle de la liaison M-O-P. Cette stabilité supplémentaire peut s'expliquer, au moins en partie, par la nature tridentate des fonctions phosphonates[192–194] et seulement bidentate pour les fonctions carboxylates.

Une autre voie possible est d'utiliser des silanes comme ligands. Toutefois, la stabilité, notamment vis-à-vis de l'hydrolyse, de la liaison M-O-Si varie[200] en fonction des matériaux (Figure I-18).

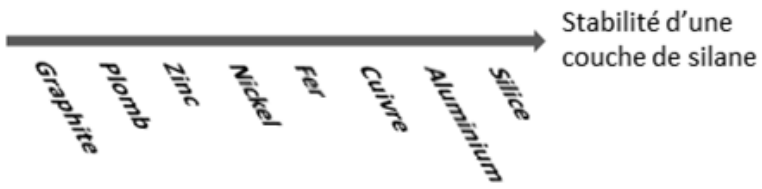


Figure I-18 : Stabilité d'une couche de silane en fonction du matériau sous-jacent[201]

Cette sensibilité à l'hydrolyse même pour les cas favorables[202,203] peut être contournée en utilisant des silanes à même de polymériser tels que les trichlorosilanes ou les trialkoxysilanes, afin d'obtenir une couche de silice réticulée en surface. Les mécanismes de cette réaction ont été largement étudiés, avec ou sans présence d'eau dans le milieu. En présence d'eau, on pourra remarquer que le contrôle fin des quantités d'eau est un point important.

En présence d'eau dans le milieu, la réaction s'amorce par une étape d'hydrolyse du silane (le plus souvent un alcoxysilane), le silanol obtenu va ensuite pouvoir soit réagir directement avec les liaisons O-H de surface, soit se condenser, en solution, avec d'autres silanols, soit réagir, mais dans une moindre mesure, avec des silanes non hydrolysés[204]. Les polysiloxanes formés en solution vont ensuite s'adsorber à la surface du matériau. Afin d'améliorer la stabilité de cette couche de silice, une étape de recuit peut être nécessaire. Cette étape de recuit permet d'accroître la réticulation entre molécules de silanes au sein de cette couche de surface. En revanche, le nombre de liaisons entre le substrat et la couche de silane est globalement peu impacté par un tel recuit[205–207]. En

absence d'eau, le mécanisme le plus largement accepté consiste en une condensation directe du silane sur les groupements hydroxyles de surface. Toutefois, la cinétique de ce type de réaction ne devient suffisante que pour des températures élevées : entre 300 et 400°C pour les chlorosilanes et entre 150 et 200°C pour les alcoxysilanes[200]. Afin d'abaisser les températures de réaction en deçà de 100°C et d'améliorer l'efficacité de la réaction, il est possible d'utiliser des catalyseurs aminés[204,206,208]ou de remplacer le silane par un silazane[207,209]. La cinétique et l'efficacité de la réaction peuvent être également améliorées par un choix de solvant approprié[210]. Les solvants comme le DMF[208], avec un caractère (relativement) nucléophile, font partie des solvants qui peuvent faciliter ce type de réaction.

Ce type de fonctionnalisation, basée sur la réaction entre un silane et une surface d'oxyde, a été mis en œuvre pour de nombreux oxydes, notamment d'aluminium[211–213], de fer[81,152,154,214], de zinc[155,215], de titane[80,216], de niobium[72,104] ou de terres rares[27,29,31,32,153,156]. Une fois la couche de silice formée, on peut ensuite fonctionnaliser à façon la surface des nanoparticules, en utilisant le silane fonctionnel approprié[27,29,31,32,34,152,153,155,156,172,214,217–219]. Les silanes présentent en effet l'avantage d'offrir une très large gamme de fonctions terminales possibles.

Enfin, les oxydes peuvent présenter une surface chargée. On pourra alors utiliser des systèmes basés sur l'attraction électrostatique entre la surface et un ligand, souvent polymérique, de charge opposée à cette surface[73,153].

I.4.1.3. Fonctionnalisation de surface des autres nanoparticules inorganiques

Parmi le grand nombre de matériaux pouvant constituer les nanoparticules, les métaux natifs et leurs oxydes constituent une grande partie des matériaux rencontrés. Toutefois, d'autres dérivés métalliques peuvent être rencontrés tels que les sulfures, les nitrures, les carbures, etc… De plus, certains métalloïdes peuvent également entrer dans la composition de nanoparticules comme le silicium, l'arsenic, le tellure, etc... Tous ces matériaux sont de plus en plus étudiés. Ils sont notamment utilisés en tant que « quantums dots ». D'un point de vue chimique, on peut séparer le silicium et ses dérivés (principalement nitrures et carbures) des autres matériaux. En effet, le silicium peut former des liaisons stables, notamment avec le carbone. Cette propriété offre une plus large gamme de réactions chimiques utilisables pour la fonctionnalisation du silicium et de ses composés. En premier lieu, le silicium ou ses composés peuvent être oxydés afin de former une couche de silice de surface, à même de réagir avec des silanes de la même manière qu'avec les oxydes métalliques[173,220–223]. Par ailleurs, le silicium et ses composés permettent également des réactions d'hydrosilylation[224,225]. Cette réaction, dont le mécanisme est décrit dans la

Figure I-19, est possible en présence d'un catalyseur tels que H_2PtCl_6 ou bien par un mécanisme radicalaire nécessitant une activation (irradiation UV, activation thermique ou microondes). Toutefois, pour que cette réaction puisse se produire, des liaisons Si-H doivent être présentes, ce qui nécessite un traitement préalable de la surface à l'acide fluorhydrique.

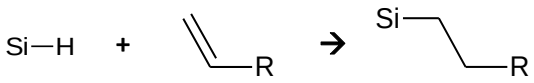


Figure I-19 : Equation générale d'une hydrosilylation

Enfin, le silicium peut être fonctionnalisé par voie radicalaire. Dans ce cas, la réaction permet d'apporter la fonction chimique soit directement par l'amorceur[226] soit en initiant une polymérisation radicalaire in situ à la surface des nanoparticules[227–229].

Dans le cas des matériaux non constitués de silicium, on retrouve fréquemment des dérivés du cadmium et du zinc. Ces dérivés métalliques présentent une forte affinité pour le soufre. On peut alors retrouver des fonctionnalisations basées sur des ligands organiques soufrés, similaires à celles utilisées pour fonctionnaliser les surfaces d'or[33,161] ou basées sur des mercaptosilanes. Dans ce second cas, la couche de silane en surface peut alors être utilisée comme substrat pour réaliser une couche de silice[29] ou pour faire réagir des silanes fonctionnels[34,35,230].

I.4.2. Réactions de greffage sur une surface fonctionnalisée

Cette partie présente différentes réactions classiquement utilisées pour la fixation de biomolécules. Toutes les réactions de couplages possibles ne sont évidemment pas présentées, compte tenu du nombre très important de possibilités, de la faible utilisation et des limites de certaines de ces techniques. De la même manière que pour la première étape de fonctionnalisation, les protocoles utilisés sont extrapolés à partir de protocoles utilisés pour la chimie des surfaces planes ou en chimie organique en solution. Là encore, les problématiques d'agrégation liées à la nature colloïdale des échantillons se posent et doivent être pris en compte. Pour cette raison, les procédés ne nécessitant pas d'activation, minimisant le nombre d'étapes de réaction ou de lavage ou pouvant se dérouler en phase aqueuse sont souvent les plus utilisés.

On peut envisager trois manières de fixer une biomolécule sur une surface fonctionnalisée. La fixation par physisorption est la première méthode qui puisse être envisagée, mettant en jeu une somme importante de liaisons faibles. Compte tenu du nombre important de liaisons devant être formées, on pourra rencontrer ce type d'interaction pour de très grosses molécules comme les

protéines. D'un point de vue sémantique, le classement de la physisorption parmi les réactions de couplage peut être contestable compte tenu de l'absence de liaisons robustes entre la biomolécule et la surface. Une seconde option est d'utiliser les propriétés d'interactions spécifiques de biomolécules entre elles pour aboutir à une liaison, certes non covalente, mais d'une robustesse qui puisse tout de même être comparée à une liaison covalente. Enfin, la dernière solution consiste à réaliser, chimiquement, une liaison covalente.

I.4.2.1. Greffage de molécules par physisorption

Le greffage par physisorption va s'effectuer grâce à la formation de nombreuses liaisons faibles. Ces interactions de différentes natures peuvent être de nature électrostatique ou concerner des interactions entre la surface et des domaines hydrophobes ou hydrophiles des protéines. Compte tenu de l'absence de réactions chimiques à mettre en œuvre, cette méthode présente l'avantage d'être simple et rapide. Cependant, il peut alors être difficile de contrôler des paramètres tels que la densité en biomolécules ou leur bonne orientation sur le substrat. De plus, la stabilité de ces systèmes est souvent limitante soit à cause du risque de désorption lié à la réversibilité de la liaison, soit à cause des possibles changements de conformation après interaction avec la surface. Afin de limiter la désorption, dans le cas de la fonctionnalisation de nanoparticules inorganiques, on privilégiera une adsorption faisant intervenir des interactions électrostatiques[52], plus robustes. D'autres techniques basées sur l'insertion de biomolécules dans une couche lipidique existent mais sont principalement employées pour la fonctionnalisation des liposomes[231].

I.4.2.2. Greffage de molécules basé sur des systèmes biochimiques

L'utilisation de systèmes biochimiques pour le greffage de molécules s'est répandue grâce au développement des outils de dosage et de diagnostic issus de la biologie moléculaire. Ces systèmes présentent l'avantage d'une grande simplicité d'emploi. De nombreux systèmes biologiques permettent de lier spécifiquement deux molécules. En effet, la spécificité d'interaction est une caractéristique de très nombreux systèmes « récepteur-ligand » issus du vivant. Toutefois, les complexes obtenus ne fournissent que rarement une force d'interaction suffisante pour permettre un greffage stable et irréversible, limitant de fait le nombre de systèmes utilisables.

Par ailleurs, les molécules biologiques d'intérêt à greffer ne disposent pas toujours de leur propre système d'interaction spécifique dans leur structure native. Il est donc parfois nécessaire d'ajouter à la biomolécule d'intérêt une autre molécule qui assurera l'interaction avec la surface. Ce type de modification, qu'il soit réalisé par des opérations de chimie ou de biologie moléculaire, peut poser

des problèmes de changement de conformation des biomolécules. Cette sensibilité aux changements de conformation constitue la principale limite technique de ce type de greffage. Dans cette partie, sont présentées les deux techniques les plus largement utilisées mais d'autres couples ligand-récepteur ont également pu être envisagés[232].

I.4.2.2.1. Complexes biotine-streptavidine

L'interaction biotine-streptavidine est une méthode de fixation très largement employée, notamment en biologie[27,29,31–33,223]. En effet, cette interaction présente de très nombreux avantages, parmi lesquels la grande simplicité de mise en œuvre, l'utilisation dans une large gamme de températures et de pH ainsi que la stabilité de la liaison obtenue. En effet, bien que non covalente, la stabilité de cette liaison est similaire à celle d'une liaison covalente puisqu'elle possède une constante de dissociation très faible (K_d=10^{-15}mol/L pour le complexe biotine-streptavidine). La streptavidine dispose par ailleurs de quatre sites de fixation de la biotine, du fait de sa structure tétramérique. Cette propriété, couplée à sa taille relativement faible (52,8kDa), la rend intéressante, notamment dans la réalisation de systèmes « sandwichs », très utilisés, par exemple pour la révélation de différents tests biologiques.

I.4.2.2.2. Complexes basés sur l'hybridation de brins d'ADN

L'ADN est un système de grand intérêt pour le greffage de molécules. En effet, il présente à la fois une grande spécificité d'interaction, une force d'interaction importante et une grande stabilité chimique. Il permet par ailleurs, en développant une chimie de surface unique, d'apporter différentes propriétés aux nanoparticules. En effet, on peut ajouter simultanément des ADN présentant des modifications chimiques différentes, permettant ainsi de coupler différentes propriétés, notamment optiques[31,177,178,187,188], comme la fluorescence, le Raman, etc… L'ADN est également utilisé pour lier différentes particules entre elles tout en contrôlant précisément la distance interparticules[178,187], en choisissant une longueur de brin adaptée.

I.4.3. Réactions de greffage covalent

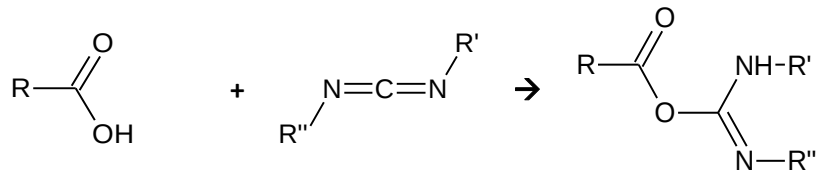
Dans ce paragraphe, la fonction chimique considérée sera celle portée par la molécule d'intérêt. Dans le cas des molécules biologiques, la gamme de fonctions chimiques accessibles est essentiellement limitée aux amines, carboxylates et thiols. Par ailleurs, certaines réactions chimiques simples permettent d'ajouter des fonctions chimiques comme des insaturations ou des azotures, aux propriétés différentes. Cet ajout élargit alors le panel de réactions chimiques disponibles et autorise

des réactions très douces ou avec de très bons rendements. Cette partie présentera dans un premier temps les réactions utilisant les fonctions chimiques « natives » des biomolécules (amines, thiols) avant de présenter des réactions de couplage nécessitant l'ajout de fonctions chimiques spécifiques.

I.4.3.1. Greffage sur une amine

Les amines primaires sont très largement rencontrées parmi les molécules biologiques. Par exemple, au sein des protéines, les amines sont très représentées (Arginine, Histidine, Lysine et Tryptophane) toutefois, le résidu lysine est le principal concerné par ces couplages, compte tenu de la plus grande disponibilité de son amine primaire. Par ailleurs, des brins d'ADN modifiés avec des fonctions amines sont également disponibles commercialement.

Le premier type de couplage pouvant être réalisé consiste en la formation d'une liaison amide, parfaitement stable. Le principal problème de cette liaison est que sa formation ne se fait pas spontanément et nécessite le recours à des analogues plus réactifs. Les chlorures d'acyle ou les anhydrides d'acides ne sont pas utilisables en milieu aqueux, limitant leur intérêt pour le couplage de biomolécules instables en milieu non aqueux. La solution la plus largement utilisée réside dans l'emploi d'agents d'activation. Les carbodiimides tels que l'EDC, l'EDCI, le DCC ou le DIC peuvent ainsi être utilisés dans ce cadre[31,34,156,231,233–238]. Le mécanisme mis en jeu a été étudié[239–242] sur des surfaces planes. Les mécanismes proposés suggèrent la formation d'un carboxylate activé, sous la forme d'une O-Acylurée (Figure I-20). Cette espèce étant très réactive, elle est à même de réagir avec un nucléophile comme une amine ou l'eau par exemple.

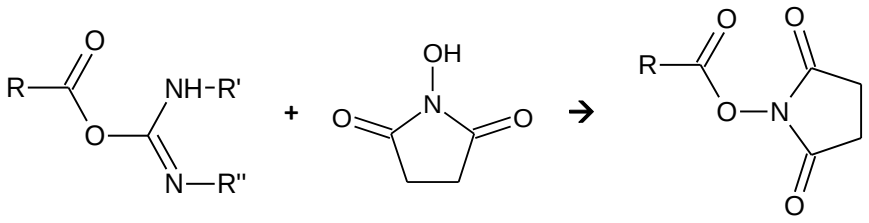


Acide Carboxylique Carbodiimide O-Acylurée

Figure I-20 : Activation d'un acide carboxylique par un carbodiimide

Cette réactivité vis-à-vis de l'eau étant importante, la durée de vie de cette espèce est courte en solution aqueuse. Si en plus la concentration en amines cibles est faible, la seule activation par un carbodiimide peut être insuffisante pour obtenir un couplage efficace. Afin d'améliorer le rendement, une solution fréquemment employée réside dans l'utilisation du N-hydroxysuccinimide (NHS) ou de ses dérivés. En effet, la fonction hydroxylamine du NHS peut réagir sur la O-acylurée permettant l'obtention d'un intermédiaire réactionnel (le plus souvent nommé NHS ester ou ester

activé), plus stable vis-à-vis de l'hydrolyse que la O-acylurée mais suffisamment réactif pour être substitué par l'amine de la molécule biologique (Figure I-21).



O-Acylurée NHS Ester Activé

Figure I-21 : Stabilisation d'un carboxylate activé par le NHS

Ainsi, la plupart des protocoles de greffage utilisant ce type de réaction emploient simultanément carbodiimide et NHS. Toutefois plusieurs réactions secondaires peuvent se produire. Tout d'abord, la O-acylurée est sujette aux réarrangements[239,241] et peut ainsi devenir une N-acylurée (Figure I-22), insuffisamment réactive pour réagir avec le NHS.

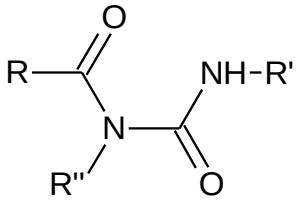
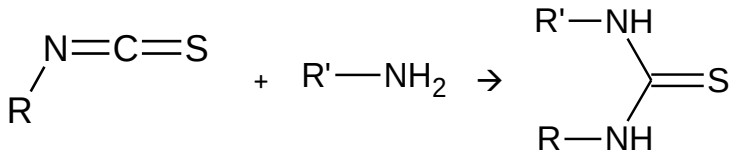


Figure I-22 : N-Acylurée

Ensuite, en solution aqueuse, l'ester activé s'hydrolyse rapidement au-delà de 30min. L'hydrolyse est totale après 24h [239]. Il est à noter que cette problématique de l'hydrolyse peut être contournée par l'utilisation d'un solvant organique anhydre et aprotique comme le THF ou le DMSO. Dans ce cas, la concentration en ester activé demeure élevée, même au-delà de 24h. Cependant, le recours à ces solvants exclut une application au greffage de protéines, lesquelles sont dénaturées dans de telles conditions. Il est à noter que le choix de solvant impactera également le choix du carbodiimide. On utilisera ainsi l'EDC ou l'EDCI dans l'eau et les solvants protiques alors que des carbodiimides comme le DIC ou le DCC seront envisagés en cas d'utilisation de solvants aprotiques.

Toutefois, les protocoles basés sur une activation NHS-carbodiimide peuvent poser problème dans le cas de la fonctionnalisation de nanoparticules. En effet, les réactions chimiques mises en jeu peuvent perturber l'état de surface (diminution du potentiel zêta en valeur absolue) de ces nanoparticules et ainsi entrainer une agrégation/précipitation des nanoparticules, notamment lors des étapes de purification. En conséquence, l'utilisation de réactions de couplage totales, rapides et sans sous-produits présente un intérêt non négligeable. Ces chimies sont basées sur des groupements très réactifs vis-à-vis des amines mais stables en solution aqueuse tels que les isothiocyanates, les époxydes ou les aldéhydes. Les isothiocyanates réagissent intégralement et efficacement avec les amines, produisant des groupements thiourées sans rejeter de sous-produits (Figure I-23). Ils sont largement utilisés, notamment au travers du marquage à la fluorescéine

isothiocyanate[29,31,42,153,190,205,223] ou à la rhodamine isothiocyanate[40,41] mais sont également utilisés pour le greffage de biomolécules tels que des protéines[27,150,243] ou par réaction sur des espaceurs aminés eux-mêmes porteurs de la biomolécule[244].

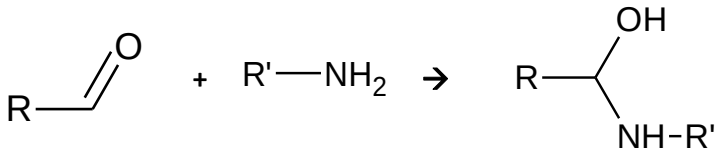


Isothiocyanate Amine Thiourée

Figure I-23 : Réaction de couplage Amine-Isothiocyanate

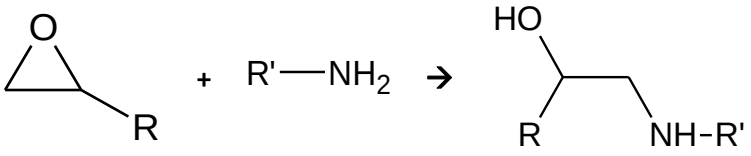
Toutefois, certaines études[245] montrent l'apparition d'une hydrolyse de la thiourée qui devient non négligeable au-delà de 48h d'exposition à l'eau, à 37°C. Pour les molécules stables en milieu organique, le recours à un solvant aprotique permet d'occulter ce type de problème.

D'autres réactions peuvent être employées, notamment par réaction des amines sur des groupements aldéhydes[32,243] (Figure I-24) ou époxydes[12,173] (Figure I-25). Il est toutefois à noter que ces réactions présentent des limitations aux pH acides ou basiques. Les époxydes se dégradent en effet aux pH basiques et acides tandis que l'adduit formé par la réaction aldéhyde-amine s'hydrolyse en conditions aqueuses acides.



Aldéhyde Amine

Figure I-24: Réaction de couplage Aldéhyde-Amine



Epoxyde Amine

Figure I-25: Réaction de couplage Epoxyde-Amine

I.4.3.2. Réactions de greffage covalent sur un thiol

Les réactions de couplage basées sur les fonctions thiols présentent un intérêt majeur pour le greffage de biomolécules, notamment les protéines. En effet, contrairement aux fonctions amines, très largement présentes dans les molécules biologiques, les fonctions thiols sont assez rares et se retrouvent principalement au niveau des résidus cystéines des protéines. Cette relative rareté permet de limiter le nombre de sites de couplage possibles sur une protéine et ainsi d'assurer un meilleur contrôle de l'orientation. Cette orientation est importante pour certaines protéines, notamment les anticorps (Figure I-26) dont l'épitope est situé sur la partie NH_2-terminale de la protéine. Un greffage de la protéine par les NH_2 terminaux peut alors bloquer ou diminuer fortement l'accès au site de reconnaissance et donc diminuer les capacités de reconnaissance de l'anticorps.

Les positions des quelques thiols présents dans les anticorps étant connues et fixes, il est alors envisageable d'utiliser ces fonctions pour le greffage. Cependant, les thiols présents dans les anticorps sont présents sous la forme de ponts disulfures. Aussi est-il nécessaire de réduire spécifiquement certains ponts disulfures[246], ce qui permet de libérer quelques fonctions thiols qui peuvent ensuite être utilisées. Il est toutefois important de noter que les ponts disulfures sont des structures souvent capitales au maintien de l'activité d'une protéine. Ainsi, la réduction de ponts disulfures peut ne pas être applicable. Pour reprendre l'exemple des anticorps, on peut ainsi réduire sans risque les ponts disulfures maintenant la cohésion entre les parties « gauches » et « droites » de l'anticorps. En revanche, la réduction des autres ponts disulfures aboutit à une perte de l'activité de l'anticorps.

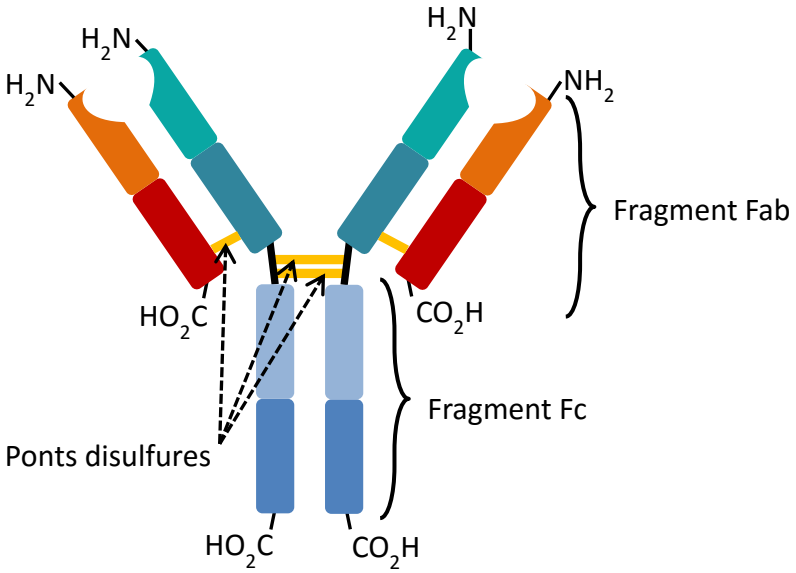
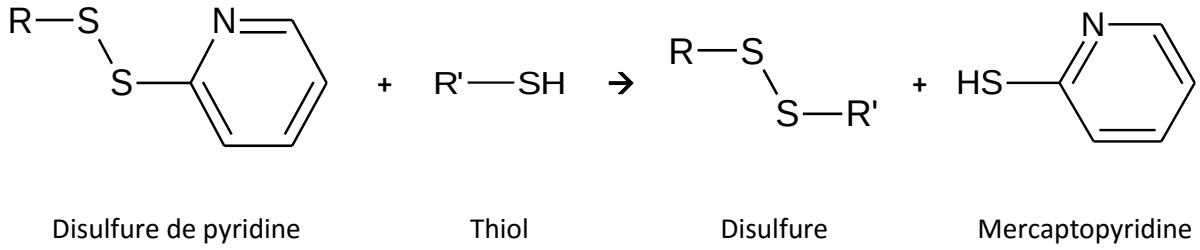


Figure I-26 : Représentation schématique d'une immunoglobuline de type G

Dans le cas d'un greffage par les amines de l'anticorps, d'un point de vue statistique, la probabilité qu'une majorité des anticorps soient greffés avec une mauvaise orientation est faible et de nombreux systèmes sont obtenus par greffage via les amines de la protéine[34,247]. Cependant, le greffage via les thiols est également utilisé[45,80,248]. Cette technique présente l'avantage du contrôle de l'orientation et permet également d'utiliser la chimie des thiols qui est très favorable pour plusieurs aspects. En effet, certaines réactions vis-à-vis des thiols présentent de bons rendements, et permettent d'éviter des étapes d'activation, qui peuvent être critiques, notamment en termes d'agrégation des nanoparticules.

Il est à noter que certaines protéines ne disposent d'aucun résidu cystéine utilisable et que cette méthode n'est donc pas directement extrapolable à toutes les protéines. Il existe cependant des réactions permettant d'ajouter des fonctions thiols à des biomolécules. On pourra, par exemple, citer le réactif de Traut pour cette application[231].

La première réaction envisageable pour greffer les thiols sur une surface est de former des ponts disulfures entre les molécules d'intérêt et la surface thiolée de nanoparticules. Toutefois, pour éviter la dimérisation des molécules d'intérêt, il n'est pas possible de procéder à une oxydation directe pour former les ponts disulfures. La solution utilisée est d'utiliser un thiol « activé », par exemple sous la forme d'un disulfure de pyridine[249,250] (Figure I-27).



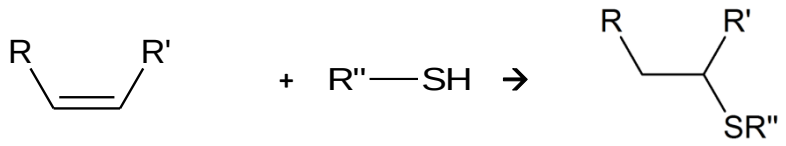
Disulfure de pyridine | Thiol | Disulfure | Mercaptopyridine

Figure I-27 : Formation d'un disulfure à partir d'un thiol activé

Cependant, les ponts disulfures sont des liaisons relativement sensibles, à même de se rompre (par réduction, par oxydation ou sous irradiation lumineuse), ou de s'échanger leurs ligands thiolés. En conséquence, ce type de couplage est relativement peu utilisé comparativement aux couplages de type addition de Michael.

Les additions de Michael (Figure I-28) avec les composés soufrés se caractérisent par la réaction d'un thiol sur une insaturation (nommée accepteur de Michael). Les accepteurs de Michael les plus fréquemment utilisés sont des alcènes[216,251,252] (réactions thiol-ène) ou des alcynes[169,253] (réactions

thiol-yne). La réaction étant favorisée par la présence de groupements électroattracteurs à proximité de l'insaturation, on retrouve souvent le groupement maléimide comme accepteur[34,45,156,252].



Accepteur de Michael Thiol Adduit de Michael

Figure I-28 : Equation générale d'une réaction de Michael avec formation d'un thioether

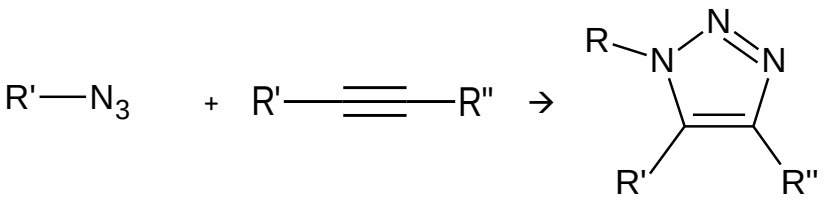
I.4.3.3. Autres réactions de greffage

La modification chimique des biomolécules par ajout de groupements fonctionnels naturellement absents comme des insaturations aliphatiques ou des azotures offre de très nombreuses possibilités supplémentaires pour réaliser des couplages. L'ajout de ces fonctions chimiques peut constituer un point limitant qui est contrebalancé par de bons rendements, des conditions de réactions très douces et l'absence de sous-produits. Aussi, de nombreuses biomolécules sont aujourd'hui disponibles commercialement avec ce type de modification.

Pour illustrer ces différentes possibilités additionnelles, on pourra citer, entre autres, les cycloadditions de Diels-Alder et de Huisgen.

I.4.3.3.1. Couplage par cycloaddition de Huisgen

La cycloaddition 1,3 de Huisgen, couramment nommée « click chemistry », est un excellent exemple de ces solutions à haut rendement et conditions douces. Cette réaction consiste, dans le cas de conditions douces, en l'addition d'un azoture sur une triple liaison C-C (Figure I-29).



Azoture Alcyne Adduit de Huisgen

Figure I-29 : Equation générale d'une cycloaddition de Huisgen

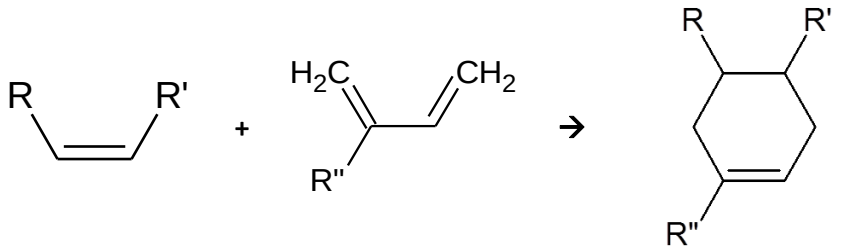
Cette réaction peut alors se dérouler en solution aqueuse à des températures ambiantes ou proche de cette température[157,235]. Ces avantages font que ce type de couplage est aujourd'hui largement utilisé dans de nombreux domaines de la chimie, dont celui de la fonctionnalisation de nanoparticules[81,164,171,179,235]. On peut noter qu'un chauffage, notamment par micro-ondes, permet d'améliorer fortement la cinétique de la réaction.

Toutefois, pour parvenir à réaliser cette réaction, l'emploi d'un catalyseur cuivreux est nécessaire. Le Cu(I) étant instable, la réaction doit se dérouler en l'absence d'oxygène pour ne pas oxyder le catalyseur. Cependant, du fait de la toxicité du cuivre, même à l'état de traces, celui-ci doit être éliminé pour des applications biomédicales. Aussi, plusieurs travaux tentent de trouver des solutions afin d'éviter l'emploi de tels catalyseurs. L'utilisation de triples liaisons contraintes permet par exemple d'éviter le recours à ces catalyseurs[254,255].

La ligation de Staudinger, qui se base sur la réaction entre un azoture et un thioester est également une solution alternative permettant d'éviter l'ajout d'un catalyseur[256–259].

I.4.3.3.2. Couplage par cycloaddition de Diels-Alder

La cycloaddition 1,4 de Diels-Alder est une alternative sans catalyseurs à la cycloaddition de Huisgen. La réaction aboutit à la formation d'un cycle (Figure I-30) suite à la réaction d'une insaturation sur une double insaturation conjuguée (parfois nommée diénophile).



Diénophile Diène Adduit de Diels-Alder

Figure I-30 : Equation générale d'une cycloaddition de Diels-Alder

Ce type de couplage n'est pas limité aux insaturations C-C, permettant ainsi une large gamme de réactifs utilisables. Comme pour les additions de Michael, la présence de groupements électroattracteurs à proximité facilite d'autant la réaction. Pour cette raison, les groupements maléimides[165,260,261] et furanes[165,260,261] sont fréquemment utilisés, respectivement comme dièenophiles et dièenes.

I.4.4. Application à la synthèse de nanohybrides par couplage de nanoparticules

Le domaine des nanoparticules est actuellement en plein développement compte tenu de l'intérêt grandissant pour les systèmes multifonctionnels. En effet, les nanoparticules constituent une plateforme intéressante pour l'ajout de propriétés complémentaires, notamment par greffage de molécules aux propriétés variées. Toutefois, certaines propriétés ne peuvent pas être véhiculées par de simples molécules, ou alors ces molécules présentent des limites (efficacité limitée, toxicité, instabilité, etc…).

Dans ces conditions, il peut être alors nécessaire d'adjoindre de nouvelles propriétés par couplage de systèmes non moléculaires comme des nanoparticules. Parmi les nanoparticules régulièrement utilisées pour créer des nanohybrides, on pourra retrouver, notamment, des nanoparticules d'or[18,47,94,185,217,262,263] ou d'argent[97,264] (pour leurs propriétés plasmoniques ou thérapeutiques), des nanoparticules d'oxyde de fer[38] (pour leurs propriétés magnétiques) ou des quantum dots[92–94,185,262] (pour leur fluorescence). Par ailleurs, pour certaines applications, il pourra être utile de relier des nanoparticules de même nature entre elles pour conférer des propriétés physiques[167,178,179,187,265,266] ou mécaniques[173] à ces assemblages. Enfin, des méthodes de diagnostic, dites par sandwich (ou bio-codes-barres), sont basées sur ce principe de couplage de deux nanoparticules différentes, en présence de la cible biologique à détecter[267–269].

Comme nous l'avons montré dans ce chapitre, les interactions entre nanoparticules résultent d'un équilibre entre forces attractives et répulsives. Afin d'obtenir des assemblages de nanoparticules stables, il est nécessaire de compenser les forces répulsives (principalement la répulsion coulombienne) par la création de liaisons entre nanoparticules.

On pourra donc différencier deux cas différents : le cas où les nanoparticules, présentant des charges de surface de signes opposés, s'attirent naturellement par attraction coulombienne et le cas où les nanoparticules, présentant des charges de surface de mêmes signes se repoussent à cause de la force coulombienne. Le premier cas est propice à un autoassemblage des nanohybrides par simple interaction électrostatique. Toutefois, ce cas simple est rare et une première étape de fonctionnalisation des nanoparticules est souvent nécessaire pour arriver à ces conditions permettant une attraction électrostatique. Pour réaliser cette fonctionnalisation de surface, on retrouve essentiellement deux solutions : la première consiste à fonctionnaliser les nanoparticules en adsorbant un polymère chargé comme des aminopolysaccharides (dextran[11], aminodextran[73], chitosan[126,147,151], etc..), la polylysine[247], la polyallylamine[264], le polyéthylèneimine[10,82,183] (PEI), le polystyrène-sulfonate[52,82,105] (PSS), des tensioactifs cationiques[52] ou des dendrimères tels que le

polyamidoamine (PAMAM)[147,167,185,270,271]. La deuxième solution consiste à greffer de petites molécules porteuses de la charge à la surface des nanoparticules. Cette seconde solution est notamment très utilisée pour la fonctionnalisation de nanoparticules de silice, lesquelles se prêtent bien à la fonctionnalisation, par silanisation[35,217,262,263].

Le couplage de nanoparticules basé sur des interactions électrostatiques attractives est ainsi largement utilisé du fait de sa grande simplicité de mise en œuvre. Toutefois, ce type d'interaction est peu spécifique et relativement labile, dans des milieux de forte force ionique. Aussi, certains auteurs s'intéressent-ils à l'utilisation d'autres types de liaisons plus spécifiques et/ou moins sensibles à la force ionique du milieu. Pour le couplage de nanoparticules d'or ou d'oxydes, l'utilisation respective de liaisons Au-S (via des thiols[47,167]) et P-O-M (via des phosphonates[35]) sont des solutions alternatives simples à mettre en œuvre et relativement spécifiques. On pourra également noter que des fonctions thiols peuvent aussi être utilisées pour se fixer à aux quantum dots soufrés tels que le ZnS[35].

Enfin, on pourra baser l'assemblage des nanoparticules sur des liaisons encore plus solides ou encore plus spécifiques.

On pourra ainsi lier des nanoparticules entre elles de manière covalente, à condition que ces nanoparticules présentent, initialement, des fonctions chimiques à même de supporter ces liaisons chimiques. Parmi les réactions utilisées pour coupler les nanoparticules, on pourra citer la réaction de fonctions époxydes[173] ou carboxylates[92,93] sur des amines. Une autre alternative consiste à utiliser des biomolécules capables de se lier entre elles de manière spécifique et suffisamment solide. Le couple streptavidine-biotine est ainsi largement utilisé[272–274]. L'ADN est aussi utilisé comme système de couplage, et ce, pour deux applications liées à deux propriétés distinctes de cette molécule. D'une part, l'ADN est une molécule dont la longueur peut être contrôlée précisément en modulant le nombre de paires de base du motif et la force ionique du milieu. Ainsi, différents systèmes[178,179,187,265] utilisent ces propriétés pour réaliser des systèmes agencés avec un contrôle fin, et modulable, de la distance interparticules (on notera que d'autres molécules biologiques, plus exotiques, permettent un tel contrôle[266]). Une telle modulation permet, dans le cas de nanoparticules d'or, de réaliser des systèmes aux propriétés plasmoniques ajustables[178,187,265,266], pour une utilisation, par exemple, en SERS. D'autre part, l'ADN est un système de reconnaissance très spécifique, et il est très largement utilisé en diagnostic, dans les systèmes sandwichs, pour détecter des brins d'ADN spécifiques de pathologies[267,268]. Ces systèmes sandwichs ont également été étendus à d'autres systèmes biologiques, en utilisant, notamment des anticorps[269,274].

I.4.5. Conclusions

Cette partie sur la fonctionnalisation des nanoparticules a permis de détailler la diversité des chimies disponibles. Aussi, la séparation distincte entre les contraintes imposées par la nature inorganique des nanoparticules et les contraintes imposées par les biomolécules permet de bien comprendre l'importance des étapes de fonctionnalisation qui permettent d'interfacer ces deux systèmes.

Au-delà de l'extrapolation de ces chimies à des nanoparticules, et de sa complexité liée à la nature colloïdale des surfaces à fonctionnaliser, la chimie des nanoparticules pose de nombreux défis pour leur utilisation sur le vivant. En effet, de nombreux phénomènes de toxicité et de comportement des nanoparticules *in vitro* et *in vivo* sont nettement impactés, voire régis, par le choix d'un type de nanoparticule ou d'un type de fonctionnalisation de surface.

Enfin, cette chimie, en plus d'interfacer l'organique avec l'inorganique, permet également d'accéder à des systèmes à une échelle de taille bien supérieure, en permettant d'associer des nanoparticules entre elles, sous la forme de nanohybrides aux propriétés multiples.

I.5. Objectifs de la thèse

On a pu voir, au travers de cette revue de la littérature, que les problématiques des nanoparticules appliquées au cancer font appel à différents domaines distincts, qu'il s'agisse d'imagerie, de traitement ou de ciblage, rendant notre approche multidisciplinaire. Le dénominateur commun de ces différents domaines réside dans le développement d'une chimie qui parviendrait à combiner tous ces aspects afin d'obtenir des systèmes nanoparticulaires multifonctionnels à même de servir pour l'imagerie et la thérapie. Ce travail de thèse visera donc, dans un premier temps à synthétiser et caractériser ces systèmes en couplant des émetteurs SHG à des nanoparticules d'or, aux propriétés multiples : plasmoniques, thérapeutiques, luminescentes. Il sera ensuite possible d'utiliser ces systèmes, pour des applications diagnostic et thérapeutiques sur cellules vivantes. Enfin, une fois ces systèmes validés, la problématique du ciblage spécifique des cellules cancéreuses par ces nanoparticules multifonctionnelles pourra être étudiée.

Au travers de cette revue de la littérature, on peut remarquer que ces différents aspects ont pu être abordés séparément, mais le développement de systèmes transverses regroupant toutes ces propriétés au sein d'un tout unique reste encore un objectif à atteindre. La nécessité de prendre en compte toutes les contraintes physiques, physico-chimiques, chimiques et biologiques représente un

niveau de complexification supérieur qui a justifié les travaux qui ont été réalisés au cours de cette thèse.

II. SYNTHESE ET CARACTERISATION DES NANOPARTICULES DE SiC, $KNbO_3$ ET D'OR

Les nanoparticules de SiC, de $KNbO_3$ et d'or constituent autant de briques élémentaires sur lesquelles seront basées le reste de ce travail de thèse. Par conséquent, les méthodes d'élaboration aboutissant à ces nanoparticules et les caractérisations associées ont fait l'objet d'un travail approfondi. Dans ce chapitre, nous décrirons donc les différents protocoles de synthèse utilisés et les caractérisations optiques et structurales réalisées sur les différents échantillons.

II.1. Synthèse de nanoparticules d'or

Bien que disponibles commercialement, nous avons fait le choix, dans ce travail, de réaliser la synthèse de nos propres nanoparticules d'or à partir de sels d'or. En effet, les formulations de nanoparticules commerciales peuvent contenir différents produits nécessaires à leur stabilisation à moyen terme comme des tensioactifs. Ces produits peuvent être difficiles à retirer de la surface des nanoparticules et de la suspension colloïdale, et peuvent également empêcher une réaction, polluer un échantillon ou perturber des analyses. De plus, de manière générale, les fournisseurs ne donnent pas ou peu d'informations précises sur ces produits. Ce manque d'information rend d'autant plus compliqué l'interprétation des résultats.

Les procédés de synthèse de nanoparticules d'or sont nombreux et largement décrits dans la littérature. Aussi, nous avons choisi de nous concentrer sur des procédés facilement reproductibles et permettant d'obtenir, avec de bons rendements, des nanoparticules d'or présentant une bande plasmon centrée sur une longueur d'onde de 800 nm. Deux types de nanostructures largement décrites, et satisfaisant ces besoins de rendement et de reproductibilité, ont été étudiées et synthétisées : des nanosphères et des nanobâtonnets (« nanorods ») d'or.

II.1.1. Synthèse de nanosphères d'or

Plusieurs solutions peuvent être envisagées pour produire des nanosphères d'or. Nous avons utilisé la méthode de Frens[113], en une étape, qui est très largement utilisée et une méthode en plusieurs étapes, basée sur la croissance de germes préalablement synthétisés[120].

II.1.1.1. Méthode de Frens

La méthode de Frens consiste en la réduction de sels d'or par du citrate trisodique (Figure II-1). La taille des nanoparticules peut être contrôlée en modifiant la cinétique de la réaction. On peut ainsi ajuster cette vitesse en modifiant la quantité de citrate introduite. Les processus de nucléation étant

très sensibles à la présence de germes métalliques, la verrerie utilisée a été nettoyée préalablement à l'eau régale (1 HNO_3 65%: 3 HCl 37%). Il est nécessaire de limiter au maximum l'exposition à la lumière pendant la synthèse compte tenu de la photosensibilité des sels d'or.

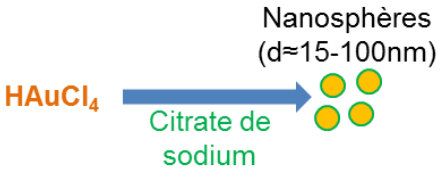


Figure II-1 : Schéma récapitulatif de la synthèse de nanoparticules d'or par la méthode de Frens

Le protocole de synthèse que nous avons utilisé est le suivant : 50mL de solution aqueuse de $HAuCl_4$ à 250µM sont introduits dans un ballon tricol de 100mL. La solution est chauffée à reflux et portée à ébullition, sous agitation (400rpm). Une fois le reflux atteint, un volume de solution aqueuse de citrate trisodique à 34mM est ajouté. Le volume de citrate est adapté pour obtenir un ratio molaire citrate/sel d'or permettant d'obtenir la taille désirée (Figure I-2). Après l'ajout de citrate, le mélange réactionnel passe du jaune au bleu puis au rouge en quelques minutes. Le reflux est prolongé pendant 1h. Pour les nanoparticules d'une taille supérieure à 100nm, le reflux est maintenu durant 2h, compte tenu de la croissance plus lente des nanoparticules. Enfin, les nanoparticules sont lavées par centrifugation (6700g, 5min) puis redispersées dans un même volume d'eau.

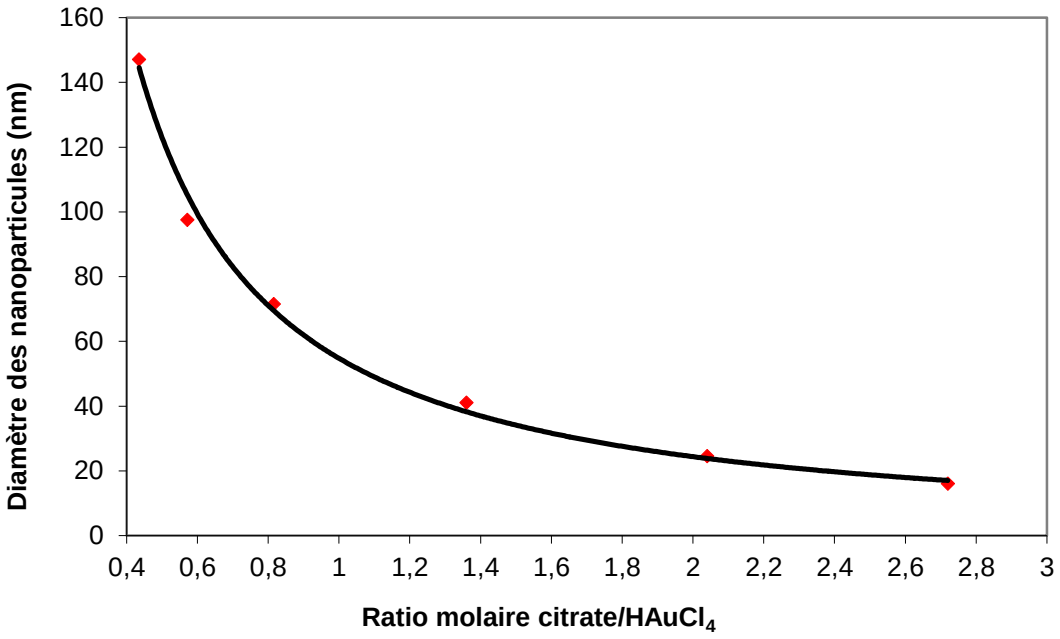


Figure I-2 : Relation entre diamètre moyen attendu des nanosphères d'or et ratio molaire citrate/sel d'or, d'après Frens[113]

II.1.1.2. Méthode par croissance de germes

La méthode par croissance de germes est une méthode basée sur un procédé en plusieurs étapes (Figure I-3). Dans un premier temps, de petites nanoparticules (d≈15-20nm) sont produites par la méthode de Frens. Ensuite, on fait croître ces nanoparticules dans un milieu tel que la formation de nouveaux germes par nucléation n'est pas possible. Ce contrôle a été rendu possible par l'utilisation de réducteurs plus doux comme l'acide ascorbique. On peut alors réaliser des étapes de croissance successives, jusqu'à obtenir la taille désirée. Pour obtenir des nanoparticules de grandes dimensions en maintenant la monodispersité, la littérature privilégie des étapes de croissances multiples[119].
Le protocole utilisé ici est décrit par Rodriguez-Fernandez[87] et se limite à deux étapes de croissance, ce qui permet d'envisager des synthèses courtes, avec de bons rendements. Comme pour la méthode de Frens, la verrerie utilisée est nettoyée préalablement à l'eau régale. L'exposition à la lumière est également réduite au maximum. Pour estimer les quantités d'or nécessaires à chaque étape de croissance, on fait l'hypothèse que les sels d'or présents participeront intégralement à la croissance de toutes les nanoparticules.

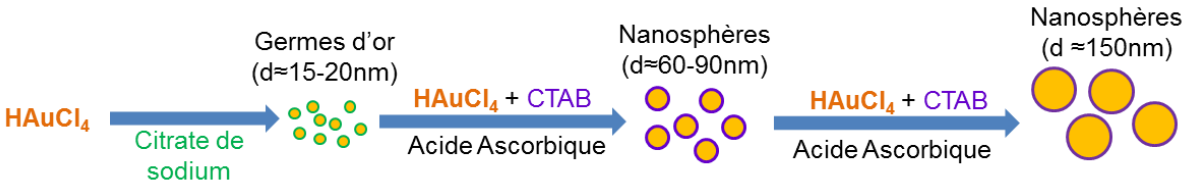


Figure I-3 : Schéma récapitulatif de la synthèse de nanoparticules d'or par croissance de germes

Le protocole de synthèse que nous avons utilisé est le suivant. Dans un premier temps, 20mL d'une solution de $HAuCl_4$ à 250µM, sont chauffés à reflux sous agitation (400rpm), dans un ballon tricol de 50mL. Une fois le reflux atteint, 400µL de solution aqueuse de citrate trisodique à 34mM sont ajoutés, pour former une solution A. Le ratio molaire citrate/sel d'or (R=2,72) permet un diamètre cible d'environ 16nm (Figure I-2). Le reflux est ensuite maintenu durant 1h.

Dans un second ballon, une solution B, contenant 20mL de solution aqueuse de $HAuCl_4$ à 250µM et 7,5mL d'une solution de CTAB à 0,1M est préparée. La solution B est agitée durant 2min, en maintenant la température au-dessus de 25°C afin d'éviter la précipitation du CTAB. 10mL d'une solution aqueuse d'acide ascorbique à 2,5mM sont ensuite introduits. Après 3min d'agitation, un volume de la solution A ($C=3,6.10^{14}$ nanoparticules/L), contenant les germes d'or obtenus par la méthode de Frens, sont ajoutés. La quantité de germes introduite est calculée pour que la quantité d'or introduite (fixée à 500nmol) permette d'augmenter le diamètre de chaque germe jusqu' à environ 60nm de diamètre, en considérant que la réaction est totale. Pour des germes de 16nm de

diamètre, 780µL de solution A sont introduits. La solution est maintenue sous agitation (400rpm), à une température de 35°C, au moyen d'un bain marie, durant 3h.

Enfin, une deuxième étape de croissance est réalisée en reprenant les conditions de la première étape de croissance. Dans un troisième ballon, une solution C est donc préparée, contenant 20mL de solution aqueuse de $HAuCl_4$ à 250µM et 7,5mL d'une solution de CTAB à 0,1M. La solution C est agitée durant 2min, en maintenant la température au-dessus de 25°C. 10mL d'une solution aqueuse d'acide ascorbique à 2,5mM sont ensuite introduits. Après 3min d'agitation, un volume de la solution B, contenant les nanosphères, non lavées, de 60nm de diamètre, est ajouté. Pour le calcul de ce volume, on procède comme à l'étape de croissance précédente. Pour obtenir des nanoparticules d'environ 150nm de diamètre, 3,7mL de solution B sont introduits. La solution est maintenue sous agitation (400rpm), à une température de 35°C, au moyen d'un bain marie, durant 3h.

II.1.2. Nanorods d'or

Les nanorods d'or peuvent être synthétisés selon différentes méthodes. La différence majeure entre les méthodes réside dans l'utilisation ou non de sels d'argent comme catalyseur de la réaction. D'après Murphy *et al*, la synthèse de nanorods en présence de sels d'argent permet d'obtenir une meilleure monodispersité et une meilleure reproductibilité entre les différentes synthèses[19]. Pour cette raison, nous avons choisi d'utiliser cette voie de synthèse (Figure I-4).

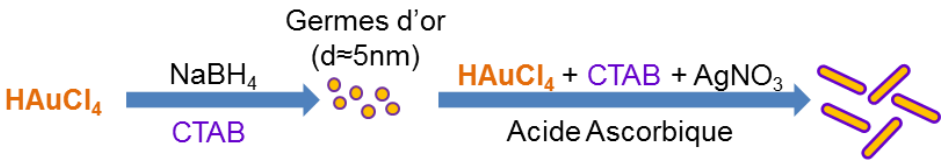


Figure I-4 : Schéma récapitulatif de la synthèse de nanorods d'or en présence de sels d'argent

Cette méthode est similaire à la méthode dite « par croissance de germes », à la différence qu'elle requiert des germes de très petite taille et d'un agent dit orientant : le nitrate d'argent. Comme pour les nanosphères, la verrerie utilisée a été nettoyée à l'eau régale. L'exposition à la lumière est également réduite au maximum.

Dans un premier temps, pour produire des germes de très petite taille, une solution D est préparée, contenant 629µL de solution aqueuse de CTAB à 0,15M, 216µL d'eau déionisée et 55,1µL de solution aqueuse de $HAuCl_4$ à 4,28mM. La solution est stockée dans un tube eppendorf et maintenue à une température supérieure à 25°C au moyen d'un bain-marie pour éviter la précipitation du CTAB.

100µL d'une solution aqueuse de $NaBH_4$ à 5,66mM, préparée extemporanément, sont ensuite introduits dans la solution A. Après une courte agitation, on laisse la réaction se dérouler durant 3h, dans une étuve à 30°C.

Ensuite, dans un erlenmeyer de 50mL, une solution E est préparée, contenant 9,87mL de solution aqueuse de CTAB à 0,15M, 2,2mL d'eau déionisée et 1,73mL de solution aqueuse de $HAuCl_4$ à 4,28mM. Une solution d'$AgNO_3$ à 7,4mM est ensuite ajoutée. La quantité d'argent introduite permet de contrôler le rapport d'aspect des nanorods (et donc leurs propriétés plasmoniques). Différentes concentrations d'argent ont donc été étudiées dans la gamme 20-100µM. Afin de parvenir à ces concentrations, des volumes compris entre 32 et 160µL de la solution d'$AgNO_3$ sont utilisés.

La solution E est agitée lentement pendant 2min et maintenue à 30°C, au moyen d'une étuve. 1000µL de solution aqueuse d'acide ascorbique à 8,18mM sont ensuite introduits. Après 1min d'agitation, 25µL de la solution D, contenant les germes d'or, sont ajoutés. Après 1min d'agitation très douce, la solution est placée dans une étuve à 30°C pendant une nuit. Les nanoparticules sont ensuite lavées par centrifugation (6700g, 6min) et redispersées dans un même volume de solution aqueuse de CTAB.

II.2. Résultats de caractérisation des nanoparticules d'or synthétisées

Toutes les nanoparticules d'or obtenues sont caractérisées de deux manières. Les propriétés plasmoniques de l'or sont caractérisées par spectroscopie d'absorption UV-Visible tandis que la taille et la morphologie des particules sont déterminées par MEB. Les mesures de taille en MEB ont été préférées aux mesures en DLS, en effet, les mesures en DLS ne permettent pas de mesurer précisément des particules non sphériques comme les nanorods. Toutes les techniques utilisées et leurs protocoles associés sont décrits en Annexe 1.

II.2.1. Nanoparticules obtenues par la méthode de Frens

Les suspensions colloïdales de nanoparticules d'or sont analysées directement en fin de synthèse par spectroscopie d'absorption UV-Vis. On réalise également des dépôts sur substrats de silicium pour réaliser des clichés MEB. L'objectif de cette synthèse était d'obtenir des nanoparticules possédant une bande plasmon centrée sur 800nm, longueur d'onde à laquelle les tissus vivants absorbent peu. De telles propriétés plasmoniques sont atteignables pour des nanosphères de 150nm de diamètre

environ[120,275]. Ces particules présentent une bande plasmon dont le maximum est situé vers 560nm et s'étirant largement vers les grandes longueurs d'ondes (Figure I-5).

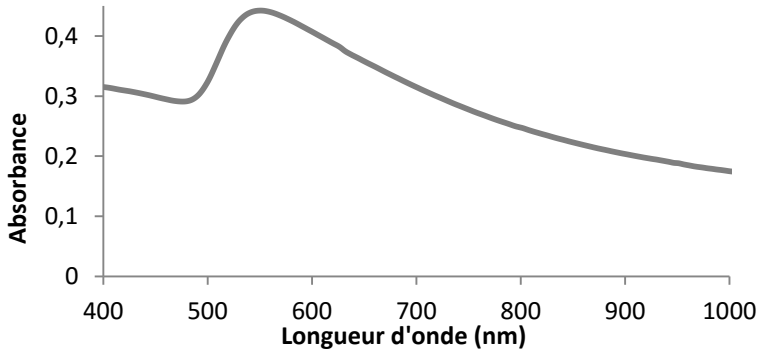
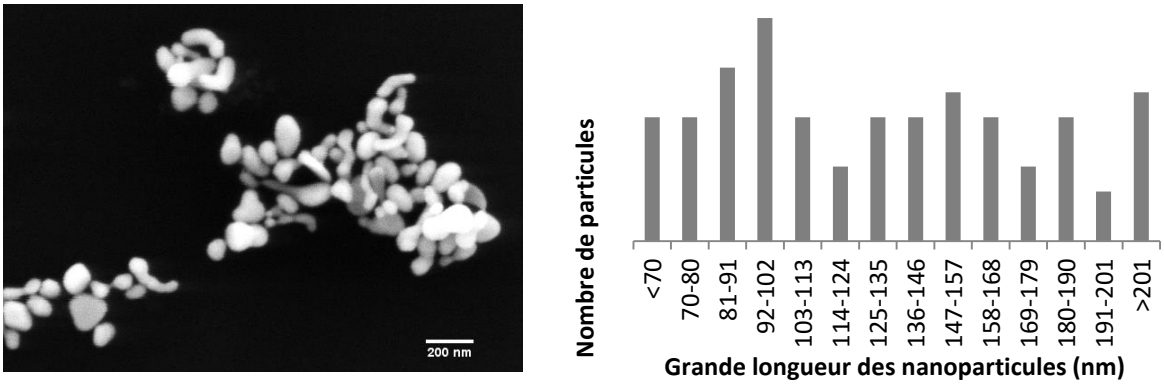


Figure I-5 : Spectre d'absorption d'une suspension colloïdale de nanoparticules d'or obtenus par méthode de Frens – taille cible 150nm (ratio molaire citrate/$HAuCl_4$=0,43)

Ce comportement peut s'expliquer par le fait que ces nanoparticules se comportent comme des multipôles et non comme des dipôles. De plus une hétérogénéité en taille et en forme peut aussi expliquer cet élargissement[275]. Cette hypothèse est directement confirmée par les clichés MEB réalisés (Figure I-6a) où l'on peut constater que les nanoparticules obtenues sont de formes et de tailles variables avec de nombreuses particules non sphériques. Les nanoparticules étant non sphériques, la plus grande longueur a été retenue pour la mesure de taille. La taille mesurée, sur une population de 75 nanoparticules issues de différents champs est de 130±46nm. On constate ainsi un écart relativement faible vis-à-vis de l'objectif de 150nm. Toutefois, ce résultat doit être modéré compte tenu de la très grande dispersion en taille de l'échantillon (Figure I-6b). On peut ainsi remarquer deux populations relativement différentes de particules, de grandes longueurs centrées sur 97nm et 152nm.



(a) (b)

Figure I-6 : Cliché MEB de particules d'or obtenues par méthode de Frens, avec un ratio molaire citrate/$HAuCl_4$ de 0,43 (a) et distribution des tailles effectives mesurées sur les images MEB (b)

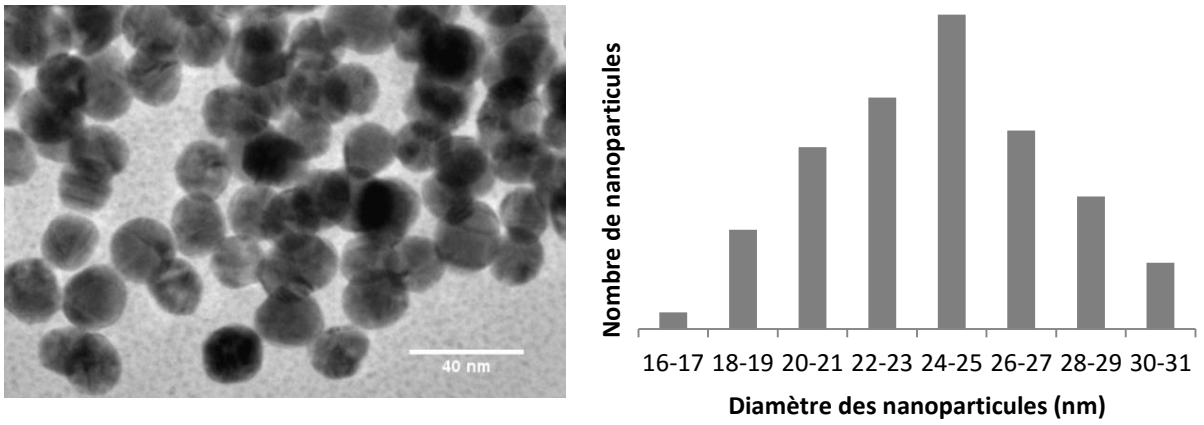
Cette très grande hétérogénéité peut être expliquée par les limites de la méthode de Frens. En effet, bien qu'il soit possible d'obtenir des nanoparticules d'or d'un diamètre aux environs de 150nm[113], Frens explique que sa technique de synthèse présente des limites pour ces grandes tailles : le pourcentage de nanoparticules sphériques décroit et la reproductibilité est également impactée. En effet, pour parvenir à de telles tailles de nanoparticules, la quantité de réducteur est très faible, la vitesse de réaction est donc diminuée. Cette faible vitesse de réaction entraîne la formation prolongée de nuclei, dont la durée de croissance va alors varier nettement. Les propriétés plasmoniques des nanoparticules obtenues avec la méthode de Frens n'étant pas satisfaisantes, cette méthode n'a pas été retenue pour obtenir des nanoparticules de grande taille. C'est pour cette raison que différents auteurs privilégient des techniques par croissance de germes[120,275] ou des techniques permettant l'obtention d'autres nanostructures d'or[52,88,129] lorsque l'objectif de bande plasmon est situé au-delà de 700nm. Dans ces conditions, les cinétiques de nucléation et de croissance sont dissociées en 2 étapes distinctes. Pour l'étape de nucléation, on utilisera une réduction avec une cinétique rapide (excès de réducteur ou réducteur fort) et pour la croissance on utilisera un réducteur très doux (acide ascorbique[119], hydroquinone[117], etc…), afin de limiter la vitesse de réaction.

II.2.2. Nanoparticules obtenues par croissance de germes

Du fait des limites de la méthode de Frens, nous avons donc synthétisé des nanoparticules d'or de 150nm de diamètre à partir de la méthode de croissance de germes[120]. Dans un premier temps, des nanoparticules sphériques de faible diamètre (d≈15-20nm) ont été synthétisées par la méthode de Frens. Ensuite, la taille des germes a été augmentée par des étapes de croissance successives en utilisant des réducteurs plus doux, n'autorisant pas la formation de nouveaux nuclei.

Des clichés TEM (pour les germes) et MEB (après croissance) ont été réalisés sur les nanoparticules après chacune des étapes de synthèse.

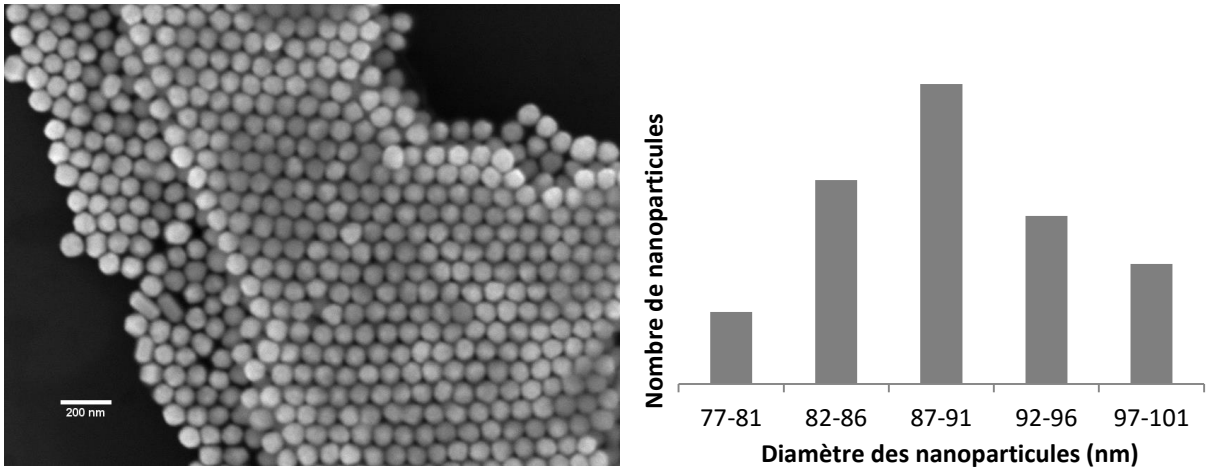
Les images TEM obtenues après l'étape de synthèse des germes montrent des nanoparticules présentant une bonne homogénéité en taille et en forme (Figure I-7a). Le diamètre mesuré, sur une population de 75 nanoparticules issues de différents champs, est de 24±3nm. On constate aussi une distribution en taille resserrée de ces particules (Figure I-7b).



(a) (b)

Figure I-7 : Cliché TEM de nanoparticules d'or obtenues après une l'étape de nucléation avec un ratio molaire citrate/$HAuCl_4$ de 2,8 (a) et distribution des tailles effectives mesurées au MEB (b)

Les images MEB obtenues après la première étape de croissance montrent des nanoparticules présentant une très bonne homogénéité en taille et en forme (Figure I-8a). Cette très bonne monodispersité se traduit également, sur les images MEB, par la formation d'un réseau bi-dimensionnel de nanoparticules. Le diamètre mesuré, sur une population de 75 nanoparticules issues de différents champs, est de 89±5nm. On constate aussi une distribution en taille resserrée de ces nanoparticules (Figure I-8b).

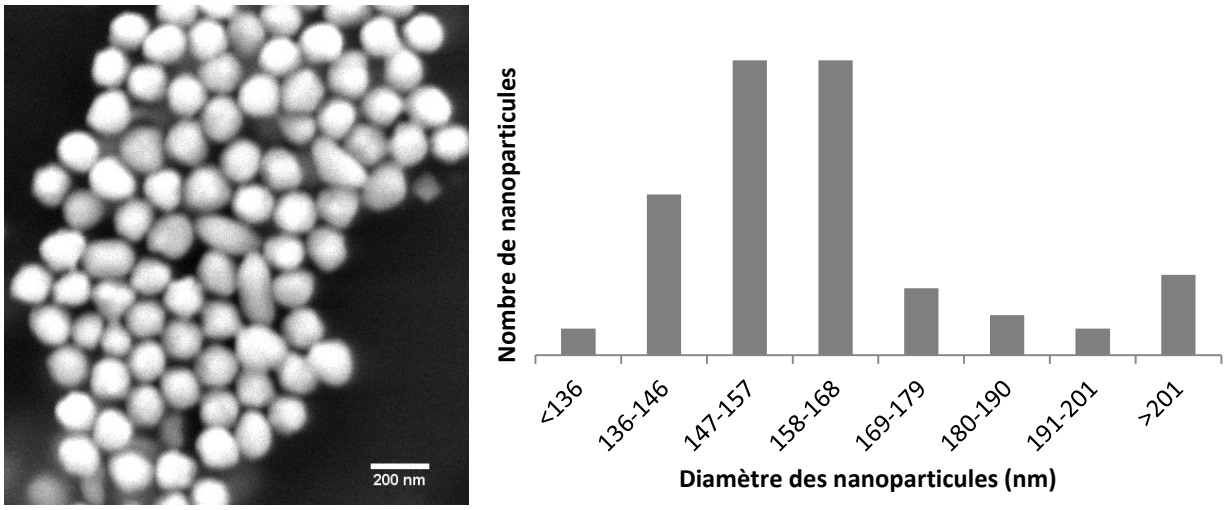


(a) (b)

Figure I-8 : Cliché MEB de nanoparticules d'or obtenues après une étape de croissance de germes (a) et distribution des tailles effectives mesurées au MEB (b) – V(germes)=780µL

Les images MEB obtenues après la deuxième étape de croissance montrent des nanoparticules présentant une bonne homogénéité en taille et en forme (Figure I-9a) en comparaison des nanoparticules obtenues par la méthode de Frens (Figure I-6). On peut cependant remarquer une

perte partielle de l'homogénéité en taille et en forme par rapport aux sphères de 89nm utilisées pour la croissance. En effet, la taille mesurée, sur une population de 75 particules, issues de champs différents, est de 163±29nm. Cette polydispersité en taille (Figure I-9b) est principalement due à la présence, en plus de la population de taille moyenne, de deux populations additionnelles de particules : l'une de faible taille (≈140-145nm) et l'autre de très grande taille (>200nm). En calculant la quantité d'or consommée par l'excès de croissance de la population de grandes particules, on peut constater que cette quantité correspond à la quantité d'or manquante pour combler le retard de croissance de la population de petites particules et ainsi obtenir une population homogène de nanoparticules, d'un diamètre d'environ 160nm. Par ailleurs, on peut observer l'apparition de faces nettes sur certaines nanoparticules, qui tend à expliquer l'hétérogénéité en forme. En effet, pour une telle taille de nanoparticules, les propriétés de l'or massif commencent à se manifester ce qui explique la présence de ces structures facettées et non sphériques imposées par les propriétés cristallines du matériau « bulk ».



