

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 596
Matière, Molécules, Matériaux
Spécialité : Sciences des matériaux

Par

Joanna BOUCARD

**Nanomatériaux magnéto-fluorescents pour la bio-imagerie multimodale
et la libération contrôlée de principes actifs**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 08 octobre 2018

Unité de recherche : Laboratoire CEISAM – UMR CNRS 6230 – Université de Nantes

Rapporteurs avant soutenance :

Céline Frochot Directrice de recherche CNRS, Université de Lorraine
Olivier Sandre Directeur de recherche CNRS, Université de Bordeaux

Composition du jury :

Président : Fabienne Gauffre Directrice de recherche CNRS, Université de Rennes
Examineurs : Fabienne Gauffre Directrice de recherche CNRS, Université de Rennes
Claudio Sangregorio Senior Researcher, CNR ICCOM
Dir. de thèse : Eléna Ishow Professeure des Universités, Université de Nantes
Co-enc. de thèse : Lénaïc Lartigue Maître de conférences, Université de Nantes

Invité

Co-dir. de thèse : Christophe Blanquart Chargé de recherche CNRS, Université de Nantes

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au laboratoire CEISAM (Chimie et Interdisciplinarité, Synthèse, Analyse, Modélisation) - UMR CNRS 6230 et au CRCINA (Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes Angers) - UMR CNRS 1232.

Tout d'abord, je remercie Bruno Bujoli du CEISAM pour m'avoir accueillie à l'époque dans son laboratoire, mais également Jean-Michel Bouler, actuel directeur du CEISAM.

Je remercie sincèrement les membres de mon jury de thèse Céline Frochot et Olivier Sandre pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et Fabienne Gauffre et Claudio Sangregorio pour avoir accepté d'examiner cette thèse.

J'exprime ma plus grande gratitude à l'égard de mes directeurs de thèse, le Professeur Eléna Ishow, le Docteur Lénaïc Lartigue et Christophe Blanquart. Eléna, merci tout particulièrement pour ta disponibilité, ta passion communicative, tes encouragements et tes précieux enseignements qui m'ont donné le goût d'en découvrir plus, mais aussi pour m'avoir donné la chance d'assister à de nombreuses conférences et d'échanger avec l'Italie. Mes remerciements vont également à mon tuteur de thèse Lénaïc Lartigue, pour sa présence, nos échanges intéressants sur le magnétisme mais également pour nos discussions « scientifiques » lors des séances TEM. Christophe, merci pour ta disponibilité et d'avoir répondu à mes différents questionnements sur la biologie.

J'adresse de chaleureux remerciements aux membres du CRCINA, Philippe Hulin et Steven Nedellec de la plateforme de microscopie MicroPiCell et Camille Linot et Thibaut Blondy, doctorants, pour m'avoir fait découvrir le monde des cellules.

Lors de mes déplacements en Italie, j'ai eu la chance de travailler au sein du laboratoire de physique appliquée de l'Université de Milan aux côtés de Alessandro Lascialfari, Paolo Arosio et Martina Basini, et au sein du LAMM (Laboratoire de Magnétisme Moléculaire) de l'Université de Florence aux côtés de Claudio Sangregorio et Andrea Guerrini. Je les remercie d'avoir pris le temps de me former à l'utilisation des techniques de magnétisme complexes et d'avoir rendu nos échanges faciles grâce à leur bonne humeur. J'ai eu l'occasion de fréquenter des personnes formidables. Je n'oublie pas Asma Amjad et Lorenzo Tesi, avec qui j'ai apprécié visiter ces magnifiques villes italiennes.

Un grand merci à Marie-Pierre Fontaine-Aupart, Karine Steenkeste et Rym Boudjemaa de l'Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay pour m'avoir autorisé l'excitante tâche de manipuler des bactéries en m'accueillant dans leur laboratoire.

Je remercie Fabrice Fleury et Houda Benhelli-Mokrani de l'Unité Fonctionnalité et Ingénierie des Protéines pour m'avoir initiée à la culture cellulaire.

Je remercie toutes les personnes qui ont manifesté leur intérêt pour mes travaux de recherche lors des nombreuses conférences auxquelles j'ai eu la chance d'assister, et plus particulièrement, Dario Basani et Robert Pansu pour leurs conseils.

Mes collègues de l'équipe IMF, Manon Dupleichs, Pauline Girard, Adrien Faucon, Thibault Gallavardin, Simon Olivier. Spéciale dédicace à Florian Forato, avec qui j'ai beaucoup partagé : verrerie, interrogations, rires... Merci pour sa présence.

Je remercie les étudiantes Solène Morand (DUT), Constance Prenant (DUT), Mélanie Dreano (M2), qui m'ont permis d'avancer plus rapidement dans mes travaux de recherche, et tout particulièrement Brenda Guillet (M1), pour sa joie de vivre et sa motivation. Mes remerciements tout particuliers à Marina Coupeau qui a effectué son stage de M1 sur ce sujet et qui prend la suite de ces travaux de thèse.

Une pensée pour les doctorants avec lesquels j'ai partagé ces trois années et pour les étudiants de licence et master à qui j'ai pu dispenser des enseignements, qui m'ont fait découvrir une autre partie du monde académique et de moi-même.

Merci à ma famille, et plus particulièrement à ma maman, Patricia, pour son soutien sans faille, sa confiance et sa capacité à toujours trouver les mots justes.

Merci à mes amis, notamment aux nantais Justine et Nathan, présents dans les bons moments comme dans les mauvais.

Et merci à Jordan, pour m'avoir soutenue par de multiples attentions.

« Faire bouillir l'eau... J'suis pas chimiste moi ! »

Table des matières

Table des abréviations	1
Liste des grandeurs physiques	5
Introduction générale.....	7
Chapitre 1 : Bibliographie et état de l'art.....	11
I.1. Introduction	12
I.2. Nanomatériaux pour l'imagerie de fluorescence	13
I.2.1. Molécules pour l'imagerie de fluorescence.....	13
I.2.2. Nanomatériaux pour l'imagerie de fluorescence.....	18
I.3. Vers la multimodalité : l'imagerie de résonance magnétique.....	22
I.3.1. Imagerie de Résonance Magnétique.....	23
I.3.2. Systèmes multimodaux magnéto-fluorescents	28
I.4. Les nanomatériaux comme agents théranostiques	31
I.4.1. Encapsulation de principes actifs et ciblage.....	31
I.4.2. Mécanismes d'internalisation cellulaire et échappement endosomal.....	35
I.4.3. Contrôle de la libération de principes actifs.....	39
I.5. Conclusion.....	43
Chapitre II : Synthèse de fluorophores et fabrication de nanosphères fluorescentes organiques.....	45
II.1. Introduction	46
II.2. Synthèse et caractérisation des fluorophores	47
II.2.1. Stratégie de synthèse	47
II.2.2. Synthèse du squelette de base	49
II.2.3. Synthèse d'une famille de fluorophores.....	50
II.2.4. Influence de la structure sur les propriétés photophysiques.....	58
II.2.5. Etude de solvatochromisme.....	68
II.2.6. Analyse thermique.....	72
II.3. Synthèse et caractérisation de nanosphères organiques fluorescentes.....	74
II.3.1. Synthèse de nanosphères organiques fluorescentes	74
II.3.2. Caractérisation de nanosphères organiques fluorescentes.....	75

II.3.3. Propriétés photophysiques des FONs.....	82
II.4. Conclusion.....	90
Chapitre III : Les FONs comme agents théranostiques	93
III.1. Introduction	94
III.2. Les FONs pour le diagnostic	95
III.2.1. Imagerie de cellules cancéreuses.....	95
III.2.2. Imagerie de bactéries.....	98
III.2.3. Étude d'internalisation dans des macrophages tumoraux	105
III.2.4. Étude d'internalisation dans des lymphocytes et monocytes	108
III.3. Les FONs pour la thérapie	110
III.3.1. Obtention d'un système de suivi de la libération de molécules	110
III.3.2. Encapsulation d'un agent anticancéreux : la doxorubicine	120
III.4. Conclusion.....	127
Chapitre IV : Synthèse de nanoparticules magnétiques et obtention de nanoassemblages magnéto-fluorescents	129
IV.1. Introduction	130
IV.2. Synthèse et caractérisations de nanoparticules magnétiques.....	131
IV.2.1. Présentation et fabrication de nanoparticules magnétiques.....	131
IV.2.2. Caractérisations structurales de nanoparticules magnétiques	133
IV.3. Formation et caractérisation de nanoassemblages hybrides.....	135
IV.3.1. Procédé de fabrication de nanoassemblages hybrides.....	135
IV.3.2. Propriétés structurales et photophysiques de nanoassemblages hybrides	137
IV.4. Etude des propriétés magnétiques des nanoparticules magnétiques et des nanoassemblages hybrides	149
IV.4.1. Propriétés magnétiques des nanoparticules de maghémite	149
IV.4.2. Principaux types de caractérisations magnétiques	151
IV.4.3. Influence de la nature du cœur fluorescent	153
IV.4.4. Influence de l'organisation et de la taille des nanoparticules magnétiques	157
IV.4.5. Influence de la nature du polymère stabilisant.....	163
IV.5. Conclusion.....	166

Chapitre V : Les nanoassemblages hybrides comme agents théranostiques.....	169
V.1. Introduction.....	170
V.2. Internalisation <i>in cellulo</i> de nanoassemblages hybrides.....	171
V.2.1. Internalisation dans des monocouches de cellules tumorales	171
V.2.2. Internalisation dans des sphéroïdes multicellulaires de cellules tumorales	174
V.3. Contrôle de la libération d'un composé par hyperthermie magnétique.....	177
V.3.1. Caractérisations structurales, photophysiques et magnétiques.....	179
V.3.2. Étude de la délivrance par hyperthermie magnétique	182
V.4. Bio-conjugaison du peptide TAT en surface des nanoassemblages	185
V.4.1. Synthèse des nanoassemblages bio-conjugués.....	186
V.4.2. Caractérisations structurales et photophysiques.....	187
V.4.3. Imagerie de cellules MuStem	189
V.5. Conclusion.....	195
Conclusion générale	197
Perspectives.....	199
Chapitre VI : Partie expérimentale	201
VI.1. Organic compounds	204
VI.1.1. Organic compound characterizations	204
VI.1.2. Photophysical experiments.....	204
VI.2. Syntheses of photoactive organic compounds	206
VI.3. Nanoassemblies.....	221
VI.3.1. Nanoassembly characterizations	221
VI.3.2. Syntheses of organic nanospheres	225
VI.3.3. Syntheses of hybrid nanoassemblies	227
VI.4. Biological studies <i>in cellulo</i>.....	232
Glossaire de photophysique.....	239
Références bibliographiques	247

Table des abréviations

AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
AcONH ₄	Acétate d'ammonium
ACN	Acétonitrile
ACQ	Aggregation-caused quenching (extinction induite par agrégation)
ADCA	Lung adenocarcinoma cells (cellules d'adénocarcinome pulmonaire)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIE	Aggregation-induced emission (émission induite par agrégation)
AON	Azoic organic nanosphere (nanosphère organique azoïque)
azo	Composé azoïque
Cdot	Carbon dots
CT	Contrôle (manipulation contrôle lors des tests biologiques)
DCM	Dichlorométhane
DIPC	N,N'-diisopropylcarbodiimide
DLS	Dynamic light scattering (diffusion dynamique de la lumière)
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
Dox	Doxorubicine
Dox,HCl	Doxorubicine hydrochlorate
DPTS	4-(diméthylamino)pyridinium 4-toluenesulfonate
EDC	N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EEA1	Early Endosome Antigen 1 (Antigène-1 des endosomes précoces)
EGF	Epidermal Growth Factor (facteur de croissance épidermique)
EPR	Enhanced and Permeability Retention Effect (effet de perméabilité et de rétention accrues)
ESI	Electrospray ionization (ionisation par électronébuliseur)
EtOH	Éthanol

EØ	Eau physiologique
FAON	Fluorescent azoic organic nanosphere (nanosphère organique fluorescente et azoïque)
FC	Field cooled
FDA	Food and drug administration
FON	Fluorescent organic nanosphere (nanosphère organique fluorescente)
FONmag	Magneto-fluorescent nanoassembly (nanoassemblage magnéto-fluorescent)
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor (facteur de stimulation de colonies de granulocytes-macrophages)
GFP	Green fluorescent protein (protéine fluorescente verte)
HRMS	High-resolution mass spectra (spectrométrie de masse haute résolution)
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy (spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif)
IFN- γ	Interféron gamma
IRM	Imagerie de résonance magnétique
LPS	Lipopolysaccharide
LRMS	Low-resolution mass spectra (spectrométrie de masse basse résolution)
mal	Maléimide
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor (facteur de stimulation de colonies de macrophages)
MDA cells	M.D. Anderson cells (Cellules épithéliales de tumeur mammaire)
MeOH	Méthanol
Méso	Cellules mésothéliales de tumeur pleurale
MET	Microscopie électronique en transmission
MTCS	Multicellular tumor cell spheroid (sphéroïde multicellulaire de cellules tumorales)
MuStem	Cellules souches résidentes du muscle
MWCO	Molecular weight cut-off (seuil coupure en poids moléculaire)
M1	Macrophage de phénotype M1
M2	Macrophage de phénotype M2
n-BuLi	n-butyllithium

NHS	N-hydrosuccinimide
NMR	Nuclear magnetic resonance (résonance magnétique nucléaire)
NMRD	Nuclear magnetic relaxation dispersion (dispersion de relaxation magnétique nucléaire)
NP	Nanoparticule
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAA	Polyacrylic acid (acide polyacrylique)
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell (cellules mononuclées du sang périphérique)
PDI	Polydispersity index (indice de polydispersité)
PEG	Polyéthylène glycol
Pdot	Polymer dots
PBS	Phosphate-buffered saline (solution saline tamponnée au phosphate)
PVA	Polyvinyl alcohol (alcool polyvinylique)
Qdot	Quantum dots (boîtes quantiques)
RAFT	Reversible addition fragmentation chain transfer (polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation)
RMFI	Relative mean fluorescence intensity (intensité moyenne de fluorescence relative)
RNS	Reactive nitrogen species (espèces réactives de l'azote)
ROS	Reactive oxygen species (espèces réactives de l'oxygène)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (milieu de culture)
RT	Room temperature
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAR	Specific absorption rate (Taux d'absorption spécifique)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (dodécylsulfate de sodium)
SH	Sérum humain
SQUID	Superconducting quantum interference device (dispositif supraconducteur à interférence quantique)
SVF	Sérum de veau fœtal
TA	Température ambiante

TAM	Tumor associated macrophages (macrophages associés aux tumeurs)
TAT	Transactivator of transcription (trans-activateur de transcription)
TBO	Toluidine blue O (bleu de toluidine O)
<i>t</i> Bu	Groupe <i>tert</i> -butyle
TCEP	Tris(2-carboxyéthyl)phosphine
TCSPC	Time-correlated single-photon counting (comptage de photons uniques corrélés dans le temps)
THF	Tétrahydrofurane
TLC	Thin layer chromatography (chromatographie sur couche mince)
TMSBr	Trimethylsilyl bromide (bromure de triméthylsilyle)
TSB	Tryptic soya broth (gélose trypticase de soja)
UV	Ultra-violet
ZFC	Zero field cooled

Liste des grandeurs physiques

ε	Coefficient d'absorption molaire (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
E_a	Énergie d'activation (J.mol ⁻¹)
f	Fréquence (Hz)
H_c	Champ coercitif (Oe ou A.m ⁻¹)
K_a	Constante d'anisotropie (4,6.10 ³ J.m ⁻³ pour la maghémite massive)
k_B	Constante de Boltzmann (1,380.10 ⁻²³ J.K ⁻¹)
k_f	Constante de vitesse pour la désexcitation radiative par fluorescence (s ⁻¹)
k_{nr}	Constante de vitesse pour la désexcitation non radiative (s ⁻¹)
$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$	Longueur d'onde d'absorption maximale (nm)
$\lambda_{\max}^{\text{em}}$	Longueur d'onde d'émission maximale (nm)
M_{\max}	Aimantation maximale des courbes ZFC/FC (emu.g ⁻¹ ou A.m ² .kg ⁻¹)
M_R	Aimantation rémanente (emu.g ⁻¹ ou A.m ² .kg ⁻¹)
M_S	Aimantation à saturation (emu.g ⁻¹ ou A.m ² .kg ⁻¹)
ϕ_f	Rendement quantique de fluorescence
r_1	Relaxivité longitudinale (L.mol ⁻¹ .s ⁻¹)
r_2	Relaxivité transversale (L.mol ⁻¹ .s ⁻¹)
τ_0	Facteur pré-exponentiel (s)
$\tau_i (f_i)$	Composantes du déclin de fluorescence τ_i (s) et leurs proportions f_i
τ_B	Temps de relaxation de Brown (s)
τ_N	Temps de relaxation de Néel (s)
T_1	Temps de relaxation longitudinal (s)
T_2	Temps de relaxation transversal (s)
T_b	Température de blocage – courbe ZFC/FC (K)
T_g	Température de transition vitreuse (K)
T_{irr}	Température d'irréversibilité – courbe ZFC/FC (K)
T_{\max}	Température maximale – courbe ZFC (K)
χ	Susceptibilité magnétique volumique (sans dimension) ou massique (en emu/g en cgs et en m ³ /kg en SI)

Introduction générale

De nombreuses pathologies ne trouvent, à l'heure actuelle, aucun traitement efficace. Le cancer, qui représente la première cause de mortalité dans le monde (17,5 millions de cas et 8,7 millions de décès en 2015), est un exemple parmi tant d'autres.^{1,2} Dans ce cas, la plupart des traitements reposent sur la chirurgie, la radiothérapie ou la chimiothérapie. Bien qu'ils soient efficaces pour soigner certains cancers, ils souffrent de nombreuses limitations. La chirurgie est invasive donc douloureuse et la radiothérapie peu sélective des tissus cancéreux. La chimiothérapie, quant à elle, manque également de sélectivité et requiert des doses importantes de médicament. Ces deux causes induisent des effets secondaires indésirables pour le patient, allant de la nausée à des complications physiologiques sérieuses, notamment cardiaques. De plus, la récurrence du traitement déclenche des mécanismes qui rendent le corps résistant à son efficacité.^{3,4}

C'est devant ces impasses thérapeutiques et la nécessité de développer une médecine personnalisée répondant aux pathologies propres à chacun que la demande en nouveaux traitements explose. Ceux-ci reposent sur l'immunothérapie, la thérapie génique, la thérapie photodynamique ou la nanomédecine, voire leur combinaison pour gagner en spécificité et en efficacité. Depuis la célèbre présentation « There's Plenty of Room at the Bottom » en 1959 de Richard Feynman, Prix Nobel de Physique en 1965, introduisant la possibilité d'aller vers l'infiniment petit, les nanotechnologies sont apparues comme un champ de recherches innovant et prometteur. La nanomédecine, à l'interface entre les nanotechnologies et la médecine, repose sur l'utilisation d'objets de taille nanométrique, typiquement entre 1 et 100 nm, proche des dimensions des organites cellulaires. Les nanomédicaments, en général formés par vectorisation des petites molécules utilisées en chimiothérapie au sein de nanoparticules, ont la propriété de s'accumuler préférentiellement dans la tumeur, offrant ainsi un ciblage accru. Ceci permet de diminuer les doses administrées et donc les effets secondaires.

Si la nanomédecine est largement répandue pour soigner le cancer, elle s'étend également à des applications théranostiques vis-à-vis d'autres pathologies comme l'athérosclérose, le diabète ou la maladie d'Alzheimer,⁵⁻⁷ ou plus récemment des infections bactériennes.^{8,9}

S'il est possible de vectoriser des médicaments, il est également possible d'incorporer des agents de contraste pour l'imagerie, tels que des fluorophores pour l'imagerie optique, des radioisotopes pour l'imagerie nucléaire, des nanoparticules magnétiques pour l'imagerie de résonance magnétique (IRM) ou de matériaux inorganiques présentant une forte densité électronique pour la tomodensitométrie.

Les nano-objets peuvent ainsi se transformer en vraies plateformes multimodales, offrant des potentialités de détection et de suivi de tumeurs de plus en plus petites, voire de métastases, par le biais de techniques d'imagerie non-invasives. Plusieurs agents de contraste différents peuvent être combinés au sein du même nano-objet. La corrélation des clichés obtenus par les diverses techniques d'imagerie permet alors d'augmenter la précision des informations collectées et de diminuer le nombre de faux positifs pour des détections plus précoces de pathologies ou de pathogènes. De plus, l'incorporation d'une grande quantité d'unités actives au sein d'un même objet autorise un gain de sensibilité de détection. Les nanoparticules

associant à la fois le diagnostic de la maladie par imagerie et son traitement sont qualifiées de nanoparticules théranostiques. On attend néanmoins de nanoparticules multimodales des propriétés conservées lors de leur combinaison, une haute densité en unités actives induisant un effet de coopérativité, une biodégradabilité et une non-cytotoxicité et enfin, une facilité de synthèse avec un nombre d'éléments réduit biocompatibles.

Au laboratoire, notre équipe travaille entre autres sur la conception de nanoobjets multimodaux pour la bio-imagerie multi-échelle. Ces nanoassemblages hybrides, d'un diamètre autour de 80 nm, combinent deux agents relevant de techniques d'imagerie distinctes : la microscopie de fluorescence et l'IRM. Ils sont exclusivement composés d'unités photo- et magnéto-actives, et dénués de toute matrice de silice ou de polymère. Ils sont basés sur un système de type cœur-coquille avec un cœur fluorescent organique, appelé FON, pour nanosphère organique fluorescente, et une coquille de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques de 8 à 13 nm de diamètre. Le tout est recouvert d'un polymère pour protéger l'assemblage et lui apporter la stabilité colloïdale et la biodisponibilité nécessaires en milieu physiologique. L'élaboration de FONs est simple et s'effectue par précipitation au cours de laquelle les fluorophores moléculaires s'auto-assemblent sous forme de nanosphères. Ces FONs ont largement fait leur preuve en tant qu'agents de bio-imagerie cellulaire. L'obtention d'assemblages hybrides cœur-coquille repose sur la même technique de nanoprecipitation des fluorophores, non plus dans l'eau mais dans une solution aqueuse de nanoparticules superparamagnétiques, en exploitant le caractère fortement chélatant des fluorophores vis-à-vis des oxydes de fer. La haute densité en unités actives permet de disposer de signaux de fluorescence élevés et de réponses magnétiques très localisées par rapport à ceux des unités non assemblées. Ces nanomatériaux peuvent être internalisés dans des cellules et des macrophages, prouvant leur utilité en tant que sondes fluorescentes à l'échelle cellulaire, même si leurs propriétés de fluorescence et de magnétisme peuvent être améliorées. Ils ont également fait leur preuve en IRM *in vivo* sur petit animal. Le succès d'une post-fonctionnalisation en surface de l'assemblage laisse imaginer des possibilités de ciblage actif vers les organites cellulaires désirés.

Cette thèse s'est articulée autour de trois enjeux majeurs. D'abord, elle a reposé sur l'élaboration de nanoassemblages hybrides plus performants que les précédents, en termes de brillance et de magnétisme, pour la bio-imagerie par microscopie de fluorescence et par IRM. Ensuite, les FONs optimisées ont été utilisées pour vectoriser un principe actif et suivre son évolution *in cellulo*. Puis, une libération contrôlée à distance du principe actif a été testée sur des composés modèles grâce à des expériences d'hyperthermie magnétique reposant sur l'application d'un stimulus magnétique externe. Enfin, dans le but d'accroître les capacités de ciblage des nanovecteurs hybrides, leur surface a été fonctionnalisée par différents peptides. L'ensemble des études rapportées est organisé en cinq chapitres présentant tour à tour les enjeux des recherches effectuées.

Le premier chapitre, introductif, traitera des nanomatériaux mono- ou multimodaux généralement utilisés dans la communauté scientifique et, en particulier, en imagerie de fluorescence et en IRM. Après avoir détaillé les avantages et les inconvénients de ces nanomatériaux au travers de leurs architectures et de leurs performances, le choix des nanosystèmes retenus et leur stratégie de fabrication adoptée au laboratoire seront présentés.

Enfin, l'aspect théranostique de ces matériaux sera développé à l'occasion d'une présentation des principales stratégies d'encapsulation de principes actifs, des mécanismes d'internalisation cellulaire et d'échappement endosomal des nanovecteurs théranostiques et, enfin, des approches adoptées pour contrôler la libération de principes actifs.

Dans le deuxième chapitre, les synthèses de nouveaux fluorophores aux performances photophysiques accrues et des FONs résultantes seront présentées. Avant leur utilisation en biologie, les fluorophores et les nanosphères correspondantes seront caractérisés d'un point de vue structural, photophysique et stabilité colloïdale.

Le troisième chapitre décrira l'utilisation des FONs synthétisées en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie de fluorescence *in cellulo*. L'internalisation des FONs dans différents organismes biologiques (cellules cancéreuses, monocytes, macrophages, bactéries) sera ensuite étudiée. Puis, l'accent sera mis sur leur potentialité de vectorisation de principes actifs. L'élaboration d'un système de suivi de la libération du principe actif et l'encapsulation d'un principe actif anticancéreux commercialisé (doxorubicine) seront finalement décrits.

Dans un quatrième chapitre, les propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer seront présentées afin d'identifier les paramètres-clés pour la réalisation de systèmes performants en IRM et en délivrance magnéto-induite de principes actifs. En premier lieu, la synthèse de nanoparticules magnétiques et la formation de nanoassemblages hybrides seront détaillées. En second lieu, un rappel sur le nanomagnétisme et les principaux types de mesures magnétiques sera réalisé avant de caractériser les systèmes synthétisés.

Un cinquième chapitre concernera les aspects théranostiques propres aux nanoassemblages hybrides élaborés au cours de ces travaux de recherche et décrira leur internalisation *in cellulo*, le contrôle et le suivi de la libération par hyperthermie magnétique d'un composé encapsulé en leur sein et enfin leur fonctionnalisation avec un peptide de ciblage (TAT).

Enfin, un sixième et dernier chapitre détaillera l'ensemble des équipements utilisés et les protocoles expérimentaux suivis au cours des travaux de recherche effectués.

Chapitre 1 : Bibliographie et état de l'art

I.1. Introduction	12
I.2. Nanomatériaux pour l'imagerie de fluorescence	13
I.2.1. Molécules pour l'imagerie de fluorescence.....	13
I.2.1.1. Les molécules organiques	13
I.2.1.2. Les protéines fluorescentes	17
I.2.2. Nanomatériaux pour l'imagerie de fluorescence.....	18
I.2.2.1. Les nanomatériaux fluorescents existants	18
I.2.2.2. Les nanoparticules organiques fluorescents.....	20
I.3. Vers la multimodalité : l'imagerie de résonance magnétique	22
I.3.1. Imagerie de Résonance Magnétique.....	23
I.3.1.1. Le principe de fonctionnement de l'IRM.....	23
I.3.1.2. Les agents de contraste pour l'IRM	25
I.3.1.3. Les nanoparticules magnétiques	26
I.3.2. Systèmes multimodaux magnéto-fluorescents	28
I.3.2.1. Les complexes lanthanides.....	28
I.3.2.2. La formation d'assemblages multimodaux magnéto-fluorescents	29
I.3.2.3. Les systèmes multimodaux développés au laboratoire	30
I.4. Les nanomatériaux comme agents théranostiques	31
I.4.1. Encapsulation de principes actifs et ciblage.....	31
I.4.1.1. L'encapsulation de principes actifs.....	31
I.4.1.2. Le ciblage : vers des aspects <i>in vivo</i>	34
I.4.2. Mécanismes d'internalisation cellulaire et échappement endosomal.....	35
I.4.2.1. Les mécanismes d'internalisation cellulaire	35
I.4.2.2. Cas des FONs.....	38
I.4.2.3. L'échappement endosomal.....	38
I.4.3. Contrôle de la libération de principes actifs.....	39
I.4.3.1. La libération par application de stimuli	39
I.4.3.2. La libération par hyperthermie magnétique	41
I.5. Conclusion	43

I.1. Introduction

Détecter des cellules ou des biomolécules pour combattre des pathologies comme le cancer nécessite des outils d'imagerie et de thérapie adaptés. De nos jours, la majeure partie des agents d'imagerie et des principes actifs implique des molécules. La limitation du diagnostic *in vivo* à l'aide de molécules repose sur un manque de sensibilité et de résolution. Les traitements à base de principes actifs moléculaires requièrent de fortes doses et manquent de sélectivité, induisant des effets secondaires dramatiques pour le patient. De plus, ces traitements s'effectuent en aveugle car, une fois administrés, il est impossible de les suivre dans l'organisme.

C'est ainsi que, depuis les années 2000, l'intérêt pour les nanoparticules s'est développé. Un même nano-objet autorise la combinaison de différents agents d'imagerie, permettant d'imager avec une bonne précision des organites subcellulaires jusqu'à des organes entiers. La corrélation des différents signaux permet de confirmer la réponse obtenue et d'éviter les faux positifs. Le même objet peut également vectoriser un principe actif, offrant un ciblage accru de la tumeur par le médicament. Telle un véritable couteau suisse, une nanoparticule théranostique, combinant thérapie et diagnostic, peut être fonctionnalisée pour cibler des entités biologiques spécifiques, notamment des récepteurs. En effet, les nanoparticules présentent un rapport surface sur volume élevé menant à des taux de greffage de surface importants.

Ce chapitre aborde ces aspects de multimodalité à travers un état de l'art dans le domaine et dans le cadre des travaux de recherche décrits dans ce manuscrit. Deux techniques d'imagerie seront particulièrement développées : l'imagerie de fluorescence et l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Une première partie traitera de l'imagerie de fluorescence pour le diagnostic *in cellulo* et *in vivo*, ainsi que des molécules et nano-objets existants pour ce faire. Ensuite, l'IRM et la notion d'imagerie multimodale seront traitées avec une description des systèmes multimodaux existants. Enfin, l'accent sera mis sur divers aspects thérapeutiques, à savoir : les différents moyens d'encapsuler un principe actif, les mécanismes d'internalisation cellulaire des nanoparticules, et les stratégies vers un relargage contrôlé du principe actif dans la cellule cancéreuse.

I.2. Nanomatériaux pour l'imagerie de fluorescence

L'imagerie de fluorescence présente une excellente sensibilité, un temps de réponse court et un coût faible.¹⁰ Elle offre une résolution spatiale d'une dizaine de nanomètres et une résolution temporelle en général de l'ordre de la nanoseconde, ce qui en fait un outil de choix pour les biologistes pour investiguer des phénomènes à l'échelle sub-cellulaire. Ce type de microscopie s'est développé dans les années 30 avec l'utilisation de fluorophores pour marquer des cellules ou des bactéries. Nombre de ces marquages étaient spécifiques et ont donc stimulé le développement de l'imagerie de fluorescence. Ensuite, la nécessité de différencier simultanément plusieurs zones ou organites a entraîné l'apparition d'un grand panel de composés luminescents, dont, entre autres, les molécules fluorescentes (ou fluorophores), les protéines fluorescentes ou les quantum dots.

La sonde fluorescente doit remplir certains critères pour imager efficacement des processus biologiques par microscopie de fluorescence. D'abord, sous excitation, elle doit émettre un signal de fluorescence d'intensité élevée, c'est-à-dire une brillance élevée (voir Glossaire), et constant au cours du temps pour être aisément observé. Ce signal doit être choisi pour ne pas interférer avec celui d'autres entités biologiques. La sonde doit également être non photosensible pour éviter sa dégradation ou la génération d'espèces toxiques. De plus, elle doit être biocompatible, non toxique et stable en milieu biologique. On apprécie aussi qu'elle soit facilement fonctionnalisable pour pouvoir cibler et marquer des entités cellulaires.

Pour résumer, on s'attachera à réunir trois critères qui sont essentiels pour des utilisations en bio-imagerie de fluorescence :

- stabilité chimique, colloïdale et photochimique
- brillance élevée
- biodégradabilité et absence de cytotoxicité¹¹

I.2.1. Molécules pour l'imagerie de fluorescence

I.2.1.1. Les molécules organiques

Les sondes moléculaires sont les plus utilisées en imagerie de fluorescence *in cellulo*. Elles se sont rapidement développées grâce à la facilité de synthèse rendue possible par la chimie organique et permettent d'étudier différents phénomènes biologiques. On peut citer les dérivés de BODIPY, de coumarine, de rhodamine ou de fluorescéine¹², dont les structures sont présentées ci-après (Figure 1). Leur structure peut être adaptée en fonction des propriétés optiques et chimiques souhaitées, et elles sont aisément disponibles dans le commerce. En plus de leur propriété de fluorescence, certains fluorophores peuvent être sensibles au pH, à la température, à la présence de dioxygène, à la polarité du milieu ou à différentes entités biologiques comme des protéines, autorisant à détecter et à mieux comprendre les processus se déroulant dans les cellules.

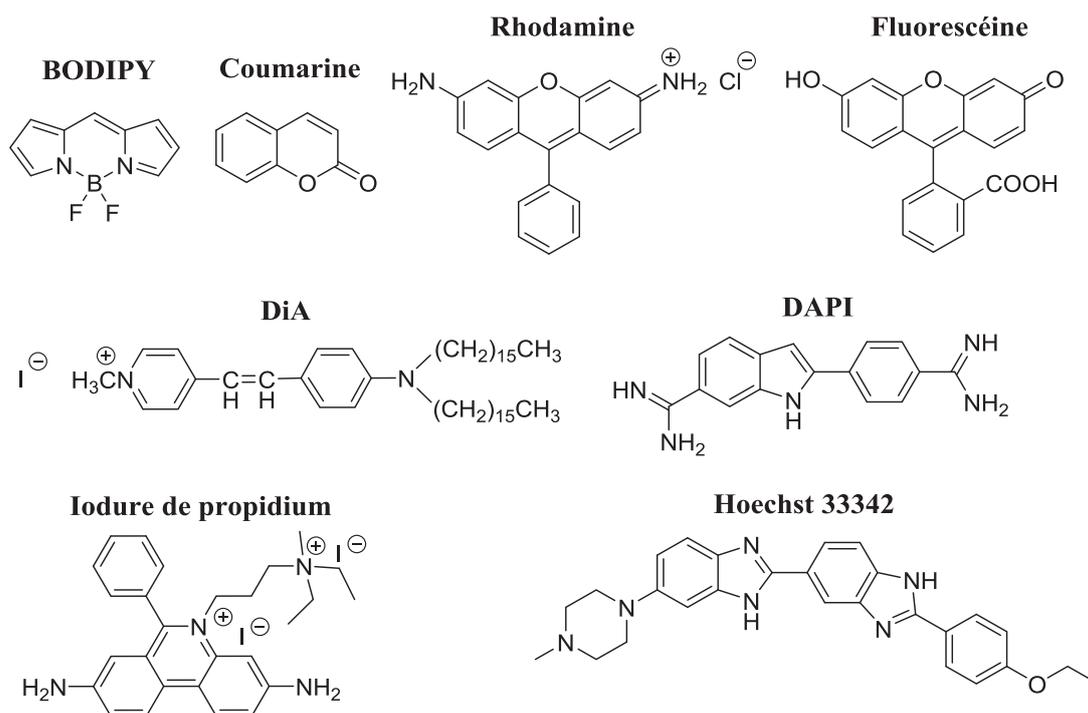


Figure 1 : Structure du squelette de sondes moléculaires les plus communément utilisées en bio-imagerie.

Ainsi, un panel de sondes fluorescentes a été développé présentant des couleurs d'émission distinctes pour signaler simultanément différents événements ou marquer différents compartiments cellulaires. La plupart des fluorophores voient leur structure modifiée pour devenir sélectifs de certains organites. Certains composés sont alors marqueurs de la membrane cellulaire. C'est le cas des dérivés de di-alkyles aminostyryle (DiA), dérivés de cyanine, dont la lipophilicité leur permet de s'insérer dans la bicouche lipidique des membranes (Figure 1). D'autres parviennent à marquer les lysosomes, comme le LysoTracker Green (dérivé de BODIPY), qui colore en vert les compartiments acides de la cellule ($\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} = 511 \text{ nm}$).¹³ Plusieurs fluorophores marquent le noyau en s'intercalant entre les doubles brins de l'ADN, comme le DAPI ou le Hoechst 33342 qui se lient aux paires de bases A-T et émettent dans le bleu ($\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} = 450\text{-}490 \text{ nm}$)¹³. Des colorants comme les SYTOX et l'iodure de propidium se lient également à l'ADN des cellules dont la membrane est endommagée et révèlent donc les cellules en nécrose ($\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} = 617 \text{ nm}$ pour l'iodure de propidium après intercalation dans l'ADN).¹³ Les colorants SYTO, dérivés de cyanine, ont moins d'affinité pour se lier à l'ADN mais peuvent diffuser passivement à travers la membrane de cellules encore vivantes. Enfin, la rhodamine 123 semble se lier aux membranes des mitochondries ($\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} = 534 \text{ nm}$).¹⁴ Ce mécanisme n'a pas été élucidé mais proviendrait peut être d'une interaction entre la charge positive de la rhodamine et le gradient électrique à travers la membrane mitochondriale.

Pour mettre en lumière sélectivement certaines zones de la cellule, il est également possible de greffer le fluorophore à une protéine ou un anticorps. C'est le cas de l'Alexa Fluor 488, fluorophore dérivé de la fluorescéine qui émet dans le vert ($\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} = 520 \text{ nm}$, $\Phi_f = 0,92$, $\tau = 4,1 \text{ ns}$, mesures réalisées dans le PBS à 50 mM en phosphate de potassium et 150 mM en NaCl).^{13,15}

Il est souvent conjugué à de l'agglutinine de germe de blé pour colorer la membrane des cellules en vert car cette lectine se lie aux résidus *N*-Acétylglucosamine et acide *N*-acétylneuraminique des membranes cellulaires.