(a) (b)

Figure I-9 : Cliché MEB de nanoparticules d'or obtenues après deux étapes de croissance de germes (a) et distribution des tailles effectives mesurées au MEB (b) – V(particules, d=85nm)=3,7mL

Du point de vue des propriétés plasmoniques, on peut constater une bande plasmon centrée sur 550nm dont l'intensité va croissante avec l'augmentation du nombre d'étapes de croissance (Figure I-10). On constate également l'apparition d'une seconde bande plasmon, très large et centrée sur 700nm, pour les particules ayant subi deux étapes de croissance. Toutefois, cette bande plasmon n'atteint que partiellement l'objectif de 800nm puisque l'absorbance à 800nm est nettement en deçà de l'absorbance au maximum du pic. Un tel comportement est également rencontré par Bastus[119] ou Rodriguez-Fernandez[120], lesquels décrivent un phénomène similaire pour des bandes plasmons situées au-delà de 650-700nm. Cette difficulté à dépasser cette barrière est à relier aux propriétés

des nanoparticules d'or qui, pour de telles dimensions, cessent de se comporter comme des dipôles mais plutôt comme des multipôles. En effet, pour de telles tailles, les nanoparticules d'or sont le plus souvent polycristallines et facettées, ce qui n'est plus compatible avec un comportement dipolaire.

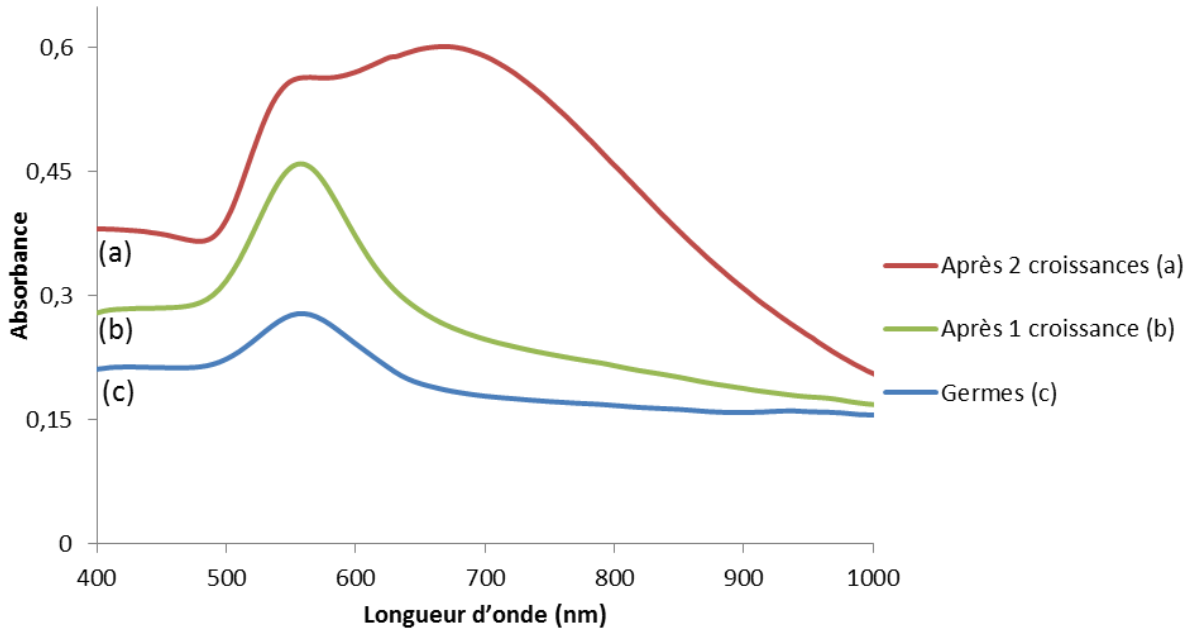


Figure I-10 : Spectre d'absorption UV-Vis des nanoparticules d'or obtenues lors des différentes étapes d'une synthèse par croissance de germes. Diamètre moyen des germes : 24nm, après la 1ère étape de croissance : 89nm, après la 2ème étape de croissance : 163nm

Au vu de ces résultats, la possibilité de rajouter une troisième étape de croissance pour déplacer encore la bande plasmon vers le rouge peut être envisagée[119]. Cependant, au-delà d'une taille de 180 à 200nm de diamètre, les propriétés cristallines de l'or « bulk » deviennent prépondérantes et il n'est donc pas possible d'obtenir des nanosphères de dimensions supérieures avec une homogénéité en forme et en taille acceptable. De plus, même pour ces tailles limites, les travaux de Bastus et de Perrault dans ce domaine montrent qu'il est difficile de déplacer le maximum de la bande plasmon au-delà de 700-730nm environ[119,117] pour de telles dimensions.

Enfin, il a été constaté expérimentalement que ces grosses nanoparticules sont très sensibles, en termes d'agrégation, lors des étapes de centrifugation. Dans le cadre de cette thèse, ces nanoparticules seraient nécessairement très largement exposées à ce risque compte tenu des nombreuses étapes de fonctionnalisation prévues. Aussi, cette limite est-elle un frein important à l'utilisation de ces structures.

II.2.3. Nanorods d'or

A cause de la difficulté à obtenir des nanosphères dont la bande plasmon serait au-delà de 730nm, la synthèse de nanorods a été réalisée.

Il est possible de contrôler finement le rapport d'aspect des nanorods. Ainsi on peut ajuster précisément la position de la bande plasmon de ces nanoparticules. Nos nanorods sont synthétisés par la méthode décrite par Nikoobakht *et al*[129], c'est-à-dire en présence de sels d'argents puisqu'elle permet une meilleure monodispersité et reproductibilité pour des rods de faible rapport d'aspect (AR<10-12). Dans cette synthèse, le rapport d'aspect est sensible à la concentration en sels d'argent et à la présence d'ions parasites, notamment les ions iodures[118,134,135], comme nous l'avons expliqué au § I.2.4.2 du chapitre I. On pourra retrouver ces traces d'iodures dans certains lots de CTAB. Disposant de deux lots de CTAB issus de deux fournisseurs, Merck et Sigma Aldrich, nous avons dans un premier temps étudié ce paramètre, avant de nous pencher sur l'influence de l'argent.

II.2.3.1. Influence du lot de CTAB sur la synthèse de nanorods

Dans ces travaux, nous avons utilisé deux lots de CTAB : un lot Merck, de spécification inconnue, et un lot Sigma Aldrich, affichant une pureté supérieure à 99%. Compte tenu de la très faible teneur en iode, de la complexité à doser des traces d'iode dans un composé riche en brome et de la sensibilité importante de la réaction à l'iode[118], nous avons choisi de réaliser une synthèse en conditions identiques en utilisant chacun des deux lots de CTAB et une quantité de sels d'argent telle que $[Ag^+]$=100µM. L'iode inhibant la croissance des rods, une synthèse utilisant un lot davantage pollué par l'iode produira des nanorods avec un rapport d'aspect plus faible et donc une bande plasmon décalée vers le bleu.

On peut constater, sur la Figure I-11 que le maximum de la bande plasmon des nanorods obtenus avec le CTAB Sigma Aldrich est décalée d'environ 60nm vers le rouge. On peut donc en conclure que ce lot est plus pur que le lot Merck vis-à-vis des ions iodures. Compte tenu de cette meilleure pureté, nous avons choisi d'utiliser ce lot Sigma Aldrich pour la suite des synthèses de nanorods.

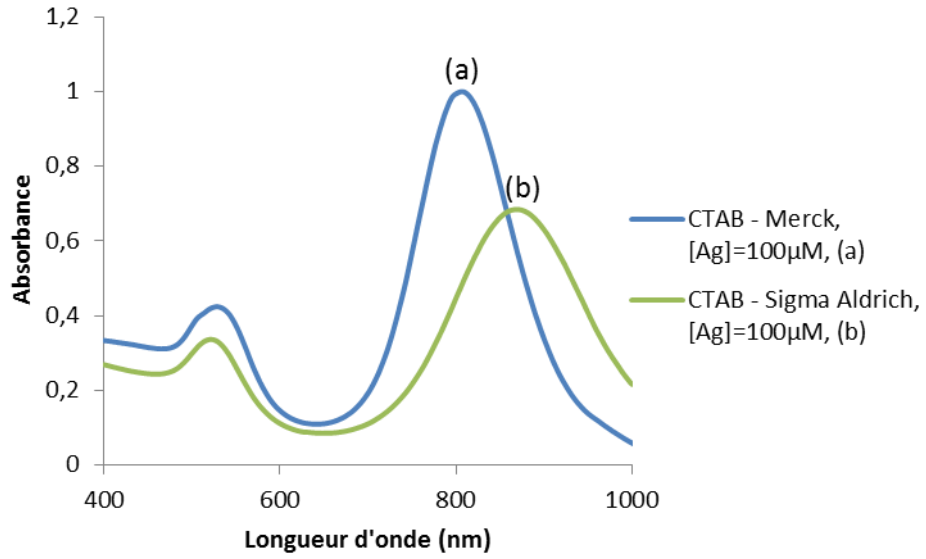


Figure I-11 : Bandes plasmons de deux séries de nanorods obtenues avec 2 lots de CTAB différents

II.2.3.2. Influence de la concentration en argent

Un lot de CTAB ayant été choisi et son influence étudiée, il est maintenant possible d'évaluer l'impact de la concentration en argent sur le rapport d'aspect des nanorods issus de nos synthèses.

Le rôle de l'argent dans la croissance des nanorods a fait l'objet de différentes études[11819,118,132,133]. Celles-ci montrent que le complexe [Ag^+-CTAB] formé en solution présente la capacité d'inhiber la croissance en largeur des nanorods. Ainsi, un accroissement de la concentration en argent permet d'obtenir des nanorods dont le rapport d'aspect est plus élevé. Toutefois, compte tenu de la sensibilité de la synthèse (notamment aux traces d'iode), il n'existe pas de concentrations standards permettant d'obtenir, à priori, des nanorods de bonnes dimensions. Il est donc nécessaire d' « étalonner » nos conditions de synthèse pour pouvoir déterminer la relation entre rapport d'aspect et concentration en argent.

Ainsi, différentes concentrations d'argent, comprises entre 20µM et 100µM ont été testées pour déterminer la gamme de rapports d'aspect accessibles. A l'issue de ces synthèses, les nanoparticules ont été caractérisées en TEM et en spectroscopie d'absorption UV-Vis. Afin de pouvoir comparer plus facilement les différentes bandes plasmons, les spectres obtenus sont normalisés à 450nm. Cette approche est utilisée par de nombreux auteurs[87,119,117,129] pour comparer les propriétés plasmoniques de différentes nanoparticules d'or.

On peut constater, sur la Figure I-12 que les bandes plasmons des nanorods issus de nos synthèses se décalent vers le rouge à mesure que la quantité d'argent augmente. Cette constatation est cohérente avec les prédictions théoriques.

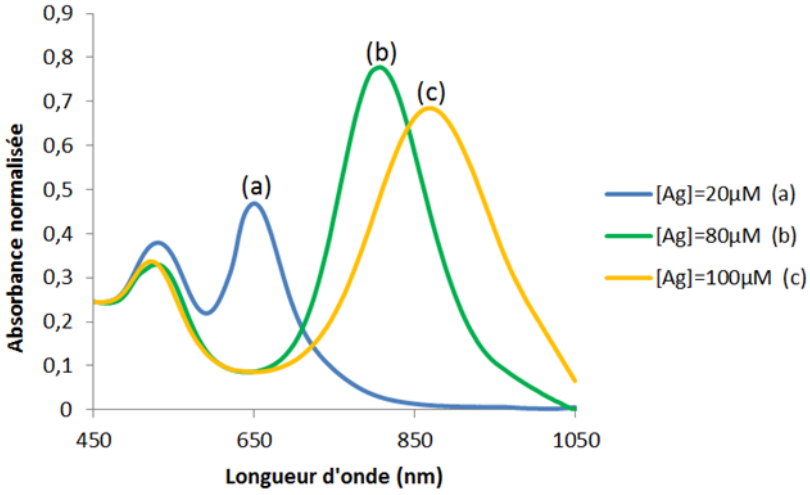


Figure I-12 : Bandes plasmons de trois séries de nanorods obtenues en variant la quantité de sels d'argent

Dans le cadre de ces travaux, les nanorods produits avec des concentrations en argent de 80 et 100µM sont particulièrement adaptés puisque leur bande plasmon est située dans la fenêtre de transparence du vivant (≈800-1000nm). Les nanorods avec une bande plasmon vers 790nm ([Ag]=80µM) sont particulièrement intéressants compte tenu du fait que les lasers utilisés pour la microscopie optique non linéaire et la photothérapie émettent le plus efficacement vers 810nm.

On peut remarquer que la bande plasmon à 525nm est variable mais nettement marquée. Cette bande peut correspondre à la bande plasmon transversale des nanorods ou à la bande plasmon de nanosphères qui peuvent être des sous-produits des synthèses de nanorods. Les nanorods présentant une bande plasmon vers 790nm ont ensuite été observés par TEM afin notamment de déterminer la présence de nanosphères.

A partir des images TEM, on peut constater la présence de nanosphères au sein des échantillons, sphères qui expliquent la présence assez marquée du pic plasmon à 525nm. Ainsi, pour l'échantillon synthétisé à partir d'une concentration en ions argent [Ag]=80µM (Figure II-13), après comptage sur 1000 particules issues de différents champs, on peut déterminer que cet échantillon contient environ 24% de sphères (en nombre) et que la taille moyenne des nanorods est de 42,8±1,8nm pour la longueur et de 11,5±0,5nm pour le diamètre. Cette taille correspond à un rapport d'aspect de 3,7.

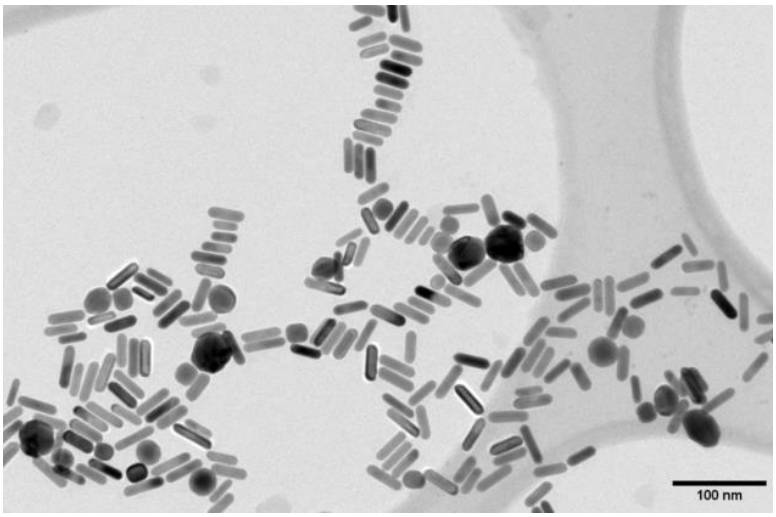


Figure I-13 : Clichés TEM de nanorods d'or avec une bande plasmon centrée sur 790nm (AR=3,7)

Il est connu que le comportement biologique des nanorods et des nanosphères puisse différer[276,277]. Les nanosphères sont, par exemple, davantage capables de pénétrer les cellules que les nanorods. Parallèlement, la surface spécifique des nanorods étant plus élevée que celle des nanosphères, certains phénomènes surface-dépendant pourront s'exprimer davantage dans le cas des nanorods. Aussi, y a-t-il un intérêt à purifier nos échantillons pour éliminer spécifiquement les nanosphères qu'ils contiennent.

II.3. Elimination sélective des nanosphères résiduelles issues des synthèses de nanorods

II.3.1. Procédure de purification

L'élimination des nanosphères issues des synthèses de nanorods a déjà été étudiée au cours de précédents travaux. Différentes solutions ont été proposées[278–281], principalement pour des nanorods de rapport d'aspect élevé (>10). Deux solutions ont pu être envisagées dans ces études : la chromatographie d'exclusion stérique[281] ou des méthodes par précipitation/centrifugation[278–280]. La chromatographie d'exclusion stérique présente plusieurs limites : D'une part, l'adsorption irréversible des nanoparticules dans la colonne ne peut être évitée. L'ajout de quantités importantes (≈50mM) de tensioactifs permet de résoudre partiellement ce problème. Néanmoins, l'adsorption restera présente, augmentant les pertes et aboutissant à un colmatage de la colonne. D'autre part, les auteurs décrivent que la différence de diamètre apparent entre sphères et rods est trop faible pour des rods de faible rapport d'aspect, ne permettant qu'une séparation partielle. Pour ces raisons, nous avons préféré exclure la purification par chromatographie d'exclusion stérique.

Jana[280] et Khanal[279] proposent quant à eux des techniques basées sur la précipitation des nanorods de grande longueur (>200nm, AR≈20) en présence de fortes concentrations de CTAB. Dans les travaux de Jana *et al*, une solution chaude de CTAB concentrée est utilisée pour précipiter le CTAB et des nanorods. Jana *et al* suggèrent que la précipitation des nanorods et du CTAB est liée à l'auto-assemblage des nanorods lors de l'abaissement de la température. Pour Khanal *et al*, la précipitation est induite par l'auto-assemblage des nanorods après leur exposition prolongée (14h) à de fortes quantités de CTAB et de sels d'or. Ces deux techniques paraissent difficiles à extrapoler à des nanorods de faible rapport d'aspect, pour lesquels ces auto-assemblages sont moins favorables.

La solution proposée par Sharma *et al*[278] se base sur la différence de propriétés hydrodynamiques entre nanosphères et nanorods pour réaliser une centrifugation différentielle. En effet, selon Sharma, les nanosphères minimisent le rapport surface/masse, ce qui minimise les frottements fluides, favorisant leur précipitation, vis-à-vis des nanorods. Dans le cas étudié, le mélange de nanosphères et de nanorods (AR=7,3) est centrifugé de sorte que les nanosphères tombent au fond du tube alors que les nanorods se déposent sur les parois inclinées du tube (Figure I-14).

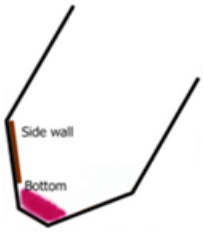


Figure I-14 : Schéma représentant la séparation des nanoparticules, d'après Sharma[278]. Les nanosphères tombent au fond du tube tandis que les nanorods restent sur les parois.

Cette technique paraît intéressante compte tenu de la simplicité de sa mise en œuvre. Cependant, il semble complexe de pouvoir isoler facilement chacune des deux fractions précipitées. Aussi, avons-nous cherché à améliorer cette technique, en l'appliquant à nos nanorods de plus faibles AR et en induisant la précipitation exclusive d'un seul des deux types de nanoparticules.

Les nanosphères sont, d'après Sharma *et al*[278], plus sensibles à la sédimentation. Par conséquent, en utilisant un protocole de centrifugation adapté, il peut être possible de précipiter spécifiquement les nanosphères tout en maintenant en suspension les nanorods. Dans notre cas, nous avons centrifugé nos suspensions mixtes nanorods/nanosphères à la vitesse de 6700g, durant 1min. Après chaque centrifugation, les surnageants sont isolés puis soumis à une nouvelle centrifugation à 6700g durant 1min. Les particules sont ainsi purifiées par 3 étapes de centrifugation à 6700g d'une minute chacune.

Afin de suivre l'efficacité de purification, la suspension initiale et les surnageants récupérés après chaque étape de purification sont étudiés par spectroscopie d'absorption UV-Vis. Parallèlement, les échantillons avant purification et après purification (c.à.d. après 3x1min de centrifugation) sont observés au TEM afin de déterminer le pourcentage de nanosphères et les valeurs exactes des rapports d'aspect.

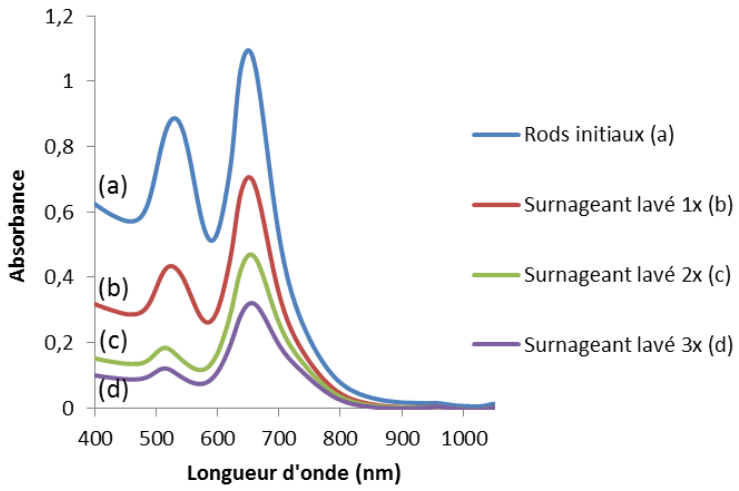
Pour réaliser ces essais, et étudier la flexibilité de notre protocole pour différents rapports d'aspect, trois populations de nanorods de tailles différentes ont été utilisées, présentant des bandes plasmons respectivement centrées sur 650, 790 et 940nm. La dimension des nanorods et nanosphères présentes dans ces différents échantillons sont résumés dans le Tableau I-1.

Echantillon	Rods 650nm (AR=2,4)	Rods 790nm (AR=3,7)	Rods 940nm (AR=5,3)
Dimension des nanorods			
Petite longueur :	$18,9 \pm 1,4$	$11,5 \pm 0,5$	$9,9 \pm 1,1$
Grande longueur :	$45,2 \pm 1,9$	$42,8 \pm 1,8$	$52,8 \pm 3,5$
	Bimodale	Bimodale	Bimodale
Dimension des nanosphères :	$25,3 \pm 2,1$	$22,0 \pm 1,2$	$20,6 \pm 0,9$
	$47,4 \pm 1,7$	$39,0 \pm 2,7$	$46,1 \pm 3,8$

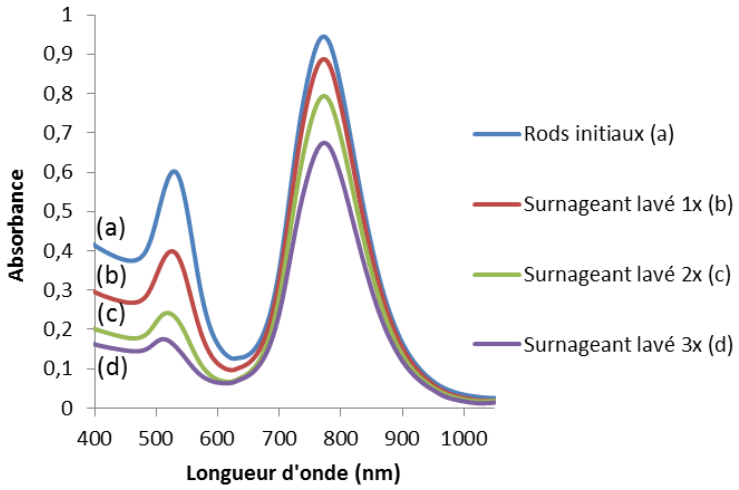
Tableau I-1 : Dimensions des nanoparticules composant les échantillons de nanorods de différents rapports d'aspect avant et après élimination des nanosphères par centrifugation

II.3.2. Résultats

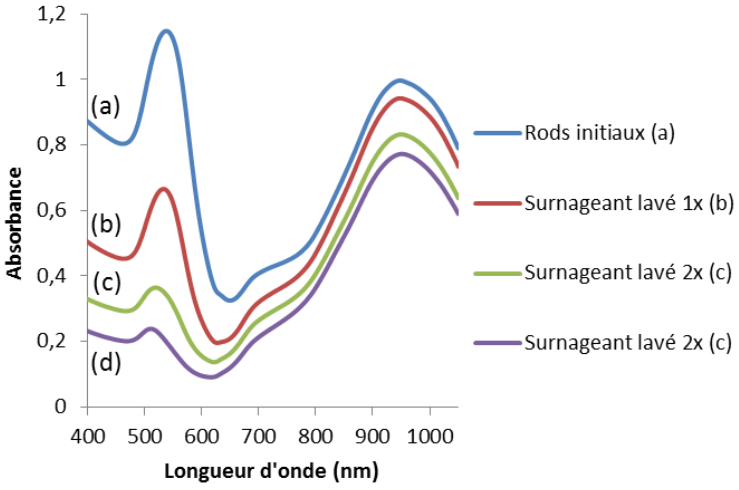
Les spectres d'absorption UV-Visible pour chacune des trois séries de nanorods montrent une diminution des deux pics plasmons après chaque étape de centrifugation (Figure I-15) explicable par une diminution de la concentration en nanoparticules au fil des lavages. On constate toutefois une diminution plus importante du pic plasmon à 525nm par rapport au pic plasmon de la résonance longitudinale des nanorods.



Rods présentant une bande plasmon à 650nm (AR=2,4)



Rods présentant une bande plasmon à 790nm (AR=3,7)



Rods présentant une bande plasmon à 940nm (AR=5,3)

Figure I-15 : Spectres d'absorption UV-Visible de nanorods d'or avant et après purification

Afin de déterminer l'efficacité de la purification, une approche consistant à simplement mesurer le ratio d'absorbance A_{max}/A_{525nm} peut être envisagée. Toutefois, une telle mesure est approximative. En effet, pour des nanorods de grande dimension, une population de nanoparticules de tailles variables est générée au cours de la synthèse. Cette dispersion en taille implique une dispersion des propriétés plasmoniques et donc une bande plasmon moins haute mais plus large. Ainsi, une analyse par comparaison des valeurs d'absorbance au sommet du pic plasmon peut apporter un certain biais pour les populations non monodisperses.

Une analyse par mesure de l'aire sous la courbe pourrait apporter une solution à ce problème. Toutefois, deux limites doivent être envisagées : la difficulté à déterminer la ligne de base à cause de la diffusion de la lumière et la nécessité de disposer d'un spectromètre d'absorption UV-Visible couvrant la plage 400-1400nm (notamment pour les échantillons de nanorods de grande taille dont les propriétés plasmoniques s'étalent du visible à l'infrarouge). Dans notre cas, notre spectrophotomètre ne permet pas de détection au-delà de 1050nm, ce qui n'a pas permis, d'un point de vue pratique, de réaliser une telle caractérisation. Enfin, les nanorods absorbent également la lumière vers 525nm. Ainsi l'absorbance à 525nm est une somme des absorbances des nanorods et des nanosphères ce qui complique l'interprétation. A l'inverse, la microscopie électronique en transmission (Figure I-16) permet de réaliser des comptages de nanoparticules qui peuvent être utilisés pour quantifier l'efficacité des lavages. Ces mesures sont toutefois plus longues et ne permettent pas un suivi en direct de l'efficacité des lavages. Aussi, dans ce cas, nous sommes nous seulement intéressés au gain entre les échantillons initiaux non lavés et ceux lavés 3 fois.

Echantillon	Pourcentage de sphères avant lavages	Pourcentage de sphères après lavages	Gain apporté par les lavages*	Rendement des lavages**
Rods 650nm (AR=2,4)	28,1%	9,6%	2,9	28%
Rods 790nm (AR=3,7)	24,0%	7,0%	3,4	71%
Rods 940nm (AR=5,3)	28,0%	8,3%	3,4	77%

*Le gain correspond au ratio des pourcentages de nanosphères après et avant purification

**Le rendement définit le pourcentage de nanorods conservé en fin de purification et correspond au ratio des absorbances des pics plasmons des nanorods avant et après purification

Tableau I-2 : Pourcentages de nanosphères dans des échantillons de nanorods de différents rapports d'aspect avant et après élimination des nanosphères par centrifugation

Chaque comptage a été réalisé sur un minimum de 1000 nanoparticules issues d'au moins 8 champs différents par échantillon, afin d'éviter des problèmes de non représentativité des images étudiées. Le rapport d'aspect a également été mesuré, en se basant sur 75 nanorods, issus de champs différents.

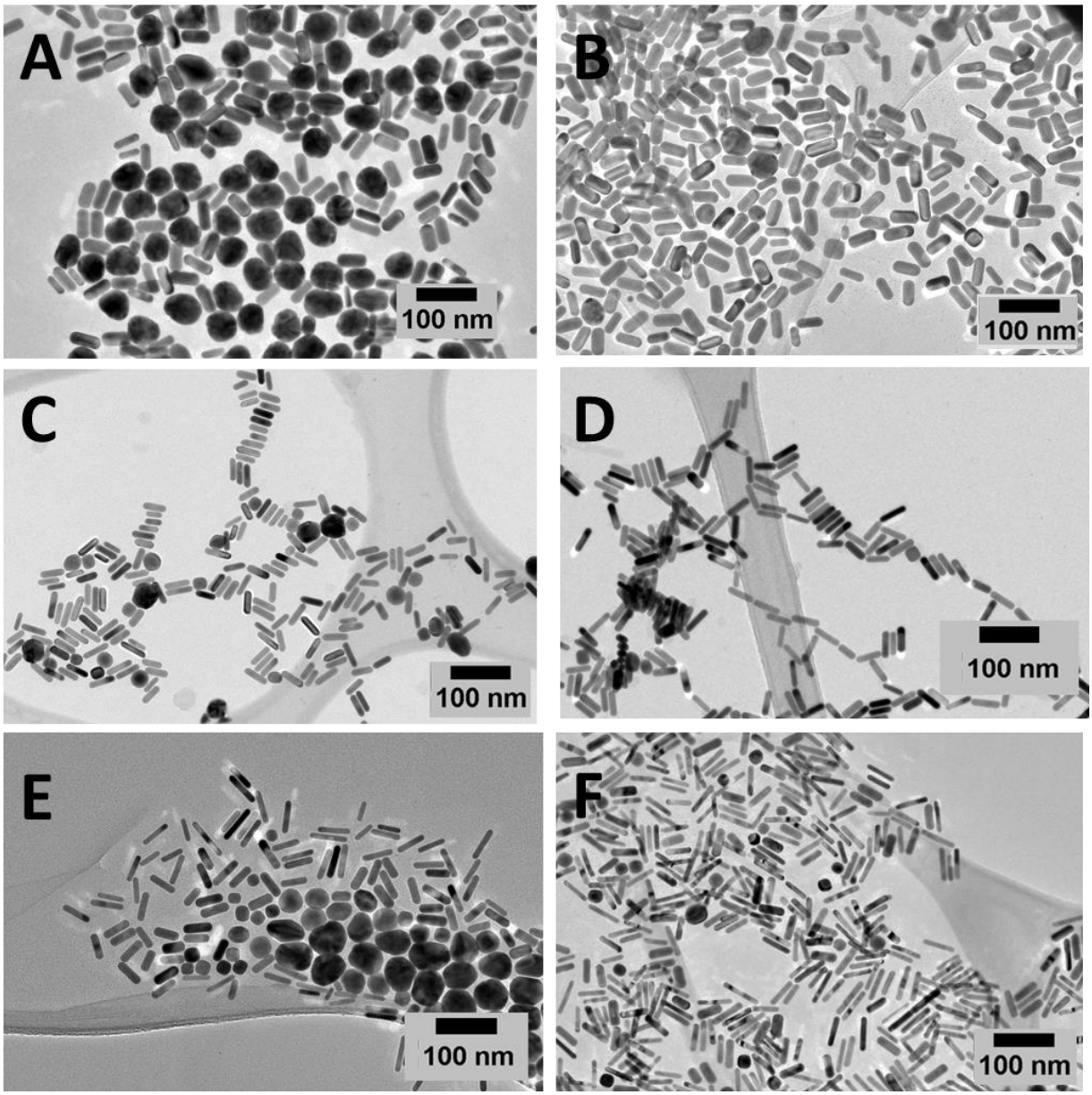


Figure I-16 : Clichés TEM des échantillons avant (à gauche) et après (à droite) élimination des sphères d'or résiduelles dans des échantillons de nanorods de différents rapports d'aspect : 2,4 (A et B) ; 3,7 (C et D) ; 5,3 (E et F)

On constate donc que cette purification fonctionne pour toutes tailles de nanorods mais que son efficacité est légèrement améliorée pour les nanorods de grande taille. D'un point de vue empirique, il paraît cohérent que des nanorods de faible rapport d'aspect aient un comportement plus proche de nanosphères (dont le rapport d'aspect est de 1). Par ailleurs, on pourra remarquer que le rendement de purification est lui nettement impacté par cette variation de rapport d'aspect. Ainsi,

les rendements de purification des nanorods de grande dimension (AR=3,7 et 5,3) sont globalement assez proches alors que pour les nanorods de petite dimension, ce rendement chute nettement, montrant les limites de la technique pour séparer des nanoparticules dont les dimensions sont très proches (Tableau I-1).

Différents auteurs[278,282,283] ont décrit cette différence de comportement hydrodynamique entre nanorods et nanosphères par différents modèles. Ces auteurs montrent ainsi que l'accroissement du rapport d'aspect entraine une diminution de la vitesse de sédimentation. Ainsi, soumis à la force centrifuge, des nanorods de rapport d'aspect élevé sédimenteront plus lentement (donc nécessiteront des temps de centrifugation plus longs) que des nanosphères (dont le rapport d'aspect vaut 1). Cette loi théorique est totalement en accord avec nos résultats et pourrait expliquer le rendement de purification inférieur, constaté pour les nanorods dont le rapport d'aspect est le plus faible. Toutefois, pour de faibles différences de rapport d'aspect, cette différence reste relativement limitée, ce qui explique la présence résiduelle de sphères (7 à 10% en nombre)

A contrario des études déjà décrites présentant des méthodes complexes, à bas rendements ou inopérantes pour des nanorods de faible AR, nous avons pu montrer qu'une ségrégation en forme de populations de nanoparticules de tailles similaires, est réalisable en utilisant un procédé simple de centrifugation. Il conviendra toutefois de remarquer que cette méthode, pour être extrapolée à d'autres nanoparticules, nécessitera des adaptations aux nanoparticules étudiées, même s'il peut s'agir d'autres nanoparticules d'or.

II.4. Nanoparticules de SiC

Les nanoparticules de SiC vont jouer, pour la suite de ce travail, un rôle central. En effet, ces nanoparticules vont jouer le rôle de « plateforme d'ancrage » possédant à la fois des propriétés SHG et une chimie de surface permettant la réalisation d'assemblages complexes. Ainsi, il est très important de caractériser en détail ces nanoparticules.

II.4.1. Synthèse des nanoparticules de SiC

Les nanoparticules de SiC que nous avons utilisé durant ces travaux sont fournies par la société KM Labs. Ces nanoparticules sont produites par réduction carbothermale de la silice selon le procédé suivant : des poudres de silice amorphe, de sucrose et d'acide citrique sont mélangées dans l'eau durant une heure. Le mélange est ensuite séché et mis sous forme de pastilles. Ces pastilles sont

ensuite carbonisées à 240°C. La poudre obtenue est ensuite mélangée et chauffée dans un four à 1420°C, sous flux d'argon. Le diamètre annoncé par le fournisseur est de 150nm environ.

Cette poudre de nanoparticules de SiC ne permet pas d'obtenir des suspensions colloïdales stables que ce soit dans un solvant polaire comme l'eau et l'éthanol ou un solvant apolaire comme le trichlorométhane. A titre indicatif, les nanoparticules précipitent en moins de 20s dans ces solvants. Afin de faciliter leur redispersion, la surface des particules de SiC est oxydée selon le procédé suivant :

500mg de poudre de SiC sont chauffés dans un four à 600°C, sous air, pendant 1h puis laissés dans le four jusqu'à refroidissement complet. 6mL d'une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium à 9M est utilisée pour redisperser les nanoparticules. Les nanoparticules sont soniquées durant 1h, et vortexées toutes les 10min. Les nanoparticules sont ensuite centrifugées à 1000g durant 1min. Les culots sont isolés puis redispersés dans l'eau et soniqués 5min. Deux étapes supplémentaires de centrifugation et redispersion sont réalisées. Les nanoparticules sont ensuite centrifugées à 3000g durant 3min puis redispersées dans l'eau et soniquées. Le volume de suspension est complété à 15mL, la suspension est homogénéisée puis laissée à décanter durant 24h. Le surnageant est alors isolé et conservé à 4°C. La partie décantée du SiC est séchée à 120°C durant 48h puis pesée, pour estimer la concentration en nanoparticules dans le surnageant. Sur les 500mg initiaux, 50mg sont redispersés de manière stable. La concentration massique en nanoparticules obtenue est donc proche de 3g/L. Le rendement de cette étape d'oxydation-redispersion est donc d'environ 10%.

II.4.2. Résultats

Les nanoparticules de SiC sont caractérisées de quatre manières différentes. Les propriétés structurales des nanoparticules sont étudiées par XRD et MEB tandis que les propriétés chimiques seront étudiées par spectroscopie infrarouge, XPS et mesure du potentiel zêta. Ces différentes techniques ainsi que les paramètres expérimentaux utilisés sont décrits en Annexe 1.

II.4.2.1. Propriétés structurales des nanoparticules de SiC

L'étude des propriétés structurales du SiC est fondamentale pour déterminer ses propriétés optiques. En effet, pour posséder des propriétés optiques non linéaires, il est obligatoire de disposer de nanoparticules non centrosymétriques. Ainsi, la structure recherchée pour nos nanoparticules de SiC est une structure cubique, de symétrie $\overline{4}3\mathrm{m}$, notée SiC-3C. Cette caractérisation est réalisée

avant et après oxydation, au cas où le traitement thermique à 600°C provoquerait une transition de phase au sein du SiC.

On peut constater sur les diffractogrammes issus de nos nanoparticules de SiC un chevauchement constant des courbes avant et après recuit (Figure I-17). On peut donc en déduire que le recuit n'a pas d'impact sur la structure cristalline des nanoparticules. Par ailleurs, la comparaison avec un diffractogramme de référence[284] (Figure I-18) permet d'attribuer tous les pics du diffractogramme de nos nanoparticules à des pics du SiC-3C. On peut toutefois remarquer, sur la Figure I-17, un petit épaulement vers 34° du pic 111 du SiC-3C qui pourrait être attribué au pic 101 du SiC-6H (phase hexagonale).

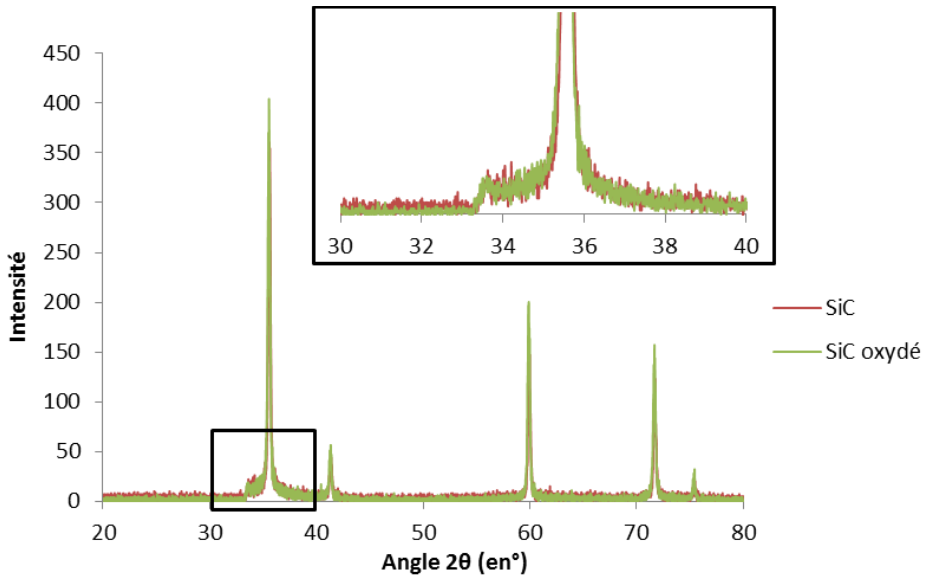


Figure I-17 : Diffractogramme de poudre des nanoparticules de SiC avant (SiC) et après recuit (SiC oxydé) et agrandissement sur la zone 30-40°

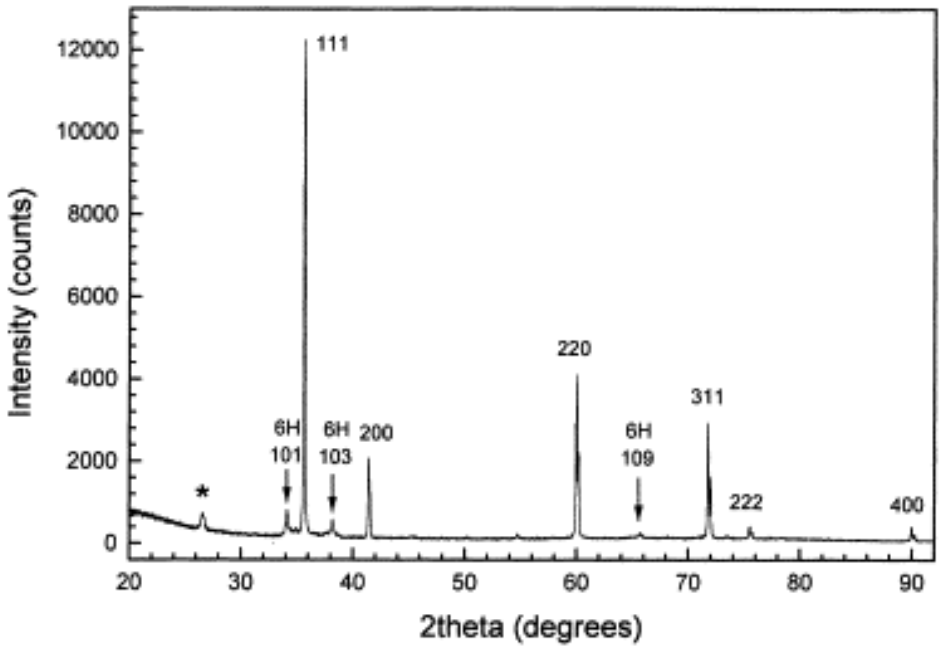
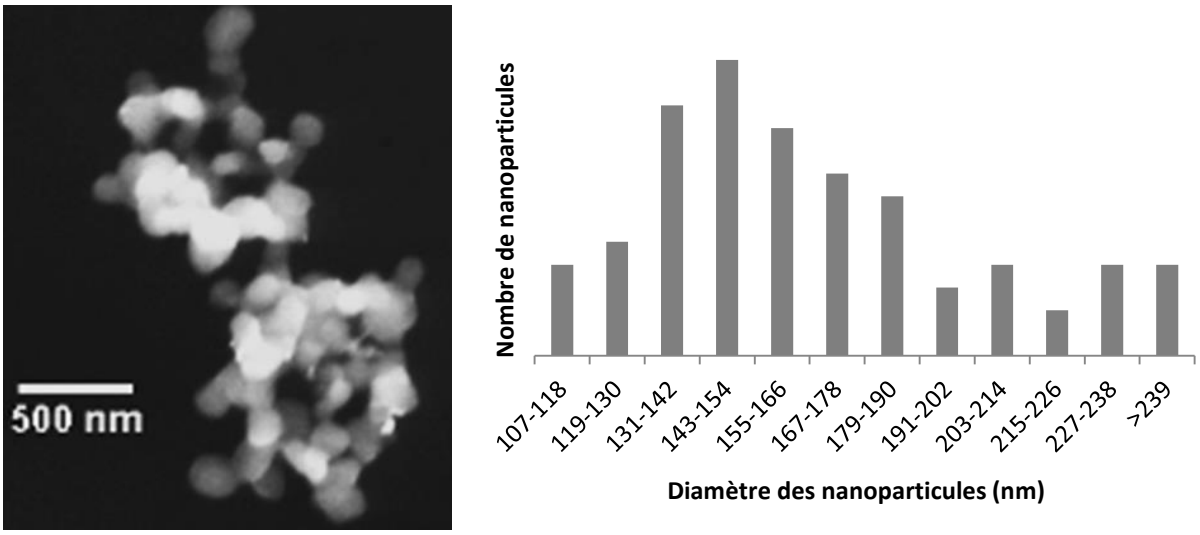


Figure I-18 : Diffractogramme de référence d'une poudre de SiC-3C[284]

Les nanoparticules de SiC ont également été observées au MEB. Les nanoparticules avant oxydation ne pouvant être resuspendues efficacement dans un solvant, après dépôt, seuls des agrégats de plusieurs centaines de micromètres ont pu être observés, sans possibilité d'obtenir des images nettes permettant une caractérisation en forme ou en taille.

Pour les nanoparticules après recuit, les images MEB (Figure I-19a) révèlent des nanoparticules de forme globalement sphérique, parfois légèrement elliptiques. La taille moyenne, mesurée sur 75 nanoparticules est de 167±37nm (Figure I-19b). On peut cependant remarquer que la distribution en taille est centrée aux environs de 150nm, ce qui est proche de la taille annoncée par le fabricant, mais que quelques grosses nanoparticules (>230nm voire 280nm) sont présentes et augmentent significativement la taille moyenne et la dispersion en taille. Compte tenu de la part importante que représentent les particules de 150nm de diamètre, pour les calculs ultérieurs impliquant des calculs de surface, nous nous sommes basés sur cette taille de 150nm, plus représentative de l'échantillon.



(a) (b)

Figure I-19 : Cliché MEB des nanoparticules de SiC obtenues après oxydation (a) et distribution des tailles effectives mesurées au MEB (b)

II.4.2.2. Propriétés chimiques de surface des nanoparticules de SiC

Les propriétés de surface des nanoparticules ont été étudiées par spectroscopie infrarouge, spectroscopie XPS et par mesure du potentiel zêta. Le potentiel zêta nécessitant de disposer de suspensions colloïdales stables (pendant au moins quelques minutes), cette caractérisation n'a été possible que pour l'échantillon obtenu après recuit et traitement en conditions alcalines.

II.4.2.2.1. Mesures de potentiel zêta

Le potentiel zêta moyen des nanoparticules après recuit varie de -40mV à -50mV selon les échantillons. Ce potentiel est quasi constant entre pH 4,5 et 12. Le potentiel zêta n'a pas pu être mesuré pour des pH plus acides, une corrosion des cuves à ces pH ayant été constatée. On peut déduire de ce potentiel négatif que ces particules présentent des fonctions chargées négativement à pH neutre, comme des groupements carboxylates ou des silanols déprotonés. Ce résultat est tout à fait cohérent avec la très grande stabilité de la suspension colloïdale après ce traitement. Le temps nécessaire à l'apparition de la décantation passe en effet de moins de 20s avant traitement (thermique + KOH), à plusieurs jours après traitement.

II.4.2.2.2. Spectroscopie Infrarouge

Le spectre infrarouge (Figure I-20) obtenu présente relativement peu de pics spécifiques. On peut retrouver sur les spectres des 3 échantillons certains pics communs. Le pic marqué à 750cm^{-1} et présentant un épaulement à 810cm^{-1} est caractéristique des phonons du SiC[173,285]. On peut également remarquer les pics à 1525cm^{-1} et 1615cm^{-1} qui correspondent à des modes de combinaisons[285] de ces deux phonons à 750cm^{-1} et 810cm^{-1}. Enfin on remarque un pic inversé à 970cm^{-1}, caractérisé par une transmittance nettement augmentée. L'explication de cet antipic est débattue, les principales raisons avancées par les différents auteurs sont l'effet Christiansen[286] et l'effet Reststrahlen[287–289]. Sans rentrer dans le détail de ces phénomènes, ces deux effets sont liés à des changements d'indices de réfraction dans le matériau pour une plage étroite et spécifique de longueur d'onde. Ce changement d'indice de réfraction induit alors une réflexion accrue de la lumière incidente, pour cette longueur d'onde, se traduisant par un antipic.

Après recuit, on peut constater l'apparition d'un massif de faible intensité entre 1055cm^{-1} et 1230cm^{-1} (pointé sur la Figure I-20). Ce massif peut correspondre à la formation de ponts Si-O-Si ou Si-O-C liée à l'oxydation de la surface des nanoparticules lors du recuit sous air. La présence d'un tel massif est confirmée par les travaux de Vörös[290] et Alekseev[285]. Enfin, après le traitement par la solution aqueuse d'hydroxyde de potassium, il est intéressant de noter que ce pic disparait. Ce pic est peut-être simplement noyé dans le signal du SiC. Cette disparition peut aussi être expliquée par l'hydrolyse (favorisée en conditions alcalines) des liaisons Si-O-Si et Si-O-C au profit de liaisons Si-OH et C-OH, liaisons qui expliqueraient le potentiel zêta largement négatif de nos nanoparticules ainsi que le gain remarquable en stabilité des particules, une fois traitées par KOH. On constate par ailleurs la formation d'un massif marqué entre 3650cm^{-1} et 2900cm^{-1} qui corrobore la présence des liaisons O-H et cette hypothèse de l'hydrolyse. On remarque également l'intensification du pic phonon à 1620cm^{-1}. L'interprétation de cette intensification est complexe. En effet, ce pic peut correspondre à des liaisons C=O de groupements carboxylates, qui tendrait à prouver la formation de groupement carboxylates de surface. Vörös[290] et Alekseev[285] obtiennent des pics similaires et concluent à la présence de tels groupements sur ces particules de SiC. Toutefois, ce pic est également rencontré dans le cas des surfaces de silice hydratées, lesdites surfaces présentant de très nombreux groupements silanols[291]. L'échantillon ayant été séché à 130°C durant une nuit avant analyse, cette hypothèse de l'hydratation paraît moins plausible.

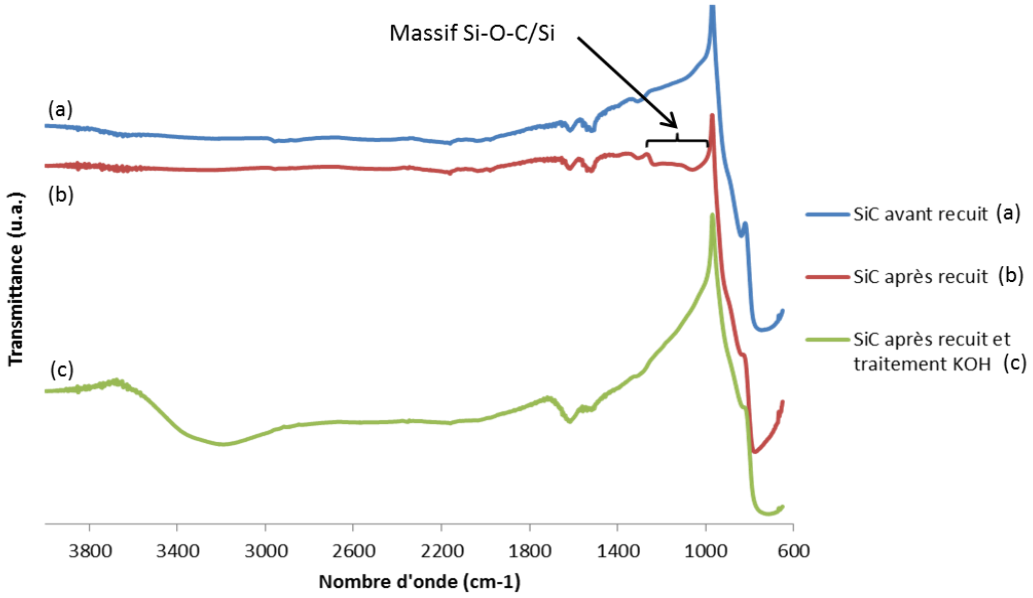


Figure I-20 : Spectres infrarouges de nanoparticules de SiC obtenus avant (a) et après traitements thermiques (b) et chimiques par KOH (c)

II.4.2.2.3. Analyses XPS

Le Tableau I-3 présente les pourcentages atomiques de C, O et Si déterminés par XPS pour les échantillons de SiC avant traitement et après traitement thermique et alcalin. On peut constater que le traitement thermique et alcalin aboutit à une augmentation de la concentration en oxygène au détriment du silicium.

Echantillon	Pourcentage atomique (%)			
	C	O	Si	Autres
SiC avant traitement	52,53±1,4	9,6±0,8	37,7±1,5	<0,5
SiC après traitement	51,52±0,48	13,5±0,42	34,95±0,5	<0,5

Tableau I-3 : Pourcentages atomiques, déterminés par XPS, de nanoparticules de SiC avant et après traitement thermique et alcalin

De plus, en regardant en détail le niveau Si2p (Figure I-22), on peut constater que le niveau Si2p présente 4 pics distincts avant traitement puis seulement 3 après traitement. On constate que les deux pics vers 100,8 et 101,3eV, typiques des liaisons SiC se maintiennent. En revanche, les pics à 103,8eV et 102,7eV, typiques d'un silicium fortement oxydé disparaissent au profit d'un pic unique à 102,08eV. On peut imaginer, compte tenu de ce degré d'oxydation élevé, que les nanoparticules de SiC non traitées présentent une fine couche de silicium fortement oxydé qui disparait après traitement thermique et alcalin, pour laisser sa place à un silicium moins oxydé. Il est ainsi possible d'envisager une attaque de la silice par le KOH concentré, induisant la formation de nombreux

silanols déprotonés. Ce mécanisme coïncide assez bien avec le comportement de nos nanoparticules en suspension. Ces suspensions de nanoparticules sont en effet instables avant et après traitement thermique, mais deviennent très stables après traitement alcalin, à condition de redisperser les nanoparticules dans de l'eau (la forte concentration en KOH induisant un écrantage des charges qui déstabilise la suspension). L'analyse XPS du carbone ne montre aucun changement entre les deux types de nanoparticules. On peut donc en conclure que l'abaissement du potentiel zêta est causé exclusivement par l'apparition de silanols.

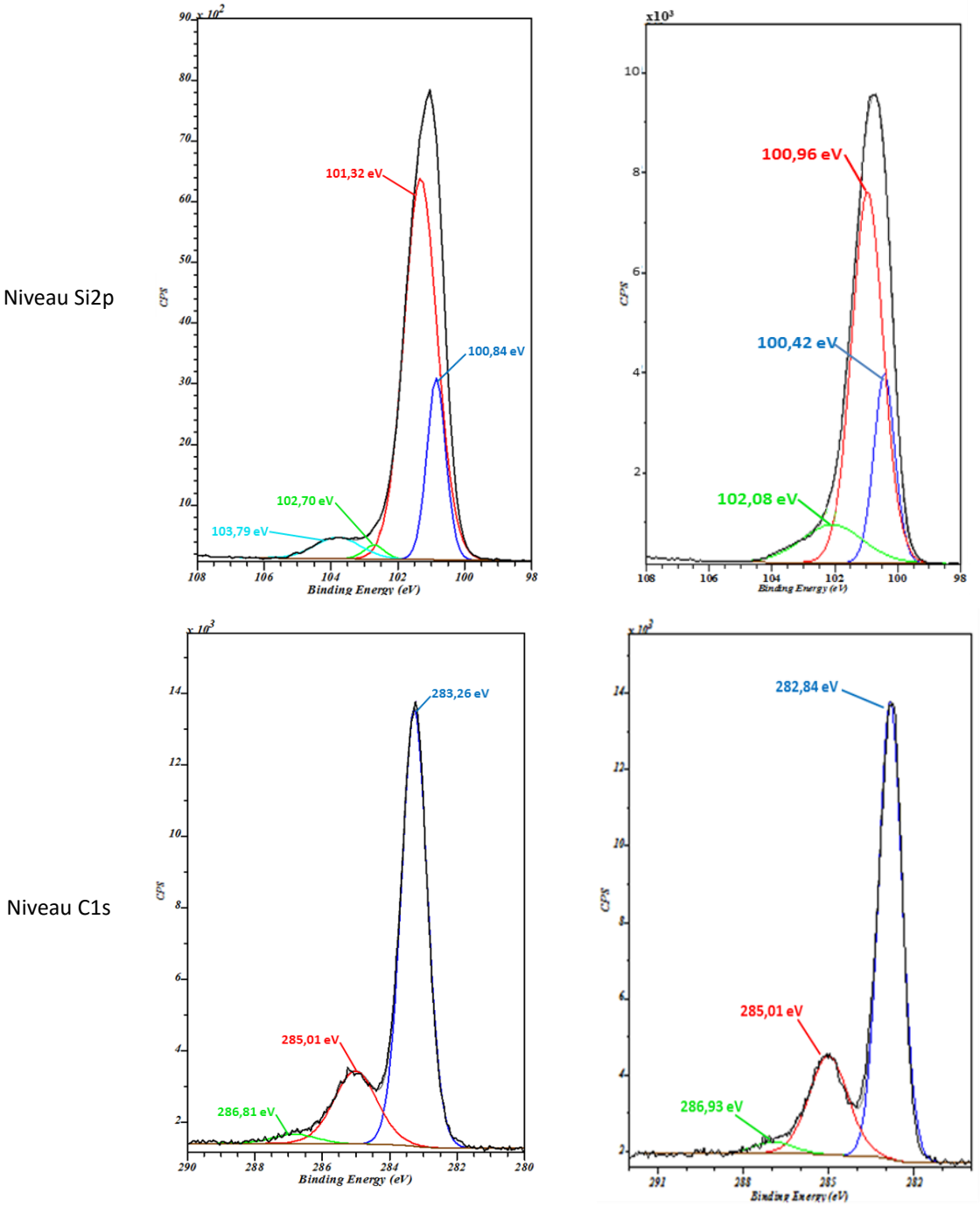


Figure I-21 : Spectres XPS des niveaux Si2p, C1s et N1s des nanoparticules de SiC avant (gauche) et après (droite) traitement thermique et alcalin

II.4.2.3. Conclusions sur la chimie de surface des nanoparticules de SiC

A l'issue de ces analyses, on peut donc conclure que nos nanoparticules de SiC présentent des propriétés de surface tout à fait intéressantes du point de vue de la fonctionnalisation comme la présence de silanols, ce qui permettrait leur réaction avec des silanes. De plus la stabilité remarquable de ces nanoparticules est également un point capital pour permettre leur fonctionnalisation.

Au-delà de ces propriétés chimiques, ces nanoparticules de SiC présentent également toutes les caractéristiques structurales nécessaires pour être actives en SHG. La caractérisation effective des propriétés non linéaires de ces nanoparticules sera abordée dans un chapitre ultérieur.

II.5. Nanoparticules de $KNbO_3$

II.5.1. Synthèse des nanoparticules de $KNbO_3$

Les nanoparticules de $KNbO_3$ sont produites par la société FEE GmbH par broyage de cristaux massifs de $KNbO_3$ resuspendus dans l'heptane au moyen d'un broyeur à billes. Les propriétés structurales des nanoparticules sont déterminées par XRD et au MEB. Les propriétés chimiques seront étudiées par spectroscopie infrarouge et mesure du potentiel zêta. Afin d'obtenir une dispersion la plus homogène en taille et d'éliminer les plus grosses particules, il est nécessaire d'effectuer un tri en taille :

40mg de poudre de $KNbO_3$ sont dispersés dans 10mL d'eau. La dispersion est soniquée durant 30min. La solution est transférée dans une fiole jaugée de 100mL, le volume de solution est complété à 100mL par de l'eau. La solution est laissée à décanter durant 1 semaine puis 80mL de surnageant sont prélevés et constituent une suspension colloïdale de $KNbO_3$. Compte tenu des faibles masses engagées, il n'est pas possible de peser un extrait sec de cette suspension avec précision et donc de déterminer une concentration en nanoparticules.

II.5.2. Résultats

II.5.2.1. Propriétés structurales des nanoparticules de $KNbO_3$

L'étude des propriétés structurales du $KNbO_3$ est fondamentale pour déterminer ses propriétés optiques. Ainsi, la structure recherchée, non centrosymétrique, est une structure orthorhombique, de symétrie Bmm2. On peut constater que le diffractogramme de notre échantillon (Figure I-22) correspond en tout point au diffractogramme de référence[292] (Figure I-23) pour des cristaux de $KNbO_3$ de structure orthorhombique.

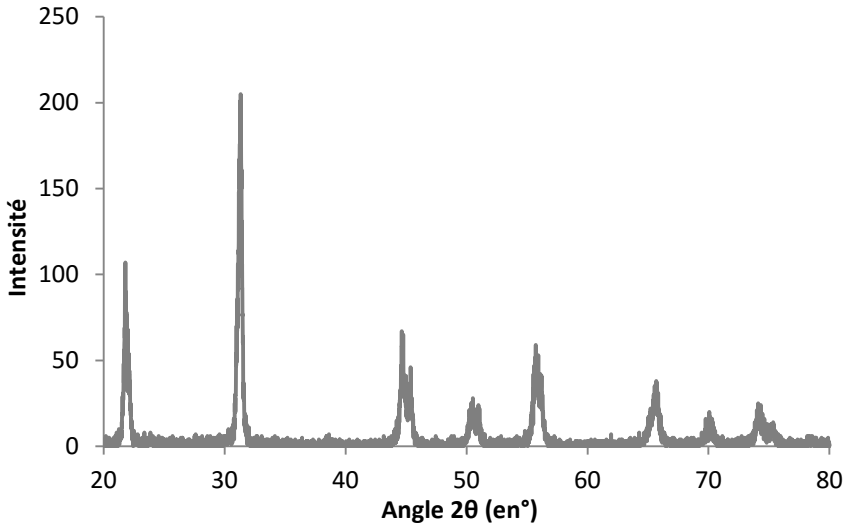


Figure I-22 : Diffractogramme des nanoparticules de $KNbO_3$

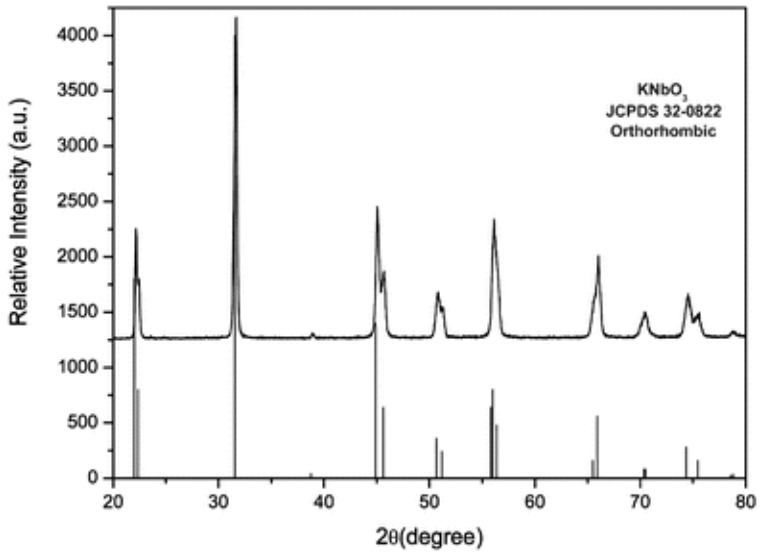


Figure I-23 : Diffractogramme de référence de $KNbO_3$[292]

On peut constater sur les images MEB (Figure I-24) que les nanoparticules de $KNbO_3$ ne sont homogènes ni en taille ni en forme. Malgré le tri en taille effectué lors de la redispersion dans l'eau, on constate une très grande dispersité avec des nanoparticules dont la taille est comprise entre 50 et 500nm environ. Les nanoparticules étant de formes très diverses et non sphériques, il est assez difficile de déterminer une distribution en taille pour de telles nanoparticules, que ce soit par comptage ou par d'autres techniques comme la DLS. Compte tenu de la dépendance quadratique des propriétés SHG vis-à-vis du volume des nanoparticules[58], une telle dispersion en taille impliquera une variation des propriétés SHG. Toutefois, de telles nanoparticules ont déjà été utilisées avec succès pour imager des cellules[293].

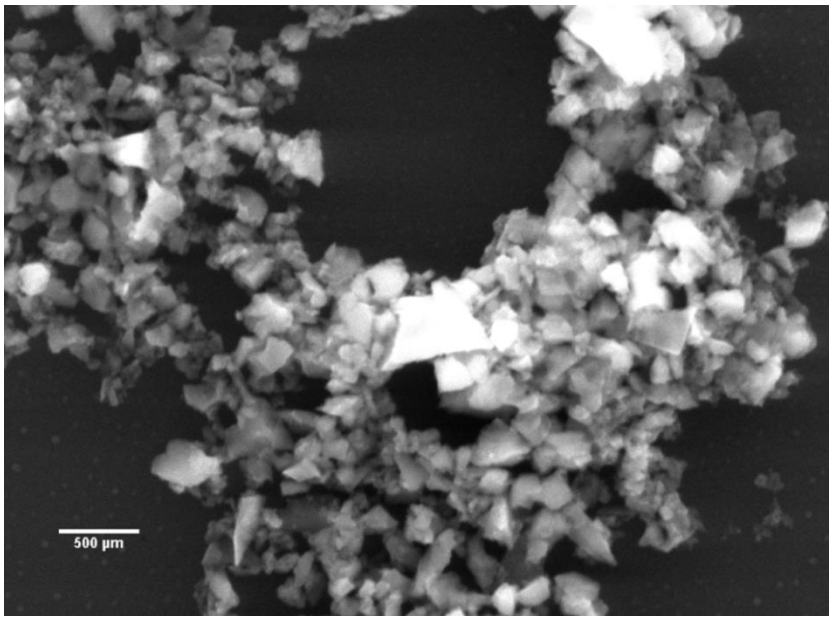


Figure I-24 : Cliché MEB de nanoparticules de $KNbO_3$ après tri en taille

II.5.2.2. Propriétés chimiques de surface des nanoparticules de $KNbO_3$

Les propriétés de surface des nanoparticules ont été étudiées par spectroscopie infrarouge et par mesure du potentiel zêta. Avant le tri en taille, la suspension de nanoparticules est relativement peu stable et le potentiel zêta varie nettement au cours du temps. Aucune valeur n'a donc été retenue dans ces conditions. Le potentiel zêta moyen des particules après tri en taille est de -27mV. La dispersion est stable pendant plusieurs jours.

Le spectre infrarouge (Figure I-25) présente peu de pics. On constate seulement un pic à 560 cm^{-1}, que l'on peut attribuer aux liaisons O-Nb-O[73].

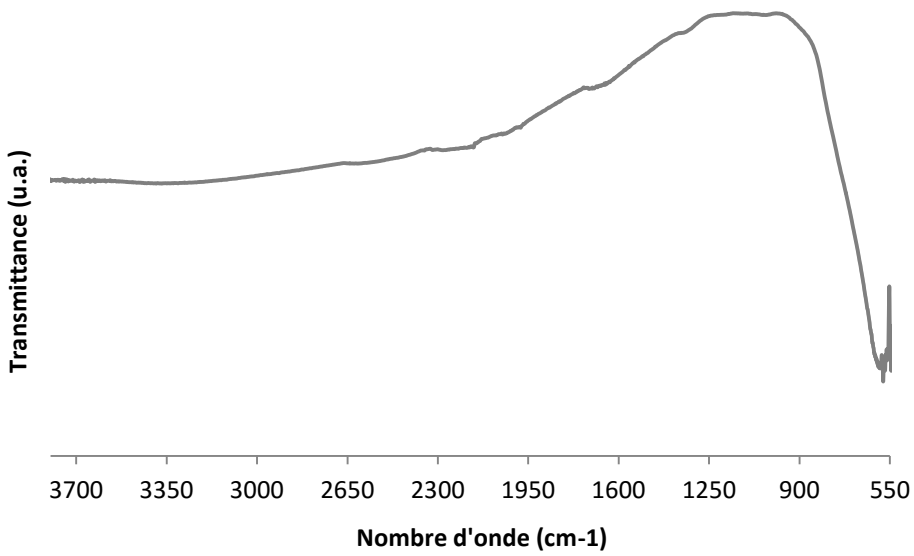


Figure I-25 : Spectre infrarouge de nanoparticules de $KNbO_3$ après tri en taille

II.6. Conclusions

Ce chapitre a permis de définir les protocoles de synthèses ainsi que les propriétés basiques des différentes nanoparticules que nous allons utiliser comme briques élémentaires dans la suite de ce travail à savoir : des nanorods d'or pour leurs propriétés plasmoniques (et donc thérapeutiques) et de luminescence à deux photons et des nanoparticules de SiC et de $KNbO_3$ pour leurs propriétés d'émission SHG.

Ces nanoparticules étant maintenant caractérisées, il va être possible de réaliser différentes opérations afin d'ajouter ou de combiner leurs propriétés, soit par couplage entre nanoparticules soit par une fonctionnalisation chimique.

III. FONCTIONNALISATION ET COUPLAGE ENTRE NANOPARTICULES D'OR ET EMETTEURS SHG

La fonctionnalisation des nanoparticules est une étape clé pour conférer des propriétés additionnelles aux nanoparticules. Deux types de nanoparticules ont été fonctionnalisées : des nanorods d'or et des nanoparticules de SiC. Différentes méthodes de fonctionnalisation ont été mises en œuvre afin de réaliser, d'une part, des couplages entre nanoparticules et d'autre part de développer une chimie plus spécifique sur ces nanoparticules en vue de réaliser un ciblage de cellules cancéreuses.

III.1. Fonctionnalisation des nanorods d'or

III.1.1. Procédures de fonctionnalisation

Comme nous l'avons vu au § I.4.1.1 du chapitre I, la chimie de l'or est largement connue pour les surfaces d'or 2D, se basant sur la formation de monocouches autoassemblées d'alkylthiols. La fonctionnalisation de nanoparticules reprend cette méthode. Les protocoles seront appliqués aux nanorods étant donné leurs meilleures propriétés plasmoniques et leur stabilité vis-à-vis des centrifugations. Le protocole utilisé dérive de celui utilisé par Cao *et al*[88], pour lequel les nanorods initialement recouverts de CTAB sont fonctionnalisés par un acide mercaptocarboxylique. Trois types de fonctions chimiques terminales ont été étudiés : les carboxylates, les phosphonates et les amines. Les ligands utilisés pour ces fonctionnalisations sont respectivement l'acide 11-mercaptoundecanoique (MUA), l'acide 11-mercaptoundecanephosphonique (MUP) et le chlorhydrate de 11-mercaptoundecylamine (MUAM).

Les alkylthiols sont des molécules sensibles à la lumière, à l'oxygène et, pour les alkylthiols à longue chaîne, peu solubles dans l'eau. Les solutions à 0,01M sont préparées par dissolution des poudres d'alkylthiols dans de l'eau déionisée, dégazée, chaude. Le pH des solutions est ajusté à 9, par ajout de NaOH, pour les solutions de MUA et de MUP, pour favoriser leur dissolution.

La suspension de nanorods est lavée, à deux reprises, par centrifugation (6700g, 6min) et redispersion dans de l'eau afin d'éliminer le CTAB en solution et adsorbé sur les nanorods. La solution de ligands thiolés est ensuite introduite dans la suspension de nanorods avec un ratio d'environ 100 ligands par nm² de surface d'or. La suspension est agitée à 600rpm, dans le noir, pendant une nuit. La suspension de nanoparticules d'or fonctionnalisées est ensuite lavée, à deux reprises, par centrifugation (6700g, 6min) et redispersion dans de l'eau. Lors de la deuxième redispersion, une sonication brève peut être nécessaire. Les échantillons sont conservés à 4°C.

III.1.2. Résultats

La fonctionnalisation de surface a été vérifiée par mesure du potentiel zêta des suspensions de nanorods d'or avant et après fonctionnalisation par les différents ligands. Le potentiel zêta est mesuré au pH de l'eau utilisée pour la redispersion soit pH≈6. Les distributions obtenues pour les potentiels zêta sont représentées sur la Figure III-1. La valeur de potentiel pour l'échantillon de nanorods fonctionnalisés par le CTAB, est de +55mV. Cette valeur tombe à -2mV après lavage, ce qui confirme l'efficacité du lavage.

Après la fonctionnalisation de ces nanorods nus par le MUAM, le MUP et le MUA, les potentiels zêta sont respectivement de +38mV, -43mV et -47mV. On peut donc constater de nets changements de potentiels entre les différentes chimies de surface. L'inversion de signe dans le cas du MUA et du MUP est une preuve certaine de ce changement de fonctionnalisation. La variation du potentiel dans le cas du MUAM n'est pas une preuve certaine, compte tenu de la nature non quantitative des mesures de potentiel zêta mais on peut raisonnablement penser que la fonctionnalisation a également fonctionné dans ce cas.

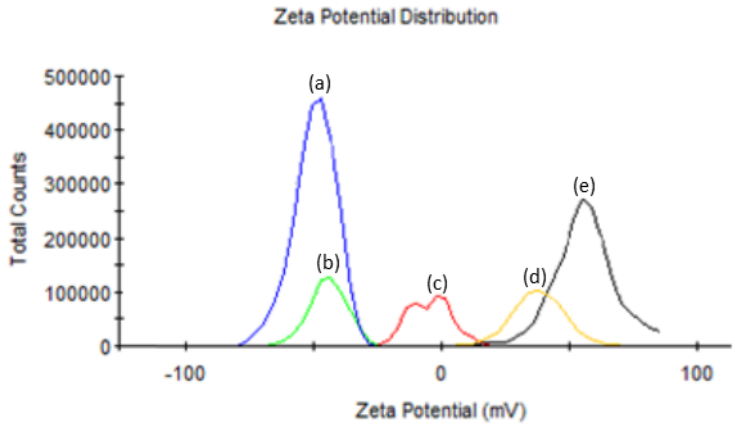


Figure III-1 : Potentiel zêta de différentes suspensions de nanorods d'or nus (c) ou fonctionnalisés par le MUA (a), le MUP (b), le MUAM (d) et le CTAB (e)

III.2. Fonctionnalisation des nanoparticules de SiC

III.2.1. Procédures de fonctionnalisation

En comparaison à la chimie de l'or, la chimie du SiC est relativement peu étudiée, surtout lorsqu'il s'agit de fonctionnaliser des nanoparticules et non des surfaces. L'utilisation de triéthoxysilanes est la voie la plus souvent retenue pour réaliser cette fonctionnalisation[173,222]. On peut ensuite choisir le

groupement fonctionnel adapté. Dans notre cas, nous nous sommes intéressés à deux silanes : l'aminopropyltriethoxysilane (APTES) et le mercaptopropyltriethoxysilane (MPTES). Les éthoxysilanes ont été préférés aux méthoxysilanes en raison de leur réactivité plus faible, qui limite les risques de réactions trop rapides et mal contrôlées, pouvant aboutir à des agrégats de nanoparticules.

On notera que pour réaliser cette silanisation, il est nécessaire de disposer de groupements silanols de surfaces. De plus, afin d'éviter que les silanes ne réagissent avec la surface des ballons utilisés, il est nécessaire de traiter ces ballons au préalable avec un silane hydrophobe.

III.2.1.1. Procédure de traitement de la verrerie utilisée pour la fonctionnalisation des nanoparticules de SiC par des silanes

Avant la silanisation des nanoparticules de SiC, la verrerie utilisée est préalablement traitée avec un trichloroalkylsilane possédant une longue chaîne carbonée de 18 carbones (octadecyltrichlorosilane ou OTS). Cette première étape permet de rendre la surface de verre hydrophobe afin d'éviter que les silanes ne réagissent avec les parois des ballons en verre utilisés comme réacteurs de fonctionnalisation. Le protocole utilisé est le suivant :

Les ballons sont d'abord nettoyés par une solution de potasse alcoolique saturée durant 2h. Ils sont ensuite rincés à deux reprises par de l'eau. Une solution de mélange « piranha » est préparée extemporanément par mélange de deux volumes d'acide sulfurique (à 99,9%) et un de peroxyde d'hydrogène (à 30%). Cette solution est introduite dans les ballons et laissée à réagir durant 30min. Cette étape a pour but d'éliminer les contaminants organiques et permet de générer des silanols, rendant la surface du verre très hydrophile et très réactive vis-à-vis des silanes utilisés. Les ballons sont ensuite rincés cinq fois à l'eau déionisée puis à l'éthanol puis trois fois au trichlorométhane. Ils sont ensuite remplis d'une solution d'octadecyltrichlorosilane (OTS) à 1% v/v dans le trichlorométhane. Le mélange est chauffé à reflux, sous agitation (400rpm) durant une nuit. En fin de réaction, les ballons sont rincés à trois reprises à l'éthanol puis recuits dans une étuve à 120°C durant 1h.

III.2.1.2. Procédure de silanisation des nanoparticules de SiC

La fonctionnalisation des nanoparticules de SiC utilisée dans ces travaux dérive du protocole proposé par Westcott *et al* pour la fonctionnalisation de particules de silice[217] et repris par Bazzar *et al* pour fonctionnaliser des particules de SiC[173]. Ce protocole se décompose en deux étapes : 1) la réaction du

silane (Figure III-2) avec les silanols de surface en présence d'eau et 2) la réticulation des silanes entre eux au moyen d'un chauffage à reflux. La quantité de silane à introduire correspond approximativement à 15 fois la quantité de silane nécessaire pour obtenir une densité de 2 molécules/nm² de surface de nanoparticule.

Dans un ballon traité à l'OTS, 9mL d'éthanol sont introduits. 1mL de suspension aqueuse de nanoparticules de SiC est ensuite introduit, sous agitation (300rpm). 155µL d'une solution éthanolique de silane à 0,1M sont ensuite introduits. Dans le cas du MPTES, le montage est balayé à l'argon afin de limiter l'oxydation du thiol. Le mélange est maintenu sous agitation durant une nuit, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le mélange est ensuite chauffé à reflux, sous agitation (300rpm) durant 1h. Afin de limiter le dépôt des nanoparticules sur les parois du ballon, le chauffage est maintenu au minimum nécessaire pour entretenir le reflux et de l'éthanol est introduit, au moyen d'un pousse seringue, à la vitesse de 10mL/h. Dans le cas du MPTES, le reflux est réalisé sous flux d'argon (Figure III-3). En fin de réaction, le ballon est soniqué pour redisperser d'éventuels dépôts sur les parois. Les particules sont lavées par centrifugation (6700g, 2-4min) à deux reprises et redispersées dans 1mL d'éthanol. Ce protocole de silanisation est ensuite répété une seconde fois. On mélange ainsi 8mL d'éthanol, 1mL d'eau déionisée, 1mL de nanoparticules silanisées et 155µL de solution éthanolique de silane à 0,1M puis on reproduit les étapes précédentes.

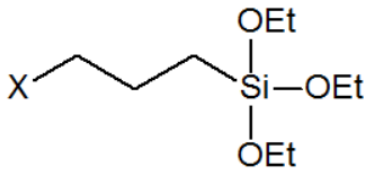


Figure III-2 : Structure générale des silanes utilisés

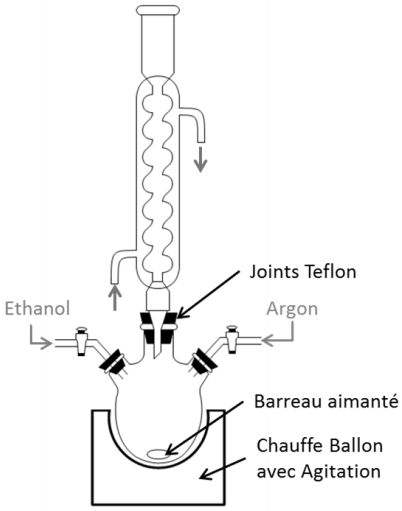


Figure III-3 : Montage à reflux utilisé pour la silanisation

III.2.2. Résultats de caractérisation

Les nanoparticules de SiC ont été caractérisées par différentes techniques complémentaires. Des analyses en spectroscopie IR, XPS et TOF-SIMS, en collaboration avec Giacomo Ceccone, du Joint Research Center (Ispra, Italie), ont pu être réalisées. Des dosages colorimétriques semi-quantitatifs des fonctions de surface et des mesures de potentiel zêta ont également été réalisés. Enfin, les nanoparticules sont observées en MEB pour vérifier que la réaction n'a pas produit de gros agrégats ou de structures très riches en silice comme des films ou des nanoparticules. La description de

l'appareillage et des protocoles utilisés pour réaliser les différentes caractérisations sont détaillés en Annexe 1. Dans la suite de cette partie l'échantillon de SiC nommé SiC avant silanisation correspondra au SiC après traitement thermique, lequel est utilisé dans les réactions de silanisation.

III.2.2.1. Mesures de potentiel zêta

Les mesures de potentiel zêta sont réalisées en phase aqueuse et nécessitent un milieu relativement non turbide. Aussi, les mesures sont réalisées sur des suspensions de nanoparticules de SiC très diluées obtenues par mélange de 50µL de dispersion de nanoparticules initiales ou silanisées dans 1mL d'eau. Le potentiel zêta des nanoparticules traitées par le MPTES n'a pas pu être mesuré. Une corrosion rapide des électrodes des cuves en présence de fonctions thiols a été constatée. Les valeurs obtenues dans ces conditions présentaient une non-reproductibilité très marquée avec des potentiels oscillants, pour un même lot de particules, entre -35mV et +30mV. Il n'est donc pas possible d'en tenir compte. En revanche, pour les nanoparticules traitées par l'APTES, on constate un net accroissement du potentiel zêta après chaque étape de réaction (Tableau III-1). Le potentiel passe ainsi de -40mV à -20mV après une étape de silanisation et +20mV après deux étapes de silanisation. On constate donc un changement de signe du potentiel zêta indiquant la présence de fonctions amines en surface des particules. De plus ce potentiel plus élevé après deux étapes de silanisation semble indiquer une plus grande densité en fonctions amines à la surface des nanoparticules de SiC. Un mécanisme en deux étapes peut être envisagé, comme suggéré par Roy *et al*[294]. Les mesures de potentiel zêta apportant des informations limitées, les résultats apportés par les autres techniques de caractérisation permettront d'apporter des réponses vis-à-vis de ce mécanisme en deux étapes.

Echantillon	SiC avant silanisation	SiC silanisé 1x	SiC silanisé 2x
Potentiel zêta	-40mV	-20mV	+20mV

Tableau III-1 : Potentiel zêta des nanoparticules de SiC avant et après chaque étape de silanisation par l'APTES.

III.2.2.2. Spectroscopie infrarouge

Les analyses par spectroscopie infrarouge, obtenues en mode ATR, ont été réalisées après dépôt des nanoparticules sur le cristal ATR. Les nanoparticules traitées par l'APTES ont été caractérisées après chacune des deux étapes de silanisation. Les spectres des nanoparticules silanisées ont été comparés aux spectres du silane et des nanoparticules initiales. Sur l'ensemble des spectres, on peut constater d'importantes variations de l'intensité des pics. Ces variations sont dues à la qualité variable des dépôts de nanoparticules, notamment en termes de quantité de nanoparticules déposées.

L'allure générale des spectres infrarouges (Figure III-4) montre que les pics du SiC à 750cm^{-1} et 810cm^{-1} sont bien présents sur les différents échantillons de nanoparticules[285]. Le pic inversé à 970cm^{-1}, typique des nanoparticules de SiC-3C, est également présent[286]. Le massif vers 1620cm^{-1} correspondant aux phonons du SiC est également présent sur les différents échantillons de SiC.

Les pics spécifiques de l'APTES sont en revanche plus difficiles à distinguer au niveau des nanoparticules. Cette faiblesse des pics est cohérente avec la très faible quantité d'APTES présente rapportée au volume important que représente le cœur des nanoparticules de SiC. Toutefois, en analysant plus en détail les spectres, il est possible de distinguer deux pics informatifs. Tout d'abord, sur la Figure III-5 donnant un agrandissement sur la région spectrale située autour de 2900cm^{-1}, on observe la présence de pics entre 2850cm^{-1} et 2950cm^{-1}. Ces pics sont caractéristiques des vibrations ν(C-H), présentes dans l'APTES. On peut également constater un élargissement de ces pics après la première silanisation. Bien que ces pics C-H puissent provenir d'une contamination, il paraît raisonnable de les attribuer aux liaisons C-H de l'APTES, au vu des potentiels zêta mesurés précédemment (§ III.2.2.1). De plus, Bazzar *et al*[173] montrent également la formation de ces mêmes pics, de faible intensité, lors de la silanisation de nanoparticules de SiC par un époxysilane.

On peut également s'intéresser à la région du spectre située autour 950cm^{-1} (Figure III-4). Cette région du spectre nous permet de suivre la formation des liaisons Si-O-Si issues de la réaction entre la surface des nanoparticules de SiC et le silane. On remarque ainsi la présence d'un massif dont le maximum est situé à 1040cm^{-1}, pour l'échantillon de nanoparticules silanisées à deux reprises. Ce massif est en revanche absent de l'échantillon silanisé une seule fois. Une hypothèse pourrait être que la seconde silanisation est nécessaire pour greffer de manière covalente, et en quantité suffisante, les molécules d'APTES à la surface du SiC et au sein d'un réseau polymérique d'APTES tandis que la première silanisation ne permettrait que d'obtenir un ancrage épars, et potentiellement non covalent de molécules d'APTES. Ces résultats sont à mettre en relation avec les résultats présentés par Roy *et al*[294]. Dans ces travaux portant sur les mécanismes de fixation de l'APTES sur une surface, les auteurs montrent ainsi que l'APTES peut, au cours d'une première étape, se greffer de manière covalente, électrostatique ou par physisorption (et donc sans liaisons Si-O-Si) à la surface, puis, dans un second temps, qu'il est possible de fixer davantage de molécules d'APTES, par des liaisons Si-O-Si, au sein d'un réseau de molécules d'APTES. Un tel mécanisme permet d'expliquer à la fois l'apparition différée du pic Si-O-Si et l'accroissement de l'intensité des pics en spectroscopie infrarouge et du potentiel zêta après la seconde étape de silanisation.

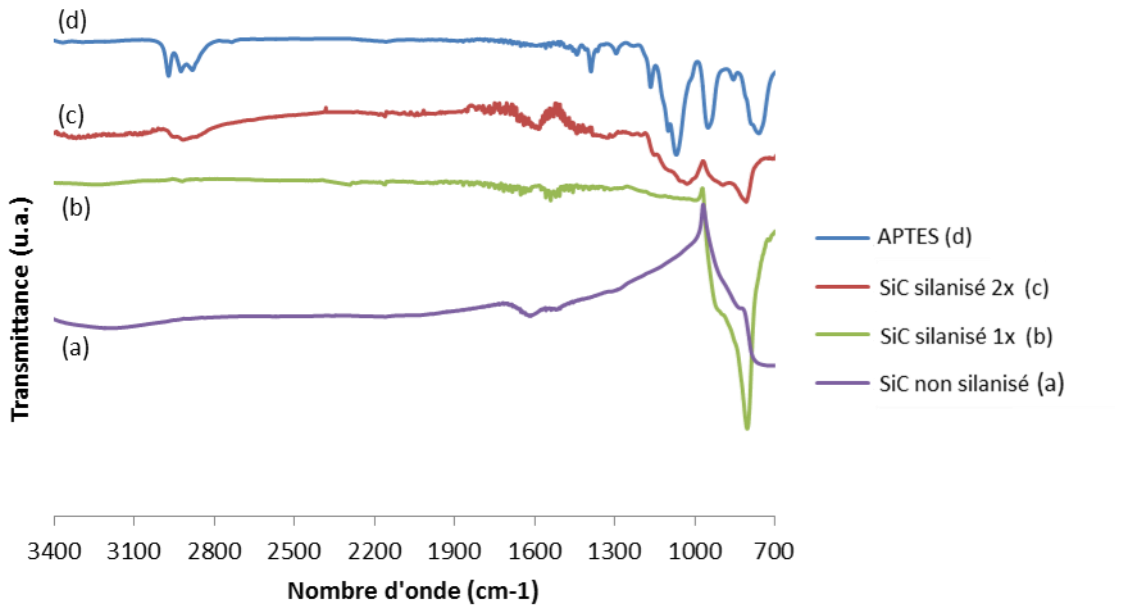


Figure III-4 : Spectres IR des nanoparticules de SiC initiales non silanisées (a), après une étape de silanisation par l'APTES (b), après deux étapes de silanisation par l'APTES (c) et de l'APTES seul (d)

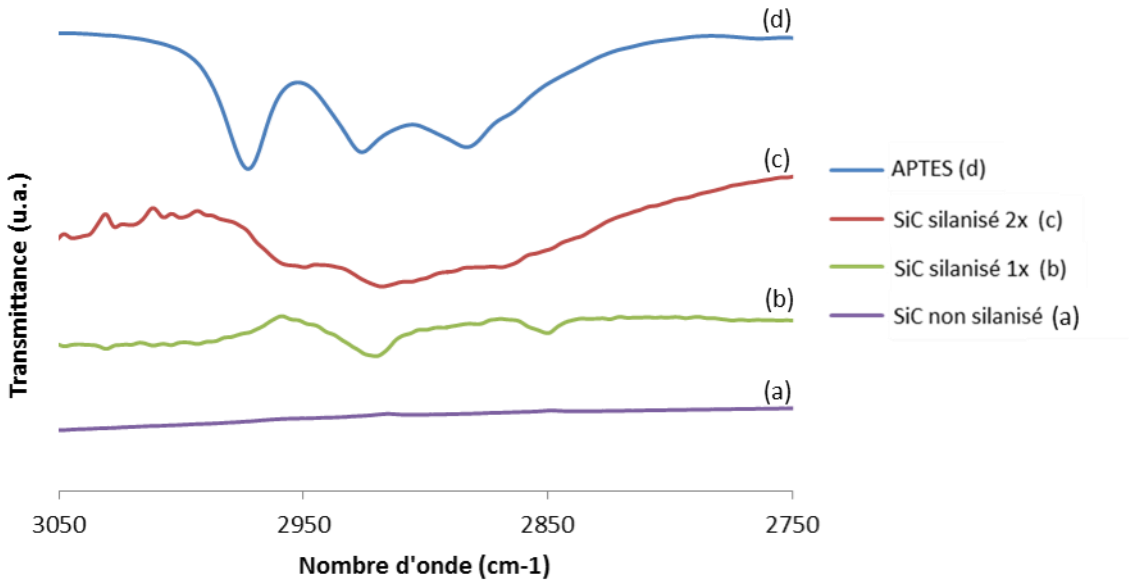


Figure III-5 : Agrandissement de la Figure III-4 sur la région spectrale située autour de 2900 cm^{-1}

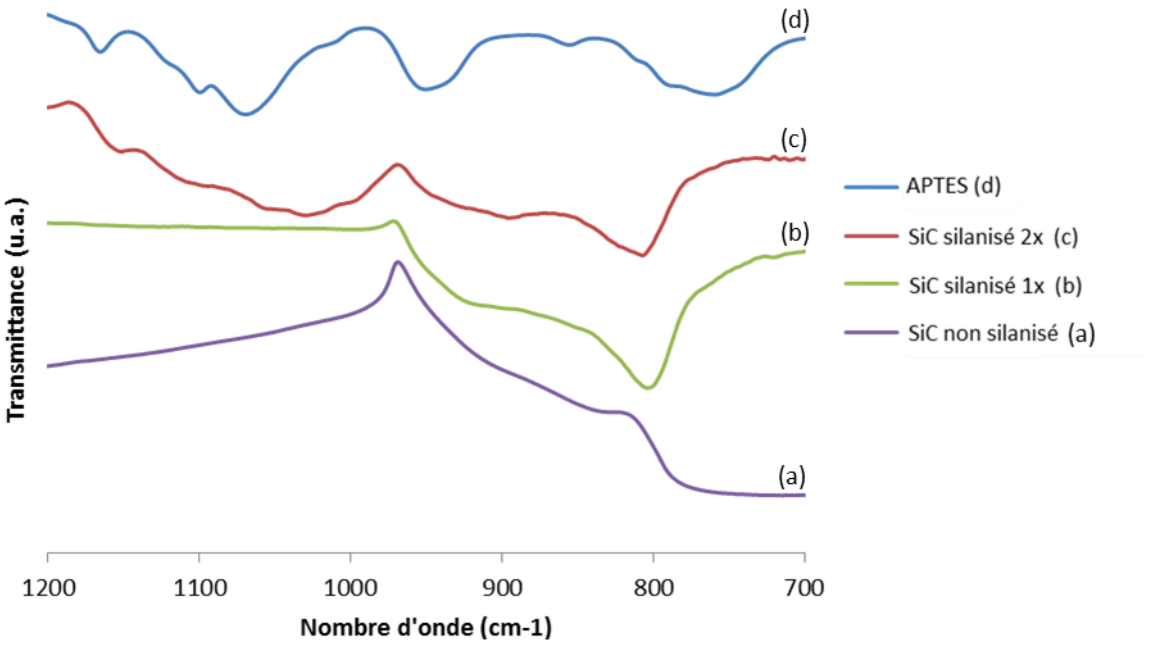


Figure III-6 : Agrandissement de la Figure III-4 sur la région spectrale située autour de 950 cm^{-1}

Dans le cas des particules de SiC silanisées par le MPTES, on constate des résultats similaires avec la présence des pics C-H et du massif Si-O-Si après deux étapes de silanisation (Figure III-7).

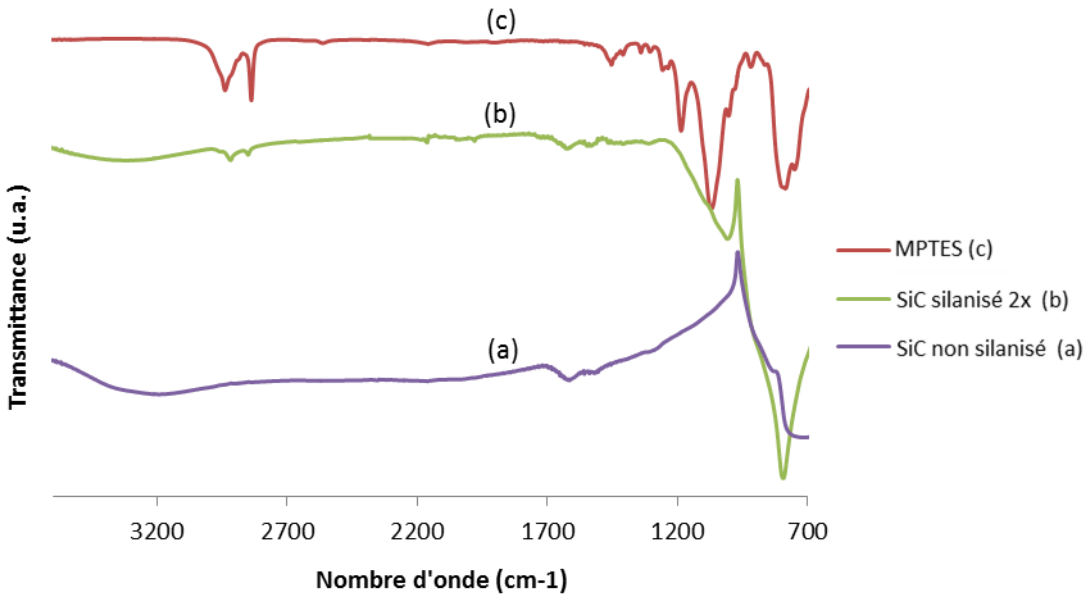


Figure III-7 : Spectres IR des nanoparticules de SiC non silanisées (a), après deux étapes de silanisation par le MPTES (b) et du MPTES seul (c)

III.2.2.3. Mesures par XPS

L'analyse par XPS permet de révéler des différences visibles entre nanoparticules avant et après silanisation. Après l'étape de silanisation, on peut tout d'abord constater d'importantes variations dans la composition de l'échantillon. On peut ainsi constater une nette diminution de la concentration en silicium (de 35 à 8%), au profit, notamment d'une forte augmentation de la concentration en oxygène (de 14 à 32%) (Tableau III-2).

Echantillon	Pourcentage atomique (%)				
	C	O	N	Si	Autres
SiC avant silanisation	51,52±0,48	13,5±0,42	--	34,95±0,50	<0,5
SiC silanisé 2x	45,90±0,30	32,14±0,60	8,91±0,40	8,40±0,15	<5

Tableau III-2 : Pourcentages atomiques, déterminés par XPS, de nanoparticules de SiC avant et après deux silanisations par l'APTES

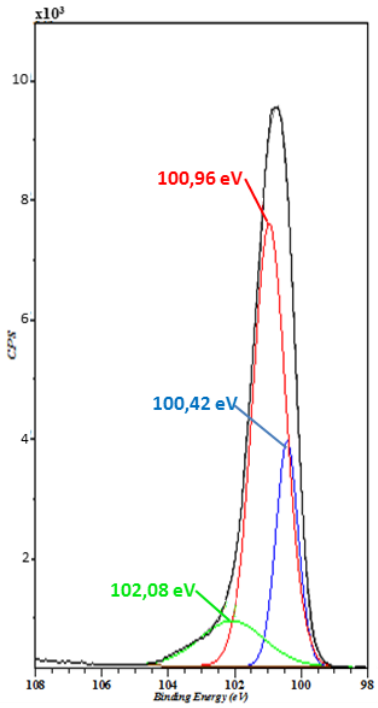
Cette forte baisse de la part du silicium, alors que la teneur en carbone reste peu impactée implique une forte diminution du ratio Si/C. L'échantillon avant silanisation présente un ratio Si/C proche de 1, ce qui est cohérent pour un échantillon de SiC brut. En revanche, l'APTES, possède un atome de silicium mais possède également (en supposant une réaction de greffage où les trois groupements éthoxy réagissent) 3 atomes de carbone, 3 d'oxygène, et 1 d'azote. Aussi, les résultats de pourcentage atomique obtenus sont-ils totalement cohérents avec un greffage d'APTES à la surface des nanoparticules.

En regardant plus en détail les niveaux Si2p et C1s, on peut confirmer ces observations faites à partir des pourcentages atomiques. Pour le cas du silicium (Figure III-8), on constate que les pics compris entre 100 et 101eV sont très marqués avant silanisation : respectivement 22% du signal total pour le pic à 100,42eV et 65% du signal total pour le pic à 100,96eV. Ces pics montrent la part importante des liaisons Si-C dans l'échantillon avant silanisation. A l'inverse, le pic à 102,08eV, typique des liaisons Si-O, est relativement faible (13% du signal total) et peu marqué, et va dans le sens d'une couche de silicium partiellement oxydé et de faible épaisseur. Après silanisation, on constate une bascule très nette, avec un pic représentant 98% du signal total à 102,64eV, typique des liaisons Si-O formées par la silanisation. On peut par ailleurs constater qu'une telle énergie de liaison est typique d'un sous-oxyde du silicium, ce qui est en accord avec les 3 liaisons Si-O présentes dans la molécule d'APTES, et en accord avec le pic à 1040 cm^{-1} détecté en infrarouge. A l'inverse, le pic à 100,3eV, typique des liaisons Si-C disparait quasiment, avec moins de 2% du signal total.

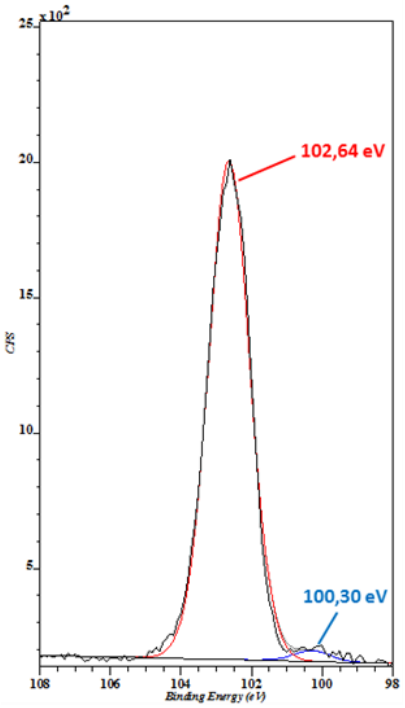
L'analyse du signal du carbone (Figure III-8) montre un phénomène similaire, avec une disparition du

pic à 282,84eV, typique des liaisons Si-C des nanoparticules, après silanisation au profit de pics de plus haute énergie à 285,0eV, 286,38eV et 288,37eV. Ces pics peuvent être attribués, respectivement, aux liaisons C-C et C-N, lesquelles sont très largement présentes au sein de l'APTES. La disparition de ces pics typiques du SiC au profit de pics typiques de l'APTES corrobore l'hypothèse de formation d'une couche relativement épaisse (quelques nanomètres) constituée de molécules d'APTES liées entre elles. On peut également constater l'apparition d'environ 12% d'azote après silanisation. Ce résultat corrobore clairement la présence d'APTES. Le ratio silicium/azote montre par ailleurs, en excluant les 2% de signal à 100,30eV (qui proviennent de la nanoparticule) un ratio égal à 1, ce qui correspond à la valeur du ratio pour l'APTES et renforce l'argumentaire pour une couche épaisse d'APTES en surface des nanoparticules. Enfin, l'analyse fine du pic de l'azote (Figure III-8) montre un pic constitué de deux composantes, à 398,03eV et 400,38eV. Le pic à 400,38eV est typique des liaisons C-N, et donc typique de l'APTES. Le pic à 398,03eV est plus surprenant mais peut correspondre à des liaisons Si-N. Ces liaisons sont peu stables, notamment en présence d'eau. Toutefois, dans l'hypothèse soutenue par Roy *et al,* où l'APTES peut également se fixer à la surface par interaction de l'amine de l'APTES avec les silanols de surface, on pourrait envisager des réactions entre azote et silanols de surface. Toutefois, ce point reste sujet à caution, compte tenu de la stabilité limitée de telles liaisons.

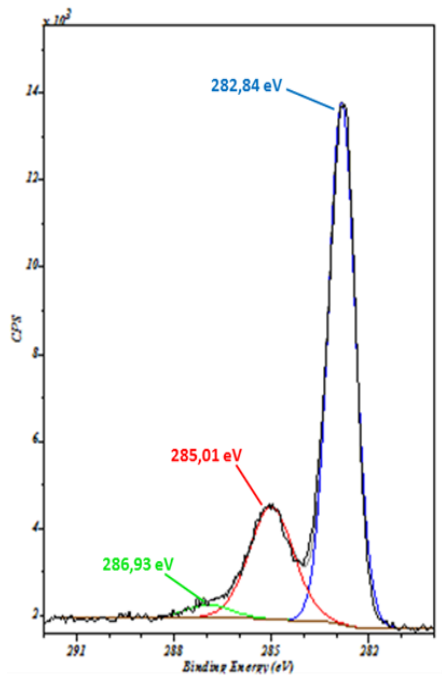
Par ailleurs, on peut noter la présence d'un taux d'impureté relativement élevé (presque 5%) dans l'échantillon silanisé alors que ce taux est très faible avant silanisation. Parmi les impuretés principalement en cause, on retrouve le soufre (4,3% du pourcentage atomique total). En regardant en détail le niveau S2p, on peut constater deux pics (dû aux niveaux $S2p_{1/2}$ et $S2p_{3/2}$) à 168,32 et 169,52eV. Ces niveaux d'énergies correspondent à des atomes de soufre oxydés, probablement des sulfates. Bien que l'acide sulfurique soit très utilisé dans nos protocoles de lavages de verrerie (mélange piranha), sa présence ici paraît surprenante.



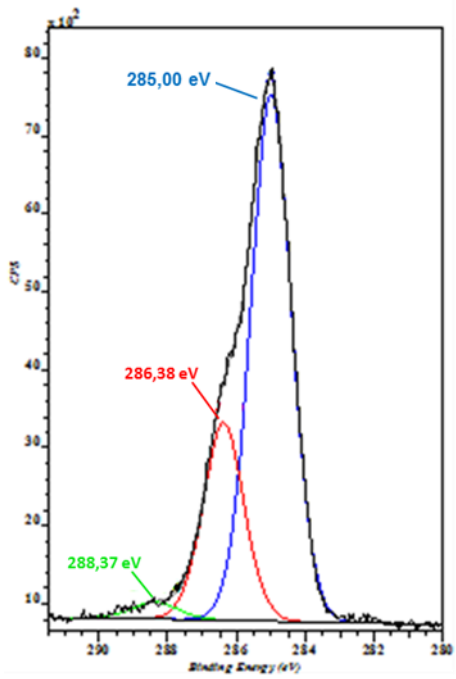
Niveau Si2p avant silanisation



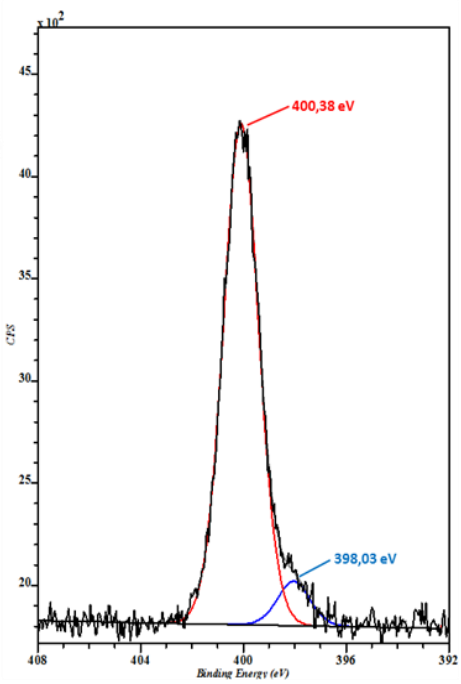
Niveau Si2p après silanisation



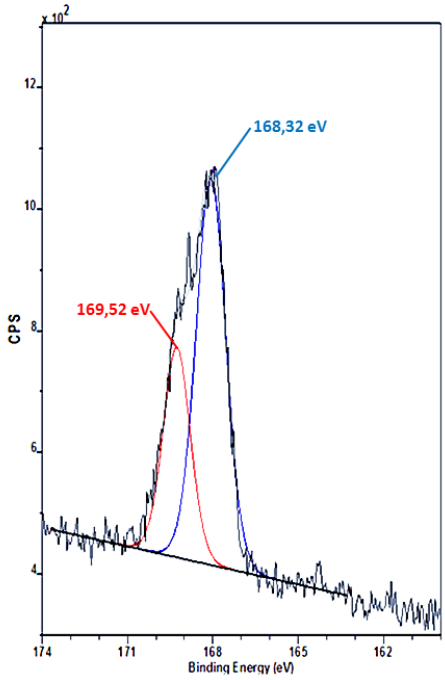
Niveau C1s avant silanisation



Niveau C1s après silanisation



Niveau N1s après silanisation



Niveau S2p après silanisation

Figure III-8 : Spectres XPS des niveaux Si2p, C1s et N1s des nanoparticules de SiC avant et après silanisation par l'APTES

Le cas des nanoparticules silanisées par le MPTES est également intéressant puisque l'analyse quantitative révèle la présence de 3,8% de soufre dans l'échantillon (Tableau III-3).

Echantillon	Pourcentage atomique (%)				
	C	O	S	Si	Autres
SiC avant silanisation	51,52±0,48	13,5±0,42	--	34,95±0,50	<0,5
SiC silanisé MPTES 2x	49,76±0,38	17,22±0,35	3,79±0,66	28,35±0,45	<1

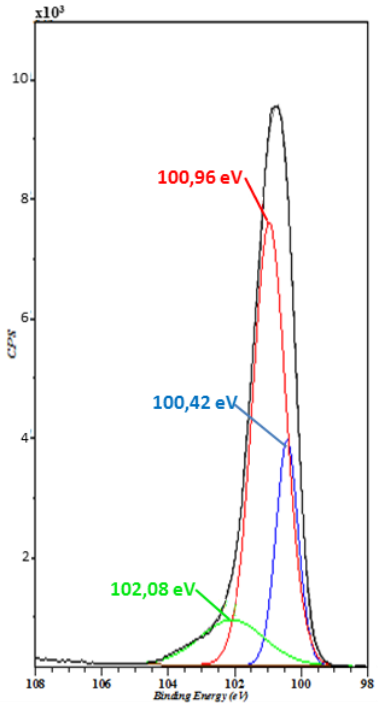
Tableau III-3 : Pourcentages atomiques, déterminés par XPS, de nanoparticules de SiC avant et après deux silanisations par le MPTES

L'analyse fine des niveaux $S2p_{1/2}$ et $S2p_{3/2}$ (Figure III-9) montre deux pics à 163,6eV et 164,6eV, typiques des thiols. Le pic à 164,6eV peut également signer la présence de disulfures liés à une oxydation partielle. Cette oxydation partielle est cohérente avec le pic à 169eV typiques des atomes de soufres oxydés, tels que des sulfones ou des acides sulfoniques. Compte tenu de la pollution aux sulfates mise en évidence pour le SiC silanisé par l'APTES, l'hypothèse d'une contamination aux sulfates peut également être envisagée. Toutefois, les pics de basses énergies signent clairement la présence de soufre organique due au MPTES.

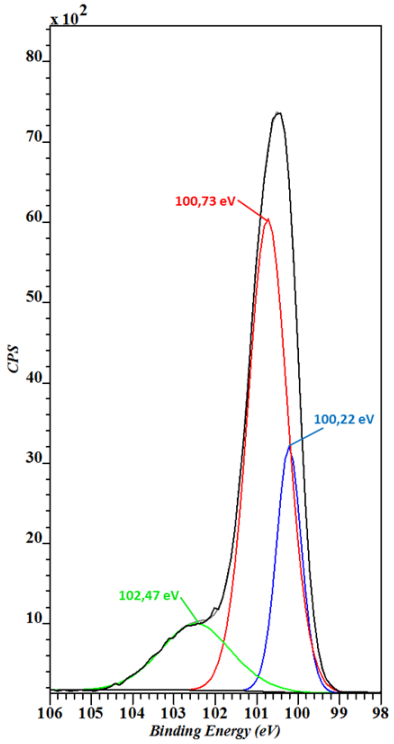
A contrario des nanoparticules traitées par l'APTES avec un ratio N/Si proche de 1, on peut constater que dans le cas du MPTES, le ratio S/Si est très inférieur à 1 puisqu'il est de 0,13 (voire 0,09 en omettant la part du soufre oxydé à 169,7eV). De plus, l'augmentation du pourcentage atomique en

oxygène est plus faible (+3,72% contre +18,64% pour l'APTES) et inversement pour le silicium (-6,6% contre -26,55% pour l'APTES). Ces résultats semblent indiquer un greffage moins important du MPTES par rapport à l'APTES.

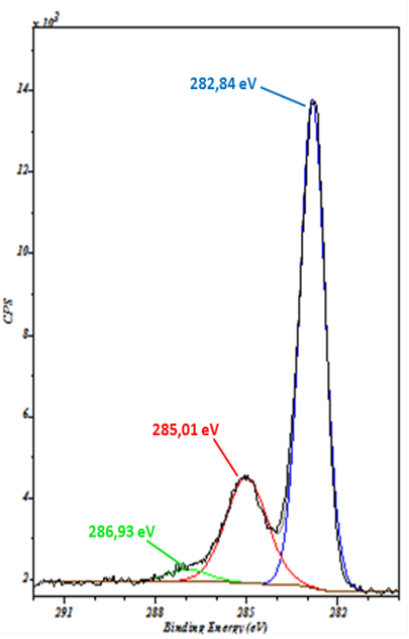
Par ailleurs, l'analyse fine des niveaux C1s et Si2p ne montre pas de basculement net en faveur des pics du silane comme pour l'APTES mais des variations plus modérées des intensités, en faveur du greffage des silanes. On constate ainsi, pour le niveau Si2p, un accroissement de 13,1% à 15,9 % du pic correspondant aux liaisons Si-O (102,5eV). Pour le niveau C1s, on constate des accroissements respectifs de 25,6% à 36,5% et de 3,0% à 5,6% pour les pics correspondant aux liaisons C-C et C-S. Toutes ces données tendent à montrer que la quantité de MPTES greffée est plus faible, et probablement limitée à une très fine couche voire une monocouche. Cette différence s'explique par la réactivité moins grande du MPTES en comparaison de l'APTES. En effet, la nucléophilie de l'amine de l'APTES lui confère des propriétés autocatalytiques que le thiol ne peut conférer au MPTES. De plus, l'APTES autorise des interactions électrostatiques avec la surface des nanoparticules qui ne sont pas possibles pour le MPTES. Ces différences expliquent probablement la différence de réactivité. De plus, le greffage entraîne une surface intégralement soufrée et non réactive vis-à-vis des silanes restants, aboutissant, possiblement, à une monocouche de silane.



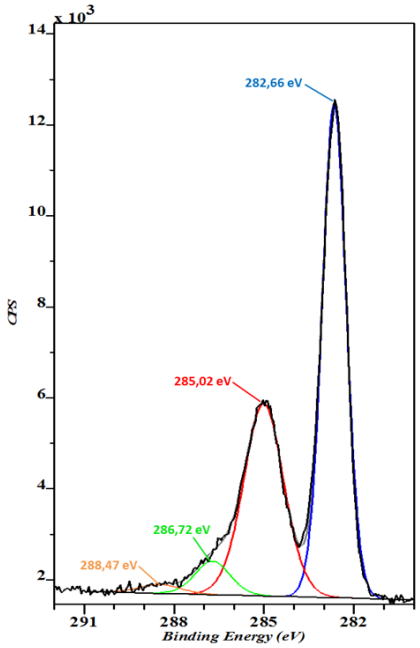
Niveau Si2p avant silanisation



Niveau Si2p après silanisation

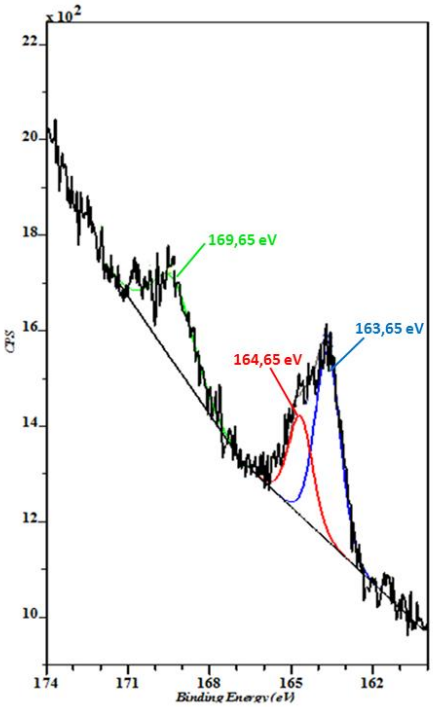


Niveau C1s avant silanisation



Niveau C1s après silanisation

Absent avant silanisation



Niveau S2p avant silanisation

Niveau S2p après silanisation

Figure III-9 : Spectres XPS des niveaux Si2p, C1s et S2p des nanoparticules de SiC avant et après silanisation par le MPTES

III.2.2.4. Dosage des fonctions de surface

Le dosage colorimétrique des fonctions amines et thiols de surface est possible via l'utilisation respective de bleu de Coomassie[295] ou de réactif d'Ellman[35,296]. Le dosage des amines est basé sur l'interaction électrostatique entre les fonctions sulfonates du bleu de Coomassie et les fonctions

amines à doser. Dans le cas des thiols, le réactif d'Ellman est basé sur la réaction d'échange thiol-disulfure et entraîne également la libération d'un produit optiquement actif. Les protocoles détaillés de dosage sont décrits en Annexe 1.

Pour les nanoparticules de SiC traitées par l'APTES, des dosages ont été réalisés pour chacune des étapes de silanisation. On constate sur la Figure III-10, une nette augmentation des fonctions amines présentes en surface des nanoparticules après chaque étape de silanisation (a et b). On constate une légère absorbance résiduelle pour les nanoparticules de SiC non traitées (c). Cette absorbance est retranchée pour chacun des trois échantillons. Après mesure de l'absorbance maximale à λ = 611nm et connaissant le coefficient d'extinction molaire du bleu de Coomassie à cette longueur d'onde, on calcule, d'après la loi de Beer Lambert, la concentration en fonctions amines provenant de la surface des nanoparticules. On obtient ainsi une densité surfacique de fonctions chimiques de 0 amines/nm² pour le SiC avant silanisation, 0,42 amines/nm² après une étape de silanisation et 0,56 amines/nm² après deux étapes de silanisation. Les résultats obtenus par dosage corroborent ceux obtenus par mesure du potentiel zêta (Tableau III-1), à savoir, un accroissement de la densité surfacique en fonctions amines après chacune des deux étapes de silanisation. Il conviendra toutefois de ne pas considérer cette technique de quantification comme une mesure purement quantitative, mais comme une analyse semi-quantitative. En effet, différents biais peuvent amener à sous-estimer la densité réelle en amine à la surface des nanoparticules. Les biais typiques pouvant être cités sont : 1) Les lavages insuffisamment ou trop efficaces, aboutissant respectivement à une surévaluation ou une sous-évaluation de la densité en amines et 2) Compte tenu des contraintes stériques, toutes les amines de surface peuvent ne pas réagir avec des molécules de bleu de Coomassie, aboutissant à une sous-évaluation de la densité en amine.

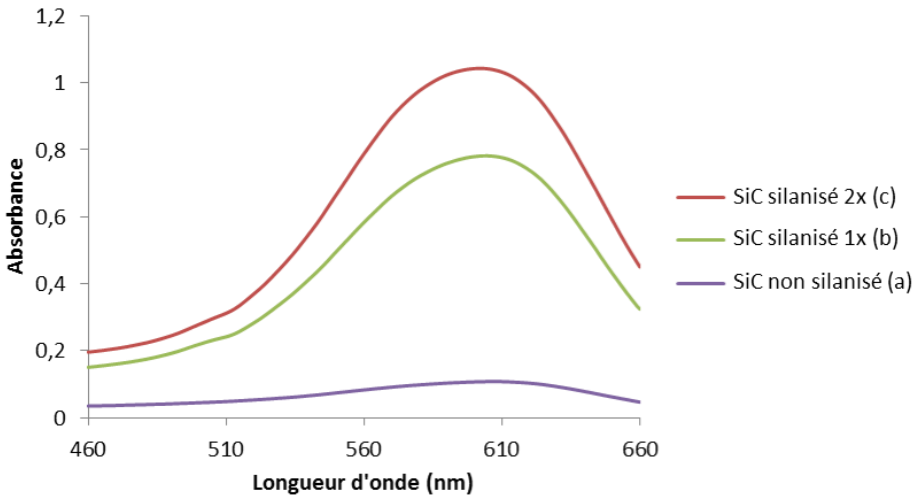


Figure III-10 : Spectres d'absorbance UV-Vis obtenus après dosage par le bleu de Coomassie de nanoparticules de SiC non silanisées (a), après une étape de silanisation par l'APTES (b) et après deux étapes de silanisation par l'APTES (c)

Pour le dosage des thiols par le réactif d'Ellman, on constate que le réactif réagit rapidement, même avec les nanoparticules de SiC initiales. On obtient alors des valeurs de densités surfaciques parfois supérieures à 200 thiols/nm², résultat trop élevé pour être réaliste. Ces valeurs ne sont pas impactées par les silanisations effectuées sur ces nanoparticules. Il est possible que les nanoparticules de SiC perturbent l'analyse, potentiellement par des propriétés réductrices vis-à-vis du réactif d'Ellman. Ces tentatives de dosage des thiols n'ont pas été menées plus avant.

III.2.2.5. Mesures en ToF-SIMS

Les principaux fragments obtenus à partir des analyses en ToF-SIMS sont détaillés dans le Tableau III-4. Seuls les échantillons silanisés par l'APTES ont été étudiés.

On peut constater des changements significatifs dans la fragmentation avant et après silanisation. En effet, avant silanisation, on retrouve différents fragments dérivant du silicium. Compte tenu de leur structure ne présentant ni azote, ni liaison C-H, on peut raisonnablement attribuer une origine inorganique à ces fragments, ce qui est en adéquation avec la nature inorganique de nos nanoparticules de SiC. De plus, le ToF SIMS confirme la présence de cette couche d'oxyde et des silanols associés. Après silanisation, on retrouve différents fragments azotés, qui signent la présence de l'APTES. De plus on retrouve même des fragments entiers en provenance directe de la molécule d'APTES.

m/z	SiC non silanisé	SiC silanisé 2x	Formule brute du fragment	Origine potentielle
45,01	Présent	Absent	$SiOH^+$	Silanols de surface
91,95	Présent	Absent	$Si_2C_3^+$	Fragments de SiC provenant de la nanoparticule
175,88	Présent	Absent	$Si_4O_4^-$ / $Si_4C_4O^-$	Oxyde à la surface de la nanoparticule
44,00	Absent	Présent	$SiNH_2^+$	Fragment secondaire avec de l'azote, provenant de l'APTES
57,05	Absent	Présent	$C_3H_7N^+$	Fragment aminopropyl de l'APTES
86,99	Absent	Présent	$SiC_3H_9N^+$	Fragment silylpropanamine de l'APTES

Tableau III-4 : Principaux fragments positifs et négatifs obtenus en ToF-SIMS pour des nanoparticules de SiC avant silanisation et après silanisation par l'APTES

III.2.3. Conclusions sur la fonctionnalisation des nanoparticules de SiC

Le protocole présenté dans cette partie nous a permis de silaniser efficacement les nanoparticules de SiC. Les différentes analyses, complémentaires, réalisées démontrent l'efficacité de ce protocole pour la fonctionnalisation par un aminosilane et un mercaptosilane. Les résultats en spectroscopie infrarouge et XPS montrent par ailleurs que la silanisation par l'APTES conduit au greffage de nombreuses molécules d'APTES, aboutissant à la formation d'une coquille de quelques nanomètres d'épaisseur. A l'inverse, la fonctionnalisation par le MPTES semble aboutir à une couche beaucoup plus fine, peut-être même une monocouche.

Cette silanisation pourrait potentiellement être étendue à d'autres fonctions chimiques[173], permettant de disposer de nanoparticules avec une large gamme de fonctions terminales pour les nanoparticules de SiC.

Enfin, on peut dès lors utiliser cette chimie comme un support pour le couplage de nanoparticules entre elles ou pour développer une chimie plus complexe.

III.3. Synthèse de nanoparticules hybrides par couplage de nanorods d'or aux nanoparticules de SiC ou de $KNbO_3$

Les nanoparticules de SiC et de $KNbO_3$, actives en SHG, ont été couplées à des nanorods d'or afin d'obtenir des nanoparticules multifonctionnelles pour des applications thérapeutiques et de diagnostic. Le couplage de ces nanoparticules ne peut être rendu possible qu'à condition de créer des interactions suffisamment fortes entre elles.

III.3.1. Synthèse de nanohybrides SiC@Au par couplage entre des nanoparticules de SiC et des nanorods d'or

III.3.1.1. Procédures de couplage

III.3.1.1.1. Couplage électrostatique

Comme nous l'avons vu au § II.4.2.2 du chapitre II, les nanoparticules de SiC possèdent un potentiel zêta largement négatif, d'environ -50mV. Il est donc possible d'associer ces nanoparticules à des nanorods d'or chargés positivement par le biais d'interactions électrostatiques. Afin de disposer de nanorods chargés positivement, deux ligands de surface peuvent être envisagés : le MUAM ou le

CTAB. Les nanorods traités au CTAB présentent plusieurs avantages comparativement à ceux traités par le MUAM. En effet, ils sont plus simples à obtenir, dans la mesure où la synthèse des nanorods fait intervenir du CTAB. Ces nanorods sont également plus stables en suspension et présentent un potentiel zêta plus élevé d'environ +50mV contre +38 mV pour les nanorods fonctionnalisés par le MUAM (voir § III.1.2). Enfin, la charge positive du CTAB n'est pas dépendante du pH du milieu. Pour ces raisons, les nanorods traités au CTAB ont été utilisés lors du protocole décrit ici :

500µL de suspension de nanorods (C=100mg/L) sont lavés par centrifugation-redispersion (6700g, 6min) dans 500µL d'eau déionisée afin d'éliminer le CTAB, non adsorbé, en solution. 30µL de suspension de nanoparticules de SiC (C=2,67g/L), traitées thermiquement, sont ajoutés à la suspension de nanorods. Le mélange obtenu est agité à 500rpm, durant une nuit. La suspension est ensuite lavée par centrifugation (6700g, 2min) et redispersée dans l'eau déionisée. Le temps de centrifugation de deux minutes permet de ne précipiter que les nanorods libres et ainsi d'obtenir un échantillon constitué de nanohybrides.

III.3.1.1.2. Couplage thiol-or

Il est également possible d'utiliser les nanoparticules de SiC modifiées par des fonctions thiols leur permettant d'interagir avec les nanorods d'or. Dans ces conditions, le protocole utilisé a été le suivant :

500µL de suspension de nanorods (C=100mg/L) sont lavés par centrifugation-redispersion (6700g, 6min) et redispersés dans 500µL d'eau à deux reprises afin d'éliminer le CTAB adsorbé et en solution. 30µL de suspension de nanoparticules de SiC thiolé (C=2,67g/L) sont ajoutés à la suspension de nanorods. Le mélange obtenu est agité à 500rpm, durant une nuit. Les nanoparticules sont ensuite lavées par centrifugation (6700g, 2min) et redispersées dans l'eau déionisée.

III.3.1.2. Résultats de caractérisation

Les propriétés structurales des nanohybrides obtenus après couplage sont caractérisées par MEB et leurs propriétés optiques par microscopie à deux photons et mesures HRS. Les mesures des propriétés optiques non linéaires seront détaillées dans le chapitre IV. De la même manière, l'étude du comportement et de la stabilité de ces nanohybrides en milieu biologique sera étudiée en microscopie multiphotonique. Ces résultats seront également présentés dans les chapitres suivants.

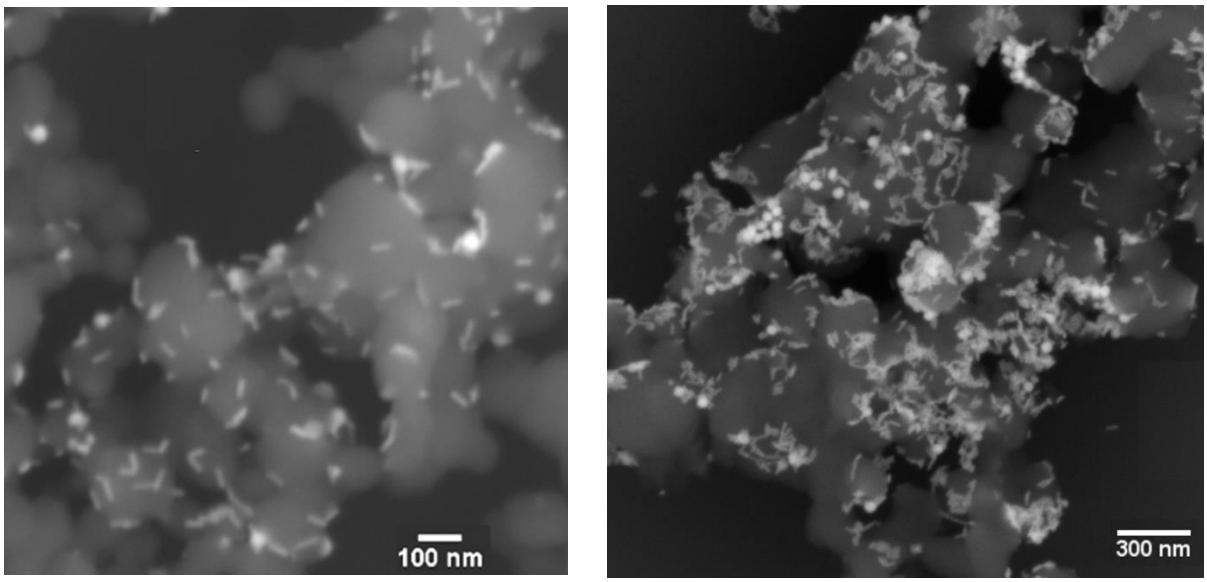
Les assemblages obtenus ont été observés en utilisant le détecteur d'électrons rétrodiffusés du MEB afin de mieux faire ressortir le contraste chimique entre les nanorods d'or (de numéro atomique plus

élevé donc apparaissant plus blancs) et les nanoparticules de SiC. La Figure III-11 montre que les deux types d'assemblages SiC@Au présentent effectivement la structure attendue avec des nanorods d'or localisés en surface des nanoparticules de SiC. L'interaction thiol-or semble permettre une fixation plus importante de nanorods d'or (Figure III-11b) que l'interaction électrostatique (Figure III-11a). Cette différence peut s'expliquer par la répulsion entre nanoparticules qui est d'autant plus marquée dans le cas de nanorods fortement chargés positivement. En effet, une telle contrainte va imposer des distances plus importantes entre particules d'or fixées, tout en écrantant les charges de surfaces du SiC et en réduisant l'accessibilité des nanorods libres à la surface du SiC. On peut d'ailleurs constater que la plupart des auteurs[47,217] privilégient les interactions thiols-or pour favoriser la formation d'hybrides avec une densité surfacique en particules d'or suffisante.

Cependant, on peut remarquer, pour nos échantillons, une hétérogénéité relativement marquée dans la répartition des nanorods sur les échantillons de SiC thiolés. De plus, nous avons constaté que la stabilité colloïdale des nanohybrides est nettement plus faible dans le cas d'interactions thiol-or que dans le cas d'interactions électrostatiques.

Compte tenu de la nature non chargée de ces nanorods nus, on peut s'attendre à des nanohybrides thiol-or avec une faible charge de surface et donc peu stables. Toutefois, la mesure du potentiel zêta de ces nanohybrides donne des résultats très variables et ininterprétables. Cette impossibilité à réaliser de telles mesures est sans doute due à la présence simultanée dans l'échantillon de nanostructures aux propriétés très différentes (taille, forme, indice de réfraction, etc…). En effet, le modèle utilisé par l'appareil de mesure n'est pas capable de prendre en compte des systèmes d'une telle complexité, aboutissant à un résultat ininterprétable.

Compte tenu de ces différentes limites (instabilité, hétérogénéité), l'élaboration de nanohybrides par couplage thiol-or a été moins étudiée dans le cadre de ces travaux. Toutefois, dans une optique de biofonctionnalisation ultérieure, la présence de fonctions thiols en surface des nanohybrides SiC@Au peut être un avantage, en servant par exemple de fonctions d'ancrage pour des biomolécules.



(a) (b)

Figure III-11 : Clichés MEB, obtenus par détection d'électrons rétrodiffusés, de nanohybrides SiC@Au basés sur des interactions électrostatiques (a) et thiol-or (b)

III.3.2. Synthèse de nanohybrides $KNbO_3$@Au par Couplage entre des nanoparticules de $KNbO_3$ et des nanorods d'or

Les nanoparticules de niobate de potassium offrent la possibilité de lier nanorods d'or et émetteurs SHG par une interaction de type Phosphore-Oxygène-Métal. Ces liaisons sont stables et relativement spécifiques puisqu'elles ne permettront des interactions que vis-à-vis des oxydes. Elles permettent ainsi une alternative au couplage électrostatique.

III.3.2.1. Procédure de couplage

500µL de suspension de nanorods (C=100mg/mL) fonctionnalisés au préalable par du MUP sont lavés par centrifugation-redispersion (6700g, 6min), à deux reprises, dans 500µL d'eau déionisée. 30µL de suspension de nanoparticules de $KNbO_3$ (C=400mg/mL) sont ajoutés à la suspension de nanorods. Le mélange obtenu est agité à 500rpm, durant une nuit. La suspension est ensuite lavée par centrifugation (6700g, 2-4min) et redispersée dans l'eau déionisée.

III.3.2.2. Résultats de caractérisation

Les propriétés structurales des nanohybrides obtenus après couplage sont caractérisées par MEB et leurs propriétés optiques par microscopie multiphotonique et mesures HRS. Les mesures des propriétés optiques non linéaires seront détaillées dans le chapitre suivant. De la même manière, le

comportement et la stabilité de ces nanohybrides en milieu biologique seront étudiés en microscopie multiphotonique. Ces résultats seront également présentés dans le chapitre IV.

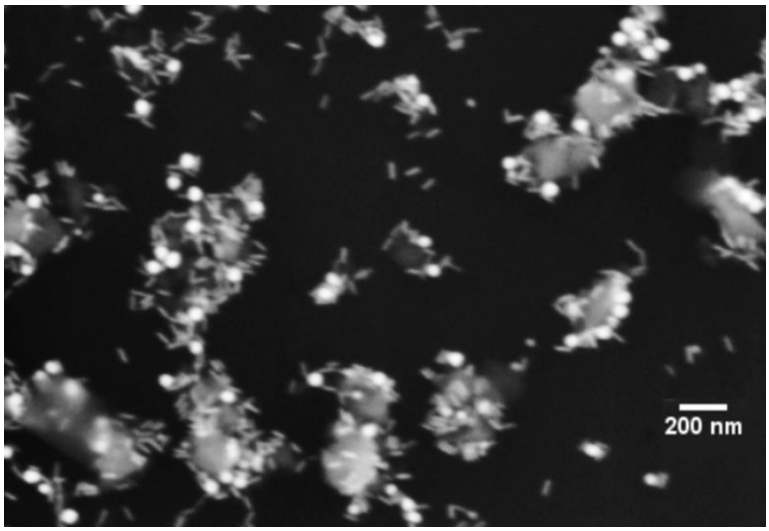


Figure III-12 : Cliché MEB, obtenu par détection d'électrons rétrodiffusés, de nanohybrides $KNbO_3$@Au basés sur des interactions Phosphore-Oxygène-Métal

La Figure III-12 obtenue au MEB par détection des électrons rétrodiffusés montre que nos assemblages or-$KNbO_3$ présentent effectivement la structure attendue avec des nanorods d'or autour des nanoparticules de $KNbO_3$. On peut toutefois remarquer un certain nombre de nanorods libres dans l'échantillon. La présence de ces nanorods est potentiellement à relier à la plus grande stabilité des nanoparticules de $KNbO_3$ en suspension par rapport aux nanoparticules de SiC. En effet, compte tenu de cette stabilité, il est plus difficile d'obtenir des conditions permettant de centrifuger exclusivement les nanohybrides, avec un rendement suffisant.

III.3.2.3. Conclusions

Dans cette partie, nous avons montré qu'il est possible d'assembler des nanoparticules de SiC ou de $KNbO_3$ avec des nanorods d'or. Par ailleurs, dans le cas du SiC, nous avons également pu montrer que ces assemblages peuvent être réalisé indifféremment en fonctionnalisant les nanorods d'or ou les nanoparticules de SiC. La stabilité de ces nanohybrides en conditions biologiques sera évaluée au chapitre IV. Dans le cas de nanohybrides stables, il est ainsi possible d'envisager des applications théranostiques.

III.4. Développement d'une chimie pour le ciblage des cellules cancéreuses par les nanoparticules de SiC

La capacité à cibler spécifiquement des cellules cancéreuses constitue un objectif important pour améliorer la performance d'un système diagnostic ou thérapeutique. De tels systèmes sont néanmoins complexes à réaliser. Ainsi, nous avons cherché un système le plus simple possible et adaptable à nos émetteurs SHG. D'emblée, les nanoparticules de SiC paraissent plus intéressantes de par leur chimie. En effet, ces nanoparticules présentent une chimie de surface stable[173], et personnalisable par un large choix de fonctions chimiques. Le choix du ligand utilisé pour le ciblage conditionne également la chimie à employer. En effet, une balance s'opère entre spécificité de ciblage des ligands et possibilités offertes par ce ligand en matière de chimie. Dans le but de simplifier le système, nous avons privilégié des procédés simples et disposant de bons rendements de greffage. De fait, ces techniques nécessitent l'utilisation de solvants organiques et excluent ainsi de nombreux ligands. Les folates font partie des ligands d'intérêt, grâce à leur grande stabilité chimique et les possibilités de couplages qu'ils offrent. Ces ligands permettent de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses qui sont connues pour surexprimer les récepteurs au folate[297] comme nous le reverrons au chapitre IV. Cette partie présentera donc les différentes étapes nécessaires au greffage d'acide folique sur les nanoparticules ainsi que les caractérisations associées.