Cependant, la structure aromatique de ces composés les rend peu hydrosolubles. En milieu aqueux, ceux-ci tendent à s'agréger et à perdre leur émission. Des modifications chimiques ont donc été effectuées. Par exemple, les Alexa Fluor ont été conçus pour améliorer les performances des familles de fluorophores existantes par sulfonation ou greffage de groupes hydrophiles ou chargés, rendant le fluorophore plus hydrophile. Ils se révèlent en général plus photostables, brillants et moins sensibles au pH que les autres colorants dont ils dérivent.¹⁵

Ces composés apportent sans aucun doute une contribution significative à notre compréhension des processus biologiques, comme cela a pu être le cas au cours de ces travaux de thèse. Effectivement, sans eux, l'identification des compartiments cellulaires et des cellules elles-mêmes est délicate, comme en témoigne la Figure 2F, où l'image en transmission ne donne accès à aucune information à part la forme des cellules. Ceci n'est pas le cas des images en microscopie confocale de fluorescence où des sondes moléculaires adéquates (LysoTracker® Green et Hoechst 33342) font apparaître des entités subcellulaires (lysosomes, noyaux) (Figure 2).

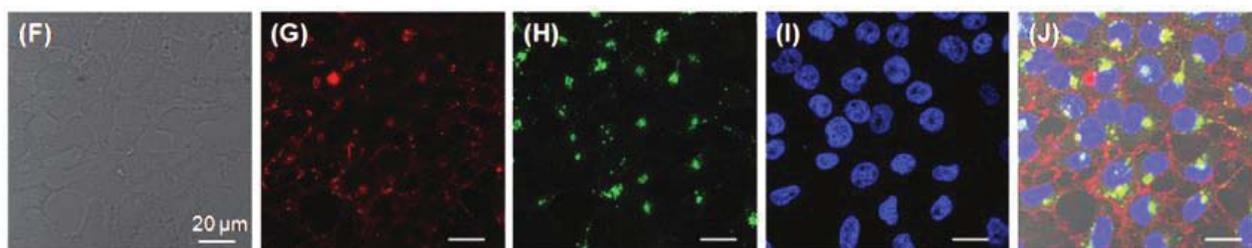


Figure 2 : Image de cellules d'adénocarcinome pulmonaire (F) en transmission, et en microscopie confocale de fluorescence avec (G) des nanoparticules fluorescentes organiques en rouge, (H) du LysoTracker® Green (lysosomes en vert) et (I), du Hoechst 33342 (noyaux en bleus). (J) Fusion des 4 images précédentes. Echelle = 20 µm.¹⁶

Nonobstant une brillance (voir Glossaire) élevée entre 10^4 et 10^5 L.mol⁻¹.cm⁻¹, ces sondes présentent souvent un déplacement de Stokes (voir Glossaire) très faible 350-450 cm⁻¹ ce qui induit une réabsorption du signal émis.^{11,13,17} Elles sont également photosensibles ce qui conduit à une dégradation et à une perte de fluorescence au cours des expériences. De plus, la faible pénétration de la lumière excitatrice rend impossible toute observation *in vivo* autre que des zones superficielles. C'est pourquoi, à l'heure actuelle, peu de molécules ont été autorisées par les agences du médicament en tant que sondes de fluorescence pour des applications cliniques sur l'humain. Quelques unes d'entre elles ont été regroupées dans le tableau ci-après (Tableau 1), présentant les longueurs d'onde d'émission maximale, leur année d'approbation par la FDA (U.S. Food and Drug Administration) et leur utilité en imagerie. Leur structure sont également présentées ci-après (Figure 3).

Tableau 1 : Principales molécules fluorescentes utilisées en clinique.¹⁸⁻²⁰

Nom commercial (entreprise)	Molécule	$\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ (nm)	Approbation par la FDA	Imagerie
IC-Green [®] (Diagnostic Green)	Vert d'indocyanine	830	2007	Vaisseaux sanguins Angiographie de l'œil
	Bleu de méthylène	682	-	Vaisseaux sanguins, tumeurs
Fluorescite [®] (Alcon Lab.)	Fluoréscéine sodique	520	2008	Angiographie de l'œil
Omocianine [®] (Bayer-Schering)	Omocyanine	>750	-	Tumeurs du sein
Cysview [®] (Photocure)	Hexyl aminolévulinate	635	2010	Tumeurs de la vessie
Gleolan [®] (NXDC)	Acide aminolévulinique	620-710	2017	Glioblastome

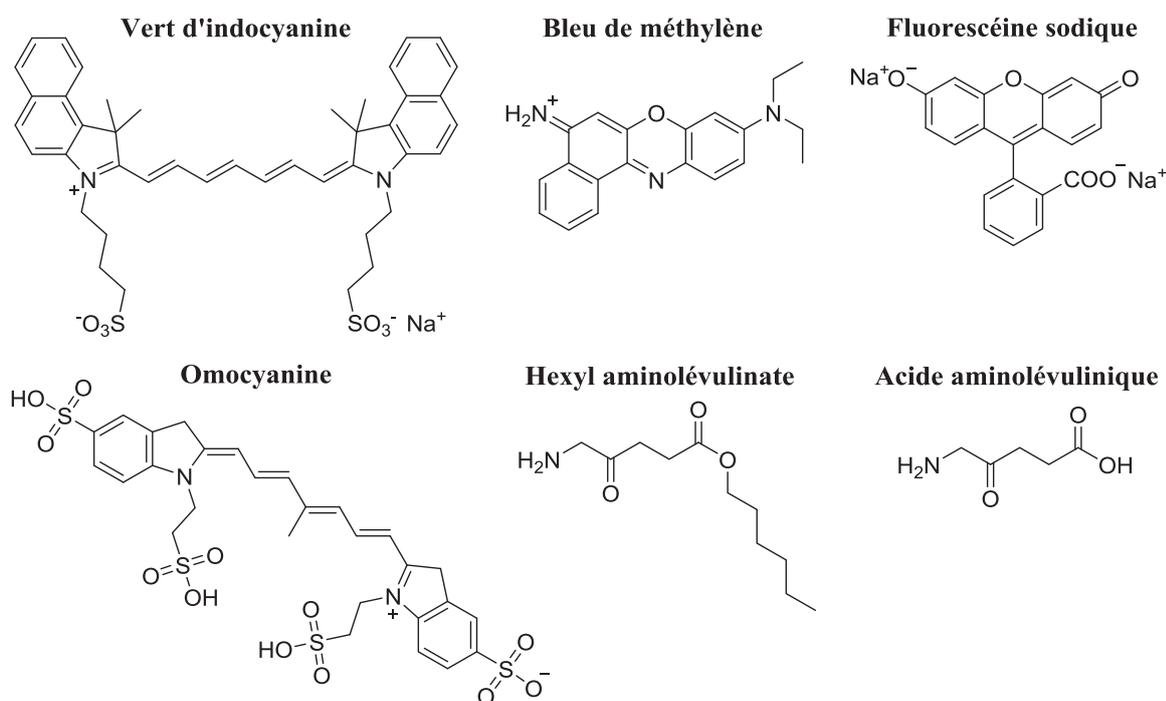


Figure 3 : Structure des principales molécules fluorescentes utilisées en clinique.

Par ailleurs, très peu de molécules émettent dans le proche infrarouge, fenêtre de transparence des tissus biologiques (voir Glossaire). C'est pourquoi des recherches actives sont réalisées dans ce domaine. C'est notamment le cas de l'Omocianine[®] (Bayer-Schering), composé émettant à plus de 750 nm, actuellement utilisé en clinique pour la détection du cancer du sein.²⁰ Le bleu de méthylène et le vert d'indocyanine, deux composés émettant dans le proche infrarouge, sont utilisés depuis de nombreuses années en tant que colorants pour l'histologie et, plus récemment, pour leurs propriétés de fluorescence et d'accumulation dans les zones

tumorales afin de visualiser en temps réel la zone à opérer au moment de la chirurgie.²⁰ Cependant, ces composés souffrent de photoblanchiment et, en milieu aqueux, tendent à s'agréger et perdre leur émission. De plus, le vert d'indocyanine ne présente qu'un faible rendement quantique de fluorescence de 2,5% dans l'eau.²¹ Il a été reporté que l'adsorption de vert d'indocyanine à la surface de protéines contenues dans du sérum d'albumine humaine entraîne la formation de nanoparticules d'environ 7 nm de diamètre, ce qui permet de prolonger significativement le signal de fluorescence.²⁰ Partant de cette évidence, des nanoparticules de type liposome ou polymère chargées en vert d'indocyanine ont alors été fabriquées.^{22,23} Les nanoparticules semblent donc présenter un avantage considérable par rapport aux molécules libres en matière de brillance et de persistance du signal de fluorescence *in cellulo*.

Il existe également de nombreuses autres molécules en essais cliniques comme l'AngioStamp[®], agent de contraste pour l'imagerie peropératoire de tumeurs mis au point par Fluoptics, est une molécule peptidique fluorescente ciblant l'intégrine $\alpha V\beta 3$, un récepteur surexprimé dans de nombreux types de cancer.

I.2.1.2. Les protéines fluorescentes

Les protéines fluorescentes ont largement été étudiées pour leur biocompatibilité. La protéine fluorescente verte (en anglais GFP pour green fluorescent protein) a conduit, suite à des mutations, à un panel de protéines émettant dans des gammes de couleur différente²⁴. Ces travaux réalisés par les professeurs O. Shimomura, M. Chalfie et R. Y. Tsien ont été reconnus par l'octroi du prix Nobel de chimie en 2008. Dans les années 1960, il a été découvert que la GFP était responsable de la bioluminescence de la méduse *Aequorea victoria*. Après son extraction de la méduse, la GFP a été utilisée comme sonde pour l'imagerie *in cellulo*. La structure des protéines fluorescentes se présente sous la forme d'un tonneau β dans lequel se trouve le chromophore dont la fluorescence est ainsi protégée.²⁵ La brillance de ces protéines est donc élevée, autour de 10^4 - 10^5 L.mol⁻¹.cm⁻¹. Le rendement quantique de fluorescence de la GFP est de 79 % dans l'eau. La différence entre les maxima de la bande d'absorption et celle d'émission varie entre 10 et 45 nm, ce qui donne un déplacement de Stokes faible (760 cm⁻¹ pour la GFP) mais néanmoins plus élevé que celui des molécules fluorescentes. Les protéines fluorescentes sont biocompatibles et gardent leur intégrité une fois dans la cellule. De plus, le gène codant pour la GFP peut être fusionné au gène d'une protéine que l'on souhaite étudier afin de la marquer, permettant d'imager sélectivement différents tissus ou compartiments cellulaires. Ceci rend aisément possible l'imagerie de l'évolution de mécanismes biologiques au cours du temps, tels que la division cellulaire par exemple. Cependant, les protéines fluorescentes présentent une pauvre photostabilité, un coût élevé, une fonctionnalisation difficile et sont plutôt fragiles. Ainsi, la fixation des cellules avant imagerie ou des modifications de la température peuvent entraîner la perte de leur fluorescence.²⁶

I.2.2. Nanomatériaux pour l'imagerie de fluorescence

Contrairement aux molécules individuelles, les nanoparticules font preuve d'une brillance et d'une photostabilité exacerbées en plus d'une toxicité moindre due à l'absence d'accumulation dans le noyau.²⁷ La combinaison de ces propriétés a fait des nanomatériaux fluorescents des outils très prometteurs pour l'imagerie de fluorescence de la cellule jusqu'à l'organe.

I.2.2.1. Les nanomatériaux fluorescents existants

Quelques nanomatériaux fluorescents existants ont été représentés dans le schéma ci-dessous (Figure 4) et les propriétés de certains d'entre eux rassemblées dans le tableau ci-après (Tableau 2). Si certains nanomatériaux sont intrinsèquement fluorescents, d'autres doivent être dopés ou greffés avec des molécules fluorescentes. C'est le cas des nanoparticules de silice qui représentent une plateforme idéale où les fluorophores viennent doper la matrice poreuse de silice ou sont greffées par liaisons covalentes avec cette matrice. La silice représente une plateforme avantageuse possédant une grande stabilité colloïdale de par sa charge naturellement négative. En général, dans le cas du dopage, le diamètre des particules varie de 2 à 200 nm. Le dopage a été effectué avec de nombreux fluorophores différents comme la cyanine Cy5, le FITC ou la rhodamine B isothiocyanate. Les fluorophores sont alors stabilisés et leur grand nombre amplifie considérablement la fluorescence.^{28,29} En effet, la brillance de ces nanoparticules avoisine celle des quantum dots, nanomatériaux luminescents détaillés plus loin dans cette partie.³⁰ Cependant, de nombreux désavantages se présentent comme un relargage non contrôlé des fluorophores ou un marquage cellulaire non spécifique.^{29,31}

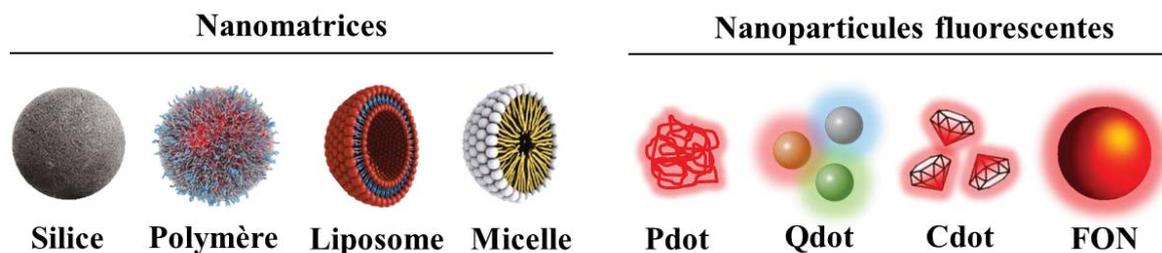


Figure 4 : Représentation des principaux types de nanomatrices pouvant être chargées avec des fluorophores, et de nanoparticules intrinsèquement fluorescentes.

Dans le cas des nanoparticules de polymères, soit le polymère est intrinsèquement fluorescent,³² soit des fluorophores sont emprisonnés dans une matrice de polymère non photoactive.³³ Les nanoparticules organiques de polymères semi-conjugués, nommées Pdots pour polymer dots, présentent un procédé d'assemblage facile par nanoprécipitation. Cette technique consiste en la précipitation dans l'eau de Pdots, préalablement dissous dans un solvant organique miscible à l'eau. Les chaînes de polymère, insolubles dans l'eau tendent à minimiser leur énergie. Pour cela, elles s'auto-assemblent via des liaisons non covalentes pour former des nanosphères organiques, dispersées dans l'eau. Ainsi, les Pdots possèdent une grande brillance autour de 10^5 - 10^6 L.mol⁻¹.cm⁻¹ due à leur système π -conjugué développé et une faible cytotoxicité.³⁴ Le

problème principal repose sur leur hydrophobie conduisant à une faible biodisponibilité. En outre, leur désagrégation, lorsqu'elle se fait, induit une augmentation locale de la viscosité qui rend difficile la délivrance de principes actifs.³⁵ Ces systèmes sont également sensibles à toute modification de la structure du polymère, induisant à son tour une modification de la longueur d'onde d'émission et rendant le signal difficile à suivre en imagerie. De plus, le recouvrement des nuages électroniques π intermoléculaires fait que les électrons peuvent se déplacer facilement le long des squelettes polymériques et induire une extinction en cascade de la fluorescence.³⁶ Dans le cas de matrices polymères non photoactives, des polymères amphiphiles peuvent être utilisés.³³ Dans ce cas, le polymère forme une matrice qui recouvre et stabilise le cœur composé de fluorophores.

Tableau 2 : Quelques nanomatériaux fluorescents pour l'imagerie et leurs propriétés.

		Nanomatériaux fluorescents				
		Qdots Cdots	Pdots	Silice dopée	Lipo- somes	FONs
Propriétés	Brillance	+	+	--	-	+
	Photostabilité	++	-	+	+	+
	Stabilité colloïdale	--	-	+	-	+
	Toxicité	--	+	-	+	+
	Facilité fonctionnalisation	-	-	+	+	+
	Contrôle relargage drogue	+	+	+	-	+
	Références ^{28,37-40}	41,42	43	29	44	45,46

Comme les nanoparticules de silice ou de polymère, les liposomes et les micelles représentent des matrices de stockage de fluorophores. Les liposomes ont la capacité d'encapsuler des entités hydrophobes dans leur membrane lipidique et hydrophiles en leur cœur. De plus, ils sont biocompatibles et biodégradables et ont déjà été mis sur le marché en tant que nanovecteurs de principes actifs.⁴⁴ Cependant, les nano-objets résultants sont très peu brillants, instables, polydispersés et toxiques après administrations répétées.

Pour pallier les limitations d'une émission faible, les quantum dots (Qdots), appelés boîtes quantiques en français, classe de nanomatériaux intrinsèquement luminescents, ont été rapidement considérés comme une alternative intéressante. Les Qdots sont des nanocristaux semi-conducteurs le plus souvent de type cœur-coquille. Cette structure permet de bénéficier d'un confinement quantique des charges et des densités d'états. Ainsi, la bande interdite augmente de manière inverse à la taille des nanoparticules.⁴⁷ Le plus souvent, les Qdots sont constitués d'un cœur à base de CdTe ou de CdSe et d'une coquille de ZnS. Par comparaison avec les molécules fluorescentes organiques, les Qdots possèdent les mêmes rendements quantiques de luminescence mais ont des coefficients d'extinction molaire 10 à 50 fois plus élevés.⁴⁸ Ainsi, ils présentent une brillance très élevée de 10^6 L.mol⁻¹.cm⁻¹. Leur temps de vie de fluorescence est également élevé et supérieur à 10 ns.⁴⁹ De plus, ils sont photostables et leur longueur d'onde d'émission est modifiable à façon puisqu'elle augmente avec leur taille, usuellement de 2 à 10 nm. Si la taille de leur cœur dépasse les 6 nm ils émettront dans le rouge

voire le proche infrarouge. Cependant, ils présentent des problèmes de photoclignotement et possèdent une faible stabilité chimique. La synthèse des Qdots s'effectue en milieu hydrophobe et nécessite un échange de ligand pour les rendre hydrophile encore mal contrôlé. Leur fonctionnalisation est difficile et les métaux relargués sont toxiques, particulièrement le cadmium, ce qui les empêche d'atteindre les tests pré-cliniques.^{11,41} C'est pour cette raison qu'actuellement les efforts se tournent vers le remplacement de Cd et Se par Cu et In.^{50,51}

Les Carbon dots (Cdots) sont une autre classe de nanomatériaux luminescents prometteurs. Ce sont des clusters d'atomes de carbone d'une taille de 2 à 8 nm et d'une brillance relativement élevée autour de $10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.^{52,53} Malgré leur biocompatibilité, leur faible toxicité et leur synthèse aisée, leur fonctionnalisation est difficile et ils restent peu sélectifs car leur fluorescence dépend du pH et de la température du milieu.⁴² Les nanodiamants, contenant des centres colorés azote-lacune, semblent actuellement plus prometteurs.⁵⁴ Plus brillants que les Cdots, leur structure leur confère des propriétés intéressantes pour du suivi cellulaire, comme une émission dans la fenêtre thérapeutique, une photorésistance et un temps de vie long d'environ 20 ns.⁵⁵ Malheureusement, leur synthèse a recours à des conditions extrêmes et nécessite donc un matériel adapté (bombardement de faisceau d'ions, températures élevées autour de 800 °C,...).⁵⁶

Les ions lanthanides sont également reconnus pour leurs propriétés de fluorescence mais seront abordés ultérieurement dans ce chapitre car ce sont des systèmes utilisés pour l'imagerie IRM.

Voyons désormais en quoi consistent les FONs, ou nanoparticules organiques fluorescentes, qui semblent être des agents d'imagerie de fluorescence prometteurs au regard des observations collectées dans le Tableau 2.

I.2.2.2. Les nanoparticules organiques fluorescents

La nécessité de pallier ces inconvénients a favorisé l'émergence de nanoassemblages organiques supramoléculaires, connus depuis les années 90.^{57,58} Ils ont été largement utilisés ces dernières années dans les matériaux optiques.^{59,60} Plus récemment, on les utilise pour des applications en bio-imagerie.^{45,61,62} Ces assemblages sont synthétisés par nanopréciipitation,⁶³ ablation laser de microcristaux⁶⁴ ou encore par le biais d'une matrice sol-gel.⁶⁵

Parmi ces nanoassemblages, on retrouve les FONs pour nanoparticules organiques fluorescentes (*fluorescent organic nanoparticles* en anglais). Elles présentent de nombreux avantages comme un procédé d'assemblage facile par nanopréciipitation et peu coûteux. Cette technique de nanopréciipitation utilisée au laboratoire est présentée ci-après (Figure 5) et sera détaillée ultérieurement (Chapitre 2). En modulant la nature des fluorophores constitutifs des FONs, il est possible de développer un panel de nanosphères émettant dans des plages de longueurs d'onde différentes.⁶⁶ De par leur haute densité en unités actives d'environ 10^5 fluorophores par FONs,⁶⁷ les FONs sont très brillantes, et ce 3 à 4 fois plus que la plupart des molécules fluorescentes. Malgré cette grande densité en fluorophores, la plupart des FONs souffrent d'extinction de fluorescence. Cette extinction peut être due à la formation d'empilement des squelettes π des fluorophores, ici délétère et donc appelée ACQ (voir

Glossaire), ce qui peut être contrebalancé par l'introduction de groupes encombrants, comme des groupes *tert*-butylphényles ou spiro, ou twistés, comme des groupes triarylamines.^{62,68,69} Elle peut également être due à un transfert d'énergie radiatif ou non radiatif entre fluorophores, qui peut être évité en minimisant le recouvrement entre les spectres d'absorption et d'émission, c'est-à-dire en augmentant le déplacement de Stokes.⁷⁰ Les FONs sont utilisées depuis quelques années en imagerie mono- et bi-photonique.⁴⁵ Elles sont non-cytotoxiques et biocompatibles, présentent une stabilité chimique et colloïdale élevées dans différents milieux de culture et sont photostables.⁷¹ C'est pourquoi ces systèmes ont été choisis dans le cadre de cette thèse en tant qu'agents d'imagerie.

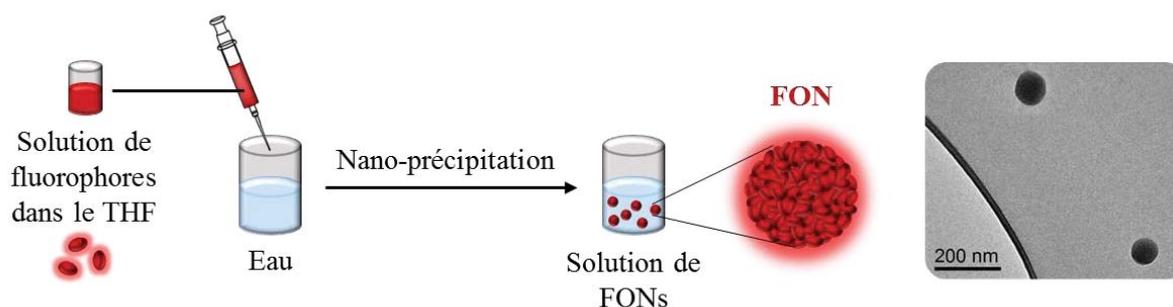


Figure 5 : Procédé de fabrication des FONs développées au laboratoire accompagné d'un cliché de microscopie électronique en transmission (MET) de FONs.

Cette partie a été l'occasion d'aborder l'imagerie de fluorescence, technique prometteuse mais qui souffre de quelques limitations inhérentes à la nature de la sonde luminescente choisie. Dans le cadre des études menées au laboratoire et notamment concernant cette thèse, les FONs, bonnes candidates pour l'imagerie *in cellulo*, ont été choisies.

Pour étendre les investigations à des considérations *in vivo*, nous allons voir qu'il est possible de combiner au sein d'un même objet ces propriétés de fluorescence à de nouvelles entités connues pour leur potentialité comme agents de contraste *in vivo*. L'obtention d'un tel objet multimodal est décrite ci-après.

I.3. Vers la multimodalité : l'imagerie de résonance magnétique

De nombreuses autres techniques d'imagerie sont actuellement utilisées pour les investigations *in vivo*. Quelques unes d'entre elles sont rassemblées dans le tableau ci-après (Tableau 3) où elles sont comparées en termes de sensibilité, de résolution spatiale et de profondeur de pénétration. Par exemple, l'imagerie nucléaire par émission de positrons (PET), qui nécessite des produits radioactifs, est très sensible mais présente une faible résolution spatiale. Au contraire, la tomodensitométrie (CT), utilisant des rayons X, et l'IRM souffrent d'une faible sensibilité mais offrent une haute résolution sub-millimétrique. Les imageries PET et CT trouvent également une limitation suite aux risques d'exposition aux rayonnements ionisants utilisés. Une quatrième technique émergente fondée sur une excitation laser et la détection d'une onde acoustique provenant de la zone « échauffée » est l'imagerie photoacoustique. Cette technique permet une localisation plus fine que celle obtenue par les ultrasons. De plus, le dispositif utilisé pour ce type d'imagerie est portable et moins coûteux que ceux impliquant l'imagerie PET ou l'IRM. La microscopie de fluorescence propose d'excellentes sensibilité et résolution spatiale mais la profondeur de pénétration dans les tissus est un facteur limitant du fait de l'absorption des tissus dans le domaine du visible. Toutes ces techniques d'imagerie ont souvent recours à un agent de contraste qui leur est propre afin de créer ou d'augmenter le signal à détecter. Cependant, chaque technique possède ses avantages et ses inconvénients et souvent une seule technique ne permet pas d'avoir accès à toutes les informations désirées. C'est pourquoi la combinaison de plusieurs agents de contraste au sein d'un même nano-système permet de rassembler le meilleur de chaque technique d'imagerie en termes de sensibilité, de résolution et de profondeur de pénétration. Des corrélations croisées offrent alors l'avantage de mieux comprendre les systèmes biologiques étudiés et/ou le suivi des traitements administrés.

Tableau 3 : Comparaison entre différentes techniques d'imagerie.^{10,72}

Technique	Agents d'imagerie	Sensibilité	Résolution	Profondeur de pénétration	Utilité première
Microscopie de fluorescence	Fluorophores	$\sim 10^{-9}$ M	nm	mm	Cellules
IRM	Gd, Fe _x O _y	$\sim 10^{-6}$ M	50-100 μ m	Pas de limite	Divers
CT	I, Ba	$\sim 10^{-3}$ M	50 μ m	Pas de limite	Poumon et os
PET	¹⁸ F, ⁶⁴ Cu, ⁶⁸ Gd	$\sim 10^{-12}$ M	mm	Pas de limite	Divers
Photoacoustique	Au, C	-	20-200 μ m	cm	Vaisseaux sanguins

Si les techniques d'imagerie monomodales sont toutes utilisées en clinique, très peu de techniques multimodales ont passé le stade du modèle du petit animal. La combinaison PET-CT est actuellement commercialisée pour l'imagerie du corps humain et la PET-IRM pour le petit animal.⁷³ L'imagerie de fluorescence est très appréciée pour sa simplicité d'utilisation et permet d'imager de l'échelle de l'organe à l'échelle subcellulaire. Cette technique est le plus souvent combinée à l'IRM en raison des propriétés complémentaires résultantes.³⁸ Nous avons vu l'apport de l'imagerie de fluorescence qu'il semble intéressant de coupler à l'IRM. Voyons maintenant en quoi consiste cette dernière.

I.3.1. Imagerie de Résonance Magnétique

I.3.1.1. Le principe de fonctionnement de l'IRM

L'IRM (Imagerie de Résonance Magnétique) est une des techniques d'imagerie les plus communément utilisées. Elle repose sur la résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton. Sachant que le corps humain est composé à 60 % d'eau, c'est le signal des protons de l'eau qui va être analysé. Pour mieux comprendre ce phénomène, un schéma explicatif est représenté sur la figure ci-après (Figure 6). En présence d'un champ magnétique extérieur et statique B_0 , les moments magnétiques de spin des protons de l'eau, représentés par un moment magnétique total, noté M sur le schéma, vont précesser autour de la direction du champ B_0 . Une impulsion radiofréquence B_1 excite les protons en faisant basculer leur moment magnétique dans un plan perpendiculaire à (Oz) et leur relaxation vers l'état initial est mesurée après l'impulsion.

Le moment magnétique total lors de sa relaxation peut être décomposé en deux composantes M_z et M_{xy} : une composante selon l'axe (Oz) associée la **relaxation longitudinale R_1** et à un temps de relaxation T_1 ($R_1 = 1/T_1$) et une composante dans le plan (Oxy) associée à la **relaxation transversale R_2** et à un temps de relaxation T_2 ($R_2 = 1/T_2$). La relaxation R_i est décrite par la valeur r_i appelée **relaxivité**. La relaxation transversale R_2 correspond à une relaxation spin-spin due à des interactions entre moments dipolaires magnétiques de spin. Des hétérogénéités locales du champ magnétique et des interactions entre les spins sont à l'origine de vitesses de précession différentes. Ce déphasage entre les spins est responsable de l'atténuation de l'aimantation dans le plan (Oxy) .⁷⁴ La relaxation longitudinale R_1 correspond à une relaxation spin-réseau, où les spins échangent leur énergie avec le milieu extérieur.

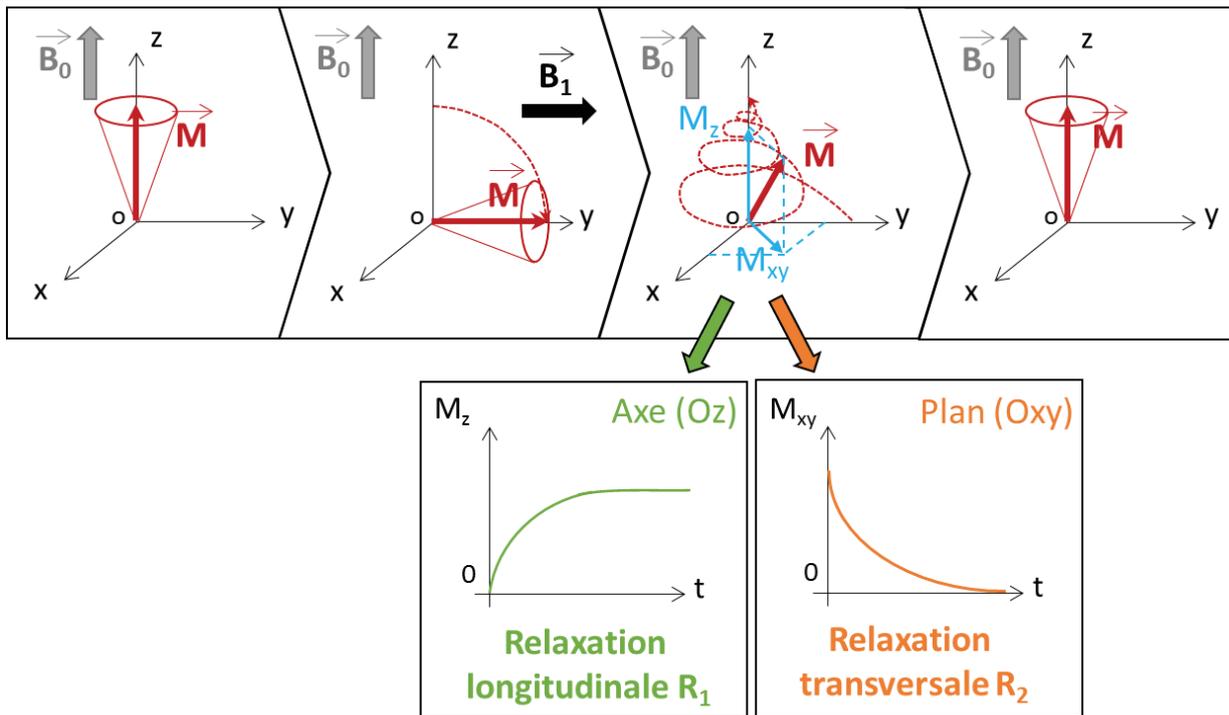


Figure 6: Schéma explicatif de l'IRM. La relaxation longitudinale R_1 est mesurée par rapport à l'axe (Oz) et la relaxation longitudinale R_2 selon le plan (Oxy). M : aimantation totale (ou moment magnétique total) évoluant au cours du temps, B_0 : champ magnétique extérieur, B_1 : impulsion radiofréquence.

Pendant la relaxation, l'aimantation globale induite va décroître en fonction du temps, ce qui correspond au signal de précession libre ou FID (free induction decay en anglais). Ce signal va être décomposé en une série de fréquences propres à chaque proton dans un environnement donné grâce à une transformée de Fourier et ce pour chaque volume élémentaire de l'échantillon. La reconstruction dans l'espace de ces signaux donne l'image finale. Les différents tissus du corps humain ne présentent ni la même densité en molécules d'eau ni la même composition. Ainsi, leurs signaux seront différents, permettant de déterminer une cartographie de la zone imagée.

Le premier cliché IRM réalisé sur le vivant, en l'occurrence un pouce, est né de la collaboration de P. Mansfield et P. Lauterbur dans les années 70, récompensés par le prix Nobel de physiologie ou médecine en 2003.⁷⁵ Depuis, le développement de la technique a permis d'obtenir des images de plus en plus résolues (Figure 7).

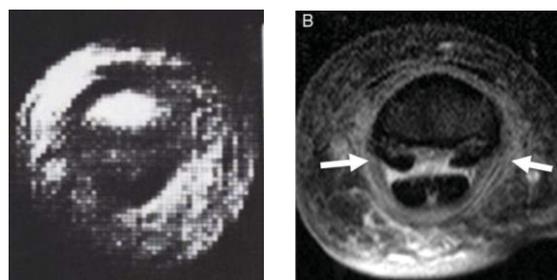


Figure 7: A gauche le premier cliché IRM d'un doigt⁷⁶, à droite une image obtenue 40 ans plus tard.⁷⁷

Pour obtenir un bon contraste, il est nécessaire d'avoir des relaxations R_1 ou R_2 élevées. L'utilisation d'agents de contraste perturbe la relaxation des protons et permet ainsi de diminuer la durée de l'examen et d'augmenter le contraste de l'image, donnant ainsi accès à des informations supplémentaires. Un **agent de contraste positif** (agent T_1) va réduire le temps de relaxation longitudinal T_1 menant à un éclaircissement de la zone concernée. Un **agent de contraste négatif** (agent T_2) va, quant à lui, réduire le temps de relaxation transversal T_2 et mener à un assombrissement de la zone. Ainsi, si la diffusion des molécules d'eau autour de l'agent de contraste est entravée, les échanges d'énergie entre les spins des protons de l'eau et l'agent ne sont pas facilités et la relaxation longitudinale R_1 est considérablement ralentie.⁷⁸ D'autre part, si les molécules d'eau sont liées à de grosses molécules moins mobiles, la fluctuation de leur spin est bloquée, leur temps de relaxation est donc plus élevé et alors le R_2 est plus faible.

I.3.1.2. Les agents de contraste pour l'IRM

Les agents de contraste ont fait leur apparition en 1988 avec le Magnevist, agent de contraste positif à base de gadolinium possédant un ligand DTPA (acide diéthylène triamine penta acétique) (Tableau 4). Aujourd'hui encore, la plupart des agents sur le marché sont de type positif et à base de complexes de gadolinium, composés paramagnétiques (voir chapitre 4). Si le Magnevist reste le plus utilisé avec 51 % de part de marché,¹⁰ différents ligands macrocycliques ont été développés depuis (DTPA, DOTA, DO3A,...) pour diminuer le relargage des ions Gd^{3+} et leur toxicité par incorporation dans les tissus, notamment osseux. Cependant, depuis une dizaine d'années, des études attestent malgré tout d'un relargage des ions gadolinium qui complexent, de manière compétitive avec d'autres ions endogènes comme Ca^{2+} , certains ligands biologiques comme des enzymes telles que l'adénosine triphosphatase, bloquant leur activité.⁷⁹ Les ions Gd^{3+} sont excrétés grâce au système rénal et sont donc contre-indiqués pour les patients en insuffisance rénale.⁸⁰ C'est pourquoi, depuis 2017, certains d'entre eux font l'objet d'une recommandation de retrait.⁸¹ De plus, leurs relaxivités restent faibles, entre 3 et 4 $mM^{-1}.s^{-1}$ pour un champ de 0,47 T, ce qui est dû au fait qu'une seule molécule d'eau ne peut approcher l'ion Gd^{3+} .⁸²

Tableau 4 : Quelques agents de contraste T_1 actuellement sur le marché européen et leurs propriétés.^{83,84}

Nom commercial (entreprise)	Structure	Relaxivité (mM.s) ⁻¹ à 0,47 T	Imagerie	Autorisation par l'Europe
Magnevist [®] (Bayer-Schering)	Gd-DTPA	$r_1=3,4$ $r_2=4$	Cerveau, moëlle epinière	1988
Dotarem [®] (Guerbet)	Gd-DOTA	$r_1=3,4$ $r_2=4,1$	Cerveau, moëlle epinière	1989
ProHance [®] (Bracco Imaging)	Gd-DO3A-HP	$r_1=3,1$ $r_2=3,7$	Cerveau, moëlle epinière	1999

Ainsi, la recherche s'est développée autour d'autres types d'agents d'imagerie : les nanoparticules magnétiques.

I.3.1.3. Les nanoparticules magnétiques

Il existe différents types de nanoparticules magnétiques : les métaux, leurs alliages et les oxydes métalliques.⁸⁵ Les métaux sont instables et souffrent d'oxydation. Les alliages sont principalement composés de fer, de nickel et de cobalt de par leurs importantes propriétés magnétiques. Néanmoins, ils sont chimiquement peu stables et peu biocompatibles en plus d'être sensibles à l'oxydation. Parmi les oxydes de métaux, on retrouve les oxydes de nickel ou encore les ferrites spinelles $M_xFe_{3-x}O_4$ ($M = Mn, Fe, Co, Ni, Zn, x = 0-1$). Même si ces ferrites présentent de meilleures propriétés d'échauffement, la magnétite (Fe_3O_4) et la maghémite ($\gamma-Fe_2O_3$) présentent des propriétés de biocompatibilité plus élevées. En effet, après dégradation dans le milieu lysosomal acide, les ions Fe^{3+} sont stockés dans des protéines appelées ferritines.⁸⁶⁻⁸⁸ La magnétite et plus particulièrement la maghémite seront donc les nanoparticules magnétiques qui feront l'objet de notre étude.