III.4.1. Procédures de synthèse

L'acide folique est greffé à la surface des nanoparticules de SiC par l'intermédiaire d'un PEG-diamine. Ce PEG va permettre de passiver la surface des nanoparticules, réduisant ainsi les interactions non spécifiques. De plus, ce PEG permet de fournir une liberté de mouvement à l'acide folique, ce qui améliore l'efficacité du ciblage[298]. Le protocole peut donc être divisé en deux étapes : la synthèse du ligand PEG-folate puis son greffage sur les nanoparticules de SiC.

III.4.1.1. Synthèse du ligand PEG-folate

Le couplage de l'acide folique à différentes molécules a été largement étudié. L'acide folique présente plusieurs fonctions chimiques (amines, carboxylates) à même d'être utilisées pour réaliser le couplage (Figure III-13). Toutefois, pour ne pas gêner la reconnaissance du ligand par son récepteur, il est préférable que les couplages ne s'effectuent uniquement qu'à partir des fonctions carboxylates terminales.

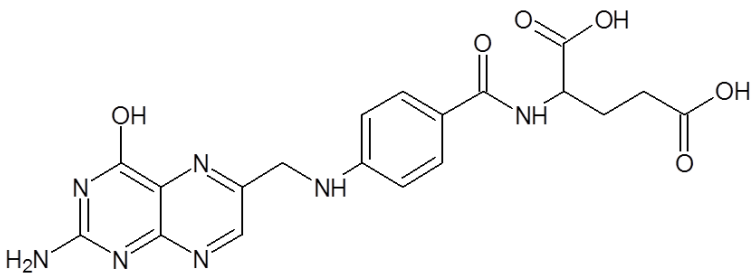
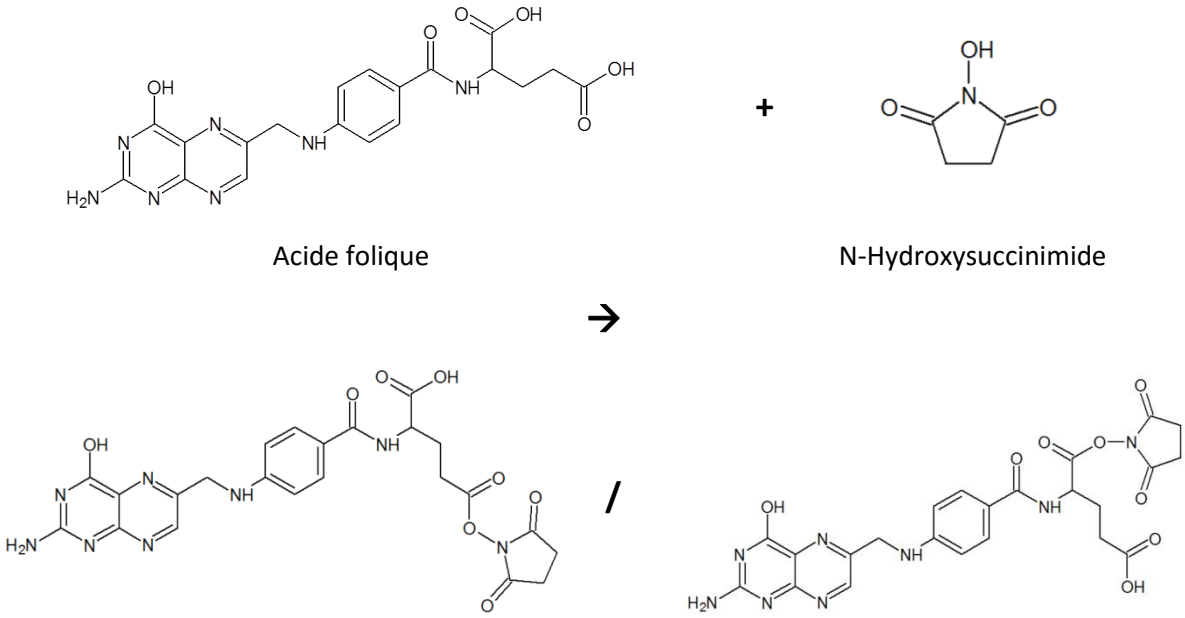


Figure III-13 : Structure de l'acide folique

La méthode la plus utilisée pour réaliser le couplage à partir de ces fonctions est basée sur l'activation de la fonction carboxylate par le NHS, en présence d'un carbodiimide (Figure III-14). Dans ce travail, notre protocole d'activation s'inspire directement du protocole proposé par Lee[231].

2,3mmol d'acide folique (1005mg) sont dissous dans 20mL de DMSO. Après 1h d'agitation, 4,6mmol de NHS (528mg) et de DCC (955mg) sont introduits. 500µL de triéthylamine sont également introduits dans la solution. La solution est soniquée durant 30s pour favoriser la solubilisation puis agitée (1000 rpm), à température ambiante et à l'abri de la lumière durant une nuit. En fin de réaction, la suspension obtenue est filtrée. Le filtrat est isolé et concentré au moyen d'un évaporateur rotatif. Le NHS-folate ainsi obtenu est ensuite précipité par ajout d'éther diéthylique sec (séché sur tamis moléculaire 4Å). Le précipité est ensuite lavé à trois reprises par l'éther diéthylique puis séché sous vide durant 24h, à l'abri de la lumière. L'échantillon purifié est analysé en spectroscopie infrarouge.



Acide folique + N-Hydroxysuccinimide → NHS-folate / NHS-folate

Figure III-14 : Schéma réactionnel simplifié du NHS avec l'acide folique

Le couplage du NHS-folate au PEG diamine est ensuite réalisé par dissolution de 65µmol de NHS-folate (35mg), de PEG diamine (MW=3000g/mol, 190mg) et 500µL de triethylamine dans 5mL de DMSO (Figure III-15). La solution est maintenue sous agitation (550 rpm), à température ambiante, et à l'abri de la lumière durant une nuit. La solution est ensuite purifiée par dialyse contre de l'eau (Spectra Por, seuil de coupure : 1kDa) durant 3 jours, à l'abri de la lumière. Après dialyse, la solution est lyophilisée et conservée à -20°C. Le lyophilisat est analysé en spectroscopie infrarouge et en RMN ^{1}H.

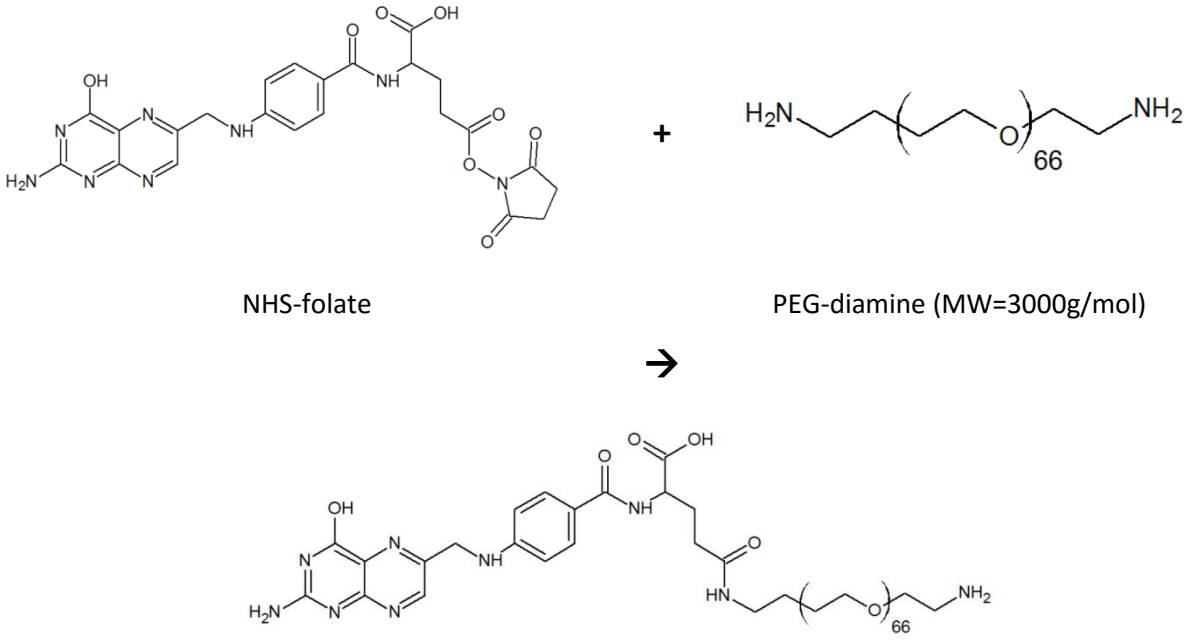


Figure III-15 : Schéma réactionnel simplifié d'un des isomères du NHS-folate avec le PEG-diamine

III.4.1.2. Couplage du PEG-folate aux nanoparticules de SiC

Différentes solutions de couplage sont envisageables pour greffer le PEG-folate sur les nanoparticules de SiC. Ces différentes solutions sont fonctions de la chimie de surface du SiC. Les nanoparticules fonctionnalisées par l'APTES présentent l'avantage d'être relativement stables et facilement caractérisables, notamment par mesure du potentiel zêta.

Pour cette raison, dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur le développement d'une technique de greffage sur ce type de nanoparticules. L'utilisation de diisothiocyanates comme le butyldiisothiocyanate ou le phénylène diisothiocyanate permet de réaliser le couplage entre la fonction amine de surface des nanoparticules de SiC et celle du PEG-folate. Comme nous l'avons vu au § I.4.3.1 du chapitre I, le butane diisothiocyanate est un « cross-linker » intéressant compte tenu de sa réactivité importante vis-à-vis des amines, l'absence de sous-produits et sa bonne solubilité

dans les solvants polaires. La réalisation de ce couplage peut être divisée en deux étapes : l'activation de la surface des particules par un large excès de « cross-linker » et le greffage du PEG-folate (Figure III-16). Les diisothiocyanates réagissant avec l'eau (la cinétique est toutefois lente et autoriserait des réactions de greffage dans l'eau[243]) et les solvants protiques en général, les étapes d'activation seront donc réalisées dans le DMF.

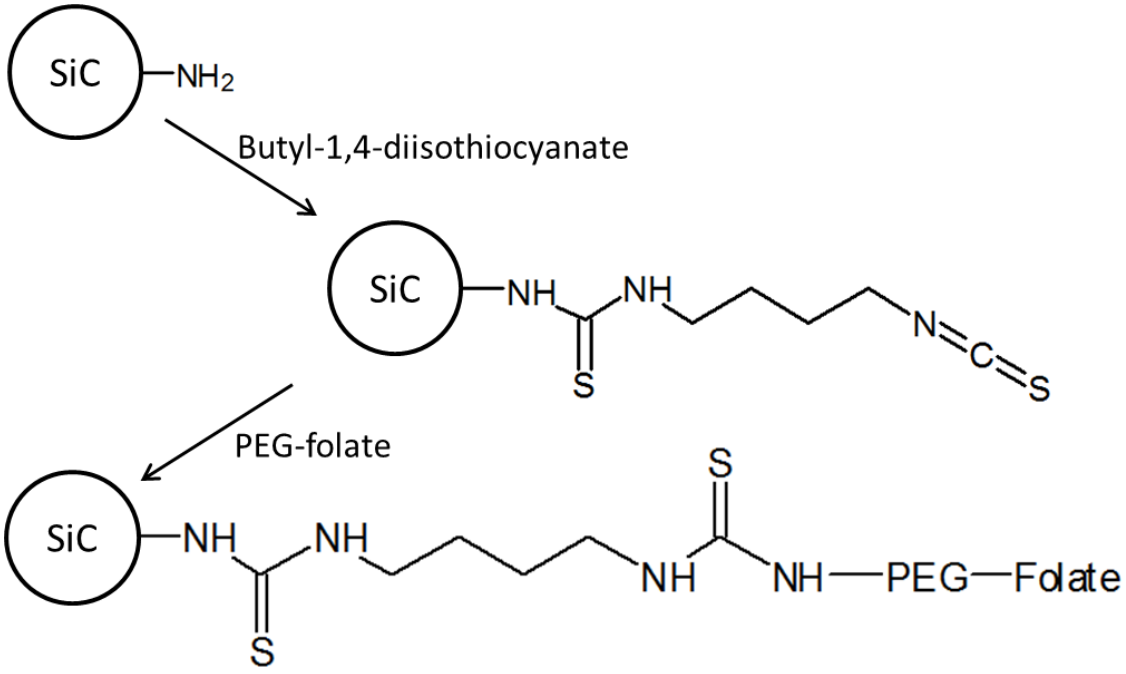


Figure III-16 : Schéma réactionnel simplifié des étapes d'activation par le butyldiisothiocyanate et de greffage du PEG-folate

1000µL de suspension aqueuse de nanoparticules aminées de SiC sont centrifugés (6700g, 2-4min) et redispersés, à deux reprises, dans le DMF pour éviter la présence d'eau. La suspension de nanoparticules de SiC dans le DMF est ensuite introduite dans 1500µL de solution de butyldiisothiocyanate à 27nM dans le DMF, soit un ratio de 10 molécules de butyldiisothiocyanate par fonction amine sur la surface des nanoparticules de SiC. Le mélange est maintenu sous agitation (1500rpm) durant une nuit. En fin de réaction, les nanoparticules sont purifiées par centrifugation (6700g, 2-4min) à deux reprises et redispersées dans le DMSO. 122nmol de PEG-folate (423µg) sont ensuite introduits. La suspension obtenue est agitée (1500rpm) durant une nuit, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les nanoparticules sont ensuite purifiées par centrifugation (6700g, 2-4min) à deux reprises et redispersées dans le DMSO. Afin d'éviter toute congélation du DMSO, la suspension est conservée à l'abri de la lumière à une température supérieure à 19°C.

Le même procédé est utilisé pour réaliser des nanoparticules de SiC PEGylées sans folate. Dans ce cas, les 122nmol de PEG-folate sont remplacées par un aminoPEG (MW=3000g/mol, 366µg).

III.4.2. Résultats de caractérisation

III.4.2.1. Synthèse du ligand PEG-folate

III.4.2.1.1. Spectroscopie infrarouge

Les caractérisations en spectroscopie infrarouge, obtenues en mode ATR, ont été réalisées après activation de l'acide folique par le NHS et après greffage entre le PEG diamine et le NHS-folate.

Dans le cas de l'activation de l'acide folique par le NHS (Figure III-17), malgré le chevauchement de plusieurs pics caractéristiques du NHS (Figure III-17a) et de l'acide folique (Figure III-17b), on peut constater plusieurs pics typiques du NHS sur le spectre du NHS-folate (Figure III-17 c). On peut noter que le NHS-folate présente deux pics typiques du NHS, le premier à 1205 cm^{-1} ainsi qu'un second, moins marqué à 1782cm^{-1}. Le pic à 1205cm^{-1} correspond à la vibration δ(N-O) tandis que le pic à 1782 cm^{-1} correspond à la vibration ν(C=O) des doubles liaisons C=O.

On retrouve également, sur le spectre du NHS-folate, des pics typiques de l'acide folique[42,299,300], notamment à 1705 cm^{-1} et 1603 cm^{-1} typiques des liaisons amides de l'acide folique. Le pic à 1705cm^{-1} correspond à la vibration ν(C=O) tandis que le pic à 1603cm^{-1} correspond à la vibration δ(N-H) du groupement amide[299]. On retrouve également le massif typique des cycles aromatiques de l'acide folique avec un pic vers 1506$cm^{-1.}$ On notera également la présence de pics à 2908cm^{-1} et 2843cm^{-1}. Ces bandes ne correspondent à aucun pic majeur de l'acide folique ou du NHS. Ces pics peuvent être attribués à la vibration ν(C-H), due à la présence de résidus de DMSO issus de l'étape de précipitation. Le pic à 943cm^{-1} pourrait également signer la présence de DMSO mais la présence de pics à proximité, spécifiques du NHS à 992cm^{-1} et du folate à 970cm^{-1} ne permet pas de conclure sur ce pic. Cette présence de DMSO résiduel n'est pas problématique, le DMSO n'étant pas à même d'hydrolyser le NHS-folate. De plus, l'étape de synthèse suivante se déroule également dans le DMSO.

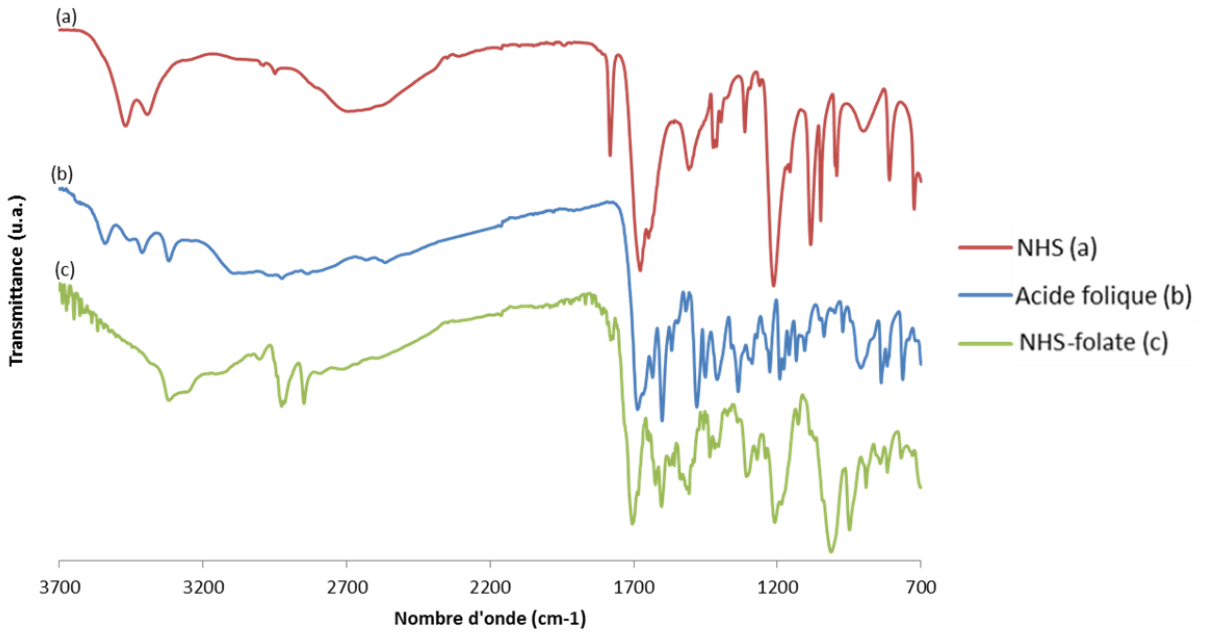


Figure III-17 : Suivi de la réaction d'activation de l'acide folique par le NHS par spectroscopie infrarouge : spectre IR du NHS (a), de l'acide folique (b) et du NHS-folate synthétisé (c)

L'analyse du greffage du NHS-folate sur le PEG diamine (Figure III-18) révèle la présence très nette de l'ensemble des pics du PEG diamine. On distingue ainsi nettement les pics du PEG liés aux liaisons C-H avec le pic correspondant à la vibration ν(C-H) à 2855 cm^{-1} et aux vibrations δ(C-H) à 1448cm^{-1}, 1340cm^{-1} et 839cm^{-1} ainsi que les pics à 958cm^{-1}, 1107cm^{-1}, 1243cm^{-1} et 1281cm^{-1}, typiques de la vibration ν(C-O) des liaisons éthers du PEG. On note également la présence d'un pic à 1601cm^{-1} et d'un épaulement à 1691cm^{-1}, lesquels correspondent à deux pics caractéristiques de l'acide folique : respectivement typiques des vibrations ν(C=O) et δ(N-H) des amides du folate[42,299,300]. On pourra également relever l'absence des pics du DMSO rencontrés lors de l'étape précédente. La dialyse a donc permis d'éliminer efficacement le solvant de réaction. La lyophilisation a également permis d'éliminer efficacement l'eau, le massif typique de l'eau vers 3200cm^{-1} étant absent.

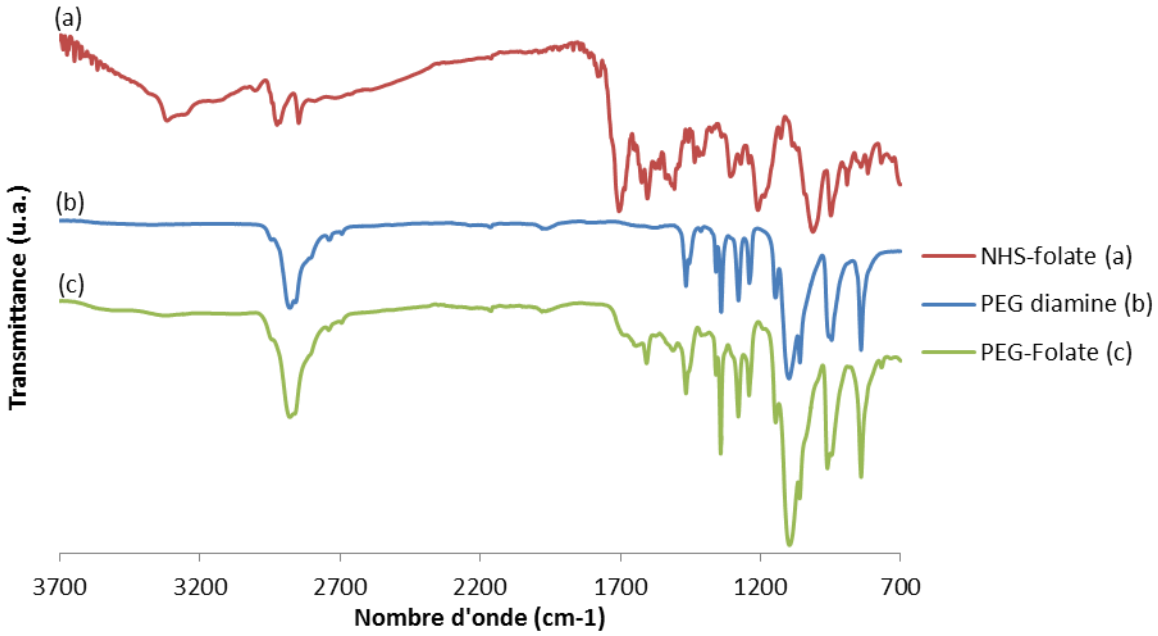


Figure III-18 : Suivi de la réaction de greffage du NHS-folate sur le PEG diamine par spectroscopie infrarouge : spectres IR du NHS-folate (a), du PEG diamine (b) et du PEG-folate (c)

III.4.2.1.2. RMN du proton

Le PEG-folate est caractérisé par RMN du proton dans l'eau deutérée à 400 MHz. On normalise les valeurs d'intégrales en fixant l'aire du pic à 3,72ppm à 2H afin de disposer des valeurs d'aires entières pour chacun des pics du PEG. On observe les pics suivants (Figure III-20): 3,5-3,66ppm (m, 276H, h), 3,72ppm (t, 2H, i), 4,74ppm (s, 1H, e), 6,76ppm (t, 1,3H, c), 7,61ppm (t, 1,3H, d), 8,71ppm (a, 0,6H). La position et l'attribution (Figure III-19) de ces pics est cohérente avec les données issues de la littérature[300,301].

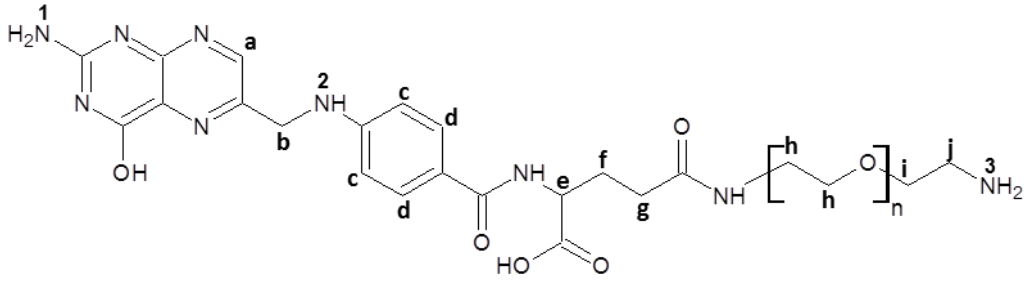


Figure III-19 : Formule du PEG-folate, avec sa numérotation[300]

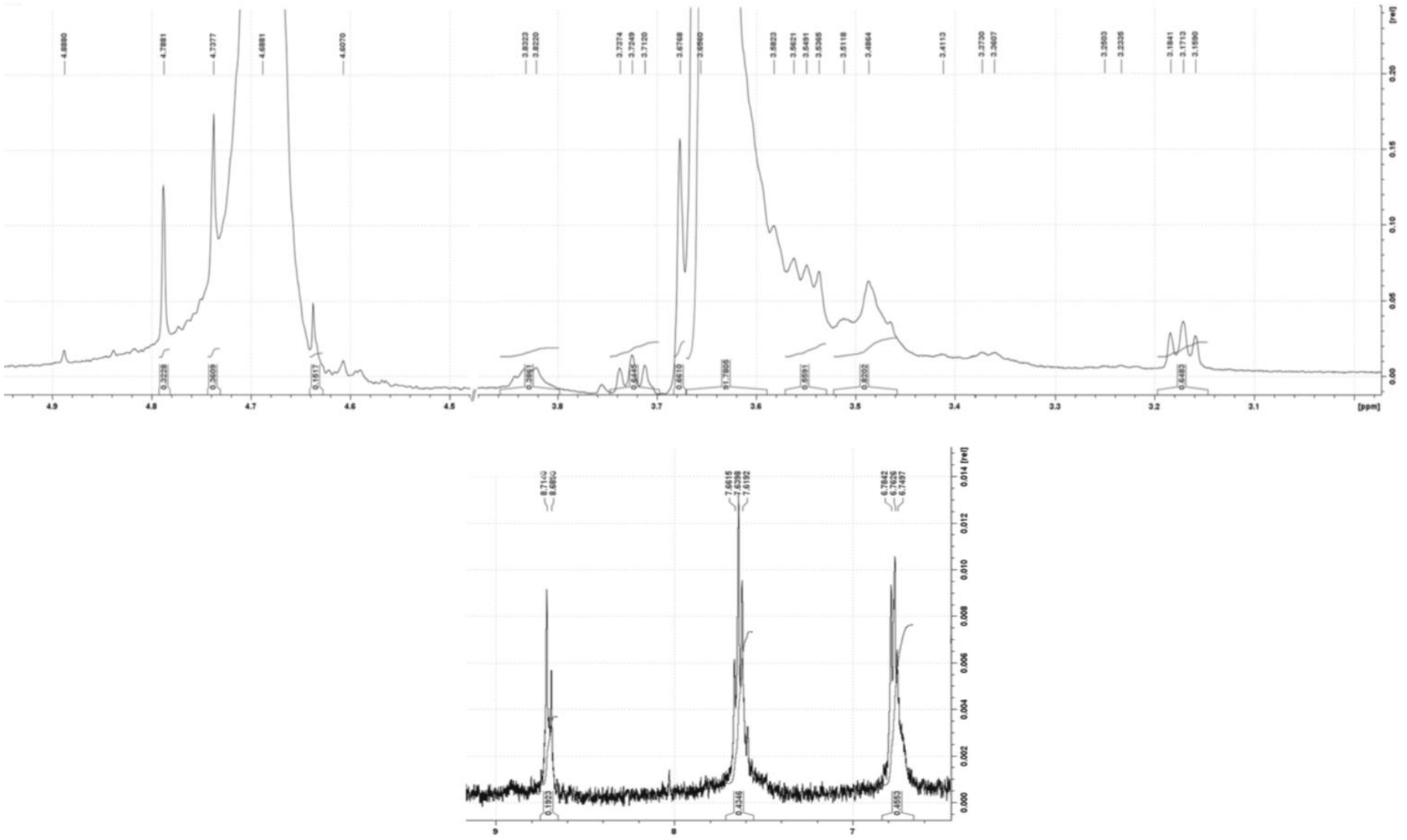


Figure III-20 : Spectre RMN ^{1}H du PEG-folate

L'analyse fine du spectre RMN permet de mettre en évidence différents points intéressants. Tout d'abord, on remarque la présence de triplets pour les pics attribués à l'acide folique à 6,76ppm et 7,61ppm et d'un doublet à 8,71ppm. Théoriquement, ces pics devraient apparaitre sous la forme, respectivement de doublets et d'un singulet. Ce dédoublement pourrait s'expliquer par la présence d'isomères. Les deux isomères les plus probables à envisager sont liés à la position de greffage du PEG sur l'acide folique qui peut se réaliser sur le carboxylate en alpha du carbone e ou sur le carboxylate en alpha du carbone g. Le greffage d'un acide folique sur l'amine 1 ou 2 d'un acide folique déjà greffé sur le PEG peut également être envisagé bien que ces deux amines soient très peu réactives du fait de leurs faibles nucléophilies. Par ailleurs, on peut constater que les aires des pics correspondant au PEG correspondent exactement aux nombres d'hydrogènes attendus. A l'inverse, les aires des pics correspondant à l'acide folique ne correspondent pas avec les valeurs attendues. Ces valeurs sont inférieures d'un facteur 1,5 environ. Cette différence remarquable peut être interprétée comme le fait, qu'en moyenne, environ 2/3 des molécules de PEG sont fonctionnalisées par des folates. Le rendement de la réaction est donc proche de 65%.

III.4.2.2. Couplage du PEG-folate aux nanoparticules de SiC

III.4.2.2.1. Spectroscopie d'absorption UV-Visible

L'acide folique possédant plusieurs bandes d'absorption, il est possible de détecter son greffage sur les nanoparticules de SiC par spectroscopie d'absorption UV-Visible. Toutefois, les nanoparticules de SiC diffusant fortement la lumière (Figure III-21), il est nécessaire de travailler à faible concentration et de retraiter les courbes afin d'éliminer ce signal de bruit de fond. La valeur d'absorbance à 750nm est utilisée pour estimer la concentration en nanoparticules de SiC et le signal de diffusion associé. A partir de cette estimation, il est alors possible de retrancher le signal de diffusion lié aux nanoparticules de SiC sur l'ensemble du spectre (insert sur la Figure III-21). Le spectre d'absorption UV-Vis du PEG-folate présente deux pics d'absorption à 288nm et 358nm[302] (Figure III-21). Le pic à 358nm, bien que moins intense est également utilisé pour caractériser l'acide folique du fait de la non transparence de nombreux solvants en deçà de 290nm.

On peut ainsi constater sur la Figure III-21b que le spectre d'absorption UV-Vis de nos nanoparticules révèle un pic net à 290nm avec un épaulement à 360nm. Ce spectre semble indiquer la présence d'acide folique sur nos nanoparticules. Toutefois, compte tenu des différentes approximations dues aux traitements mathématiques nécessaires pour isoler le signal de l'acide folique et à l'absorbance importante du DMSO dans cette plage de longueur d'onde, il paraît hasardeux de tirer un résultat quantitatif de ces analyses.

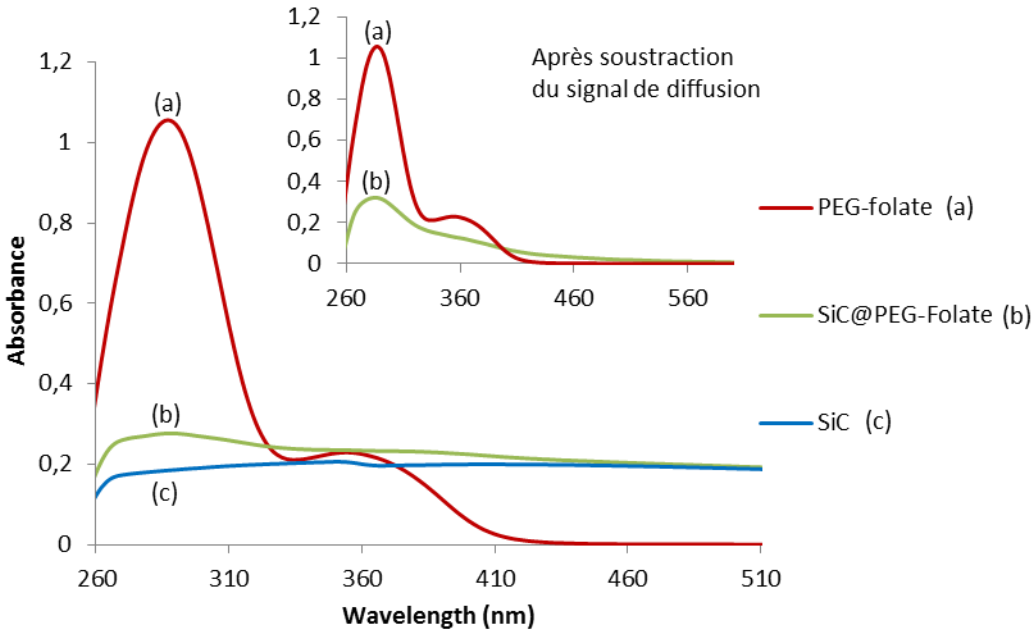


Figure III-21 : Spectres d'absorption UV-Visible du PEG-folate (a), des nanoparticules de SiC fonctionnalisées par le PEG-folate (b) et des nanoparticules de SiC non silanisées (c). L'insert montre les spectres obtenus après élimination du bruit de fond de diffusion lié aux nanoparticules de SiC

III.4.2.2.2. Analyses XPS

Dans un premier temps, le PEG-folate a été analysé par XPS. La composition élémentaire, décrite dans le Tableau III-5.

Echantillon	Pourcentage atomique (%)		
	C	O	N
PEG diamine seul (théorique)	66,34	32,68	0,97
PEG-folate seul (théorique)	65,68	30,51	3,80
Mix PEG-folate/PEG 65% (théorique)	65,88	31,17	2,95
PEG-Folate (Mix à 65%) (Expérimental)	68,16±0,60	24,50±0,84	2,36±0,40

Tableau III-5 : Pourcentages atomiques, théoriques et déterminés par XPS du PEG-folate

Les résultats de pourcentage atomique montrent une teneur en azote de 2,36%. Cette teneur est intermédiaire entre les teneurs en azote théoriques du PEG diamine seul et du PEG-folate seul. Après calcul, on détermine que la teneur de 2,36% correspondrait à un mélange 48:52 de PEG-diamine et

de PEG folate. Un tel résultat diffère légèrement des résultats obtenus en RMN (§III.4.2.1.2.), où le rapport obtenu était de 35:65.

On peut également remarquer une teneur en carbone supérieure au maximum théorique de 66,34% (correspondant à un PEG-diamine pur). Ces différences pourraient être liée à la présence de contaminants ou à une dégradation de l'échantillon durant l'analyse XPS[303] avec élimination de sous-produits riches en oxygène et en azote. Toutefois, l'analyse XPS a été réalisée de manière à limiter au maximum toute dégradation ce qui accréditerait l'hypothèse d'un contaminant. De plus, un contaminant carboné permettrait d'expliquer cette surreprésentation du carbone.

L'analyse des pics du niveau C1s (Figure III-22 gauche) du PEG folate montre trois pics à 284,99, 286,61 et 287,99eV (représentant respectivement 19,3 et 74,8% du signal total). Les deux pics de plus basse énergie peuvent être attribués respectivement aux liaisons C-C et C-O. Le pic à 287,99eV correspond aux groupements amides. Le niveau N1s (Figure III-22 droite) est quant à lui très simple, limité à un pic à 399,79eV, typique des liaisons C-N.

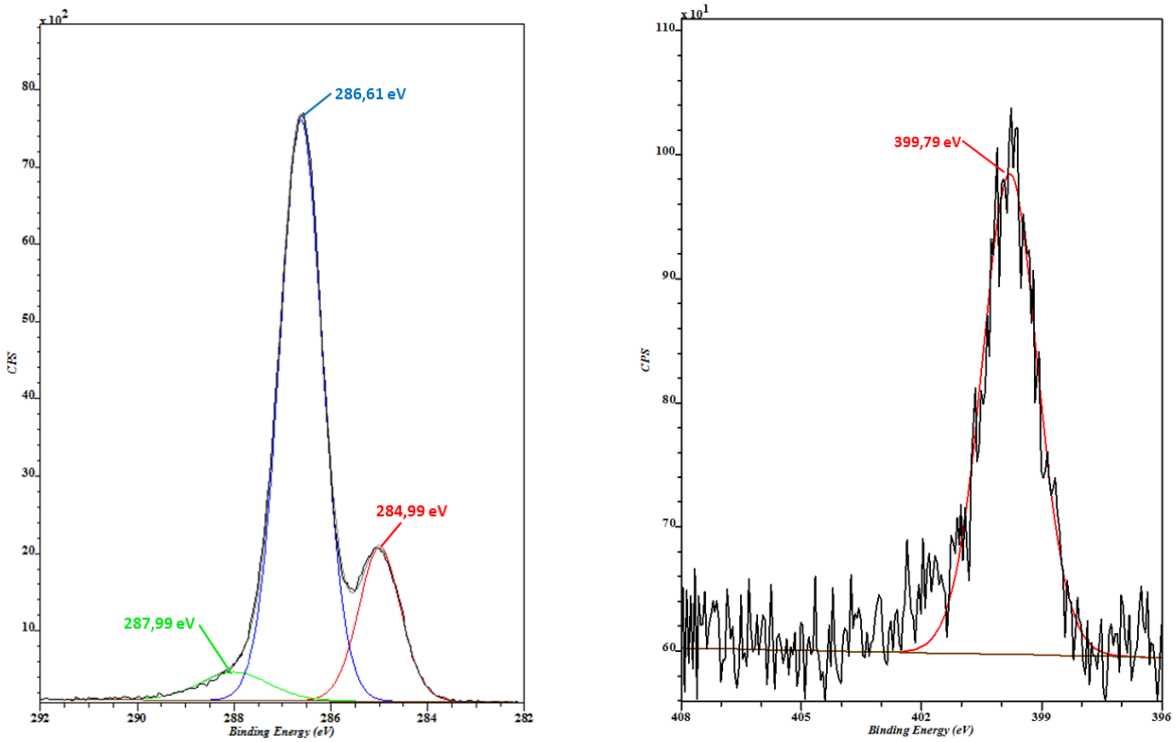


Figure III-22 : Spectres XPS du PEG-folate seul pour le niveau C1s (gauche) et N1s (droite)

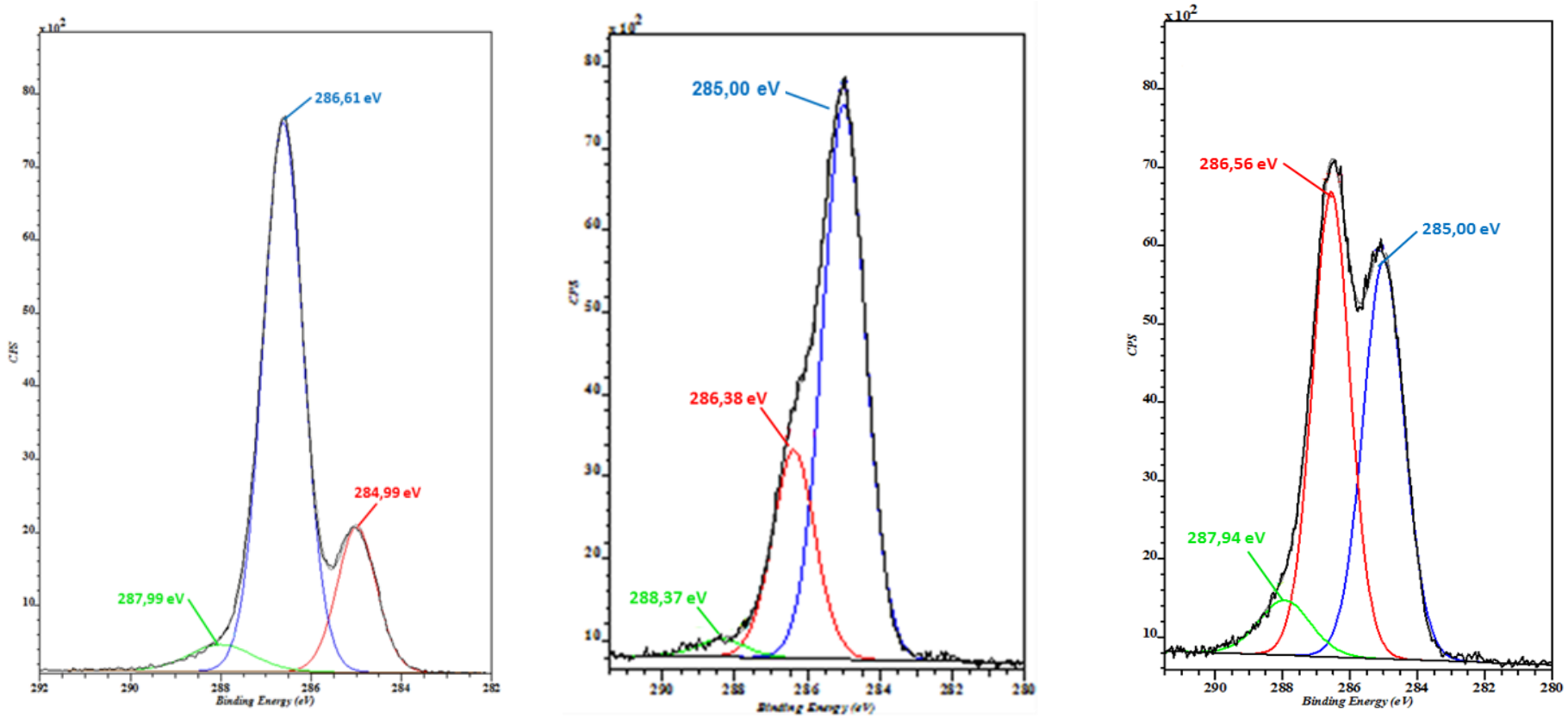
Le greffage du PEG-folate sur les nanoparticules de SiC a ensuite été étudié. On peut, dans un premier temps, constater la légère augmentation de la teneur en carbone par rapport aux nanoparticules de SiC silanisées (Tableau III-6). Cet accroissement peut s'expliquer par la présence du PEG-folate, lequel est particulièrement riche en carbone. En analysant en détail le niveau C1s (Figure III-23), on peut constater que le pic du SiC-folate présente trois pics dont deux très marqués à 285,00

et 286,56eV (respectivement 44,4 et 47,8%). Le pic à 285,00eV semble provenir du SiC traité par l'APTES. En revanche, le second pic, à 286,56eV est présent mais peu intense (26,6%) dans l'échantillon non fonctionnalisé par le PEG folate. A l'inverse, ce pic devient très intense après greffage du PEG-folate. On retrouve d'ailleurs ce pic sur le spectre du PEG-folate seul, où il signe la présence des nombreuses liaisons C-O présentes dans le PEG. On peut donc conclure à la présence du PEG à la surface des nanoparticules. De plus, le pic à 287,94eV est relativement intense (7,76%) sur l'échantillon de SiC-folate. En comparaison, ce pic ne représente que 2,6% et 5,9% du signal total dans le cas du SiC silanisé par l'APTES et dans le cas du PEG-folate seul, respectivement. Ce pic marqué, typique des liaisons amides indique donc la présence du PEG-folate sur les nanoparticules. De plus, on constate que l'intensité de ce pic est plus marquée pour le PEG-folate greffé que le PEG-folate libre. Cette différence peut être attribuée à la contribution des thiourées servant à greffer le PEG-folate à la surface, lesquelles présentent également un pic vers 288eV.

Concernant l'azote, en regardant en détail le niveau N1s (Figure III-24), on constate un dédoublement du pic avec un pic à 399,62eV et un second pic à 401,44eV. Le pic de basse énergie est très probablement une composition de différents pics, notamment des amides et des thiourées. Ces pics sont très proches et il n'a donc pas été possible de les déconvoluer. Le second pic indique clairement la présence d'atomes d'azotes protonés. On constate la coexistence de ces deux formes, ce qui est cohérent avec la présence concomitante d'azotes basiques sur le cycle ptéridine de l'acide folique et d'azotes ayant perdu ce caractère basique du fait de leur participation à des mésoméries. Ces azotes protonés sont absents du spectre du PEG-folate pur, ce qui peut s'expliquer par le fait que cet échantillon ait été analysé directement après lyophilisation, tandis que les nanoparticules de SiC-folate, ont été analysées par séchage d'une suspension de ces nanoparticules.

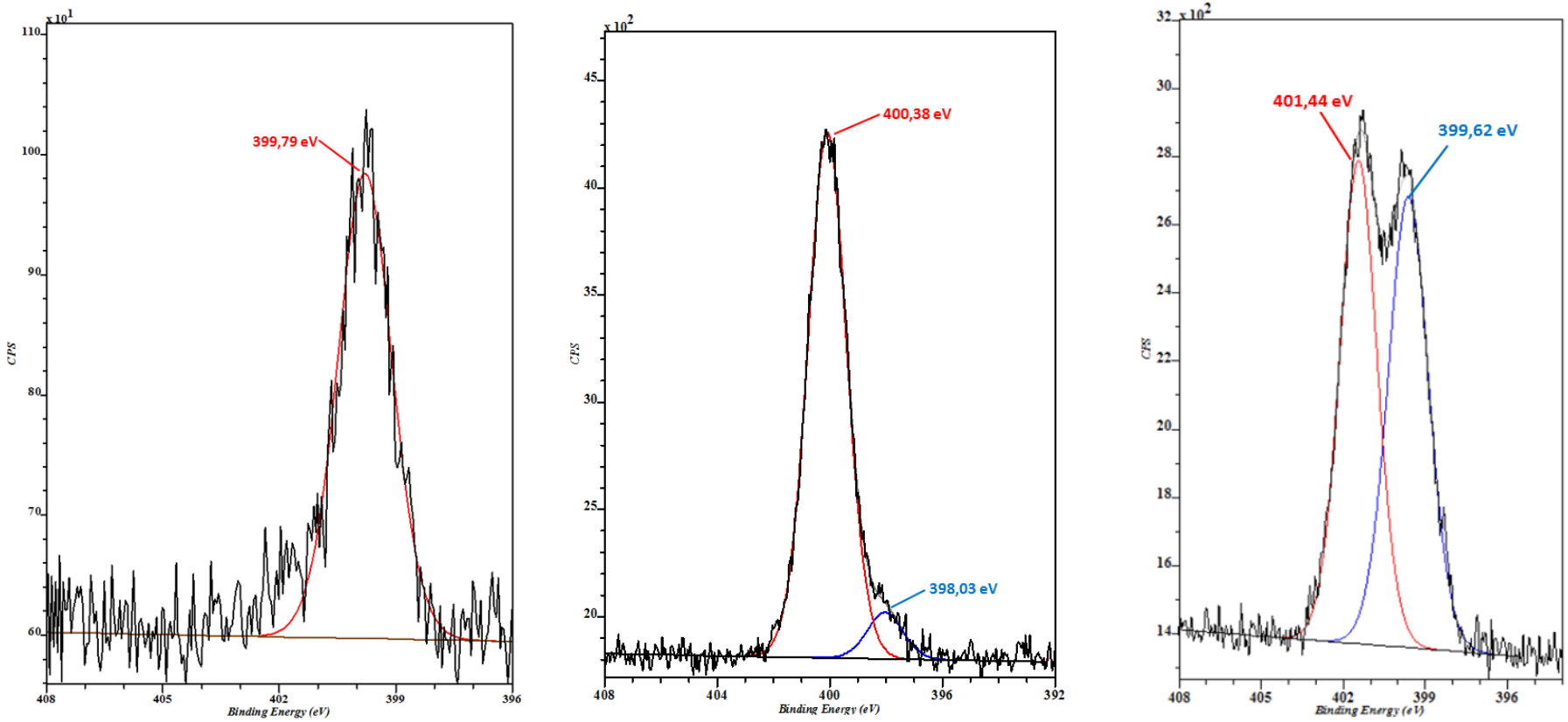
Echantillon	Pourcentage atomique (%)					
	C	O	N	Si	S	Autres
PEG-folate	68,16±0,66	24,50±0,84	2,36±0,33	--	--	--
SiC silanisé 2x	45,90±0,30	32,14±0,60	8,91±0,40	8,40±0,15	4,27±0,22	<0,5
SiC@PEG-Folate	54,73±1,5	27,7±2,1	8,74±0,18	6,36±0,45	2,0±0,19	<0,5

Tableau III-6 : Pourcentages atomiques déterminés par XPS pour le PEG-folate et des nanoparticules de SiC, silanisées par l'APTES, et après greffage du PEG-folate



PEG-folate | SiC silanisé 2x | SiC@PEG-folate

Figure III-23 : Spectres XPS du niveau C1s pour le PEG-folate, des nanoparticules de SiC silanisé 2 fois par l'APTES, et après le greffage du PEG-folate



PEG-folate SiC silanisé 2x SiC@PEG-folate

Figure III-24 : Spectres XPS du niveau N1s pour le PEG-folate, des nanoparticules de SiC silanisées deux fois par l'APTES, et après le greffage du PEG-folate

L'analyse du silicium permet d'obtenir également différentes informations. Tout d'abord, on constate une diminution de la teneur en silicium de 8,4 à 6,3% (Tableau III-6), notamment au profit du carbone apporté par le PEG-folate. Une telle diminution peut être reliée à la présence d'une coquille de PEG folate, épaisse de plusieurs nanomètres, à la surface des nanoparticules. L'analyse détaillée du niveau Si2p (Figure III-25) montre que les deux échantillons sont très similaires, avec un pic très intense à 102,6eV, typique des liaisons Si-C de l'APTES et d'un second pic (potentiel dans le cas du SiC-Folate) à 100,3eV, caractéristique de nos nanoparticules.

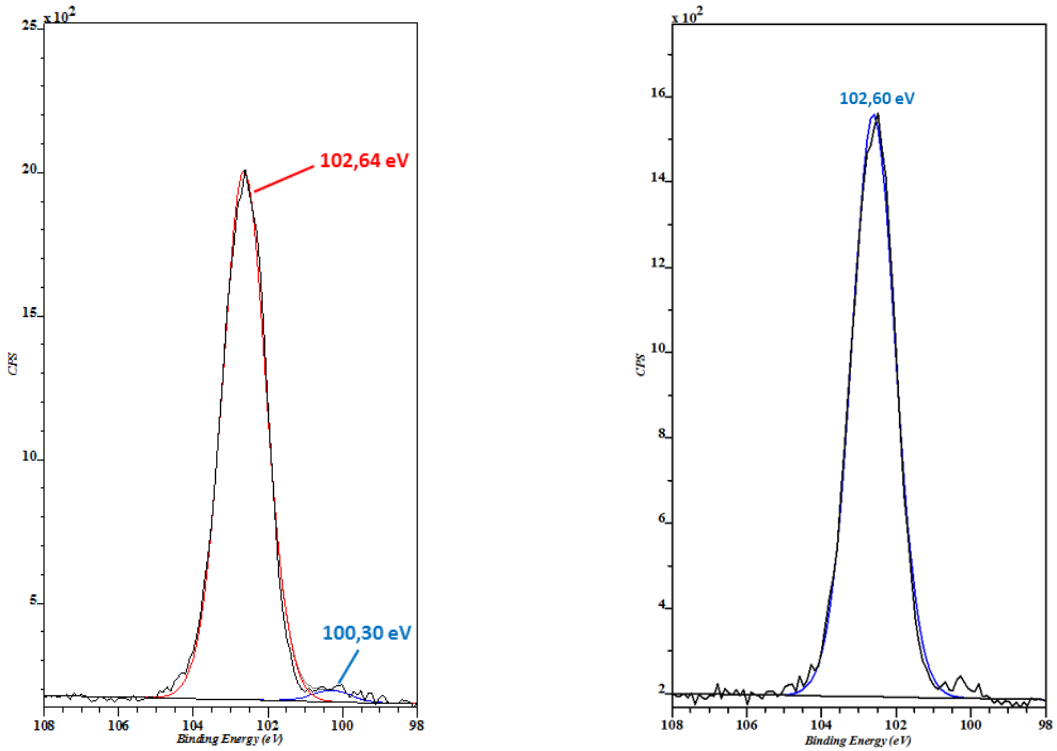


Figure III-25 : Spectres XPS du niveau Si2p des nanoparticules de SiC silanisées deux fois par l'APTES, avant (gauche) et après (droite) le greffage du PEG-folate

Enfin, la présence de soufre est intéressante car elle pourrait signer la présence des thiourées. Toutefois, le niveau S2p (Figure III-26) montre des pics de hautes énergies, très similaires aux pics déjà présents dans l'échantillon silanisé par l'APTES. Ces pics sont donc probablement attribuables à une contamination, probablement par les sulfates. De plus, la présence résiduelle de DMSO, le solvant de synthèse, est également envisageable (le vide utilisé pour l'analyse XPS aurait toutefois eu tendance à l'évaporer). Il convient toutefois de signaler qu'une autre hypothèse intéressante peut être discutée. En effet, les thiourées sont sensibles à la dégradation, notamment par oxydation. Cette hypothèse est d'autant plus intéressante que les analyses XPS sont connues pour induire des dégradation durant l'irradiation[303] et que les thiourées y sont particulièrement sensibles[304], compte tenu de la sensibilité élevée des liaisons C-S aux mécanismes radicalaires. Par ailleurs, cette dégradation peut également se produire avant les analyses XPS puisque la présence de dioxygène

et/ou une exposition à des photons peuvent induire une oxydation des thiourées. Les différents mécanismes possibles peuvent aboutir à différents oxydes tels que des acides sulfiniques[305] voire des oxydes de soufres volatils (et donc non détectés par l'analyse XPS). Enfin, l'atome de soufre peut également être substitué par un atome d'oxygène et ainsi aboutir à une urée classique. On peut donc envisager la présence d'un pic issu des contributions conjointes de contaminants et de thiourées oxydées. Dans ce cas, l'analyse ToF-SIMS pourra permettre de fournir des informations complémentaires.

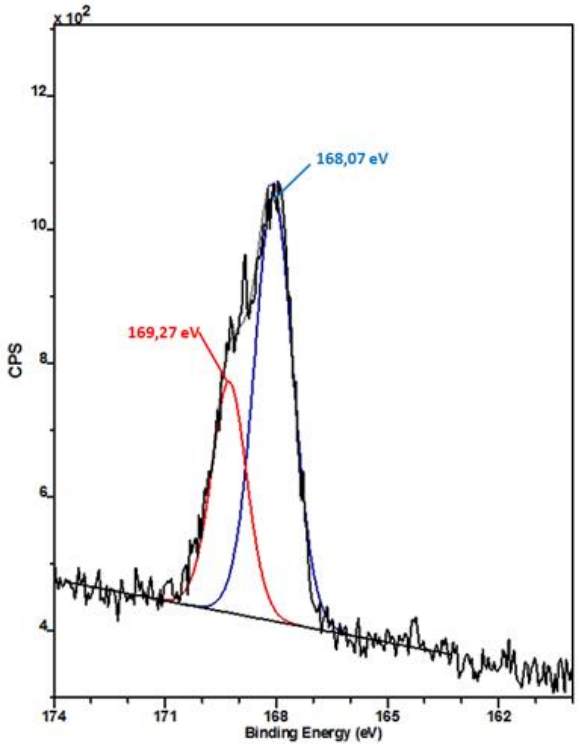


Figure III-26 : Spectre XPS du niveau S2p des nanoparticules de SiC silanisées deux fois par l'APTES, après le greffage du PEG-folate

Pour conclure sur l'analyse XPS, les différentes évolutions constatées semblent aller dans le sens de la présence du PEG-folate à la surface des nanoparticules. Ces résultats, notamment vis-à-vis du soufre, gagneront à être confirmés par les analyses ToF-SIMS.

III.4.2.2.3. Spectroscopie infrarouge

L'analyse des spectres IR des nanoparticules de SiC fonctionnalisées par le PEG-folate (Figure III-27) permet de distinguer quatre zones d'intérêts : 2750-2950cm^{-1}, 1600-1700cm^{-1}, 950-1150cm^{-1} et 750-950cm^{-1}. Pour chacune de ces quatre zones, les deux échantillons de référence (PEG-folate et nanoparticules de SiC aminées) présentent des pics typiques. Pour la zone 2750-2950cm^{-1}, les pics peuvent être attribués aux vibrations ν(C-H) des liaisons C-H du PEG pour le PEG-folate (Figure III-27a) et de l'APTES pour les nanoparticules de SiC aminées (Figure III-27c). Le spectre des

nanoparticules de SiC modifiées par le PEG-folate (Figure III-27b) présente pour sa part un double pic dans cette région, qui pourrait s'expliquer par la présence conjointe des pics issus de l'APTES et du PEG.

Pour la zone 1600-1700cm^{-1}, les pics peuvent être attribués à la vibration ν(C=O) des liaisons C=O de l'acide folique pour le PEG-folate et aux phonons du SiC pour les nanoparticules de SiC aminées. Ces deux pics sont décalés d'environ 70cm^{-1}. On retrouve ce même décalage dans l'échantillon de nanoparticules de SiC-PEG-folate avec un premier pic à 1610cm^{-1}, attribuable aux carbonyles de l'acide folique[42,299,300] et un second pic vers 1520cm^{-1}, attribuable soit aux phonons du SiC, soit aux cycles aromatiques de l'acide folique.

Pour la zone 950-1150cm^{-1}, les pics peuvent être attribués à la vibration ν(C-O) des liaisons éther du PEG-folate et à la vibration δ(Si-O) des liaisons Si-O-Si pour les nanoparticules de SiC aminées. Il est à noter que les liaisons C=S, des groupements thiourées[306], sont également caractérisés par une bande intense entre 1030cm^{-1} et 1250cm^{-1} due à la vibration ν(C=S). La phase de dépôt des nanoparticules étant relativement longue et le groupement isothiocyanate/thiourée étant relativement instable au contact de l'humidité de l'air, il n'a pas été entrepris d'analyses sur les nanoparticules de SiC aminées traitées par le butane diisothiocyanate. Le double pic présent pour les nanoparticules de SiC modifiées par le PEG-folate est donc complexe à interpréter. Le premier pic, situé à 1003cm^{-1}, peut être attribué à la δ(Si-O) du massif Si-O-Si mais pour le pic à 1107cm^{-1}, une incertitude existe entre les vibrations ν(C=S) et ν(C-O). Compte tenu de l'intensité du pic, on peut émettre l'hypothèse que ce pic est lié aux liaisons C-O, qui sont beaucoup plus nombreuses, vu la masse molaire importante du PEG utilisé (MW=3000g/mol).

Pour la zone 750-950cm^{-1}, les pics peuvent être attribués aux vibrations ν(C-O) des éthers du PEG pour le PEG-folate et au phonon du SiC pour les nanoparticules de SiC aminées. On remarque aussi nettement le pic inversé à 950cm^{-1}, typique du SiC-3C[285,286]. Compte tenu de l'intensité très marquée du signal du SiC, il n'est pas possible de distinguer les pics du PEG sur le spectre des nanoparticules SiC modifiées par le PEG-folate.

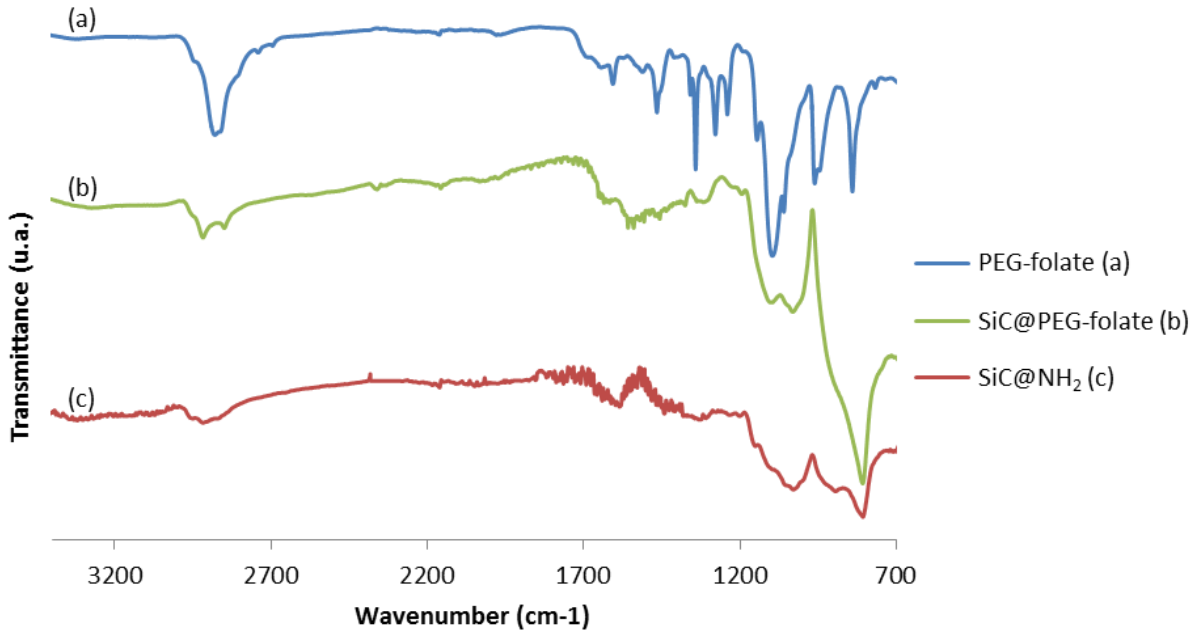


Figure III-27 : Spectres IR de du PEG-folate (a), des nanoparticules de SiC fonctionnalisées par le PEG-folate (b) et des nanoparticules de SiC aminées (c)

III.4.2.2.4. Analyses ToF-SIMS

Les principaux fragments positifs et négatifs sont présentés dans le Tableau III-7. On peut remarquer que les fragments liés à l'APTES, présents avant le greffage du PEG-folate ne sont plus présents après greffage. Compte tenu de la profondeur d'analyse de la technique (inférieure au nanomètre), cette disparition indique que l'épaisseur de la couche de PEG-folate en surface des nanoparticules est supérieure à cette profondeur d'analyse du ToF-SIMS (≈0,5nm). On peut également constater que de nombreux fragments présents sur le SiC@PEG-Folate correspondent à des fragments du PEG-folate. Parmi les différents fragments, certains peuvent être attribués, avec peu de doute, au PEG-diamine, notamment les fragments à 44,04 et 58,03, typiques des sous unités du PEG-diamine.

On retrouve également différents fragments (m/z=162,04; 176,04; 295,13; 295,14) de masse importante, à la fois pour le PEG-folate pur et le SiC@PEG-folate. Parmi ces fragments, les fragments à 162,04 et 176,04 sont identifiables puisqu'ils correspondent vraisemblablement au cycle ptéridine de l'acide folique (Figure III-28). Enfin, on note trois fragments soufrés présents uniquement pour l'échantillon SiC@PEG-folate. La présence de soufre permet de montrer la présence du butane diisothiocyanate. De plus, le fragment à 71,99 correspond clairement à la thiourée, ce qui confirme les observations en XPS. De plus, ce fragment indique clairement une thiourée non oxydée, ce qui accréditerait l'hypothèse d'une dégradation de cette thiourée lors de l'analyse XPS. La présence de

la thiourée ne permet toutefois pas de confirmer à 100% le greffage covalent du PEG-folate à la surface puisque la réaction APTES-diisothiocyanate aboutit également à cette thiourée. Au-delà de ce fragment, très informatif et aisément attribuable, on peut noter deux autres fragments à 138,95 et 139,95. Ces fragments présentant des compositions contenant du soufre sont très étonnants. Toutefois, la fragmentation en ToF-SIMS est d'une grande complexité, et après recombination, de tels fragments peuvent malgré tout être envisagés, la présence de soufre signant malgré tout la réaction entre diisothiocyanates et amines.

m/z	SiC silanisé 2x par l'APTES	SiC@PEG-Folate	PEG-Folate	Formule brute du fragment	Origine potentielle
44,00	Présent	Absent	Absent	$SiNH_2^+$	Fragment secondaire avec de l'azote, provenant de l'APTES
57,05	Présent	Absent	Absent	$C_3H_7N^+$	Fragment aminopropyl de l'APTES
86,99	Présent	Absent	Absent	$SiC_3H_9N^+$	Fragment silylpropanamine de l'APTES
44,04	Absent	Présent	Présent	$C_2H_4O^+$	Sous-unité oxyde d'éthylène du PEG
58,03	Absent	Présent	Présent	$C_2H_4NO^+$	Fragment aminoéthyl provenant des terminaisons aminées du PEG
87.05	Absent	Présent	Présent	$C_2H_7NO_2^+$	
162,04	Absent	Présent	Présent	$C_6H_4N_5O^-$	Fragment issu du cycle ptéridine de l'acide folique
176,04	Absent	Présent	Présent	$C_7H_6N_5O^-$	Fragment issu du cycle ptéridine de l'acide folique
295,13	Absent	Présent	Présent	$C_{22}H_{16}O^+$	
295,14	Absent	Présent	Présent	$C_{19}H_{19}O_3^+$	
71,99	Absent	Présent	Absent	$CSN_2^+/C_2H_2NS^+$	Thiourée
138,95	Absent	Présent	Absent	$SiH_5SNO_2^+$	
139,95	Absent	Présent	Absent	$S_2N_3O_2H_2^+$	

Tableau III-7 : Principaux fragments positifs et négatifs obtenus en ToF-SIMS pour le PEG-folate, et des nanoparticules de SiC silanisées à deux reprises par l'APTES, avant et après greffage de PEG-folate

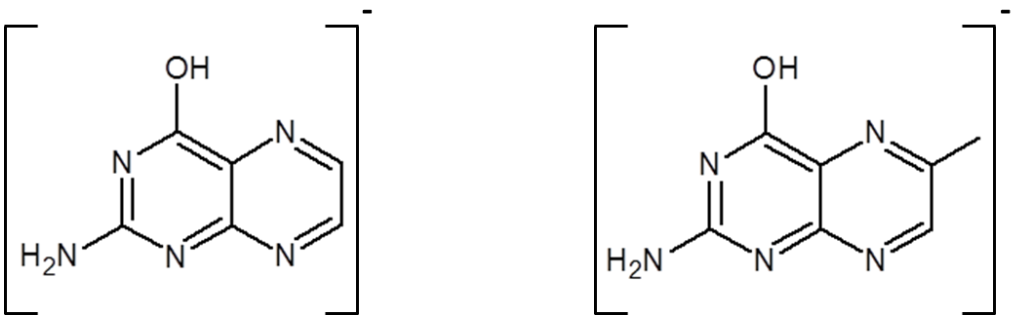


Figure III-28 : Structure probable des fragments m/z=16,04 (gauche) et m/z=176,04 (droite)

III.4.3. Conclusions sur le greffage du PEG-folate

Au travers de ces différentes analyses, nous avons pu montrer la présence claire du PEG-folate à la surface de nos nanoparticules, que ce soit par spectroscopie UV-Vis, infrarouge, XPS et par ToF SIMS. Par ailleurs, l'XPS et le ToF SIMS confirment la présence du diisothiocyanate sur nos nanoparticules. Toutefois, deux points restent en suspens. Tout d'abord, la nature des interactions entre SiC et PEG-folate est-elle covalente ou liée à des interactions faibles (voire une coexistence des deux) ? Ensuite, quelle quantité de folate est réellement présente à la surface des nanoparticules ? L'intérêt pour ce point est toutefois partiel, Gu *et al* ayant montré que les quantités de ligand par nanoparticule pour parvenir à un ciblage optimal sont très faibles[307]. Pour répondre à ces questions, il pourrait être utile d'analyser en détail les particules de SiC silanisées par l'APTES puis traitées par le butyl-diisothiocyanate afin de disposer d'un point de comparaison intermédiaire. Toutefois, la stabilité limitée de cet intermédiaire a constitué une limite à la réalisation de ces analyses.

III.5. Conclusions

Dans ce chapitre, la fonctionnalisation des nanorods d'or et des nanoparticules de SiC par des alkylthiols et des silanes a été réalisée. Par ailleurs, ces nanoparticules fonctionnalisées ont pu être couplées ensemble, par l'intermédiaire de ces fonctions chimiques, pour obtenir des nanohybrides. Enfin, nous sommes parvenus à greffer un PEG-folate à la surface de nos nanoparticules de SiC autorisant ainsi le ciblage de cellules cancéreuses. Dans la suite de ce travail, il sera alors possible d'étudier le comportement de nos nanoparticules et nanohybrides. Il sera nécessaire de tester les propriétés optiques non linéaires des nanoparticules mais il sera également possible de tester les capacités de ciblage de nos nanoparticules traitées par l'acide folique ainsi que de vérifier la stabilité de nos nanohybrides en conditions biologiques.