Certains agents de contraste à base de nanoparticules magnétiques ayant été proposés au marché européen sont rassemblés dans le tableau ci-après (Tableau 5). Ces nanoparticules sont recouvertes de polymères pour assurer leur stabilité, éviter leur sur-agrégation et les assembler en un plus gros nano-objet pour obtenir une amélioration du contraste par effet additif. Cependant, nombre de ces produits ont été retirés du marché comme c'est le cas de l'Endorem[®], commercialisé en 1994 et retiré en 2012 pour des raisons commerciales. Concernant le Sinerem[®], l'entreprise Guerbet a été contrainte de retirer sa demande d'autorisation de mise sur le marché car le produit n'améliorait pas suffisamment le contraste des images.⁸⁹

Tableau 5 : Quelques agents de contraste T_2 ayant été proposés au marché européen et leurs propriétés. d_{sec} est le diamètre des nanoparticules. d_H est le diamètre hydrodynamique de l'assemblage des nanoparticules avec le polymère.^{83,84,90}

Nom commercial (entreprise)	d_{sec} (nm)	Polymère	d_H (nm)	Relaxivité (mM.s) ⁻¹ à 0,47 T	Imagerie	Autorisation par l'Europe
Endorem [®] (Guerbet) Feridex [®] (Berlex Lab.)	4-5	Dextran	80-150	$r_1=27$ $r_2=152$	Foie	1994 (retirée en 2012) 2001
Resovist [®] (Bayer-Schering)	4	Carboxy-dextran	60	$r_1=21$ $r_2=86$	Foie	2001
Sinerem [®] (Guerbet)	4-5	Dextran	20-40	$r_1=23$ $r_2=53$	Ganglions lymphatiques	Retirée en 2007

Le diamètre des nanoparticules d'oxyde de fer va conditionner leur type, positif ou négatif. En effet, au-delà de 5 nm de diamètre les nanoparticules opèrent comme des agents de contraste T_2 et en-deçà T_1 .⁷⁵ Dans le cas d'un agent de contraste T_2 comme la maghémite, le meilleur contraste sera obtenu pour les systèmes présentant, en plus d'une valeur de r_2 élevée, un rapport entre la relaxation transversale et la relaxation longitudinale r_2/r_1 le plus élevé possible.

Au vu des propriétés ci-dessus, les travaux de thèse rapportés dans ce manuscrit se sont intéressés à l'élaboration et à l'utilisation de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer de type maghémite présentant un contraste en T_2 .

Après avoir décrit différents types d'imagerie et notamment l'imagerie de fluorescence et l'IRM, voyons maintenant comment obtenir des objets permettant de combiner ces deux techniques.

I.3.2. Systèmes multimodaux magnéto-fluorescents

I.3.2.1. Les complexes lanthanides

Les complexes de lanthanide sont appréciés pour leur double utilisation en imagerie.¹⁰

En effet, ils sont luminescents et la plupart d'entre eux sont magnétiques. Cependant, leurs coefficients d'absorption molaires sont faibles ($0,1-10 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). C'est pourquoi ils doivent être combinés à des ligands organiques servant d'antennes pour transférer l'énergie absorbée à l'ion métallique central et ainsi obtenir une brillance autour de 10^4 à $10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, suffisante pour une utilisation en imagerie optique.⁸² Ces complexes présentent par ailleurs des bandes d'absorption et d'émission très fines. L'émission des ions lanthanides couvre une large gamme spectrale, de l'ultraviolet pour l'ion Gd^{3+} à l'infrarouge pour les ions néodyme Nd^{3+} , erbium Er^{3+} ou ytterbium Yb^{3+} ($\lambda_{\text{em}} = 1065, 1509$ et 978 nm , respectivement). Certains d'entre eux, comme les ions europium Eu^{3+} ou terbium Tb^{3+} ($\lambda_{\text{em}} = 550$ et 620 nm), présentent une durée de vie de luminescence de l'ordre de la milliseconde. Ceci peut être utile pour des observations en microscopie résolue en temps, pour ne pas être gêné par l'autofluorescence des tissus biologiques. Les propriétés photophysiques de ces complexes sont insensibles à la nature chimique des ligands mais sensibles à la géométrie de la sphère de coordination. La luminescence de l'ion lanthanide peut être éteinte en présence de molécules d'eau qui se coordonnent et entraînent des désactivations non radiatives par couplage vibrationnel avec les liaisons O-H. Il est donc essentiel de protéger les ions de l'eau.⁹¹

Ces complexes sont également utilisés en IRM pour leur moment magnétique élevé, l'ion Gd^{3+} restant le plus utilisé. Cependant, comme il a été vu précédemment, leur relaxivité reste faible (entre 3 et $4 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ à $0,47 \text{ T}$), ce qui est dû au fait qu'une seule molécule d'eau ne peut se coordonner ou s'échanger à proximité de l'ion Gd^{3+} .

Pour obtenir des complexes lanthanides pour l'imagerie bimodale il est donc nécessaire de trouver un compromis entre les échanges de molécules d'eau, délétère pour le signal de fluorescence mais nécessaire pour le signal IRM.

I.3.2.2. La formation d'assemblages multimodaux magnéto-fluorescents

Si les ions lanthanides offrent intrinsèquement la possibilité d'une imagerie bimodale, ce n'est pas le cas des autres systèmes où il est nécessaire d'assembler différentes entités pour y arriver. Parmi les techniques d'assemblage, on retrouve le simple greffage d'entités fluorescentes à la surface de nanoparticules magnétiques.⁹²⁻⁹⁴ La combinaison au sein d'un même nano-édifice a été étudiée pour protéger la fluorescence d'une extinction par le milieu environnant : des nanoparticules magnétiques et des quantum dots ont été assemblés au sein d'une matrice de silice⁹⁵ ou encore des nanoparticules magnétiques et des Pdots ont été incorporés dans des micelles phospholipidiques.⁹⁶ Ces édifices sont représentés ci-après (Figure 8). Des structures cœur-coquille ont aussi été développées. Certaines structures adoptent un cœur fluorescent et une coquille magnétique, comme par exemple un cœur de silice dopé avec des fluorophores et couvert d'une coquille magnétique.⁹⁷ D'autres structures sont basées sur un cœur magnétique recouvert d'une coquille fluorescente. Ces édifices sont, par exemple, constitués d'une nanoparticule magnétique recouverte de silice dopée par de la fluorescéine⁹⁸ ou de quantum dots⁹⁹. Mais ils peuvent également être sous la forme d'un assemblage de nanoparticules magnétiques dans une matrice de silice¹⁰⁰ ou liposomale¹⁰¹ où la couche fluorescente de Qdots ou de rhodamine respectivement, est situé vers l'extérieur. Ce type de système cœur-coquille permet d'éviter l'extinction de l'émission par transfert d'électrons vers les nanoparticules magnétiques, d'où la nécessité d'en éloigner les entités fluorescentes tout en disposant d'un nombre élevé d'entités actives.

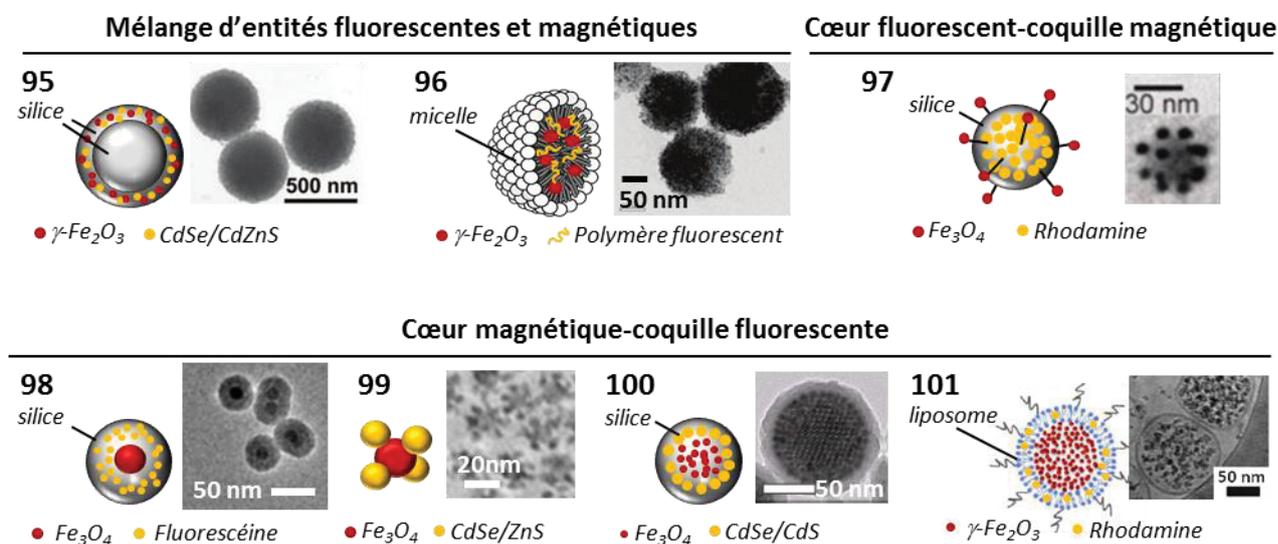


Figure 8 : Représentations schématiques et images MET de nanoassemblages multimodaux magnéto-fluorescents.

I.3.2.3. Les systèmes multimodaux développés au laboratoire

Ce type d'architecture cœur-coquille a donc été sélectionné comme modèle pour les nanoassemblages multimodaux développés au laboratoire et appelés FONmag. Ils sont basés sur un cœur de molécules fluorescentes recouvert de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer (Figure 9) et ont fait l'objet d'un brevet.¹⁰² La formation d'un tel assemblage est rendue possible par la présence dans la structure du fluorophore d'unités chélatant les ions Fe^{2+} et Fe^{3+} des nanoparticules magnétiques. Leur charge globalement négative autour de -40 mV assure une stabilité colloïdale par répulsion électrostatique. Comme pour les FONs, le procédé de fabrication est très simple¹⁰³ et permet de modifier à façon les entités constitutives du nanoassemblage, que ce soit le cœur fluorescent ou la coquille magnétique.¹⁰⁴

Ces systèmes sont dotés d'une aimantation comparable à celles de structures comprenant un cœur inorganique.¹⁰⁴ En outre, ils présentent une brillance élevée grâce à un haut taux de charge en fluorophores qui se trouvent être protégés du photoblanchiment par la coquille magnétique.⁶⁷ Chaque assemblage rassemble environ 10^4 nanoparticules magnétiques.⁶⁷ Ceci crée de larges inhomogénéités dans le champ magnétique induit à proximité des nanoparticules magnétiques conduisant à une diminution du temps de relaxation transversale T_2 et à l'obtention d'un agent de contraste IRM performant. Des images IRM du foie de petits rongeurs après injection de cet agent ont révélé un contraste exacerbé de 50% avec une dose de fer 10 fois moins importante que celle utilisée usuellement.¹⁰⁵ Des images en microscopie confocale et en microscopie électronique à transmission ont montré que les nanoassemblages étaient toujours émissifs et intègres 24 h après leur injection *in vivo*.

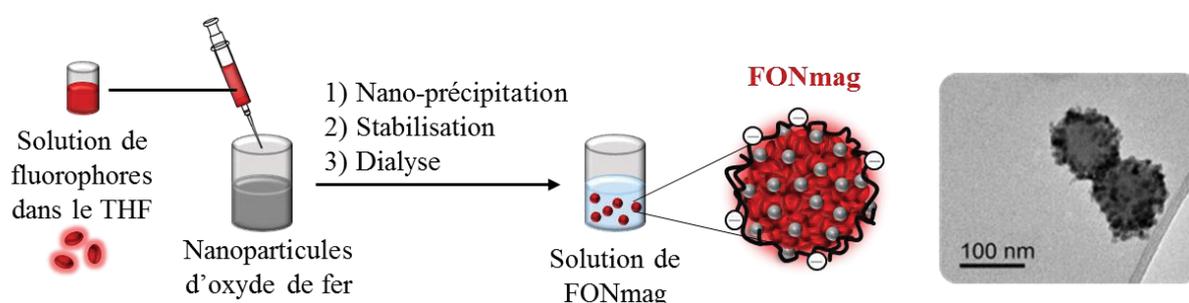


Figure 9 : Procédé de fabrication et structure des nanossemblages hybrides développés au laboratoire accompagné d'un cliché de microscopie électronique en transmission (MET) de FONmag.

Enfin, ces assemblages sont recouverts d'une couche de polyélectrolyte assurant la protection et la stabilité de l'édifice. Différents polymères ont été choisis en fonction du but recherché : la post-fonctionnalisation des systèmes avec des anticorps¹⁰⁶, des protéines ou des peptides ou encore une augmentation de la furtivité des systèmes en ajoutant des unités PEGylées. Ces aspects seront développés dans la partie suivante.

La multimodalité reposant sur la combinaison de différentes techniques d'imagerie peut aussi s'étendre à des aspects thérapeutiques comme l'encapsulation de principes actifs dans le nanoassemblage. Le système présente ainsi la capacité de soigner sur commande (thérapie) et d'imager les zones traitées (diagnostic) devenant un véritable outil théranostique. L'importance

de tels objets est capitale pour le développement de médicaments personnalisés ciblant spécifiquement la maladie d'un patient. Intéressons-nous de plus près à ces aspects théranostiques.

I.4. Les nanomatériaux comme agents théranostiques

Cette partie s'intéresse à l'utilisation de nanoparticules en tant qu'agents théranostiques. Dans cette optique, il existe deux approches. La première approche implique des systèmes intrinsèquement thérapeutiques qui vont induire une réponse toxique sous l'effet d'un stimulus externe. Par exemple, l'entreprise NH TherAguiX a développé des nanoparticules d'oxyde de gadolinium pour le diagnostic par IRM et le traitement des métastases cérébrales par radiothérapie. Un second exemple concerne des nanoparticules développées par l'entreprise Nanobiotix et présentant un cœur inorganique d'oxyde d'hafnium (HfO₂) pour l'imagerie par rayons X et le traitement de cancers par radiothérapie.

La deuxième approche passe par l'utilisation de nanocargos permettant d'encapsuler des principes actifs. C'est cet aspect qui nous intéressera particulièrement en mettant l'accent sur une pathologie en particulier : le cancer. D'abord, les différentes techniques d'encapsulation au sein de nanovecteurs existantes seront développées. Le ciblage de principe actif vers la tumeur sera alors présenté. Puis, seront exposés les mécanismes d'endocytose des nanoparticules, ainsi que le phénomène d'échappement endosomal, nécessaire pour que le principe actif atteigne sa cible. Enfin, le contrôle de la délivrance du principe actif hors du nanovecteur par l'application de stimuli sera abordé, avec un focus sur l'hyperthermie liquide magnétique.

I.4.1. Encapsulation de principes actifs et ciblage

I.4.1.1. L'encapsulation de principes actifs

L'idée de ciblage de principes actifs a été développée dès 1900 par le prix Nobel Paul Ehrlich avec le concept de « magic bullet ». ¹⁰⁷ Une centaine d'années plus tard, les nanotechnologies offrent une nouvelle opportunité de libérer un principe actif sélectivement dans les zones tumorales. Après injection dans le corps, les molécules de principe actif font face à différentes barrières physiologiques comme l'élimination rénale ou la phagocytose (détaillée ultérieurement). ¹⁰⁸ Elles doivent également résister à l'action non-sélective de protéines membranaires ou d'enzymes. C'est le cas de la gemcitabine, un antinéoplasique dégradé dans le cytoplasme par une enzyme en un dérivé uracile inactif. Les mécanismes de résistance aux médicaments développés par les organismes dans différents compartiments cellulaires, comme la membrane, le cytoplasme ou le noyau, éliminent donc rapidement les molécules thérapeutiques. ³ De plus, leur manque de solubilité dans l'eau mène souvent à leur agrégation ou à leur dégradation. En effet, 60 % d'entre elles sont hydrophobes. Le manque de spécificité des principes actifs provoque des effets secondaires. En outre, leur suivi est impossible une fois qu'ils ont été administrés dans le corps. ¹⁰⁹ L'encapsulation du médicament au sein d'un

nanovecteur permet de le protéger pour passer les barrières physiologiques, tout en limitant sa toxicité, et de suivre sa délivrance. La taille des nanovecteurs, typiquement entre 10 et 100 nm,^{3,110} leur permet d'être sélectifs vis-à-vis des tissus cancéreux grâce à l'effet EPR, Enhanced Permeability and Retention en anglais, effet de perméabilité et de rétention accrues.¹¹¹ En effet, si les nanoparticules ne peuvent pas traverser les tissus des vaisseaux sanguins sains, compacts, elles peuvent pénétrer par diffusion dans les vaisseaux alimentant les tissus cancéreux, inflammés. Cet effet repose sur deux propriétés des tissus cancéreux, à savoir une vascularisation perméable et un drainage lymphatique ralenti.

Plus de la moitié des techniques d'encapsulation en clinique repose sur l'utilisation de liposomes, de micelles⁴⁴ ou de polymères¹¹² (Tableau 6, Figure 10-Figure 11). Les liposomes sont très appréciés parce qu'ils peuvent encapsuler des principes actifs hydrophobes (bicouche lipidique) et hydrophiles (cœur). De plus, ils peuvent être aisément fonctionnalisés pour échapper au système immunitaire, comme nous le verrons ultérieurement.¹¹³ Le Doxil[®], premier nanomédicament autorisé par la FDA, est une solution de liposomes encapsulant de la doxorubicine, médicament indiqué pour le traitement de nombreux cancers et fluoresçant dans le rouge ($\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} = 535 \text{ nm}$ dans l'eau).¹¹⁴ A l'instar de la daunorubicine, elle agit en bloquant la prolifération cellulaire par intercalation entre les brins d'ADN, ce qui les rend cohésifs et bloque leur désappariement nécessaire à leur synthèse ainsi qu'à celle de l'ARN. Cependant, les liposomes et les polymères sont des systèmes reconnus pour être instables en milieu biologique et laissent diffuser les petites molécules de principe actif, entraînant un relargage rapide et non contrôlé.¹¹⁵ Un autre type de système basé sur des lipides sont les nanoparticules lipidiques solides.¹¹⁶ A la différence des micelles ou des liposomes, ces systèmes sont constitués de lipides cristallins induisant leur solidité permettant une libération prolongée des médicaments encapsulés. Cependant, la cristallisation de la matrice induit l'éjection du médicament et les taux d'encapsulation sont généralement plus faibles.

D'autres systèmes ont été conçus, notamment à base de protéines pour des questions de biocompatibilité, comme l'Abraxane[®]. Dans le cas de ce médicament, le principe actif, le Paclitaxel, anticancéreux qui empêche la division cellulaire en bloquant la mitose, est lié à de l'albumine.¹¹⁷

Une autre technique de vectorisation est basée sur l'utilisation de nanocristaux. Les nanocristaux ont la spécificité d'être entièrement composés de principe actif. Cette formulation a l'avantage d'être applicable à tout médicament, notamment hydrophobe, souffrant d'un manque de solubilité. Ils présentent une bonne biodisponibilité due à leur dissolution rapide dans l'environnement ciblé.¹¹⁷ C'est le cas du fénofibrate, médicament qui permet de réduire le « mauvais » cholestérol. Sous forme de nanocristaux obtenus par broyage de poudre microcristalline et commercialisé sous le nom de Tricor[®], il présente une bonne biodisponibilité.¹¹⁸

Tableau 6 : Nanovecteurs organiques commerciaux pour le traitement de diverses pathologies.
44,117,119,120

Nom commercial (entreprise)	Nanovecteur	Principe actif	Autorisation par la FDA	Diamètre (nm)	Maladie visée
Doxil® (Janssen)	Liposome	Doxorubicine	1995	100	Kaposi
DaunoXome® (Galen)	Liposome	Daunorubicine	1996	45	Kaposi
Marqibo® (Talon Therapeutics)	Liposome	Vincristine	2012	100	Tumeurs solides
AmBisome® (Gilead Sciences)	Liposome	Amphotéricine B	1997	45 - 80	Infection fongique
Estrasorb® (Novavax)	Micelle	Estradiol	2003	/	Ménopause
Eligard® (Tolmar)	Nanoparticule de polymère	Acétate de leuproréline	2002	/	Cancer de la prostate
Opaxio® (Cell Therapeutics)	Nanoparticule de polymère	Paclitaxel	2012	/	Glioblastome
Abraxane® (Celgene)	Nanoparticule de protéine	Paclitaxel	2005 2008 (Europe)	130	Cancers
Tricor® (Abbott)	Nanocristal	Fénofibrate	2004	200	Hypercholestérolémie

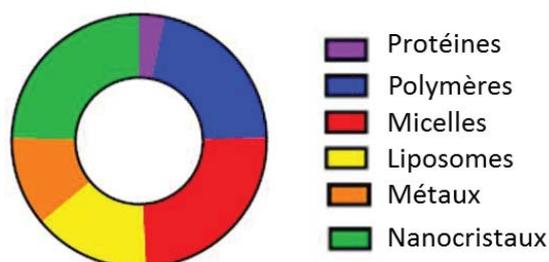


Figure 10 : Répartition des médicaments autorisés par la FDA entre 1995 et 2015 en fonction du type de nanoparticules utilisées.¹²⁰

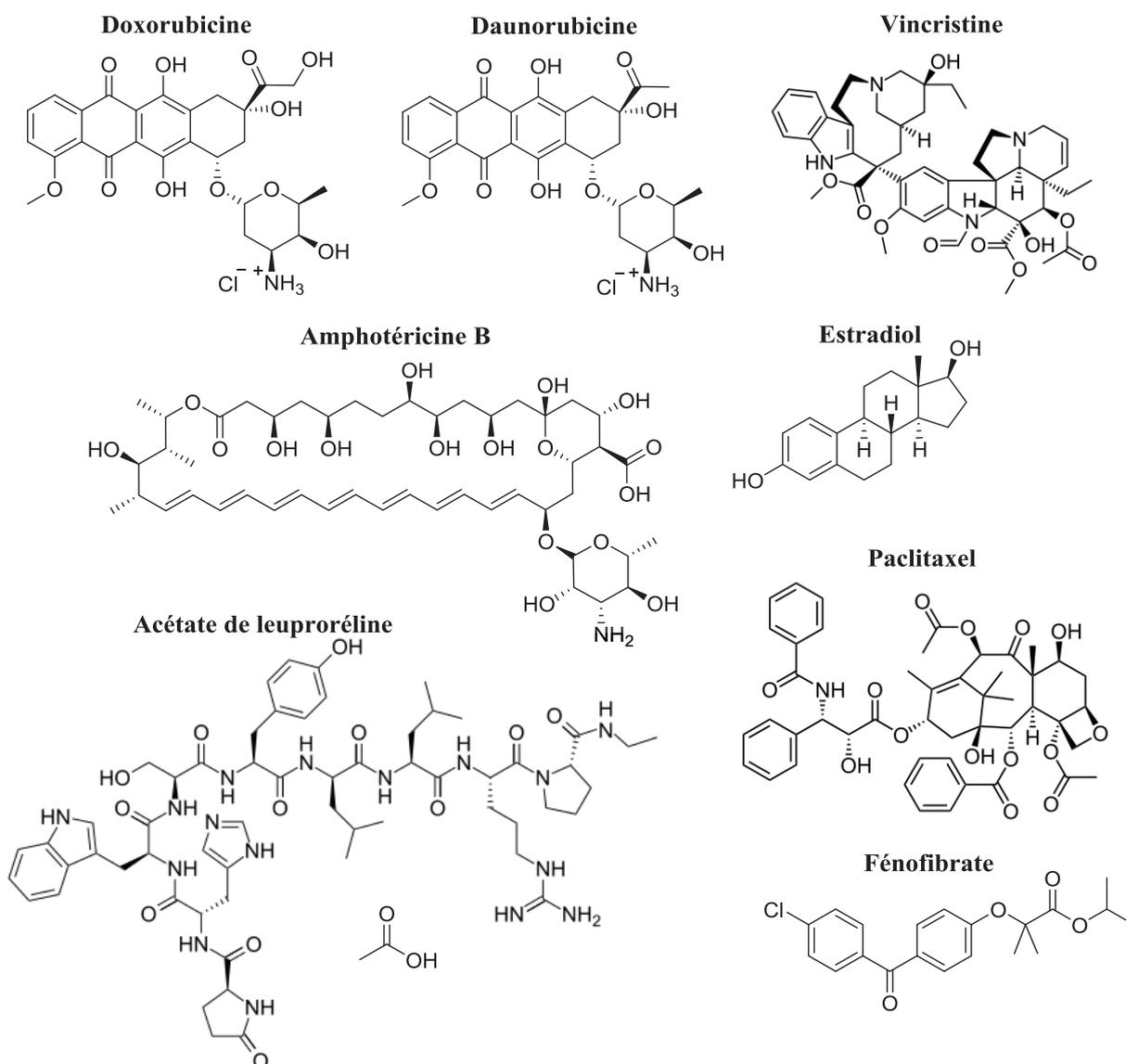


Figure 11 : Structure des principes actifs des nanovecteurs commerciaux présentés dans le Tableau 6.

I.4.1.2. Le ciblage : vers des aspects *in vivo*

Un nanovecteur ne parvient à assurer un ciblage passif vers la tumeur que s'il présente une taille adaptée. Un diamètre entre 30 et 200 nm est idéal pour augmenter le temps de circulation dans le sang sans que les nanoparticules ne soient dégradées ou éliminées par voie rénale. Ainsi, les chances de gagner la tumeur par effet EPR sont accrues.¹²¹ En effet, au-delà de 250 nm de diamètre, les nanoparticules sont préférentiellement éliminées par **phagocytose**.¹²² Dans ce mécanisme, les nanoparticules sont recouvertes d'opsonines, protéines qui seront ensuite reconnues par différents acteurs du nettoyage du milieu sanguin comme les macrophages, les monocytes ou les granulocytes neutrophiles.¹¹³ Les nanoparticules sont internalisées par formation de phagosomes ($> 0,5 \mu\text{m}$) qui évolueront ensuite en lysosomes. Malheureusement, la quantité de nanoparticules qui atteignent leur cible par mécanisme passif ne représente qu'une partie minimale de la quantité totale administrée, à savoir entre 1 et 10 %.^{121,123}

La fonctionnalisation avec des unités polyéthylène glycol, appelées PEG, est un moyen connu pour augmenter la furtivité des systèmes et leur temps de circulation dans le sang. En effet, plusieurs études ont montré une augmentation de 100% de l'accumulation tumorale de nanoparticules après PEGylation.¹²⁴ Les chaînes PEG encombrantes vont induire des répulsions stériques et ainsi empêcher l'adsorption des opsonines à leur surface et donc leur élimination par les macrophages. De plus, elles diminuent l'adsorption d'une couronne de biomolécules autour de la nanoparticule, ce qui augmente également leur temps de circulation dans le sang.⁸⁶ En effet, l'absorption d'apolipoprotéine, protéine fréquemment rencontrée dans les couronnes de biomolécules, induit une élimination rapide dans le foie et la rate.^{125,126} Le temps de clairance très long, les problèmes de biodégradabilité et la création d'anticorps anti-PEG dans l'organisme en cas d'utilisation répétée de produits PEGylés sont responsables de l'émergence récente d'autres types de revêtements furtifs comme des polyoxazolines ou des polybétaïnes, types de zwitterion.¹²⁷

Cependant, des essais cliniques montrent que le ciblage passif par effet EPR serait admis chez le rongeur mais pas pour tous types de tumeur chez l'humain.¹²⁸ Ainsi, pour renforcer leurs propriétés de ciblage, les nanovecteurs peuvent être pourvus d'un système de ciblage dit actif et reconnaissant les entités biologiques visées. Ces systèmes peuvent être des anticorps, des sucres ou encore des peptides et des protéines. Le ciblage est au cœur de toutes les préoccupations pour une stratégie anticancéreuse plus efficace. En effet, il a été récemment démontré qu'un ciblage du noyau et des mitochondries résultait en un traitement plus efficace des cellules cancéreuses.¹²⁹ La post-fonctionnalisation des systèmes avec des anticorps a été réalisée pour se fixer sélectivement sur les récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR)¹⁰⁶ qui joue un rôle dans la prolifération et le développement des cellules cancéreuses.¹⁶ D'autres entités biologiques peuvent également être couplées comme des protéines ou des peptides ou des molécules. Par exemple, le greffage de molécules d'acide folique permet de cibler les récepteurs de cellules cancéreuses. Cependant, il est nécessaire de se questionner sur le rapport coût-efficacité car ses systèmes n'améliorent que très faiblement l'efficacité thérapeutique.¹³⁰

Avant de s'intéresser à la libération du principe actif, étudions les différentes voies d'entrées du nanovecteur dans la cellule.

I.4.2. Mécanismes d'internalisation cellulaire et échappement endosomal

Cette partie s'intéresse globalement à des aspects *in cellulo*. Effectivement, ces travaux de thèse se sont cantonnés à la délivrance d'un principe actif dans les cellules. La compréhension du mécanisme d'internalisation des nanovecteurs dans les cellules est donc un prérequis essentiel.

I.4.2.1. Les mécanismes d'internalisation cellulaire

Si les petites molécules entrent par diffusion passive à travers la bicouche lipidique ou par diffusion facilitée à l'aide de protéines,¹³¹ il n'en est rien pour les nanoparticules.⁸⁶ En effet, pour les internaliser, la cellule a besoin de les enrober dans une membrane. Ce mécanisme est

appelé **endocytose**. Lors de l'endocytose, l'invagination de la membrane autour des nanoparticules forme des **vésicules d'endocytose**. L'évolution de ces vésicules est décrite ci-après (Figure 12). Leur fusion donne des **endosomes précoces** qui évoluent en **endosomes tardifs** grâce à la fusion avec des vésicules pré-lysosomales formées par l'appareil de Golgi. Enfin, la formation de **lysosomes** passe par la fusion entre endosomes tardifs et vésicules pré-lysosomales ou par la fusion avec un lysosome préexistant. L'acidification progressive, responsable de la dégradation des nanoparticules, est rendue possible par la présence d'hydrolases acides contenue dans les vésicules pré-lysosomales. En effet, le pH des endosomes précoces est de 6,5, celui des endosomes tardifs 5,0 et celui des lysosomes de 4,5. La dégradation des nanoparticules a lieu, de manière générale, dans les lysosomes.^{113,122,132}

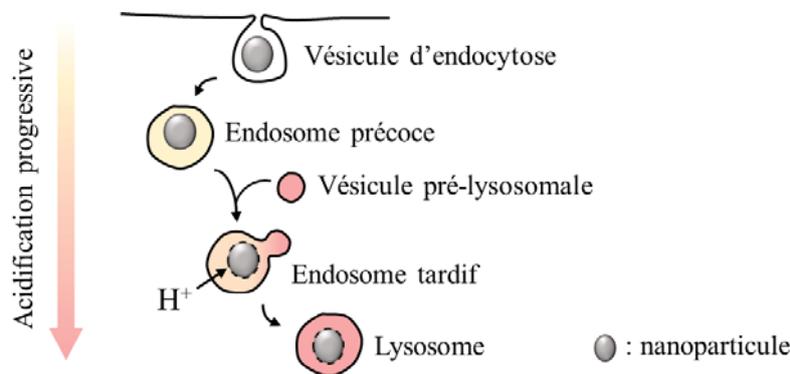
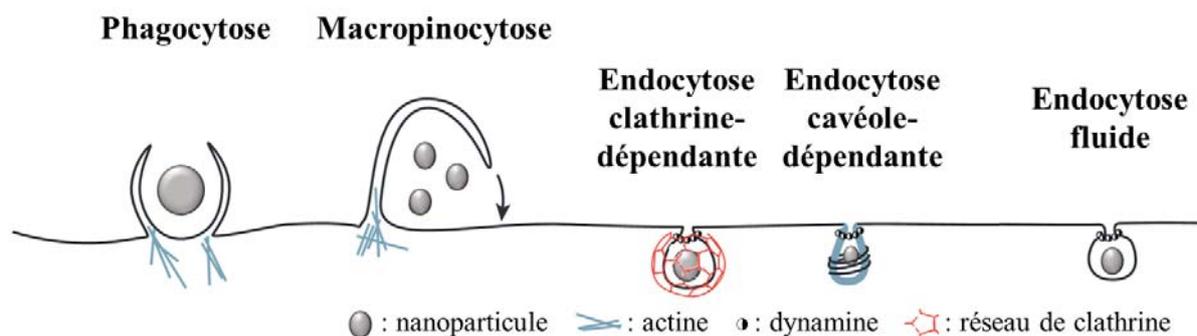


Figure 12 : Voie de dégradation intracellulaire des nanoparticules.¹¹³

La formation des vésicules d'endocytose peut être issue de différents mécanismes dépendant de nombreux facteurs et représentés en Figure 13. Si la taille des nanoparticules est au-dessus de 500 nm, les nanoparticules peuvent être internalisées par **macropinocytose** : la cellule internalise de manière non spécifique un volume de milieu extracellulaire dans des vésicules appelées macropinosomes (1-5 μm) qui évoluent ensuite en lysosomes. Pour les nanoparticules de moins de 500 nm, l'internalisation se fait par **pinocytose** et plusieurs voies médiées ou non par des récepteurs sont possibles. Une entrée par **endocytose clathrine-dépendante** où la nanoparticule est reconnue par des récepteurs en surface de la cellule puis internalisée dans une vésicule de diamètre allant de 100 à 150 nm couverte d'une protéine, la clathrine. Cette poche se transforme en endosome précoce, puis en endosome tardif et enfin en lysosome. Une **endocytose cavéole-dépendante** peut se faire de la même manière à la différence près qu'elle concerne des vésicules préexistantes, appelées cavéoles et recouvertes de cavéoline, formées par invagination de la membrane plasmique et présentant une taille de 50-60 nm de diamètre. Il existe également une voie d'endocytose non récepteur-dépendante, appelée **endocytose fluide**, où les nanoparticules entrent non spécifiquement dans la cellule au niveau des invaginations de la membrane plasmique, d'environ 90 nm de diamètre. La taille des nanoparticules a donc une forte influence sur le mécanisme d'endocytose mis en jeu.

Pinocytose



*Figure 13 : Principaux mécanismes d'internalisation cellulaire.*¹³³

En plus de leur taille, la voie d'endocytose des nanoparticules est conditionnée notamment par leur charge, leur fonctionnalisation, ou encore leur forme (Tableau 7).^{134,135} Les nanoparticules chargées positivement sont endocytées plus rapidement grâce à leur affinité accrue avec la membrane cellulaire phospholipidique globalement négative.¹²¹ Mais les nanoparticules chargées négativement ont généralement moins d'effets toxiques car leur entrée dans la cellule se fait d'une manière moins destructrice pour la membrane.⁸⁶ Il a été observé que des nanoparticules chargées négativement entraient dans la cellule par voie cavéole-dépendante, tandis que les nanoparticules neutres et positives entrent par voie clathrine-dépendante.^{86,136}

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la fonctionnalisation par des chaînes PEG est bénéfique pour augmenter la furtivité *in vivo*. Toutefois, l'unique présence de ces chaînes résultera en une nanoparticule neutre dont l'internalisation cellulaire se fera très difficilement, voire pas du tout.¹³⁶ Il est donc nécessaire d'ajouter d'autres motifs pour obtenir une nanoparticule chargée plus favorable à son internalisation.

La forme est aussi d'une importance capitale puisque des nanoparticules sphériques sont internalisées plus rapidement et en plus grande quantité que des nanoparticules en forme de bâtonnet ou de disque.^{113,121} Ceci s'explique par le fait que la membrane requiert plus d'énergie pour se déformer et envelopper les bâtonnets ou les disques.

*Tableau 7 : Récapitulatif des propriétés des nanoparticules influençant l'endocytose.*¹²²

Propriété	Endocytose favorisée	Endocytose défavorisée
Charge de surface positive	X	
Charge de surface négative		X
Petite taille	X	
Grande taille		X
Forme sphérique	X	

I.4.2.2. Cas des FONs

L'étude du mécanisme d'endocytose de FONs et d'assemblages hybrides dans des cellules cancéreuses et des macrophages a été réalisée.^{70,71} Le marquage des lysosomes a révélé que l'endocytose procède par la formation de vésicules, probablement par endocytose fluide, piégeant les nanosphères qui sont ensuite dissociées en molécules dans le cytoplasme. Cette dissociation s'accompagne d'une modification de la couleur d'émission, allant du rouge vers le vert, permettant le suivi de l'intégrité des nanosphères *in cellulo*. L'hypothèse repose sur une fusion de la membrane lipidique des endosomes avec les FONs. Les fluorophores dissous, alors dans un environnement lipidique plus hydrophobe et apolaire, émettent une couleur verte en raison de leur solvatochromisme positif (voir Glossaire).

Enfin, la répartition des nanoparticules entre les cellules est intéressante. Une étude a été récemment menée sur le sujet à l'aide de Qdots.¹³⁷ On observe que certaines cellules sont chargées avec de nombreuses particules tandis que certaines n'en ont que très peu. Ce phénomène serait expliqué par le fait que les cellules qui endocytent peu ont un mécanisme de défense supérieur à celui des nanoparticules qui endocytent beaucoup, où elles cessent de se défendre. La compréhension de ces phénomènes reste toutefois peu maîtrisée et représente un champ d'investigations en pleine expansion.

I.4.2.3. L'échappement endosomal

Comme nous l'avons vu, un nanoassemblage une fois internalisé ne peut avoir d'avenir thérapeutique que s'il évite la dégradation dans les lysosomes résultant de la maturation des endosomes. Il lui faut donc d'échapper à ce piègeage endosomal avant la dégradation lysosomale : on parle alors d'échappement endosomal. Pour cela, il est nécessaire de déstabiliser la membrane endosomale, que ce soit par formation de pores dans la membrane, par fusion ou par rupture et polarisation membranaire (Figure 14).¹³⁸ Cette fragilisation entraîne une fuite des particules du compartiment endosomal vers le cytosol. Les particules concernées par la formation de pores sont chargées positivement car elles peuvent interagir avec les membranes phospholipidiques négatives pour former des pores.¹³⁹ Concernant la fusion membranaire, l'utilisation d'agents fusogènes comme le lipide dioléylphosphatidyl-éthanolamine (DOPE) ou le cholestérol permet de pénétrer dans la membrane phospholipidique endosomale.¹³⁹ Un éclatement de la membrane endosomale peut également être observé grâce à un effet d'éponge à protons (*sponge effect*) qui traduit la capacité de certaines entités à gonfler après protonation entraînant un afflux d'ions et d'eau dans l'endosome et conduisant à sa rupture par déséquilibre osmotique.¹³⁸ Les agents utilisés présentent des fonctions amines donc la protonation induit le flux de protons détruisant la membrane. Bien évidemment, ces méthodes d'échappement endosomal peuvent être combinées pour en assurer le succès. C'est le cas de micelles préparées à base de polyéthylèneimine conjuguée avec le lipide DOPE dont l'échappement endosomal s'effectue grâce à la combinaison de l'effet de pompe à proton de la polyéthylèneimine et des propriétés de fusogénicité de DOPE.¹⁴⁰

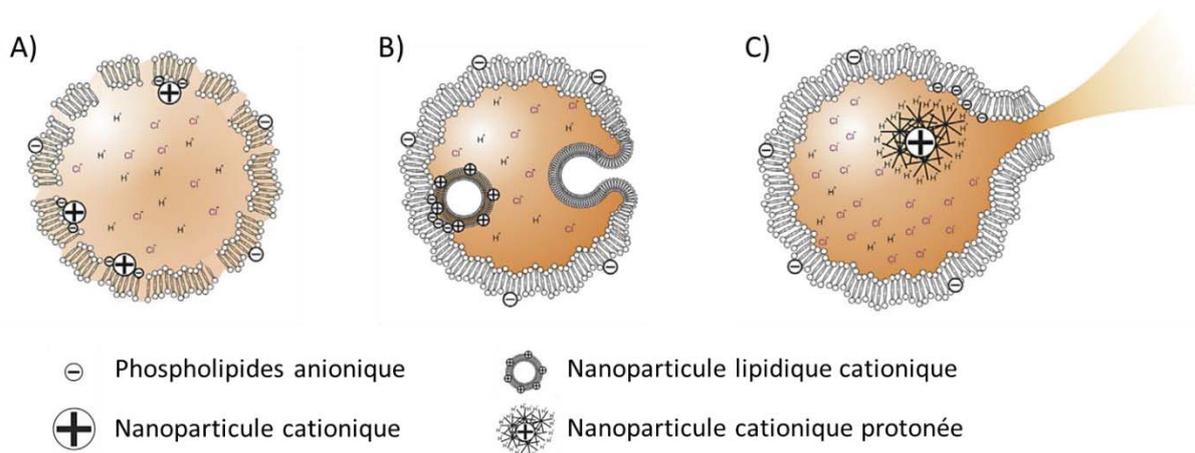


Figure 14 : Différents mécanismes d'échappement endosomal. A) Formation de pores par l'action de nanoparticules chargées positivement. B) Fusion membranaire entre la nanoparticule lipidique présentant des agents fusogènes et la membrane endosomale. C) Effet de pompe à protons induit lors de la protonation intra-endosomale de nanoparticules chargées positivement.¹³⁸

Les protéines et les peptides sont, de plus, appréciés pour leur biocompatibilité. Par exemple, la protéine trans-activatrice de transcription (TAT) du VIH est capable d'entrer efficacement dans les cellules et de promouvoir l'expression du gène du virus.¹⁴¹ La séquence d'acides aminés la plus courte nécessaire pour l'entrée dans la cellule a été identifiée comme étant GRKKRRQRRRPQ et est appelée peptide TAT. Cette séquence, riche en acides aminés chargés positivement comme les polyamines arginine (R) ou lysine (K), correspond à un signal de localisation nucléaire (NLS, en anglais nuclear localization sequence) reconnu par des protéines de transport qui lui permettent de cibler le noyau de la cellule.¹⁴¹ Dans ces travaux de recherche, c'est ce peptide que nous avons choisi (voir chapitre 5).

Maintenant que le mécanisme d'internalisation dans les cellules a été abordé et que nous connaissons leur sort après dégradation, voyons comment charger les nanoparticules en principe actif.

I.4.3. Contrôle de la libération de principes actifs

L'encapsulation du principe actif au sein du nanovecteur et l'endocytose de ce dernier présentées, voyons maintenant comment libérer le principe actif hors de son vecteur.

I.4.3.1. La libération par application de stimuli

Si le principe actif est libéré avant d'atteindre sa cible, il génèrera potentiellement des effets secondaires ou sera métabolisé et excrété de l'organisme. Ainsi, il est essentiel de maîtriser sa libération hors du nano-objet et ce dans le tissu visé. En général, cette libération s'effectue soit par délitement de l'assemblage en entier, soit par détachement du principe actif de l'assemblage.¹⁴² Pour effectuer un contrôle de manière spatio-temporelle, le recours à un stimulus est une technique de choix. Le stimulus peut être externe à l'organisme, par application d'ultrasons, d'ondes radiofréquences, de rayons X, de microondes, de lumière, d'un champ magnétique alternatif ou encore d'une variation de température. Mais il peut aussi être interne

et provenir d'une modification du pH, de concentration en enzyme ou de gradient rédox du milieu lui-même.¹⁴² La première preuve de concept de cette méthode de libération date de 1978 et utilisait une augmentation de température pour libérer un dérivé de fluorescéine d'un liposome.¹⁴³

Le mode de libération le plus connu et le plus avancé au niveau des essais cliniques est basé sur une augmentation de la température. Les systèmes libérant le principe actif sous l'effet de la chaleur sont généralement des liposomes, des micelles ou des nanoparticules de polymère thermosensibles. Ces assemblages présentent une température de transition de phase entre un état gel et un état liquide adaptable en fonction des molécules considérées. Par exemple, le liposome résultant d'un assemblage de phospholipides 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine présente une transition de phase à 42 °C.¹⁴³ Ainsi, à partir de cette température, l'édifice va se déliter et libérer le principe actif. Ceci peut se faire par élévation générale de la température corporelle si le système est assez sensible à de légères variations autour de la température physiologique (37 °C). Autrement, le stimulus peut être une impulsion radiofréquence ou un champ magnétique alternatif.

L'utilisation de stimulus par impulsion radiofréquence est également en plein essor. Dans ce cas, on utilise la chaleur générée par un courant électrique alternatif. C'est le cas de la préparation ThermoDox[®], un liposome chargé en doxorubicine et sensible à la température. La chaleur générée par impulsion radiofréquence à l'aide d'un cathéter va rompre la structure du liposome autour de 40 – 45 °C, libérant la doxorubicine. Pour en assurer le plein succès, cette procédure est combinée avec une ablation également basée sur une impulsion radiofréquence. La biocompatibilité et la biodégradabilité de ce nanovecteur lui ont permis d'atteindre la phase III d'essais cliniques pour le traitement du cancer du foie au stade primaire et la phase II pour le traitement du cancer du sein.¹⁴⁴

Le pH est également un paramètre intéressant puisqu'il varie de 7,4 dans les tissus sains jusqu'à des pH plus acides autour de 6,5-7,2 dans l'environnement extracellulaire des tumeurs. Une acidification progressive a également lieu lors du passage des endosomes précoces vers les lysosomes atteignant un pH de 4,5. Ainsi, sous l'effet du pH, des polymères, polyacides ou polybases, relarguent le médicament par changement de solubilité ou de conformation. Il existe également des micelles ou des liposomes pH-sensibles dans lesquels sont encapsulées des molécules de principes actifs.¹⁴² C'est le cas de micelles de PEG-poly(β -amino ester) libérant la camptothécine (agent anticancéreux) à un pH autour de 6,4.¹⁴⁵

L'utilisation d'un champ magnétique alternatif nécessite des nanoparticules magnétiques, généralement piégées dans un édifice de polymère, de silice ou liposomal pour gagner en pouvoir chauffant par rassemblement. Ceux-ci sont chargés en principe actif et en particules magnétiques et sont sensibles à la chaleur induite par un champ magnétique alternatif de quelques dizaines jusqu'à la centaine de kHz. L'application d'un tel champ change l'orientation des moments magnétiques des particules ~ 100 000 fois par seconde,¹⁴⁶ ce qui génère un échauffement à distance, sans avoir recours à la chirurgie grâce à la profondeur de pénétration du champ magnétique. Selon la durée d'exposition, la fréquence et/ou l'intensité du champ magnétique appliqué, le résultat mène à une sensibilisation des cellules vis-à-vis de traitements chimiothérapeutiques et peut même aboutir à la destruction des cellules. Il est également

possible de greffer directement le principe actif sur la nanoparticule magnétique via un lien thermosensible et une fonction d'ancrage. De cette façon, le principe actif est libéré après application d'un champ magnétique alternatif.¹⁴⁷

L'utilisation de nanoparticules magnétiques présente l'avantage de pouvoir suivre l'évolution de la tumeur par imagerie de résonance magnétique (IRM) car celles-ci demeurent au niveau de la zone de traitement. Les nanoparticules magnétiques combinent donc la thérapie par destruction thermoinduite des cellules cancéreuses et relargage contrôlé du principe actif et le diagnostic par IRM. Partant de ces faits, nous avons imaginé un système théranostique multimodal, couplant un principe actif pour assurer le côté thérapie et des nanoparticules magnétiques qui montrent une double utilité : celle de la libération du principe actif par hyperthermie et celle du diagnostic par IRM.

I.4.3.2. La libération par hyperthermie magnétique

L'hyperthermie est définie comme une élévation de la température corporelle au-dessus de sa température normale. Elle est utilisée pour le traitement de diverses pathologies comme les inflammations, l'arthrose ou les kystes⁸⁵, mais également dans le traitement contre le cancer. Le traitement du cancer par hyperthermie est reconnu depuis le 19^{ème} siècle. Un chauffage entre 41 et 46 °C pendant 20 à 60 minutes entraîne l'apoptose des cellules cancéreuses en laissant intactes les cellules saines, étant moins sensibles à la température que les cellules cancéreuses.⁸⁵ L'augmentation de température peut être générée par microonde, onde radiofréquence, ultrasons, lumière ou encore par application d'un champ magnétique alternatif.

L'application d'un champ magnétique alternatif conduit à l'excitation des moments magnétiques en les faisant fluctuer. Cette fluctuation conduit à son tour à un échauffement local par dissipation thermique de l'excitation.¹⁴⁸ L'application du champ magnétique peut être locale pour mieux viser la zone tumorale. Cette méthode ne souffre d'aucune limite de pénétration et l'utilisation de nanoparticules magnétiques offre une possibilité de ciblage par accumulation passive dans la zone tumorale. L'injection intra-tumorale de nanoparticules d'oxyde de fer est utilisée depuis de nombreuses années pour fragiliser les cellules cancéreuses et a notamment fait ses preuves en clinique.^{146,149,150} Cependant, elle nécessite une concentration élevée en particules magnétiques. En effet, le traitement NanoTherm[®], mis au point par l'entreprise MagForce AG et autorisé en Europe en 2013, basé sur l'injection intratumorale d'une solution de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer de 12 nm de diamètre, recouvertes d'aminosilane, nécessite une concentration en fer de 35 mg.kg⁻¹ de poids corporel.¹⁴⁶ Par comparaison, la concentration utilisée pour de l'imagerie IRM appliquée à la détection des lésions tumorales du foie avec une solution de nanoparticules d'oxyde de fer commercialisée sous le nom d'Endorem[®] est de 0,075 mg.kg⁻¹ de poids corporel, soit 450 fois moins que NanoTherm[®]. Sachant que la dose limite en fer où apparaissent des effets toxiques est de 20 mg.kg⁻¹,¹⁵¹ il apparaît essentiel de la contrôler.

L'efficacité de l'hyperthermie magnétique se traduit par l'efficacité de chauffage des nanoparticules, caractérisée par le **taux d'absorption spécifique, SAR** en anglais, pour *specific absorption rate*. Pour une intensité (H) et une fréquence (f) de champ magnétique données, le SAR s'exprime en $W.g^{-1}$ exprimé par la relation (1).

$$SAR = \frac{1}{m_{Fe}} \left(\sum_i c_i m_i \frac{dT}{dt} \right) \quad (1)$$

avec m_{Fe} la masse totale de fer, c_i la capacité calorifique des espèces en solution ($J.L^{-1}.K^{-1}$), m_i leur masse, et dT/dt la pente de la courbe de la variation de température en fonction du temps. Pour des applications sur le corps entier, la limite de tolérance correspond à un produit intensité par fréquence $H.f < 4,85.10^5 \text{ kA.m}^{-1}.s^{-1}$.¹⁵² Lorsque la zone exposée est plus localisée, la valeur peut monter jusqu'à $5.10^6 \text{ kA.m}^{-1}.s^{-1}$.¹⁵³ Typiquement, le traitement NanoTherm[®] proposé par MagForce AG est combiné avec un générateur de champ magnétique alternatif (NanoActivator[®]) dont la fréquence est de 100 kHz et l'intensité se situe entre 2,5 et 15 kA.m^{-1} , aboutissant à une valeur maximale $H.f$ de $1,5.10^6 \text{ kA.m}^{-1}.s^{-1}$.¹⁵⁴

Le SAR dépend de l'intensité et de la fréquence du champ magnétique mais également de la taille des nanoparticules magnétiques, de leur composition, de leur géométrie, et de la viscosité du solvant.

Par exemple, à dimensions similaires, des nanocubes (20 nm de côté) possèdent un SAR environ 20 % supérieur à celui de nanosphères (20 nm de diamètre).¹⁵⁵

De plus, l'effet additif suite à la formation de clusters de nanoparticules magnétiques apparaît bénéfique. En effet, des nanofleurs d'un diamètre total de 24 nm, résultant de l'assemblages de nanosphères de 10,5 nm de diamètre, présentent une capacité de chauffage 10 fois supérieure à celle des nanosphères seules.¹⁵⁶ Le même phénomène est observé lorsque les nanoparticules magnétiques sont encapsulées dans un liposome, où l'efficacité de chauffage est multipliée par 2.¹⁵⁷

La forte dépendance en taille trouve un exemple dans des nanoparticules de magnétite recouvertes de rhamnose : si leur taille est inférieure à 7 nm, le SAR est quasiment nul (168 kHz, 21 kA.m^{-1}), monte à 30 $W.g^{-1}$ pour des nanoparticules de 10 nm et atteint 76 $W.g^{-1}$ pour des tailles de 35 nm. Pour la maghémite, le SAR augmente de 4 à 1650 $W.g^{-1}$ (700 kHz, 24.8 kA.m^{-1}) lorsque la taille des particules passe de 5,3 à 16,5 nm.¹⁴⁸

La composition joue également un rôle crucial puisque, à taille (10 nm de diamètre), fréquence et intensité de champ égales, des nanoparticules de ferrite $CoFe_2O_4$ présentent un SAR 2 fois plus élevé que celui des nanoparticules de maghémite.¹⁵⁷ En effet, ceci est dû à l'anisotropie magnétocristalline qui est environ 20 fois supérieure pour $CoFe_2O_4$ que pour Fe_3O_4 .¹⁵⁸ Toutefois, les ferrites de cobalt sont plus cytotoxiques que les nanoparticules d'oxyde de fer, il faut donc trouver un compromis entre propriétés magnétiques et cytotoxicité.

I.5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons défini la structure des nanomatériaux théranostiques désirés en comparant les avantages et les inconvénients des techniques d'imagerie et des nano-objets de contraste associés.

Ainsi, le but de ces travaux de thèse est de former un nano-objet dont la structure repose sur une FON. Rassemblant un nombre élevé de molécules organiques fluorescentes, la FON présente une brillance élevée dans le rouge. Elle peut également encapsuler un principe actif hydrophobe. La FON permettra de suivre *in cellulo* la libération du médicament par microscopie de fluorescence, avant d'imaginer toute expérimentation *in vivo*.

La FON sera recouverte d'une coquille de nanoparticules d'oxyde de fer pour permettre un relargage contrôlé du principe actif par application d'un stimulus magnétique dans le cadre d'expériences d'hyperthermie magnétique. Ces nanoparticules magnétiques offriront également la possibilité de suivre l'évolution de la tumeur *in vivo* par IRM, ces aspects n'ont pas été abordés dans cette étude faute de temps.

De par leur taille, nous nous attendons à ce que les nano-objets fabriqués soient intrinsèquement dotés de propriétés de ciblage passif vers les zones tumorales par l'effet EPR. Des modifications de surface par des ligands (bio)chimiques seront mises en œuvre pour parvenir à induire un ciblage actif.

Dans les chapitres suivants, nous nous intéresserons de plus près à la fabrication de ces nanoassemblages supramoléculaires, à l'évaluation de leurs propriétés et enfin à leurs applications.

Chapitre II : Synthèse de fluorophores et fabrication de nanosphères fluorescentes organiques

II.1. Introduction	46
II.2. Synthèse et caractérisation des fluorophores	47
II.2.1. Stratégie de synthèse	47
II.2.2. Synthèse du squelette de base	49
II.2.3. Synthèse d'une famille de fluorophores	50
II.2.3.1. Modification de la chaîne principale R ₁	50
II.2.3.2. Famille comparative benzothiadiazole/cyanovinylidène	54
II.2.3.3. Modification des chaînes latérales R ₂	57
II.2.4. Influence de la structure sur les propriétés photophysiques.....	58
II.2.4.1. Influence de l'ajout du groupe benzothiadiazole	59
<i>Comparaison entre dérivés acides phosphoniques</i>	59
<i>Comparaison entre les composés avec des chaînes grasses</i>	61
II.2.4.2. Influence des chaînes latérales R ₂	62
II.2.4.3. Influence de la chaîne principale R ₁	63
<i>Chaîne principale R₁ avec le groupe benzothiadiazole</i>	63
<i>Chaîne principale R₁ avec le groupe cyanovinylidène</i>	66
II.2.4.4. Comparaison avec les propriétés photophysiques dans le THF	67
II.2.5. Etude de solvatochromisme.....	68
II.2.6. Analyse thermique.....	72
II.3. Synthèse et caractérisation de nanosphères organiques fluorescentes	74
II.3.1. Synthèse de nanosphères organiques fluorescentes	74
II.3.2. Caractérisation de nanosphères organiques fluorescentes.....	75
II.3.2.1. Propriétés structurales des FONS	75
II.3.2.2. Stabilité colloïdale.....	79
II.3.3. Propriétés photophysiques des FONS.....	82
II.3.3.1. Comparaison dans différents solvants : THF, toluène et sous forme de FONS.....	82
II.3.3.2. Comparaison entre les différents FONS synthétisées	84
II.3.3.3. Influence du pH sur les propriétés photophysiques	87
II.4. Conclusion	90

II.1. Introduction

Un des objectifs de ces travaux de thèse est d'élaborer de nouveaux fluorophores, précurseurs de nanosphères organiques fluorescentes (FONs) plus performantes pour leur utilisation en tant qu'agents de bio-imagerie. Leur structure est rappelée ci-dessous (Figure 15). Les nanosphères, et donc les fluorophores constitutifs, doivent réunir plusieurs critères photophysiques abordés au chapitre 1, à savoir une brillance élevée supérieure à 10^5 - 10^6 L.mol⁻¹.cm⁻¹, une émission décalée dans le rouge, un fort déplacement de Stokes et une faible photodégradation.

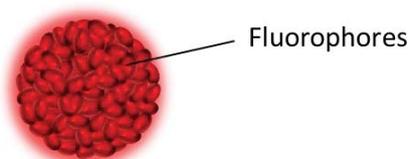


Figure 15 : Structure des FONs développées au laboratoire dans le cadre de ces travaux de thèse.

Dans un premier temps, les propriétés désirées des fluorophores visés seront présentées, la synthèse d'une chimiothèque de composés fluorescents détaillée et l'influence de leurs structures sur les propriétés photophysiques et thermiques étudiée.

Il s'agira ensuite de présenter le procédé de fabrication des FONs à partir de ces fluorophores. Leurs propriétés photophysiques et structurales seront alors exposées.

II.2. Synthèse et caractérisation des fluorophores

II.2.1. Stratégie de synthèse

La structure des molécules cibles développées au laboratoire est basée sur un cœur électrodonneur constitué d'un motif triphénylamine, conjugué à des groupes fortement électroattracteurs comme le (di)cyanovinylidényl. Cette structure de type « donneur-accepteur » est à l'origine de la fluorescence et correspond au squelette de base des composés précédemment synthétisés au laboratoire pour la synthèse de nanoparticules ultérieurement impliquées dans l'obtention de systèmes magnéto-fluorescents. En particulier, l'introduction d'un groupe acide phosphonique ayant une forte affinité pour les oxydes de fer magnétiques a abouti au composé nommé **fpOH** (Figure 16). Cependant, ce composé est trop peu brillant ($\sim 60 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et son émission est peu décalée dans le rouge ($\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} = 586 \text{ nm}$ dans le toluène).¹⁰⁴ Sa très faible brillance provient d'une désactivation non radiative de l'état excité par un repliement intramoléculaire lié à des liaisons hydrogène entre l'atome d'azote du groupe cyano et les protons de l'acide phosphonique.¹⁵⁹ Il a donc été convenu de remplacer la liaison vinylique par un groupe permettant de pallier ces deux limitations : l'unité benzothiadiazole (entourée en vert sur la Figure 16).

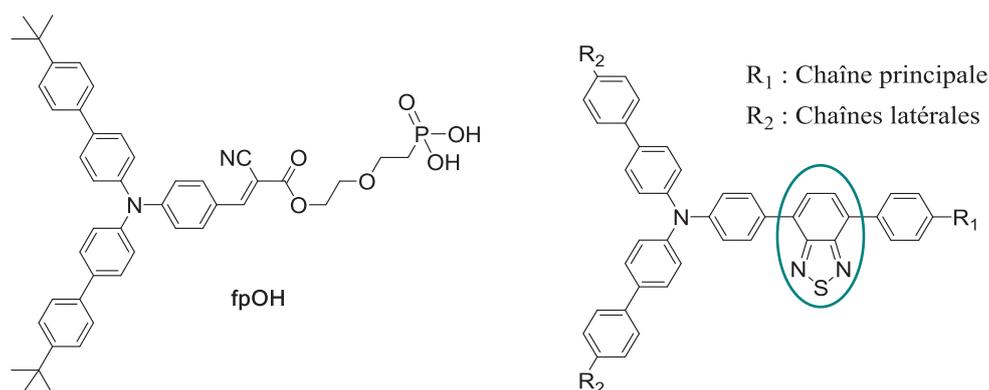


Figure 16 : Structure de **fpOH** (gauche) et des nouvelles molécules cibles (droite).

Ce remplacement va permettre d'augmenter le transfert de charge dans la molécule et donc de décaler l'émission de fluorescence plus dans le rouge (Figure 17). Il limitera la formation de liaisons H intramoléculaires lors du repliement de la molécule sur elle-même, d'où une augmentation attendue du rendement quantique.

En outre, il a été précédemment observé qu'une modification de la balance hydrophile/hydrophobe sur la structure du composé **fpOH**, impactait les propriétés de fluorescence.¹⁵⁹ Par exemple, l'augmentation du nombre de motifs éthylèneoxy de la chaîne principale de **fpOH** entraînait une augmentation du rendement quantique due à un repliement moins probable de la molécule sur elle-même. En effet, l'ajout de deux motifs éthylèneoxy conduit à un accroissement du rendement quantique de fluorescence de 0,2 % à 11 % dans le toluène. Le remplacement de la chaîne éthylèneglycol polaire de **fpOH** par une chaîne alkyle apolaire de même longueur permet d'améliorer le rendement quantique jusqu'à 8 % dans le toluène, soit 40 fois plus qu'en série polaire. Outre l'augmentation du rendement quantique de

fluorescence par limitation de la formation de liaisons H intramoléculaires et de la polarité locale, la synthèse de fluorophores plus hydrophobes vise différents buts. En effet, l'obtention de nanosphères plus hydrophobes donne naissance à des matrices plus susceptibles d'encapsuler des principes actifs hydrophobes. Ensuite, une dissolution plus aisée de ces nanosphères hydrophobes dans les cellules sera rendue possible par fusion avec les chaînes phospholipidiques de la membrane cellulaire soit cytoplasmique, soit des endosomes. La balance hydrophile/hydrophobe des composés est alors aisément modifiée en jouant sur la chaîne principale R₁ de la nouvelle famille de fluorophores (Figure 16).

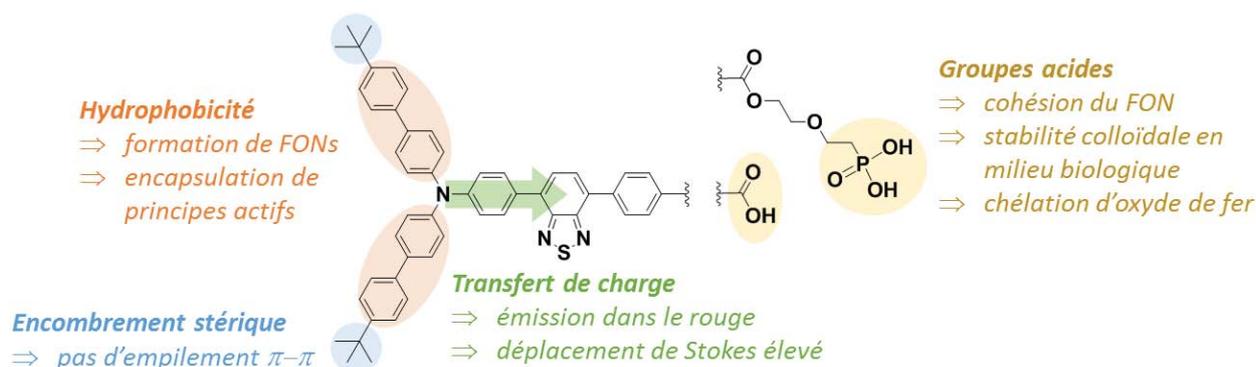


Figure 17 : Lien entre la structure et les propriétés des fluorophores synthétisés.

De plus, des fluorophores présentant une fonction acide carboxylique ou acide phosphonique ont la capacité de chélater des ions métalliques et en particulier les ions Fe(II) et Fe(III) (Figure 17).¹⁶⁰ Des nanosphères formées à partir de fluorophores possédant de tels groupes chélatants peuvent ainsi être recouvertes d'une coquille de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer, ce qui sera exploité au moment de la fabrication d'objets magnéto-fluorescents. L'introduction de ces fonctions acides dans la chaîne principale R₁ est donc également étudiée.

Le travail de synthèse sur la partie R₁ consistera aussi à conférer aux fluorophores des propriétés de furtivité, comme c'est le cas de motifs neutres hydrophiles comme les chaînes PEGylées ou les bêtaïnes. Nous exploiterons ce nouveau design pour explorer et mieux comprendre les interactions fluorophore/membrane cellulaire au moment de l'internalisation de nanoparticules. Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, la charge des nanoparticules exerce un impact sur leur processus d'internalisation cellulaire étant donné que la membrane cytoplasmique de celle-ci est globalement négative.¹³¹ Il est donc attendu qu'une nanoparticule neutre rentre moins facilement dans les cellules qu'une nanoparticule chargée. Ce phénomène de faible internalisation est recherché lorsqu'il s'agit d'éviter la prise en charge par le système immunitaire et notamment les macrophages, mais devient indésirable lorsque les cellules ou les monocytes sont les objets cibles.

Enfin, un des buts espérés est de parvenir à faire « fondre » le cœur fluorescent des nanoassemblages hybrides par hyperthermie magnétique pour libérer de manière contrôlée le principe actif alors encapsulé. Pour cela, un cœur fluorescent et donc des fluorophores présentant une température de transition vitreuse T_g basse sont nécessaires. Or le composé **fpOH** présentait une valeur de T_g égale à 121 °C. Un travail au niveau des chaînes R₂ sera donc effectué pour entraîner une plus grande flexibilité et donc des valeurs de T_g plus basses. Les

unités *tert*-butyles précédemment utilisées seront remplacées par des chaînes décyles, plus souples.

Toutes les modifications envisagées conduiront à une nouvelle famille de fluorophores, intégrant le squelette benzothiadiazole. Cette famille sera développée pour étudier l'influence de la modification de la chaîne principale (R₁) ou des chaînes latérales (R₂) sur les propriétés photophysiques des fluorophores, à savoir la brillance, la longueur d'onde d'émission maximale, le déplacement de Stokes et le déclin de fluorescence. Intéressons-nous d'abord à la synthèse de ce nouveau squelette.

II.2.2. Synthèse du squelette de base

Le nouveau squelette visé, noté **4** et dont la structure est présentée ci-après (Figure 18), comprend le cœur triarylamine/benzothiadiazole. Il présente deux atomes de brome en guise de substituants latéraux R₂ et une fonction aldéhyde pour introduire la chaîne R₁. Ces substituants entraînent une fonctionnalisation aisée de la molécule : les deux atomes de brome permettent d'accéder à des réactions de couplage aromatique de type Suzuki-Miyaura pour la formation de liaisons carbone-carbone et l'aldéhyde peut conduire à un acide carboxylique ou à un alcool via des réactions d'oxydo-réduction.

Cet intermédiaire clé **4** a été obtenu en 4 étapes avec un rendement global de 34 % (Figure 18). La première étape est une réaction de dibromation du benzothiadiazole, produit commercial et conduit au 4,7-dibromo-2,1,3-benzothiadiazole, composé noté **1**. L'utilisation de conditions « dures » comme du dibrome et de l'acide dibromique s'explique par la désactivation électronique du benzothiadiazole. La substitution de l'atome de brome peut s'effectuer sur différentes positions du benzothiadiazole suivant les conditions opératoires.¹⁶¹ Ces conditions laissent inattaquées les positions 5 et 6 à l'inverse des positions 4 et 7 qui nous intéressent, ce qui s'explique par la nature électroattractrice du cycle thiadiazole.

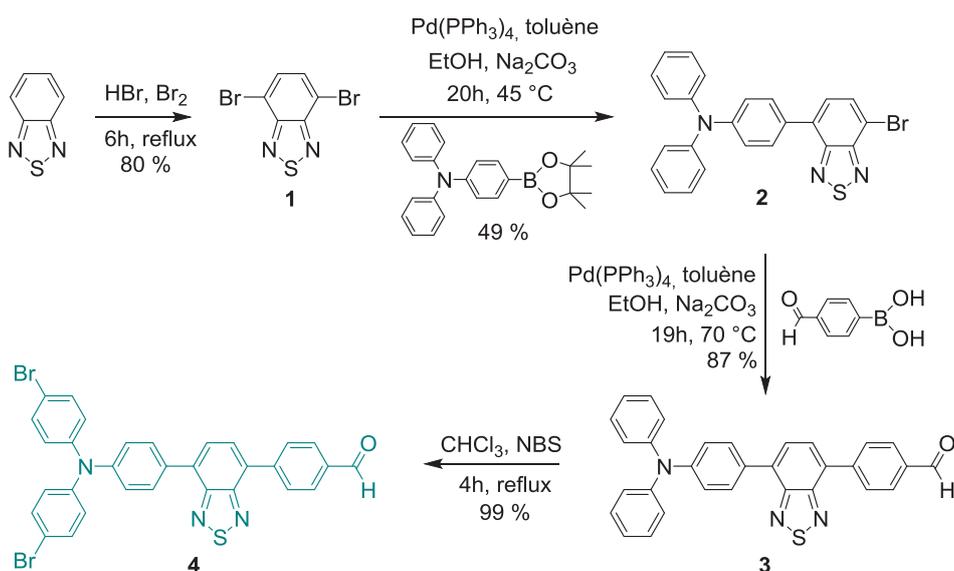


Figure 18 : Schéma de synthèse pour obtenir l'intermédiaire clé **4**.

Le composé est engagé dans une réaction de couplage aromatique pallado-catalysé de type Suzuki-Miyaura avec un ester boronique pour introduire la triphénylamine et fournir le composé **2**. Ici, un ester boronique est choisi pour sa plus grande stabilité par rapport à celle de l'acide correspondant, bien qu'il soit moins réactif. Dans ce type de réaction, le bromoaryle joue le rôle d'électrophile et l'ester boronique de nucléophile. Cette réaction s'effectue à basse température pour limiter au maximum la formation du composé symétrique di-substitué avec la triphénylamine. En effet, à haute température il a été observé la formation presque quantitative de ce composé di-substitué. Néanmoins, cette di-substitution n'a pu être évitée, ce qui explique le rendement relativement faible obtenu par rapport à celui de la réaction de couplage qui suit.

Une seconde réaction de Suzuki-Miyaura, cette fois avec un acide boronique, à savoir l'acide (4-formylphényl)boronique, plus désactivé, permet d'introduire notamment l'unité benzaldéhyde avec un très bon rendement et d'obtenir le composé **3**. Cette fois, cette réaction est menée à haute température car cet acide boronique est peu réactif et ne réagit pas sur le dibromo-benzothiadiazole **1**, ce qui nous a amené à adopter cet enchaînement de couplages et non l'inverse.

Enfin, une dibromation à chaud à l'aide du N-bromosuccinimide (NBS) permet d'obtenir avec un rendement quantitatif l'intermédiaire clé **4**, motif de base de la famille des nouvelles triarylamines. Cette réaction est une substitution électrophile aromatique du NBS, composé électrophile, sur le cycle aromatique en position para activée par l'unité amino. Cette réaction de bromation s'effectue en conditions douces grâce à l'absence d'autres sites aussi réactifs sur la molécule **3**.

Intéressons-nous désormais à la fonctionnalisation de la molécule **4**. Il est nécessaire d'ajouter en priorité les unités latérales R_2 avant de modifier l'unité R_1 . En effet, les groupes acides carboxyliques ou phosphoniques de R_1 seraient susceptibles de réagir avec les catalyseurs utilisés lors des réactions réalisées par la suite.

II.2.3. Synthèse d'une famille de fluorophores

II.2.3.1. Modification de la chaîne principale R_1

Dans cette partie, nous nous intéresserons à la synthèse de fluorophores présentant des unités chélatant les ions fer (acides carboxylique **6** et phosphonique **9**), des unités induisant la furtivité (« PEG » **11** et bétaïnes **13** et **14**) et une unité apportant de l'hydrophobie (longue chaîne carbonée **10**) via la modification de la chaîne principale R_1 . Pour chaque fluorophore, les unités R_2 sont des groupes tert-butyles. Les molécules visées sont présentées ci-après (Figure 19).

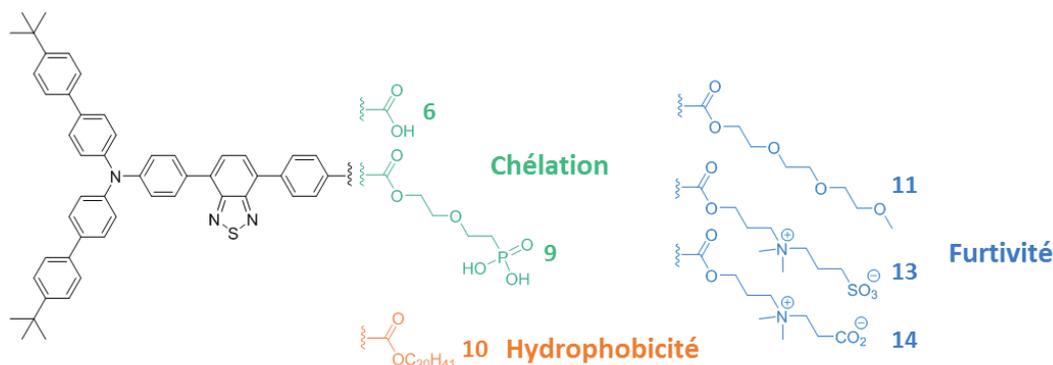


Figure 19 : Présentation des structures attendues à l'issue de modifications sur la chaîne principale R_1 .

L'ajout des unités latérales *tert*-butyles se fait à partir de l'intermédiaire clé **4** en procédant par une réaction de Suzuki avec l'acide (4-*tert*-butylphényl) boronique, qui mène au composé **5** (Figure 20). Dans cette réaction, l'absence de groupe réactif autre que les atomes de brome permet d'obtenir **5** avec un bon rendement. Les substituants *tert*-butylphényles génèrent de l'encombrement stérique qui a pour but d'éviter des empilements π - π intermoléculaires de fluorophores, reconnus pour mener à une extinction de fluorescence.⁴⁶ Une réaction d'oxydation de l'aldéhyde **5** en milieu organique et en l'absence de cation métallique, grâce à l'utilisation d'hydrogénopersulfate de potassium $\text{KHSO}_5 \cdot 0,5\text{KHSO}_4$, espèce active de l'Oxone[®], permet d'obtenir à température ambiante l'acide carboxylique **6** (Figure 20), capable de chélater les ions fer.

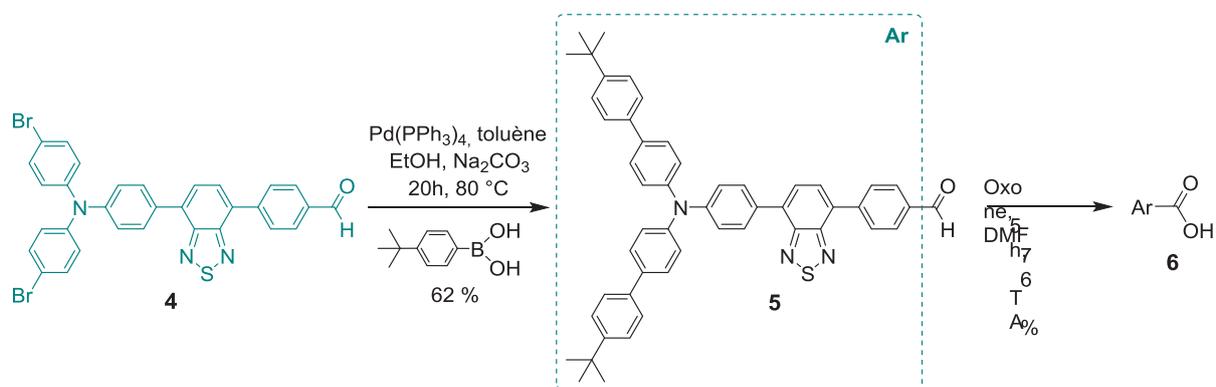


Figure 20 : Voie d'obtention de l'aldéhyde **5** et de l'acide carboxylique **6**.

A partir de l'acide carboxylique **6**, d'autres chaînes principales de différentes natures peuvent être introduites grâce à une réaction d'estérification en conditions douces, appelée réaction de Steglich (Figure 21). Cette réaction, trop peu réactive avec un simple acide carboxylique, met en jeu un carbodiimide comme agent de couplage et le 4-diméthylaminopyridine acide paratoluènesulfonique (DPTS) comme catalyseur. L'alcool va alors réagir selon une addition nucléophile sur l'acide ainsi activé.

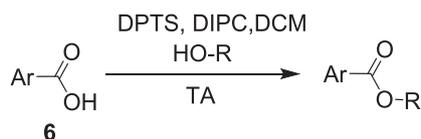


Figure 21 : Réaction d'estérification de Steglich à partir de l'acide carboxylique **6**.