IV. UTILISATION DES NANOPARTICULES ET DES NANO-HYBRIDES POUR LE MARQUAGE CELLULAIRE

Dans les chapitres II et III nous avons détaillé les protocoles de synthèse et la fonctionnalisation de nanoparticules de SiC, de $KNbO_3$, et d'or, soit pour permettre la synthèse de nanoparticules hybrides soit pour leur permettre de cibler spécifiquement des cellules cancéreuses. Ce chapitre présentera l'utilisation de ces nanoparticules de SiC, de $KNbO_3$, nanorods d'or et des nanohybrides SiC@Au et $KNbO_3$@Au pour le marquage cellulaire en microscopie multiphotonique.

Dans un premier temps, nous introduirons les techniques de caractérisation ONL utilisées dans ces travaux. Dans un second temps, les propriétés optiques non linéaires de ces nanoparticules, isolées ou sous forme de nanohybrides seront présentées. Enfin, les résultats obtenus en imagerie cellulaire seront détaillés. Il s'agira ici de présenter des images obtenues par marquage non spécifique de cellules saines puis d'évaluer l'influence du couplage plasmonique sur les propriétés optiques non linéaires des nanohybrides. Enfin, nous montrerons qu'il est possible de cibler spécifiquement des cellules cancéreuses par des nanoparticules de SiC fonctionnalisées par l'acide folique.

IV.1. Description des techniques de caractérisations ONL

Pour caractériser les propriétés optiques non linéaires de nos nanoparticules, deux techniques ont été utilisées : la microscopie multiphotonique et les mesures de diffusion Hyper Rayleigh (le plus souvent appelées mesures HRS pour « Hyper Rayleigh Scattering »).

IV.1.1. Description du microscope multiphotonique

Le microscope sur lequel les images ont été réalisées est situé au laboratoire GAP Biophotonics de l'Université de Genève. Nous avons pu l'utiliser lors de plusieurs campagnes d'expériences dans le cadre d'une collaboration étroite avec l'équipe de Luigi Bonacina. Le montage expérimental est composé d'un microscope multiphotonique A1R-MP (Nikon) et d'une source laser Mai-Tai DeepSee (Spectra-Physics). La configuration de ce microscope est décrite dans la Figure IV-1. La source lumineuse est un laser Ti:Saphir délivrant une puissance moyenne de 2,5W à 800nm sous la forme de pulses de 100fs de durée minimale et avec un taux de répétition de 80MHz. Ce laser est accordable sur une plage de longueur d'onde allant de 690 à 1040nm. Toutefois, la puissance du laser décroit rapidement et devient faible pour des valeurs en dehors de la plage de 800±100nm (Figure IV-2).

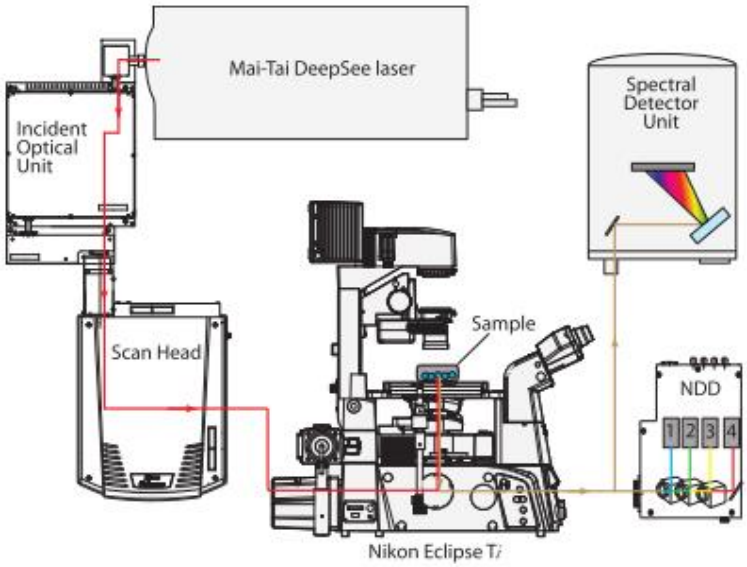


Figure IV-1 : Schéma du montage du microscope multiphotonique A1R-MP

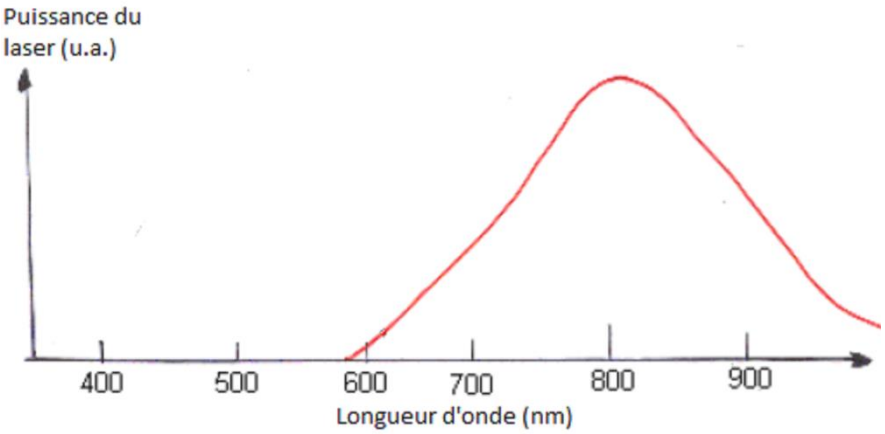


Figure IV-2 : Puissance du laser en fonction de la longueur d'onde d'émission

Ce laser est couplé à un module DeepSee permettant de corriger la dispersion du pulse laser avant son passage dans l'optique du microscope. Le microscope A1R-MP est quant à lui constitué d'un microscope inversé, d'un dispositif permettant de scanner l'échantillon et de deux types de détecteurs pour collecter le signal.

Le premier détecteur permet d'acquérir une image en 4 canaux, au moyen de 4 photomultiplicateurs (noté NDD sur la Figure IV-1). Les plages de détection que nous avons utilisées avec ce détecteur sont : 390-400nm, 426-442nm, 475-495nm et 572-642nm. Les images présentées dans ce chapitre ont toutes été obtenues à l'aide de ce détecteur.

Le second détecteur est un détecteur spectral composé de 32 photomultiplicateurs couvrant la plage 400-650nm. Le signal en provenance du microscope est diffracté par un réseau et projeté sur la barrette de photomultiplicateurs. Trois réseaux peuvent être utilisés, permettant d'obtenir des résolutions spectrales de 2,5nm, 6nm et 10nm. Ce détecteur permet d'acquérir des images hyperspectrales ou d'obtenir le spectre d'émission de l'image entière ou d'une zone d'intérêt plus limitée. Ce détecteur est environ 4 fois moins sensible que le détecteur NDD. Il a été utilisé pour déterminer le spectre d'émission de nos nanoparticules.

Afin de maximiser la résolution, le microscope inversé est équipé d'objectifs à immersion dans l'eau à grande ouverture numérique (NA=1.27, grossissement x60).

IV.1.2. Description du montage HRS

D'un point de vue général, un montage HRS (Figure IV-3) est conçu pour mesurer l'intensité d'un signal optique non linéaire.

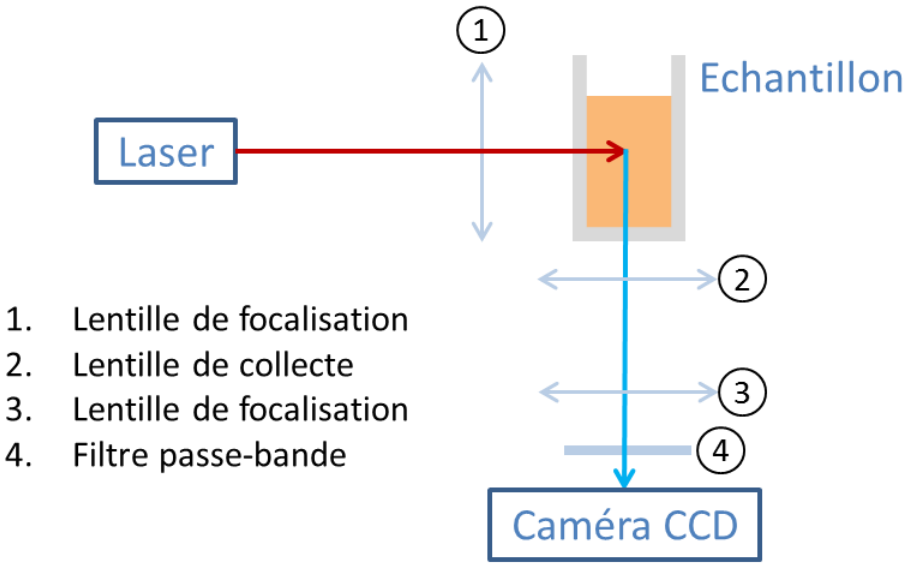


Figure IV-3 : Schéma du montage HRS

Ce montage partage le même laser que celui utilisé pour la microscopie (§ IV.1.1.). Il est adapté pour permettre la mesure des intensités émises en milieu liquide. Le faisceau laser est focalisé, au moyen d'une lentille, au sein d'une cuve quartz. Le signal réémis à 90° est collecté par une première lentille, puis focalisé sur une caméra CCD par une seconde lentille. La caméra CCD permet de couvrir la plage 405-615nm. Afin d'éviter une surexposition aux photons fondamentaux du laser, un filtre passe-

bande FGB37 de marque Thorlabs (plage de transparence : 350-550nm) est installé entre la cuve et la caméra CCD pour filtrer les longueurs d'onde correspondant au laser.

A partir des intensités mesurées, il est alors possible de remonter aux coefficients des tenseurs de susceptibilité électriques. Dans notre cas, nous nous sommes servis de ce type d'appareillage uniquement pour quantifier l'intensité de signal SHG émis par nos échantillons, sans remonter aux valeurs des tenseurs.

IV.2. Imagerie par microscopie multiphotonique des cellules saines marquées par les nanoparticules et les nanohybrides

Comme nous l'avons vu au chapitre II, les nanoparticules de SiC et de $KNbO_3$ présentent des structures cristallines non centrosymétriques et sont donc capables de présenter un signal de génération de second harmonique (SHG). Toutefois, compte tenu des différents traitements subis par ces nanoparticules (traitement thermique, modifications chimiques, etc…), l'hypothèse d'une perte de ces propriétés peut être envisagée. Aussi, avons-nous vérifié que nos nanoparticules conservent bien leurs propriétés optiques.

Nous avons choisi de vérifier que ces propriétés étaient conservées dans les conditions de culture cellulaire (conditions que nous qualifierons de « biologiques » par la suite) en utilisant ces nanoparticules pour imager des cellules.

Par ailleurs, les propriétés de luminescence à deux photons de nos nanorods d'or doivent également être déterminées. En effet, les nanorods d'or présentent des propriétés de luminescence à deux photons qui varient selon leur rapport d'aspect selon Wang *et al*[308]. Ici nous nous intéresserons plus particulièrement aux propriétés optiques de nanorods avec un rapport d'aspect de 3,7 et une bande plasmon située à 790 nm.

Enfin, la stabilité structurale et colloïdale de nos nanohybrides en conditions biologiques doit être évaluée. En effet, les interactions non covalentes permettant de maintenir la cohésion au sein des nanohybrides pourraient être brisées dans des conditions moins favorables que l'eau déionisée, telles que les conditions biologiques.

Cette partie présentera donc les propriétés ONL des différentes nanoparticules et des différents nanohybrides utilisés au cours de ces travaux (Tableau IV-1). Des caractérisations par microscopie multiphotonique ont été réalisées pour mesurer, qualitativement, ces propriétés optiques. Afin d'évaluer l'impact des conditions biologiques sur les propriétés optiques des nanoparticules et sur la

stabilité des nanohybrides, ces mesures ont été réalisées après incubation sur cellules saines (fibroblastes 3t3).

Les nanoparticules étudiées dans un premier temps ne disposeront d'aucun système permettant le ciblage cellulaire. Aussi, pour ces essais, les cellules seront-elles marquées de manière non spécifique.

Pour les travaux présentés par la suite, les nanoparticules suivantes ont été utilisées :

	Caractéristiques
Nanorods d'or	11x44nm, AR=3,7, bande plasmon à 790nm, stabilisés par le CTAB
Nanoparticules de SiC	d=150nm
Nanoparticules de $KNbO_3$	Tailles comprises entre 50 et 500nm
Nanohybrides SiC-Or (SiC@Au)	Interactions SiC (d=150 nm)-Or (11x44 nm) de type électrostatiques
Nanohybrides $KNbO_3$-Or ($KNbO_3$@Au)	Interactions $KNbO_3$ (d=50-500 nm)-Or (11x44 nm) par liaisons phosphonates-métal

Tableau IV-1 : Récapitulatif des nanoparticules et nanohybrides utilisés dans ce chapitre

IV.2.1. Incubation des nanoparticules et des nanohybrides sur cellules saines

Les cultures cellulaires ont été réalisées avec Alain Géloën, au Laboratoire de recherche en cardiovasculaire, métabolisme, diabétologie et nutrition de l'INSA de Lyon. Les cellules saines utilisées sont des fibroblastes murins 3t3 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) qui mesurent entre 20 et 30 µm de long et 5 à 10 µm de large. Toutes les cultures sont effectuées dans un incubateur Heraeus, à 37°C, dans une atmosphère saturée en eau, avec 5% de CO_2. Le milieu de culture utilisé est le DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), supplémenté avec 4,5g/L de glucose, 10% de sérum de veau, 100UI de pénicilline et 100µg de streptomycine. En l'absence d'agent de ciblage, les nanoparticules sont incubées sur cellules, avec une concentration élevée en nanoparticules de l'ordre de 150µg/mL, dans du DMEM. Après 24h d'incubation, les cellules sont lavées à 3 reprises dans du PBS 1X, pH 7,4 puis fixées sur lames par de l'éthanol pour observation.

IV.2.2. Conditions expérimentales pour l'observation des cellules marquées et la réalisation des mesures spectrales

Pour l'imagerie cellulaire, les observations en microscopie sont réalisées avec le détecteur NDD. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 800nm, ce qui correspond au maximum d'efficacité du laser (Figure IV-2).

Afin de déterminer le spectre d'émission des nanorods d'or et des nanohybrides, il est nécessaire d'utiliser le détecteur spectral du microscope. Ce dernier couvre la plage 400-650nm avec une résolution spectrale de 10nm. Afin de pouvoir observer le pic SHG dans son intégralité, il est donc préférable d'exciter les particules à 820nm.

Pour éviter le signal d'autofluorescence en provenance des cellules, cette analyse a été réalisée sur un échantillon de nanoparticules sans cellules. En l'occurrence, l'échantillon a été préparé par dépôt d'une goutte de suspension de nanorods d'or ou de nanohybrides (C≈2g/L) sur une lame de verre. Cette goutte est ensuite recouverte d'une lamelle (afin d'éviter le séchage de l'eau et donc l'agrégation des nanoparticules). La lame obtenue est observée au microscope et le spectre réalisé à l'aide du détecteur spectral du microscope.

IV.2.3. Résultats en imagerie cellulaire

IV.2.3.1. Marquage de cellules saines par les nanoparticules de SiC et de $KNbO_3$

Les images des fibroblastes 3t3 marquées par des nanoparticules de $KNbO_3$ et de SiC sont présentées sur la Figure IV-4 et la Figure IV-5. Les spots correspondant au signal de SHG détecté à 400nm (pour une longueur d'onde d'excitation de 800nm) apparaissent en bleu et proviennent des nanoparticules. Le signal de TPEF détecté provenant de l'autofluorescence des cellules est principalement détecté dans la plage 426-495nm.

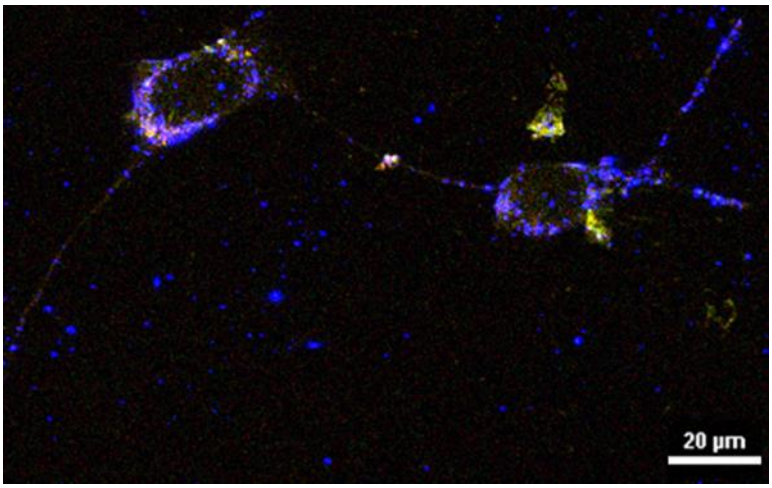


Figure IV-4 : Cellules saines 3t3 marquées par des nanoparticules de $KNbO_3$ observées en microscopie multiphotonique SHG (λ_{ex}=800nm), Plage de détection : 390-642nm.

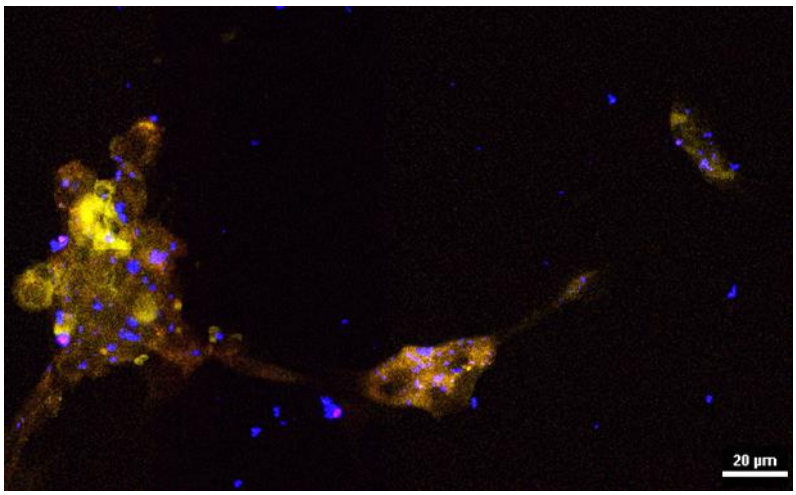


Figure IV-5 : Cellules saines 3t3 marquées par des nanoparticules de SiC observées en microscopie multiphotonique SHG (λ_{ex}=800nm), Plage de détection : 390-642nm

On peut constater que les images présentent des spots SHG très nets que ce soient pour les nanoparticules de $KNbO_3$ (Figure IV-4) ou de SiC (Figure IV-5). La conservation des propriétés SHG de ces nanoparticules confirme l'absence d'impact des traitements réalisés et de l'exposition aux conditions biologiques. Un tel résultat est cohérent avec les résultats en XRD qui indiquaient (§ II.4.2.1 et II.5.2.1 du chapitre II) que les structures non centrosymétriques de ces nanoparticules étaient conservées. De plus, il convient de remarquer que la contribution des surfaces aux propriétés SHG des nanoparticules peut être négligée[309]. Ainsi, les traitements de surface réalisés ont-ils un impact négligeable sur ces propriétés.

Une grande partie de ces spots est localisée sur les cellules. La différence en termes de nombres de spots sur les cellules peut s'expliquer par une quantité différente de nanoparticules introduites lors de l'incubation. En effet, la concentration en SiC de la suspension est élevée et mesurable, par pesée de l'extrait sec. En revanche, pour la suspension de $KNbO_3$, la concentration est faible et il n'a pas été possible de mesurer la masse de l'extrait sec, compte tenu de la sensibilité de la balance (0,1mg). Pour rappel, la suspension finale de nanoparticules de $KNbO_3$ est obtenue à partir d'une suspension de poudre de $KNbO_3$ décantée durant 7 jours. Par conséquent, pour estimer la concentration de la suspension, nous avons considéré que la concentration du surnageant après décantation était de l'ordre de 1% de la concentration initiale. La suspension est alors reconcentrée par centrifugation pour obtenir une concentration proche de celle de la suspension de SiC. Cette approximation étant arbitraire, une différence de concentration peut être présente et peut expliquer la différence de marquage entre les échantillons marqués SiC et $KNbO_3$.

IV.2.3.2. Détermination des propriétés de luminescence à deux photons et marquage de cellules saines par les nanorods d'or

Le spectre d'émission à deux photons des nanorods d'or pour une excitation à 820nm est présenté sur la Figure IV-6(à droite). Il a été obtenu en prenant la moyenne des intensités de tous les spots lumineux présents sur l'image obtenue en microscopie (Figure IV-6, gauche).

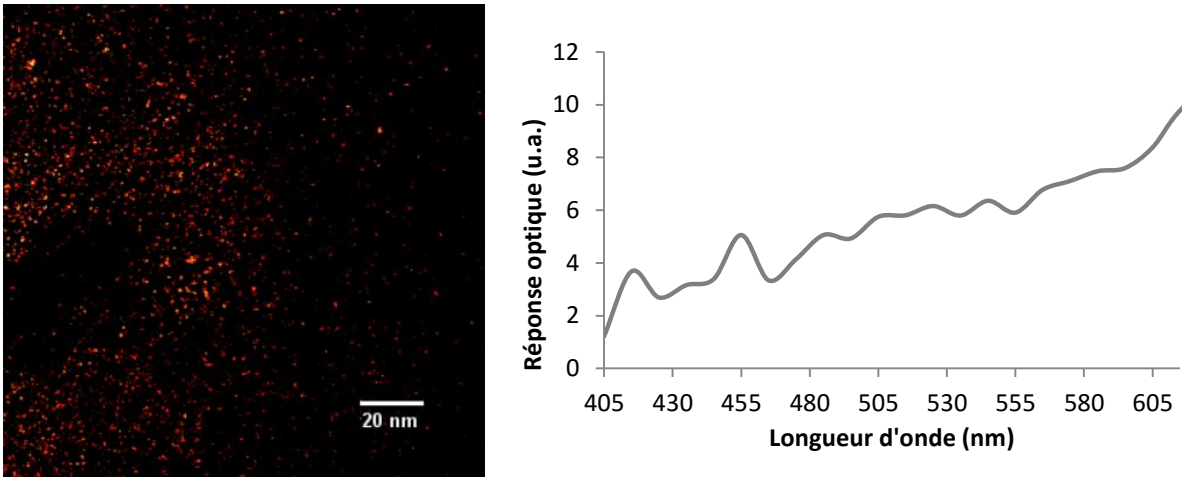


Figure IV-6 : Image (gauche) de nanorods d'or (AR=3,7) observés en microscopie multiphotonique (λ_{ex}=820nm), Plage de détection : 390-642nm et spectre d'émission associé (droite)

On peut constater que le spectre de luminescence à deux photons de l'or est globalement continu (Figure IV-6 droite) avec une augmentation de l'intensité du signal émis pour les grandes longueurs d'onde. Une telle constatation est cohérente avec les résultats décrits par Wang *et al*[308] : pour des

nanorods d'or de différents rapports d'aspect, on constate toujours le même profil continu et dont l'intensité va croissante pour les grandes longueurs d'onde. De la même manière, on observe un petit pic SHG à 410 nm sur nos échantillons qui est également présent dans les résultats présentés par Wang *et al*. On pourra remarquer que l'intensité de ce pic est très faible dans les deux cas. Cette constatation se retrouve visuellement sur l'image où le signal rouge (correspondant au canal 607±35nm) prédomine très largement et où le signal bleu du canal SHG n'est pas visible. Par ailleurs, les différents auteurs utilisant les nanorods d'or comme marqueurs ONL rapportent tous une activité en luminescence à deux photons marquée sans faire état de propriétés SHG nettes[52–54]. Enfin, le petit pic à 455nm peut être considéré comme un artefact de mesure, ce pic ayant été retrouvé sur différents autres échantillons.

L'utilisation des nanorods pour le marquage cellulaire (Figure IV-7) révèle quant à lui un comportement très différent de celui des nanoparticules de SiC et de $KNbO_3$.

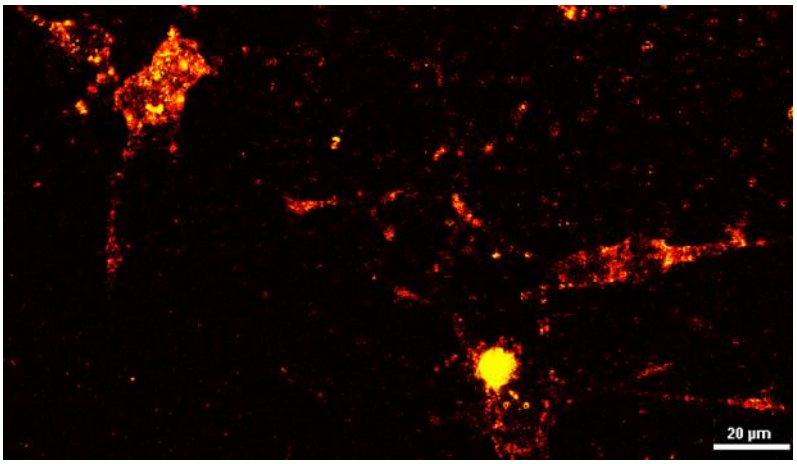


Figure IV-7 : Cellules 3t3 marquées par des nanorods d'or (AR=3,7) observées en microscopie multiphotonique (λ_{ex}=800nm), Plage de détection : 390-642nm

On peut en effet constater que le signal de luminescence des nanorods est distribué de manière relativement homogène dans les cellules. Cette distribution laisse penser que les nanorods ont une taille suffisamment faible pour pénétrer et se répartir dans toute la cellule. De plus, la charge cationique de surface due au CTAB présent à la surface des nanorods d'or favorise également leur pénétration au sein des cellules. En comparaison, les nanoparticules de SiC et de $KNbO_3$ ont davantage tendance à s'accumuler sur les pourtours des cellules. La différence de taille (11x44nm pour les nanorods, environ 150nm de diamètre pour les nanoparticules de SiC et de $KNbO_3$) et de charge de surface (potentiel zêta positif pour les nanorods, négatifs pour les nanoparticules de SiC et de $KNbO_3$) pourrait expliquer cette différence de comportement[277,310]. Par ailleurs une telle capacité de pénétration est à comparer aux résultats présentés par Chithrani *et al*[277] où sont rapportés que la

forme allongée des nanorods est peu favorable à la pénétration cellulaire. En effet, pour des nanorods de dimensions 14x50nm, Chithrani *et al* montrent des niveaux d'absorption de l'ordre de 10 à 100 particules/cellules (contre plus de 1000 pour des nanosphères) qu'ils considèrent comme faibles. Nos résultats en imagerie ne nous permettent pas de quantifier cette pénétration. Toutefois, d'un point de vue qualitatif, les cellules apparaissent comme particulièrement chargées en nanorods. Les raisons d'une possible différence d'absorption sont nombreuses (type cellulaire, charge de surface, conditions de culture, etc..) et n'ont pas été étudiées plus avant. Toutefois, la charge négative des nanorods utilisés par Chithrani *et al* semble l'hypothèse la plus probable pour expliquer la différence d'absorption avec nos nanorods chargés positivement. Il conviendra de garder à l'esprit ces propriétés de pénétration lorsqu'il s'agira d'évaluer le profil toxicologique de nos nanorods d'or (voir chapitre 5).

IV.2.3.3. Marquage de cellules saines par les nanohybrides SiC@Au et $KNbO_3$@Au

Les nanohybrides SiC@Au et $KNbO_3$@Au présentent des applications potentielles intéressantes, qu'il s'agisse d'imagerie exaltée par plasmon ou de systèmes multiplexés thérapie-imagerie. Toutefois, pour que ces systèmes soient utiles, il est nécessaire que les interactions non covalentes qui maintiennent les différentes nanoparticules soient stables (§I.4.4 du chapitre I) en conditions biologiques. Nous avons vu dans les paragraphes précédents que les nanorods d'or et les nanoparticules de SiC et de $KNbO_3$ présentent des activités ONL très différentes (luminescence à deux photons pour les nanorods d'or, génération de second harmonique pour les nanoparticules de SiC et de $KNbO_3$). Il est donc possible de suivre, par microscopie multiphotonique, la colocalisation de ces deux types de signaux (à 400nm pour la SHG des nanoparticules de SiC et de $KNbO_3$ et 607nm pour la luminescence à deux photons des nanorods d'or, pour une excitation à 800 nm) pour vérifier que les deux types de nanoparticules sont bien liées l'une à l'autre.

Les cellules présentent naturellement une autofluorescence dans le jaune-rouge (pour une excitation à 800nm). Ce signal rouge pourrait fausser les résultats de colocalisation. En effet, dans ces conditions, des émetteurs SHG isolés mais en contact avec la membrane cellulaire aboutiraient à des signaux à 400nm et 607nm colocalisés. Par conséquent, il est nécessaire de travailler à faible puissance laser. En effet, l'autofluorescence est un phénomène peu efficace, comparativement à la luminescence à deux photons (l'écart d'intensité est d'environ trois ordres de grandeur[52]). Celle-ci a donc été minimisée en abaissant la puissance laser, de sorte que le signal à 607nm, provienne des nanorods d'or. De plus, les nanorods, sous leur forme de nanohybrides devraient luminescer sous la forme de spots nettement localisés dans l'espace alors que l'autofluorescence cellulaire se

caractérisera par un signal plus diffus. De manière générale, pour des puissances laser inférieures à 25% de la puissance nominale du laser du microscope, le phénomène d'autofluorescence est très peu marqué voire absent.

La Figure IV-8 présente les images de cellules 3t3 marquées par des nanohybrides.

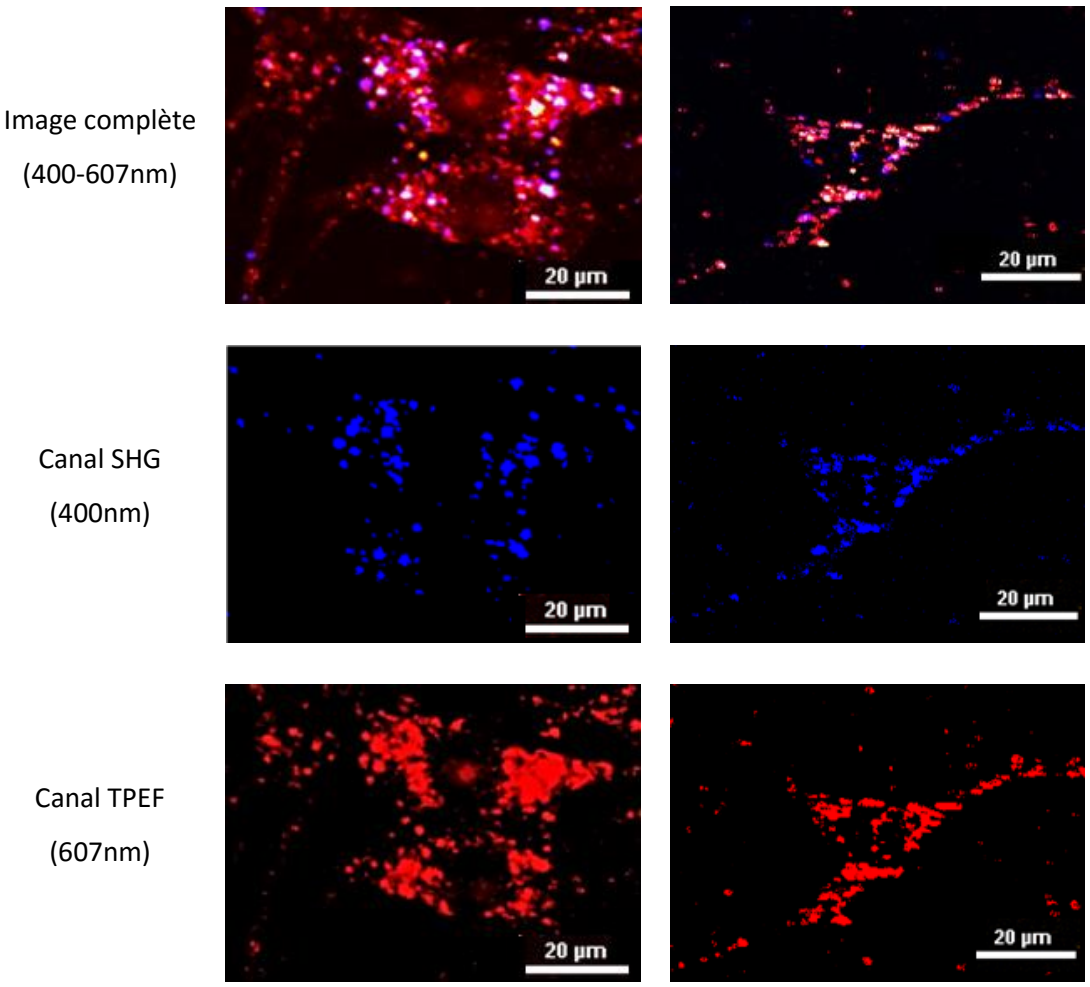


Figure IV-8 : Cellules saines 3t3 marquées par des nanohybrides observées en microscopie multiphotonique (λ_{ex}=800nm)

On peut constater sur la Figure IV-8 que les spots SHG présentent une bonne corrélation géographique avec les spots de luminescence à deux photons de l'or. On peut donc en conclure que les liaisons non covalentes, qu'elles soient électrostatiques (pour SiC@Au) ou de type P-O-Nb (pour $KNbO_3$@Au) sont suffisamment stables pour maintenir la cohésion au sein des deux types de nanohybrides. La technique de microscopie ne nous permet cependant pas de déterminer si un type d'interaction permet une meilleure stabilité.

Par ailleurs, étant donné que l'analyse est réalisée sur des échantillons séchés, il subsiste un doute quant au fait que cette colocalisation soit purement fortuite et induite par le séchage. Toutefois, les

étapes de lavages réalisées avant et après fixation réduisent ce risque d'agrégation lié au séchage puisque les nanoparticules « libres » auront été éliminées avant l'ultime étape de séchage.

Des analyses du spectre d'émission ont également été réalisées sur les nanohybrides SiC@Au (Figure IV-9). Ces nanohybrides présentant une stabilité colloïdale plus faible que les nanoparticules de SiC, ils sont triés en stabilité au cours d'une première étape de décantation de 10min. Les nanoparticules les moins stables et les plus susceptibles de former de gros agrégats sont ainsi éliminées. En effet, avec la présence de gros agrégats présentant une section efficace importante, le risque est de surévaluer le signal SHG de la population globale des nanohybrides. Les nanohybrides $KNbO_3$@Au n'étant pas suffisamment stables, ce tri en taille n'est pas possible et le spectre d'émission de ces nanohybrides n'a donc pas été analysé. Une goutte du surnageant restant, constitué des nanohybrides les plus stables (et donc non agrégés), est ensuite déposée sur une lame de verre puis analysée. La goutte est recouverte d'une lamelle pour éviter le séchage trop rapide de la suspension.
Le spectre obtenu (Figure IV-9) révèle un pic SHG très net à 410 nm pour les nanoparticules de SiC et les nanohybrides SiC@Au. Le pic SHG est moins intense pour les nanohybrides. Cette différence peut s'expliquer par le fait que le tri en stabilité opéré avant la mesure entraine la précipitation d'un certain nombre de nanohybrides. Cette différence de concentration explique alors la différence d'intensité SHG. On peut également constater un signal non nul entre 420nm et 610nm pour les nanohybrides SiC@Au alors qu'il est quasi nul pour les nanoparticules de SiC. Ce signal augmente avec la longueur d'onde, indiquant qu'il s'agit bien du signal de luminescence à deux photons des nanorods d'or. Ce signal relativement faible peut être expliqué par le faible nombre de nanorods d'or par nanoparticule de SiC. Enfin, on retrouve le pic artefact à 455nm sur chacune des 3 courbes, ce qui montre bien que ce pic est indépendant des échantillons analysés et à relier à l'appareillage.

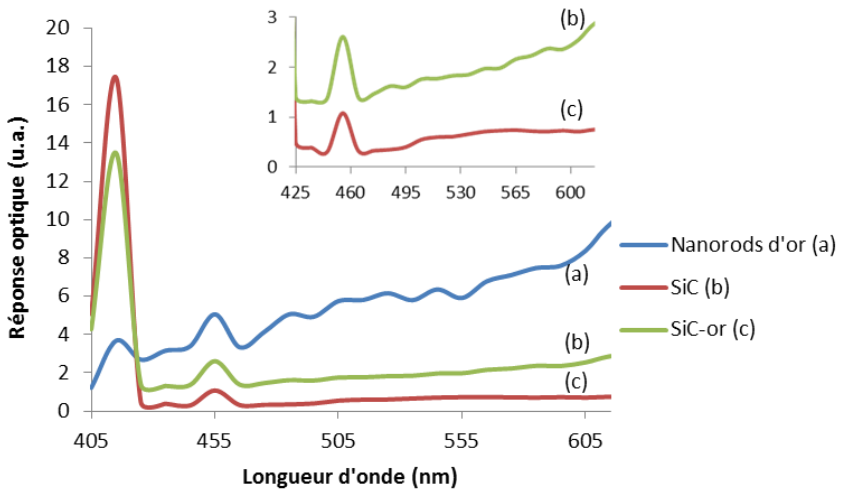


Figure IV-9 : Spectre d'émission non linéaire des nanorods d'or (a), des nanoparticules de SiC (b) et des nanohybrides SiC@Au (c) en fonction de la longueur d'onde (λ_{ex}=820nm), en insert : agrandissement de la zone 425nm-615nm

IV.2.3.4. Conclusions sur le marquage des cellules par les nanoparticules et les nanohybrides

Dans cette partie, nous avons pu vérifier que nos nanoparticules présentaient les propriétés optiques non linéaires attendues (SHG ou luminescence à deux photons). Nous avons également pu identifier le comportement de nos nanoparticules vis-à-vis des cellules, à savoir une faible pénétration cellulaire des émetteurs SHG et des nanohybrides associés à une forte pénétration cellulaire des nanorods. Toutes nos nanoparticules présentent également de bonnes capacités pour marquer les cellules. Enfin, nous avons pu montrer que nos nanohybrides présentent une cohésion suffisamment importante pour supporter une exposition à des conditions biologiques. Ces résultats permettent d'envisager différentes applications, notamment la synthèse de nanohybrides couplant imagerie et thérapie ou bien encore la synthèse de nanohybrides aux propriétés non linéaires exaltées par couplage plasmonique. L'étude de ce couplage plasmonique a donc constitué l'étape suivante de ce travail de thèse. Les propriétés thérapeutiques de ces nanohybrides seront, quant à elles, étudiées dans le chapitre V.

IV.3. Influence du couplage plasmonique sur les propriétés optiques non linéaires des nanohybrides

IV.3.1. Méthode utilisée pour évaluer l'influence du couplage plasmonique

Différents auteurs suggèrent que les propriétés SHG des nanoparticules peuvent être exaltées par couplage plasmonique entre un émetteur SHG et des nanostructures d'or[72,78,100,103] (nanoparticules ou nanocoquilles d'or). Les nanohybrides SiC@Au et $KNbO_3$@Au que nous avons synthétisés présentent une structure qui pourrait convenir pour une telle exaltation. Les nanohybrides SiC@Au sont notamment intéressants compte tenu des possibilités de fonctionnalisation offertes par les nanoparticules de SiC. Aussi, nous sommes-nous intéressés à la caractérisation de ce couplage plasmonique pour l'exaltation du signal SHG des nanoparticules de SiC.

Afin de déterminer l'efficacité d'un tel couplage, nous avons réalisé des mesures sur les nanohybrides SiC@Au. Afin d'isoler l'influence du plasmon, et compte tenu des propriétés optiques des nanorods d'or, deux solutions peuvent être envisagées.

La première solution consiste à comparer l'intensité du signal SHG émis par les nanohybrides et par des émetteurs SHG seuls. Toutefois, compte tenu des propriétés optiques spécifiques de chaque type de nanoparticules (diffusion, absorption, luminescence à deux photons pour les nanorods d'or), il nous a paru complexe de comparer ces systèmes relativement différents. En particulier, la diffusion de la lumière est différente pour des nanorods dont la plus grande dimension se situe autour de 40-50 nm et des nanoparticules de SiC et de $KNbO_3$ dont le diamètre moyen est autour de 150 nm. De plus, les nanohybrides présentent naturellement une instabilité supérieure aux émetteurs SHG seuls. Une telle instabilité est à même de favoriser l'agrégation des nanoparticules, aboutissant à des agrégats plus grands que les émetteurs SHG seuls. Compte tenu de la dépendance des propriétés SHG vis-à-vis du volume des particules[58], la non maitrise du facteur agrégation peut constituer un facteur d'erreur au poids considérable. Enfin, une telle technique nécessite de travailler à concentration constante en nanoparticules, ce qui peut être problématique quand ces particules ne présentent pas de propriétés autres (fluorescence, absorbance, etc…) permettant de les doser.

La seconde solution consiste à ne comparer que les intensités des signaux provenant des nanohybrides. Dans ce cas, on réalisera des mesures à puissance constante, en comparant le signal obtenu en excitant au maximum de la bande plasmon des nanorods d'or (excitation sur la résonance plasmonique) avec le signal obtenu en excitant à une longueur d'onde hors de la bande plasmon (excitation hors résonance).

Dans notre cas, nous avons sélectionné des nanorods d'or pour lesquels le maximum de la bande plasmon se situe autour de 800 nm (), le laser accordé à 800nm sera donc utilisé pour l'excitation sur la résonance plasmonique. Pour l'excitation hors résonance, le laser a été accordé à 900nm. Ce choix s'explique par un compromis à réaliser. En effet, une excitation à 1000nm serait préférable pour éliminer toute influence du plasmon (). Mais en dehors de la plage 700-900nm, la puissance du laser chute de telle sorte qu'il n'est plus possible d'obtenir suffisamment de phénomènes non linéaires (Figure IV-2). L'excitation à 900nm est donc un compromis entre puissance laser suffisante et éloignement suffisant de la résonance plasmonique.

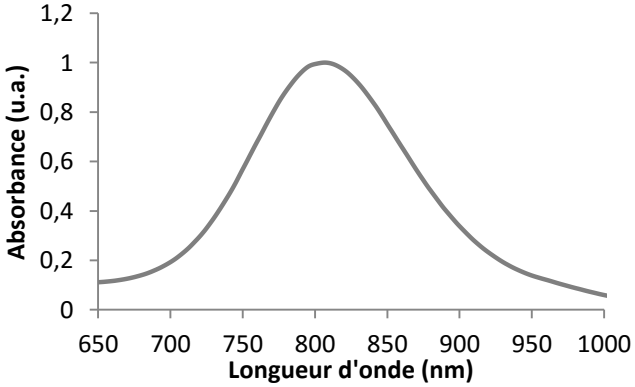


Figure IV-10 : Bande plasmon des nanorods (AR=3,7) utilisés pour réaliser le couplage plasmonique

Le signal SHG mesuré pour une excitation à la résonance plasmonique sera donc détecté à 400nm tandis que le signal mesuré pour une excitation hors résonance sera détecté à 450nm. On déduira donc le facteur d'exaltation F à partir de l'équation suivante :

$$F = \frac{I_{SHG}\ (\lambda_{exc} = 800\ nm)}{I_{SHG}\ (\lambda_{exc} = 900\ nm)}$$

La technique présente alors l'avantage de ne pas être affectée par les comportements optiques différents des deux types de nanoparticules. De plus, il est possible d'analyser le comportement d'une seule population de nanoparticules ce qui paraît plus juste que d'analyser le comportement de deux populations différentes (nanohybrides et nanoparticules) dont la sensibilité à l'agrégation peut varier. En revanche, cette technique nécessite d'accorder le laser à différentes longueurs d'onde, ce qui peut entrainer des modifications de puissance. Nous nous sommes donc assurés que la puissance effectivement reçue par l'échantillon était la même pour chaque mesure. Toutefois, l'accord en longueur d'onde est susceptible de faire varier la durée du pulse laser. La puissance crête est ainsi susceptible de varier, sans que cela puisse être détecté par un puissancemètre. Cette approximation parait cependant acceptable au regard du risque d'erreur apporté par les risques d'agrégation inhérent à la première méthode d'analyse décrite.

Enfin, cette méthode suppose également que l'intensité SHG émise par les nanoparticules de SiC et de $KNbO_3$ ne varie pratiquement pas entre une excitation à 800 nm et une excitation à 900 nm. Pantazis *et al*[71] ont ainsi montré (Figure IV-11) que les propriétés SHG du SiC étaient quasi constantes sur la gamme d'excitation 800-950nm. On pourra remarquer que cette constance est perdue pour des excitations en deçà de 800nm.

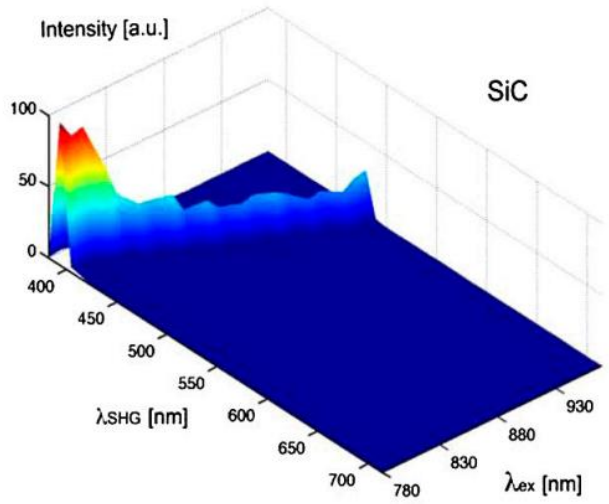


Figure IV-11 : Représentation de l'intensité SHG émise par le SiC en fonction de la longueur d'onde d'excitation[71]

La deuxième approche (comparaison des intensités SHG des nanohybrides à la résonance et hors résonance plasmonique) permet de limiter les risques d'erreurs, il faut ensuite choisir le mode de détection le plus approprié. Ici, deux solutions peuvent être envisagées : l'utilisation du microscope comme détecteur ou l'utilisation d'un montage HRS. Les avantages des deux techniques sont détaillés dans le Tableau IV-2. La mesure par HRS présente l'avantage d'utiliser un détecteur non saturable, et d'être une analyse d'ensemble, sur un échantillon en suspension. Le fait d'analyser l'échantillon en phase liquide est à la fois un avantage (agrégation limitée) et un inconvénient de la technique (décantation). A l'inverse, la mesure par microscopie est basée sur une mesure par comptage qui présente un risque de non représentativité. De plus, dans ce cas, la mesure est relativement longue, et l'échantillon sèchera immanquablement, impliquant des risques d'agrégation. Enfin, le seuil de saturation des détecteurs est très rapidement atteint, ce qui nécessite de travailler à très basse puissance (impliquant donc de ne pas détecter les spots les moins lumineux). Dans ces conditions, il est plus difficile de trancher sur la méthode la plus adaptée. Aussi, avons-nous utilisé les deux types de détection.

	Mesure par microscopie (Détection par NDD)	Mesure par HRS
Avantages	Insensible à la décantation des nanoparticules	Analyse d'ensemble, sur la suspension des nanoparticules Détecteur non saturable
Inconvénients	Saturation des détecteurs Risque d'agrégation des nanoparticules lors du séchage Risque de non-représentativité (comptage sur une population particulière de nanoparticules)	Atténuation à corriger Sensible à la décantation

Tableau IV-2 : Comparatif des techniques de caractérisation pour la mise en évidence de l'exaltation plasmonique

D'un point de vue pratique, les mesures sont réalisées comme suit :

Les mesures étant purement comparatives et basées sur l'analyse du même échantillon, les questions de la concentration ou de la taille de nanoparticules peuvent être éludées puisqu'on analysera le rapport des intensités SHG obtenues pour chacune des deux longueurs d'onde d'excitation, pour ce même échantillon.

Pour la mesure par microscopie, la suspension de nanohybrides est diluée 100 fois avant dépôt pour réduire le risque de présence d'agrégats. Une goutte est déposée puis séchée (pour éviter un

séchage progressif pendant l'observation au microscope) sur lame de verre et imagée en excitant à 800nm, à une puissance permettant d'observer un maximum de spots non saturés. Le champ est ensuite imagé en excitant à 900nm, à la même puissance laser. Puis, sur chaque champ, à chacune des deux longueurs d'onde, on obtient une image telle que celle présentée sur la Figure IV-12.

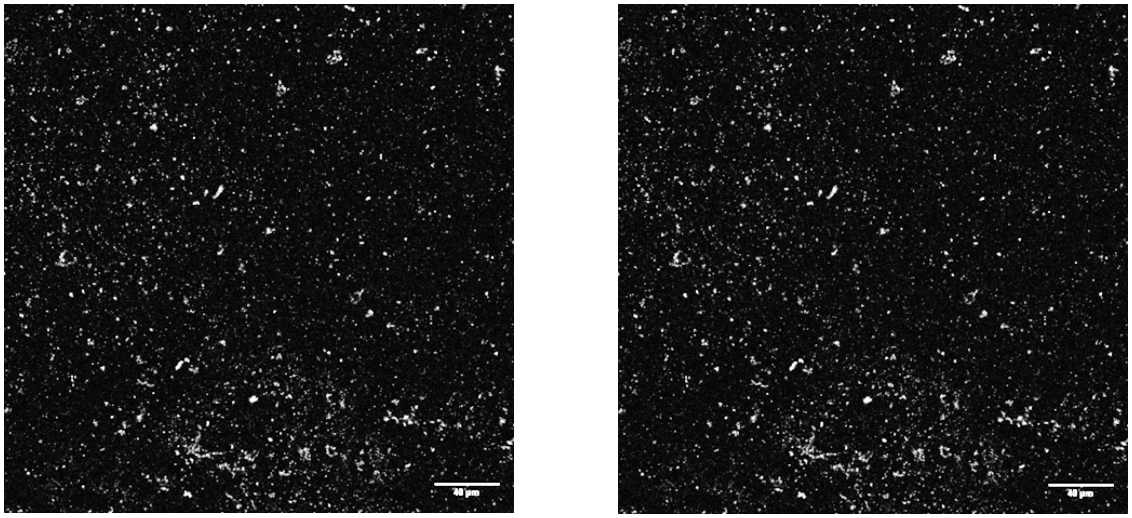


Figure IV-12 : Images obtenues en microscopie pour les nanohybrides SiC@Au avec une excitation à 800nm (gauche) et 900nm (droite).

Les images sont traitées, de sorte que ne soient retenues que les valeurs d'intensité maximales de chaque spot différencié.

L'intensité moyenne est calculée pour chacune des deux longueurs d'onde puis ces valeurs moyennes sont comparées pour obtenir le facteur d'exaltation. On peut alors comparer des valeurs d'intensités SHG pour un spot donné ou pour la population intégrale, soit, ici, un peu plus de 700 spots.

Pour la mesure par HRS, la suspension de nanohybrides est diluée de sorte que la suspension soit limpide, pour éviter une atténuation trop importante lors du trajet optique du laser dans la suspension. Après un temps d'équilibre de 10min permettant de réduire l'agitation du liquide au sein de la cuve, la mesure de l'intensité SHG est réalisée avec une excitation à 900nm, puis en maintenant la puissance du laser constante, la mesure est réalisée avec une excitation à 800nm. La mesure est répétée à cinq reprises. Au-delà, l'impact de la décantation devient visible et on constatera une chute rapide des intensités SHG mesurées. Les intensités SHG à 800nm et 900nm sont moyennées puis comparées pour obtenir le facteur d'exaltation moyen. Un facteur correctif est apporté pour tenir compte des variations de coefficient d'extinction de la suspension de nanoparticules entre 800nm et 900nm.

Pour les deux méthodes, un facteur correctif est ensuite appliqué au résultat, afin de tenir compte de la différence de sensibilité des détecteurs (photomultiplicateurs pour la microscopie, caméra CCD pour l'HRS) entre ces deux longueurs d'onde.

IV.3.2. Résultats sur l'influence du couplage plasmonique SiC@Au

Les résultats des mesures sont présentés dans le Tableau IV-3.

	Intensité SHG pour une excitation à 800nm (u.a.)	Intensité SHG pour une excitation à 900nm (u.a.)	Facteur d'exaltation calculé
Par microscopie	3243	1720	1,88
Par HRS	298	233	1,3

Tableau IV-3 : Résultats d'intensité SHG avec excitation pour les nanohybrides SiC@Au obtenus par détection par microscopie et en HRS

Dans le cas de la technique par microscopie, pour les nanohybrides SiC@Au, on constate des cariations importantes entre spots. En effet, on peut observer quelques rares spots SHG présentant une activité SHG à 400nm 20 à 25 fois supérieure à celle observée à 450nm. Ces valeurs se rapprochent des quelques résultats décrits dans le domaine de l'exaltation plasmonique de SHG[72,78] qui présentent des facteurs d'exaltation oscillant entre 50 et 240 dans le cas de l'analyse de nanoparticules uniques. En revanche, après une analyse sur une population plus grande, soit plus de 700 particules, on obtient un facteur d'exaltation de 1,9 (Tableau IV-3 : Résultats d'intensité SHG avec excitation pour les nanohybrides SiC@Au obtenus par détection par microscopie et en HRS. Une telle différence prouve que les résultats issus de l'analyse de particules uniques doivent être traités avec précautions et montre bien l'intérêt des analyses d'ensemble comme l'analyse HRS. Dans le cas de la mesure HRS, on obtient un facteur d'exaltation de 1,3. Ces deux résultats, obtenus de manières différentes sont relativement similaires, surtout compte tenu des limites des deux techniques, qu'il s'agisse des problèmes d'agrégation, de décantation ou des corrections à apporter pour obtenir les résultats en HRS. Ces mêmes approximations nous imposent également une certaine prudence. De fait, ces facteurs d'exaltation si proches de un, ne peuvent probablement pas être considérés comme un cas d'exaltation par couplage plasmonique. En effet, les calculs théoriques, réalisés *in silico*, tendent à montrer que les facteurs d'exaltation pour des nanoparticules actives en SHG et couplées à des structures plasmoniques sont supérieurs à 200[79,311,312], valeurs qui semblent particulièrement éloignées de nos résultats.

Nous pouvons formuler quelques hypothèses pour expliquer cette absence d'exaltation :

1) Tout d'abord, le nombre de nanorods d'or par nanoparticule de SiC est peut-être insuffisant pour fournir un champ électrique local capable d'affecter suffisamment les propriétés SHG des nanoparticules de SiC.

2) Deuxièmement, comme nous l'avons vu au chapitre III (§III.3.) les nanorods sont disposés de façon tangentielle à la surface des nanoparticules de SiC. Cette orientation ne permet pas, lors d'une excitation dans le proche infrarouge, de tirer profit du champ proche électrique généré, lequel est principalement obtenu aux extrémités des nanorods[313]

3) Enfin, l'intensité du champ proche électrique décroit exponentiellement avec la distance. Par conséquent le champ proche électrique provenant des nanorods ne pénètre que de manière très superficielle dans les nanoparticules de SiC (quelques nm de profondeur). Ainsi, étant donné leur diamètre important (150 nm), la quasi-totalité du volume de la nanoparticule de SiC n'est pas éligible pour une exaltation potentielle. Ce point est d'autant plus important qu'il y a une dépendance quadratique[58,59] entre volume de la nanoparticule et intensité de SHG émise.

Pour tenter de contourner ces limites, on peut réfléchir à une structure alternative. Ainsi, l'utilisation de plus petites nanoparticules actives en SHG permettrait de répondre à l'hypothèse 3. L'hypothèse 2 est difficile à tester pour des nanoparticules en suspension dans un liquide puisqu'il n'est pas possible de contrôler l'orientation des nanorods par rapport aux nanoparticules actives en SHG. Enfin, l'accroissement de la densité de nanorods par nanoparticule active en SHG n'est également pas évident à réaliser. En effet, nous avons constaté qu'un excès plus important de nanorods lors des synthèses de nanohybrides aboutit à une quantité accrue de nanorods libres, mais pas à davantage de nanorods par nanohybride, probablement à cause des contraintes stériques ou de répulsion coulombienne. Une solution alternative pourrait consister à synthétiser des coquilles d'or homogènes [72,77,78,104,314] enrobant les nanoparticules actives en SHG.

Dans le cadre de ces travaux, nous n'avons pas mené plus avant nos recherches sur l'exaltation plasmonique de SHG. En effet, nos particules (SiC ou $KNbO_3$) présentent des propriétés SHG très importantes, ce qui limite l'intérêt d'une exaltation plasmonique. De plus, au-delà des bénéfices limités, ces systèmes hybrides basés sur des coquilles d'or impliquent une complexification du système et des baisses de rendement qui limitent d'autant l'attrait de tels systèmes pour des applications à plus grande échelle.

IV.3.3. Bilan sur les propriétés ONL des nanoparticules et des nanohybrides

Nous avons pu démontrer que nos nanoparticules, isolées ou sous la forme de nanohybrides, présentent des activités ONL marquées, qu'il s'agisse de SHG (SiC et $KNbO_3$) ou de luminescence à deux photons (nanorods d'or) et ce, malgré des modifications chimiques ou le couplage des nanoparticules entre elles.

Par ailleurs, nos nanohybrides présentent une stabilité intéressante dans le tampon de culture cellulaire. Ainsi, bien que nous n'ayons pas observé de propriétés optiques exaltées par couplage plasmonique, il est malgré tout possible d'envisager des systèmes multiplexés à partir de ces nanohybrides.

En effet, il serait possible d'utiliser les nanorods d'or pour des applications en photo/radiothérapie, en SERS, imagerie multimodale, etc... L'utilisation de nos nanohybrides en tant qu'agent pour la photothérapie sera détaillée dans le chapitre V. De plus, les propriétés de luminescence à deux photons des nanorods d'or étant ajustables[308] (en modifiant le rapport d'aspect), on peut également envisager d'utiliser les nanorods d'or pour réaliser l'upconversion d'un signal infrarouge vers différentes longueurs d'ondes visibles. Cette lumière émise *in situ* pourrait, secondairement, déclencher différents phénomènes nécessitant des énergies correspondant au domaine du visible, comme l'activation de molécules médicamenteuses en PDT[46,47] ou l'activation d'interrupteurs moléculaires commandant la libération de petites molécules bioactives[48–50] (cytotoxiques, peptides, etc…).

Enfin, comme nous l'avons vu dans le chapitre III, les nanoparticules de SiC peuvent être utilisées comme une plateforme robuste pour fixer différentes molécules et notamment des systèmes permettant le ciblage de cellules cancéreuses. Nous allons maintenant nous intéresser aux propriétés de ciblage des nanoparticules de SiC fonctionnalisées par l'acide folique.

IV.4. Ciblage de cellules cancéreuses par les nanoparticules SiC@PEG-Folate

Les cellules cancéreuses surexpriment fréquemment le récepteur à l'acide folique[297]. Ainsi, de nombreux systèmes sont aujourd'hui développés se basant sur l'acide folique pour réaliser le ciblage spécifique de cellules cancéreuses[44,231,234,300,315,316].

L'imagerie par microscopie multiphotonique nous permet de pouvoir visualiser et mesurer l'efficacité d'un tel ciblage. Aussi dans cette partie, allons-nous détailler les résultats de ciblage des nanoparticules de SiC@PEG-Folate dont la préparation a été décrite au chapitre III.

IV.4.1. Procédures d'incubation des nanoparticules sur cellules

Les cultures cellulaires ont été réalisées avec Alain Géloën, au Laboratoire de recherche en cardiovasculaire, métabolisme, diabétologie et nutrition de l'INSA de Lyon. Des cellules saines ont été utilisées en tant que population contrôle, non cancéreuse lors des essais de ciblage. Les cellules saines utilisées sont les fibroblastes murins 3t3 déjà décrits au § IV.2.1 de ce chapitre. Les cellules cancéreuses sont des hépatocarcinomes humains HuH7 (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK).

Toutes les cultures sont effectuées dans un incubateur Heraeus, à 37°C, dans une atmosphère saturée en eau, avec 5% de CO_2. La croissance des cellules démarre dans le DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), supplémenté avec 4,5g/L de glucose, 10% de sérum de veau, 100UI de pénicilline et 100µg de streptomycine.

Les cellules sont ensuite transférées dans un milieu similaire mais appauvri en acide folique deux jours avant l'incubation des nanoparticules, afin de mimer la carence en folate que rencontreraient des cellules au sein d'une tumeur dans un organisme entier[298]. Cette déplétion est cependant partielle, le sérum de veau ajouté contenant toujours une petite quantité d'acide folique. Les nanoparticules de SiC sont ensuite incubées sur cellules avec une concentration de l'ordre de 70µg/mL, dans du milieu de culture.

Après 4h d'incubation, les cellules sont lavées à 3 reprises, marquées au Nile Red, puis fixées sur lames avec du formaldéhyde pour observation. Le Nile Red est un fluorophore très utilisé pour la microscopie cellulaire puisqu'il émet dans le rouge lorsqu'il rentre en contact avec les phospholipides membranaires. Il peut émettre un signal de fluorescence aussi bien lorsqu'il est excité à un photon qu'à deux photons. Nous l'avons donc utilisé pour l'observation spécifique des membranes cellulaires par microscopie multiphotonique.

Afin de tester la spécificité du ciblage, un essai comparatif cellules cancéreuses/cellules saines a été réalisé. Cependant, afin d'exclure l'hypothèse d'une accumulation non spécifique de nanoparticules sur les cellules cancéreuses, deux contrôles négatifs supplémentaires sont réalisés (Tableau IV-4) : un essai en compétition avec de l'acide folique en solution (essai n°3) et un essai avec des nanoparticules de SiC uniquement PEGylées (essai n°4). L'essai en compétition a consisté à réaliser l'incubation des nanoparticules de SiC@PEG-folate dans un milieu de culture saturé en acide folique afin de bloquer les récepteurs au folate des cellules cancéreuses et ainsi d'empêcher l'interaction entre les nanoparticules SiC@PEG-folate et les récepteurs au folate.

N° Essai	Type de Nanoparticules	Type Cellulaire	Compétition par l'acide folique
1	SiC@PEG-Folate	3t3 (sain)	Non
2	SiC@PEG-Folate	HuH7 (cancéreux)	Non
3	SiC@PEG-Folate	HuH7 (cancéreux)	Oui
4	SiC@PEG	HuH7 (cancéreux)	Non

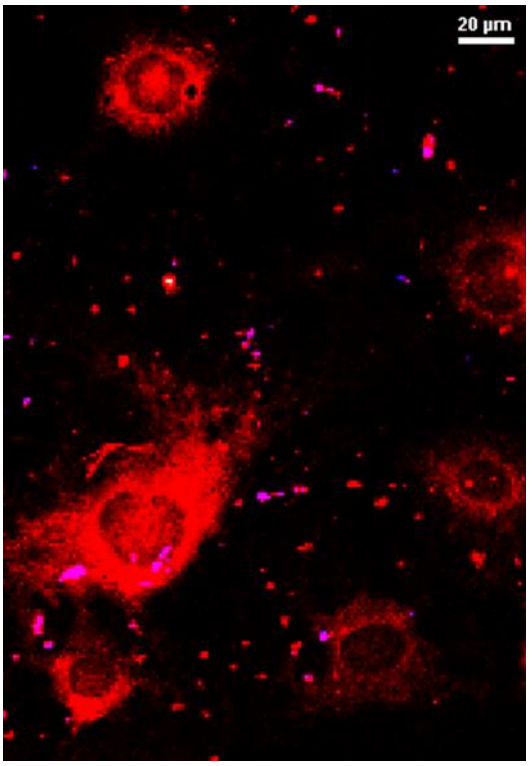
Tableau IV-4 : Récapitulatif des essais effectués lors des essais de ciblage

IV.4.2. Résultats de ciblage des cellules cancéreuses par l'acide folique

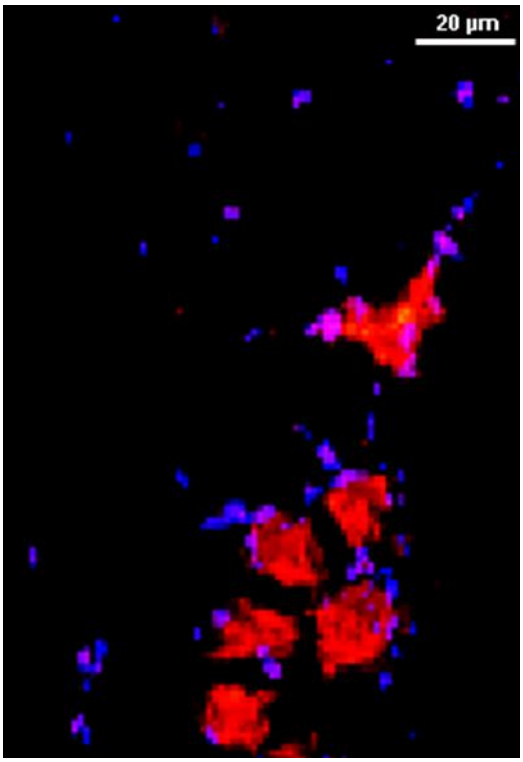
Les images obtenues par microscopie multiphotonique pour les différents essais réalisés sont présentées sur la Figure IV-13. Les spots bleus correspondent au signal de SHG détecté à 395 nm provenant des nanoparticules de SiC. Les spots rouges correspondent au signal de TPEF détecté à 607 nm issu de la membrane cellulaire marquée par le Nile Red.

Sur les images obtenues par microscopie multiphotonique, on peut visuellement constater une nette différence de marquage entre les cellules saines (Figure IV-13a) et cancéreuses (Figure IV-13b). Les cellules saines, présentent en effet quelques spots SHG, de taille modérée alors que les cellules cancéreuses présentent un nombre important de spots SHG, lesquels peuvent également être de plus grande dimension. Les deux témoins négatifs complémentaires, à savoir l'essai en compétition et l'essai avec les nanoparticules SiC@PEG montrent également des taux de marquage faibles (Figure IV-13c et Figure IV-13d).

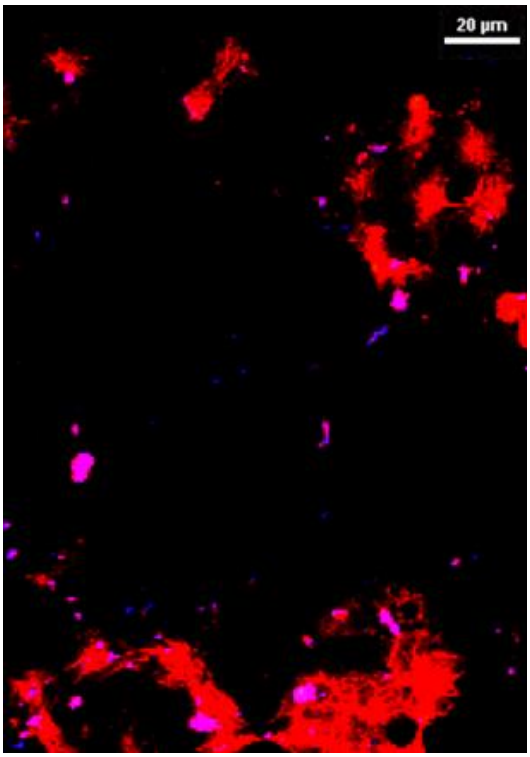
Afin de confirmer ces impressions visuelles, nous avons mis au point une méthode quantitative permettant de déterminer l'efficacité du ciblage. En effet, dans le cas de marqueurs ONL ciblant spécifiquement certaines cellules, de nombreux auteurs illustrent leurs résultats au moyen d'images, sans chercher à quantifier l'efficacité de leur ciblage[52,233,317,318]. Toutefois, une quantification de ce ciblage permet d'aller au-delà et de recourir à la statistique.