Cette réaction permet de fournir la deuxième fonction d'accroche visée, l'acide phosphonique, reconnue pour présenter une meilleure aptitude à chélater les ions fer par rapport à l'acide carboxylique. Pour cela, une réaction de Steglich entre l'acide carboxylique **6** et le 2-(2-bromoéthoxy)éthanol **7** mène à un intermédiaire bromé **8** (Figure 22). Cet intermédiaire est engagé dans une réaction de Michaelis-Arbuzov avec le phosphate de tris(triméthylsilyle) $\text{P}(\text{OSiMe}_3)_3$, où le phosphonate de tris(triméthylsilyle) intermédiaire n'est pas isolé mais directement hydrolysé pour obtenir l'acide phosphonique **9** correspondant. Cette synthèse, à la différence de celle de son homologue **fpOH**, dispense de passer par la formation d'un intermédiaire ester phosphonique $-\text{PO}(\text{OEt})_2$. En effet, l'absence du site électrophile cyanovinylidène pouvant subir une addition de Michaël rend possible l'attaque directe de $\text{P}(\text{OSiMe}_3)_3$ sur l'atome de brome de **8**.

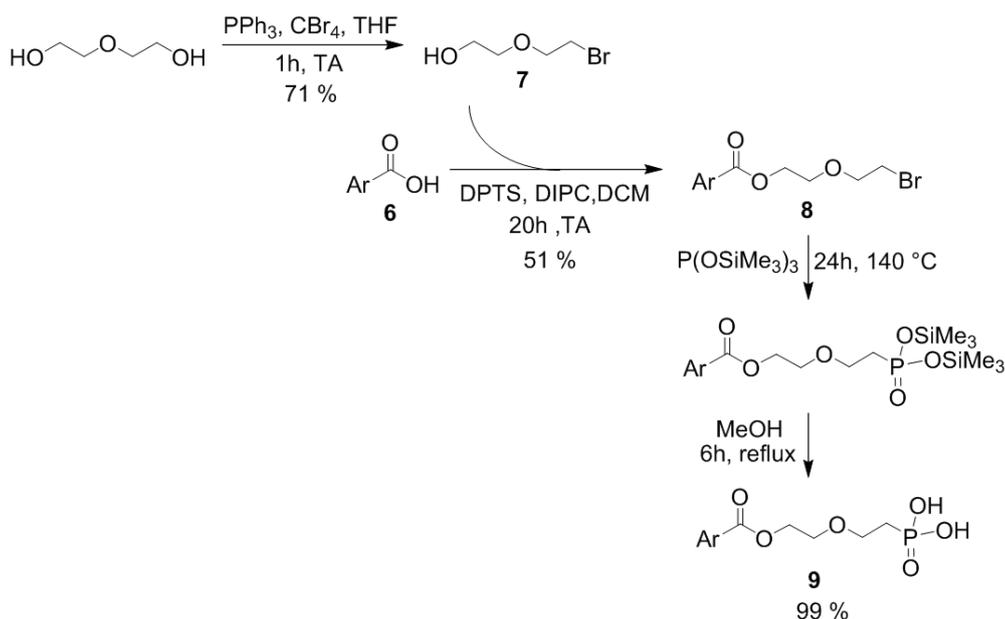


Figure 22 : Réactions de formation du fluorophore possédant une fonction acide phosphonique **9**.

Le fluorophore **10** avec une chaîne principale eicosyle (20 atomes de carbone) (Figure 23) est également synthétisé grâce à cette réaction d'estérification douce. Plus hydrophobe, cette chaîne nous permet d'espérer les propriétés intéressantes décrites dans la partie II.2.4. De plus, l'encombrement stérique généré par cette longue chaîne entraînera sans doute une augmentation du rendement quantique de fluorescence.

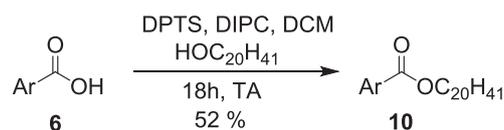


Figure 23: Réaction de formation du fluorophore avec une chaîne principale à principale eicosyle **10**.

Une réaction de Steglich avec le méthyltrioxitol donne lieu au greffage d'une chaîne glycol à 3 motifs (Figure 24) et d'obtenir le composé **11**. Cette chaîne a pour but de mimer un motif PEG et donc d'attendre des propriétés de furtivité accrues des FONS résultantes pour des utilisations de délivrance *in vivo*.

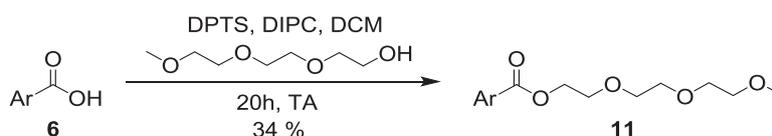


Figure 24 : Synthèse du fluorophore présentant une courte chaîne « PEG » **11**.

Des fluorophores globalement neutres ont également été synthétisés. Pour cela, la synthèse de bêtaïnes a été choisie car ce sont des composés zwitterioniques dont la charge positive ne provient pas d'une protonation et n'est pas adjacente à l'atome portant la charge négative. Deux bêtaïnes **13** et **14** ont été obtenues en partant de l'acide carboxylique (Figure 25). Lors d'une première étape, l'acide carboxylique est transformé en chlorure d'acyle plus réactif, par ajout de chlorure de thionyle. Une réaction d'estérification permet alors d'aboutir à l'introduction d'une amine tertiaire donnant le composé **12**. La deuxième étape est une addition nucléophile de l'amine tertiaire sur la 1,3-propane sultone ou la β -propiolactone pour obtenir la bêtaïne sulfonate **13** ou la bêtaïne carboxylate **14** respectivement.^{162,163} Le choix de ces deux bêtaïnes a été réalisé en fonction de leur différence de charge. En effet, les acides sulfoniques sont des acides forts. En conditions cellulaires et notamment dans les lysosomes ($\text{pH} \approx 4,5$), ils seront donc toujours présents sous forme d'ions sulfonates à l'inverse des acides carboxyliques dont l'état de protonation pourra varier. Ainsi, si la charge globale de la bêtaïne sulfonate est neutre, la bêtaïne carboxylate pourrait être positive.¹⁶⁴

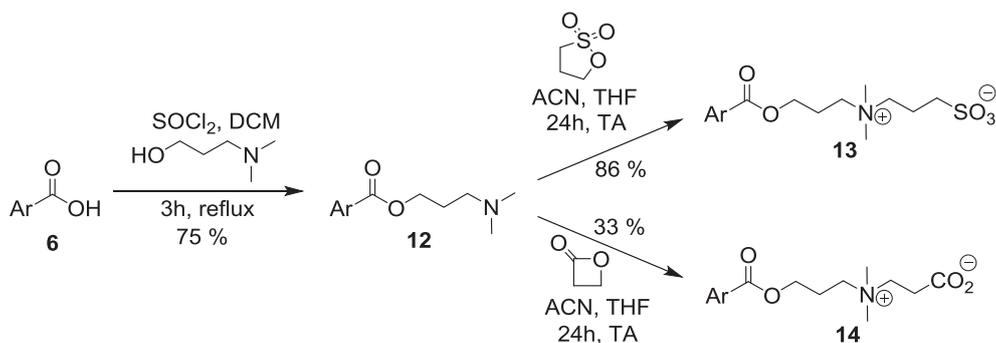


Figure 25 : Réaction de formation des deux fluorophores avec des chaînes bêtaïnes **13** et **14**.

II.2.3.2. Famille comparative benzothiadiazole/cyanovinylidène

Cette partie s'intéresse à la synthèse de molécules servant de comparaisons avec le fluorophore précédemment obtenu et largement étudié au laboratoire, à savoir **fpOH**. En effet, pour attester de l'efficacité de l'introduction du benzothiadiazole et de la suppression du groupe cyanovinylidène, les propriétés des nouvelles molécules seront automatiquement comparées à celles de **fpOH**.

Tout d'abord, un composé équivalent à **fpOH** est synthétisé. Notée **18**, cette molécule présente un groupe benzothiadiazole et un cycle phényle supplémentaire (en bleu sur la Figure 26).

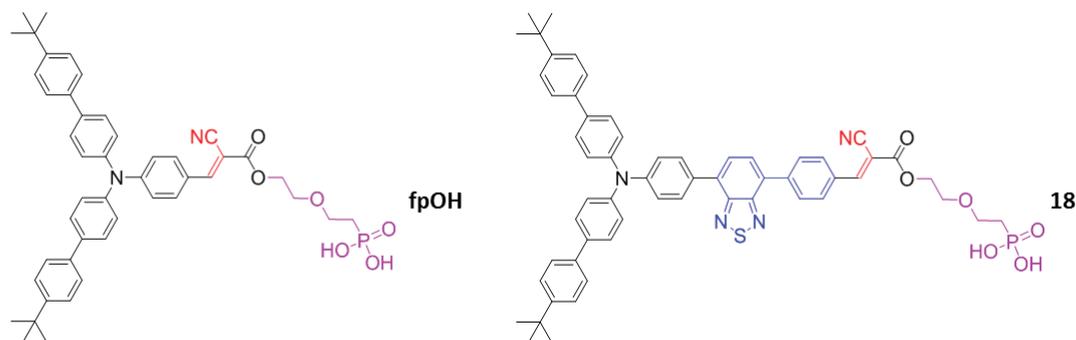


Figure 26 : Structure du composé **18**, analogue de **fpOH**.

Le composé **18** est formé à partir de l'aldéhyde **5** et cette synthèse suit le même enchaînement de réactions que celui menant à **fpOH**. Tout d'abord, un lien possédant un phosphonate de diéthyle et une fonction cyano a été préalablement synthétisé par une réaction de Michaelis-Arbuzov. Lors de cette réaction, le triéthylphosphite P(OEt)₃ attaque le réactif bromé selon un mécanisme de type S_N2, puis l'ion bromure attaque un groupe éthoxy pour donner le phosphonate de diéthyle et du bromoéthane. La force motrice de cette réaction est la formation de la liaison P=O. Ce lien est engagé dans une réaction de Knoevenagel avec le cyanoacétate, catalysée par le sel d'acétate d'ammonium. Les atomes d'hydrogène en α du carbonyle sont très acides grâce à la présence des groupes cyano et carbonyle. Une réaction acido-basique avec la pyridine forme un énolate qui attaque l'aldéhyde selon une réaction d'aldolisation-crotonisation. Enfin, une étape de méthanolyse permet d'obtenir l'acide phosphonique **18**. Cette déprotection relativement douce utilise le bromure de triméthylsilyle et procède par la formation d'un phosphonate de triméthylsilyle intermédiaire qui est finalement hydrolysé à l'aide de méthanol. Cette dernière étape engendre une précipitation sélective du produit qui permet d'éliminer tous les résidus solubles de siloxanes.

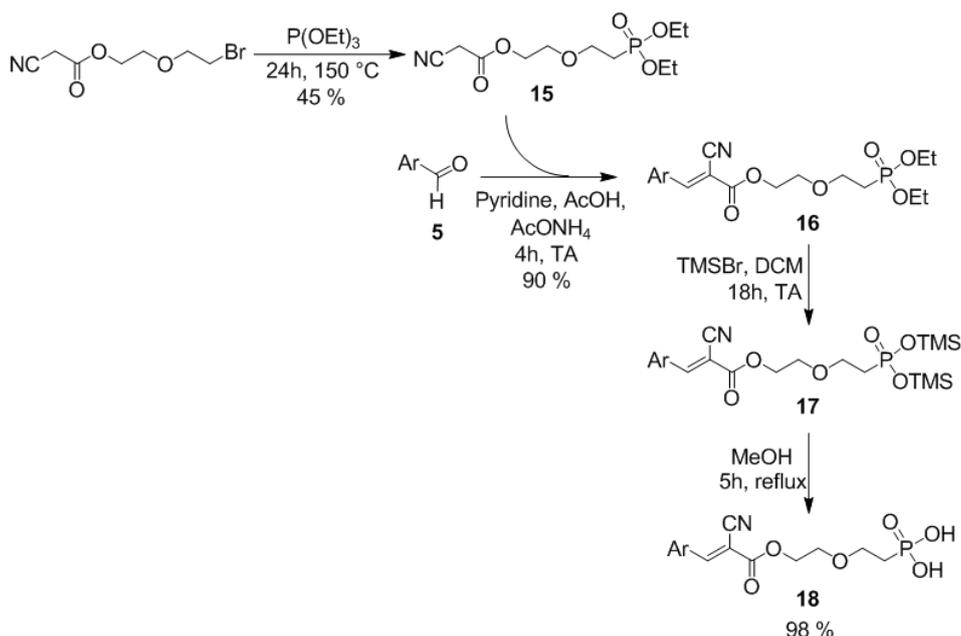


Figure 27 : Voie de synthèse de **18**.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'équivalent hydrophobe de **fpOH**, noté **19** (Figure 28), qui est également le pendant de la molécule précédemment synthétisée, notée **10**, et présentant une chaîne principale eicosyle.

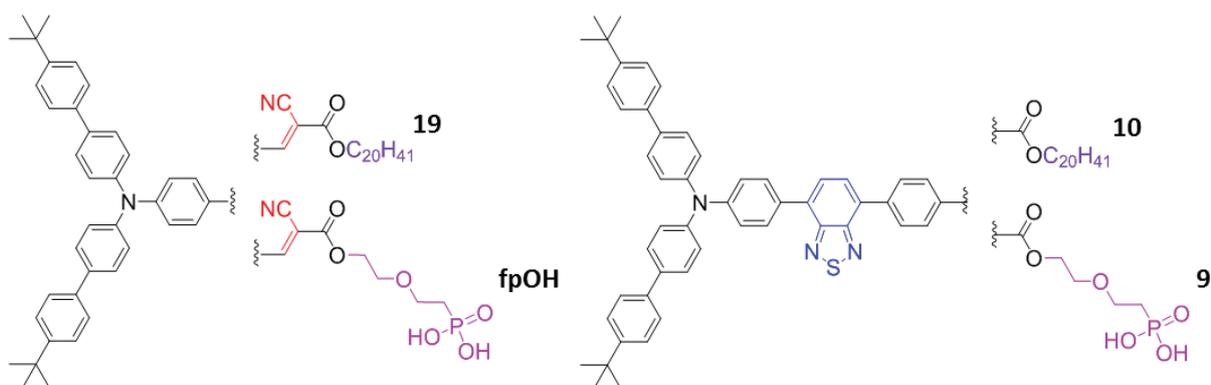


Figure 28 : Structure du composé **19**, analogue de **10** et équivalent de **fpOH**.

Le fluorophore hydrophobe **19** est obtenu à partir du composé aldéhydique précédemment obtenu au laboratoire¹⁵⁹, présentant les unités latérales *tert*-butylphényles et la chaîne principale aldéhyde. La synthèse est présentée ci-après (Figure 29). En suivant le même procédé que celui pour la synthèse du composé **18**, l'aldéhyde **5** est engagé dans une réaction de Knoevenagel avec le cyanoacétate d'eicosyle, également catalysée par le sel d'acétate d'ammonium.

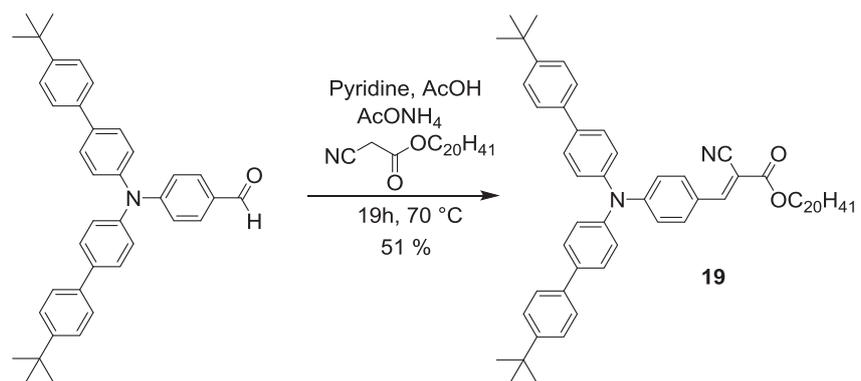
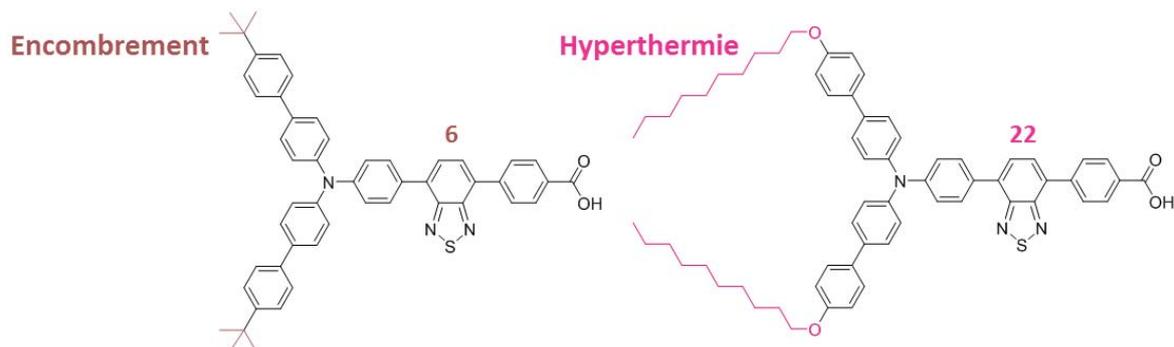


Figure 29 : Voie de synthèse de **19**.

II.2.3.3. Modification des chaînes latérales R₂

Comme expliqué précédemment, un des buts est l'obtention de fluorophores présentant des températures de transition vitreuse basses. Des groupes présentant une grande flexibilité et des rotations aisées ainsi que peu d'interactions dipolaires ou par liaison H sont susceptibles de diminuer cette température. Pour cette étude, l'ajout d'une chaîne linéaire ou ramifiée en position R₂ a donc été envisagé. Pour des questions de temps et de commodité, une longue chaîne linéaire décyle (10 atomes de carbone) a été ajoutée (Figure 30). Ce composé est noté **22** et pourra être comparé à son homologue sans chaîne alkyle **6**.



La voie de synthèse de **22** est présentée ci-après (Figure 31). Une nouvelle fois, les chaînes latérales décyles sont ajoutées avant la réaction d'oxydation, ici pour éviter une réaction compétitive entre l'acide carboxylique formé et l'organolithien. C'est pourquoi, l'acide boronique **20** apportant la chaîne alkyle est préalablement synthétisé. Celui-ci est obtenu par une transmétallation entre le triisopropyl borate B(O-*i*Pr)₃ et un aryllithien, lui-même obtenu par lithiation du 1-bromo-4-décyloxybenzène avec le *n*-butyllithium.¹⁶⁵ Cette réaction est menée à basse température pour éviter d'aller jusqu'à la formation d'un acide borinique (OR)₂BOH suite à une alkylation excessive et de détruire le lithien. Ensuite, comme pour l'ajout des unités latérales *tert*-butylphényles, l'acide boronique obtenu est engagé avec l'intermédiaire clé **4** dans une réaction de couplage de Suzuki pour mener à **21**. Une réaction d'oxydation avec l'Oxone[®] génère finalement l'acide carboxylique **22**, produit désiré, avec un rendement global correct de 50%.

II.2.4.1. Influence de l'ajout du groupe benzothiadiazole

Comparaison entre dérivés acides phosphoniques

Cette partie s'intéresse à l'influence du groupe benzothiadiazole sur les propriétés photophysiques en comparant **fpOH**, **9** et **18** en solution dans le toluène (Figure 32, Tableau 8).

Tout d'abord, il est nécessaire de remarquer deux bandes sur les spectres d'absorption des composés. Ces bandes correspondent aux deux transferts de charges présents dans les molécules : un transfert à plus haute énergie entre la triarylamine et les chaînes latérales correspondant à la transition $S_0 \rightarrow S_2$, et un transfert à plus basse énergie entre la triarylamine et la chaîne principale, correspondant à $S_0 \rightarrow S_1$. C'est la transition $S_0 \rightarrow S_1$ qui nous intéressera le plus ici. Le transfert de charge est plus important vers la chaîne principale R_1 grâce à la présence des groupes cyanovinylidène et benzothiadiazole, censés abaisser l'orbitale BV dont la densité électronique est principalement développée sur ces unités électroattractrices. C'est ce qu'on remarque en effet en observant le décalage bathochrome (voir Glossaire) de cette bande d'absorption pour **18** et dans une moindre mesure pour **9** par rapport à **fpOH**. Leur déplacement de Stokes (voir Glossaire) élevé (5600 cm^{-1} pour **fpOH**, 5300 cm^{-1} pour **9** et 4900 cm^{-1} pour **18**) permettra d'obtenir un signal fluorescent se distinguant de celui des fluorophores endogènes souvent peu décalé lors des observations en microscopie de fluorescence.

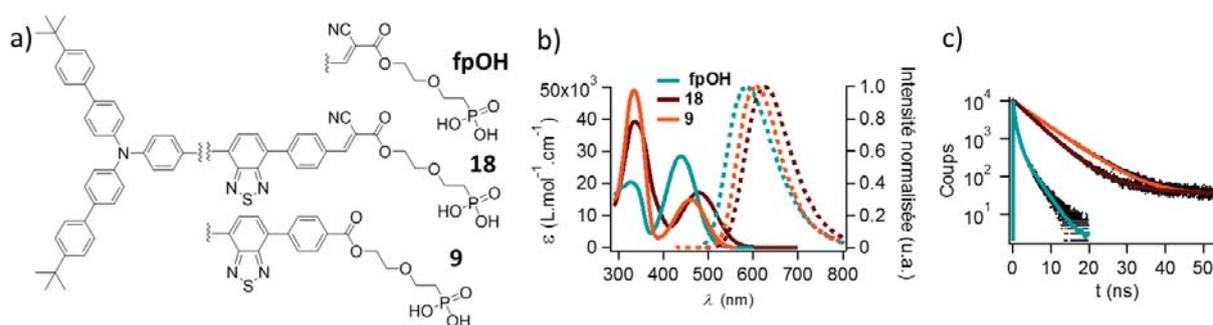


Figure 32 : a) Structure des composés comparés. b) Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (traits pointillés) ($\lambda_{exc} = 465 \text{ nm}$) des fluorophores **fpOH** (bleu), **18** (bordeaux) et **9** (orange) dans le toluène. c) Déclins de fluorescence de ces composés après modélisation ($\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$, $\lambda_{obs} = 645 \text{ nm}$).

Les spectres d'émission présentent une seule bande provenant de l'état à transfert de charge S_1 de plus basse énergie et correspondant à la transition $S_1 \rightarrow S_0$. Grâce à l'ajout du groupe benzothiadiazole, l'émission de **18** est largement décalée dans le rouge de près de 40 nm. Cette émission à 625 nm pour **18**, contre 586 nm pour **fpOH**, permet ainsi de se rapprocher de manière appréciable de la première fenêtre de transparence des tissus biologiques (650-900 nm) (voir Glossaire). Le rendement quantique de **18** est modeste et compensé par un coefficient d'absorption molaire élevé. Ainsi, sa brillance est près de 110 fois plus élevée que celle de **fpOH**, passant de 60 pour **fpOH** à $6300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour **18** (Tableau 8). Ces mesures prouvent ainsi l'intérêt de l'ajout du benzothiadiazole. L'étude du composé sans groupe cyanovinylidène **9** mettra en évidence une brillance encore plus élevée résultant d'un rendement quantique de fluorescence plus fort, même si le décalage de l'émission dans le rouge est moindre à cause d'une π -conjugaison plus réduite.

Tableau 8 : Propriétés photophysiques des fluorophores **fpOH**, **18** et **9** dans le toluène.

Composé	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	Φ_f (a)	τ_i (f_i) (b) (ns)	$\langle\tau_s\rangle$ (c) (ns)	k_f (d) (ns ⁻¹)	k_{nr} (e) (ns ⁻¹)	ε (f) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	Brillance(λ)(g) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
fpOH	328; 442	586	<0,01	2,9(35%); 0,8(48%); 0,2(27%)	1,4	0,001	0,713	28 500	60 (442)
9	335; 460	609	0,45	6,3 (100%)	6,3	0,071	0,087	14 900	6 700 (460)
18	337; 479	625	0,37	8,8(9%); 4,4(91%)	4,8	0,077	0,131	17 100	6 300 (479)

(a) Rendement quantique de fluorescence Φ_f calculé par rapport à la coumarine 540A dans l'éthanol ($\Phi_f = 0,38$). (b) Composantes τ_i et leurs proportions f_i en intensité, obtenues après modélisation par une loi exponentielle du déclin de fluorescence mesuré à 645 nm après excitation à 450 nm. (c) Moyenne des temps de vie $\langle\tau_s\rangle$ calculée à partir des τ_i (f_i). (d) Constante de vitesse k_f du processus de fluorescence calculée à partir de la relation $k_f = \Phi_f / \langle\tau_s\rangle$. (e) Constante de vitesse k_{nr} des processus non radiatifs calculée à partir de la relation $k_{nr} = (1/\langle\tau_s\rangle) - k_f$. (f) Coefficient d'absorption molaire ε évalué à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption de la bande dans le visible $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$. (g) Brilliance calculée à $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ à partir de la relation Brilliance = $\varepsilon \cdot \Phi_f$.

Un autre paramètre intéressant à étudier est le déclin de fluorescence qui traduit la durée de vie de l'état excité et les interactions dynamiques du fluorophore avec son environnement. Pour **fpOH**, le déclin a été modélisé par une loi tri-exponentielle. La proportion des trois composantes est trop importante pour être liée à une impureté et correspondrait donc à la présence de trois conformations à l'état excité, chacune relaxant vers l'état fondamental avec des constantes de vitesse différentes. Trois configurations de la molécule ont été précédemment proposées : une structure étendue, une structure repliée et une structure dimérique.¹⁵⁹ Le temps de vie moyenné en intensité est calculé égal à 1,4 ns. La valeur faible de ce temps de vie coïncide avec celle d'un faible rendement quantique. Ceci est confirmé par le calcul des constantes de vitesse des processus radiatifs k_f et non radiatifs k_{nr} . Effectivement, on observe une valeur près de 700 fois plus élevée de la constante de vitesse k_{nr} par rapport à celle du processus de fluorescence k_f . Comme le déplacement de Stokes est élevé malgré la taille réduite du système π -conjugué, on peut supposer une forte distorsion à l'état excité, conduisant à des relaxations privilégiées par conversion interne. La faible valeur du rendement quantique et le déclin rapide de l'émission sont donc à mettre en relation avec cette distorsion de la molécule à l'état excité. Les mêmes conclusions peuvent être dressées pour le composé **18**, qui présente un déclin modélisé par une loi bi-exponentielle et une constante k_{nr} plus élevée que la constante k_f . Pour le fluorophore **9**, le déclin de fluorescence a été modélisé par une décroissance mono-exponentielle, faisant apparaître un temps de vie de fluorescence relativement long de 6,3 ns. La présence d'une unique composante prouve qu'il est pur et qu'il se présente sous une seule conformation dans le toluène. k_{nr} étant légèrement supérieur à k_f , le processus de désexcitation par voie non radiative n'est plus prépondérant. Ainsi, ce composé présente de bonnes propriétés photophysiques dans le toluène.

Comparaison entre les composés avec des chaînes grasses

La même tendance est observée avec les analogues alkylés de **fpOH** et **9** comportant une chaîne principale eicosyle : **19** et **10**. L'influence de la nature de la chaîne principale sera discutée ultérieurement dans cette partie, c'est pourquoi nous ne comparons pas ici ces 4 composés entre eux. Les structures des fluorophores étudiés ainsi que leurs propriétés sont présentées ci-après (Figure 33, Tableau 9). Comme observé précédemment, le remplacement du groupe cyanovinylidène par le groupe benzothiadiazole induit un décalage bathochrome de l'émission de 17 nm, une augmentation du temps de vie de 4,1 à 6,0 ns et du rendement quantique de fluorescence. Les brillances résultantes sont proches mais proviennent de contributions différentes, à savoir un rendement quantique fort pour **10** et un coefficient d'absorption molaire élevé pour **19**. Comme dans le cas de **fpOH** et **9**, le coefficient d'absorption molaire est plus élevé pour **19** que pour **10** grâce à la présence du groupe cyanovinylidène. Des calculs de la force d'oscillateur permettraient de conforter une valeur plus élevée pour le composé **19** et donc un coefficient d'absorption molaire plus élevé.

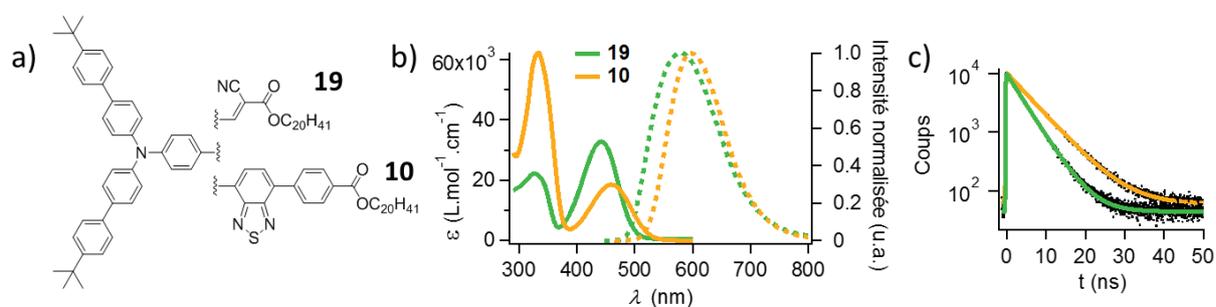


Figure 33 : a) Structure des composés comparés. b) Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (traits pointillés) ($\lambda_{exc} = 465$ nm) des fluorophores dans le toluène avec le groupe benzothiadiazole **10** (jaune) et avec le groupe cyanovinylidène **19** (vert). c) Déclins de fluorescence après modélisation ($\lambda_{exc} = 450$ nm, $\lambda_{obs} = 645$ nm).

Tableau 9 : Propriétés photophysiques des fluorophores **19** et **10** dans le toluène.

Composé	λ_{max}^{abs} (nm)	λ_{max}^{em} (nm)	Φ_f (^a)	τ_i (f_i) (ns)	k_f (^c) (ns ⁻¹)	k_{nr} (^d) (ns ⁻¹)	ϵ (^e) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	Brillance (λ) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
19	327; 442	580	0,24	4,1 (100%)	0,059	0,185	32 800	7 900 (442)
10	333; 460	597	0,47	6,0 (100%)	0,078	0,088	18 400	8 600 (460)

(^a) Rendement quantique de fluorescence Φ_f calculé par rapport à la coumarine 540A dans l'éthanol ($\Phi_f = 0,38$). (^b) Composantes τ_i et leurs proportions f_i en intensité, obtenues après modélisation par une loi exponentielle du déclin de fluorescence mesuré à 645 nm après excitation à 450 nm. (^c) Constante de vitesse k_f du processus de fluorescence calculée à partir de la relation $k_f = \Phi_f / \langle \tau_s \rangle$. (^d) Constante de vitesse k_{nr} des processus non radiatifs calculée à partir de la relation $k_{nr} = (1 / \langle \tau_s \rangle) - k_f$. (^e) Coefficient d'absorption molaire ϵ évalué à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption de la bande dans le visible λ_{max}^{abs} . (^f) Brillance calculée à λ_{max}^{abs} à partir de la relation Brillance = $\epsilon \cdot \Phi_f$.

II.2.4.2. Influence des chaînes latérales R₂

Nous nous sommes également intéressés à l'influence de la modification des chaînes latérales R₂ en comparant les unités *tert*-butylphényles de **6** avec les chaînes décylxy de **22**. Leurs structures sont rappelées ci-après (Figure 34).

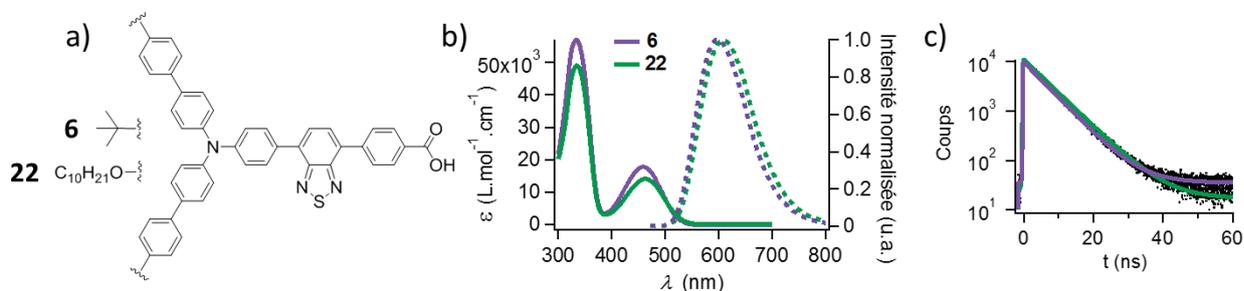


Figure 34 : a) Structures des deux composés comparés. b) Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (traits pointillés) ($\lambda_{exc} = 465 \text{ nm}$) des fluorophores dans le toluène en fonction de la nature de chaîne latérale : oxydécyle **22** (vert) et *tert*-butyle **6** (violet). c) Déclins de fluorescence après modélisation ($\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$, $\lambda_{obs} = 645 \text{ nm}$).

Tableau 10 : Propriétés photophysiques des fluorophores **6** et **22** dans le toluène.

Composé	λ_{max}^{abs} (nm)	λ_{max}^{em} (nm)	Φ_f (a)	τ_i (f_i) (b) (ns)	k_f (c) (ns ⁻¹)	k_{nr} (d) (ns ⁻¹)	ϵ (e) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	Brillance (λ) (f) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
6	334; 459	597	0,58	6,0 (100%)	0,097	0,070	17 800	10 300 (459)
22	335; 463	608	0,58	6,4 (100%)	0,091	0,066	14 000	8 100 (463)

(a) Rendement quantique de fluorescence Φ_f calculé par rapport à la coumarine 540A dans l'éthanol ($\Phi_f = 0,38$). (b) Composantes τ_i et leurs proportions f_i en intensité, obtenues après modélisation par une loi exponentielle du déclin de fluorescence mesuré à 645 nm après excitation à 450 nm. (c) Constante de vitesse k_f du processus de fluorescence calculée à partir de la relation $k_f = \Phi_f / \langle \tau_s \rangle$. (d) Constante de vitesse k_{nr} des processus non radiatifs calculée à partir de la relation $k_{nr} = (1 / \langle \tau_s \rangle) - k_f$. (e) Coefficient d'absorption molaire ϵ évalué à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption de la bande dans le visible λ_{max}^{abs} . (f) Brillance calculée à λ_{max}^{abs} à partir de la relation Brillance = $\epsilon \cdot \Phi_f$.

On observe un léger décalage bathochrome de 4 nm des spectres d'absorption pour les chaînes décyles par rapport à ceux des unités *tert*-butyles (Tableau 10). La présence d'atomes d'oxygène sur les chaînes R₂ induit une augmentation du transfert de charge par effet mésomère donneur dans la molécule **22**, haussant l'énergie de l'orbitale HO. Ce décalage peut également provenir d'une bonne stabilisation de l'état fondamental de **22**. En effet, l'utilisation d'un solvant apolaire comme le toluène permet de mieux solvater les longues chaînes apolaires de **22**. Les coefficients d'absorption molaire sont relativement proches avec un écart d'à peine 4000 L.mol⁻¹.cm⁻¹. Ainsi, ces résultats montrent que les chaînes latérales influencent peu le transfert de charge de la chaîne principale.

Un plus grand décalage bathochrome de la longueur d'onde maximale d'émission de 11 nm est observé en passant d'un groupe latéral *tert*-butyle à une chaîne décyle. Ce décalage provient, encore une fois, du transfert de charge accru permis par les atomes d'oxygène pour **22**.

Les déclin de fluorescence des deux composés ont été modélisés par une décroissance mono-exponentielle, fournissant des temps de vie très proches. Ceci est corroboré par les valeurs identiques de rendement quantique égales à 0,58. Au vu de ces similarités photophysiques, la nature de la chaîne latérale R₂ n'exerce donc aucune influence significative sur la géométrie de l'état excité et de ses voies de désactivation.

II.2.4.3. Influence de la chaîne principale R₁

Dans cette partie, l'influence de la balance hydrophile/hydrophobe est étudiée à travers des modifications de la chaîne principale R₁. Pour cela, nous utiliserons les molécules présentant des groupes acides, des groupes apolaires (chaîne alkyle) et polaires (chaîne éthylène glycol).

Chaîne principale R₁ avec le groupe benzothiadiazole

Tout d'abord, étudions l'influence de la chaîne principale présentant un groupe benzothiadiazole à partir de fluorophores présentant différents groupes : acide carboxylique (**6**), acide phosphonique (**9**), chaîne alkyle (**10**), chaîne PEGylée (**11**) et bétaïnes (**13** et **14**) représentés ci-après (Figure 35).

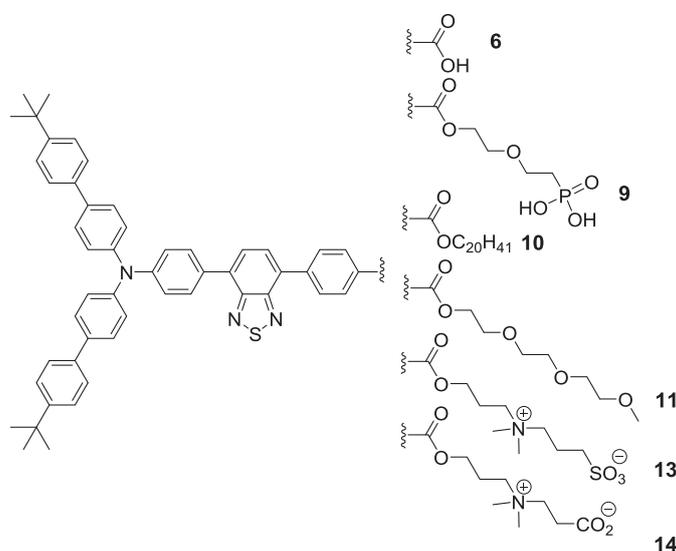


Figure 35 : Rappel des structures des fluorophores comparés.