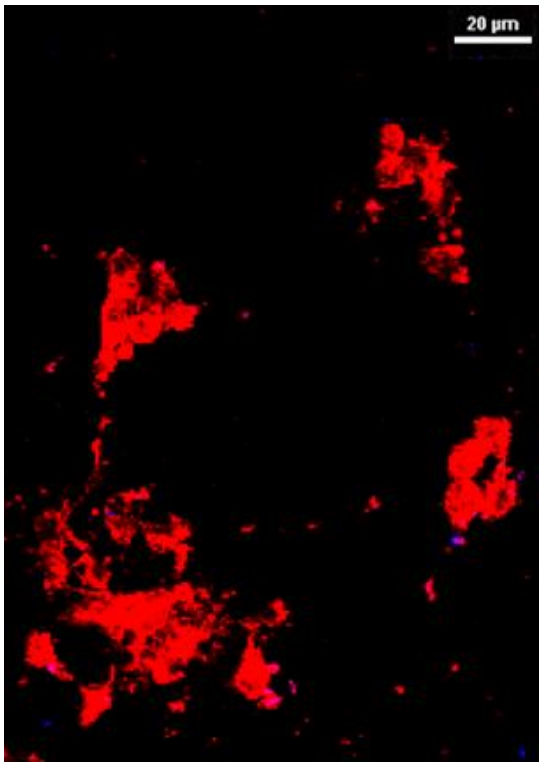
(a) – Essai 1 – 3t3 marquées par SiC@PEG-Folate



(b) – Essai2 – HuH7 marquées par SiC@PEG-Folate



(c) – Essai3 – HuH7 marquées par SiC@PEG-Folate + Compétition par acide folique libre



(d) – Essai4 – HuH7 marquées par SiC@PEG

Figure IV-13 : Images obtenues par microscopie multiphotonique (excitation à 800nm). Cellules marquées au Nile Red (en rouge, détection à 607 nm) et par des nanoparticules de SiC@PEG-Folate ou SiC@PEG (en bleu, détection à 395 nm)

La méthode de quantification la plus simple, à priori, consiste à compter le nombre de spots SHG par cellule pour caractériser cette efficacité[68,293]. Cependant, compte tenu de la résolution des images, il n'est pas possible de déterminer le nombre de nanoparticules par spot. Ainsi, de petits spots peuvent effectivement représenter une nanoparticule unique, là où d'autres spots pourront représenter un nombre plus élevé de nanoparticules. Par ailleurs, dans notre cas où différentes populations cellulaires sont étudiées (cellules saines et cellules cancéreuses), il pourrait être nécessaire de prendre en compte les différences de tailles entre cellules, ce qui nécessiterait de renormaliser les résultats.

Par conséquent, nous avons préféré déterminer le pourcentage de surface cellulaire émettant de la SHG. Pour réaliser cette mesure, nous avons, dans un premier temps, délimité le contour de chaque cellule, en nous basant sur le signal TPEF émis par le Nile Red utilisé pour marquer les membranes cellulaires. Dans le cas où un spot SHG est présent à proximité immédiate du contour la cellule, le contour a été modifié afin d'inclure le spot dans la cellule. Puis, nous avons comptabilisé sur cette surface l'ensemble de la surface cellulaire émettant également de la SHG afin d'obtenir le pourcentage de surface cellulaire marquée.

Au cours des comptages, nous avons choisi d'exclure certaines cellules du compte total de cellules. La première cause d'exclusion a concerné des structures émettant de la TPEF mais dont la forme ne pouvait pas être associée à celle d'une cellule (par exemple les débris cellulaires). De la même manière, lorsque le contournement des cellules n'a pas pu être réalisé de manière évidente, la cellule a été rejetée du compte total des cellules. Enfin, pour le cas du ciblage de cellules cancéreuses par les nanoparticules SiC@PEG-Folate sans compétition (essai n°2), certaines cellules (supposées) ont pu présenter des pourcentages de marquage supérieurs à 75% voire à 90% dans certains cas. Ces résultats nous ayant paru très élevés, et afin de ne pas surévaluer l'efficacité de notre ciblage (dans ce cas, où l'effet du ciblage doit se manifester), nous avons préféré les omettre afin de réduire le risque de conclusions trop favorables. Au final, les mesures, après exclusion des cas douteux, ont été répétées sur trois coupes différentes et sur un minimum de 15 cellules par contrôle négatif et sur 30 cellules pour l'essai n°2. Les résultats ont ensuite été testés, avec un seuil de confiance de 99,99% au moyen d'un test de Student (voir Annexe 3) afin de déterminer si les taux de ciblages étaient significativement différents entre l'essai n°2 et les contrôles négatifs.

Les moyennes des pourcentages de cellules marquées pour les différents essais sont présentées sur la Figure IV-14.

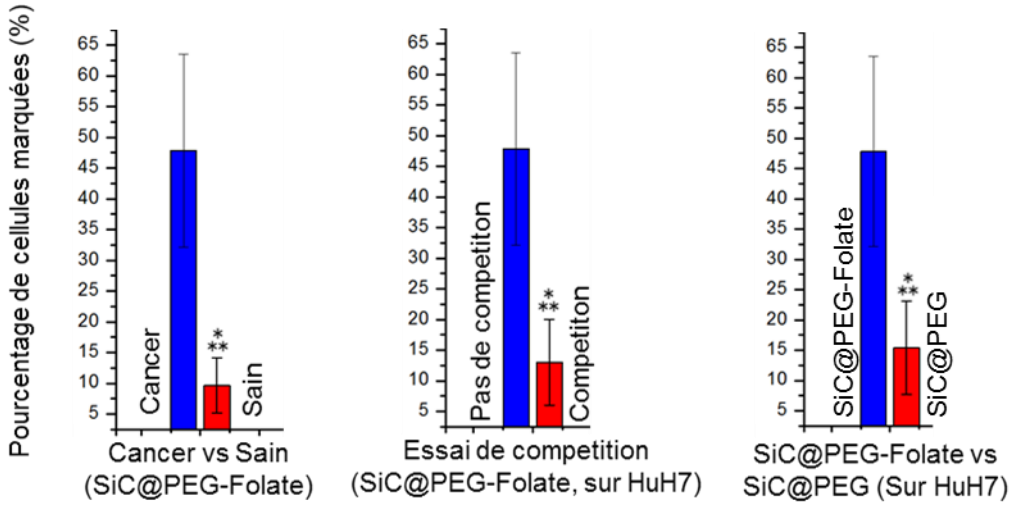


Figure IV-14: Comparaison des pourcentages de cellules marquées : entre cellules cancéreuses et cellules saines exposées aux nanoparticules SiC@PEG-Folate (a), entre cellules cancéreuses exposées aux nanoparticules SiC@PEG-Folate sans et avec compétition par l'acide folique libre (b) et entre cellules cancéreuses exposées aux nanoparticules SiC@PEG-Folate et SiC@PEG (c). (* p<0,0001)**

Après analyse, on peut constater que le pourcentage de cellules marquées atteint 48% pour les cellules HuH7 exposés aux nanoparticules SiC@PEG-Folate. En comparaison, ce même pourcentage atteint seulement 10% pour les cellules 3t3. Cette différence est significative et confirme l'efficacité de l'acide folique comme ligand de ciblage vis-à-vis des cellules cancéreuses.

L'essai de marquage des cellules HuH7 par les nanoparticules SiC@PEG, quant à lui, montre un pourcentage de cellules marquées de 15%, qui est également significativement plus faible que les 48% de marquage, en présence d'acide folique. On peut donc conclure que l'interaction cellules-nanoparticules n'est pas due à des interactions non spécifiques. Enfin, les 13% de marquage obtenus avec l'essai en compétition montrent bien le rôle clé de l'interaction entre l'acide folique et son récepteur dans l'interaction cellules-nanoparticules. L'efficacité du ciblage que nous obtenons avec nos nanoparticules est du même ordre de grandeur que les résultats quantitatifs décrits par différents auteurs[319,320] pour différents types de nanoparticules fonctionnalisées par l'acide folique. Yoo *et al* et Ding *et al* décrivent ainsi des ciblages permettant de tripler la quantité de nanoparticules sur les cellules. Ces résultats sont très proches de ceux que nous obtenons. Ding *et al* ont également réalisé des essais en compétition qui permettent là aussi de conclure à la spécificité du ciblage. Par ailleurs, on peut également citer différents résultats qualitatifs aboutissant à des conclusions similaires[12,42,235,317,318,321] pour le ciblage par l'acide folique.

Bien que nos résultats soient clairs dans le cas des cellules HuH7 et que certaines études[322] montrent que ces résultats peuvent être extrapolés à différentes cellules cancéreuses, il convient toutefois de ne pas généraliser ces résultats aux cellules cancéreuses dans leur ensemble. En effet, les cellules

HuH7 sont connues pour interagir fortement avec les folates et leurs dérivés[323]. De nombreuses autres cellules cancéreuses surexpriment également le récepteur à l'acide folique[297]. A l'inverse, certaines lignées cellulaires cancéreuses peuvent être moins sensibles à ce ciblage. Ding *et al* décrivent par exemple que le ciblage utilisant des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec de l'acide folique est très efficace sur cellules HeLa tandis que ce ciblage fonctionne mais présente une efficacité plus faible pour d'autres lignées cancéreuses telles que A549 ou 239T. Enfin, on pourra noter que certaines populations cellulaires saines (principalement au niveau rénal[297]) peuvent surexprimer naturellement le récepteur à l'acide folique ce qui pourrait ainsi aboutir à une diminution de l'efficacité du ciblage, dans un organisme entier.

IV.5. Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons montré que les nanoparticules de SiC et de $KNbO_3$ sont des marqueurs efficaces pour la microscopie SHG. Les nanoparticules de SiC présentent, par ailleurs, un double intérêt compte tenu de leur capacité à être fonctionnalisées de manière covalente. La fonctionnalisation de nos nanoparticules par l'acide folique est particulièrement intéressante, puisqu'elle permet de cibler efficacement les cellules cancéreuses.

Enfin, les nanoparticules de SiC peuvent être couplées à des nanorods d'or, permettant ainsi d'obtenir des nanohybrides stables en milieu biologique. Ce couplage ne nous a cependant pas permis d'obtenir un couplage plasmon à même d'exalter les propriétés SHG des nanoparticules de SiC. En revanche, ces nanohybrides offrent la possibilité d'obtenir des nanosondes multifonctionnelles et notamment utilisables pour des applications théranostiques, comme nous le verrons dans le chapitre V.

Nous allons donc maintenant nous intéresser au comportement de ces nanoparticules et de ces nanohybrides vis-à-vis du vivant par des études sur leur toxicité et sur leurs propriétés thérapeutiques.

V. TOXICITE ET PROPRIETES PHOTOTHERAPEUTIQUES DES NANO-PARTICULES ET DES NANOHYBRIDES

Dans les chapitres précédents, nous avons développé la synthèse de marqueurs et avons démontré leur efficacité pour l'imagerie multiphotonique. Ces marqueurs visent, à terme, une application sur des systèmes biologiques, qu'il s'agisse d'applications *ex vivo* comme l'analyse histochimique ou d'applications *in vivo*. L'utilisation de ces nanoparticules pour des applications *in vivo* pose la question de leur toxicité. Nous avons donc, dans un premier temps, étudié ce point. Par ailleurs, nos nanohybrides présentent un potentiel intéressant pour des applications théranostiques basées sur l'imagerie SHG et la photothérapie. Aussi, avons-nous étudié les propriétés photothérapeutiques de nos nanohybrides. Dans ce chapitre, nous nous sommes concentrés sur les nanoparticules de carbure de silicium et leurs hybrides. En effet, le profil toxicologique du $KNbO_3$ est moins favorable que celui du SiC[74] et les nanohybrides obtenus à partir de $KNbO_3$ sont moins stables dans le temps.

V.1. Description du système de mesure de toxicité en temps réel

L'évaluation de la toxicité des nanoparticules est un point complexe. Cette complexité tient notamment à la multiplicité des techniques utilisées et à l'impossibilité de généraliser des résultats de toxicité compte tenu de l'influence d'un très grand nombre de paramètres (composition, taille, forme, chimie de surface, population cellulaire étudiée, etc…). Ces points sont abordés plus en détails dans l'Annexe 2.

On pourra cependant noter, qu'il est plus simple de démontrer un effet toxique, en utilisant un test adapté que de démontrer une absence de toxicité.

Pour nos expériences, nous avons évalué la toxicité de nos particules en utilisant un test mesurant, en temps réel, la prolifération cellulaire. L'appareil que nous avons utilisé est un appareil xCelligence (ACEA Biosciences). Son fonctionnement est basé sur l'emploi de plaques à puits dont la surface est recouverte d'électrodes d'or interdigitées. Ce système permet de mesurer en continu des variations d'impédance liées à la prolifération cellulaire sur le tapis d'électrodes (Figure V-1). Les variations d'impédance sont ensuite converties en variations de population cellulaire, le nombre de cellules présentes étant exprimé sous la forme d'un « cell index » qui permettra de suivre les variations relatives du nombre de cellules dans les puits.

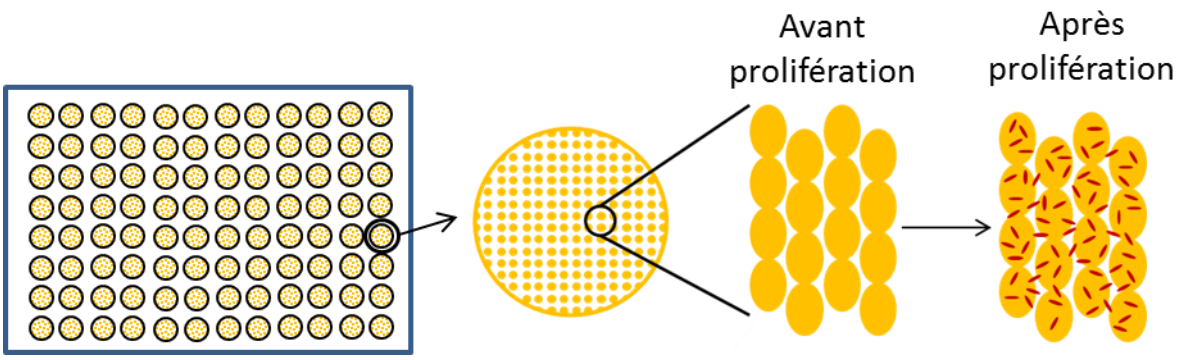


Figure V-1 : Description de l'xCelligence et des plaques à puits utilisées pour évaluer la prolifération cellulaire

L'utilisation d'une telle technique présente de multiples avantages. En effet, en plus de fournir des mesures de toxicité en point final, elle permet d'accéder à des informations en temps réel habituellement plus difficiles à obtenir, comme la cinétique des mécanismes toxicologiques de nos nanoparticules. De plus, la mesure est dynamique. Il est donc possible d'intervenir durant l'expérience pour ôter l'agent toxique par lavage ou ajouter un composé supplémentaire à même de contrebalancer ou d'accroître la toxicité du composé initialement testé. On peut ainsi mettre en évidence des phénomènes plus difficiles voire impossibles à observer avec des mesures en point final tels que le test MTT dont le principe général est brièvement décrit dans l'Annexe 2. Il est intéressant de remarquer à ce titre que les résultats obtenus par test MTT et par xCelligence concordent pour des mesures de toxicité aiguë en point final[324–326].

V.2. Mesures de toxicité

V.2.1. Procédures d'incubation des nanoparticules

Les cultures cellulaires sont effectuées dans un incubateur Heraeus, à 37°C, dans une atmosphère saturée en eau, avec 5% de CO_2. Le milieu de culture utilisé est le DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), supplémenté avec 4,5g/L de glucose, 10% de sérum de veau, 100UI de pénicilline et 100µg de streptomycine. 2500 cellules sont incubées pour chaque puit. Dans un premier temps, la toxicité a été évaluée sur des fibroblastes 3t3.

Lorsque le « cell index » atteint une valeur suffisante (idéalement entre 1 et 2), l'incubation des nanoparticules est réalisée pendant une durée de 24h. A l'introduction des nanoparticules, les valeurs de cell index sont normalisées, afin de pouvoir faciliter les comparaisons. Le changement de milieu (introduction des nanoparticules ou lavage) se caractérise la plupart du temps par des variations brusques d'impédance pendant environ 1h.

Les nanoparticules sont introduites à des concentrations comprises entre 1,25 et 5µg/mL. La toxicité du SiC étant débattue par ailleurs[327–329], un test contrôle à plus haute concentration (20µg/mL) a également été réalisé. Après 24h d'incubation, on élimine les nanoparticules en enlevant le milieu de culture et en le remplaçant par du milieu de culture frais. Les mesures d'impédance sont alors maintenues pour une durée d'au moins 24h afin de déterminer l'influence de ce lavage.

V.2.2. Résultats de toxicité pour les nanoparticules

On peut constater, sur la Figure V-2, que les nanoparticules de SiC présentent une toxicité aiguë négligeable et indépendante de la dose dans les conditions étudiées. Cette constatation est en accord avec les travaux de Pourchez *et al*[328] où est évoquée une taille limite de 15nm au-dessus de laquelle les nanoparticules de SiC ne présentent pas d'effet cytotoxique. De plus, la charge de surface négative de ces nanoparticules (<-40mV, §II.4.2.2. du chapitre II) ne favorise pas l'absorption des nanoparticules de grandes tailles[310,330,331] par les cellules (voir Annexe 2). On constate également une hausse importante du cell index suite à l'introduction des nanoparticules. Cette hausse est due à une perturbation de la mesure d'impédance par l'injection et non à une croissance cellulaire intense. On constate la normalisation de cette hausse dans les heures qui suivent.

En revanche, il conviendra de nuancer ce résultat. En effet, Barillet *et al*[327] et Pourchez *et al*[328] s'accordent à dire que les nanoparticules de SiC sont capables de générer des phénomènes inflammatoires au niveau cellulaire, notamment par un mécanisme de stress oxydant. Il pourrait donc être nécessaire de compléter cet essai par des mesures de cytokines inflammatoires et de ROS pour pouvoir conclure à une relative innocuité. Enfin, il convient de garder à l'esprit que des mesures de toxicité aiguë, réalisées sur des cultures cellulaires ne peuvent pas préjuger du profil toxicologique de nanoparticules dans des conditions biologiques, à fortiori à l'échelle d'un organisme entier, et ce tant sur le plan de la toxicité aiguë que chronique.

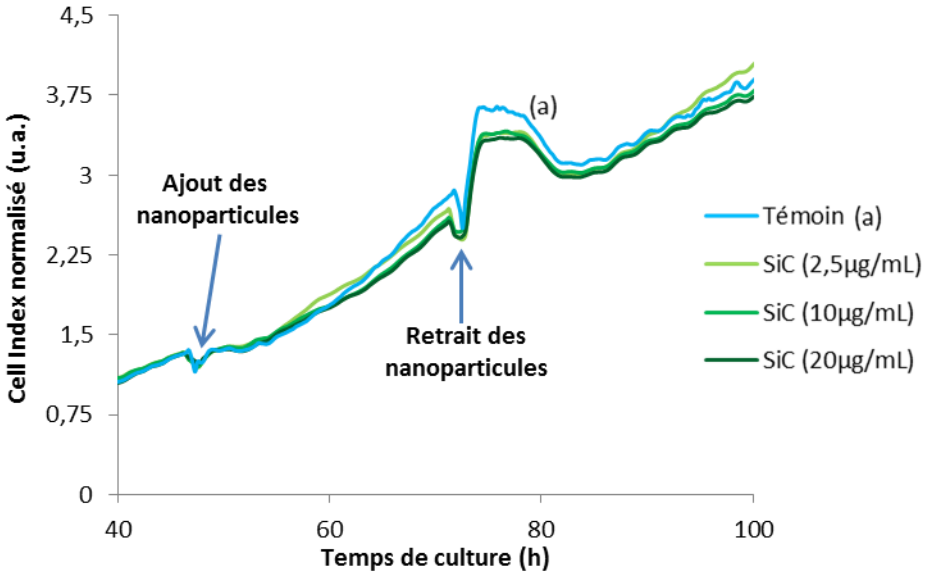


Figure V-2 : Impact de nanoparticules de SiC sur la prolifération de cellules 3t3

Pour les nanorods d'or, on peut constater, sur la Figure V-3 qu'ils présentent une toxicité aiguë importante vis-à-vis des cellules, avec un effet cytostatique pour des concentrations de l'ordre de 1,25µg/mL et un effet cytotoxique net pour une concentration de 5µg/mL. Cet effet n'était pas attendu à priori, compte tenu de la littérature où l'assomption de biocompatibilité de l'or est couramment retrouvée[21,52,270,276,277,332]. Cependant, la charge de surface positive de nos nanorods est à même de fortement favoriser la pénétration cellulaire de nos nanorods[330]. Cette potentielle capacité à pénétrer les cellules peut alors permettre à nos nanorods d'exercer des effets toxiques ne

0

se manifestant qu'au niveau intracellulaire[310,330,331]. Le fait que les nanohybrides SiC@Au (Figure V-4) ne présentent qu'une faible toxicité va dans le sens de cette interprétation. En effet, dans ces conditions, les nanorods, liés à des nanoparticules de SiC de grand diamètre (d≈150nm) se comportent comme des nanoparticules de grandes dimensions. Ces nanoparticules sont trop grosses pour être absorbées efficacement par endocytose. Ainsi, bien qu'il soit difficile de définir une taille limite au-delà de laquelle l'endocytose n'est plus possible, compte tenu du nombre important de paramètres à prendre en compte, différents auteurs considèrent qu'au-delà de 50nm, la capacité d'une nanoparticule à être endocytée diminue jusqu'à être négligeable au-delà de 100nm[276,277]. De tels résultats sont en accord avec nos résultats d'imagerie multiphotonique (§IV.2.3.3.). Parallèlement, on peut également dire que la concentration résiduelle en nanorods libres dans nos échantillons de nanohybrides est sans influence visible sur la toxicité aiguë, ce qui peut indiquer que

la concentration en nanorods libres est inférieure à la concentration toxique, c'est à dire, aux vues de la Figure V-3, au moins inférieure à 1,25µg/mL.

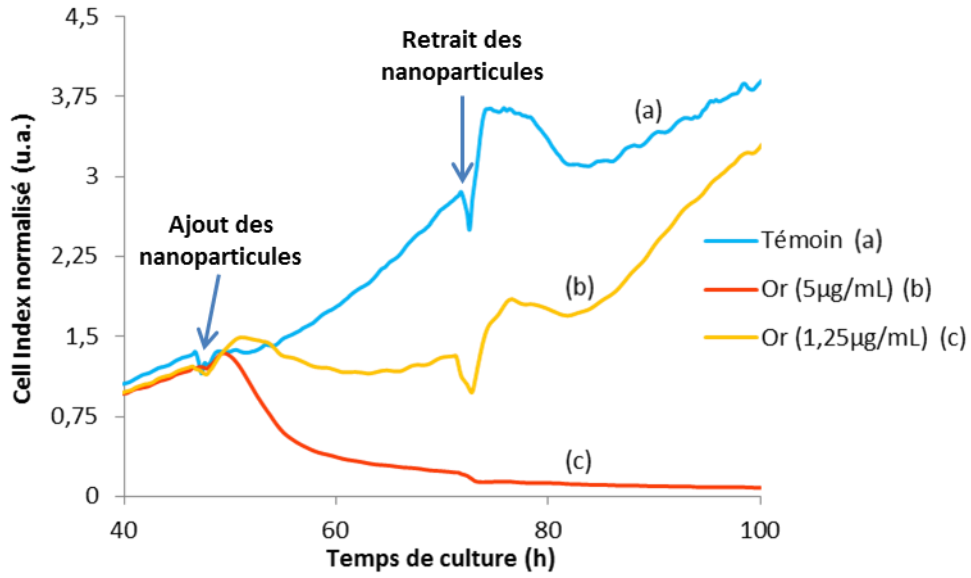


Figure V-3 : Impact de nanorods d'or sur la prolifération de cellules 3t3

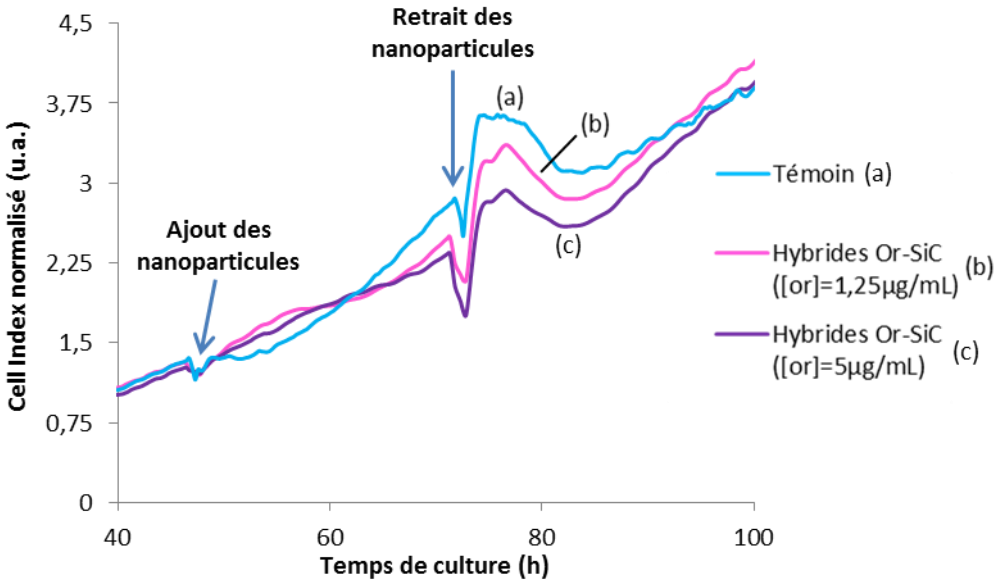


Figure V-4 : Impact de nanohybrides SiC@Au sur la prolifération de cellules 3t3

V.2.3. Conclusions

Les nanoparticules de SiC semblent être une plateforme intéressante pour la réalisation de nanohybrides aux propriétés photothérapeutiques. Ces nanoparticules et les nanohybrides associés ne semblent pas impacter le développement cellulaire. Il conviendra toutefois de faire attention à l'absence de nanorods d'or libres, lesquels présentent un effet toxique net pour une concentration de 1,25µg/mL.

On peut donc, en se basant sur ces résultats de toxicité, utiliser ces nanohybrides pour déterminer leur efficacité en photothérapie.

V.3. Essais de photothérapie

V.3.1. Procédures d'incubation des nanoparticules et d'irradiation

Les cultures cellulaires sont effectuées dans un incubateur Heraeus, à 37°C, dans une atmosphère saturée en eau, avec 5% de CO_2. Le milieu de culture utilisé est le DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), supplémenté avec 4,5g/L de glucose, 10% de sérum de veau, 100UI de pénicilline et 100µg de streptomycine. 2500 cellules sont incubées pour chaque puits. Dans un premier temps, la toxicité a été évaluée sur des fibroblastes 3t3. Les cellules HuH7 étant de petites dimensions, un temps de prolifération plus long est nécessaire pour parvenir à un « cell index » de valeur plus élevée. L'incubation des nanoparticules est réalisée pendant une durée de 2h. A l'introduction des nanoparticules, les cell index sont normalisés, afin de pouvoir faciliter les comparaisons. L'introduction des nanoparticules se caractérise la plupart du temps par des variations brusques d'impédance pendant environ 1h. Des nanoparticules seules et des nanohybrides SiC@Au ont été utilisés pour ces incubations. Compte de la toxicité des nanorods libres, deux échantillons de nanohybrides ont été utilisés. Le premier échantillon a été purifié à 3 reprises (centrifugation à 6700g – 2min) afin d'éliminer au maximum les nanorods libres, le second échantillon correspond à un échantillon présentant des concentrations plus élevées en or, afin de déterminer l'impact de la quantité d'or.

Après 2h d'incubation, chaque puits à traiter est irradié. Les mesures d'impédance sont alors maintenues pour une durée minimum de 24h afin de déterminer la cinétique de mort cellulaire. Pour l'irradiation, un laser Newport émettant à 808nm a été utilisé. Le laser est collimaté puis fibré afin de pouvoir irradier les cellules directement dans l'incubateur. Le choix de la puissance et de la durée

d'irradiation varie notoirement selon les auteurs[15,16,333]. A pleine puissance, l'intensité de notre laser au niveau de la zone de prolifération cellulaire atteint 40mW/cm². Aussi, avons-nous choisi de travailler à cette pleine puissance et de moduler la durée d'irradiation.

Compte tenu de l'application en thérapie anticancéreuse, les capacités thérapeutiques des nanoparticules ont été testées sur cellules cancéreuses HuH7.

V.3.2. Résultats de photothérapie

V.3.2.1. Phototoxicité des nanoparticules seules

On peut constater sur la Figure V-5 que les cellules non exposées aux nanoparticules présentent une croissance inchangée en l'absence ou en présence de l'irradiation lumineuse. Le laser seul ne présente donc pas de dangerosité, à la puissance laser utilisée, pour les cellules exposées en l'absence de nanoparticules photosensibilisantes. On peut également constater que les nanoparticules de SiC ne perturbent pas la prolifération celullaire et ne possèdent donc pas de propriétés photosensibilisantes. Enfin, pour les nanoparticules d'or, on ne constate pas de différence significative entre les cellules irradiées et non irradiées, ce qui est probablement due à la toxicité marquée des nanorods d'or libres.

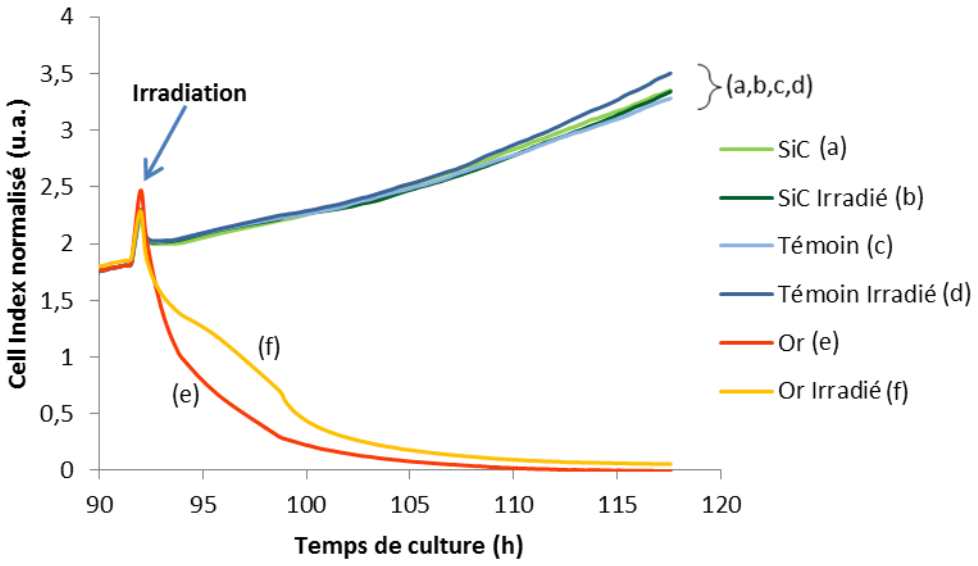


Figure V-5 : Impact de l'irradiation sur la prolifération de cellules HuH7 incubées avec des nanoparticules (C=10µg/mL), irradiation de 12min à 40mW/cm²

V.3.2.2. Phototoxicité des nanohybrides

Dans un premier temps, l'échantillon de nanohybrides SiC@Au exempt de nanorods libres a été testé. Compte tenu de la faible dose d'or présente dans cet échantillon ([or]≈1-2µg/mL, [SiC]≈20µg/mL), les cellules ont été irradiées pour des durées de 12min et 30min. On peut ainsi constater sur la Figure V-6 que les échantillons n'évoluent que très peu après irradiation, avec des variations de « cell index » faibles (<5%). De plus, on ne constate aucune différence significative entre les échantillons traités par des nanohybrides puis irradiés et les différents contrôles négatifs Figure V-6a,d,e). On peut donc en déduire qu'il n'y pas d'effet photothérapeutique pour ces nanohybrides SiC@Au. Afin d'aller plus loin, il est nécessaire d'accroître les doses d'or ou d'irradiation afin de s'assurer que nos paramètres retenus permettent un effet photothérapeutique pour nos nanohybrides. L'accroissement des doses se heurte toutefois à différentes limites techniques : à savoir la puissance limitée du laser utilisé et la nécessité d'irradiations de durées raisonnables. En effet, pour obtenir une puissance statistique suffisante, les essais d'irradiations font l'objet de réplicas. Pour pouvoir comparer ces réplicas, il est nécessaire que ces réplicas soient synchrones. Etant donné que chaque puits est irradié un à un, des irradiations trop longues aboutiraient à une désynchronisation importante entre réplicas, ce qui rendrait l'analyse difficile et ne permettrait plus d'extraire d'informations cinétiques.

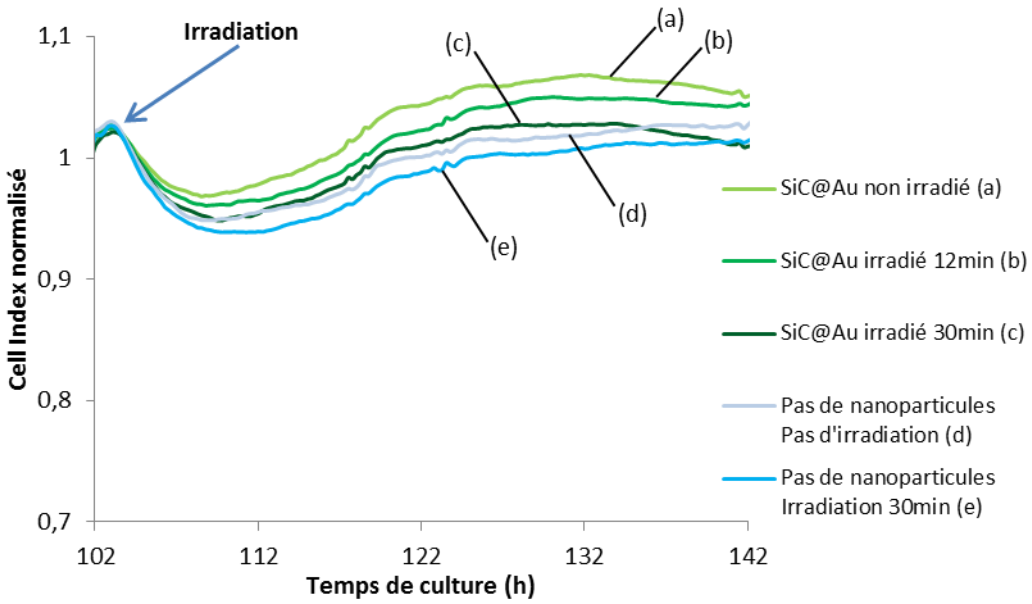


Figure V-6 : Impact de nanohybrides SiC@Au sur la prolifération cellulaire de cellules HuH7 pour différentes conditions d'irradiation, [Or]=10µg/mL, irradiation à 40mW/cm²

Aussi, pour tenter de répondre à ces questions avons-nous décidé d'utiliser des échantillons de nanohybrides SiC@Au plus concentrés en or ([or]≈10µg/mL, [SiC]≈20µg/mL). Les résultats sont présentés sur la Figure V-7. On peut constater que les cellules en contact avec les nanohybrides présentent une mortalité importante. Dans un premier temps, on peut constater que cette mortalité est présente même pour l'échantillon non irradié. Une telle constatation implique la présence probable de nanorods d'or libres dans l'échantillon, conséquence possible de la volonté de « charger » l'échantillon en nanorods. Toutefois, on peut constater une mortalité plus importante en présence d'irradiation. Une telle différence pourrait révéler l'effet photothérapeutique des nanorods. En effet, cet effet n'avait pas pu être observé sur les échantillons de nanorods seuls, leurs concentrations relativement élevées induisant une mort cellulaire trop rapide pour identifier l'impact d'un effet photoinduit. En revanche, dans ces conditions, les concentrations en nanorods libres sont probablement plus faibles, permettant ainsi de distinguer cet effet. Une question importante se pose néanmoins au vu de ces résultats.

En effet, les nanorods semblent posséder un effet photothérapeutique. Il est toutefois possible que ce comportement toxique ne soit pas partagé par les deux populations de nanorods : libres et couplés. Les nanorods libres, de par leur grande capacité à pénétrer les cellules, sont capables d'exercer leurs effets toxiques et photoinduits directement au sein des cellules tandis que les nanorods couplés au SiC ne peuvent exercer cette action qu'au niveau extracellulaire. Aussi est-il possible que l'activité photothérapeutique soit majoritairement portée par les nanorods libres, au détriment des nanorods couplés. On pourra toutefois citer différents auteurs utilisant soit des structures d'or de grandes dimensions[15,17] soit pegylées[13,17], et présentant des activités photothérapeutiques intéressantes malgré des nanoparticules aux propriétés de pénétration cellulaire restreintes par leur taille ou leur chimie de surface. Enfin, on peut noter une hausse apparente (à ne pas confondre avec la hausse rapide mais limitée dans le temps consécutive à l'injection des nanoparticules, à 91,5h sur la Figure V-7) des « cell index » des échantillons exposés aux nanohybrides après l'irradiation des nanoparticules (93-97h sur la Figure V-7) .Cette hausse est probablement à relier à la méthode de mesure par impédancemétrie. En effet, toute hausse d'impédance sera interprétée comme une variation de « cell index ». Ce phénomène explique par exemple les sursauts consécutifs aux injections de nanoparticules. Ainsi, une augmentation du volume cellulaire, associée à une couverture plus importante des électrodes, induirait une hausse d'impédance à même d'expliquer ce sursaut de « cell index ». Il est donc utile de noter que la nécrose cellulaire se traduit par une phase de gonflement cellulaire préalable à la lyse de la cellule. Or la présence de ROS et le choc thermique induits par la photothérapie sont des stimuli pouvant entraîner la nécrose cellulaire[14–16,106]. Cette explication permettrait d'interpréter ce phénomène.

Enfin, la baisse du « cell index » serait la conséquence de lyse cellulaire, consécutive à cette phase de gonflement.

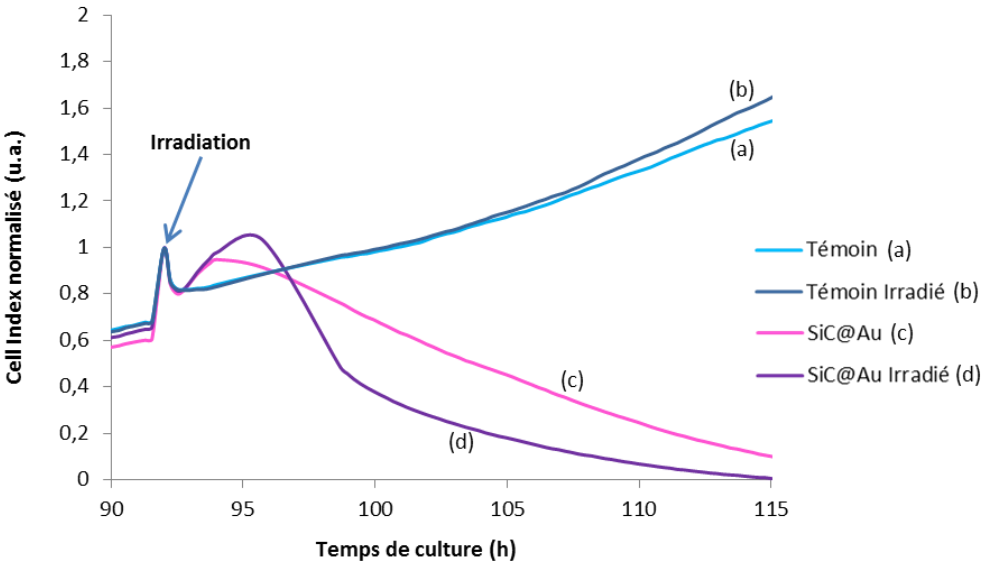


Figure V-7 : Impact de nanohybrides SiC@Au sur la prolifération cellulaire de cellules HuH7, [Or]=10µg/mL, irradiation : 12min à 40mW/cm²

V.4. Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons pu montrer que les nanoparticules de SiC présentent une innocuité intéressante (dans les conditions testées). Compte tenu des possibilités de fonctionnalisation variées et de leur grande stabilité de ces nanoparticules, les nanoparticules de SiC semblent être une plateforme intéressante pour des applications biomédicales. En revanche, la question de l'effet photothérapeutique ne peut pas être tranchée fermement pour nos nanohybrides. La difficulté à purifier parfaitement les nanoparticules des nanorods libres voire la capacité de nos nanohybrides à relarguer leurs nanorods dans le temps pose un problème à court terme pour l'interprétation et à long terme pour des applications biologiques. L'utilisation de systèmes utilisant des nanorods moins toxiques, comme des nanorods à la charge de surface négative, ou de nanostructures plus stables tels que les systèmes cœur-coquilles semblent être des alternatives intéressantes à celles présentées ici

Conclusions Générales et Perspectives

Dans un contexte d'accroissement du nombre de cas de cancers, les problématiques de précocité et de performance des méthodes de diagnostic deviennent un sujet particulièrement central dans le domaine de la santé. Le développement de nouvelles solutions thérapeutiques est également porté par les mêmes nécessités.

Au cours de cette thèse, nous avons étudié différents systèmes nanométriques ayant pour but d'améliorer tant l'aspect diagnostic que thérapeutique du cancer au travers de la microscopie multiphotonique et de la photothérapie.

Dans un premier temps, cette thèse a été consacrée à la synthèse et à la fonctionnalisation de nanoparticules. Ainsi, nous avons réalisé la synthèse contrôlée, tant en taille, qu'en forme, de nanoparticules d'or dans le but de contrôler finement leurs propriétés plasmoniques. Nous avons également pu développer une technique inédite permettant la purification sélective de nanoparticules selon leurs formes, afin d'obtenir des systèmes aux propriétés optiques uniformes. Les nanorods d'or ainsi purifiés ont montré des propriétés plasmoniques intenses dans le domaine du proche infrarouge, c'est-à-dire dans la fenêtre de transparence du vivant. La fonctionnalisation par différentes fonctions chimiques de ces nanoparticules d'or a également été étudiée et réalisée avec succès. Parallèlement, la chimie de surface des nanoparticules SiC a été caractérisée précisément à l'aide de différentes techniques expérimentales avancées (spectroscopies IR, XPS, ToF-SIMS) afin de parvenir à une fonctionnalisation robuste à même de servir de support au greffage, notamment, de biomolécules d'intérêt telles que l'acide folique. Cette chimie de surface a également pu être utilisée pour réaliser la synthèse de nanohybrides à base de nanorods d'or, de nanoparticules de SiC et de nanoparticules de $KNbO_3$. Ces nanohybrides ont pu démontrer une certaine stabilité et une capacité à coupler différentes propriétés, dans le but d'obtenir des nanoparticules multifonctionnelles.

Dans un second temps, cette thèse a permis d'étudier les potentialités des nanoparticules et des nanohybrides pour la microscopie multiphotonique. Ainsi, nous avons pu montrer que nos nanoparticules de SiC présentaient des capacités de génération de seconde harmonique importantes, à même d'être utilisées pour le marquage cellulaire en microscopie multiphotonique. L'exaltation plasmonique du signal SHG des nanoparticules de SiC par les nanorods d'or a également été étudiée. L'originalité de notre approche repose sur des mesures réalisées sur des populations de nanoparticules et pas uniquement sur des nanoparticules isolées. Enfin, les nanoparticules de SiC

fonctionnalisées par l'acide folique ont démontré des capacités de ciblage spécifique vis-à-vis des cellules cancéreuses.

Dans un troisième temps, cette thèse s'est attachée à l'étude du comportement de nos nanoparticules dans des conditions biologiques, certes simplifiées. Nous avons ainsi pu démontrer que les nanoparticules de SiC utilisées présentaient une innocuité intéressante vis-à-vis des cellules. Une telle innocuité a ainsi permis d'envisager des applications thérapeutiques à nos nanosystèmes par le biais de la photothérapie. Des premiers résultats ont pu être obtenus mais il est nécessaire de concevoir des systèmes plus aboutis et mieux contrôlés pour parvenir à une reproductibilité et une fiabilité suffisante pour des applications thérapeutiques.

Il ressort donc de ces travaux de thèse que les nanoparticules fonctionnalisées par l'acide folique semblent être des candidats intéressants comme systèmes de marquage pour l'analyse *ex vivo* d'échantillons cancéreux tels que des biopsies. Ce système parait d'autant plus novateur, que compte tenu de l'absence de tout photoblanchiment, de la haute résolution et de la capacité à imager en profondeur de l'imagerie multiphotonique, il paraît envisageable d'accéder à des informations de grande valeur diagnostique et pronostique. Il pourrait notamment être possible d'accéder à l'organisation tumorale à l'échelle de la tumeur entière voire à des informations sur la dynamique tumorale ou nécessitant des résolutions submicrométriques, difficilement accessibles (voire inaccessibles) par les techniques actuelles.

A partir de ces travaux, il est également possible de définir des axes d'évolutions à même de perfectionner ces systèmes. Le recours à un système cœur-coquille (cœur SiC, coquille or) paraît particulièrement intéressant. En effet, cette option permet d'offrir des solutions aux différentes problématiques. Les systèmes cœur-coquilles peuvent potentiellement fournir une solution pour parvenir à l'exaltation plasmonique des propriétés optiques non-linéaires des nanoparticules de SiC. Parallèlement, de tels systèmes permettraient de disposer de systèmes de grand intérêt pour des applications thérapeutiques puisqu'ils solutionneraient certaines des limites de nos systèmes actuels, notamment en supprimant la possibilité de dissociation du couple nanoparticules de SiC-nanorods d'or. Par ailleurs, la chimie de l'or est une chimie particulièrement robuste, efficace, et peu sensible à l'augmentation de l'échelle de synthèse, a contrario de la silanisation qui peut nécessiter une relative expertise. Enfin, cette solution permettrait de disposer de systèmes couplant à la fois, dans un ensemble stable, des propriétés optiques, thérapeutiques et de ciblage, développées au cours de cette thèse. Il est également intéressant de noter qu'un tel système pourrait également dépasser le cadre étudié dans ces travaux sur la microscopie SHG et la photothérapie on offrant des solutions

pour la microscopie de génération de troisième harmonique ou la thérapie par radiosensibilisation en utilisant les rayons X.

Enfin, à moyen terme, on peut espérer l'utilisation de tels systèmes, dans un premier temps chez le petit animal, puis à long terme pour des applications médicales réelles, notamment dans l'imagerie de biopsies tumorales voire pour la thérapie de certains cancers accessibles à des lasers infrarouge. Il conviendra toutefois de remarquer que la pharmacocinétique et la toxicologie des nanoparticules, à l'échelle d'un animal entier demeure extrêmement mal connue, notamment pour des systèmes inertes chimiquement. Aussi, l'application de nos systèmes à l'être humain pourrait-elle nécessiter de développer de nouvelles méthodes afin de mieux comprendre et évaluer la toxicologie de nos nanoparticules, avant d'envisager l'application de tels systèmes à l'Homme.

ANNEXES

Annexe 1. Description des appareils et techniques de caractérisation

Annexe 1.1. Spectroscopie d'absorption UV-Visible

La spectroscopie d'absorption UV-visible permet d'identifier des espèces chimiques en mesurant l'absorption du rayonnement UV ou visible par cette espèce chimique. Les pics d'absorption obtenus correspondent à différentes transitions électroniques au sein de l'espèce analysée.

Dans le cadre de ces travaux, le spectromètre UV-Visible que nous avons utilisé est un spectromètre UV mc2 à double faisceau de marque SAFAS. Pour les analyses, des cuves en quartz et en plastique avec un trajet optique de 1cm ont été utilisées.

Pour l'analyse des propriétés plasmoniques des nanoparticules d'or, des cuves plastiques à usage unique, transparentes dans le visible et le proche infrarouge ont été utilisées.

Pour le suivi des réactions de fonctionnalisation des nanoparticules de SiC, la spectroscopie UV-Visible a été utilisée pour détecter la présence de l'acide folique. Les cycles aromatiques de l'acide folique absorbant, au moins pour partie, dans l'UV, des cuves en quartz ont été utilisées pour pallier à la non-transparence des cuves plastiques en deçà de 380nm.

Annexe 1.2. Spectroscopie Infrarouge

Dans le cadre de ces travaux, le spectromètre infrarouge que nous avons utilisé est un spectromètre Nicolet 6700 de marque Thermoscientific. Pour ces travaux, nous avons utilisé un module de mesure par réflectance totale atténuée (ATR) équipé d'un cristal de diamant. Deux types de détecteurs ont été utilisés : un détecteur semi-conducteur MCT (MercuryCadmiumTelluride) et un détecteur pyroélectrique DTGS (Deuterated TriGlycine Sulfate).

La plupart des mesures ont été effectuées avec le détecteur MCT, compte tenu de sa plus grande vitesse d'acquisition. Toutefois, ce détecteur ne permet pas de réaliser de mesures en deçà de $700cm^{-1}$. Pour des échantillons nécessitant de mesurer des pics à plus haute énergie ($\sigma<700cm^{-1}$), le détecteur DTGS a été utilisé. En pratique, cette utilisation a concerné principalement les échantillons de $KNbO_3$, lesquels présentent deux pics typiques[73] (O-Nb-O) vers $510cm^{-1}$ et $590cm^{-1}$.

Compte tenu de la difficulté à obtenir des quantités macroscopiques de poudres de nanoparticules, une approche alternative a été utilisée pour déposer les nanoparticules sur le cristal de diamant. Ainsi, pour obtenir un spectre présentant des bandes d'absorption suffisamment intenses, environ 200µL de suspension de nanoparticules sont déposées sur le cristal. Afin de limiter l'étalement des nanoparticules, le dépôt est réalisé par gouttes de 0,5 à 2µL (selon l'angle de contact formé par la goutte). Une étape de séchage est réalisée avant chaque nouveau dépôt. Pour faciliter le séchage, les particules sont, au préalable, transférées dans un solvant volatil. Pour éviter la présence de traces du solvant précédent, trois lavages par centrifugation sont réalisés. Le solvant de redispersion typiquement utilisé était l'éthanol absolu. Pour les produits susceptibles de réagir avec des solvants protiques (acide folique activé par le NHS), l'éthanol a été substitué par le tétrahydrofurane. En fin de dépôt, un spectre est réalisé puis un second est réalisé à 1h et 2h d'intervalle, afin de s'assurer de l'absence de pics éventuels liés au solvant.

Annexe 1.3. Microscopie Electronique à Balayage et en Transmission

Les images en microscopie électronique à balayage (MEB) ont été réalisées avec un microscope de marque Tescan à une tension de travail de 10kV. Le microscope est équipé d'un détecteur d'électrons secondaires et d'un détecteur d'électrons rétrodiffusés. Le détecteur d'électrons rétrodiffusés étant plus sensible vis-à-vis du contraste chimique, il a été utilisé pour réaliser l'imagerie des nanohybrides, puisqu'il permet de mieux distinguer les nanorods des émetteurs SHG.

Pour préparer les échantillons pour l'imagerie MEB, environ 2µL de suspension de nanoparticules sont déposés puis séchés sur des substrats de silicium.

Les images en microscopie électronique à transmission (TEM) ont été réalisées avec un microscope JEOL-2000HT, à une tension de travail de 200kV.

Pour préparer les échantillons pour l'imagerie, une goutte de suspension de nanoparticules est déposée puis séchée sur une grille en cuivre recouverte d'une membrane de carbone de 3nm d'épaisseur de marque Ted Pella.

Les images sont traitées à l'aide du logiciel ImageJ.

Annexe 1.4. Diffusion dynamique de la lumière (DLS) et mesure du potentiel zêta

Les mesures en DLS ont principalement été utilisées pour déterminer qualitativement le potentiel zêta de nos nanoparticules. Les mesures de diamètre hydrodynamique par DLS présentent, en effet, différentes approximations et limites, notamment pour les particules non sphériques, ce qui nous a conduits à privilégier la microscopie électronique pour des mesures de taille absolues.

Dans le cadre de nos mesures, nous avons utilisé un appareil Zetasizer de marque Malvern dont le principe théorique est décrit dans le paragraphe I.3.2.2 du chapitre I. Les échantillons ont été étudiés dans l'eau, à une température de 25°C. L'analyse étant basée sur la diffusion d'un faisceau laser émettant à 632nm, chaque échantillon est dilué de sorte que son absorbance à cette longueur d'onde soit inférieure à 0,05.

Annexe 1.5. Dosage des amines et thiols de surface par colorimétrie

Le dosage des amines de surfaces par le Bleu de Coomassie (aussi noté CBB pour Coomassie Brilliant Blue) est basé sur l'interaction électrostatique entre les amines primaires protonées (pour des pH acides) et les groupements sulfonates du CBB[295] (Figure A-1).

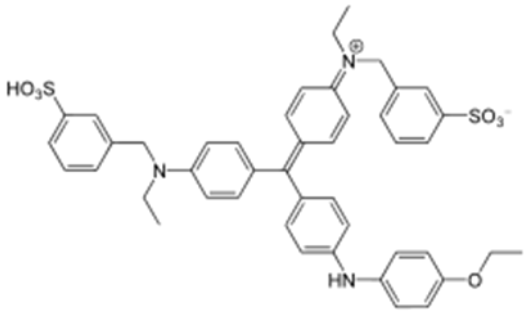


Figure A-1 : Structure du Bleu de Coomassie

Le protocole que nous avons appliqué pour titrer nos nanoparticules est le suivant (Figure A-2). Dans un premier temps, un tampon acide Eau/Méthanol/Acide acétique glacial (85/10/5 en volume) et un tampon basique Eau/Méthanol/Ammoniaque (35%) (50/47/3 en volume) sont préparés. Les nanoparticules à doser sont centrifugées (6700g, 3min) et le culot est redispersé dans le tampon acide afin de protoner les amines. Les nanoparticules sont ensuite centrifugées (6700g, 3min) à nouveau puis le culot est redispersé dans une solution de CBB à 60µM dans le tampon acide. Les nanoparticules sont soniquées durant 15min puis lavées à deux reprises par centrifugation-

redispersion dans le tampon acide. Un troisième lavage est effectué avec redispersion dans l'eau. Ces lavages permettent d'éliminer le CBB non fixé. Les particules sont ensuite centrifugées puis le culot est redispersé dans le tampon basique. Ce changement de pH permet de déprotoner les amines et donc de relarguer le CBB adsorbé en surface des particules. Les nanoparticules sont soniquées durant 5min puis centrifugées (10000g-15min) et le surnageant est analysé par spectroscopie UV-Vis à 611nm pour doser le bleu de Coomassie relargué (ε=87893L.mol^{-1}.cm^{-1}).

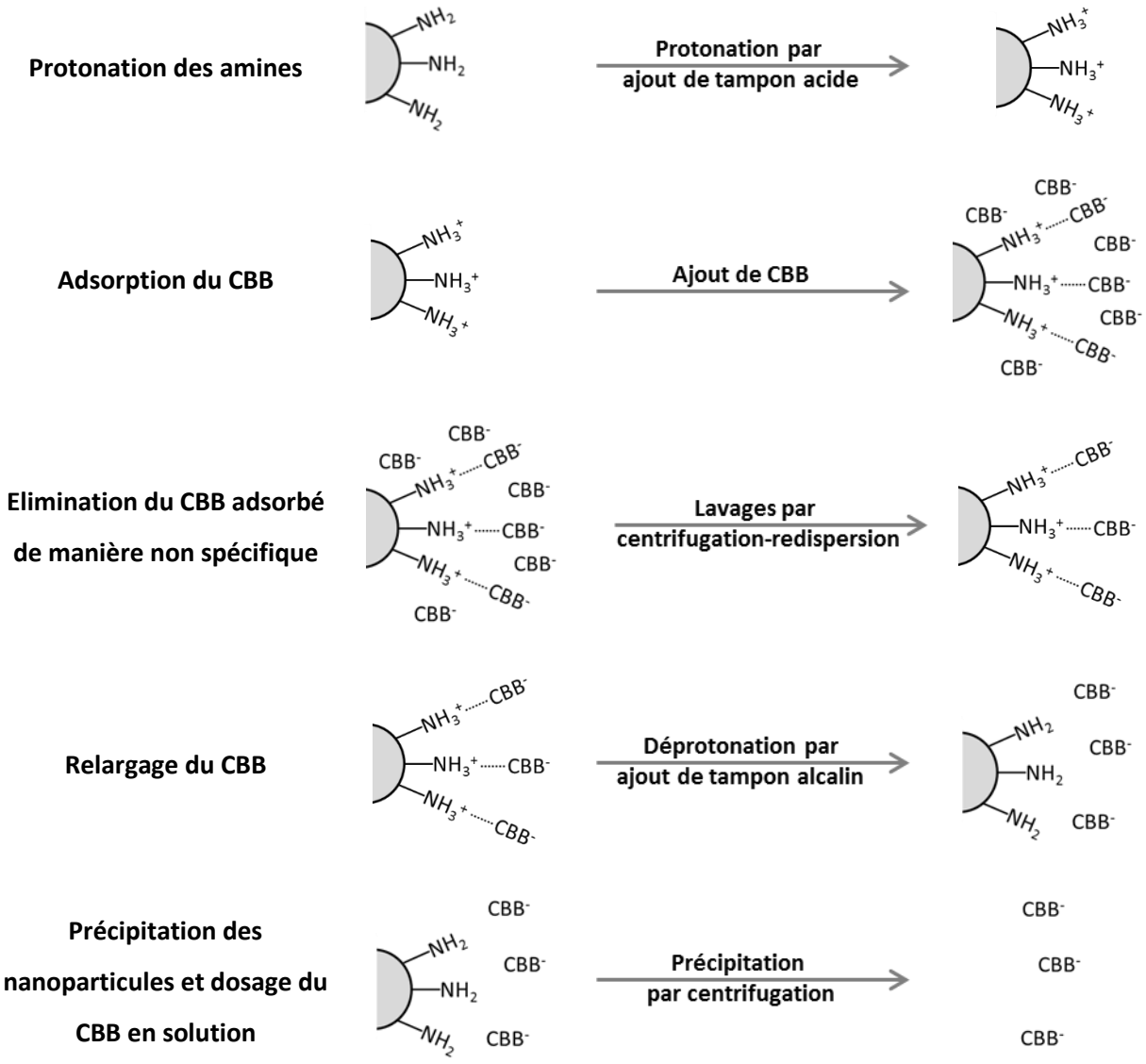
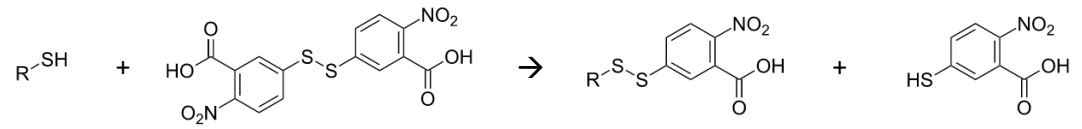


Figure A-2 : Schéma récapitulatif de la méthode de dosage des amines par le bleu de Coomassie

Compte tenu de la taille relativement importante du colorant, pour les systèmes présentant une densité surfacique en amines élevée, on pourra constater une tendance à sous-estimer les valeurs réelles de densité. Cette sous-estimation n'est cependant pas problématique pour nos travaux. En effet, il s'est agi, dans notre cas, de comparer des densités surfaciques pour des particules avant et après fonctionnalisation et non de déterminer de manière absolue le nombre exact d'amines/nm². Les valeurs obtenues sont donc seulement indicatives. L'efficacité potentiellement partielle des lavages peut également fausser la mesure.

Le dosage des thiols de surfaces peut être effectué en utilisant le réactif d'Ellman[35,296] (aussi noté DTNB, pour acide 5,5' dithiobis-2-nitrobenzoique). Ce réactif présente la propriété d'absorber la lumière à 412nm, lorsqu'il se trouve sous sa forme réduite TNB (Figure A-3).



Thiol | Réactif d'Ellman (DTNB) | TNB (optiquement actif à 412nm)

Figure A-3 : Réaction entre un thiol libre et le réactif d'Ellman

Le protocole que nous avons appliqué pour doser nos nanoparticules est le suivant. Dans un premier temps, les nanoparticules sont redispersées dans une solution de DTNB dans le PBS 1X. Après 4h de réaction, les nanoparticules sont précipitées par centrifugation (6700g, 3min) et le surnageant est analysé. Les nanoparticules sont ensuite centrifugées et redispersées dans l'eau à deux reprises puis placées dans une solution aqueuse, en présence d'un large excès de borohydrure de sodium afin de libérer le TNB éventuellement greffé sur les nanoparticules. Après une nuit, les nanoparticules sont centrifugées et redispersées dans l'eau à deux reprises et le surnageant est également analysé.

Annexe 1.6. Spectroscopie par résonnance magnétique nucléaire (RMN)

Les analyses RMN ont été réalisées sur un appareil Avance III – 400MHz de marque Bruker. Pour nos travaux, nous avons uniquement réalisé des analyses RMN du proton. Ces mesures ont été faites en utilisant l'eau deutérée comme solvant.

Annexe 1.7. Spectroscopie de photoélectrons X (XPS)

L'analyse XPS est une analyse de surface permettant de déterminer l'environnement électronique des atomes étudiés et ainsi d'en déduire les liaisons chimiques présentes. Dans notre cas, 100µL de suspension de nanoparticules ont été déposées puis séchées en dessicateur durant une nuit sur un substrat de silicium orienté (100). Les mesures XPS ont été réalisées avec un appareil Axis Ultra-DLD de marque Kratos. La source lumineuse utilisée est une source d'aluminium dont la raie Kα a été sélectionnée (1486,6eV). La source lumineuse opère à une puissance de 150W. La surface du spot étudié est de 400x700µm². La pression résiduelle dans l'enceinte est inférieure à 8.10^{-9} Torr. Pour chaque échantillon, un balayage spectral est effectué entre 0 et 1150eV à partir duquel est déterminée la composition chimique de surface. En complément, sont réalisés des spectres fins, à haute résolution pour les différents éléments présents dans l'échantillon. La charge de surface est éliminée par un système de compensation magnétique.

Pour la calibration, le pic à 285eV du niveau C1s du carbone est utilisé. Les temps d'acquisition sont maintenus en dessous de 20min, pour limiter la dégradation de l'échantillon par les rayons X. Les différents spectres sont réalisés sur des parties différentes du dépôt pour limiter également la dégradation. Enfin l'angle d'acquisition est réglé à 90° pour maximiser la profondeur d'analyse. Les spectres obtenus sont ensuite traités à l'aide du logiciel Casa XPS. Les compositions élémentaires sont déterminées à partir des intensités des pics, normalisés par les facteurs de sensibilités atomiques. Le bruit de fond est soustrait puis les spectres fins sont déconvolués en utilisant un ajustement 70% Gaussien et 30% Lorentzien.

Annexe 1.8. Diffraction de rayons X (XRD)

Dans le cadre de ces travaux, le diffractomètre que nous avons utilisé est un diffractomètre Smartlab de marque Rigaku. Le diffractomètre est équipé d'une source de type anode tournante en cuivre. La puissance de l'appareil est de 9kW. Le faisceau de rayons X est rendu monochromatique par un double cristal de Germanium et la longueur d'onde retenue est de 1.5405Å. Le détecteur est ponctuel.

Pour la préparation de l'échantillon, environ 20mg de poudre, préalablement séchée en étuve, sont déposés sur une lame de verre.

Annexe 1.9. Spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS)

L'analyse en SIMS est une analyse d'extrême surface utilisant des pulses d'ions lourds pour fragmenter les molécules présentes en surface de l'échantillon et permettre ensuite une analyse en spectrométrie de masse des fragments produits. Dans notre cas, on détermine la masse des fragments à partir de leur temps de vol. On parlera donc de ToF-SIMS (ToF : Time of Flight). Pratiquement, 100µL de suspension de nanoparticules ont été déposées puis séchées en dessicateur durant une nuit sur un substrat de silicium orienté (100). Les mesures ont été réalisées sur un appareil TOFSIMS IV, de marque ION-TOF. L'appareil est équipé d'une source ionique de métal liquide (25keV) travaillant avec du bismuth. L'acquisition des spectres est réalisée en mode statique (fluence d'ions primaires < 10^{12} ions/cm) afin de conserver la structure des fragments et l'information chimique qu'ils véhiculent. Durant l'analyse, la charge de la surface est compensée en utilisant un canon à électron de basse énergie (20eV). La calibration de l'appareil est effectuée en utilisant les pics d'hydrocarbures CH^+ (m/z=13), CH_3^+ (m/z=15), $C_2H_3^+$ (m/z=27), $C_3H_5^+$ (m/z=41), $C_5H_7^+$ (m/z=67), $C_7H_7^+$ (m/z=91) pour les spectres d'ions positifs et C^- (12 m/z), C_2^- (24 m/z), C_3^- (36 m/z), C_4^- (48 m/z), and C_5^- (60 m/z) pour les spectres d'ions négatifs. Les spots analysés en haute résolution (M/ΔM>6000) ont une surface de 250x250µm². L'interprétation des spectres est réalisée à l'aide du logiciel Surface Lab Software.

Annexe 2. Comportement du vivant au contact de nanoparticules

Annexe 2.1. Interactions entre les nanoparticules et le vivant

Pour comprendre le comportement de cellules vis-à-vis de nanoparticules et plus spécifiquement la toxicité exercée par ces particules, différentes échelles de temps et de taille peuvent être envisagées. En effet, selon les cas, une particule pourra ou non être toxique selon que l'on s'intéresse à la toxicité aigüe ou chronique.

La plupart des travaux se concentrent sur des études de toxicité sur de courtes périodes de temps, permettant d'appréhender la toxicité aiguë. Il est en effet plus simple d'étudier ce type de toxicité. Les études nécessitent en effet peu de temps et la toxicité peut être, souvent, mise en évidence par simple observation de la mort cellulaire. A l'inverse, l'étude de la toxicité chronique est plus complexe, tant sur le plan de la durée d'expérimentation que sur la mise en évidence. En effet, les évènements tels que les mutations et l'évolution vers un stade cancéreux sont plus complexes à objectiver. Enfin, le choix du modèle biologique d'étude joue également pour déterminer la toxicité. Ainsi, un composé pourra voir ses propriétés toxiques varier selon que l'on étudie une cellule unique ou un organisme entier. De plus, la toxicité variera considérablement selon l'organisme étudié, qu'il s'agisse de bactéries, de cellules animales, végétales ou autres. Pour achever de complexifier le système, pour un même organisme, des réactions différentes pourront s'observer pour différents types cellulaires[271], voire pour le même type cellulaire exposé dans des conditions différentes[334].

Avec un tel nombre de paramètres à prendre en compte et le nombre important de techniques utilisées pour évaluer la toxicité, il est très difficile, à l'heure actuelle, de tirer des conclusions générales sur la toxicité des nanoparticules vis-à-vis du vivant[335].

Cette partie permettra de présenter les techniques les plus utilisées pour évaluer la toxicité des nanoparticules vis-à-vis des cellules. On pourra également identifier quelques paramètres importants ayant une influence sur la toxicité : le matériau, la chimie de surface, la taille et la forme des particules.

Annexe 2.1.1. Principaux tests de toxicité utilisés

On l'a vu, la toxicité des nanoparticules peut se manifester sous des formes très diverses. Aussi, on trouve de nombreux tests différents, à même de fournir différents types d'informations. Parmi les

points étudiés par ces tests on peut citer la viabilité cellulaire, la prolifération cellulaire, la génotoxicité, etc… L'évaluation de la toxicité à l'échelle d'organismes entiers ne sera pas abordée ici. En effet, à une telle échelle, il est nécessaire de prendre en compte de très nombreux paramètres pharmacocinétiques ce qui rend le nombre de tests beaucoup plus important.

Les premiers tests utilisés pour évaluer la toxicité cellulaire étaient basés sur l'incorporation par les cellules de biomolécules marquées au tritium (notamment la thymidine) dans le milieu de culture. Il était alors possible de relier la vitalité des cellules à une activité radioactive. Toutefois, l'utilisation de tels radiotraceurs diminue, au profit de tests basés sur d'autres méthodes de détection, moins contraignantes et dangereuses. On peut remarquer que des tests basés sur l'incorporation de dérivés bromés de la thymidine (bromodeoxyuridine) reprennent ce principe. Toutefois, dans ce cas, la détection est réalisée par immunohistochimie et ne peut être réalisée qu'en point final[336].

Parmi les tests les plus répandus, on peut citer le test MTT (et ses analogues, XTT, MTS, WST…). Ces tests sont basés sur la réduction d'un sel de tétrazolium en un formazan coloré. Cette réduction s'opère grâce à des réductases présentes dans la cellule et actives dans le cas où la cellule est vivante. Le formazan étant coloré, on peut ensuite relier l'absorbance à une quantité de cellules encore vivantes. Dans le cas du test utilisant le MTT, la mesure se fera en point final tandis que ses analogues permettent des mesures en continu.