En comparant les spectres des composés, on peut noter que la nature de la chaîne R₁ a peu d'influence sur les longueurs d'onde d'absorption et d'émission (Figure 36). En effet, les bandes d'absorption présentent un maximum centré autour de 460 ± 1 nm avec des intensités proches pour tous les composés, excepté **14**, qui présente un coefficient d'absorption molaire plus bas que les autres (Tableau 11). Cette différence pour **14** provient sans doute de la présence d'une impureté non fluorescente non identifiée. L'écart entre les maxima d'émission des

fluorophores n'est que de 12 nm. Ceci prouve que les molécules présentent la même répartition de la densité électronique dans leur état fondamental et dans leur état excité. Les temps de vie moyens sont également relativement identiques autour de 6,1 ns. Quelques tendances générales se distinguent néanmoins entre des familles de structures différentes.

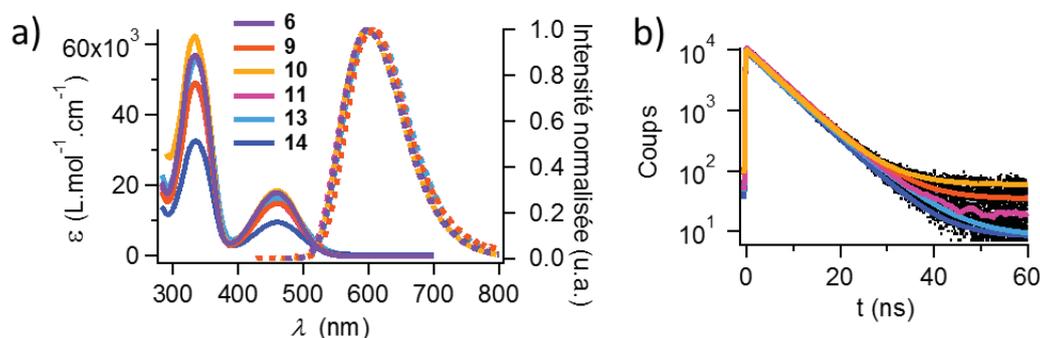


Figure 36 : a) Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (traits pointillés) ($\lambda_{exc} = 465$ nm) des fluorophores dans le toluène en fonction de la nature de la chaîne principale : acide carboxylique **6** (violet), acide phosphonique **9** (orange), alkyle **10** (jaune), PEG **11** (rose), bétaine carboxylate **13** (bleu clair) et bétaine sulfonate **14** (bleu foncé). b) Déclins de fluorescence après modélisation ($\lambda_{exc} = 450$ nm, $\lambda_{obs} = 645$ nm).

Tableau 11 : Propriétés photophysiques des fluorophores dans le toluène.

Composé	λ_{max}^{abs} (nm)	λ_{max}^{em} (nm)	Φ_f (^a)	τ_i (f_i) (^b) (ns)	$\langle\tau_s\rangle$ (^c) (ns)	k_f (^d) (ns ⁻¹)	k_{nr} (^e) (ns ⁻¹)	ϵ (^f) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	Brillance (λ)(^g) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
6	334; 459	597	0,58	6,0(100%)	6,0	0,097	0,070	17 800	10 300 (459)
9	335; 460	609	0,45	6,3(100%)	6,3	0,071	0,087	14 900	6 700 (460)
10	333; 460	597	0,47	6,0(100%)	6,0	0,078	0,088	18 400	8 600 (460)
11	334; 458	602	0,71	6,2(100%)	6,2	0,115	0,047	15 000	10 700 (458)
13	335; 460	604	0,34	6,9(75%); 4,1(25%)	6,2	0,055	0,106	16 300	5 500 (460)
14	335; 460	598	0,42	6,0(100%)	6,0	0,070	0,097	9 500	4 000 (460)

(^a) Rendement quantique de fluorescence Φ_f calculé par rapport à la coumarine 540A dans l'éthanol ($\Phi_f = 0,38$). (^b) Composantes τ_i et leurs proportions f_i en intensité, obtenues après modélisation par une loi exponentielle du déclin de fluorescence mesuré à 645 nm après excitation à 450 nm. (^c) Moyenne des temps de vie $\langle\tau_s\rangle$ calculée à partir des τ_i (f_i). (^d) Constante de vitesse k_f du processus de fluorescence calculée à partir de la relation $k_f = \Phi_f / \langle\tau_s\rangle$. (^e) Constante de vitesse k_{nr} des processus non radiatifs calculée à partir de la relation $k_{nr} = (1 / \langle\tau_s\rangle) - k_f$. (^f) Coefficient d'absorption molaire ϵ évalué à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption de la bande dans le visible λ_{max}^{abs} . (^g) Brillance calculée à λ_{max}^{abs} à partir de la relation Brillance = $\epsilon \cdot \Phi_f$.

En effet, une analyse plus fine des longueurs d'onde d'émission maximale montre que les spectres de **9**, **13** et **11** sont les plus décalés dans le rouge. Pour **9** et **13**, ce décalage bathochrome peut être attribué à une solvatisation différente des fonctions acides phosphonique et sulfonique peu enclines à interagir avec le toluène. Pour **11**, la chaîne polaire éthylène-glycol permet de mieux stabiliser l'état excité polaire.

Excepté pour **13**, la décroissance mono-exponentielle observée prouve que ces composés sont purs et présents sous une seule forme en solution. Le calcul des constantes de vitesse k_f et k_{nr} nous donne globalement les mêmes résultats, avec, néanmoins, un processus de désexcitation par fluorescence plus marqué que celui par relaxation non radiative pour **11** et inversement pour **13**. Pour **13**, une modélisation bi-exponentielle a été nécessaire. La proportion des deux composantes est trop importante pour être liée à une impureté. Comme pour **fpOH**, on observe à nouveau $k_f \ll k_{nr}$, signalant que le composé est présent sous plusieurs formes en solution. Ceci s'explique par le fait que le sulfonate de **13** et le phosphonate de **fpOH** sont des acides forts pouvant donc impacter la solvatisation de l'état excité.

Globalement, les bêtaïnes présentent les propriétés photophysiques les moins bonnes. Leurs brillances autour de $4000-5000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, leurs rendements quantiques de fluorescence et leurs temps de vie font partie des plus faibles rencontrés dans cette comparaison. L'effet de la charge des fluorophores a donc une influence sur les propriétés de fluorescence.

Les molécules **6** et **9** nous serviront principalement tout au long de ce manuscrit et notamment pour la formation d'assemblages hydrides. Elles nous permettent ici d'étudier l'influence du groupe acide choisi, à savoir carboxylique ou phosphonique. Leurs coefficients d'absorption molaire sont élevés, autour de $15000-18000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ au maximum d'absorption. L'émission du fluorophore contenant l'acide phosphonique est décalée de 12 nm dans le rouge par rapport à l'acide carboxylique. Ce décalage bathochrome est peut-être dû à la formation de dimère entre les fonctions acides carboxyliques de **6** abaissant le côté électro-attracteur et stabilisant l'état excité. Cette dimérisation est également possible entre les fonctions acides phosphoniques de **9** mais n'a pas d'impact sur les propriétés photophysiques étant donné que ces fonctions ne sont pas conjuguées avec le reste de la molécule. Leurs rendements quantiques de fluorescence sont respectivement de 45 % et 58 % pour **9** et **6** aboutissant ainsi à des brillances élevées, équivalentes à celles des quantum dots. La valeur plus faible obtenue avec l'acide phosphonique avait déjà été observée précédemment sur le composé **fpOH** et est due à une interaction par liaison H intramoléculaire induisant une plus forte désactivation non radiative par couplage vibrationnel.¹⁵⁹ Pour les deux molécules, le déplacement de Stokes est d'environ 5000 cm^{-1} , ce qui est idéal pour des fluorophores utilisés en bioimagerie. Ces informations nous prouvent que les propriétés photophysiques de l'acide carboxylique en solution dans le toluène sont plus intéressantes que celles de l'acide phosphonique.

Les composés **6** et **11** sortent globalement du lot car ils présentent les meilleures performances photophysiques. La stabilisation de l'état excité (par formation de dimère ou présence d'une chaîne polaire) leur confère une brillance très élevée avoisinant $1,1.10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et des rendements quantiques de fluorescence autour de 60-70 %. De plus, leur constante de vitesse k_f bien supérieure à k_{nr} , montre la part prépondérante de la fluorescence dans le processus de désexcitation.

Chaîne principale R₁ avec le groupe cyanovinylidène

Enfin, comparons l'influence de la chaîne principale pour deux composés comportant un groupe cyanovinylidène, à savoir le fluorophore **19** doté d'une chaîne alkyle et le fluorophore **20** pourvu d'une chaîne polaire avec un acide phosphonique terminal **fpOH**. Leurs propriétés photophysiques sont résumées ci-après (Figure 37, Tableau 12).

Concernant les spectres d'absorption, aucune différence n'est notée au niveau de leur énergie, avec des longueurs d'onde d'absorption maximale $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ égales à 440 et 442 nm, ou de leur coefficient d'absorption molaire autour de 30 000 L.mol⁻¹.cm⁻¹.

Un léger décalage bathochrome de l'émission pour **fpOH** est attribué à la polarité de la courte chaîne éthylèneglycol en R₁ qui accroît la polarité locale et contribue à une meilleure stabilisation de l'état excité polaire, comme nous le verrons lors des études dans un solvant polaire comme le THF. Le rendement quantique est bien plus élevé dans le cas de **19**, dû à l'absence d'interactions par liaison H intramoléculaire, d'où une très bonne brillance. Pour **19**, on observe également $k_f < k_{nr}$ mais en moindre proportion.

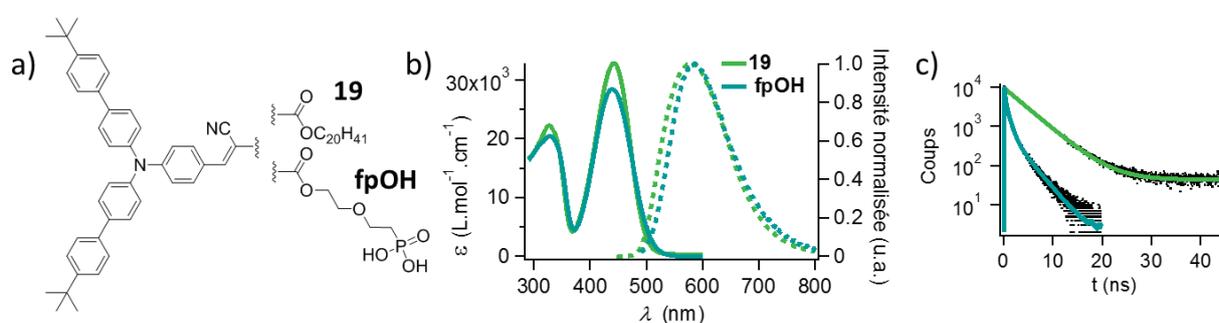


Figure 37 : a) Structures des deux composés comparés. b) Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (traits pointillés) ($\lambda_{\text{exc}} = 465 \text{ nm}$) des fluorophores dans le toluène en fonction de la nature de chaîne latérale de **19** (vert) et **fpOH** (bleu). c) Déclins de fluorescence après modélisation ($\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{obs}} = 645 \text{ nm}$).

Tableau 12 : Propriétés photophysiques des fluorophores **19** et **fpOH** dans le toluène.

Composé	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	Φ_f (a)	τ_i (f _i) (b) (ns)	k_f (c) (ns ⁻¹)	k_{nr} (d) (ns ⁻¹)	ϵ (e) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	Brillance (λ) (f) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
19	327; 442	580	0,24	4,1 (100%)	0,059	0,185	32 800	7 900 (442)
fpOH	328; 440	586	<0,01	2,9(35%); 0,8(48%); 0,2(27%)	0,001	0,713	28 500	60 (440)

(a) Rendement quantique de fluorescence Φ_f calculé par rapport à la coumarine 540A dans l'éthanol ($\Phi_f = 0,38$). (b) Composantes τ_i et leurs proportions f_i en intensité, obtenues après modélisation par une loi exponentielle du déclin de fluorescence mesuré à 645 nm après excitation à 450 nm. (c) Constante de vitesse k_f du processus de fluorescence calculée à partir de la relation $k_f = \Phi_f / \langle \tau_s \rangle$. (d) Constante de vitesse k_{nr} des processus non radiatifs calculée à partir de la relation $k_{nr} = (1 / \langle \tau_s \rangle) - k_f$. (e) Coefficient d'absorption molaire ϵ évalué à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption de la bande dans le visible $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$. (f) Brilliance calculée à $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ à partir de la relation Brilliance = $\epsilon \cdot \Phi_f$.

II.2.4.4. Comparaison avec les propriétés photophysiques dans le THF

Les précédents résultats nous ont montré que les propriétés photophysiques de l'ensemble des composés étaient relativement proches, malgré des aspects de polarité distincts. C'est pourquoi les mêmes mesures ont été effectuées dans le THF, solvant plus polaire que le toluène, et appelé à solvater différemment les états excités. Les résultats sont rassemblés dans le tableau ci-après (Tableau 13).

Tableau 13 : Propriétés photophysiques des fluorophores dans le THF.

Composé	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	Φ_f (^a)	τ_i (f_i) (^b) (ns)	$\langle \tau_s \rangle$ (^c) (ns)	k_f (^d) (ns ⁻¹)	k_{nr} (^e) (ns ⁻¹)	ϵ (^f) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	Brillance (λ) (^g) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
6	329; 453	656	0,33	5,7(100%)	5,7	0,058	0,118	15 800	5 200 (453)
22	332; 457	676	0,12	6,7(6%); 2,6(94%)	2,8	0,043	0,314	14 700	1 800 (457)
9	334; 455	662	0,19	5,4(100%)	5,4	0,035	0,150	14 800	2 800 (455)
18	333; 470	674	0,01	5,7(78%); 0,9(22%)	4,6	0,002	0,215	21 700	200 (470)
10	331; 454	660	0,20	5,5(100%)	5,5	0,036	0,145	17 500	3 500 (454)
19	322; 436	625	0,17	0,5(100%)	0,5	0,340	1,660	42 800	7 300 (436)
13	333; 455	666	0,16	6,2(64%); 3,8(36%)	5,3	0,030	0,158	14 900	2 400 (455)
14	333; 457	658	0,20	6,0(82%); 2,9(18%)	5,4	0,037	0,148	9 100	1 800 (457)
11	331; 453	661	0,31	5,3(100%)	5,3	0,058	0,130	12 600	3 900 (453)
fpOH	324; 435	621	0,02	1,6(18%); 0,5(82%)	0,7	0,029	1,400	36 600	700 (435)

(^a) Rendement quantique de fluorescence Φ_f calculé par rapport à la coumarine 540A dans l'éthanol ($\Phi_f = 0,38$). (^b) Composantes τ_i et leurs proportions f_i en intensité, obtenues après modélisation par une loi exponentielle du déclin de fluorescence mesuré à 645 nm après excitation à 450 nm. (^c) Moyenne des temps de vie $\langle \tau_s \rangle$ calculée à partir des τ_i (f_i). (^d) Constante de vitesse k_f du processus de fluorescence calculée à partir de la relation $k_f = \Phi_f / \langle \tau_s \rangle$. (^e) Constante de vitesse k_{nr} des processus non radiatifs calculée à partir de la relation $k_{nr} = (1 / \langle \tau_s \rangle) - k_f$. (^f) Coefficient d'absorption molaire ϵ évalué à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption de la bande dans le visible $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$. (^g) Brillance calculée à $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ à partir de la relation Brillance = $\epsilon \cdot \Phi_f$.

Globalement par rapport au toluène, on observe que la longueur d'onde d'émission maximale est plus décalée dans le rouge en solution dans le THF. Comme attendu, ceci est dû à une meilleure stabilisation de l'état excité polaire par le THF, plus polaire que le toluène. Cependant, mis à part pour **fpOH**, les rendements quantiques et les temps de vie de fluorescence sont plus faibles que ceux dans le toluène. Ceci s'explique par une relaxation par voie non radiative (conversion interne ou croisement inter-systèmes) privilégiée comme nous l'indique la proportion plus importante des processus de désexcitation non radiatifs vis-à-vis des processus de fluorescence ($k_{nr} > k_f$). Ce phénomène est également rencontré dans d'autres solvants polaires comme l'eau, l'acétone ou le dichlorométhane et sera décrit dans la partie suivante.

II.2.5. Etude de solvatochromisme

Comme nous avons pu le constater, les propriétés photophysiques des fluorophores dépendent du solvant dans lequel ils sont dissous. Pour aller plus loin dans ces réflexions, il est nécessaire de réaliser une étude de solvatochromisme, visant à identifier la capacité des molécules à changer de spectres d'absorption et/ou d'émission selon la polarité du milieu où elles se trouvent. Ces phénomènes résultent d'une stabilisation privilégiée de l'état excité ou de l'état fondamental par les molécules environnantes et ont été mis à profit pour étudier le comportement des fluorophores dans différents milieux. En effet, après internalisation dans les cellules, il est attendu que la FON se délite en ses fluorophores constitutifs. L'utilisation de fluorophores solvatochromes est donc intéressante dans la mesure où ils peuvent émettre à des longueurs d'onde différentes avant et après délitement de la nanoparticule en fonction de la nature du milieu intracellulaire. En effet, le cytoplasme est polaire et la membrane lipidique apolaire.

Les solvants étudiés ont été choisis pour leurs différences de polarité et de proticité et sont répertoriés dans le tableau ci-après (Tableau 14) par comparaison avec l'eau.

Tableau 14 : Solvants utilisés, leur moment dipolaire μ et leur paramètre de Kamlet-Taft α , β et π^* .^{166,167}

Solvant	μ (D) ^(a)	α ^(b)	β ^(c)	π^* ^(d)
Acétone	2,88	0,08	0,43	0,71
Eau	1,85	1,17	0,18	1,09
AcOEt	1,78	0	0,45	0,55
THF	1,75	0	0,55	0,58
DCM	1,62	0,13	0,10	0,82
Toluène	0,36	0	0,11	0,54
Cyclohexane	0	0	0	0

^(a) Le moment dipolaire μ en Debye (D). Le paramètre de Kamlet-Taft ^(b) α désigne le caractère donneur de liaison hydrogène, ^(c) β le caractère accepteur de liaison hydrogène et ^(d) π^* la polarisabilité du solvant. Ces trois paramètres contribuent à la polarité globale du solvant.

Pour comparer l'évolution du solvatochromisme avec l'évolution de la balance hydrophile/hydrophobe, quatre fluorophores ont été choisis : deux plutôt hydrophobes **19** et **10**, et deux plutôt hydrophiles **6** et **9**. Un rappel de la structure de ces composés est effectuée ci-après (Figure 38). Leurs spectres d'absorption et d'émission dans les différents solvants ont été enregistrés (Figure 39). L'insolubilité du composé **9** dans le cyclohexane explique l'absence de données pour ce solvant et le composé **6** ne présente pas une fluorescence suffisante dans l'acétone pour conclure.

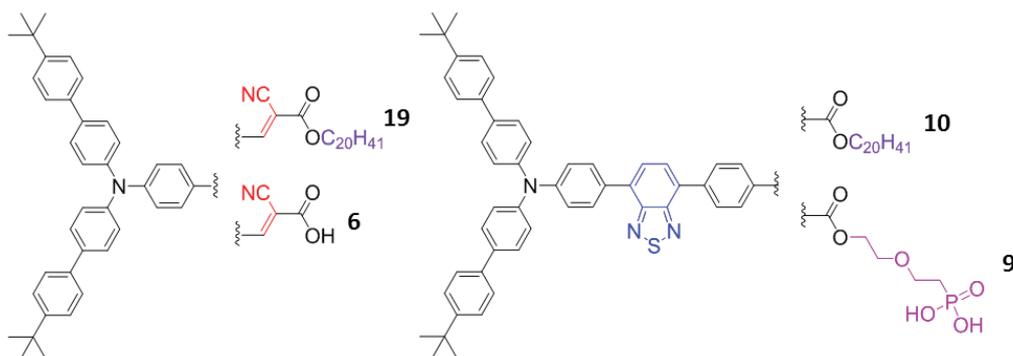


Figure 38 : Structure des composés dont le solvatochromisme est étudié

Les spectres d'absorption des quatre espèces sont quasiment identiques pour chaque solvant. Les spectres d'émission subissent un déplacement bathochrome (solvatochromisme positif) avec l'augmentation de la polarité du solvant. La polarité du solvant a donc un impact plus important sur l'état excité que sur l'état fondamental. Ceci prouve que l'état excité est plus polaire que l'état fondamental, d'où sa plus grande stabilisation et un plus grand déplacement de Stokes en milieux polaires pour les molécules les plus polaires. L'étude des paramètres de Kamlet-Taft ne révèle pas de lien particulier entre les propriétés photophysiques des composés et le caractère donneur-accepteur de liaisons H des solvants. Ceci montre que le comportement des composés dans les différents solvants n'est pas dû à des interactions par liaisons H.

L'eau ayant une polarité proche de celle de l'acétate d'éthyle et du THF on s'attend alors à retrouver une longueur d'onde d'émission maximale proche de celle observée dans ces solvants, à savoir autour de 630 nm en fonction de la nature du fluorophore. Cependant, ne prendre en considération que la seule influence de l'eau sur les propriétés des FONs est inexacte car la densité et la proximité des fluorophores au sein des FONs (10^5 molécules par FON) font qu'elles s'influencent les unes sur les autres. C'est pourquoi, comme nous le verrons dans la partie suivante, des valeurs sensiblement différentes seront obtenues sous forme de FONs.

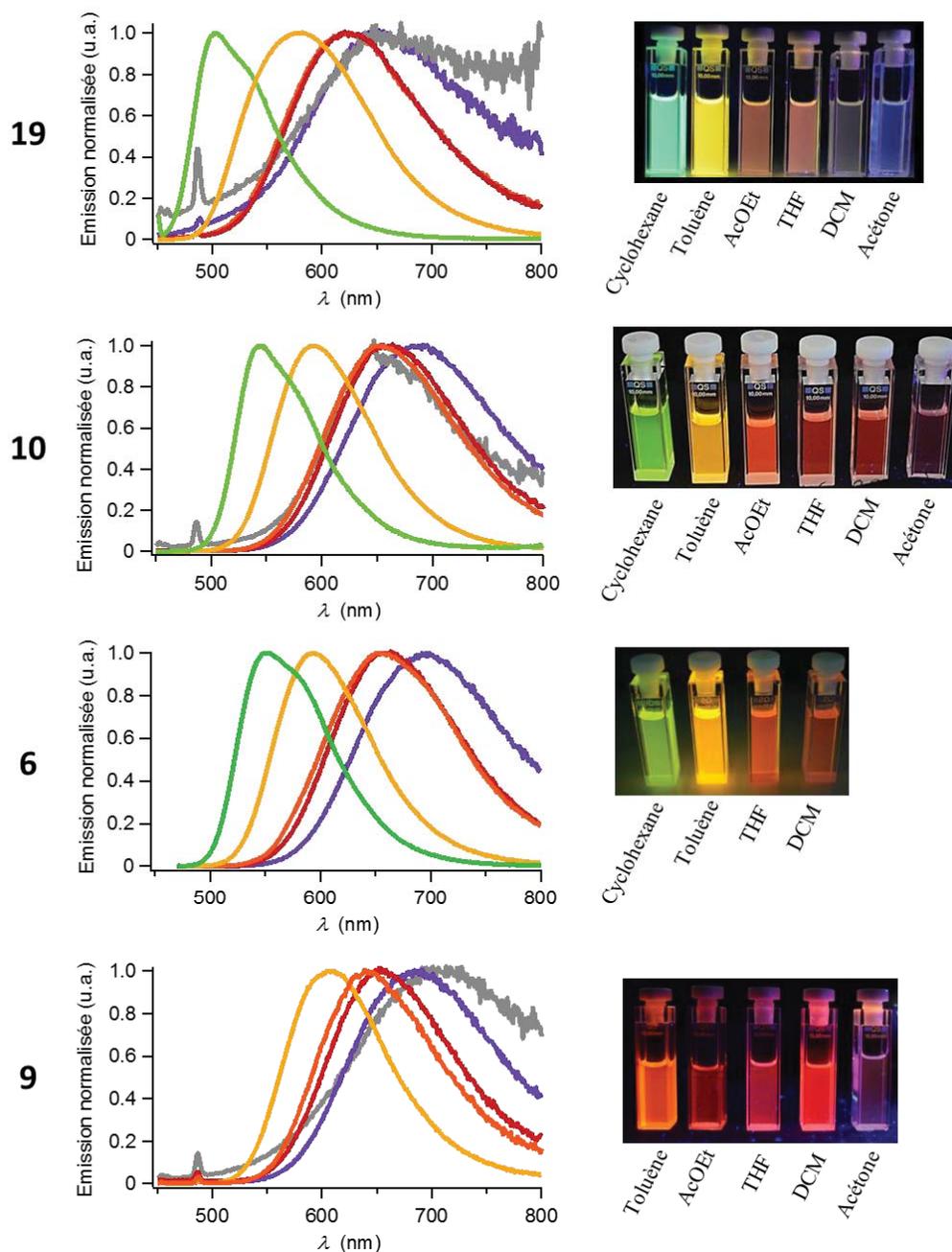


Figure 39 : Spectres d'émission normalisés des composés **19**, **10**, **6** et **9** ($\lambda_{exc} = 465$ nm) dans le cyclohexane (vert), le toluène (jaune), l'acétate d'éthyle (orange), le THF (rouge), le dichlorométhane (violet) et l'acétone (gris). Photographie des cuves de spectroscopie contenant les composés dans les solvants correspondants ($\lambda_{exc} = 365$ nm).

Les rendements quantiques de fluorescence ainsi que les temps de vie ont été également mesurés (Tableau 15). D'une manière générale, la fluorescence diminue lorsque la polarité du solvant augmente. Les faibles valeurs obtenues en solvant polaire comme l'acétone ou le dichlorométhane sont dues à une stabilisation de l'état excité qui se désexcite par conversion interne ou croisement inter-systèmes et non par voie radiative.¹⁶⁸ Dans ce cas, on peut imaginer un transfert de charge interne stabilisé en milieu polaire, s'accompagnant d'une perte de symétrie par torsion de la liaison C-N de la triphénylamine.

Nous verrons qu'un changement de couleur d'émission apparaît au cours du temps lorsque les FONs sont internalisées dans des cellules. Nous l'avons attribué à une modification d'environnement, comme détaillé ultérieurement (chapitre 3).

Tableau 15 : Propriétés photophysiques des composés **19**, **10**, **6** et **9** en solution dans différents solvants classés par ordre de polarité décroissante.

Composé	Solvant	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	$\Phi_f^{(a)}$	$\tau_i (f_i)^{(b)}$ (ns)	$\langle \tau_s \rangle^{(c)}$ (ns)
19	Acétone	434	798	0,00	0,03 (93%); 4,65 (7%)	0,4
	AcOEt	434	623	0,02	1,1 (3%); 0,5 (94%); 0,06 (3%)	0,5
	THF	437	<u>625</u>	0,17	0,5 (100%)	0,5
	DCM	442	648	0,00	1,1 (1%); 0,1 (68%); 0,01 (31%)	0,1
	Toluène	442	<u>580</u>	0,24	4,1 (100%)	4,1
	Cyclohexane	430	503	0,31	2,1 (100%)	2,1
10	Acétone	451	647	0,02	6,1 (49%); 2,0 (40%); 0,4 (11%)	3,8
	AcOEt	450	652	0,30	5,5 (100%)	5,5
	THF	454	<u>660</u>	0,20	5,5 (100%)	5,5
	DCM	454	691	0,09	8,3 (7%); 3,9 (88%); 2,6 (5%)	4,1
	Toluène	460	<u>597</u>	0,47	6,0 (100%)	6,0
	Cyclohexane	458	546	0,64	5,4 (100%)	5,4
6	Acétone	Non mesurable				
	AcOEt	445	656	0,26	4,6 (100%)	4,6
	THF	454	<u>664</u>	0,27	5,2 (100%)	5,2
	DCM	457	696	0,10	3,0 (100%)	3,0
	Toluène	460	<u>597</u>	0,58	6,0 (100%)	6,0
	Cyclohexane	463	552	0,56	5,2 (100%)	5,2
9	Acétone	443	713	0,01	0,6 (73%); 4,7 (27%)	1,7
	AcOEt	451	639	0,18	7,8 (46%); 4,4 (54%)	6,0
	THF	455	<u>652</u>	0,41	5,4 (100%)	5,4
	DCM	458	691	0,04	4,4 (29%); 2,1 (69%); 0,3 (2%)	2,7
	Toluène	460	<u>609</u>	0,45	6,3 (100%)	6,3
	Cyclohexane	Non soluble				

^(a) Rendement quantique de fluorescence Φ_f calculé par rapport à la coumarine 540A dans l'éthanol ($\Phi_f = 0,38$). ^(b) Composantes τ_i et leurs proportions f_i en intensité, obtenues après modélisation par une loi exponentielle du déclin de fluorescence mesuré à 645 nm après excitation à 450 nm. ^(c) Moyenne des temps de vie $\langle \tau_s \rangle$ calculée à partir des $\tau_i (f_i)$. Pour plus de lisibilité, les longueurs d'ondes d'émission maximale des composés dans le THF sont soulignées d'un trait et celles dans le toluène de deux traits.

II.2.6. Analyse thermique

L'objectif ultime de ces travaux de thèse est de contrôler le délitement des nanoassemblages hybrides magnéto-fluorescents en faisant fondre leur cœur fluorescent par hyperthermie magnétique. L'analyse thermique des composés a donc été effectuée grâce à des mesures de calorimétrie différentielle à balayage. Elle permet d'avoir des informations sur les interactions développées à l'état solide à partir des températures de transition de phase. La température de fusion, notée T_f , est la température à laquelle le matériau cristallin passe de l'état solide à l'état liquide. La température de transition vitreuse, notée T_g , est la température à laquelle l'échantillon amorphe passe d'un état vitreux, dur, à un état caoutchouteux. De précédentes études ont montré que la nature des substituants autour d'une structure commune du colorant ou du fluorophore influençait fortement ces températures.¹⁵⁹

L'analyse thermique des composés **fpOH** et **18** révèle la présence d'une température de transition vitreuse T_g , les fluorophores sous forme de poudre sont donc amorphes à l'état solide. De plus, l'ajout du motif benzothiadiazole de **18** augmente la température de transition vitreuse de 37 °C par rapport à celle de **fpOH** (Tableau 16). Cette augmentation peut s'expliquer par un plus grand nombre de cycles phényles π -conjugués rigidifiant la structure et pouvant induire un plus grand nombre d'interactions de van der Waals (interactions π).

Tableau 16 : Températures de transition vitreuse des fluorophores en fonction de la présence ou du groupe benzothiadiazole.

Composé	T_g (°C)
fpOH	121
18	158

La différence de température de transition vitreuse observée entre les deux fonctions chélatantes est surprenante (Tableau 17). On s'attendrait effectivement à observer une température plus élevée pour l'acide phosphonique **9**, due à la plus grande force et au plus grand nombre de liaisons hydrogène formées entre ces unités par rapport à celles impliquées entre des unités acides carboxyliques de **6**, mais il n'en est rien. Une explication peut être trouvée dans la présence d'une courte chaîne éthylèneoxy reliant l'acide phosphonique au reste de la molécule. Cette chaîne est en effet reconnue pour induire une plus grande flexibilité.

Tableau 17 : Températures de transition vitreuse des fluorophores avec les unités chélatantes acide phosphonique **9** et acide carboxylique **6**.

Composé	R_1	R_2	T_g (°C)
9	-PO(OH) ₂	<i>t</i> Bu-Ph-	145
6	-COOH	<i>t</i> Bu-Ph-	173

En comparant des dérivés acides carboxyliques se différenciant par leurs seules unités latérales (*tert*-butyles **6** ou décyles **22**) (Tableau 18), on observe une diminution de la température de transition vitreuse de 70 °C. Cette tendance est également observée dans le cas des dérivés aldéhydiques **5** et **21**, avec une diminution de 64 °C. Ceci provient d'une plus grande flexibilité de la chaîne décyle pouvant plus aisément donner lieu à des rotations segmentaires que les groupes *tert*-butyles, d'où un plus grand nombre de degrés de liberté et une T_g plus basse pour les composés substitués par des chaînes alkyles **21** et **22**.

Tableau 18 : Températures de transition vitreuse des fluorophores en fonction de la nature des chaînes latérales.

Composé	R ₁	R ₂	T _g (°C)	Composé	R ₁	R ₂	T _g (°C)
6	-COOH	<i>t</i> Bu-Ph-	173	5	-CHO	<i>t</i> Bu-Ph-	96
22	-COOH	C ₁₀ H ₂₁ O-	103	21	-CHO	C ₁₀ H ₂₁ O-	32

Comme il est montré dans le tableau ci-après (Tableau 19), la température de transition vitreuse diminue lorsque l'on passe d'une chaîne principale R₁ contenant un acide carboxylique **6**, à un aldéhyde **5**, puis à une chaîne hydrophobe **10**. Ceci s'explique également par le fait que les fluorophores peuvent de moins en moins former de liaisons hydrogène intermoléculaires, d'où une énergie moindre à fournir pour libérer les mouvements moléculaires.

Tableau 19 : Températures de transition vitreuse des fluorophores en fonction de la nature de la chaîne principale R₁.

Composé	R ₁	R ₂	T _g (°C)
6	-COOH	<i>t</i> Bu-Ph-	173
5	-CHO	<i>t</i> Bu-Ph-	96
10	-C ₂₀ H ₄₁	<i>t</i> Bu-Ph-	30

Pour conclure, les analyses thermiques des composés ont montré que les fluorophores sont amorphes à l'état solide. Ceci tient à l'absence d'empilement due aux groupes encombrants et/ou twistés. Un abaissement conséquent de la température de transition vitreuse T_g de la nouvelle famille de fluorophores autour de 30 °C a pu être réalisé grâce à l'introduction de chaînes alkyles linéaires. Ceci nous permet d'envisager des applications en hyperthermie magnétique (chapitre 5), pour laquelle la température de transition de phase idéale est autour de 40 °C, légèrement au-dessus de la température corporelle humaine. Cependant, ces températures sont appelées à différer sous forme de FONs et d'assemblages hybrides. En effet, on s'attend à obtenir une température moins élevée sous forme de FONs que sous forme de poudre, comme c'est le cas pour les nanoassemblages hybrides étudiés au chapitre 5. En effet, ces derniers sont formés à partir du fluorophore **22** qui présente une T_g de 103 °C et semblent se déliter autour de 40 °C.

II.3. Synthèse et caractérisation de nanosphères organiques fluorescentes

Après avoir présenté les différentes voies de synthèse et les propriétés photophysiques et thermiques des fluorophores cibles, intéressons-nous maintenant aux FONs créées à partir des fluorophores. Dans un premier temps l'élaboration des nanosphères sera présentée, puis nous nous attacherons à nouveau à décrire leurs caractérisations structurales et photophysiques.

II.3.1. Synthèse de nanosphères organiques fluorescentes

Les nanosphères fluorescentes organiques sont obtenues par nano-précipitation dans l'eau d'une solution organique de fluorophores. Le THF est choisi en tant que solvant organique car il est miscible à l'eau et permet de bien solubiliser les fluorophores. Il existe deux méthodes principales pour cette synthèse : l'ajout d'une solution diluée en grand volume^{169,170} ou l'ajout d'une solution concentrée en petit volume.^{45,69} Cependant, dans notre cas, les nanosphères organiques sont nues et fragiles, empêchant toute purification de l'excès de solvant par dialyse. Or, l'ajout d'un grand volume de THF n'étant pas compatible avec des applications en biologie, nous avons donc choisi la nano-précipitation dans l'eau (2,5 mL) d'un faible volume de solution organique concentrée en fluorophores (50 μ L, 1,45 mmol.L⁻¹). Le procédé de fabrication est représenté ci-après (Figure 40).

Après précipitation, les fluorophores hydrophobes, alors dans un environnement hydrophile, s'auto-assemblent par interactions de van der Waals pour minimiser leur énergie. La nano-précipitation étant essentiellement un processus cinétiquement contrôlé, de l'ordre de la milliseconde¹⁷¹, les concentrations et les quantités relatives des phases organique et aqueuse ainsi que les modalités de mélange (vitesse d'ajout, vitesse d'agitation et géométrie des mélangeurs) influencent la taille finale des particules.³³ Ainsi, cette synthèse a été précédemment optimisée au laboratoire au niveau des quantités ajoutées, du solvant choisi et de la nature du fluorophore.^{66,71,104,168,172} Cette synthèse reposant sur une configuration expérimentale d'un mélange simple reste encore très imparfaite et ne permet la préparation que d'une faible quantité de FON (2,5 mL/synthèse). Une amélioration est actuellement apportée grâce à l'utilisation de mélangeurs et de dispositifs micro-fluidiques.

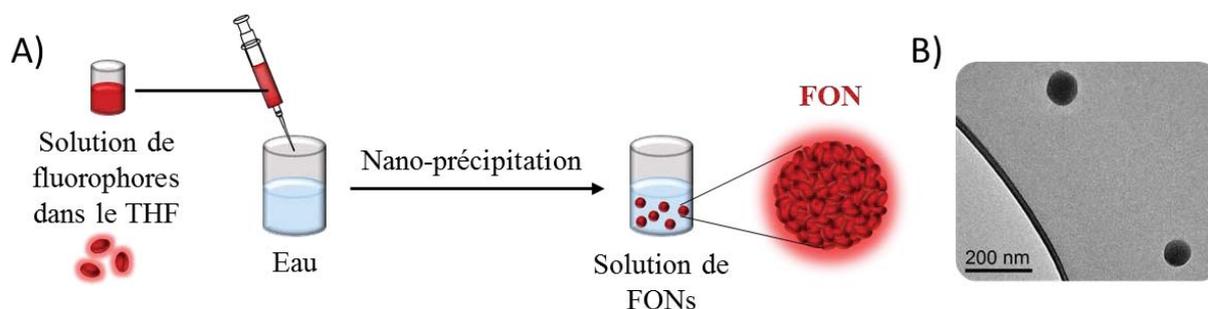


Figure 40 : A) Procédé de fabrication des FONs développées au laboratoire. B) Image MET des FONs résultantes.

En effet, même si la formation des nanosphères semble simple et immédiate, elle procède par plusieurs étapes.¹⁷³ Il est primordial de conserver un rapport entre le volume de THF et d'eau de 1 pour 50. Ce rapport a été défini pour induire une sursaturation élevée en fluorophores insolubles dans l'eau et conduire à la formation de germes, les nuclei (phase de nucléation) qui vont alors s'auto-assembler (phase d'agrégation). La force motrice de ce phénomène réside dans la stabilisation du système par diminution de la surface interfaciale, permettant finalement d'obtenir un système colloïdal stable. Le mécanisme de nucléation ci-après est une tentative de représentation et a été établi précédemment à partir de mesures photophysiques des temps de vie de fluorescence des FONs qui seront présentées dans la partie II.3.3 (Figure 41).

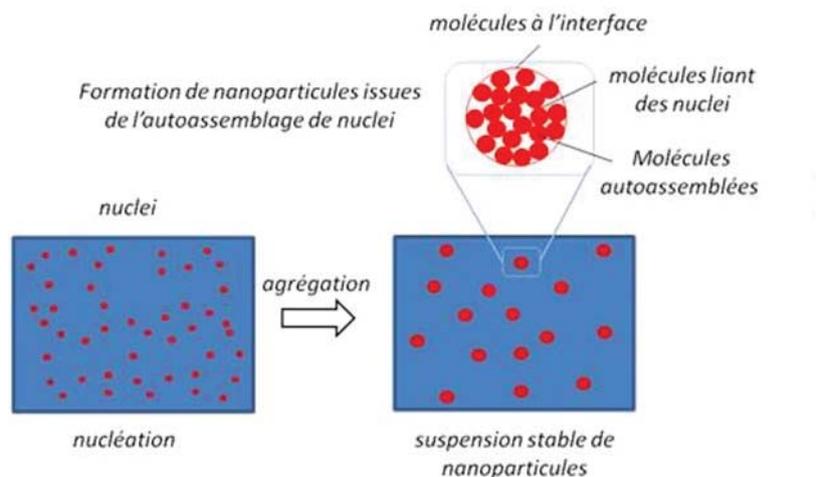


Figure 41 : Représentation schématique du processus imaginé de nucléation-agrégation pour l'obtention d'une solution de FONs stable d'un point de vue colloïdal.¹⁶⁸

II.3.2. Caractérisation de nanosphères organiques fluorescentes

Afin de s'assurer de la bonne formation de nanosphères et de leurs propriétés de fluorescence, il est nécessaire de les caractériser. Différentes techniques peuvent être utilisées lorsqu'il s'agit de nanoparticules.¹⁷⁴ Les propriétés structurales généralement élucidées sont la taille, la charge de surface ou la stabilité colloïdale. Dans notre cas, nous nous intéresserons également aux propriétés photophysiques, prérequis avant toute utilisation des FONs en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie de fluorescence, étudiés au chapitre suivant.

II.3.2.1. Propriétés structurales des FONs

La taille des nanoparticules peut être déterminée à l'aide de la **diffusion dynamique de la lumière** (appelée DLS pour dynamic light scattering). C'est une technique largement utilisée pour déterminer le diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules, noté d_H . Ce diamètre comprend la taille de la nanoparticule et sa couche de solvation. La méthode est basée sur la mesure des fluctuations d'un faisceau laser diffusé par les nanoparticules et de leur corrélation au cours du temps (Figure 42). Un traitement mathématique permet de déterminer le coefficient

de diffusion des particules lié à leur rayon hydrodynamique. L'intensité diffusée étant proportionnelle à r^6 , cette technique est très sensible puisqu'elle différencie des nanoparticules de tailles très différentes (de quelques nanomètres, d'une dizaine de nanomètre, d'une centaine de nanomètre et de l'ordre du micromètre).¹⁷⁵ Cependant, l'interprétation des données obtenues est délicate et requiert de rester vigilant sur de nombreux paramètres.

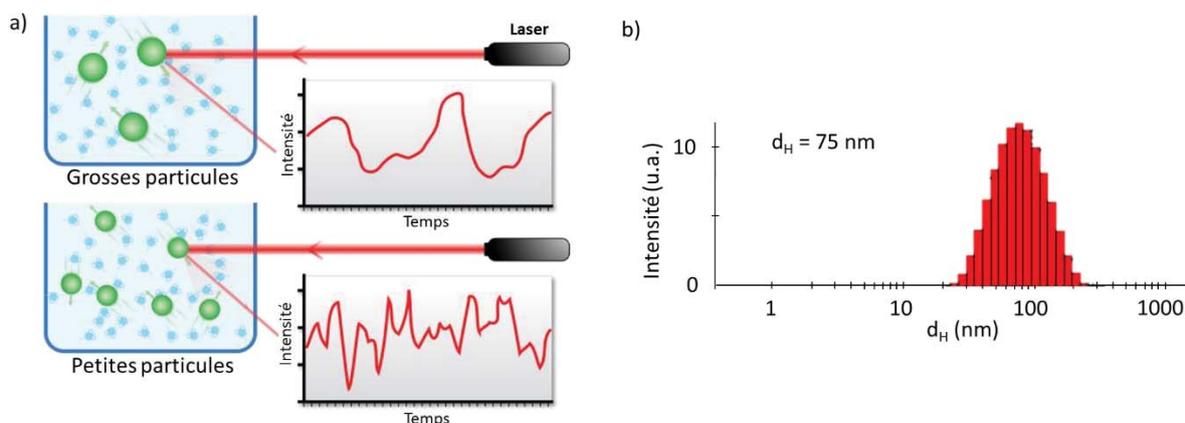


Figure 42 : a) Variation de l'intensité des fluctuations du laser au cours du temps dans le cas de grosses ou de petites particules. b) Distribution en taille obtenue à l'issue d'une mesure de DLS de FONs constituées du fluorophore 9.

Pour s'assurer de la bonne morphologie des nanoparticules formées et d'en calculer la taille « sèche », notée d_{MET} , la **microscopie électronique en transmission** (MET) est privilégiée. Un faisceau d'électrons à haute tension est envoyé sur l'échantillon. L'image se forme grâce aux différences de diffusion entre les atomes constitutifs de l'échantillon. En effet, les électrons qui heurtent des atomes lourds sont diffractés tandis que les autres sont diffusés. En raison de la faible longueur d'onde des rayonnements électroniques, des structures beaucoup plus petites que celles qui peuvent être observées par microscopie optique sont discernables. Cependant, cette technique ne permet pas toujours d'obtenir des images bien contrastées lorsqu'il s'agit de systèmes comme les FONs, constitués d'atomes légers. C'est pourquoi il a parfois été nécessaire de teinter les grilles MET avec du tétraoxyde de ruthénium dont les molécules gazeuses s'additionnent sur les systèmes aromatiques π -conjugués en pontant les doubles liaisons des cycles aromatiques des fluorophores. De plus, cette méthode passe par un dépôt de la solution à analyser sur une grille de cuivre suivi d'un séchage qui s'accompagne parfois d'agrégation ou de déformation des objets. La corrélation avec des mesures de DLS est donc nécessaire pour confirmer l'absence d'agrégation.

Un autre paramètre structural à déterminer est la charge surfacique de la nanoparticule. La **zétamétrie** donne accès au potentiel zêta, noté ζ , et correspond au potentiel électrostatique en surface de la particule (Figure 43). Il correspond à la différence de potentiel entre le diamètre hydrodynamique des nanoparticules et le milieu dans lequel elles sont en suspension. La suspension est stable lorsque la valeur absolue $|\zeta|$ est supérieure à 30 mV. Elle correspond à une répulsion électrostatique entre les particules efficace et donc à une absence d'agrégation. Elle permet ainsi d'attester la stabilité colloïdale de l'échantillon et le succès d'une fonctionnalisation en surface de la nanoparticule.

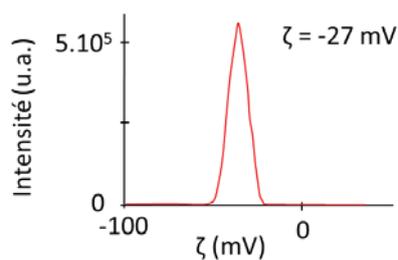


Figure 43 : Distribution de potentiel zêta pour les FONs constituées de fluorophores **9**.

Ces trois types de caractérisations ont été réalisés sur les FONs synthétisées. Les clichés des nanosphères obtenus en MET sont présentés ci-après (Figure 44). Ils montrent la formation de nanosphères relativement bien définies pour tous les composés ainsi que l'absence d'agrégation, excepté pour **14**. Les valeurs de diamètre MET obtenues à partir de ces images sont présentées dans le tableau ci-après (Tableau 20) avec leur diamètre hydrodynamique et leur potentiel zêta.

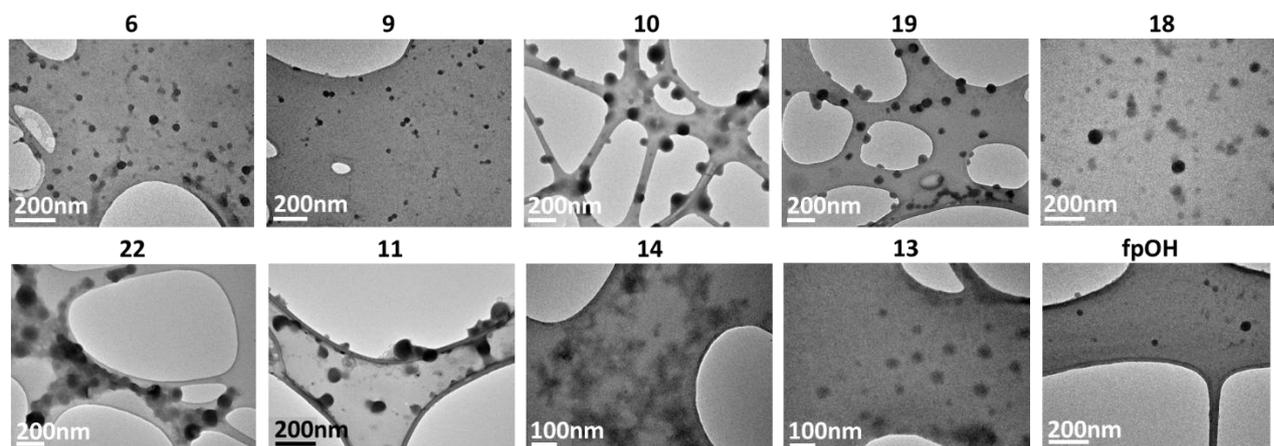


Figure 44 : Cliché de microscopie électronique en transmission des FONs déposées sur grille de cuivre de 300 mesh recouverte d'un film de carbone à trous. Les échelles, différentes pour chaque cliché, sont représentées en bas à gauche des images.

Il est intéressant de noter que les plus grosses nanosphères sont obtenues à partir des fluorophores plus hydrophobes comme **22**, **10** et **19**. Cette tendance peut trouver une explication dans le fait que la tension interfaciale entre l'eau et ces particules est plus élevée qu'avec des particules plus hydrophiles. Pour minimiser son énergie, le système aura donc tendance à diminuer sa surface spécifique et donc augmenter en taille.

Les acides phosphoniques **9**, **fpOH** et **18** possédant tous la même unité latérale *tert*-butyle présentent un diamètre autour de 30 nm. La taille moins élevée pour les acides phosphoniques **fpOH**, **9** et **18** par rapport à l'acide carboxylique **6** peut s'expliquer par la présence de la chaîne éthylène glycol hydrophile de ces fluorophores et le fait que le groupe $-\text{PO}(\text{OH})_2$ s'ionise plus dans l'eau et est donc plus hydrophile que le groupe $-\text{COOH}$.

En comparant les diamètres hydrodynamiques (d_H) et secs (d_{MET}) des FONs, on constate une couche de solvatation d'une épaisseur de 24 nm en moyenne. Même si cette épaisseur semble être indépendante de la taille sèche de la nanosphère, une tendance peut être néanmoins dégagée. En effet, l'augmentation la plus importante est observée pour les composés les plus ionisables, à savoir les bétaïnes **13** et **14** et les acides phosphoniques **9** et **fpOH**. Pour ces FONs, le diamètre hydrodynamique est environ équivalent au double du diamètre MET. Les solutions étant très diluées, il ne serait pas étonnant que ces FONs captent des impuretés non visibles, « gonflant » la nanoparticule.

Tableau 20 : Propriétés structurales des FONs avec le diamètre MET (d_{MET}), le diamètre hydrodynamique (d_H) et le potentiel zêta (ζ).

R_1	FON	$d_{MET} (\sigma)^{(a)}$ (nm)	d_H (PDI) ^(b) (nm)	$\zeta^{(c)}$ (mV)
-COOH	6-FON	36 (0,24)	62 (0,366)	-40
	22-FON	95 (0,29)	127 (0,134)	-39
-PO(OH) ₂	fpOH-FON	28 (0,17)	75	-33
	9-FON	26 (0,21)	78	-27
	18-FON	30 (0,16)	/	-32
-C ₂₀ H ₄₁	10-FON	76 (0,40)	135 (0,129)	-37
	19-FON	64 (0,19)	139	/
-Bétaïne	13-FON	33 (0,19)	88 (0,144)	-19
	14-FON	31 (0,27)	88 (0,348)	-20
-PEG	11-FON	56 (0,35)	82 (0,150)	-31

^(a) Diamètre MET d_{MET} obtenu par une distribution en taille sur environ 200 FONs modélisée par une loi log normale. σ est l'écart type de la population. ^(b) Diamètre hydrodynamique d_H obtenu par mesure DLS. PDI est l'indice de polydispersité de la population. ^(c) Potentiel zêta ζ .

Exceptées les bétaïnes **13** et **14**, les nanosphères présentent un potentiel zêta globalement inférieur à -30 mV, témoignant de leur stabilité. Les potentiels les plus négatifs autour de -40 mV sont trouvés pour les FONs synthétisées à partir de fluorophores comprenant des fonctions acides carboxyliques comme **6** et **22**. Cette valeur est attribuée à la déprotonation des fonctions -COOH en ions carboxylates en surface de la particule à pH = 7. Pour les acides phosphoniques **9**, **fpOH** et **18**, cette valeur est égale à -30 mV et donc inférieure en valeur absolue à celle des acides carboxyliques. Ceci est surprenant étant donné le caractère plus acide des acides phosphoniques par rapport aux acides carboxyliques et trouve peut-être une explication dans la complexation d'ions métalliques en solution dans l'eau à la surface des FONs possédant des acides phosphoniques. C'est également le cas pour le composé **10** qui possède une valeur de ζ de -37 mV surprenante étant donné son absence de charge. La valeur de diamètre hydrodynamique étant spécialement élevée ($d_H \sim 135$ nm), une explication peut être trouvée dans le fait que d'autres entités sont également absorbées à la surface de ces FONs. En effet,

les solutions étant très diluées en FONs ($\sim 10 \mu\text{mol.L}^{-1}$), la concentration en impuretés peut parfois être assez élevée pour que leur captation par les FONs ne soit plus négligeable. Concernant les bétaines **14** et **13**, la valeur autour de -20 mV , soit la plus faible en valeur absolue, provient de la charge globalement neutre des fluorophores. Ainsi, la valeur du potentiel zêta semble bien corrélée à la charge du fluorophore.

La stabilité colloïdale dans l'eau est un prérequis à toutes études biologiques. Cependant, ces dernières utilisent des milieux de culture riches en biomolécules qui peuvent altérer la stabilité des assemblages. Intéressons-nous donc à la stabilité colloïdale dans ces milieux.

II.3.2.2. Stabilité colloïdale

Pour que les FONs soient utilisées en biologie, il est également nécessaire de s'assurer de leur stabilité colloïdale.¹⁷⁶ Ces études ont été réalisées au cours du temps, 0, 1, 2 et 7 jours après leur fabrication, à l'aide de mesures DLS et d'observations en microscopie de fluorescence. La stabilité dans l'eau a été contrôlée pour confirmer que le stockage des FONs est possible. Différents milieux de culture utilisés dans les expérimentations cellulaires présentées au chapitre 3 ont été étudiés : le milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), le RPMI avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et le RPMI avec 10% de sérum humain (SH). Expérimentalement, les solutions aqueuses de FONs obtenues après synthèse sont mises au contact de ces quatre milieux à hauteur de $50 \mu\text{L}$ dans $150 \mu\text{L}$ de milieu.

Les résultats obtenus dans l'eau sont présentés dans le graphe ci-après (Figure 45).

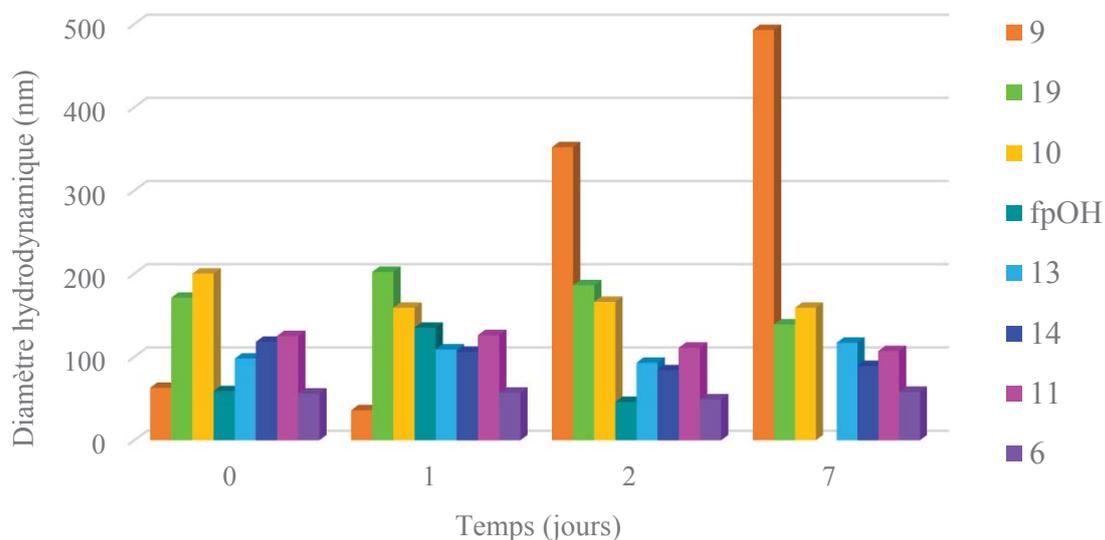


Figure 45 : Evolution au cours du temps de la stabilité colloïdale de FONs dans l'eau.

Excepté **9**, le diamètre hydrodynamique n'évolue quasiment pas au cours du temps, signe que les FONs sont stables. Le manque de stabilité de **9** peut être attribué à la présence d'impuretés dans le lot analysé qui seraient chélatées par l'acide phosphonique, entraînant une augmentation du diamètre de la particule. En effet, une observation en microscopie de fluorescence ne montre aucun agrégat fluorescent (Figure 46a), laissant supposer que l'accroissement de diamètre hydrodynamique est plutôt lié à l'adsorption d'impuretés présentes dans le milieu. Un cliché de microscopie où les FONs sont agrégées (RPMI, 1 jour après fabrication) montrent des différences d'aspects nettes et tendent à confirmer l'hypothèse formulée (Figure 46b). Ces mesures devront donc être réitérées avec un autre lot de FONs.

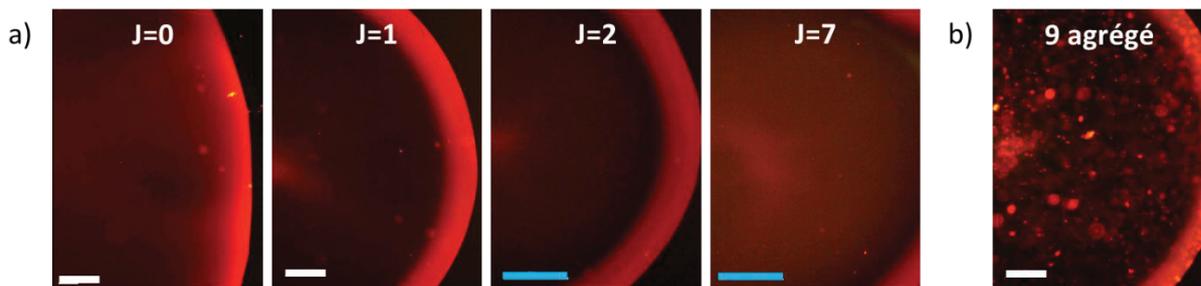


Figure 46 : Clichés de microscopie de fluorescence ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, objectif $\times 10$) d'une solution de FONs de **9** a) dans l'eau, 0, 1, 2 et 7 jours après leur fabrication. b) dans le RPMI un jour après fabrication. Echelle blanche : $20 \mu\text{m}$. Echelle bleue : $500 \mu\text{m}$.

Concernant le RPMI, les FONs s'agrègent après un jour seulement de contact avec le milieu. Ces mesures ont été réalisées par DLS et confirmées par microscopie de fluorescence (Figure 47).

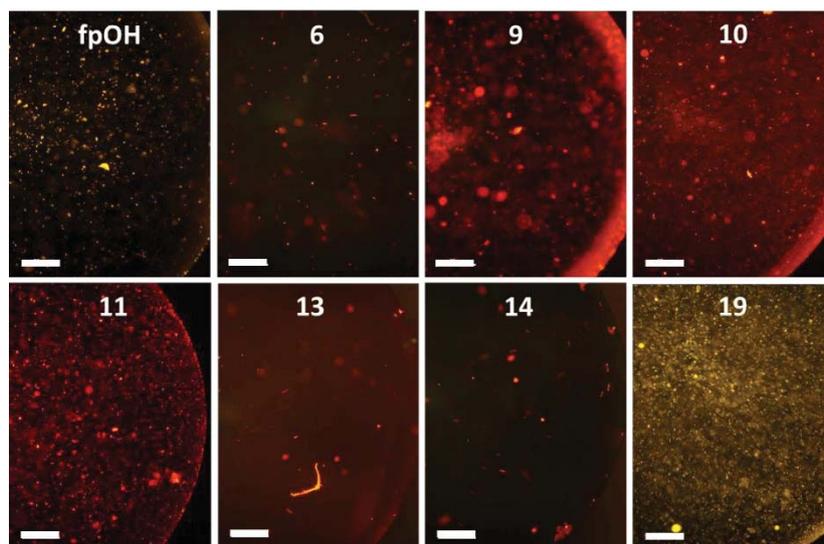


Figure 47 : Clichés de microscopie de fluorescence ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, objectif $\times 10$) des solutions de FONs dans le RPMI, un jour après leur fabrication. Echelle : $20 \mu\text{m}$.

Le sérum de veau fœtal et le sérum humain diffusent fortement et rendant toute analyse en DLS impossible, l'étude s'est faite par observation en microscopie de fluorescence. La présence d'une très légère agrégation est observée une semaine après mise en contact des FONs avec ces milieux. Un exemple de clichés obtenus en microscopie de fluorescence est présenté ci-après (Figure 48) avec **9** et les mêmes résultats sont obtenus avec **fpOH**, **6**, **10**, **11**, **13**, **14** et **19**. Comparées à d'autres nanoparticules sans aucune protection avec un polymère¹⁷⁷, les FONs sont stables dans des milieux complets même après une semaine de contact. Ceci est donc favorable à une utilisation en biologie.

L'ajout de SH ou SVF au RPMI à hauteur de 10 % en volume n'entraîne pas d'agrégation tandis que le RPMI seul induit une agrégation. Ceci provient sans doute de la formation d'une couronne protéique (comme vu au chapitre 1, partie 4.1.2) avec les différentes protéines contenues dans ces milieux complets qui stabilisent les FONs et empêchent leur agrégation. Des études complémentaires pour comprendre comment et quelles protéines s'arrangent à la surface des nanosphères pourraient permettre d'approfondir ces explications.

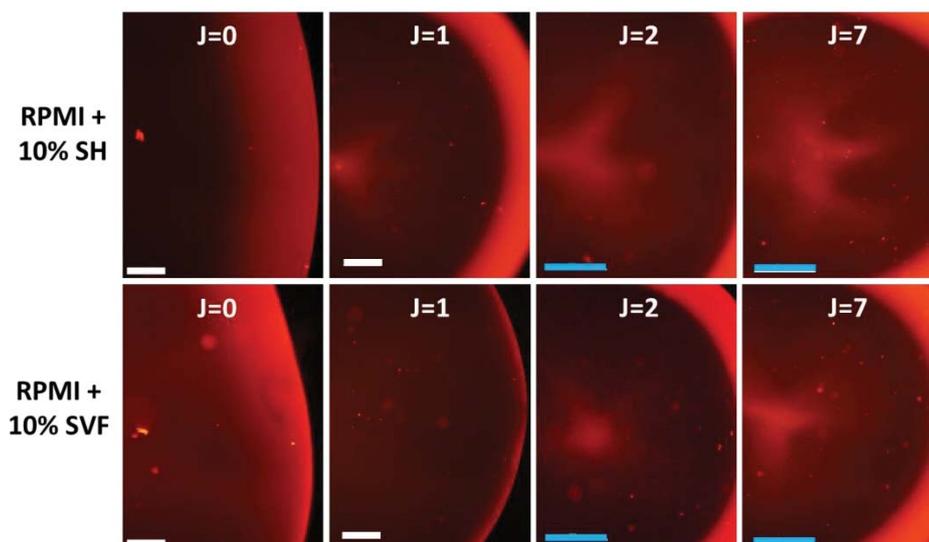


Figure 48 : Clichés de microscopie de fluorescence ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, objectif $\times 10$) d'une solution de FONs de **9** dans une solution de RPMI+10% de SH (haut) et une solution de RPMI+10% de SVF (bas), 0, 1, 2 et 7 jours après leur fabrication. Echelle blanche : 20 μm . Echelle bleue : 500 μm .

II.3.3. Propriétés photophysiques des FONs

Dans cette partie, nous comparerons d'abord les propriétés des fluorophores dans le THF, le toluène et sous forme de FONs, puis, nous examinerons les différents FONs entre eux.

II.3.3.1. Comparaison dans différents solvants : THF, toluène et sous forme de FONs

Comparons d'abord les propriétés des fluorophores assemblés sous forme de FONs avec celles des fluorophores en solution dans le toluène ou le THF. Les longueurs d'onde d'absorption et d'émission maximales ainsi que les rendements quantiques de fluorescence sont rassemblés dans le tableau ci-après (Tableau 21). Les spectres d'absorption et d'émission ainsi que des photographies des cuves sous excitation sont présentés ci-après (Figure 49). D'abord, on remarque que les spectres d'absorption sont quasiment superposés, même si l'on observe un léger décalage bathochrome lorsque l'on passe du THF au toluène aux FONs.

En comparant les spectres d'émission, un décalage bathochrome de 30 nm en moyenne est observé lorsque l'on passe du toluène aux FONs. Ce décalage est plus marqué dans le cas des fluorophores hydrophiles **6** et **9** que pour les fluorophores hydrophobes **10** et **19**. Un décalage bathochrome de 30 nm en moyenne est également noté lorsque l'on passe des FONs au THF et s'avère cette fois plus marqué pour les fluorophores hydrophobes **10** et **19** (Tableau 21). Ainsi, le comportement des FONs hydrophiles **6** et **9** se rapproche plus de celui dans le THF et celui des FONs hydrophobes **10** et **19** plus de celui dans le toluène. Les chaînes polaires de **6** et **9** permettent donc à l'état excité polaire d'être mieux solvato dans des solvants polaires comme le THF ou l'eau. Les chaînes apolaires de **10** et **19** induisent une meilleure solvation dans le toluène apolaire.

Tableau 21 : Longueurs d'onde d'absorption et d'émission maximales des fluorophores **6**, **9**, **10** et **19** dans le toluène, le THF et sous forme de FONs.

Fluorophore	FON			THF			Toluène		
	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	$\Phi_f^{(a)}$	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	$\Phi_f^{(a)}$	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	$\Phi_f^{(a)}$
fpOH	440	602	0,01	435	621	0,02	442	586	0,002
6	466	637	0,11	454	664	0,27	460	597	0,58
9	468	645	0,03	455	652	0,41	460	609	0,45
10	474	619	0,28	454	660	0,72	460	597	0,47
19	447	588	0,28	437	625	0,17	442	580	0,24

^(a) Rendement quantique de fluorescence Φ_f calculé par rapport à la coumarine 540A dans l'éthanol ($\Phi_f = 0,38$).

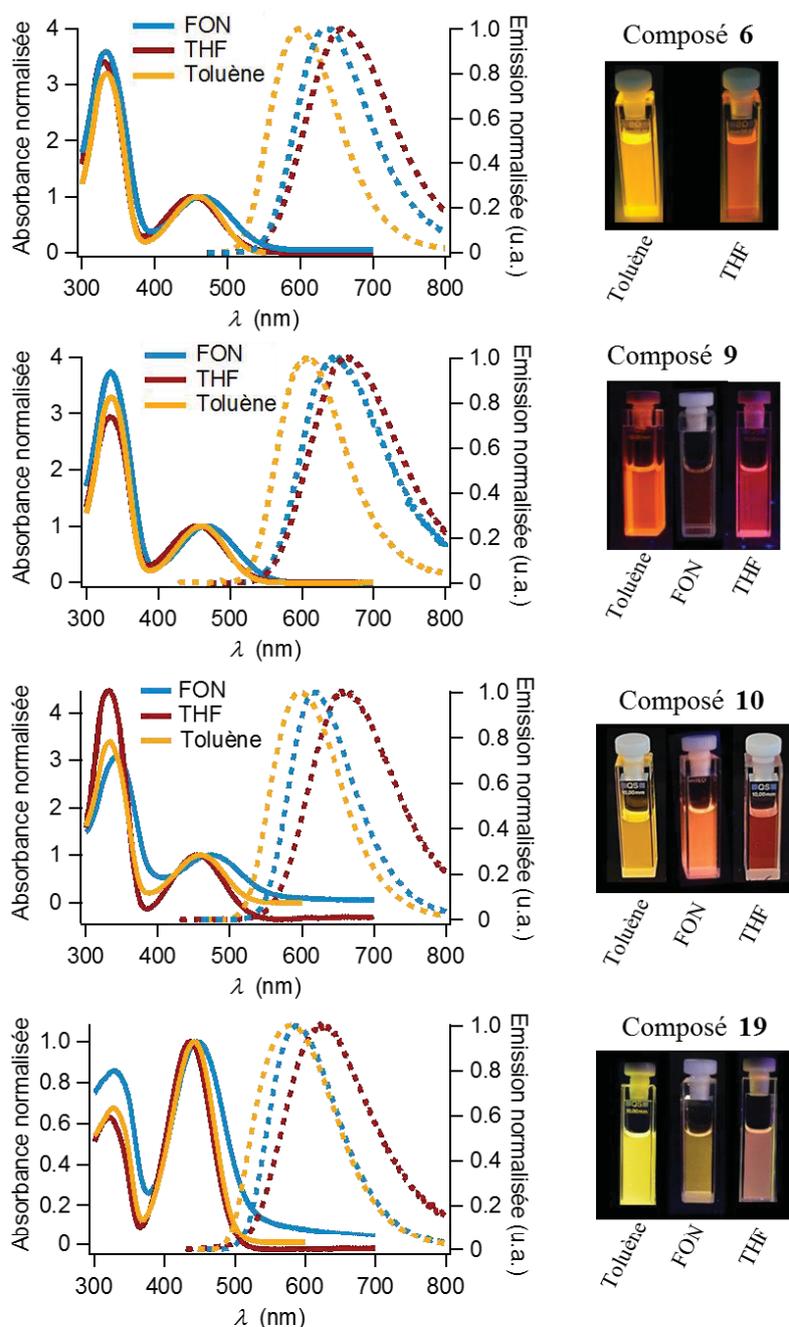


Figure 49 : Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (traits pointillés) normalisés des composés **6**, **9**, **10** et **19** ($\lambda_{exc} = 465$ nm) dans le toluène (jaune), le THF (rouge) et sous forme de FONs dans l'eau (bleu). Photographie des cuvettes de spectroscopie contenant les composés dans les solvants correspondants ($\lambda_{exc} = 365$ nm). Les concentrations des solutions ne sont pas les mêmes.

Par ailleurs, les rendements quantiques de fluorescence sont globalement plus faibles lorsque les fluorophores sont assemblés en nanosphères. Nous supposons ici deux effets. Le premier provient de la polarité de l'eau ou des fluorophores environnants. En effet, en solvant polaire, l'état excité est stabilisé et se désexcite par conversion interne et non pas par voie radiative.¹⁶⁸ Le deuxième vient de la désactivation par liaisons H. Ceci a été confirmé par une observation

de l'augmentation du rendement quantique de 20 à 30 % lors du remplacement de H₂O par D₂O à l'occasion de la nanoprécipitation des composés **6** et **9** (Figure 50).

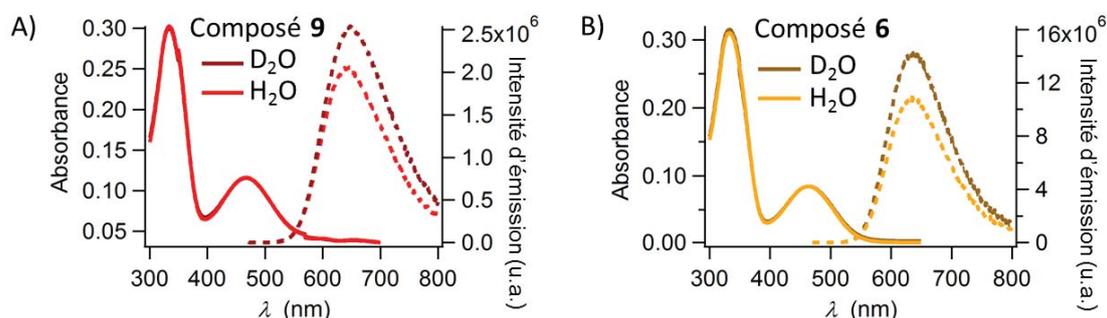


Figure 50 : Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (traits pointillés) ($\lambda_{exc} = 465$ nm) dans D₂O et H₂O des composés A) **9** et B) **6**. Les solutions ont été préparées par nanoprécipitation de 50 μ L de solution de fluorophore dans le THF dans 1 mL de D₂O ou H₂O.

II.3.3.2. Comparaison entre les différents FONS synthétisés

Les propriétés photophysiques des nanosphères sont à nouveau intrinsèques à la nature du fluorophore utilisé. Ces propriétés sont regroupées dans le tableau ci-après (Tableau 22).

Malgré des rendements quantiques de fluorescences relativement bas, la brillance n'en est pas pour autant amoindrie et avoisine 10^8 L.mol⁻¹.cm⁻¹, soit environ 100 fois plus que celle des Qdots CdS/ZnSe.¹⁷⁸ Cette haute valeur est atteinte grâce à la haute densité en fluorophores rencontrée au sein des FONS, constituées d'environ 10^5 fluorophores. Cette estimation a été précédemment réalisée à l'aide de mesures de spectrométrie de masse et de photothermie sur les nanoassemblages hybrides donnant une masse de 250 MDa.⁶⁷

Tableau 22 : Propriétés photophysiques des FONs dans l'eau.

R_1	FON	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	$\Phi_f^{(a)}$	$\tau_i (f_i)^{(b)}$ (ns)	$\langle \tau_s \rangle^{(c)}$ (ns)
-COOH	6-FON	333; 466	637	0,11	6,4 (30%); 2,5 (53%); 0,7 (17%)	3,4
	22-FON	344; 475	643	0,18	9,0 (29%); 3,9 (58%); 1,1 (13%)	5,0
-PO(OH) ₂	9-FON	334; 468	645	0,03	4,6 (29%) ; 1,2 (49%); 0,2 (22%)	2,0
	fpOH-FON	333; 440	602	0,01	1,43 (10%); 0,55 (40%); 0,18 (40%); 0,03 (10%)	0,4
	18-FON	333; 486	666	0,1	1,8 (14%); 0,3 (35%); 0,05 (51%)	0,4
-C ₂₀ H ₄₁	10-FON	342; 474	619	0,28	13,5 (19%); 7,0 (65%); 2,6 (16%)	7,5
	19-FON	329; 447	588	0,28	6,8 (49%); 3,7 (46%); 0,9 (5%)	5,1
-Bétaïne	13-FON	334; 461	642	0,06	6,3 (25%); 1,9 (52%); 0,4 (23%)	2,7
	14-FON	334; 461	642	0,08	7,9 (28%); 2,6 (55%); 0,6 (17%)	3,7
-PEG	11-FON	337; 469	632	0,09	6,2 (26%); 2,3 (54%); 0,6 (20%)	3,0
-Br	8-FON	341; 472	642	0,25	12 (20%); 5,6 (66%); 1,4 (14%)	6,3

^(a)Rendement quantique de fluorescence Φ_f calculé par rapport à la coumarine 540A dans l'éthanol ($\Phi_f = 0,38$). ^(b) Composantes τ_i et leurs proportions f_i en intensité, obtenues après modélisation par une loi exponentielle du déclin de fluorescence mesuré à 645 nm après excitation à 450 nm. ^(c) Moyenne des temps de vie $\langle \tau_s \rangle$ calculée à partir des $\tau_i (f_i)$.

Les déclins de fluorescence n'apparaissent pas mono-exponentiels et sont généralement modélisés par des fonctions multiexponentielles à trois composantes τ_i . Une telle allure avait déjà été observée précédemment et analysée comme la résultante de différentes interactions entre les fluorophores et avec leur environnement.¹⁶⁸ La composante de temps courte τ_3 correspondrait aux fluorophores présents à la surface des FONs. Ceux-ci interagissent avec l'eau qui éteint la fluorescence par couplage vibrationnel avec les liaisons hydrogènes. La composante de temps longue τ_1 proviendrait des fluorophores auto-assemblés au sein des nuclei formant les FONs. C'est la plus longue car elle est la moins impactée par l'eau. Enfin, une composante intermédiaire, souvent prépondérante, τ_2 traduirait le comportement des

fluorophores entre les nuclei. La 4^{ème} composante de temps très courte rencontrée pour **fpOH** ne semble pas pertinente vu la faiblesse du signal émis et ce malgré sa réjection par un filtre passe haut. τ_4 ne correspond pas au signal de l'échantillon en lui-même et est attribuée à la diffusion de la lumière excitatrice au vu de la résolution de l'appareillage (≈ 140 ps).