Bien que très utilisé, ce test présente plusieurs limites. D'une part, le test étant basé sur une réaction de réduction, le résultat peut être biaisé par la présence d'espèces réductrices (thiols, vitamine A ou C, nanoparticules aux propriétés réductrices, notamment à base de silicium…). Ensuite, les sels de tétrazolium et les formazans peuvent, en s'accumulant dans les cellules, présenter une certaine toxicité. Enfin, ce type de test reflète l'activité enzymatique des cellules et non leur viabilité, ce qui constitue une limite majeure du test[336].

Les tests mesurant la prolifération cellulaire sont également largement utilisés, pour contourner cette dernière limite du test MTT. La mesure sera alors effectuée par comptage des cellules. Les comptages manuels étant longs, des techniques automatisées se développent pour permettre à ce type de test d'être utilisé pour des mesures en temps réel. Différentes études ont d'ailleurs pu montrer l'équivalence de cette technique avec les résultats des tests MTT (dans des cas où le MTT n'est pas biaisé) pour l'évaluation de la toxicité des nanoparticules[324–326,337].

Parmi les tests mesurant la viabilité cellulaire, on peut également citer les tests utilisant des colorants vitaux[336]. Ils sont basés sur des colorants comme le bleu Trypan ou le rouge neutre s'accumulant exclusivement dans les cellules vivantes (Rouge neutre) ou mortes (Bleu Trypan). Toutefois, ces

colorants peuvent être toxiques pour les cellules, même sans accumulation, ce qui limite la technique.

Enfin, la concentration extracellulaire en lactate déshydrogénase (LDH) est également un bon marqueur de la viabilité cellulaire. Cependant, en présence de nanoparticules, plusieurs études tendent à montrer que ce test est sujet à des interférences, par inactivation ou adsorption de l'enzyme[336].

Il existe également différents tests évaluant des points fonctionnels précis. Un test largement utilisé dans ce domaine concerne le stress oxydant et la quantification des ROS. Ces tests sont également employés pour caractériser l'efficacité thérapeutique des systèmes (nanoparticules ou molécules organiques) utilisés en thérapie photodynamique (PDT). Ces tests sont le plus souvent basés sur l'utilisation d'un traceur oxydable par les ROS qui devient coloré ou fluorescent après oxydation comme l'acétate de dihydrodichlorofluoresceine (DCFDA), le dihydroéthidium (DHE) ou le nitroblue tetrazolium (NBT)[338–340].

On pourra aussi rechercher la réponse cellulaire à une exposition grâce à des dosages de cytokines proinflammatoires (principalement IL-6, IL-8, TNF α) ou en caractérisant par PCR une modification dans l'expression de différents gènes[336].

L'étude de l'expression des gènes est également à relier aux problèmes de génotoxicité et de cancérisation. Ainsi, au-delà des caractérisations par PCR, deux tests sont déjà largement utilisés[336,341,342], à savoir le test d'Ames et le test de recherche de micronoyau. Le test d'Ames, consiste à détecter l'apparition de mutation chez des bactéries (*S. typhimurium*) après mise en contact avec la substance. Ce test est aujourd'hui de plus en plus souvent remplacé par le test d'aberration chromosomique, qui est réalisé sur des cellules de mammifères. Le test du micronoyau est un autre test également utilisé pour caractériser la génotoxicité et consiste à rechercher des micronoyaux sur des cellules exposées au produit à tester. Différentes études préconisent, dans le cas des nanoparticules, de recourir au test du micronoyau plutôt qu'au test d'Ames. En effet, le test d'Ames apparait peu sensible pour évaluer la génotoxicité des nanoparticules[336,341,342].

Annexe 2.1.2. Influence de la nature du matériau sur la toxicité

La nature du matériau constituant les nanoparticules représente l'aspect le moins complexe à étudier. Dans cette thèse, nous n'envisagerons que le cas des nanoparticules inorganiques. On

pourra alors considérer deux mécanismes de toxicité des particules : une toxicité liée à des phénomènes de surface et une toxicité liée aux propriétés chimiques des particules.

Le cas de la toxicité chimique de nanoparticules s'exprime lorsque le matériau peut être solubilisé, partiellement ou totalement, dans le milieu biologique. La très grande surface spécifique de ces nanoparticules facilite d'autant leur dissolution. Parmi les composés les plus à même de subir ce type de dégradation, on retrouve les « quantum dots »[343], les oxydes métalliques[344,345] ou les nanoparticules d'argent[346]. On pourra retrouver une liste très longue d'éléments à même de se solubiliser et d'exercer une activité toxique, comme le cadmium, le zinc ou l'arsenic par exemple. A l'inverse, des éléments très peu sensibles à cette dissolution pourront présenter des toxicités moindres par ce phénomène, comme c'est le cas, par exemple, pour l'or[347,348], le platine, l'oxyde de titane ou les composés du silicium, Ces nanoparticules pourront toutefois être toxiques au travers d'autres mécanismes.

Parallèlement, les phénomènes de surface sont très importants pour la compréhension des mécanismes de toxicité. En effet, la surface spécifique des nanoparticules est telle que les phénomènes de surface peuvent être prépondérants. La formation d'espèces très réactives par effet catalytique de surface est un exemple de phénomène de surface que l'on peut retrouver, par exemple, pour les nanoparticules d'or[15,349,350] ou de TiO_2[334]. A ce titre, certains auteurs préconisent de définir la dose toxique des nanoparticules en fonction de la surface de nanoparticules plutôt qu'en termes de concentrations massiques ou molaires[351,352].

Il est intéressant de noter que ces propriétés peuvent ne devenir toxiques que sous certaines conditions. Ainsi, on peut rencontrer de nombreux exemples où la toxicité ne peut être effective que lorsque la nanoparticule est internalisée dans la cellule, son noyau ou l'un de ses organites, d'où l'importance d'autres paramètres que nous allons détailler par la suite.

Annexe 2.1.3. Influence de la taille, de la forme et de la chimie de surface sur la toxicité

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la capacité des nanoparticules à être internalisées peut exacerber leurs propriétés toxiques. Les phénomènes d'internalisation dépendent de différents processus, eux-mêmes influencés par la taille des nanoparticules ou leurs chimies de surface. Afin de bien comprendre ces influences, il est nécessaire d'expliciter brièvement les mécanismes d'endocytose à l'œuvre. Ainsi, l'endocytose englobe tous les mécanismes actifs mis en œuvre par la cellule pour internaliser des molécules ou des nanoparticules et impliquant une déformation de la membrane cellulaire autour du volume à internaliser par la cellule. L'endocytose regroupe plusieurs

mécanismes différents, que sont la phagocytose, la macropinocytose et les endocytoses dépendantes de systèmes protéiques spécifiques comme les clathrines ou les caveolae (Figure A-4).

La phagocytose est principalement rencontrée chez les cellules immunitaires et permet à la cellule d'absorber des particules de très grandes tailles (>250-500nm). Compte tenu de la nature, souvent immunologique, de ce processus, la phagocytose peut être activée par la présence d'anticorps ou de protéines du complément sur la structure phagocytée, lui conférant ainsi, une certaine spécificité. Dans le cas de particules aux formes très allongées, cette phagocytose peut ne pas être menée à son terme du fait de l'allongement des particules, induisant une mort cellulaire. La toxicité des fibres d'amiante s'explique, par exemple, par ce phénomène parfois nommé « phagocytose frustrée ».

La macropinocytose est un phénomène non spécifique permettant aux cellules d'absorber de grandes quantités de liquide. La grande taille des macrospinosomes formés (jusqu'à 1000nm) peut permettre à une cellule d'absorber une nanoparticule fortuitement localisée dans ce volume.

Les endocytoses clathrines ou caveolae-dépendantes sont, quant à elles, dépendantes de la reconnaissance spécifique de ligands à la surface des structures à internaliser. Parmi les ligands reconnus, on peut citer des lipoprotéines, des peptides, la transferrine, des cofacteurs comme certaines vitamines, etc... La taille des endosomes formés est variable mais comprise entre 50 et 120nm[310].

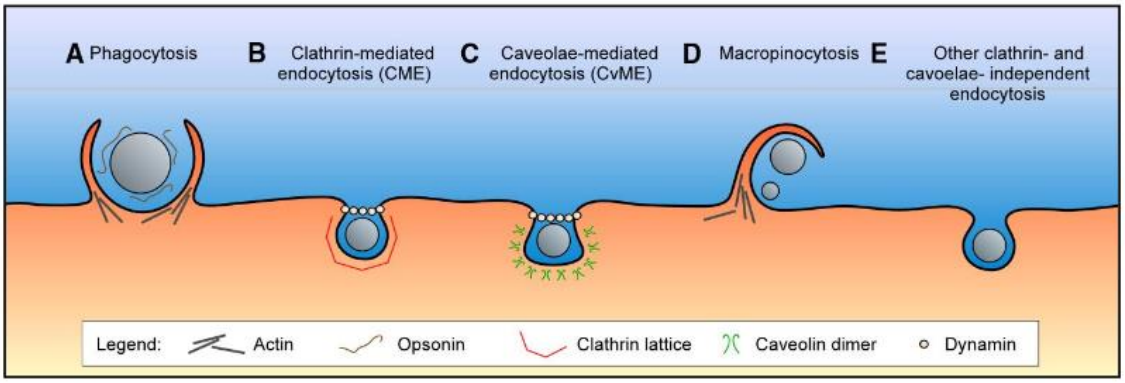


Figure A-4 : Schéma des principaux processus d'endocytose[310]

Compte tenu des limitations en taille des différents phénomènes, on pourra définir des domaines de taille ne se prêtant pas aux différents processus. Inversement, il a pu être mis en évidence certaines tailles critiques de nanoparticules, facilitant l'internalisation. Ainsi, pour des cellules Hela[276,277], la taille de 50nm semble favoriser massivement l'internalisation de nanoparticules d'or (Figure A-5).

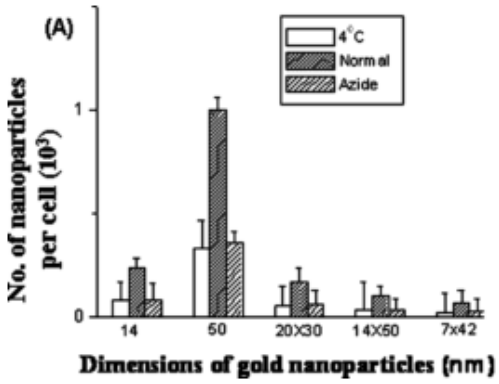


Figure A-5 : Impact de la taille et de la forme de nanoparticules d'or sur le nombre de nanoparticules internalisées[277]

La chimie de surface joue également un grand rôle dans ces mécanismes d'endocytose. Au-delà du cas des endocytoses spécifiques qui nécessitent la présence du ligand adapté à la surface des nanoparticules, le cas des internalisations non spécifiques dégage plusieurs points importants. Tout d'abord, la charge de surface des nanoparticules joue un rôle clé dans l'interaction membrane-nanoparticule. Compte tenu de la nature anionique des membranes cellulaires, les particules cationiques sont plus à même de participer au processus d'internalisation. Cette propriété explique la toxicité accrue des particules dont le potentiel zêta est supérieur à 0mV[310,330,331]. Alkilany *et al* ont ainsi montré pour des nanorods d'or que la quantité de nanoparticules cationiques absorbées par cellule est dix fois supérieure à la quantité de nanoparticules anioniques[330]. Cette propriété peut être mise à profit, notamment pour accumuler des nanoparticules au niveau du noyau des cellules.

On peut aussi réduire l'internalisation par l'ajout de molécules diminuant l'interaction avec la membrane cellulaire. Deux solutions sont principalement utilisées : l'ajout de polymères[12,52,231,234] ou l'utilisation de chaines alcanes[222]. Ainsi, le PEG[12,231,234] est couramment utilisé pour empêcher la phagocytose des nanoparticules par le système réticuloendothélial. On parle alors de nanoparticules furtives. Qin *et al* ont ainsi montré que le greffage de PEG sur du carbure de silicium permet de diminuer de 99,5% le nombre de protéines capables d'interagir avec la surface[353]. Cette réduction des interactions nanoparticules-membrane cellulaire permet alors de réduire la toxicité des nanoparticules[222].

La forme des nanoparticules joue également un rôle dans les processus d'internalisation. Toutefois, les résultats des différents auteurs semblent contradictoires. Certains auteurs affirment en effet que les sphères sont plus simples à internaliser que les autres formes[276,277,354] alors que d'autres auteurs affirment l'inverse[355,356]. Ces différences peuvent s'expliquer par des différences de charge de surface et de taille des nanoparticules entre les différentes études[310].

Enfin, indépendamment de ces phénomènes d'internalisation, la chimie de surface et la taille des nanoparticules peuvent influer sur leur comportement au sein d'un organisme. Le rôle de la chimie de surface a déjà été évoqué au travers des nanoparticules furtives. Cette furtivité se traduit en effet par une diminution de la clairance des nanoparticules, favorisant ainsi une accumulation dans l'organisme[357,358]. La taille des nanoparticules peut également jouer un grand rôle en favorisant la diffusion des nanoparticules au sein des tissus. Jong *et al* ont ainsi pu démontrer que le nombre d'organes capables d'accumuler les nanoparticules augmente à mesure que la taille de celles-ci décroit[359]. De plus, la diminution en taille des nanoparticules favorise également leur diffusion au sein des cellules. Les nanoparticules les plus petites sont à même d'atteindre le noyau où leur effets peuvent être les plus toxiques[350,360]. Certaines tailles de particules sont également critiques. Pan *et al* et Schmid *et al* décrivent ainsi que la taille de 1,4nm est une taille critique conférant une toxicité importante aux nanoparticules. En effet, cette taille permettrait aux nanoparticules de jouer le rôle d'agent intercalant bloquant les processus cellulaires liés à l'ADN[350,360,361].

On a pu voir dans cette partie quelques paramètres influençant le comportement cellulaire naturel vis-à-vis des nanoparticules. Afin d'obtenir des systèmes utilisables pour des applications biomédicales, il peut être utile de jouer sur ces paramètres pour réduire la toxicité de ces systèmes ou bien pour assurer un ciblage et une accumulation des particules sur un type donné de cellules cibles.

Annexe 2.2. Contrôle des interactions entre nanoparticules et cellules, application au ciblage des cellules cancéreuses

Une application potentielle importante des nanoparticules touche le domaine de la cancérologie. La grande problématique de la cancérologie réside dans l'identification des cellules cancéreuses parmi une quantité très importante de cellules saines et ce, malgré de très faibles différences entre ces deux populations cellulaires. La problématique du ciblage des cellules cancéreuses a donc été toujours plus au cœur des recherches dans le domaine de la cancérologie. On peut citer trois grands développements dans ce domaine : la vectorisation ciblée d'agents anti-tumoraux (cytotoxiques et radioéléments entre autres) afin de réduire le potentiel d'effets secondaires pour le patient, l'amélioration des techniques d'imagerie, afin d'abaisser le seuil de détection, et permettre ainsi un diagnostic puis un traitement plus précoce (souvent plus efficace) et enfin des applications de « gene delivery », d'utilisation plus générale que le simple traitement du cancer. On pourra diviser ensuite les processus de ciblage en deux catégories : le ciblage passif et le ciblage actif.

Annexe 2.2.1. Ciblage passif

Lorsque des nanoparticules sont introduites dans la circulation sanguine, elles sont très majoritairement phagocytées (donc accumulées puis détruites), le plus souvent au niveau hépatique et splénique par des cellules appartenant au système réticulo-endothélial. On peut ainsi réaliser un ciblage de ces organes simplement grâce à l'utilisation de nanostructures. Toutefois, les cancers hépatiques et à fortiori spléniques représentent un faible pourcentage des cancers. Ce type de ciblage présente donc un intérêt limité. Afin de dépasser cette barrière que constitue le système réticulo-endothélial, il est nécessaire de rendre les nanoparticules furtives, le plus souvent en les fonctionnalisant par des PEGs. Cette furtivité se traduit alors par une forte augmentation du temps de circulation dans l'organisme[362]. Ces systèmes pegylés, grâce à leur temps de circulation accru vont alors pouvoir s'accumuler au sein des tumeurs grâce à l'effet EPR [357,363] (Figure A-6). Ce phénomène est lié à l'organisation particulière des tumeurs. Les tumeurs sont issues de la multiplication massive des cellules cancéreuses et de ce fait, ont besoin d'un afflux sanguin important. Ainsi, les tumeurs développent des mécanismes permettant une néovascularisation, c'est la néoangiogénèse. Ce phénomène aboutit à une perfusion très importante, caractérisée par de nombreux vaisseaux. Par ailleurs, ces vaisseaux présentent des caractéristiques notables. Ainsi, le tissu conjonctif des vaisseaux, normalement constitué d'un pavage organisé de cellules endothéliales est ici très désorganisé. Cette désorganisation entraine une perméabilité très marquée de l'endothélium. De plus, différents phénomènes inflammatoires et humoraux accroissent encore la perméabilité vasculaire. Enfin, entre des vaisseaux sanguins se terminant en impasses et des canaux lymphatiques envahis par le développement anarchique des cellules, le drainage tumoral est très limité. Cette conjonction de facteurs favorise alors la pénétration, l'accumulation et la persistance des nanoparticules au sein du tissu tumoral.

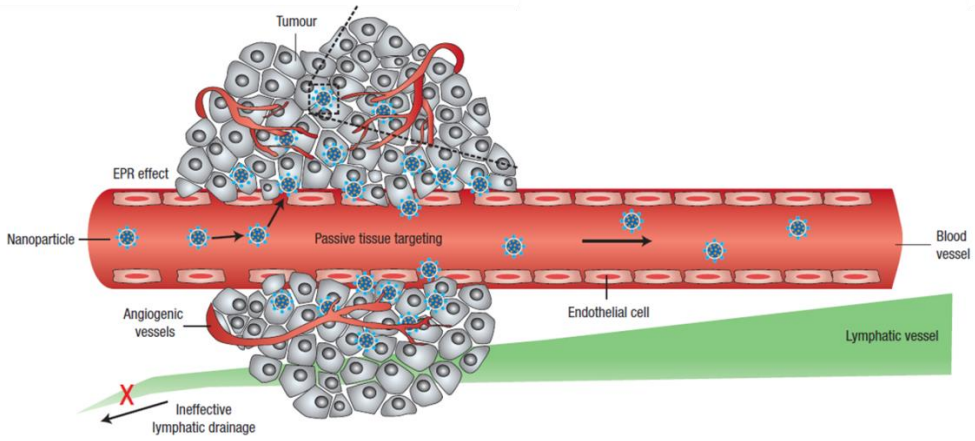


Figure A-6 : Représentation schématique d'une tumeur et de sa perfusion[364]

Pour que l'effet EPR puisse se manifester, il est nécessaire que le système puisse disposer d'une taille suffisante[357]. Maeda *et al* considèrent qu'une protéine de 50kDa est d'une taille suffisante pour que l'effet EPR puisse se manifester. Pour une telle masse, le diamètre critique, peut être considéré comme proche de 4-5nm[365]. Ce type de ciblage passif, de par sa simplicité de mise en œuvre est déjà utilisé par certaines spécialités anticancéreuses pour améliorer l'efficacité des traitements. L'objectif recherché dans ce type de cas réside surtout dans la réduction des effets toxiques, particulièrement marqués pour les cytotoxiques. On peut citer les exemples de l'Abraxane® et du Caelyx® parmi les produits commercialisés qui sont, respectivement, du paclitaxel greffé sur de l'albumine (66kDa) et des liposomes pegylés de doxorubicine. Toutefois, d'un point de vue clinique, ces nouvelles spécialités n'apportent pas ou peu d'amélioration[6,366], en comparaison des spécialités qu'elles visent à remplacer, au prix d'un surcoût majeur et d'une utilisation parfois plus complexe.

Certaines formulations pour le diagnostic à base de nanoparticules sont également sur le marché comme le Lumirem® à base de nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer.

Compte tenu des limites, sur le plan clinique, de ces spécialités à ciblage passif, de nombreuses recherches sont effectuées pour réaliser des systèmes dotés d'un ciblage actif afin d'obtenir des systèmes plus efficaces.

Annexe 2.2.2. Ciblage actif

Le développement de systèmes de ciblage actif nécessite l'identification de molécules capables de reconnaitre spécifiquement les cellules cancéreuses. Compte tenu des grandes similarités entre cellules saines et cancéreuses, peu de cibles sont envisageables.

La plupart des cibles d'intérêt sont des protéines membranaires, jouant un rôle dans la prolifération cellulaire ou la néoangiogénèse. Ces protéines sont donc largement surexprimées soit par les cellules cancéreuses, soit par les cellules de l'endothélium vasculaire nouvellement formé. Les cibles utilisables sont multiples mais on peut différencier deux groupes qui offrent des possibilités de ciblages différentes : les protéines ayant une affinité pour un ligand (des récepteurs) et les protéines n'ayant pas d'affinités particulières. Dans le premier cas, on pourra cibler ces protéines par l'intermédiaire soit d'un anticorps soit d'un ligand spécifique alors que dans le second cas, seul un anticorps pourra être utilisé.

Cette différence est importante compte tenu de la grande sensibilité des anticorps aux paramètres extérieurs (température, solvant, salinité, etc…) là où certains ligands offrent des stabilités

intéressantes pour réaliser les différentes étapes de synthèse. Une liste non exhaustive des cibles est détaillée dans le tableau A-1. A cette liste, il est utile de rajouter les « Cell Penetrating Peptides » dont les cibles et mécanismes d'action sont encore mal connus mais qui permettent également un ciblage et une internalisation des nanoparticules[8,367] dans la cellule.

Protéine cible	Peut être ciblé par :	Publications associées
VCAM-1	Anticorps	[7]
PSMA	Anticorps	[368,369]
Récepteur au VEGF	Anticorps (Avastin®) ou ligands antagonistes	[370,371]
Récepteur à l'EGF	Anticorps (Erbitux®) ou ligands antagonistes	[52,105,333,372]
Récepteur HER-2	Anticorps (Herceptin®)	[7]
Récepteur à la transferrine	Transferrine	[55,373]
Intégrines $\alpha_v\beta_3$	Peptides RGD	[7,374]
Récepteur à l'acide folique	Acide Folique	[42,44,234,301,316,375–377]

Tableau A-1 : Liste de quelques cibles couramment utilisées pour le ciblage de cellules tumorales

Annexe 2.3. Conclusions

Les phénomènes d'interactions entre cellules et nanoparticules sont nombreux et très variables. De ces interactions découlent un certain nombre des propriétés toxiques des nanoparticules. Ainsi, au-delà des limites imposées par l'optique, la physico-chimie et la chimie, l'étude du comportement des nanoparticules et leur toxicité constitue un juge de paix qui conditionne de manière majeure la conception et la synthèse de nanoparticules pour des applications diagnostic.

Annexe 3. Tests statistiques de comparaison de moyennes

Afin de comparer des moyennes issues de deux populations différentes et déterminer si ces populations sont équivalentes ou différenciées, on peut pratiquer un test statistique. On pourra ainsi, grâce à ce test, déterminer si les moyennes de deux populations sont différentes, pour un risque d'erreur donné. Pour le cas de la comparaison de moyennes, deux tests sont principalement utilisés le test de l'écart réduit et le test de Student. Pour utiliser ces tests avec une fiabilité suffisante, il est nécessaire que les distributions des deux populations s'approchent d'une distribution gaussienne.

Pour des populations de petite taille (n<30 pour au moins une des deux populations), on choisira d'effectuer un test de Student qui est plus approprié. Pour des valeurs de n élevées (n≥30 pour les deux populations), on utilisera le test de l'écart réduit. Il conviendra ensuite de déterminer si le test est uni ou bilatéral. Un test bilatéral permettra de tester les deux hypothèses suivantes : $m_1>m_2$ et $m_1<m_2$ alors qu'un test unilatéral ne pourra tester qu'une seule des deux hypothèses. En contrepartie, un test unilatéral est d'une puissance statistique supérieure et permet d'obtenir un résultat avec un risque d'erreur plus faible ou de conclure là où un test bilatéral est insuffisamment puissant.

On pourra ensuite calculer la valeur t telle que :

$$t = \frac{|m_A - m_B|}{\sqrt{\frac{s_A^2}{n_A} + \frac{s_B^2}{n_B}}}$$

Test de l'écart réduit

$$t = \frac{|m_A - m_B|}{\sqrt{\frac{s_A^2}{n_A - 1} + \frac{s_B^2}{n_B - 1}}}$$

Test de Student

Avec m la moyenne d'une population, s son écart type et n le nombre de valeur pour une population

Cette valeur doit ensuite être comparée aux valeurs contenues dans les tables. Le test de l'écart réduit utilisera une table de loi normale tandis que le test de Student utilisera une table de Student (on pourra noter la convergence de la loi de Student vers la loi normale pour les échantillons de n élevé). Il conviendra ensuite de choisir entre la table uni ou bilatérale, en fonction des objectifs du test. L'utilisation de ces tables nécessite de déterminer le nombre de degrés de liberté pour le test. Dans le cas où toutes les valeurs ont été obtenues isolément (c'est à dire sans se baser sur d'autres valeurs), le nombre de degrés de liberté est égal à n_A+n_B-2. A partir de ce nombre de degrés de liberté et en déterminant la probabilité d'erreur tolérée pour tester l'hypothèse, il est possible de déterminer une valeur dans la table. Si la valeur t calculée est supérieure à la valeur de la table, alors, on peut conclure que l'hypothèse testée est vérifiée.

Dans notre cas, l'hypothèse testée est la supériorité du ciblage de cellules cancéreuses SiC@PEG-Folate, vis-à-vis des 3 contrôles négatifs réalisés. Il s'agit donc ici d'un test de Student ($n<30$) unilatéral. L'hypothèse a donc été testée, pour les 3 comparaisons possibles, avec une probabilité d'erreur p, inférieure à 0,01% ($p<0,0001$).

Annexe 4. Liste des réactifs utilisés

Réactif	Formule Brute	Fournisseur
Acide 11-mercaptoundecanoique	$C_{11}H_{24}SO_2$	Sigma Aldrich
Acide 11-mercaptoundecanphosphonique	$C_{11}H_{24}SPO_3$	Sigma Aldrich
Acide 5,5' dithiobis-2-nitrobenzoique	$C_{14}H_8N_2O_8S_2$	Sigma Aldrich
Acide ascorbique	$C_6H_8O_6$	Sigma Aldrich
Acide chlorhydrique (37%)	HCl	Roth
Acide folique	$C_{19}H_{19}N_7O_6$	Sigma Aldrich
Acide nitrique (65%)	HNO_3	Roth
Acide sulfurique (95-98%)	H_2SO_4	Sigma Aldrich
Acide tétrachloroaurique	$HAuCl_4$, $3H_2O$	Sigma Aldrich
Aminopropyltriéthoxysilane	$C_9H_{23}NO_3Si$	ABCR
Bleu de Coomassie	$NaC_{47}H_{49}N_3O_7S_2$	Sigma Aldrich
Borohydrure de sodium	$NaBH_4$	Sigma Aldrich
Bromure de cétyltriméthylammonium (>99%)	$C_{19}H_{42}NBr$	Sigma Aldrich
Butyl 1,4 diisothiocyanate	$C_6H_8S_2N_2$	Sigma Aldrich
Chlorhydrate de 1-aminoundecanethiol	$C_{11}H_{25}SNCl$	Sigma Aldrich
Citrate de sodium	$Na_3C_6H_5O_7$, $5H_2O$	Fluka
Dicyclohexylcarbodiimide	$C_{13}H_{22}N_2$	Sigma Aldrich
Diméthylformamide	C_3H_7NO	Sigma Aldrich
Diméthylsulfoxyde	C_2H_6SO	Sigma Aldrich
Eau oxygénée (30%)	H_2O_2	Sigma Aldrich
Ethanol (99,9%)	C_2H_6O	Sigma Aldrich
Ether diéthylique	$C_4H_{10}O$	Sigma Aldrich
Hydroxyde de potassium	KOH	Sigma Aldrich
Isopropanol	C_3H_8O	Sigma Aldrich
Mercaptopropyltriéthoxysilane	$C_9H_{23}SO_3Si$	ABCR
N-hydroxysuccinimide	$C_4H_5NO_3$	Sigma Aldrich
Nitrate d'argent	$AgNO_3$	Sigma Aldrich
Octadécyltrichlorosilane	$C_{18}H_{37}SiCl_3$	ABCR
O-aminoéthylpolyéthylèneglycol (MW=3000g/mol)		Sigma Aldrich
O-diaminoéthylpolyéthylèneglycol (MW=3000g/mol)		Sigma Aldrich
Trichlorométhane	$CHCl_3$	Roth
Triéthylamine	$C_6H_{15}N$	Sigma Aldrich

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) International Agency for Research on Cancer. *World Cancer Report 2014*; Lyon, 2014.

(2) Binder-Foucard, F.; Belot, A.; Delafosse, P. *Estimation Nationale de L'incidence et de La Mortalité Par Cancer En France Entre 1980 et 2012*; 2013.

(3) Brennan, D. J.; Gallagher, W. M. Prognostic Ability of a Panel of Immunohistochemistry Markers - Retailoring of an "Old Solution". *Breast Cancer Res.* **2008**, *10* (1), 102–104.

(4) Mohsin, S. K.; Weiss, H.; Havighurst, T.; Clark, G. M.; Berardo, M.; Roanh, L. D.; To, T. V; Qian, Z.; Qian, Z.; Love, R. R.; et al. Progesterone Receptor by Immunohistochemistry and Clinical Outcome in Breast Cancer: A Validation Study. *Mod. Pathol.* **2004**, *17*, 1545–1554.

(5) Peters, S.; Adjei, A. A.; Gridelli, C.; Reck, M.; Kerr, K.; Felip, E. Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann. Oncol.* **2012**, *23*, vii56–vii64.

(6) Association Mieux Prescrire. Doxorubicine Liposomale Pégylée (Caelyx): Cancer Du Sein : Ne Pas Considérer Seulement Les Effets Indésirables Cardiaques À Court Terme. *La Rev. Prescrire* **2003**, *23* (244), 737.

(7) Byrne, J. D.; Betancourt, T.; Brannon-Peppas, L. Active Targeting Schemes for Nanoparticle Systems in Cancer Therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1615–1626.

(8) Regberg, J.; Srimanee, A.; Langel, Ü. Applications of Cell-Penetrating Peptides for Tumor Targeting and Future Cancer Therapies. *Pharmaceuticals* **2012**, *5*, 991–1007.

(9) Chen, H.; Zhen, Z.; Todd, T.; Chu, P. K.; Xie, J. Nanoparticles for Improving Cancer Diagnosis. *Mater. Sci. Eng. R. Rep.* **2013**, *74*, 35–69.

(10) Brannon-Peppas, L.; Blanchette, J. O. Nanoparticle and Targeted Systems for Cancer Therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 206–212.

(11) Mornet, S.; Vasseur, S.; Grasset, F.; Duguet, E. Magnetic Nanoparticle Design for Medical Diagnosis and Therapy. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14* (14), 2161–2175.

(12) Kaaki, K.; Herve, K.; Chiper, M.; Shkilnyy, A.; Souce, M.; Benoit, R.; Paillard, A.; Dubois, P.; Saboungi, M.; Chourpa, I. Magnetic Nanocarriers of Doxorubicin Coated with Poly (Ethylene Glycol) and Folic Acid : Relation between Coating Structure , Surface Properties , Colloidal Stability , and Cancer Cell Targeting. *Langmuir* **2012**, *28* (2), 1496–1505.

(13) Dickerson, E. B.; Dreaden, E. C.; Huang, X.; El-Sayed, I. H.; Chu, H.; Pushpanketh, S.; McDonald, J. F.; El-Sayed, M. a. Gold Nanorod Assisted near-Infrared Plasmonic Photothermal Therapy (PPTT) of Squamous Cell Carcinoma in Mice. *Cancer Lett.* **2008**, *269* (1), 57–66.

(14) Vankayala, R.; Huang, Y. K.; Kalluru, P.; Chiang, C. S.; Hwang, K. C. First Demonstration of Gold Nanorods-Mediated Photodynamic Therapeutic Destruction of Tumors via near Infra-Red Light Activation. *Small* **2014**, *10* (8), 1612–1622.

(15) Vankayala, R.; Lin, C. C.; Kalluru, P.; Chiang, C. S.; Hwang, K. C. Gold Nanoshells-Mediated Bimodal Photodynamic and Photothermal Cancer Treatment Using Ultra-Low Doses of near Infra-Red Light. *Biomaterials* **2014**, *35* (21), 5527–5538.

(16) Labouret, T.; Audibert, J.-F.; Pansu, R. B.; Palpant, B. Plasmon-Assisted Production of Reactive Oxygen Species by Single Gold Nanorods. *Small* **2015**, *11* (35), 4475–4479.

(17) O'Neal, D. P.; Hirsch, L. R.; Halas, N. J.; Payne, J. D.; West, J. L. Photo-Thermal Tumor Ablation

in Mice Using near Infrared-Absorbing Nanoparticles. *Cancer Lett.* **2004**, *209* (2), 171–176.

(18) Croissant, J.; Maynadier, M.; Mongin, O.; Hugues, V.; Blanchard-Desce, M.; Chaix, A.; Cattoën, X.; Wong Chi Man, M.; Gallud, A.; Gary-Bobo, M.; et al. Enhanced Two-Photon Fluorescence Imaging and Therapy of Cancer Cells via Gold@Bridged Silsesquioxane Nanoparticles. *Small* **2014**, 1–5.

(19) Murphy, C. J.; Thompson, L. B.; Chernak, D. J.; Yang, J. A.; Sivapalan, S. T.; Boulos, S. P.; Huang, J.; Alkilany, A. M.; Sisco, P. N. Gold Nanorod Crystal Growth: From Seed-Mediated Synthesis to Nanoscale Sculpting. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2011**, *16* (2), 128–134.

(20) Khoshgard, K.; Hashemi, B.; Arbabi, A.; Rasaee, M. J.; Soleimani, M. Radiosensitization Effect of Folate-Conjugated Gold Nanoparticles on HeLa Cancer Cells under Orthovoltage Superficial Radiotherapy Techniques. *Phys. Med. Biol.* **2014**, *59* (9), 2249–2263.

(21) Huang, P.; Bao, L.; Zhang, C.; Lin, J.; Luo, T.; Yang, D.; He, M.; Li, Z.; Gao, G.; Gao, B.; et al. Folic Acid-Conjugated Silica-Modified Gold Nanorods for X-ray/CT Imaging-Guided Dual-Mode Radiation and Photo-Thermal Therapy. *Biomaterials* **2011**, *32* (36), 9796–9809.

(22) Boisselier, E.; Astruc, D. Gold Nanoparticles in Nanomedicine: Preparations, Imaging, Diagnostics, Therapies and Toxicity. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (6), 1759–1782.

(23) Hainfeld, J. F.; Slatkin, D. N.; Smilowitz, H. M. The Use of Gold Nanoparticles to Enhance Radiotherapy in Mice. *Phys. Med. Biol.* **2004**, *49* (18), 309–315.

(24) Morana, G.; Salviato, E.; Guarise, A. Contrast Agents for Hepatic MRI. *Cancer Imaging* **2007**, *7*, 24–27.

(25) Park, J. Y.; Baek, M. J.; Choi, E. S.; Woo, S.; Kim, J. H.; Kim, T. J.; Jung, J. C.; Chae, K. S.; Chang, Y.; Lee, G. H. Paramagnetic Ultrasmall Gadolinium Oxide Nanoparticles as Advanced T 1 MRI Contrast Agent: Account for Large Longitudinal Relaxivity, Optimal Particle Diameter, and in Vivo T1 MR Images. *ACS Nano* **2009**, *3* (11), 3663–3669.

(26) Philippot, C.; Dubois, F.; Maurin, M.; Boury, B.; Prat, A.; Ibanez, A. New Core–shell Hybrid Nanoparticles for Biophotonics: Fluorescent Organic Nanocrystals Confined in Organosilicate Spheres. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 11370–11378.

(27) Faure, A.; Bazzi, R.; Goubard, F.; Pauthe, E.; Marquette, C. a; Blum, J.; Perriat, P.; Tillement, O.; Mate, L. D. P.; Lyon, C. B.; et al. Functionalization of Luminescent Aminated Particles for Facile Bioconjugation. **2008**, *2* (11), 2273–2282.

(28) Yang, J.; Zhang, F.; Chen, Y.; Qian, S.; Hu, P.; Li, W.; Deng, Y.; Fang, Y.; Han, L.; Luqman, M.; et al. Core-Shell Ag@SiO2@mSiO2 Mesoporous Nanocarriers for Metal-Enhanced Fluorescence. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (42), 11618–11620.

(29) Sivakumar, S.; Diamente, P. R.; van Veggel, F. C. Silica-Coated Ln3+-Doped LaF3 Nanoparticles as Robust down- and Upconverting Biolabels. *Chem. - A Eur. J.* **2006**, *12* (22), 5878–5884.

(30) Aslan, K.; Wu, M.; Lakowicz, J.; Geddes, C. Fluorescent Core-Shell Ag@SiO2 Nanocomposites for Metal-Enhanced Fluorescence and Single Nanoparticle Sensing Platforms. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (6), 1524–1525.

(31) Louis, C.; Bazzi, R.; Marquette, C. a.; Bridot, J. L.; Roux, S.; Ledoux, G.; Mercier, B.; Blum, L.; Perriat, P.; Tillement, O. Nanosized Hybrid Particles with Double Luminescence for Biological Labeling. *Chem. Mater.* **2005**, *17* (7), 1673–1682.

(32) Lu, H.; Yi, G.; Zhao, S.; Chen, D.; Guo, L.-H.; Cheng, J. Synthesis and Characterization of Multi-Functional Nanoparticles Possessing Magnetic, up-Conversion Fluorescence and Bio-Affinity Properties. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 1336–1341.

(33) Susumu, K.; Mei, B. C.; Mattoussi, H. Multifunctional Ligands Based on Dihydrolipoic Acid and Polyethylene Glycol to Promote Biocompatibility of Quantum Dots. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 424–436.

(34) Wolcott, A.; Gerion, D.; Visconte, M.; Sun, J.; Schwartzberg, A.; Chen, S.; Zhang, J. Z. Silica-Coated CdTe Quantum Dots Functionalized with Thiols for Bioconjugation to IgG Proteins. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (11), 5779–5789.

(35) Gerion, D.; Pinaud, F.; Williams, S. C.; Parak, W. J.; Zanchet, D.; Weiss, S.; Alivisatos, a. P. Synthesis and Properties of Biocompatible Water-Soluble Silica-Coated CdSe/ZnS Semiconductor Quantum Dots. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (37), 8861–8871.

(36) Fan, J.; Chu, P. K. Group IV Nanoparticles: Synthesis, Properties, and Biological Applications. *Small* **2010**, *6* (19), 2080–2098.

(37) Mélinon, P.; Masenelli, B.; Tournus, F.; Perez, A. Playing with Carbon and Silicon at the Nanoscale. *Nat. Mater.* **2007**, *6* (7), 479–490.

(38) Erogbogbo, F.; Yong, K.-T.; Hu, R.; Law, W.-C.; Ding, H.; Chang, C.-W.; Prasad, P. N.; Swihart, M. T. Biocompatible Magnetofluorescent Probes: Luminescent Silicon Quantum Dots Coupled with Superparamagnetic iron(III) Oxide. *ACS Nano* **2010**, *4* (9), 5131–5138.

(39) Botsoa, J.; Lysenko, V.; Géloën, A.; Marty, O.; Bluet, J. M.; Guillot, G. Application of 3C-SiC Quantum Dots for Living Cell Imaging. *Appl. Phys. Lett.* **2008**, *92*, 173902–173905.

(40) Das, M.; Mishra, D.; Dhak, P.; Gupta, S.; Maiti, T. K.; Basak, A.; Pramanik, P. Biofunctionalized, Phosphonate-Grafted, Ultrasmall Iron Oxide Nanoparticles for Combined Targeted Cancer Therapy and Multimodal Imaging. *Small* **2009**, *5* (24), 2883–2893.

(41) Abou-Hassan, A.; Bazzi, R.; Cabuil, V. Multistep Continuous-Flow Microsynthesis of Magnetic and Fluorescent Gamma-Fe2O3@SiO2 Core/shell Nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48* (39), 7180–7183.

(42) Mohapatra, S.; Mallick, S. K.; Maiti, T. K.; Ghosh, S. K.; Pramanik, P. Synthesis of Highly Stable Folic Acid Conjugated Magnetite Nanoparticles for Targeting Cancer Cells. *Nanotechnology* **2007**, *18* (38), 385102.

(43) Zhou, Z.; Zhang, C.; Qian, Q.; Ma, J.; Huang, P.; Zhang, X.; Pan, L.; Gao, G.; Fu, H.; Fu, S.; et al. Folic Acid-Conjugated Silica Capped Gold Nanoclusters for Targeted fluorescence/X-Ray Computed Tomography Imaging. *J. Nanobiotechnology* **2013**, *11* (1), 17–28.

(44) Lebret, V.; Raehm, L.; Durand, J.-O.; Smaïhi, M.; Werts, M. H. V; Blanchard-Desce, M.; Méthy-Gonnod, D.; Dubernet, C. Folic Acid-Targeted Mesoporous Silica Nanoparticles for Two-Photon Fluorescence. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2010**, *6* (2), 176–180.

(45) Van de Broek, B.; Devoogdt, N.; D'Hollander, A.; Gijs, H.-L.; Jans, K.; Lagae, L.; Muyldermans, S.; Maes, G.; Borghs, G. Specific Cell Targeting with Nanobody Conjugated Branched Gold Nanoparticles for Photothermal Therapy. *ACS Nano* **2015**, *5* (6), 4319–4328.

(46) Mauriello-Jimenez, C.; Croissant, J.; Maynadier, M.; Cattoën, X.; Wong Chi Man, M.; Vergnaud, J.; Chaleix, V.; Sol, V.; Garcia, M.; Gary-Bobo, M.; et al. Porphyrin-Functionalized Mesoporous

Organosilica Nanoparticles for Two-Photon Imaging of Cancer Cells and Drug Delivery. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (18), 3681–3684.

(47) Croissant, J. G.; Qi, C.; Maynadier, M.; Cattoën, X.; Wong Chi Man, M.; Raehm, L.; Mongin, O.; Blanchard-Desce, M.; Garcia, M.; Gary-Bobo, M.; et al. Multifunctional Gold-Mesoporous Silica Nanocomposites for Enhanced Two-Photon Imaging and Therapy of Cancer Cells. *Front. Mol. Biosci.* **2016**, *3*, 1–9.

(48) Liu, J.; Bu, W.; Pan, L.; Shi, J. NIR-Triggered Anticancer Drug Delivery by Upconverting Nanoparticles with Integrated Azobenzene-Modified Mesoporous Silica. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52* (16), 4375–4379.

(49) Li, M.; Yan, H.; Teh, C.; Korzh, V.; Zhao, Y. NIR-Triggered Drug Release from Switchable Rotaxane-Functionalized Silica-Covered Au Nanorods. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 9745–9748.

(50) Croissant, J. G.; Qi, C.; Mongin, O.; Hugues, V.; Blanchard-Desce, M.; Raehm, L.; Cattoën, X.; Wong, M.; Man, C.; Maynadier, M.; et al. Disulfide-Gated Mesoporous Silica Nanoparticles Designed for Two-Photon-Triggered Drug Release and Imaging. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 6456–6461.

(51) Mills, D. *Nonlinear Optics : Basic Concepts*, 2nd editio.; Heidelberg, S. B., Ed.; Springer Berlin Heidelberg, 1998.

(52) Durr, N. J.; Larson, T.; Smith, D. K.; Korgel, B. a; Sokolov, K.; Ben-Yakar, A. Two-Photon Luminescence Imaging of Cancer Cells Using Molecularly Targeted Gold Nanorods. *Nano Lett.* **2007**, *7* (4), 941–945.

(53) Wang, H.; Huff, T. B.; Zweifel, D. a; He, W.; Low, P. S.; Wei, A.; Cheng, J.-X. In Vitro and in Vivo Two-Photon Luminescence Imaging of Single Gold Nanorods. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 15752–15756.

(54) Huff, T. B.; Hansen, M. N.; Zhao, Y.; Cheng, J.-X.; Wei, A. Controlling the Cellular Uptake of Gold Nanorods. *Langmuir* **2007**, *23* (4), 1596–1599.

(55) Li, J.-L.; Gu, M. Surface Plasmonic Gold Nanorods for Enhanced Two-Photon Microscopic Imaging and Apoptosis Induction of Cancer Cells. *Biomaterials* **2010**, *31* (36), 9492–9498.

(56) Denk, W.; Strickler, J. H.; Webb, W. W. Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Science* **1990**, *248* (4951), 73–76.

(57) Xu, C.; Webb, W. W. Measurement of Two-Photon Excitation Cross Sections of Molecular Fluorophores with Data from 690 to 1050 Nm. *J. Opt. Soc. Am. B* **1996**, *13* (3), 481.

(58) Rogov, A. Bismuth Ferrite And Silicon Carbide Harmonic Nanoparticles : From Characterization To Tissue Imaging, Université de Genève, 2015.

(59) Bonacina, L. Nonlinear Nanomedecine: Harmonic Nanoparticles toward Targeted Diagnosis and Therapy. *Mol. Pharm.* **2013**, *10* (3), 783.

(60) Ruzin, S.; Aaron, H. 1P vs 2P Fluorescence http://microscopy.berkeley.edu/courses/tlm/2P/index.html (accessed Feb 2, 2016).

(61) Wang, H. W.; Le, T. T.; Cheng, J. X. Label-Free Imaging of Arterial Cells and Extracellular Matrix Using a Multimodal CARS Microscope. *Opt. Commun.* **2008**, *281*, 1813–1822.

(62) Chen, H.; Wang, H.; Slipchenko, M. N.; Jung, Y.; Shi, Y.; Zhu, J.; Buhman, K. K.; Cheng, J.-X. A

Multimodal Platform for Nonlinear Optical Microscopy and Microspectroscopy. *Opt. Express* **2009**, *17* (3), 1282–1290.

(63) Campagnola, P. J.; Millard, A. C.; Terasaki, M.; Hoppe, P. E.; Malone, C. J.; Mohler, W. a. Three-Dimensional High-Resolution Second-Harmonic Generation Imaging of Endogenous Structural Proteins in Biological Tissues. *Biophys. J.* **2002**, *82* (1), 493–508.

(64) Lin, J.; Lu, F.; Zheng, W.; Xu, S.; Tai, D.; Yu, H.; Huang, Z. Assessment of Liver Steatosis and Fibrosis in Rats Using Integrated Coherent Anti-Stokes Raman Scattering and Multiphoton Imaging Technique. *J. Biomed. Opt.* **2011**, *16* (11), 116024–116030.

(65) Xu, X.; Cheng, J.; Thrall, M. J.; Liu, Z.; Wang, X.; Wong, S. T. C. Multimodal Non-Linear Optical Imaging for Label-Free Differentiation of Lung Cancerous Lesions from Normal and Desmoplastic Tissues. *Biomed. Opt. Express* **2013**, *4* (12), 2855–2868.

(66) Campagnola, P. J.; Wei, M. D.; Lewis, A.; Loew, L. M. High-Resolution Nonlinear Optical Imaging of Live Cells by Second Harmonic Generation. *Biophys. J* **1999**, *77*, 3341–3349.

(67) Moreaux, L.; Sandre, O.; Mertz, J. Membrane Imaging by Second-Harmonic Generation Microscopy. *J. Opt. Soc. Am.* **2000**, *17*, 1685–1694.

(68) Passemard, S.; Staedler, D.; Sonego, G.; Magouroux, T.; Schneiter, G. S.; Juillerat-Jeanneret, L.; Bonacina, L.; Gerber-Lemaire, S. Functionalized Bismuth Ferrite Harmonic Nanoparticles for Cancer Cells Labeling and Imaging. *J. Nanoparticle Res.* **2015**, *17*, 414–426.

(69) Kim, E.; Steinbrück, A.; Buscaglia, M. T.; Buscaglia, V.; Pertsch, T.; Grange, R. Second-Harmonic Generation of Single BaTiO3 Nanoparticles down to 22 Nm Diameter. *ACS Nano* **2013**, *7* (6), 5343–5349.

(70) Extermann, J.; Bonacina, L.; Cuña, E.; Kasparian, C.; Mugnier, Y.; Feurer, T.; Wolf, J.-P. Nanodoublers as Deep Imaging Markers for Multi-Photon Microscopy. *Opt. Express* **2009**, *17* (17), 15342–15349.

(71) Pantazis, P.; Maloney, J.; Wu, D.; Fraser, S. E. Second Harmonic Generating (SHG) Nanoprobes for in Vivo Imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107* (33), 14535–14540.

(72) Richter, L. J.; Steinbrück, A.; Zilk, M.; Sergeyev, A.; Pertsch, T.; Tünnermann, A.; Grange, R. Core-Shell Potassium Niobate Nanowires for Enhanced Nonlinear Optical Effects. *Nanoscale* **2014**, *6*, 5200–5207.

(73) Ladj, R.; Magouroux, T.; Eissa, M.; Dubled, M.; Mugnier, Y.; Dantec, R. Le; Galez, C.; Valour, J.-P.; Fessi, H.; Elaissari, A. Aminodextran-Coated Potassium Niobate (KNbO3) Nanocrystals for Second Harmonic Bio-Imaging. *Colloid Surf. A* **2013**, *439*, 131–137.

(74) Staedler, D.; Magouroux, T.; Hadji, R.; Joulaud, C.; Extermann, J.; Schwung, S.; Passemard, S.; Kasparian, C.; Clarke, G.; Gerrmann, M.; et al. Harmonic Nanocrystals for Biolabeling: A Survey of Optical Properties and Biocompatibility. *ACS Nano* **2012**, *6* (3), 2542–2549.

(75) Joulaud, C. Caractérisation Par Diffusion de Second Harmonique de Nanocristaux Pour L'imagerie Biomédicale, Université de Grenoble, 2013.

(76) Dempsey, W. P.; Fraser, S. E.; Pantazis, P. SHG Nanoprobes: Advancing Harmonic Imaging in Biology. *BioEssays* **2012**, *34*, 351–360.

(77) Hsieh, C.-L.; Grange, R.; Pu, Y.; Psaltis, D. Three-Dimensional Harmonic Holographic Microcopy

Using Nanoparticles as Probes for Cell Imaging. *Opt. Express* **2009**, *17* (4), 2880–2891.

(78) Pu, Y.; Grange, R.; Hsieh, C.-L.; Psaltis, D. Nonlinear Optical Properties of Core-Shell Nanocavities for Enhanced Second-Harmonic Generation. *Phys. Rev. Lett.* **2010**, *104*, 207402–207405.

(79) Zakharko, Y.; Nychyporuk, T.; Bonacina, L.; Lemiti, M.; Lysenko, V. Plasmon-Enhanced Nonlinear Optical Properties of SiC Nanoparticles. *Nanotechnology* **2013**, *24* (5), 055703.

(80) Hsieh, C.-L.; Grange, R.; Pu, Y.; Psaltis, D. Bioconjugation of Barium Titanate Nanocrystals with Immunoglobulin G Antibody for Second Harmonic Radiation Imaging Probes. *Biomaterials* **2010**, *31*, 2272.

(81) Passemard, S.; Staedler, D.; Učňová, L.; Schneiter, G. S.; Kong, P.; Bonacina, L.; Juillerat-Jeanneret, L.; Gerber-Lemaire, S. Convenient Synthesis of Heterobifunctional Poly(ethylene Glycol) Suitable for the Functionalization of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (17), 5006–5010.

(82) Hu, K.; Liu, T.; Chung, K.; Huang, K.; Hsieh, C. Efficient NIR Hyperthermia and Intense Nonlinear Optical Imaging Contrast on the Gold Nanorod-in-Shell Nanostructures S1 S2 SI. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *22* (5), 1–11.

(83) Bharadwaj, P.; Novotny, L. Spectral Dependence of Single Molecule Fluorescence Enhancement. *Opt. Exp.* **2007**, *15* (21), 14266–14274.

(84) Bharadwaj, P.; Anger, P.; Novotny, L. Nanoplasmonic Enhancement of Single-Molecule Fluorescence. *Nanotechnology* **2007**, *18* (4), 044017.

(85) Willets, K. A.; Van Duyne, R. P. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 267–297.

(86) Taleb, A.; Petit, C.; Pileni, M. P. Synthesis of Highly Monodisperse Silver Nanoparticles from AOT Reverse Micelles : A Way to 2D and 3D Self-Organization. **1997**, *4756* (12), 950–959.

(87) Rodríguez-Fernández, J.; Pérez-Juste, J.; García de Abajo, F. J.; Liz-Marzán, L. M. Seeded Growth of Submicron Au Colloids with Quadrupole Plasmon Resonance Modes. *Langmuir* **2006**, *22* (16), 7007–7010.

(88) Cao, J.; Galbraith, E. K.; Sun, T.; Grattan, K. T. V. Effective Surface Modification of Gold Nanorods for Localized Surface Plasmon Resonance-Based Biosensors. *Sensors Actuators B Chem.* **2012**, *169*, 360–367.

(89) Mirkin, C.; Letsinger, R.; Mucic, R.; Storhoff, J. A DNA-Based Method for Rationally Assembling Nanoparticles into Macroscopic Materials. *Nature* **1996**, *382*, 607–609.

(90) Stoeva, S.; Lee, J.; Thaxton, C.; Mirkin, C. Multiplexed DNA Detection with Biobarcoded Nanoparticle Probes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45* (20), 3303–3306.

(91) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer US, 2006.

(92) Sui, N.; Monnier, V.; Zakharko, Y.; Chevolot, Y.; Alekseev, S.; Bluet, J.-M.; Lysenko, V.; Souteyrand, E. Plasmon-Controlled Narrower and Blue-Shifted Fluorescence Emission in (Au@SiO2)SiC Nanohybrids. *J. Nanopart. Res.* **2012**, *14*, 1004–1013.

(93) Sui, N.; Monnier, V.; Zakharko, Y.; Chevolot, Y.; Alekseev, S. a; Bluet, J.-M.; Lysenko, V.; Souteyrand, E. Fluorescent (Au@SiO2)SiC Nanohybrids: Influence of Gold Nanoparticle

Diameter and SiC Nanoparticle Surface Density. *Plasmonics* **2013**, *8* (1), 85–92.

(94) Li, X.; Kao, F.-J.; Chuang, C.-C.; He, S. Enhancing Fluorescence of Quantum Dots by Silica-Coated Gold Nanorods under One- and Two-Photon Excitation. *Opt. Express* **2010**, *18* (11), 11335–11346.

(95) Cao, Y.; Jin, R.; Mirkin, C. Nanoparticles with Raman Spectroscopic Fingerprints for DNA and RNA Detection. *Science (80-.).* **2002**, *297* (5586), 1536–1540.

(96) Johansson, P.; Xu, H.; Käll, M. Surface-Enhanced Raman Scattering and Fluorescence near Metal Nanoparticles. *Phys. Rev. B* **2005**, *72* (3), 035427.

(97) Jais, P. M.; Bragas, A. V. Quantum Dots close to Metal Nanoparticles. *Pap. Phys.* **2011**, *3*, 1–5.

(98) Gryczynski, I.; Malicka, J.; Shen, Y.; Gryczynski, Z.; Lakowicz, J. R. Multiphoton Excitation of Fluorescence near Metallic Particles: Enhanced and Localized Excitation. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106* (9), 2191–2195.

(99) Kong, L.; Yang, J.; Li, S.; Zhang, Q.; Xue, Z.; Zhou, H.; Wu, J.; Jin, B.; Tian, Y. A Self-Assembled Nanohybrid Composed of Fluorophore-Phenylamine Nanorods and Ag Nanocrystals: Energy Transfer, Wavelength Shift of Fluorescence and TPEF Applications for Live-Cell Imaging. *Chemistry* **2013**, *19* (49), 16625–16633.

(100) Clark, H. A.; Campagnola, P. J.; Wuskell, J. P.; Lewis, A.; Loew, L. M.; June, R. V. Second Harmonic Generation Properties of Fluorescent Polymer-Encapsulated Gold Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10234–10235.

(101) Sivapalan, S. T.; Vella, J. H.; Yang, T. K.; Dalton, M. J.; Swiger, R. N.; Haley, J. E.; Cooper, T. M.; Urbas, A. M.; Tan, L.-S.; Murphy, C. J. Plasmonic Enhancement of the Two Photon Absorption Cross Section of an Organic Chromophore Using Polyelectrolyte-Coated Gold Nanorods. *Langmuir* **2012**, *28* (24), 9147–9154.

(102) Cohanoschi, I.; Yao, S.; Belfield, K. D.; Hernández, F. E. Effect of the Concentration of Organic Dyes on Their Surface Plasmon Enhanced Two-Photon Absorption Cross Section Using Activated Au Nanoparticles. *J. Appl. Phys.* **2007**, *101*, 086112.

(103) Ishifuji, M.; Mitsuishi, M.; Miyashita, T. Enhanced Optical Second Harmonic Generation in Hybrid Polymer Nanoassemblies Based on Coupled Surface Plasmon Resonance of a Gold Nanoparticle Array. *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *89*, 011903.

(104) Richter, L. J.; Steinbrück, a.; Pertsch, T.; Tünnermann, a.; Grange, R. Plasmonic Core–Shell Nanowires for Enhanced Second-Harmonic Generation. *Plasmonics* **2012**, *8* (1), 115–120.

(105) Huang, X.; El-Sayed, I. H.; Qian, W.; El-Sayed, M. a. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (6), 2115–2120.

(106) Gao, L.; Liu, R.; Gao, F.; Wang, Y.; Jiang, X.; Gao, X. Plasmon-Mediated Generation of Reactive Oxygen Species from near-Infrared Light Excited Gold Nanocages for Photodynamic Therapy in Vitro. *ACS Nano* **2014**, *8* (7), 7260–7271.

(107) Liu, H.; Shen, M.; Zhao, J.; Zhu, J.; Xiao, T.; Cao, X.; Zhang, G.; Shi, X. Facile Formation of Folic Acid-Modified Dendrimer-Stabilized Gold-Silver Alloy Nanoparticles for Potential Cellular Computed Tomography Imaging Applications. *Analyst* **2013**, *138* (7), 1979–1987.

(108) Butterworth, K. T.; McMahon, S. J.; Currell, F. J.; Prise, K. M. Physical Basis and Biological Mechanisms of Gold Nanoparticle Radiosensitization. *Nanoscale* **2012**, *4*, 4830–4838.

(109) Park, J.; Estrada, A.; Sharp, K.; Sang, K.; Schwartz, J. a; Smith, D. K.; Coleman, C.; Payne, J. D.; Korgel, B. a; Dunn, A. K.; et al. Imaging of Tumors Using Near-Infrared Excited Gold Nanoshells. *Opt. Express* **2008**, *16* (3), 214–221.

(110) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study Of The Nucleation And Growth Processes In The Synthesis Of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55–75.

(111) Lamer, V. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72* (11), 4847–4854.

(112) Sun, Y. Controlled Synthesis of Colloidal Silver Nanoparticles in Organic Solutions: Empirical Rules for Nucleation Engineering. *Chem Soc Rev* **2013**, *42*, 2497–2511.

(113) Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat. Phys Sci* **1973**, *241*, 20–22.

(114) Brown, K. R.; Walter, D. G.; Natan, M. J. Seeding of Colloidal Au Nanoparticle Solutions. 2. Improved Control of Particle Size and Shape. *Chem. Mater.* **2000**, *12* (2), 306–313.

(115) Chateau, D. Etude de L'influence de La Structure et de La Composition de Matériaux Hybrides Monolythiques Sur Les Propriétés Optiques (Luminescence et Absorption Non Linéaire), Université de Lyon, 2013.

(116) Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. Evidence for Seed-Mediated Nucleation in the Chemical Reduction of Gold Salts to Gold Nanoparticles. *Chem. Mater.* **2001**, *13* (26), 2313–2322.

(117) Perrault, S. D.; Chan, W. C. W. Synthesis and Surface Modification of Highly Monodispersed, Spherical Gold Nanoparticles of 50-200 Nm. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (47), 17042–17043.

(118) Hubert, F.; Testard, F.; Spalla, O. Cetyltrimethylammonium Bromide Silver Bromide Complex as the Capping Agent of Gold Nanorods. *Langmuir* **2008**, *24* (17), 9219–9222.

(119) Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puntes, V. Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 Nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. *Langmuir* **2011**, *27* (17), 11098–11105.

(120) Rodríguez-Fernández, J.; Pérez-Juste, J.; García de Abajo, F. J.; Liz-Marzán, L. M. Seeded Growth of Submicron Au Colloids with Quadrupole Plasmon Resonance Modes. *Langmuir* **2006**, *22* (16), 7007–7010.

(121) Fernández-López, C.; Mateo-Mateo, C.; Alvarez-Puebla, R.; Pérez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L. M. Highly Controlled Silica Coating of PEG-Capped Metal Nanoparticles and Preparation of SERS-Encoded Particles. *Langmuir* **2009**, *25* (24), 13894–13899.

(122) Joshi, G. K.; Smith, K. a.; Johnson, M. a.; Sardar, R. Temperature-Controlled Reversible Localized Surface Plasmon Resonance Response of Polymer-Functionalized Gold Nanoprisms in the Solid State. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (49), 26228–26237.

(123) Xie, J.; Zhang, Q.; Lee, J. Y.; Wang, D. I. C. The Synthesis of SERS-Active Gold Nanoflower Tags for In Vivo Applications. *ACS Nano* **2008**, *2* (12), 2473–2480.

(124) Senthil Kumar, P.; Pastoriza-Santos, I.; Rodríguez-González, B.; Javier García de Abajo, F.; Liz-

Marzán, L. M. High-Yield Synthesis and Optical Response of Gold Nanostars. *Nanotechnology* **2008**, *19* (1), 015606.

(125) Chen, Y.; Zhang, Y.; Liang, W.; Li, X. Gold Nanocages as Contrast Agents for Two-Photon Luminescence Endomicroscopy Imaging. *Nanomedicine* **2012**, *8* (8), 1267–1270.

(126) Zoppi, a; Trigari, S.; Giorgetti, E.; Muniz-Miranda, M.; Alloisio, M.; Demartini, a; Dellepiane, G.; Thea, S.; Dobrikov, G.; Timtcheva, I. Functionalized Au/Ag Nanocages as a Novel Fluorescence and SERS Dual Probe for Sensing. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *407*, 89–94.

(127) Soulé, S.; Allouche, J.; Dupin, J.-C.; Martinez, H. Design of Ag–Au Nanoshell Core/mesoporous Oriented Silica Shell Nanoparticles through a Sol–gel Surfactant Templating Method. *Microporous Mesoporous Mater.* **2013**, *171*, 72–77.

(128) Perezjuste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L. M.; Mulvaney, P. Gold Nanorods: Synthesis, Characterization and Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249* (17-18), 1870–1901.

(129) Nikoobakht, B.; El-sayed, M. A. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chem. Mater.* **2003**, *15* (16), 1957–1962.

(130) Johnson, C. J.; Dujardin, E.; Davis, S. a.; Murphy, C. J.; Mann, S. Growth and Form of Gold Nanorods Prepared by Seed-Mediated, Surfactant-Directed Synthesis. *J. Mater. Chem.* **2002**, *12* (6), 1765–1770.

(131) Gai, P. L.; Harmer, M. a. Surface Atomic Defect Structures and Growth of Gold Nanorods. *Nano Lett.* **2002**, *2* (7), 771–774.

(132) Sau, T. K.; Rogach, A. *Complex-Shaped Metal Nanoparticles: Bottom-Up Syntheses and Applications*; Wiley, Ed.; 2012.

(133) Sau, T. K.; Murphy, C. J. Seeded High Yield Synthesis of Short Au Nanorods in Aqueous Solution. *Langmuir* **2004**, *20* (15), 6414–6420.

(134) Smith, D. K.; Miller, N. R.; Korgel, B. a. Iodide in CTAB Prevents Gold Nanorod Formation. *Langmuir* **2009**, *25* (16), 9518–9524.

(135) Grzelczak, M.; Sánchez-Iglesias, A.; Rodríguez-González, B.; Alvarez-Puebla, R.; Pérez-Juste, J.; Liz-Marzán, L. M. Influence of Iodide Ions on the Growth of Gold Nanorods: Tuning Tip Curvature and Surface Plasmon Resonance. *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18* (23), 3780–3786.

(136) Gao, J.; Bender, C. M.; Murphy, C. J.; Carolina, S. Dependence of the Gold Nanorod Aspect Ratio on the Nature of the Directing Surfactant in Aqueous Solution. *Langmuir* **2003**, *19*, 9065–9070.

(137) Canseco Ruiz, V. Transport de Colloïdes En Milieu Poreux: Étude Expérimentale, Université de Bordeaux, 2009.

(138) Elimelech, M.; Gregory, J.; Jia, X.; Williams, R. *Particle Deposition and Aggregation: Measurement, Modelling and Simulation*; Butterworth-Heinemann: Boston, 1995.

(139) Birdi, K. S. *Handbook of Surface and Colloid Chemistry*, 4th editio.; CRC Press, 2015.

(140) Sameut, I. Modélisation Multi-Échelles Du Transport Réactif Des Nanoparticules Dans L'environnement, Université d'Orléans, 2014.

(141) Verwey, J.; Overbeek, J. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids.*; Elsevier, 1948.

(142) Derjaguin, B.; Landau, L. Theory of the Stability of Strongly Charged Lyophobic Sols and of the Adhesion of Strongly Charged Particles in Solution of Electrolytes. *Acta Physicochim* **1941**, *32* (14), 633–662.

(143) Destribats, M. Emulsions Stabilisées Par Des Particules Colloïdales Stimulables : Propriétés Fondamentales et Matériaux, Université de Bordeaux, 2010.

(144) Love, J. C.; Estroff, L. a.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (4), 1103–1169.

(145) Petkova, G. a; Záruba, C. K. C.; Zvátora, P.; Král, V. Gold and Silver Nanoparticles for Biomolecule Immobilization and Enzymatic Catalysis. *Nanoscale Res. Lett.* **2012**, *7* (1), 287.

(146) Ma, Y.; Jiang, L.; Mei, Y.; Song, R.; Tian, D.; Huang, H. Colorimetric Sensing Strategy for mercury(II) and Melamine Utilizing Cysteamine-Modified Gold Nanoparticles. *Analyst* **2013**, *138* (18), 5338–5343.

(147) Kavosi, B.; Salimi, A.; Hallaj, R.; Amani, K. A Highly Sensitive Prostate-Specific Antigen Immunosensor Based on Gold nanoparticles/PAMAM Dendrimer Loaded on MWCNTS/chitosan/ionic Liquid Nanocomposite. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *52*, 20–28.

(148) Niidome, T.; Nakashima, K.; Takahashi, H.; Niidome, Y. Preparation of Primary Amine-Modified Gold Nanoparticles and Their Transfection Ability into Cultivated Cells. *Chem. Commun.* **2004**, 1978–1979.

(149) Sharma, A.; Matharu, Z.; Sumana, G.; Solanki, P. R.; Kim, C. G.; Malhotra, B. D. Antibody Immobilized Cysteamine Functionalized-Gold Nanoparticles for Aflatoxin Detection. *Thin Solid Films* **2010**, *519* (3), 1213–1218.

(150) Bedford, E. E.; Boujday, S.; Humblot, V.; Gu, F. X.; Pradier, C.-M. Effect of SAM Chain Length and Binding Functions on Protein Adsorption: β-Lactoglobulin and Apo-Transferrin on Gold. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2014**, *116*, 489–496.

(151) Nandanan, E.; Jana, N. R.; Ying, J. Y. Functionalization of Gold Nanospheres and Nanorods by Chitosan Oligosaccharide Derivatives. *Adv. Mater.* **2008**, *20* (11), 2068–2073.

(152) Polito, L.; Monti, D.; Caneva, E.; Delnevo, E.; Russo, G.; Prosperi, D. One-Step Bioengineering of Magnetic Nanoparticles via a Surface Diazo Transfer/azide-Alkyne Click Reaction Sequence. *Chem. Commun.* **2008**, 621–623.

(153) Giaume, D.; Poggi, M.; Casanova, D.; Mialon, G.; Lahlil, K.; Alexandrou, A.; Gacoin, T.; Boilot, J. P. Organic Functionalization of Luminescent Oxide Nanoparticles toward Their Application as Biological Probes. *Langmuir* **2008**, *24* (19), 11018–11026.

(154) Flesch, C.; Joubert, M.; Bourgeat-Lami, E.; Mornet, S.; Duguet, E.; Delaite, C.; Dumas, P. Organosilane-Modified Maghemite Nanoparticles and Their Use as Co-Initiator in the Ring-Opening Polymerization of ε-Caprolactone. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2005**, *262* (1-3), 150–157.

(155) Grasset, F.; Saito, N.; Li, D.; Park, D.; Sakaguchi, I.; Ohashi, N.; Haneda, H.; Roisnel, T.; Mornet, S.; Duguet, E. Surface Modification of Zinc Oxide Nanoparticles by Aminopropyltriethoxysilane. *J. Alloys Compd.* **2003**, *360* (1-2), 298–311.

(156) Shrestha, S.; Yeung, C. M. Y.; Mills, C. E.; Lewington, J.; Tsang, S. C. Chemically Immobilized

Single-Stranded Oligonucleotides on Praseodymium Oxide Nanoparticles as an Unlabeled DNA Sensor Probe Using Impedance. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46* (21), 3855–3859.

(157) Kim, Y.-P.; Daniel, W. L.; Xia, Z.; Xie, H.; Mirkin, C. a; Rao, J. Bioluminescent Nanosensors for Protease Detection Based upon Gold Nanoparticle-Luciferase Conjugates. *Chem. Commun. (Camb).* **2010**, *46* (1), 76–78.

(158) Basiruddin, S.; Saha, A.; Pradhan, N.; Jana, N. R. Advances in Coating Chemistry in Deriving Soluble Functional Nanoparticle. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (25), 11009–11017.

(159) Sahoo, B.; Sahu, S. K.; Pramanik, P. A Novel Method for the Immobilization of Urease on Phosphonate Grafted Iron Oxide Nanoparticle. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2011**, *69* (3-4), 95–102.

(160) Bolley, J.; Guenin, E.; Lievre, N.; Lecouvey, M.; Soussan, M.; Lalatonne, Y.; Motte, L. Carbodiimide versus Click Chemistry for Nanoparticle Surface Functionalization: A Comparative Study for the Elaboration of Multimodal Superparamagnetic Nanoparticles Targeting αvβ3 Integrins. *Langmuir* **2013**, *29* (47), 14639–14647.

(161) Uyeda, H. T.; Medintz, I. L.; Jaiswal, J. K.; Simon, S. M.; Mattoussi, H. Synthesis of Compact Multidentate Ligands to Prepare Stable Hydrophilic Quantum Dot Fluorophores. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (11), 3870–3878.

(162) Zhou, Y.; Wang, S.; Zhang, K.; Jiang, X. Visual Detection of copper(II) by Azide- and Alkyne-Functionalized Gold Nanoparticles Using Click Chemistry. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47* (39), 7454–7456.

(163) Gole, A.; Murphy, C. J. Azide-Derivatized Gold Nanorods: Functional Materials For “click” chemistry. *Langmuir* **2008**, *24* (1), 266–272.

(164) Brennan, J. L.; Hatzakis, N. S.; Tshikhudo, T. R.; Dirvianskyte, N.; Razumas, V.; Patkar, S.; Vind, J.; Svendsen, A.; Nolte, R. J. M.; Rowan, A. E.; et al. Bionanoconjugation via Click Chemistry: The Creation of Functional Hybrids of Lipases and Gold Nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17* (6), 1373–1375.

(165) Zhu, J.; Waengler, C.; Lennox, R. B.; Schirrmacher, R. Preparation of Water-Soluble Maleimide-Functionalized 3 Nm Gold Nanoparticles: A New Bioconjugation Template. *Langmuir* **2012**, *28* (13), 5508–5512.

(166) Susumu, K.; Blanco-Canosa, J. B.; Medintz, I. L.; Dawson, P. E.; Mattoussi, H. Preparation of Stable Maleimide-Functionalized Au Nanoparticles and Their Use in Counting Surface Ligands. *Small* **2010**, *6* (12), 1273–1278.

(167) Pan, B.; Gao, F.; Ao, L.; Tian, H.; He, R.; Cui, D. Controlled Self-Assembly of Thiol-Terminated Poly(amidoamine) Dendrimer and Gold Nanoparticles. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2005**, *259*, 89–94.

(168) Zhang, F.; Zhou, Y.; Chen, Y.; Shi, Z.; Tang, Y.; Lu, T. Facile Controlled Preparation of Phosphonic Acid-Functionalized Gold Nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *351* (2), 421–426.

(169) Konkolewicz, D.; Gaillard, S.; West, A. G.; Cheng, Y. Y.; Gray-Weale, A.; Schmidt, T. W.; Nolan, S. P.; Perrier, S. Luminescent Hyperbranched Polymers: Combining Thiol-Yne Chemistry with Gold-Mediated C−H Bond Activation. *Organometallics* **2011**, *30* (6), 1315–1318.

(170) Lin, D.; Liu, H.; Qian, K.; Zhou, X.; Yang, L.; Liu, J. Ultrasensitive Optical Detection of

Trinitrotoluene by Ethylenediamine-Capped Gold Nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *744*, 92–98.

(171) Guénin, E.; Hardouin, J.; Lalatonne, Y.; Motte, L. Bivalent Alkyne-Bisphosphonate as Clickable and Solid Anchor to Elaborate Multifunctional Iron Oxide Nanoparticles with Microwave Enhancement. *J. Nanoparticle Res.* **2012**, *14*, 965–974.

(172) Daniels, M.; Francis, L. Silane Adsorption Behavior, Microstructure, and Properties of Glycidoxypropyltrimethoxysilane-Modified Colloidal Silica Coatings. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *205* (1), 191–200.

(173) Bazzar, M.; Ghaemy, M.; Alizadeh, R. Novel Fluorescent Light-Emitting Polymer Composites Bearing 1,2,4-Triazole and Quinoxaline Moieties: Reinforcement and Thermal Stabilization with Silicon Carbide Nanoparticles by Epoxide Functionalization. *Polym. Degrad. Stab.* **2012**, *97*, 1690–1703.

(174) Fox, M. A.; Whitesell, J. K.; Mckerrow, A. J. Fluorescence and Redox Activity of Probes Anchored through an Aminotrithiol to Polycrystalline Gold. *Langmuirgmuir* **1998**, *14* (11), 816–820.

(175) Wojczykowski, K.; Meissner, D.; Jutzi, P.; Ennen, I.; Hütten, A.; Fricke, M.; Volkmer, D. Reliable Stabilization and Functionalization of Nanoparticles through Tridentate Thiolate Ligands. *Chem. Commun.* **2006**, *35*, 3693–3695.

(176) Garg, N.; Mohanty, A.; Lazarus, N.; Schultz, L.; Rozzi, T. R.; Santhanam, S.; Weiss, L.; Snyder, J. L.; Fedder, G. K.; Jin, R. Robust Gold Nanoparticles Stabilized by Trithiol for Application in Chemiresistive Sensors. *Nanotechnology* **2010**, *21* (40), 405501.

(177) Busson, M. P.; Rolly, B.; Stout, B.; Bonod, N.; Bidault, S. Accelerated Single Photon Emission from Dye Molecule-Driven Nanoantennas Assembled on DNA. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 962.

(178) Busson, M. P.; Rolly, B.; Stout, B.; Bonod, N.; Larquet, E.; Polman, A.; Bidault, S. Optical and Topological Characterization of Gold Nanoparticle Dimers Linked by a Single DNA Double Strand. *Nano Lett.* **2011**, *11* (11), 5060–5065.

(179) Fischler, M.; Sologubenko, A.; Mayer, J.; Clever, G.; Burley, G.; Gierlich, J.; Carell, T.; Simon, U. Chain-like Assembly of Gold Nanoparticles on Artificial DNA Templates via “Click Chemistry”. *Chem. Commun.* **2008**, *2*, 169–171.

(180) Ulman, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.* **1996**, *96* (4), 1533–1554.

(181) Obare, S. O.; Jana, N. R.; Murphy, C. J. Preparation of Polystyrene- and Silica-Coated Gold Nanorods and Their Use as Templates for the Synthesis of Hollow Nanotubes. *Nano Lett.* **2001**, *1* (11), 601–603.

(182) Liz-Marzán, L. M.; Giersig, M.; Mulvaney, P. Synthesis of Nanosized Gold - Silica Core - Shell Particles. *Langmuir* **1996**, *7463* (5), 4329–4335.

(183) Cebrián, V.; Martín-Saavedra, F.; Yagüe, C.; Arruebo, M.; Santamaría, J.; Vilaboa, N. Size-Dependent Transfection Efficiency of PEI-Coated Gold Nanoparticles. *Acta Biomater.* **2011**, *7* (10), 3645–3655.

(184) Kitching, H.; Kenyon, A.; Parkin, I. The Interaction of Gold and Silver Nanoparticles with a Range of Anionic and Cationic Dyes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (13), 6050–6059.

(185) Zong, J.; Yang, X.; Trinchi, A.; Hardin, S.; Cole, I.; Zhu, Y.; Li, C.; Muster, T.; Wei, G. Photoluminescence Enhancement of Carbon Dots by Gold Nanoparticles Conjugated via PAMAM Dendrimers. *Nanoscale* **2013**, *5* (22), 11200–11206.

(186) Kim, J.; Bruening, M. L.; Baker, G. L. Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization on Gold at Ambient Temperature. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7616–7617.

(187) Lermusiaux, L.; Sereda, A.; Portier, B.; Larquet, E.; Bidault, S. Reversible Switching of the Interparticle Distance in DNA-Templated Gold. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *6* (12), 10992–10998.

(188) Wang, Q.; Wang, H.; Lin, C.; Sharma, J.; Zou, S.; Liu, Y. Photonic Interaction between Quantum Dots and Gold Nanoparticles in Discrete Nanostructures through DNA Directed Self-Assembly. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (2), 240–242.

(189) Liz-Marzán, L. M.; Giersigb, M.; Mulvaney, P. Homogeneous Silica Coating of Vitreophobic Colloids. *Chem. Commun.* **1996**, 731–732.

(190) Martini, M.; Perriat, P.; Montagna, M.; Pansu, R.; Julien, C.; Tillement, O.; Roux, S.; Lyon, D.; Cedex, V.; Fisica, D. How Gold Particles Suppress Concentration Quenching of Fluorophores Encapsulated in Silica Beads. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 17669–17677.

(191) Gao, W.; Dickinson, L.; Grozinger, C.; Morin, F. G.; Reven, L. Self-Assembled Monolayers of Alkylphosphonic Acids on Metal Oxides. *Langmuir* **1996**, *12* (26), 6429–6435.

(192) Sahoo, Y.; Pizem, H.; Fried, T.; Golodnitsky, D.; Burstein, L.; Sukenik, C. N.; Markovich, G. Alkyl Phosphonate/phosphate Coating on Magnetite Nanoparticles: A Comparison with Fatty Acids. *Langmuir* **2001**, *17* (25), 7907–7911.

(193) Kreller, D. I.; Gibson, G.; Novak, W.; Van Loon, G. W.; Horton, J. H. Competitive Adsorption of Phosphate and Carboxylate with Natural Organic Matter on Hydrous Iron Oxides as Investigated by Chemical Force Microscopy. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2003**, *212*, 249–264.

(194) Mutin, P. H.; Guerrero, G.; Vioux, A. Hybrid Materials from Organophosphorus Coupling Molecules. *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3761.

(195) Kim, P.; Jones, S. C.; Hotchkiss, P. J.; Haddock, J. N.; Kippelen, B.; Marder, S. R.; Perry, J. W. Phosphonic Acid-Modified Barium Titanate Polymer Nanocomposites with High Permittivity and Dielectric Strength. *Adv. Mater.* **2007**, *19* (7), 1001–1005.

(196) Pązik, R.; Andersson, R.; Kępiński, L.; Nedelec, J.-M.; Kessler, V. G.; Seisenbaeva, G. a. Surface Functionalization of the Metal Oxide Nanoparticles with Biologically Active Molecules Containing Phosphonate Moieties. Case Study of BaTiO 3. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115* (20), 9850–9860.

(197) Zhang, B.; Kong, T.; Xu, W.; Su, R.; Gao, Y.; Cheng, G. Surface Functionalization of Zinc Oxide by Carboxyalkylphosphonic Acid Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **2010**, *26* (6), 4514–4522.

(198) Traina, C. Preparation of Y2O3 Nanoparticles and Transparent Ceramics by Homogeneous Pecipitation Method. *Langmuir* **2007**, *23*, 9158–9161.

(199) Yu, S.; Chow, G. M. Carboxyl Group (CO2H) Functionalized Ferrimagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Potential Bio-Applications. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14* (18), 2781.

(200) Dugas, V.; Demesma, C.; Chevolot, Y.; Souteyrand, E. Use of Organosilanes in Biosensors. *Use of Organosilanes in Biosensors*. Nova Science Publisher: New York 2010.

(201) Petrie, E. Silanes as Primers and Adhesion Promoters for Metal Substrates. *Met. Finish.* **2007**, 185–193.

(202) Marcinko, S.; Fadeev, A. Y. Hydrolytic Stability of Organic Monolayers Supported on. *Langmuir* **2004**, *20*, 2270–2273.

(203) Silverman, B. M.; Wieghaus, K. a; Schwartz, J. Comparative Properties of Siloxane vs Phosphonate Monolayers on a Key Titanium Alloy. *Langmuir* **2005**, *21* (1), 225–228.

(204) Lork, K.; Unger, K.; Kinkel, J. Role of the Functional Group in N-Octydimethylsilanes in the Synthesis of C8 Reversed-Phase Silica Packings for High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1986**, *352*, 199–211.

(205) Halliwell, C. M.; Cass, A. E. G. A Factorial Analysis of Silanization Conditions for the Immobilization of Oligonucleotides on Glass Surfaces. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (11), 2476–2483.

(206) Fadeev, A. Y.; McCarthy, T. J. Self-Assembly Is Not the Only Reaction Possible between Alkyltrichlorosilanes and Surfaces: Monomolecular and Oligomeric Covalently Attached Layers of Dichloro- and Trichloroalkylsilanes on Silicon. *Langmuir* **2000**, *16* (18), 7268–7274.

(207) Tripp, C. P.; Hair, M. L. Reaction of Methylsilanols with Hydrated Silica Surfaces: The Hydrolysis of Trichloro-, Dichloro-, and Monochloromethylsilanes and the Effects of Curing. *Langmuir* **1995**, *11* (1), 149–155.

(208) Kinkel, J. N.; Unger, K. K. Role of Solvent and Base in the Silanization Reaction of Silicas for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1984**, *316*, 193–200.

(209) Buzek, F.; Rathousky, J. Stoichiometry and Kinetics of the Reaction of Silica with Organosilicon Compounds. *J. Colloid Interface Sci.* **1981**, *79* (1), 47–55.

(210) Tripp, C. P.; Hair, M. L. Chemical Attachment of Chlorosilanes to Silica: A Two-Step Amine-Promoted Reaction. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97* (21), 5693–5698.

(211) Philipse, A. P.; Nechifor, A.-M.; Patmamanoharan, C. Isotropic and Birefringent Dispersions of Surface Modified Silica Rods with a Boehmite-Needle Core. *Langmuir* **1994**, *10* (12), 4451–4458.

(212) Truong, L. T.; Larsen, Å.; Holme, B.; Diplas, S.; Hansen, F. K.; Roots, J.; Jørgensen, S. Dispersibility of Silane-Functionalized Alumina Nanoparticles in Syndiotactic Polypropylene. *Surf. Interface Anal.* **2010**, *42* (6-7), 1046–1049.

(213) Prado, L. a S. a; Sriyai, M.; Ghislandi, M.; Barros-Timmons, A.; Schulte, K. Surface Modification of Alumina Nanoparticles with Silane Coupling Agents. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21* (12), 2238–2245.

(214) Philipse, A. P.; Bruggen, M. P. B. Van; Pathmamanoharan, C. Magnetic Silica Dispersions: Preparation and Stability of Surface-Modified Silica Particles with a Magnetic Core. *Langmuir* **1994**, *17*, 92–99.

(215) Tang E; Tian B. Preparation of Zinc Oxide Nanoparticle via Uniform Precipitation Method and Its Surface Modification by Methacryloxypropyltimethoxysilane. *Chem Eng Comm* **2008**, *195*,

479.

(216) Tedja, R.; Soeriyadi, A. H.; Whittaker, M. R.; Lim, M.; Marquis, C.; Boyer, C.; Davis, T. P.; Amal, R. Effect of TiO2 Nanoparticle Surface Functionalization on Protein Adsorption, Cellular Uptake and Cytotoxicity: The Attachment of PEG Comb Polymers Using Catalytic Chain Transfer and Thiol–ene Chemistry. *Polym. Chem.* **2012**, *3* (10), 2743.

(217) Westcott, S. L.; Oldenburg, S. J.; Lee, T. R.; Halas, N. J. Formation and Adsorption of Clusters of Gold Nanoparticles onto Functionalized Silica Nanoparticle Surfaces. *Langmuir* **1998**, *14*, 5396–5401.

(218) Douce, J.; Boilot, J.-P.; Biteau, J.; Scodellaro, L.; Jimenez, A. Effect of Filler Size and Surface Condition of Nano-Sized Silica Particles in Polysiloxane Coatings. *Thin Solid Films* **2004**, *466* (1-2), 114–122.

(219) Csogor; Nacken, M.; Sameti, M.; Lehr, C.-M.; Schmidt, H. Modified Silica Particles for Gene Delivery. *Mater. Sci. Eng. C* **2003**, *23*, 93–97.

(220) Diao, J.; Ren, D.; Engstrom, J. R.; Lee, K. H. A Surface Modification Strategy on Silicon Nitride for Developing Biosensors. *Anal. Biochem.* **2005**, *343* (2), 322–328.

(221) Petoral, R. M.; Yazdi, G. R.; Lloyd Spetz, a.; Yakimova, R.; Uvdal, K. Organosilane-Functionalized Wide Band Gap Semiconductor Surfaces. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *90* (22), 2005–2008.

(222) Oliveros, A.; Frewin, C. L.; Schoell, S. J.; Hoeb, M.; Stutzmann, M.; Sharp, I. D.; Saddow, S. E. Assessment of Cell Proliferation on 6H–SiC Biofunctionalized with Self-Assembled Monolayers. *J. Mater. Res.* **2012**, *28* (1), 1.

(223) Williams, E. H.; Davydov, A. V.; Motayed, A.; Sundaresan, S. G.; Bocchini, P.; Richter, L. J.; Stan, G.; Steffens, K.; Zangmeister, R.; Schreifels, J. a.; et al. Immobilization of Streptavidin on 4H-SiC for Biosensor Development. *Appl. Surf. Sci.* **2012**, *258* (16), 6056–6063.

(224) Erogbogbo, F.; Tien, C.-A.; Chang, C.-W.; Yong, K.-T.; Law, W.-C.; Ding, H.; Roy, I.; Swihart, M. T.; Prasad, P. N. Bioconjugation of Luminescent Silicon Quantum Dots for Selective Uptake by Cancer Cells. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (6), 1081–1088.

(225) Rosso-Vasic, M.; Spruijt, E.; van Lagen, B.; De Cola, L.; Zuilhof, H. Alkyl-Functionalized Oxide-Free Silicon Nanoparticles: Synthesis and Optical Properties. *Small* **2008**, *4* (10), 1835–1841.

(226) Iijima, M.; Kamiya, H. Surface Modification of Silicon Carbide Nanoparticles by Azo Radical Initiators. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 11786.

(227) Na Sun, Xiangjun Meng, Z. X. Functionalized Si3N4 Nanoparticles Modified with Hydrophobic Polymer Chains by Surface-Initated Atrom Transfer Radical Polymerization (ATRP). *Ceram. Int.* **2015**, *41* (10), 13830–13835.

(228) Kassiba, A.; Bednarski, W.; Pud, A.; Errien, N.; Laskowski, L.; Tabellout, M.; Kodjikian, S.; Fatyeyeva, K.; Ogurtsov, N.; Noskov, Y. Hybrid Core - Shell Nanocomposites Based on Silicon Carbide Nanoparticles Functionalized by Conducting Polyaniline : Electron Paramagnetic Resonance Investigations. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 11544.

(229) Mavinakuli, P.; Wei, S.; Wang, Q.; Karki, A. B.; Dhage, S.; Wang, Z.; Young, D. P.; Guo, Z. Polypyrrole/Silicon Carbide Nanocomposites with Tunable Electrical Conductivity. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (9), 3874.

(230) Lu, M.; Zhang, W.; Gai, Y.; Yang, T.; Ye, P.; Yang, G.; Ma, X.; Xiang, G. Folate–PEG Functionalized Silica CdTe Quantum Dots as Fluorescent Probes for Cancer Cell Imaging. *New J Chem* **2014**, *38*, 4519–4526.

(231) Lee, R. J.; Philip, S. Delivery of Liposomes into Cultured KB Cells via Folate Receptor-Mediated Endocytosis. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (5), 3198–3204.

(232) Briand, E.; Salmain, M.; Compère, C.; Pradier, C. M. Immobilization of Protein A on SAMs for the Elaboration of Immunosensors. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2006**, *53* (2), 215–224.

(233) Bharali, D. J.; Lucey, D. W.; Jayakumar, H.; Pudavar, H. E. Folate Receptor Mediated Delivery of InP Quantum Dots for Bioimaging Using Confocal and Two-Photon Microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (15), 1–5.

(234) Hoebeke, J.; Stella, B.; Arpicco, S.; Peracchia, M. T.; Desmae, D.; Renoir, M.; Angelo, J. D.; Cattel, L.; Couvreur, P. Design of Folic Acid-Conjugated Nanoparticles for Drug Targeting. *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89* (11), 1452–1464.

(235) Mackiewicz, N.; Nicolas, J.; Handke, N.; Noiray, M.; Mougin, J.; Daveu, C.; Lakkireddy, H. R.; Bazile, D.; Couvreur, P. Precise Engineering of Multifunctional PEGylated Polyester Nanoparticles for Cancer Cell Targeting and Imaging. *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 1834–1847.

(236) Le Gourriérec, L.; Di Giorgio, C.; Greiner, J.; Vierling, P. An Efficient Mixed Solid-Liquid Phase Synthesis of a Heterobifunctional Amphiphilic PEG-NH2 Derivative and Its Conjugation to Folic Acid. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 2233–2240.

(237) Zhang, J.; Rana, S.; Srivastava, R. S.; Misra, R. D. K. On the Chemical Synthesis and Drug Delivery Response of Folate Receptor-Activated, Polyethylene Glycol-Functionalized Magnetite Nanoparticles. *Acta Biomater.* **2008**, *4* (1), 40–48.

(238) Turek, J. J.; Leamon, C. P.; Low, P. S. Endocytosis of Folate-Protein Conjugates : Ultrastructural Localization in KB Cells. **1993**, *430*, 423–430.

(239) Palazon, F.; Montenegro Benavides, C.; Léonard, D.; Souteyrand, E.; Chevolot, Y.; Cloarec, J.-P. Carbodiimide/NHS Derivatization of COOH-Terminated SAMs: Activation or Byproduct Formation? *Langmuir* **2014**, *30* (16), 4545–4550.

(240) Sam, S.; Touahir, L.; Salvador Andresa, J.; Allongue, P.; Chazalviel, J. N.; Gouget-Laemmel, a. C.; De Villeneuve, C. H.; Moraillon, a.; Ozanam, F.; Gabouze, N.; et al. Semiquantitative Study of the EDC/NHS Activation of Acid Terminal Groups at Modified Porous Silicon Surfaces. *Langmuir* **2010**, *26* (2), 809–814.

(241) Wang, C.; Yan, Q.; Liu, H. B.; Zhou, X. H.; Xiao, S. J. Different EDC/NHS Activation Mechanisms between PAA and PMAA Brushes and the Following Amidation Reactions. *Langmuir* **2011**, *27* (19), 12058–12068.

(242) Touahir, L.; Chazalviel, J. N.; Sam, S.; Moraillon, a.; Henry De Villeneuve, C.; Allongue, P.; Ozanam, F.; Gouget-Laemmel, a. C. Kinetics of Activation of Carboxyls to Succinimidyl Ester Groups in Monolayers Grafted on Silicon: An in Situ Real-Time Infrared Spectroscopy Study. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115* (14), 6782–6787.

(243) Kim, M. Il; Ham, H. O.; Oh, S. D.; Park, H. G.; Chang, H. N.; Choi, S. H. Immobilization of Mucor Javanicus Lipase on Effectively Functionalized Silica Nanoparticles. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2006**, *39* (1-4), 62–68.

(244) Zhu, Y.; Fang, Y.; Borchardt, L.; Kaskel, S. PEGylated Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles as Potential Drug Delivery Vehicles. *Microporous Mesoporous Mater.* **2011**, *141*, 199–206.

(245) Banks, P. R.; Paquette, D. M. Comparison of Three Common Amine Reactive Fluorescent Probes Used for Conjugation to Biomolecules by Capillary Zone Electrophoresis. *Bioconjug. Chem.* **1995**, *6* (4), 447–458.

(246) Nisonoff, a; Wissler, F. C. Separation Antibody of Univalent Molecule by Fragments Reduction from the Bivalent Rabbit of Disulfide Bonds. *Arch. Biochem. Biophys.* **1960**, No. 89, 230–244.

(247) Sapsford, K. E.; Algar, W. R.; Berti, L.; Gemmill, K. B.; Casey, B. J.; Oh, E.; Stewart, M. H.; Medintz, I. L. Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries That Facilitate Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (3), 1904–2074.

(248) Shi, M.; Ho, K.; Keating, A.; Shoichet, M. S. Doxorubicin-Conjugated Immuno-Nanoparticles for Intracellular Anticancer Drug Delivery. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19* (11), 1689–1696.

(249) van der Vlies, A. J.; O'Neil, C. P.; Hasegawa, U.; Hammond, N.; Hubbell, J. a. Synthesis of Pyridyl Disulfide-Functionalized Nanoparticles for Conjugating Thiol-Containing Small Molecules, Peptides, and Proteins. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21* (4), 653–662.

(250) Vázquez-Dorbatt, V.; Tolstyka, Z. P.; Chang, C.-W.; Maynard, H. D. Synthesis of a Pyridyl Disulfide End-Functionalized Glycopolymer for Conjugation to Biomolecules and Patterning on Gold Surfaces. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (8), 2207–2212.

(251) Nair, D. P.; Podgórski, M.; Chatani, S.; Gong, T.; Xi, W.; Fenoli, C. R.; Bowman, C. N. The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry. *Chem. Mater.* **2014**, *26* (1), 724–744.

(252) Nieves, D. J.; Azmi, N. S.; Xu, R.; Lévy, R.; Yates, E. a.; Fernig, D. G. Monovalent Maleimide Functionalization of Gold Nanoparticles via Copper-Free Click Chemistry. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 13157–13160.

(253) Demay-Drouhard, P.; Nehlig, E.; Hardouin, J.; Motte, L.; Guénin, E. Nanoparticles under the Light: Click Functionalization by Photochemical Thiol-Yne Reaction, towards Double Click Functionalization. *Chem. - A Eur. J.* **2013**, *19* (26), 8388–8392.

(254) Agard, N. J.; Prescher, J. a; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047.

(255) Lutz, J. F. Copper-Free Azide-Alkyne Cycloadditions: New Insights and Perspectives. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47* (12), 2182–2184.

(256) Soellner, M. B.; Nilsson, B. L.; Raines, R. T. Staudinger Ligation of R -Azido Acids Retains Stereochemistry. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (8), 4993–4996.

(257) Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. Staudinger Ligation: A Peptide from a Thioester and Azide. *Org. Lett.* **2000**, *2* (13), 1939–1941.

(258) Köhn, M.; Breinbauer, R. The Staudinger Ligation—A Gift to Chemical Biology. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2004**, *43* (24), 3106–3116.

(259) Zhang, H.; Ma, Y.; Sun, X.-L. Chemically-Selective Surface Glyco-Functionalization of Liposomes through Staudinger Ligation. *Chem. Commun.* **2009**, 3032–3034.

(260) Liu, X.; Zhu, M.; Chen, S.; Yuan, M.; Guo, Y.; Song, Y.; Liu, H.; Li, Y. Organic-Inorganic Nanohybrids via Directly Grafting Gold Nanoparticles onto Conjugated Copolymers through the Diels-Alder Reaction. *Langmuir* **2008**, *24* (20), 11967–11974.

(261) Shi, M.; Ho, K.; Keating, A.; Shoichet, M. S. Doxorubicin-Conjugated Immuno-Nanoparticles for Intracellular Anticancer Drug Delivery. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19* (11), 1689–1696.

(262) Liu, N.; Prall, B. S.; Klimov, V. I. Hybrid Gold/silica/nanocrystal-Quantum-Dot Superstructures: Synthesis and Analysis of Semiconductor-Metal Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (48), 15362–15363.

(263) Zong, S.; Wang, Z.; Yang, J.; Wang, C.; Xu, S.; Cui, Y. A SERS and Fluorescence Dual Mode Cancer Cell Targeting Probe Based on Silica Coated Au@Ag Core-Shell Nanorods. *Talanta* **2012**, *97*, 368–375.

(264) Li, C.; Zhu, Y.; Zhang, X.; Yang, X.; Li, C. Metal-Enhanced Fluorescence of Carbon Dots Adsorbed Ag@SiO2 Core-Shell Nanoparticles. *RSC Adv.* **2012**, *2* (5), 1765–1768.

(265) Bidault, S.; Abajo, D.; Polman, A. Plasmon-Based Nanolenses Assembled on a Well-Defined DNA Template. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (9), 2750–2751.

(266) Taylor, R. W.; Lee, T.-C.; Scherman, O. a; Esteban, R.; Aizpurua, J.; Huang, F. M.; Baumberg, J. J.; Mahajan, S. Precise Subnanometer Plasmonic Junctions for SERS within Gold Nanoparticle Assemblies Using Cucurbit[n]uril “glue”. *ACS Nano* **2011**, *5* (5), 3878–3887.

(267) Nam, J. M.; Stoeva, S. I.; Mirkin, C. A. Bio-Bar-Code-Based DNA Detection with PCR-like Sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (19), 5932–5933.

(268) Nam, J.; Park, S.; Mirkin, C. A. Bio-Barcodes Based on Oligonucleotide-Modified Nanoparticles. **2002**, 3820–3821.

(269) Thaxton, C. S.; Mirkin, C. A.; Nam, J. Nanoparticle-Based Bio – Bar Codes for the Ultrasensitive Detection of Proteins. *Science (80-.).* **2003**, *301*, 1884–1886.

(270) Figueroa, E. R.; Lin, A. Y.; Yan, J.; Luo, L.; Foster, A. E.; Drezek, R. a. Optimization of PAMAM-Gold Nanoparticle Conjugation for Gene Therapy. *Biomaterials* **2014**, *35* (5), 1725–1734.

(271) Perreault, F.; Melegari, S. P.; Fuzinatto, C. F.; Bogdan, N.; Morin, M.; Popovic, R.; Matias, W. G. Toxicity of Pamam-Coated Gold Nanoparticles in Different Unicellular Models. *Environ. Toxicol.* **2012**, 1–9.

(272) Gole, A.; Murphy, C. J.; Carolina, S. Biotin - Streptavidin-Induced Aggregation of Gold Nanorods : Tuning Rod - Rod Orientation. *Langmuir* **2005**, *21*, 10756–10762.

(273) Li, M.; Wong, K. K. W.; Mann, S. Organization of Inorganic Nanoparticles Using Biotin-Streptavidin Connectors The Synthesis and Assembly of New Forms of Inorganic Matter Organized at the Nanometer and Mesoscopic Length Scales Is Currently Receiving Much Attention . Such Materials Are Not. *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 23–26.

(274) Niemeyer, C. M. Nanoparticles, Proteins, and Nucleic Acids: Biotechnology Meets Materials Science. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128 ± 4158.

(275) Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puntes, V. SI Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 Nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. Si. *Langmuir* **2011**, *27*, 11098–11105.

(276) Chithrani, B. D.; Ghazani, A. a.; Chan, W. C. W. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Lett.* **2006**, *6* (4), 662–668.

(277) Chithrani, B. D.; Chan, W. C. W. Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes. *Nano Lett.* **2007**, *7* (6), 1542–1550.

(278) Sharma, V.; Park, K.; Srinivasarao, M. Shape Separation of Gold Nanorods Using Centrifugation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (13), 4981–4985.

(279) Khanal, B. P.; Zubarev, E. R. Purification of High Aspect Ratio Gold Nanorods: Complete Removal of Platelets Bishnu P. Khanal and Eugene R. Zubarev*. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *130* (38), 1–7.

(280) Jana, N. R.; Rammohun, R.; Mahavidyalaya, R. Nanorod Shape Separation Using Surfactant Assisted Self-Assembly † Polydisperse Samples Using Surfactant-Assisted Nanorod Self-. **2003**, 1950–1951.

(281) Wei, G. T.; Liu, F. K.; Wang, C. R. Shape Separation of Nanometer Gold Particles by Size-Exclusion Chromatography. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (11), 2085–2091.

(282) Dogic, Z.; Philipse, A. P.; Fraden, S.; Dhont, J. K. G. Concentration-Dependent Sedimentation of Colloidal Rods. *J. Chem. Phys.* **2000**, *113* (18), 8368–8380.

(283) Peterson, J. Hydrodynamic Alignment of Rodlike Macromolecules during Ultra Centrifugation. *J. Chem. Phys.* **1964**, *40*, 2680–2686.

(284) Iwanowski, R.; Fronc, K.; Paszkowicz, W.; Heinonen, M. XPS and XRD Study of Crystalline 3C-SiC Grown by Sublimation Method. *J. Alloys Compd.* **1999**, *286*, 143–147.

(285) Alekseev, S. A.; Zaitsev, V. N.; Kie, V.; Botsoa, J.; Barbier, D.; Umr-, C.; Lyon, I. De; Capelle, J.; Blaise, B.; Cedex, V.; et al. Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Temperature-Programmed Desorption Mass Spectrometry Study of Surface Chemistry of Porous 6H-SiC. **2007**, *255* (14), 2189–2194.

(286) Liu, X.; Hou, L.; Wang, H. Investigations into the Mid-Infrared Christiansen Effect of the Dispersive Materials. *Infrared Phys. Technol.* **2002**, *43* (6), 401–405.

(287) Mac Millan, M. F.; Devaty, R. P.; Choyke, W. J.; Goldstein, D. R.; Spanier, J. E.; Kurtz, a D. Infrared Reflectance of Porous SiC Layers. *Inst. Phys. Conf. Ser.* **1996**, *142* (Chap 7), 1075–1078.

(288) Spanier, J. E.; Herman, I. P. Infrared Reflection Spectroscopy Of As-Anodized And Passivated 6H And 4H Porous Silicon Carbide. *MRS Proc.* **1997**, *486*, 139–142.

(289) Spanier, J.; Herman, I. Use of Hybrid Phenomenological and Statistical Effective-Medium Theories of Dielectric Functions to Model the Infrared Reflectance of Porous SiC Films. *Phys. Rev. B* **2000**, *61* (15), 10437–10450.

(290) Vörös, M.; Deak, P.; Frauenheim, T.; Gali, A. The Absorption of Oxygenated Silicon Carbide Nanoparticles. *J. Chem. Phys.* **2010**, *133* (6), 1–6.

(291) Vansant, E. F.; Voort, P. Van Der; Vrancken, K. C. Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface. In *Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface Volume 93*; 1995; p 573.

(292) Wang, G.; Selbach, S. M.; Yu, Y.; Zhang, X.; Grande, T.; Einarsrud, M.-A. Hydrothermal Synthesis and Characterization of KNbO3 Nanorods. *CrystEngComm* **2009**, *11* (9), 1958.

(293) Magouroux, T. Harmonic Nanoparticles for Biolabelling, Université de Genève, 2014.

(294) Roy, S.; Dixit, C. K.; Woolley, R.; MacCraith, B. D.; Okennedy, R.; McDonagh, C. Novel Multiparametric Approach to Elucidate the Surface Amine-Silanization Reaction Profile on Fluorescent Silica Nanoparticles. *Langmuir* **2010**, *26* (23), 18125–18134.

(295) Coussot, G.; Nicol, E.; Commeyras, A.; Desvignes, I.; Pascal, R.; Vandenabeele-Trambouze, O. Colorimetric Quantification of Amino Groups in Linear and Dendritic Structures. *Polym. Int.* **2009**, *58* (5), 511.

(296) Bravo-Osuna, I.; Teutonico, D.; Arpicco, S.; Vauthier, C.; Ponchel, G. Characterization of Chitosan Thiolation and Application to Thiol Quantification onto Nanoparticle Surface. *Int. J. Pharm.* **2007**, *340*, 173–181.

(297) Parker, N.; Turk, M. J.; Westrick, E.; Lewis, J. D.; Low, P. S.; Leamon, C. P. Folate Receptor Expression in Carcinomas and Normal Tissues Determined by a Quantitative Radioligand Binding Assay. *Anal. Biochem.* **2005**, *338* (2), 284–293.

(298) Leamon, C. P.; Cooper, S. R.; Hardee, G. E. Folate-Liposome-Mediated Antisense Oligodeoxynucleotide Targeting to Cancer Cells: Evaluation in Vitro and in Vivo. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14* (4), 738–747.

(299) de Oliveira, L. F.; Bouchmella, K.; Gonçalves, K. de A.; Bettini, J.; Kobarg, J.; Cardoso, M. B. Functionalized Silica Nanoparticles As an Alternative Platform for Targeted Drug-Delivery of Water Insoluble Drugs. *Langmuir* **2016**, *32*, 3217–3225.

(300) Yoo, M.-K.; Park, I.-K.; Lim, H.-T.; Lee, S.-J.; Jiang, H.-L.; Kim, Y.-K.; Choi, Y.-J.; Cho, M.-H.; Cho, C.-S. Folate-PEG-Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Lung Cancer Imaging. *Acta Biomater.* **2012**, *8* (8), 3005–3013.

(301) Dixit, V.; Bossche, J. Van Den; Sherman, D. M.; Thompson, D. H.; Andres, R. P. Synthesis and Grafting of Thioctic Acid - PEG - Folate Conjugates onto Au Nanoparticles for Selective Targeting of Folate Receptor-Positive Tumor Cells. *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 603–609.

(302) Chen, T. J.; Cheng, T. H.; Hung, Y. C.; Lin, K. T.; Liu, G. C.; Wang, Y. M. Targeted Folic Acid-PEG Nanoparticles for Noninvasive Imaging of Folate Receptor by MRI. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2008**, *87* (1), 165–175.

(303) Palazon, F.; Géhin, T.; Ferrah, D.; Garnier, A.; Botella, C.; Grenet, G.; Souteyrand, E.; Cloarec, J. P.; Chevolot, Y. X-Ray-Induced Degradation of OEG-Terminated SAMs on Silica Surfaces during XPS Characterization. *Surf. Interface Anal.* **2015**, *47* (6), 719–722.

(304) Luck, S.; Foerch, R.; Sales, K. D.; Urch, D. S. Photoelectron and X-Ray Emission (PAX) Spectroscopy and Electronic Structure. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1989**, *85* (12), 4129–4137.

(305) Sahu, S.; Rani Sahoo, P.; Patel, S.; Mishra, B. K. Oxidation of Thiourea and Substituted Thioureas: A Review. *J. Sulfur Chem.* **2011**, *32* (2), 171–197.

(306) Rao, C.; Venkataraghavan, R. The C=S Stretching Irequency and the "-N-C=S Bands" in the Infrared. *Spectrochim. Acta* **1962**, *18*, 541–547.

(307) Gu, F.; Zhang, L.; Teply, B. a; Mann, N.; Wang, A.; Radovic-Moreno, A. F.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. Precise Engineering of Targeted Nanoparticles by Using Self-Assembled Biointegrated Block Copolymers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (7), 2586–2591.

(308) Wang, T.; Halaney, D.; Ho, D.; Feldman, M. D.; Milner, T. E. Two-Photon Luminescence Properties of Gold Nanorods. *Biomed. Opt. Express* **2013**, *4* (4), 584–595.

(309) Joulaud, C.; Mugnier, Y.; Djanta, G.; Dubled, M.; Marty, J.-C.; Galez, C.; Wolf, J.-P.; Bonacina, L.; Le Dantec, R. Characterization of the Nonlinear Optical Properties of Nanocrystals by Hyper Rayleigh Scattering. *J. Nanobiotechnology* **2013**, *11*, 1–9.

(310) Hillaireau, H.; Couvreur, P. Nanocarriers' Entry into the Cell: Relevance to Drug Delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66* (17), 2873–2896.

(311) Singh, M. R. Enhancement of the Second-Harmonic Generation in a Quantum Dot-Metallic Nanoparticle Hybrid System. *Nanotechnology* **2013**, *24* (12), 125701.

(312) Zhang, T.; Lu, G.; Shen, H.; Perriat, P.; Martini, M.; Tillement, O.; Gong, Q. Plasmonic-Enhanced Two-Photon Fluorescence with Single Gold Nanoshell. *Sci. China Physics, Mech. Astron.* **2014**, *57* (6), 1038–1045.

(313) Habteyes, T. G. Direct Near-Field Observation of Orientation Dependent Optical Response of Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (17), 9119–9127.

(314) Brullot, W.; Valev, V. K.; Verbiest, T. Magnetic-Plasmonic Nanoparticles for the Life Sciences: Calculated Optical Properties of Hybrid Structures. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2012**, *8* (5), 559–568.

(315) Zhang, J.; Rana, S.; Srivastava, R. S.; Misra, R. D. K. On the Chemical Synthesis and Drug Delivery Response of Folate Receptor-Activated, Polyethylene Glycol-Functionalized Magnetite Nanoparticles. *Acta Biomater.* **2008**, *4*, 40–48.

(316) Goren, D.; Horowitz, A. T.; Tzemach, D.; Tarshish, M.; Zalipsky, S.; Gabizon, A. Nuclear Delivery of Doxorubicin via Folate-Targeted Liposomes with Bypass of Multidrug-Resistance Efflux Pump Nuclear Delivery of Doxorubicin via Folate-Targeted Liposomes with Bypass of Multidrug-Resistance Efflux Pump 1. *Clin. Cancer Res. 1949* **2000**, *6*, 1949–1957.

(317) Geszke, M.; Murias, M.; Balan, L.; Medjahdi, G.; Korczynski, J.; Moritz, M.; Lulek, J.; Schneider, R. Folic Acid-Conjugated Core/shell ZnS:Mn/ZnS Quantum Dots as Targeted Probes for Two Photon Fluorescence Imaging of Cancer Cells. *Acta Biomater.* **2011**, *7* (3), 1327–1338.

(318) Guo, Y.-J.; Sun, G.-M.; Zhang, L.; Tang, Y.-J.; Luo, J.-J.; Yang, P.-H. Multifunctional Optical Probe Based on Gold Nanorods for Detection and Identification of Cancer Cells. *Sensors Actuators B Chem.* **2014**, *191*, 741–749.

(319) Yoo, M.-K.; Park, I.-K.; Lim, H.-T.; Lee, S.-J.; Jiang, H.-L.; Kim, Y.-K.; Choi, Y.-J.; Cho, M.-H.; Cho, C.-S. Folate–PEG–superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Lung Cancer Imaging. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 3005–3013.

(320) Ding, C.; Tian, Y. Gold Nanocluster-Based Fluorescence Biosensor for Targeted Imaging in Cancer Cells and Ratiometric Determination of Intracellular pH. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *65*, 183–190.

(321) Tsai, S. W.; Liaw, J. W.; Hsu, F. Y.; Chen, Y. Y.; Lyu, M. J.; Yeh, M. H. Surface-Modified Gold Nanoparticles with Folic Acid as Optical Probes for Cellular Imaging. *Sensors* **2008**, *8*, 6660–

6673.

(322) Ding, C.; Tian, Y. Gold Nanocluster-Based Fluorescence Biosensor for Targeted Imaging in Cancer Cells and Ratiometric Determination of Intracellular pH. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *65*, 183–190.

(323) Zhao, R.; Hanscom, M.; Goldman, I. D. The Relationship between Folate Transport Activity at Low pH and Reduced Folate Carrier Function in Human Huh7 Hepatoma Cells. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2005**, *1715* (1), 57–64.

(324) Guo, D. D.; Wu, C. H.; Li, J. Y.; Guo, A. R.; Li, Q. N.; Jiang, H.; Chen, B. A.; Wang, X. M. Synergistic Effect of Functionalized Nickel Nanoparticles and Quercetin on Inhibition of the SMMC-7721 Cells Proliferation. *Nanoscale Res. Lett.* **2009**, *4* (12), 1395–1402.

(325) Xing, J.; Zhu, L.; Jackson, J.; Gabos, S.; Wang, X.; Xu, X. Dynamic Monitoring of Cytotoxicity on Microelectronic Sensors. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18* (2), 154–161.

(326) Otero-González, L.; Sierra-Alvarez, R.; Boitano, S.; Field, J. a. Application and Validation of an Impedance-Based Real Time Cell Analyzer to Measure the Toxicity of Nanoparticles Impacting Human Bronchial Epithelial Cells. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (18), 10271–10278.

(327) Barillet, S.; Jugan, M. L.; Laye, M.; Leconte, Y.; Herlin-Boime, N.; Reynaud, C.; Carrière, M. In Vitro Evaluation of SiC Nanoparticles Impact on A549 Pulmonary Cells: Cyto-, Genotoxicity and Oxidative Stress. *Toxicol. Lett.* **2010**, *198* (3), 324–330.

(328) Pourchez, J.; Boudard, D.; Forest, V.; Boumahdi, N.; Tomatis, M.; Fubini, B.; Guilhot, B.; Cottier, M.; Grosseau, P. In Vitro Cellular Responses to Silicon Carbide Particles Manufactured through the Acheson Process: Impact of Physico-Chemical Features on pro-Inflammatory and pro-Oxidative Effects. *J. Nanopart. Res.* **2014**, *14*, 1143.

(329) Botsoa, J. Synthèse de Nanostructures de Carbure de Silicium et Étude de Leurs Propriétés Optiques, Université de Lyon, 2008.

(330) Alkilany, A. M.; Nagaria, P. K.; Hexel, C. R.; Shaw, T. J.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D. Cellular Uptake and Cytotoxicity of Gold Nanorods: Molecular Origin of Cytotoxicity and Surface Effects. *Small* **2009**, *5* (6), 701–708.

(331) Goodman, C. M.; McCusker, C. D.; Yilmaz, T.; Rotello, V. M. Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15* (4), 897–900.

(332) Huang, X.; Neretina, S.; El-Sayed, M. A. Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications. *Adv. Mater.* **2009**, *21* (48), 4880–4910.

(333) El-Sayed, I. H.; Huang, X.; El-Sayed, M. a. Selective Laser Photo-Thermal Therapy of Epithelial Carcinoma Using Anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanoparticles. *Cancer Lett.* **2006**, *239* (1), 129–135.

(334) Stone, V.; Johnston, H.; Schins, R. P. F. Development of in Vitro Systems for Nanotoxicology: Methodological Considerations. *Crit. Rev. Toxicol.* **2009**, *39* (7), 613–626.

(335) Kurtz-chalot, A. Internalisation Cellulaire et Effets Biologiques de Nanoparticules Fluorescentes de Silice . Influence de La Taille et de La Charge de Surface, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint Etienne, 2014.

(336) Love, S. a.; Maurer-Jones, M. a.; Thompson, J. W.; Lin, Y.-S.; Haynes, C. L. Assessing

Nanoparticle Toxicity. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2012**, *5* (1), 181–205.

(337) Damoiseaux, R.; George, S.; Li, M.; Pokhrel, S.; Ji, Z.; France, B.; Xia, T.; Suarez, E.; Rallo, R.; Madler, L.; et al. No Time to Lose-High Throughput Screening to Assess Nanomaterial Safety. *Nanoscale* **2011**, *3* (4), 1345–1360.

(338) Asharani, P.; Low Kah Mun G, Hande, M.; Valiyaveettil, S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *ACS Nano* **2009**, *3*, 279–290.

(339) Muller, K.; Skepper, J.; Posfai, M.; Trivedi, R.; S, H. Effect of Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (Ferumoxtran-10) on Human Monocyte–macrophages in Vitro. *Biomaterials* **2007**, *28*, 1629–1642.

(340) Marquis, B.; Liu, Z.; Braun, K.; Haynes, C. Investigation of Noble Metal Nanoparticle !-Potential Effects on Single-Cell Exocytosis Function in Vitro with Carbon-Fiber Microelectrode Amperometry. *Analyst* **2011**, *136*, 3478–3486.

(341) Li, Y.; Chen, D. H.; Yan, J.; Chen, Y.; Mittelstaedt, R. A.; Zhang, Y.; Biris, A. S.; Heflich, R. H.; Chen, T. Genotoxicity of Silver Nanoparticles Evaluated Using the Ames Test and in Vitro Micronucleus Assay. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2012**, *745* (1-2), 4–10.

(342) Kim, H. R.; Park, Y. J.; Shin, D. Y.; Oh, S. M.; Chung, K. H. Appropriate in Vitro Methods for Genotoxicity Testing of Silver Nanoparticles. *Environ. Health Toxicol.* **2013**, *28*, e2013003–e2013003.

(343) Pujalté, I.; Passagne, I.; Brouillaud, B.; Tréguer, M.; Durand, E.; Ohayon-Courtès, C.; L'Azou, B. Cytotoxicity and Oxidative Stress Induced by Different Metallic Nanoparticles on Human Kidney Cells. *Part. Fibre Toxicol.* **2011**, *8* (1), 10–25.

(344) Franklin, N.; Rogers, N.; Apte, S.; Batley, G.; Gadd, G. E.; Casey, P. S. Comparative Toxicity of Nanoparticulate ZnO , Bulk ZnO and ZnCl 2 to a Freshwater Microalga (Pseudokirchnerilla Subcapitata): The Importance of Particle Solubility. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41* (24), 1–27.

(345) Ivask, a.; Bondarenko, O.; Jepihhina, N.; Kahru, a. Profiling of the Reactive Oxygen Species-Related Ecotoxicity of CuO, ZnO, TiO2, Silver and Fullerene Nanoparticles Using a Set of Recombinant Luminescent Escherichia Coli Strains: Differentiating the Impact of Particles and Solubilised Metals. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398* (2), 701–716.

(346) Navarro, E.; Piccapietra, F.; Wagner, B.; Marconi, F.; Kaegi, R.; Odzak, N.; Sigg, L.; Behra, R. Toxicity of Silver Nanoparticles to Chlamydomonas Reinhardtii. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42* (23), 8959–8964.

(347) Connor, E. E.; Mwamuka, J.; Gole, A.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D. Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity. *Small* **2005**, *1* (3), 325–327.

(348) Ponti, J.; Colognato, R.; Franchini, F.; Gioria, S.; Simonelli, F.; Abbas, K.; Uboldi, C.; James Kirkpatrick, C.; Holzwarth, U.; Rossi, F. Approach To Study the Intracellular Fate of Gold Nanoparticles: From Synthesis To Cytotoxicity. *Nanotoxicology* **2009**, *3* (4), 296–306.

(349) Wang, S.; Huang, P.; Nie, L.; Xing, R.; Liu, D.; Wang, Z.; Lin, J.; Chen, S.; Niu, G.; Lu, G.; et al. Single Continuous Wave Laser Induced Photodynamic/plasmonic Photothermal Therapy Using Photosensitizer-Functionalized Gold Nanostars. *Adv. Mater.* **2013**, *25* (22), 3055–3061.

(350) Pan, Y.; Leifert, A.; Ruau, D.; Neuss, S.; Bornemann, J.; Schmid, G.; Brandau, W.; Simon, U.; Jahnen-Dechent, W. Gold Nanoparticles of Diameter 1.4 Nm Trigger Necrosis by Oxidative

Stress and Mitochondrial Damage. *Small* **2009**, *5* (18), 2067–2076.

(351) Van Hoecke, K.; De Schamphelaere, K. a C.; Van der Meeren, P.; Lucas, S.; Janssen, C. R. Ecotoxicity of Silica Nanoparticles to the Green Alga Pseudokirchneriella Subcapitata: Importance of Surface Area. *Environ. Toxicol. Chem.* **2008**, *27* (9), 1948–1957.

(352) Grass, R. N.; Limbach, L. K.; Athanassiou, E. K.; Stark, W. J. Exposure of Aerosols and Nanoparticle Dispersions to in Vitro Cell Cultures: A Review on the Dose Relevance of Size, Mass, Surface and Concentration. *J. Aerosol Sci.* **2010**, *41* (12), 1123–1142.

(353) Qin, G.; Zhang, R.; Makarenko, B.; Kumar, A.; Rabalais, W.; López Romero, J. M.; Rico, R.; Cai, C. Highly Stable, Protein Resistant Thin Films on SiC-Modified Silicon Substrates. *Chem. Commun. (Camb).* **2010**, *46* (19), 3289–3291.

(354) Muro, S.; Garnacho, C.; Champion, J. A.; Leferovich, J.; Gajewski, C.; Schuchman, E. H.; Mitragotri, S.; Muzykantov, V. R. Control of Endothelial Targeting and Intracellular Delivery of Therapeutic Enzymes by Modulating the Size and Shape of ICAM-1-Targeted Carriers. *Mol. Ther.* **2008**, *16* (8), 1450–1458.

(355) Gratton, S. E. a; Ropp, P. a; Pohlhaus, P. D.; Luft, J. C.; Madden, V. J.; Napier, M. E.; DeSimone, J. M. The Effect of Particle Design on Cellular Internalization Pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (33), 11613–11618.

(356) Gratton, S. E. a; Napier, M. E.; Ropp, P. a.; Tian, S.; DeSimone, J. M. Microfabricated Particles for Engineered Drug Therapies: Elucidation into the Mechanisms of Cellular Internalization of PRINT Particles. *Pharm. Res.* **2008**, *25* (12), 2845–2852.

(357) Maeda, H. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect in Tumor Vasculature: The Key Role of Tumor-Selective Macromolecular Drug Targeting. *Advan. Enzym. Regul.* **2001**, *41*, 189–207.

(358) Faure, A. C.; Dufort, S.; Josserand, V.; Perriat, P.; Coll, J. L.; Roux, S.; Tillement, O. Control of the in Vivo Biodistribution of Hybrid Nanoparticles with Different Poly(ethylene Glycol) Coatings. *Small* **2009**, *5*, 2565–2575.

(359) De Jong, W. H.; Hagens, W. I.; Krystek, P.; Burger, M. C.; Sips, A. J. A. M.; Geertsma, R. E. Particle Size-Dependent Organ Distribution of Gold Nanoparticles after Intravenous Administration. *Biomaterials* **2008**, *29* (12), 1912–1919.

(360) Pan, Y.; Neuss, S.; Leifert, A.; Fischler, M.; Wen, F.; Simon, U.; Schmid, G.; Brandau, W.; Jahnen-Dechent, W. Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small* **2007**, *3* (11), 1941–1949.

(361) Schmid, G. The Relevance of Shape and Size of Au55 Clusters. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (9), 1909–1930.

(362) Gabizon, A.; Horowitz, A. T.; Goren, D.; Tzemach, D.; Shmeeda, H.; Zalipsky, S. In Vivo Fate of Folate-Targeted Polyethylene-Glycol Liposomes in Tumor-Bearing Mice In Vivo Fate of Folate-Targeted Polyethylene-Glycol Liposomes in Tumor-Bearing Mice. **2003**, *9*, 6551–6559.

(363) Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. Tumor Vascular Permeability and the EPR Effect in Macromolecular Therapeutics: A Review. *J. Control. Release* **2000**, *65*, 271–284.

(364) Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2* (12), 751–760.

(365) Erickson, H. P. Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *Biol. Proced. Online* **2009**, *11* (1), 32–51.

(366) Association Mieux Prescrire. La Revue Prescrire. *La Rev. Prescrire* **2008**, *28* (299), 645.

(367) Kersemans, V.; Cornelissen, B. Targeting the Tumour: Cell Penetrating Peptides for Molecular Imaging and Radiotherapy. *Pharmaceuticals* **2010**, *3* (3), 600–620.

(368) Ghosh, A.; Heston, W. D. W. Tumor Target Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA) and Its Regulation in Prostate Cancer. *J. Cell. Biochem.* **2004**, *91* (3), 528–539.

(369) Fass, L. Imaging and Cancer: A Review. *Mol. Oncol.* **2008**, *2*, 115–152.

(370) Sledge, G. W. VEGF-Targeting Therapy for Breast Cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2005**, *10* (4), 319–323.

(371) Perret, G. Y.; Starzec, A.; Hauet, N.; Vergote, J.; Le Pecheur, M.; Vassy, R.; Léger, G.; Verbeke, K. a; Bormans, G.; Nicolas, P.; et al. In Vitro Evaluation and Biodistribution of a 99mTc-Labeled Anti-VEGF Peptide Targeting Neuropilin-1. *Nucl. Med. Biol.* **2004**, *31* (5), 575–581.

(372) Song, S.; Liu, D.; Peng, J.; Sun, Y.; Li, Z.; Gu, J.-R.; Xu, Y. Peptide Ligand-Mediated Liposome Distribution and Targeting to EGFR Expressing Tumor in Vivo. *Int. J. Pharm.* **2008**, *363*, 155–161.

(373) Heidel, J. D.; Yu, Z.; Liu, J. Y.-C.; Rele, S. M.; Liang, Y.; Zeidan, R. K.; Kornbrust, D. J.; Davis, M. E. Administration in Non-Human Primates of Escalating Intravenous Doses of Targeted Nanoparticles Containing Ribonucleotide Reductase Subunit M2 siRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (14), 5715–5721.

(374) Danhier, F.; Breton, A. Le; Préat, V. RGD-Based Strategies to Target Alpha(v) beta(3) Integrin in Cancer Therapy and Diagnosis. *Mol. Pharm.* **2012**, *9* (11), 2961–2973.

(375) Stevens, P. J.; Sekido, M.; Lee, R. J. A Folate Receptor – Targeted Lipid Nanoparticle Formulation for a Lipophilic Paclitaxel Prodrug. *Pharm. Res.* **2004**, *21* (12), 2153–2157.

(376) Mackiewicz, N.; Nicolas, J.; Noiray, M.; Mougin, J.; Daveu, C. Precise Engineering of Multifunctional PEGylated Polyester Nanoparticles for Cancer Cell Targeting and Imaging. *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 1834–1847.

(377) Leamon, C. P.; Low, P. S. Folate-Mediated Targeting : From Diagnostics to Drug and Gene Delivery. **2001**, *6* (1), 44–51.

Maxime BOKSEBELD

13/11/1990 (25 ans)

117 Route de Paris, 69260 - Charbonnières-les bains

✉ maxime.boksebeld@gmail.com

Formation

2013-2016 **Thèse de doctorat de l'université de Lyon**, réalisée à l'Institut des Nanotechnologies de Lyon
Elaboration et caractérisation de nanoparticules hybrides pour la microscopie multiphotonique et la thérapie ciblée du cancer

2006-2013 **Diplôme d'état de docteur en pharmacie**, option ingénieur, **Université Claude Bernard Lyon 1**
Thèse d'exercice : Impact du pharmacien clinicien sur l'évolution de la consommation médicamenteuse à la maison d'arrêt de Lyon-Corbas

2010-2013 **Diplôme d'ingénieur en chimie et génie des procédés**, **CPE Lyon, option formulation**

Expériences professionnelles

2013-2016 Institut des Nanotechnologies de Lyon, (Ecully, 69), **Thèse de Doctorat**
Directeurs de Thèse : Yann Chevolot, Virginie Monnier – 04.72.18.62.39
Sujet de thèse : Elaboration et caractérisation de nanoparticules hybrides pour la microscopie multiphotonique et la thérapie ciblée du cancer

- Recherches bibliographiques en rapport avec la thèse
- Synthèse, fonctionnalisation et caractérisation de nanoparticules
- Développement de systèmes de ciblages de cellules cancéreuses
- Etudes toxicologiques et thérapeutiques sur cellules saines et cancéreuses
- Collaborations scientifiques multiples :
  GAP Biophotonic (Genève, Suisse), Laboratoire SYMME (Annecy, France), Laboratoire CARMEN (Villeurbanne, France), Institut for Health and Consumer Protection (Ispra, Italie) et Institut des sciences moléculaires (Bordeaux, France)
- Activité d'enseignement en français et en anglais (Chimie et Biologie) à l'Ecole Centrale de Lyon (niveau L3 à M2)
- Encadrement de stagiaire de niveau master

2012-2013
6 mois
Adisseo, (Commentry, 03), **Stage ingénieur**
Responsables de stage : Jean Marie Dollat, Géraldine Lafitte – 04.70.28.71.40

- Développement d'une formulation d'émulsion de vitamine
- Développement d'un procédé d'encapsulation d'émulsion

2011
3 mois
Laboratoire de Génie des Procédés (LAGEP, Villeurbanne, 69), **Stage de recherche**
Responsables de stages : Abdelhamid Elaissari, Ahmad Bitar – 04.72.43.18.41

- Caractérisation et stabilisation d'émulsions magnétiques
- Développement d'un procédé d'encapsulation sol-gel

2010-2011
6 mois
CHU Lyon Sud / Maison d'Arrêt de Lyon-Corbas, (Corbas, 69), **Stage hospitalo-universitaire**
Responsable de stage : Delphine Cabelguenne

- Recherche et analyse de données en lien avec ma thèse d'exercice
- Veille sanitaire et pharmacovigilance aux prisons de Lyon

Compétences autres

Anglais professionnel courant, niveau B2 (FCE)

Allemand (Réactivable)

Bureautique (Pack Office, Outils de recherche bibliographique, Gestionnaires de bibliographie)

Permis B

Brevet de secouriste de niveau 1 (AFPS)

Organisation et animation de réunions

Organisation de colloques :

- INL PhD Days 2015 (15-16 octobre 2015)
- Colloque de Recherche Inter-Ecoles Centrales 2014 (2-6 juin 2014)

Centres d'intérêts

Associatifs :	Vice-président (2013-2015) puis trésorier (2015-2016) de l'association des doctorants de l'Ecole Centrale de Lyon (ECLAT)
Sportifs	Ski, Badminton, Natation
Autres :	Vulgarisation scientifique, Astronomie, Lecture, Cuisine

Production Scientifique

Publications

M. Boksebeld, A. Rogov, C. Schmidt, L. Bonacina, S. Alekseev, A. Geloen, V. Lysenko, Y. Chevolot, E. Souteyrand, V. Monnier, Folate-targeted silicon carbide nanoparticles as labels for cell imaging in multiphoton microscopy, (Soumis)

M. Boksebeld, N. Blanchard, A. Jaffal, Y. Chevolot, V. Monnier, Shape-selective purification of gold nanorods using simple centrifugation process (Soumis)

Autres articles en préparation

Présentations orales

M. Boksebeld, A. Rogov, C. Schmidt, L. Bonacina, S. Alekseev, A. Geloen, V. Lysenko, Y. Chevolot, E. Souteyrand, V. Monnier, Nonlinear optical nanohybrids as labels for cell imaging in nonlinear microscopy and cancer phototherapy, EMRS spring meeting, 2-6 mai 2016, Lille, France

M. Boksebeld, A. Rogov, C. Schmidt, L. Bonacina, S. Alekseev, A. Geloen, V. Lysenko, Y. Chevolot, E. Souteyrand, V. Monnier, Synthesis and characterization of hybrid nanoparticles for cell imaging, Journées NanoLyon, 26 juin 2015, Villeurbanne, France

M. Boksebeld, N. Sui, M. Salvia, V. Monnier, Y. Zakharko, V. Lysenko, L. Bonacina, J. Bluet, Y. Chevolot, E. Souteyrand, Enhanced optical and nonlinear optical properties of silicon carbide nanoparticles through fluorescent-plasmonic coupling for cell labeling applications, EMRS spring meeting, 26-30 mai 2014, Lille, France

Présentations par affiche

M. Boksebeld, A. Rogov, C. Schmidt, L. Bonacina, S. Alekseev, A. Geloen, V. Lysenko, Y. Chevolot, E. Souteyrand, V. Monnier, Synthesis and Characterization of nonlinear optical hybrid nanoparticles for cell imaging and cancer therapy, European Nanomedecine Meeting, 7-9 décembre 2015, Grenoble, France

M. Boksebeld, A. Rogov, C. Schmidt, L. Bonacina, S. Alekseev, V. Lysenko, Y. Chevolot, E. Souteyrand, V. Monnier, Synthèse et caractérisation de nanoparticules hybrides pour l'imagerie cellulaire en optique non linéaire, Workshop NanoNano, 15-16 juin 2015, Villeurbanne, France

M. Boksebeld, A. Rogov, L. Bonacina, S. Alekseev, A. Geloen, V. Lysenko, Y. Chevolot, E. Souteyrand, V. Monnier, Gold-based nanohybrids with plasmon-enhanced nonlinear optical properties for cell imaging, Annual Congress of French Nanomedecine Society, 9-12 décembre 2014

AUTORISATION DE SOUTENANCE

Vu les dispositions de l'arrêté du 7 août 2006,

Vu la demande du Directeur de Thèse

Monsieur Y. CHEVOLOT

et les rapports de

M. A. IBANEZ
Directeur de Recherche CNRS - Institut Néel (F-309) CNRS - UGA et Grenoble INP
25 avenue des Martyrs - BP 166 - 38042 GRENOBLE

et de

M. J-O. DURAND
Directeur de Recherche CNRS - Institut Charles Gerhardt Montpellier
Université de Montpellier 2 - place E. Bataillon - CC1701 - 34095 Montpellier cedex 5

Monsieur BOKSEBELD Maxime

est autorisé à soutenir une thèse pour l'obtention du grade de **DOCTEUR**

Ecole doctorale ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE

Fait à Ecully, le 3 octobre 2016

P/Le directeur de l'E.C.L.
La directrice des Etudes

ECOLE CENTRALE DE LYON
Service Scolarité
ECULLY

M-A. GALLAND

Résumé :

Cette thèse décrit l'élaboration de nouvelles nanosondes disposant de propriétés permettant leur utilisation pour la microscopie multiphotonique ainsi que la thérapie ciblée du cancer. Dans un premier temps, ce travail s'est concentré sur la synthèse de nanoparticules actives en optique non linéaire et pour la photothérapie. Différents types de nanoparticules ont ainsi été élaborées et caractérisées comme des nanobâtonnets d'or, des nanoparticules de carbure de silicium ou de niobate de potassium, et des nanohybrides couplant ces différentes briques de base. Les nanoparticules ont ensuite été fonctionnalisées par des biomolécules comme l'acide folique afin de leur conférer des propriétés de ciblage spécifique vis-à-vis des cellules cancéreuses. La fonctionnalisation de surface des nanoparticules a été caractérisée de manière approfondie par des techniques avancées telles que la spectroscopie infrarouge, XPS et ToF-SIMS. Dans un second temps, les propriétés optiques non linéaires et thérapeutiques de ces nanoparticules ont été étudiées. Ainsi, ces nanosondes ont été utilisées avec succès pour réaliser le marquage de cellules saines et le ciblage spécifique de cellules cancéreuses pour la microscopie multiphotonique. Enfin, les propriétés photothérapeutiques de ces nanoparticules ont également été étudiées pour réaliser la destruction photoinduite de cellules cancéreuses.

Mots-clés : Nanoparticules d'or, Nanoparticules hybrides, Optique non linéaire, Photothérapie, Ciblage du Cancer

Abstract :

This thesis describes the synthesis of new nanoprobes with properties allowing their use for cancer-targeted multiphotonic microscopy and cancer phototherapy. On the one hand, this work was focused on the synthesis of nanoparticles with non-linear optical and phototherapeutic properties. Different nanoparticles were synthesized and used like gold nanorods, silicon carbide or potassium niobate nanoparticles, and nanohybrids coupling these previous nano-building blocks. These nanoparticles were functionalized with biomolecules like folic acid to provide specific cancer-targeting properties. The surface chemistry of these nanoparticles was carefully evaluated through advanced characterization techniques such as infrared spectroscopy, XPS and ToF-SIMS. On the other hand, optical and therapeutic properties of these nanoparticles were studied. These nanoprobes were successfully used to perform healthy cells labelling and cancer cells targeting for multiphotonic microscopy. Phototherapeutic properties of our nanoparticles were also used to induce light-triggered cancer therapy.

Keywords : Gold nanoparticles, Hybrid nanoparticles, Non-linear optics, Phototherapy, Cancertargeting