L'influence de la nature des groupes chimiques sur les propriétés photophysiques des FONs a été étudiée en comparant le comportement de dérivés esters non ionisables ou comportant des fonctions acides carboxyliques et phosphoniques.¹⁶⁸ Nous nous intéresserons ici à l'acide phosphonique **9**, l'acide carboxylique **6** et un composé ne pouvant pas former de liaisons H comme le composé **8** (analogue de **9** avec un atome de brome en remplacement de l'unité acide phosphonique). On observe à travers les mesures effectuées que les rendements quantiques sont de 0,03, 0,11 et 0,25 et les temps de vie moyens de 2, 3,4 et 6,3 ns respectivement (Tableau 22). Une photographie des cuves sous irradiation à 365 nm souligne visuellement ces mesures comme quoi les acides phosphoniques **fpOH** et **9** sont moins fluorescents que les dérivés esters non ionisables **10** et **19** (Figure 51). Plus le groupe fonctionnel carboxylique ou phosphonique est acide, moins les fluorophores et les FONs résultantes sont fluorescents en termes de rendement quantique ou de temps de vie de fluorescence. Cette étude met en exergue l'importance des liaisons hydrogène qui sont responsables de l'extinction de fluorescence.



Figure 51 : Photographie de cuves de spectroscopie contenant des solutions de FONs **fpOH**, **19**, **9** et **10** (de gauche à droite) dans l'eau à $1,45 \text{ mmol.L}^{-1}$ sous irradiation UV ($\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$).

La taille des FONs a également un impact sur leurs propriétés photophysiques. Comme montré dans le graphe ci-après (Figure 52), plus le rapport surface/volume des FONs est important, moins leur rendement quantique de fluorescence est élevé. La surface spécifique rapportée au volume de FONs de petit diamètre est plus élevée que celle de FONs de plus grand diamètre. Ainsi, le nombre de molécules en contact avec l'eau rapporté au nombre total de molécules est plus élevé pour les FONs de petit diamètre (i.e. $1/\text{MET}$ grand). Or, l'eau, polaire, induit une diminution de la fluorescence par couplage vibrationnel. Cette diminution peut également avoir un lien avec la nature hydrophile plus marquée du fluorophore, comme c'est le cas pour **11** qui s'écarte légèrement de la tendance établie. En effet, des fluorophores présentant un caractère plus hydrophobe comme **10** et **19** ont un rendement quantique très élevé.

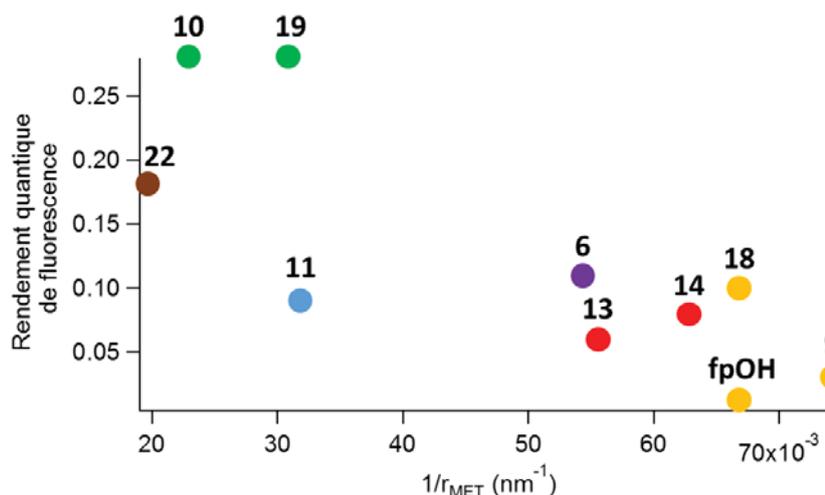


Figure 52 : Relation rapport surface sur volume des FONs ($1/r_{MET}$) et rendement quantique de fluorescence. Nature des différentes populations : acides phosphoniques **fpOH**, **9** et **18** (jaune), bétaïnes **13** et **14** (rouge), acide carboxylique **6** (violet), PEG **11** (bleu), chaîne principale alkyle **10** et **19** (vert) et chaîne latérale alkyle **22** (marron).

Certains fluorophores présentent des groupes acido-basiques qui, comme on l'a vu, influent considérablement sur la nature des propriétés structurales et photophysiques. Il serait donc intéressant d'étudier l'influence du pH, facteur important lorsqu'il s'agit d'internalisation cellulaire ou de synthèse de nanoassemblages hybrides, sur leurs propriétés photophysiques.

II.3.3.3. Influence du pH sur les propriétés photophysiques

Les fluorophores contenant les fonctions acides carboxyliques (**6** et **22**) et phosphoniques (**fpOH**, **9** et **18**) seront utilisés pour la synthèse de nanoassemblages hybrides, recouverts d'une coquille de nanoparticules magnétiques (chapitre 4). Comme cette synthèse s'effectue dans l'acide nitrique, utilisé pour stabiliser les nanoparticules magnétiques, le comportement et la stabilité des FONs dans ces conditions acides ont été investigués. De plus, l'internalisation cellulaire des FONs leur fera rencontrer des pH pouvant descendre jusqu'à 4,5 dans les lysosomes. Il est donc nécessaire d'étudier l'impact de ces pH acides sur l'intégrité des FONs.

Pour cela, les propriétés photophysiques des FONs ont été étudiées à partir du fluorophore **9** contenant une unité acide phosphonique. A différentes solutions de 2,5 mL de FONs dans l'eau millipore a été ajoutée une solution d'acide nitrique à 0,01 ou 0,1 mol.L⁻¹ selon les volumes reportés dans le tableau ci-après (Tableau 23). Les pH des différentes solutions sont mesurés, ainsi que les spectres d'absorption et d'émission et leur potentiel zêta. Les volumes d'acide ajoutés à chaque solution étant négligeables, le facteur de dilution de la solution initiale de FONs n'est pas pris en compte.

Tableau 23 : Propriétés photophysiques et structurales des solutions de FONs à différents pH.

pH	Concentration et volume de HNO ₃ ajoutés	τ_i (f_i) ^(a) (ns)	ζ (σ) (mV)
7,6	-	9,3 (11%); 2,7 (57%); 0,6 (32%)	-24
6,9	0,01 M; 1 μ L	5,2 (32%); 1,6 (51%); 0,3 (17%)	-27
5,3	0,01 M; 10 μ L	5,5 (30%); 1,6 (52%); 0,3 (18%)	-19
4,5	0,01 M; 30 μ L	5,9 (32%); 1,7 (51%); 0,3 (17%)	-16
3,3	0,1 M; 20 μ L	4,2 (32%); 1,0 (68%)	+2

^(a) Composantes τ_i et leurs proportions f_i en intensité, obtenues après modélisation par une loi exponentielle du déclin de fluorescence mesuré à 645 nm après excitation à 450 nm. ^(c) Moyenne des temps de vie $\langle \tau_s \rangle$ calculée à partir des τ_i (f_i).

Globalement, les spectres d'absorption et d'émission se superposent entre pH 7,6 et 4,5 (Figure 53). Lorsque le pH de 3,3 est atteint, une chute drastique des spectres d'absorption et d'émission est observée, pouvant être attribuée à un phénomène d'agrégation des nanosphères entre elles. Dans cette gamme de pH, la force ionique créée induit un écrantage des charges des nanosphères entraînant leur déstabilisation. La modélisation des temps de vie à pH 3,3 fait apparaître deux composantes au lieu de trois, également signe que l'assemblage a évolué. Ces hypothèses sont confirmées par la mesure du potentiel zêta, révélant une charge positive de + 2 mV (Tableau 23). Ceci suggère que le mécanisme de déstabilisation des FONs passe par la protonation des acides phosphoniques, résultant en un assemblage globalement neutre et donc instable. Une analyse plus fine des temps de vie permet de dégager trois gammes différentes pour les composantes (Tableau 23). En effet, la composante τ_1 est égale à 4,2 ns à pH 3,3, 5,5 à pH \in [4,5 ; 6,9] et 9,3 ns à pH 7,6. Il est donc possible de conclure que le premier pKa des fonctions acides phosphoniques des FONs est compris entre 3,3 et 4,5 et le deuxième entre 6,9 et 7,6.

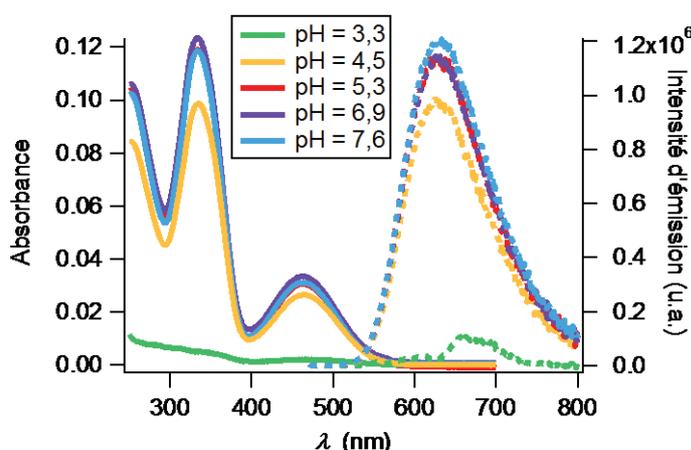


Figure 53 : Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (traits pointillés) ($\lambda_{exc} = 465$ nm) des solutions de FONs à différents pH.

A partir de ces réflexions, nous avons donc fait l'hypothèse de trois états de protonation différents décrits ci-dessous (Figure 54). Les valeurs de pH obtenues par mesures photophysiques coïncident avec celles souvent rapportées dans la littérature pour les acides phosphoniques, même si, sous forme de FON, la situation est moins directe à comparer.¹⁷⁹

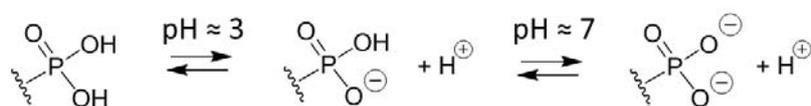


Figure 54 : Schéma représentatif des trois états de protonation des acides phosphoniques en fonction du pH.

Pour conclure, il semblerait que les FONs soient résistantes pour des pH > 4,5, compatible avec des applications en biologie. En outre, il est important de noter que le pH retenu pour la formation des nanossemblages hybrides lors de la nanoprécipitation est de 1,2. En effet, cette agrégation délétère observée à pH < 3,3 sera inhibée par la présence des nanoparticules magnétiques, servant de coquille protectrice.

II.4. Conclusion

Dans ce chapitre, la stratégie de synthèse d'une nouvelle famille de fluorophores a été exposée. En partant du même squelette de base et grâce à une stratégie modulaire, il a été possible de développer de nombreuses molécules présentant différentes propriétés photophysiques et thermiques. Ainsi, nous avons pu obtenir des fluorophores avec une brillance allant jusqu'à $10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, soit environ 170 fois plus brillants qu'un précédent fluorophore utilisé au laboratoire, **fpOH**. Le spectre d'émission de ces nouveaux fluorophores dans le toluène couvre la gamme du vert-jaune jusqu'au rouge. Des études de solvatochromisme ont permis de mieux comprendre les interactions des fluorophores avec leur environnement et la nature des mécanismes de désactivation, favorisant l'appréhension des changements de couleur induits au cours de l'internalisation cellulaire. Des analyses thermiques ont montré que la température de transition vitreuse des fluorophores sous leur forme solide était modulable et pouvait descendre jusqu'à $30 \text{ }^\circ\text{C}$ pour certains (composés **10** et **21**). Ces résultats permettent d'imaginer un cœur fluorescent fondant sous l'effet d'un faible échauffement compatible avec les milieux biologiques. Ceci nous intéressera par la suite, lorsque les nanoparticules d'oxyde de fer ajoutées autour du cœur fluorescent seront exploitées pour stimuler le délitement du cœur par hyperthermie magnétique.

A partir de l'auto-assemblage de ces fluorophores, des FONs ont été obtenues. Leur stabilité repose sur des répulsions électrostatiques puisqu'elles présentent toutes un potentiel zêta fortement négatif. C'est pourquoi la valeur du pH du milieu est d'une importance capitale pour les systèmes acides. En effet, au-delà d'une valeur critique, les assemblages perdent leur stabilité. Des études photophysiques ont démontré l'impact des liaisons hydrogène tant entre les fluorophores (liaisons H endogènes) qu'entre les fluorophores et le solvant (liaisons H exogènes), sur les propriétés des FONs. En effet, les liaisons hydrogène augmentent la température de transition vitreuse et éteignent la fluorescence. Les FONs fabriquées possèdent une très forte brillance allant jusqu'à $10^8 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et une émission décalée vers 666 nm, soit dans le rouge profond. Enfin, les FONs sont colloïdalement stables en milieu aqueux et dans différents milieux complets. C'est pourquoi le prochain chapitre sera l'occasion de les utiliser pour des applications en biologie, à savoir le marquage de différents types cellulaires et l'encapsulation de principes actifs et leur suivi par microscopie de fluorescence.

Chapitre III : Les FONs comme agents théranostiques

III.1. Introduction	94
III.2. Les FONs pour le diagnostic	95
III.2.1. Imagerie de cellules cancéreuses.....	95
III.2.2. Imagerie de bactéries.....	98
III.2.2.1. Staphylococcus Aureus.....	99
III.2.2.2. Pseudomonas Aeruginosa	102
III.2.2.3. Études spectrales.....	104
III.2.3. Étude d'internalisation dans des macrophages tumoraux	105
III.2.4. Étude d'internalisation dans des lymphocytes et monocytes	108
III.3. Les FONs pour la thérapie	110
III.3.1. Obtention d'un système de suivi de la libération de molécules	110
III.3.1.1. Fabrication de nanosphères « OFF/ON ».....	111
III.3.1.2. Étude de l'extinction par la méthode de Stern-Volmer.....	114
III.3.1.3. Suivi de la désintégration <i>in cellulo</i> au cours du temps	117
III.3.2. Encapsulation d'un agent anticancéreux : la doxorubicine.....	120
III.3.2.1. Présentation des systèmes	120
III.3.2.2. Étude de l'internalisation des nanosphères	122
III.3.2.3. Élaboration d'une sonde aux propriétés sur-mesure	124
III.3.2.4. Suivi de la délivrance de la doxorubicine	125
III.4. Conclusion	127

III.1. Introduction

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à l'utilisation de FONs (nanosphères organiques fluorescentes) pour des applications théranostiques. Jusqu'à présent, très peu d'études reposent sur l'utilisation de nanoparticules organiques seules pour ce type d'application. Le but est donc de prouver la possibilité d'imager et de combattre divers pathogènes (cellules cancéreuses, bactéries) tout en évitant leur dégradation (par les monocytes et les macrophages). À cette occasion, les différents types de FONs (hydrophobes, PEGylées...) seront exploités pour répondre à ces différents questionnements biologiques.

Une première partie abordera l'imagerie des entités biologiques étudiées à l'aide de FONs par microscopie de fluorescence, à savoir les cellules cancéreuses, les bactéries, les macrophages, les lymphocytes et les monocytes. La possibilité d'internalisation, les différences d'interactions selon la nature du système biologique ainsi que le degré de furtivité pour échapper au système immunitaire seront alors étudiés.

Dans une deuxième partie, nous verrons comment encapsuler un principe actif hydrophobe dans les FONs et suivre sa libération.

Exceptée l'imagerie de bactéries, les analyses biologiques présentées dans cette partie ont été réalisées en étroite collaboration avec Christophe Blanquart, Philippe Hulin et Steven Nedellec du CRCINA (Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers, unité Inserm U1232, Institut de Recherche en Santé, Nantes). Les analyses biologiques sur les bactéries ont été effectuées avec Marie-Pierre Fontaine-Aupart de l'ISMO (Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay, UMR 8214, Université Paris-Sud).

III.2. Les FONs pour le diagnostic

Dans cette partie, diverses entités biologiques seront imagées à l'aide de différentes FONs : des agents infectieux comme les cellules cancéreuses et les bactéries et des acteurs du système immunitaire comme les macrophages, les lymphocytes et les monocytes. Ceci permettra d'étudier les potentialités des FONs en tant qu'agents sélectifs des pathogènes et leurs interactions avec les agents immunitaires.

III.2.1. Imagerie de cellules cancéreuses

L'internalisation de certains nanoassemblages fabriqués a été réalisée dans des cellules du mésothéliome pleural malin, cancer se développant au niveau de la plèvre des poumons et prévalent dans la région Loire-Atlantique à cause des chantiers navals. C'est un cancer rare (environ 1000 cas annuels estimés en France, 3000 aux Etats-Unis) principalement développé suite à une exposition à l'amiante. La difficulté du traitement réside dans le fait que les symptômes peuvent apparaître 30 à 50 ans après exposition. A l'heure actuelle, aucun traitement n'est efficace et ceux qui sont utilisés induisent des effets secondaires dramatiques pour le patient dont la médiane de survie est inférieure à 18 mois après diagnostic.¹⁸⁰ Il apparaît donc nécessaire de trouver un traitement efficace, et une alternative prometteuse repose sur les nanoparticules en raison de leur internalisation préférentielle dans la vascularisation des tissus cancéreux et les possibilités de suivi et de diagnostic combinés. Les nanoparticules permettraient donc de suivre le traitement une fois administré dans le corps.

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec Christophe Blanquart, Philippe Hulin et Steven Nedellec du CRCINA. Des cellules mésothéliales de tumeur pleurale, notées méso, (lignée cellulaire 13) cultivées en monocouche sont incubées pendant 24 h avec les solutions de **6-FON** et **9-FON**. Les cellules sont observées par microscopie confocale de fluorescence sous excitation à 488 nm et en utilisant un monochromateur en détection permettant de sélectionner la gamme de longueurs d'onde souhaitées (Figure 55). L'observation de points jaune-orange dans le cytoplasme des cellules prouve une internalisation efficace des composés que ce soit **6-FON** ou **9-FON**. Des expériences complémentaires ont montré que les FONs sont localisées dans les endosomes et les lysosomes.

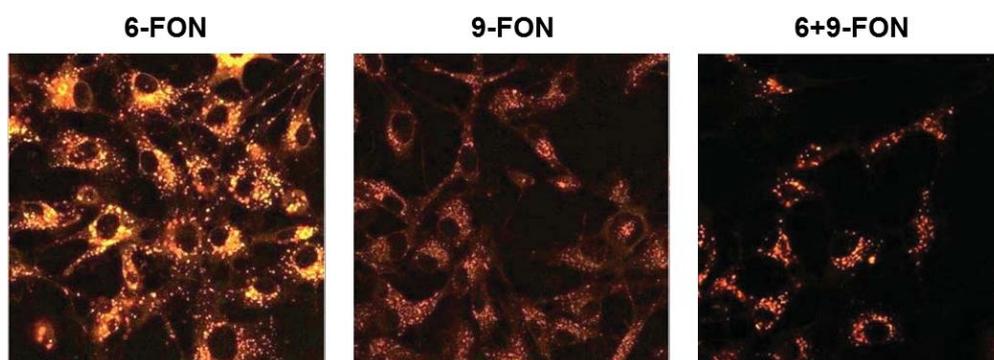


Figure 55 : Clichés de microscopie confocale de cellules méso 13 ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$) après 24 h d'incubation des cellules avec une solution de **6-FON**, de **9-FON** et de **6+9-FON** ($0,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Les points jaune-orange correspondent à des FONs.

Si **6-FON** ($\phi_f = 11\%$) est plus brillant que **9-FON** ($\phi_f = 3\%$), **9-FON** ($\lambda_{\max}^{\text{em}} = 645\text{ nm}$) présente une émission plus décalée dans le rouge que **6-FON** ($\lambda_{\max}^{\text{em}} = 637\text{ nm}$). C'est pourquoi nous avons pensé mélanger les fluorophores **6** et **9** pour obtenir des FONs combinant ces deux propriétés intéressantes. Des cellules méso sont également incubées pendant 24 h avec cette solution, appelée **6+9-FON**.

Un léger halo diffus est également observé dans le cytoplasme des cellules pour chaque type de FON (Figure 55). Pour aller plus loin dans cette observation, des temps de contact plus longs entre la solution de **6+9-FON** et les cellules ont été réalisés. Une autre lignée de méso (34) mais également deux lignées de cellules d'adénocarcinome pulmonaire (ADCA) (117 et 211), ont été étudiées pour élargir ces observations aux cancers pulmonaires. Après 48 h d'incubation, on note la formation d'un halo vert dans le cytoplasme (Figure 56). Ce phénomène, déjà observé précédemment,⁷¹ est attribué au délitement des FONs en leurs fluorophores constitutifs. Le solvatochromisme de ces derniers fait que leur couleur d'émission varie du rouge-orange sous forme de FON polaire à jaune-vert dans l'environnement lipidique apolaire de la membrane des vésicules (endosomes et lysosomes) de la cellule.

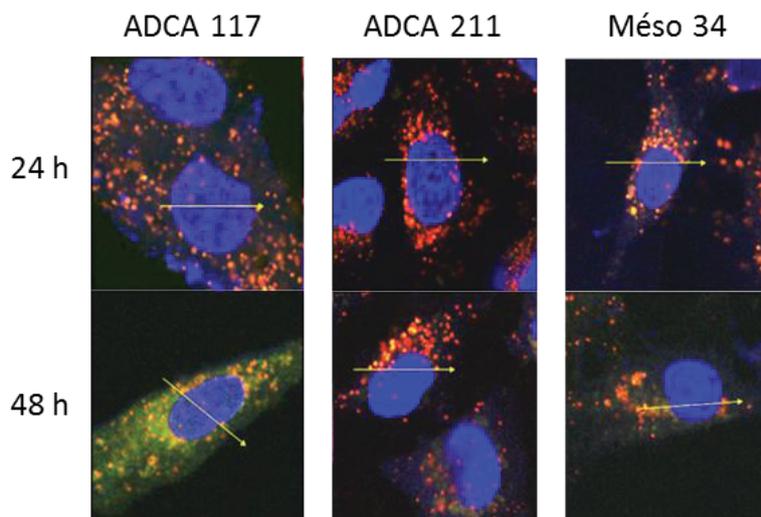


Figure 56 : Clichés de microscopie confocale d'ADCA (117 et 211) et de méso (34) après 24 et 48 h d'incubation ($\lambda_{\text{exc}} = 488\text{ nm}$) des cellules avec une solution de **6+9-FON** ($0,25\ \mu\text{mol.L}^{-1}$). Les noyaux sont marqués en bleu au Hoechst 33342 et les FONs apparaissent autour du noyau sous forme de points jaune-orange ($\lambda_{\text{em}} = 595/50\text{ nm}$).

L'influence de la balance hydrophile/hydrophobe sur l'internalisation a également été étudiée. Pour cela, des FONs plus hydrophobes comme **10-FON** et **19-FON** et plus hydrophiles comme **fpOH-FON** et **9-FON** ont été ajoutées à des ADCA 117. Après 2, 7, 16, 24, 39 et 48 h d'incubation, les cellules ADCA sont lavées avec une solution de PBS pour éliminer les nano-objets en excès. Des analyses par cytométrie de flux donnent alors l'évolution de l'intensité moyenne de fluorescence en fonction du temps de contact. Ces signaux de fluorescence sont normalisés par rapport au signal obtenu dans le cas de cellules seules et donnent ce qu'on appelle le RMFI (relative mean fluorescence intensity, en anglais) La fluorescence est collectée dans le canal FL2 ($547 < \lambda < 627\text{ nm}$) correspondant au signal d'émission des FONs. Le signal obtenu est ensuite normalisé par rapport au rendement quantique de fluorescence de chaque composé. Ainsi, plus le signal de fluorescence est élevé, plus il y a de FONs endocytées.

Le graphe obtenu est présenté ci-après (Figure 57A). On observe que les FONs hydrophiles **fpOH-FON** et **9-FON** sont plus endocytés que les FONs hydrophobes. Ce résultat est surprenant car il est connu que des nanoparticules hydrophobes ont plus d'affinité avec la membrane phospholipidique.¹⁸¹ Il existe certainement des interactions entre les protéines contenues dans le milieu de culture et les FONs différant selon leur charge ou leur polarité qui entraînent des cinétiques d'internalisation différentes. Le RMFI augmente jusqu'à 16h avant d'atteindre un plateau, peut-être dû à une division cellulaire. La pente à l'origine entre les points à 2 et 7 h étant plus élevée pour **fpOH-FON** que **9-FON**, on peut en conclure que ces FONs sont internalisés un peu plus rapidement que **9-FON**.

La longueur d'onde d'émission des FONs évoluant du rouge au vert après délitement, le signal est également collecté dans le vert, à savoir dans le canal FL1 ($500 < \lambda < 560$ nm). Le tracé du rapport des signaux FL2/FL1 en fonction du temps (Figure 57B) montre que **9-FON** et **10-FON** sont plus dégradés que **fpOH-FON** et **19-FON**. De cette différence, aucune tendance n'a pu être dégagée. On se serait effectivement attendu à ce que les nanoparticules organiques hydrophiles, à base de **fpOH** et **9**, restent intactes lors de l'internalisation tandis que celles plus hydrophobes, à base de **10** et **19**, se délitent.¹⁸²

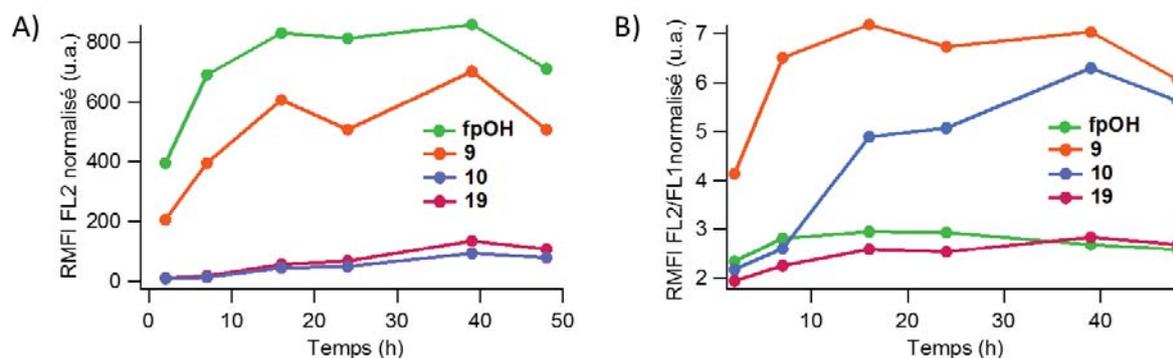


Figure 57 : Mesure de l'intensité relative de fluorescence (RMFI) par cytométrie de flux de cellules ADCA 117 incubées avec **fpOH-FON**, **9-FON**, **10-FON** et **19-FON** pendant 2, 7, 16, 24, 39 et 48 h A) dans le canal FL2 et B) rapport des signaux collectés dans les canaux FL2 ($547 < \lambda < 627$ nm) et FL1 ($500 < \lambda < 560$ nm). Le RMFI est normalisé par rapport aux rendements quantiques des composés.

Les FONs se délitant après internalisation, l'encapsulation et la libération d'un principe actif semblent donc être envisageables. Le suivi de la couleur d'émission est un indicateur intéressant mais insuffisant pour attester du suivi de la libération. Un autre système a été envisagé et sera présenté ultérieurement dans ce chapitre.

III.2.2. Imagerie de bactéries

Le diagnostic rapide des bactéries pathogènes représente un challenge d'une importance considérable pour la santé publique. En effet, les bactéries s'assemblent en colonies, appelées biofilms, adhérant à différentes surfaces et les méthodes conventionnelles, comme les traitements antibiotiques, sont inefficaces pour les détruire.¹⁸³ La nécessité de nouvelles méthodes pour éradiquer ces pathogènes a vu l'émergence de nanoparticules permettant à la fois leur détection sélective et, pour certains systèmes non présentés ici, leur destruction.¹⁸⁴⁻¹⁸⁶

Dans cette partie, nous étudierons la possibilité d'imager différents types de bactéries avec des FONs présentant des groupes fonctionnels distincts. Ces expériences ont été effectuées avec Marie-Pierre Fontaine-Aupart de l'ISMO. Pour cela, deux souches de bactéries ont été utilisées : une souche à Gram positif *Staphylococcus aureus* (SA) et une à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Les images de ces bactéries sans ajout de FON sont présentées ci-dessous (Figure 58). Les SA sont sphériques avec un diamètre d'environ 1 μm et les PA adoptent une forme de bâtonnets de 1,5 à 3 μm de long et de 0,5 à 0,8 μm de diamètre.

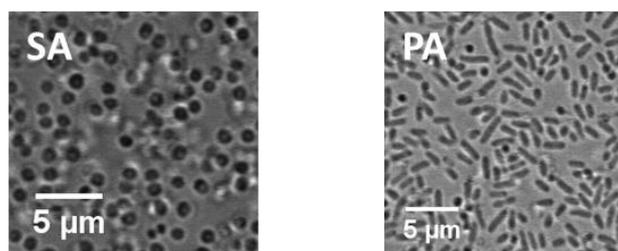


Figure 58 : Images obtenues en microscopie confocale en transmission de *Staphylococcus aureus* (gauche) et de *Pseudomonas aeruginosa* (droite).

Quatre types de FONs différant par leurs chaînes principales (**fpOH**, **fpOEt**, **9** et **5**) ont été étudiés. Leurs structures sont rappelées ci-dessous (Figure 59). **fpOEt** et **5** sont les équivalents de **fpOH** (cyanovinylidène) et **9** (benzothiadiazole) sans possibilité de faire des liaisons hydrogène et ont été choisis pour confirmer des études préliminaires montrant des interactions préférentielles entre les bactéries et les groupes acides phosphoniques et carboxyliques.

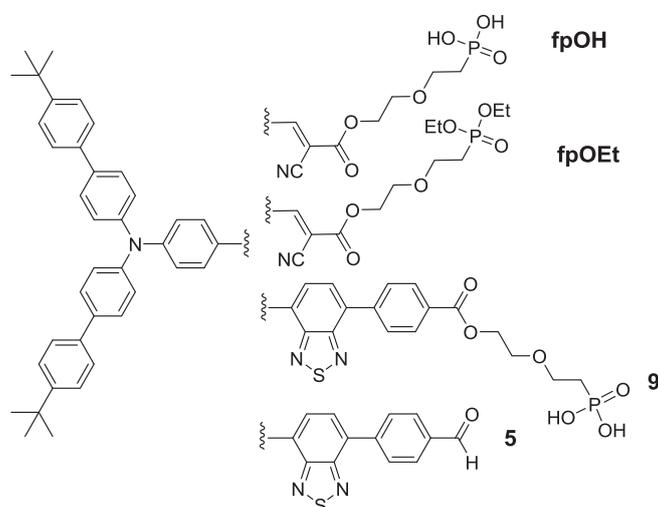


Figure 59 : Rappel des structures des fluorophores constituant les FONs.

Expérimentalement, 10^6 bactéries sont cultivées dans du TSB (gélose trypticase de soja ou tryptic soya broth en anglais), centrifugées et re-suspendues soit dans du TSB, soit dans de l'eau physiologique (EØ) (950 μ L). Les bactéries sontensemencées dans les puits d'une lame Labtek, 200 μ L de la solution de FONs à étudier y sont introduits puis, après un temps d'incubation de $t = 5$ min, $t = 5$ h ou $t = 24$ h, les bactéries sont alors observées par microscopie confocale de fluorescence sous excitation à 488 nm.

III.2.2.1. Staphylococcus Aureus

L'ajout de FONs **fpOH-FON** et **9-FON** comportant les fonctions acides phosphoniques à des SA repris dans de l'EØ a conduit à une coloration très nette et en pourtour des bactéries au bout de $t = 5$ min seulement. La corolle formée présente des inhomogénéités qui doivent résulter d'un artefact d'observation (pixellisation). Aucune FON n'apparaît à côté des bactéries après lavage (Figure 60).

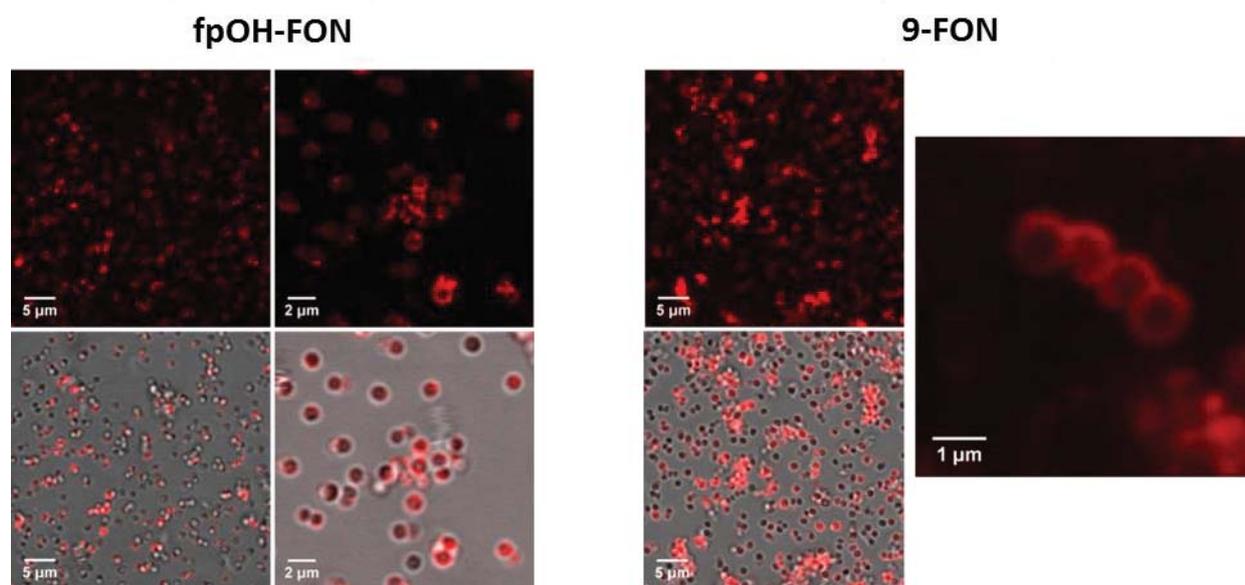


Figure 60 : Images par microscopie confocale de fluorescence après quelques minutes d'incubation de SA en présence de **fpOH-FON** ou de **9-FON** dans de l'eau physiologique ($t = 5$ min, $\lambda_{exc} = 488$ nm ; $\lambda_{em} = 520-780$ nm).

Sur les clichés après 5 et 24 h d'incubation, on observe également un fort marquage des bactéries que ce soit pour **fpOH-FON** ou **9-FON** (Figure 61). Ce marquage est beaucoup plus prononcé après 5 h. Pour $t = 24$ h, la grande démultiplication des bactéries rend les observations difficilement interprétables.

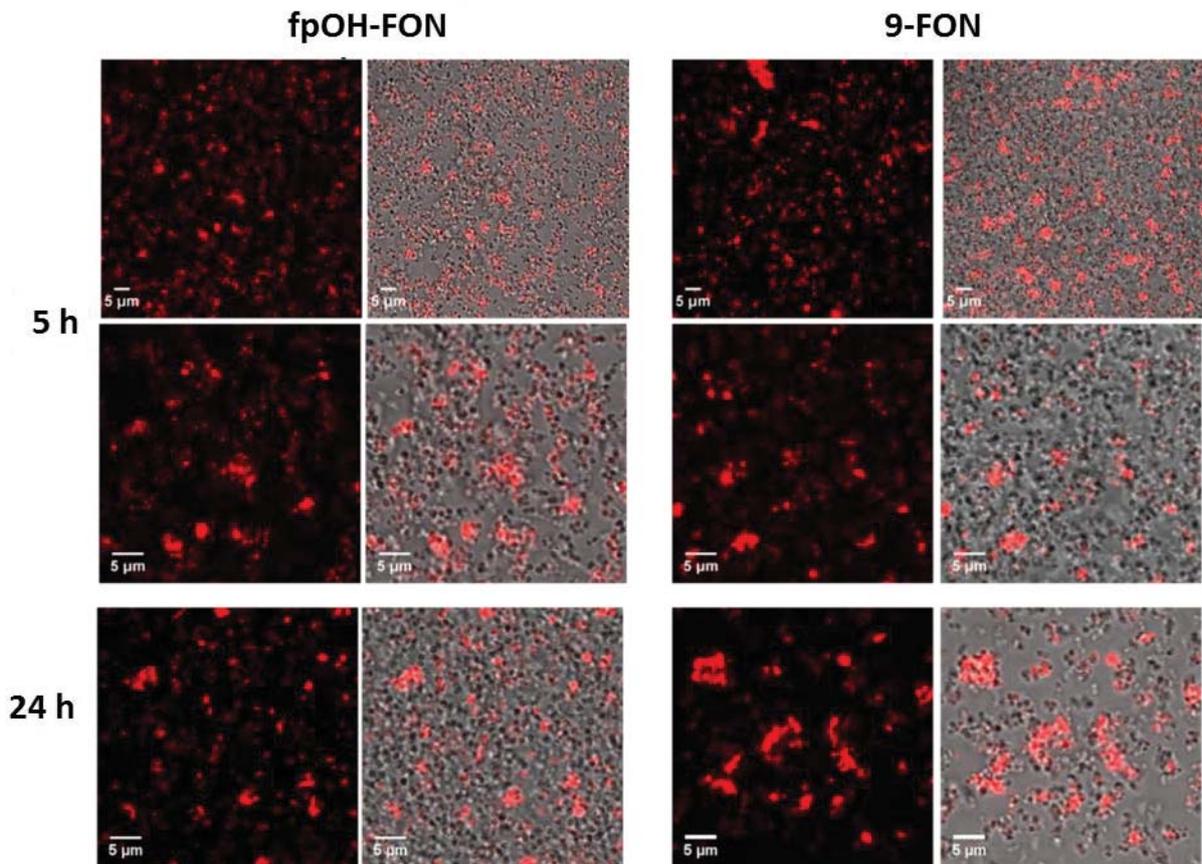


Figure 61 : Images par microscopie confocale de SA en présence de **fpOH-FON** ou de **9-FON** dans du TSB après incubation pendant 5 h et 24 h ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 520-780 \text{ nm}$).

Des images contrôles des FONs **fpOH-FON** et **9-FON** seules, dispersées dans de l'EØ, sont prises et ne révèlent aucune organisation similaire à celle notée avec les SA (Figure 62). On observe néanmoins une agglomération des FONs dans l'EØ ainsi que de grosses « fleurs » de près de 3 μm de diamètre et qui semblent dues à la surface des Lab-tek.

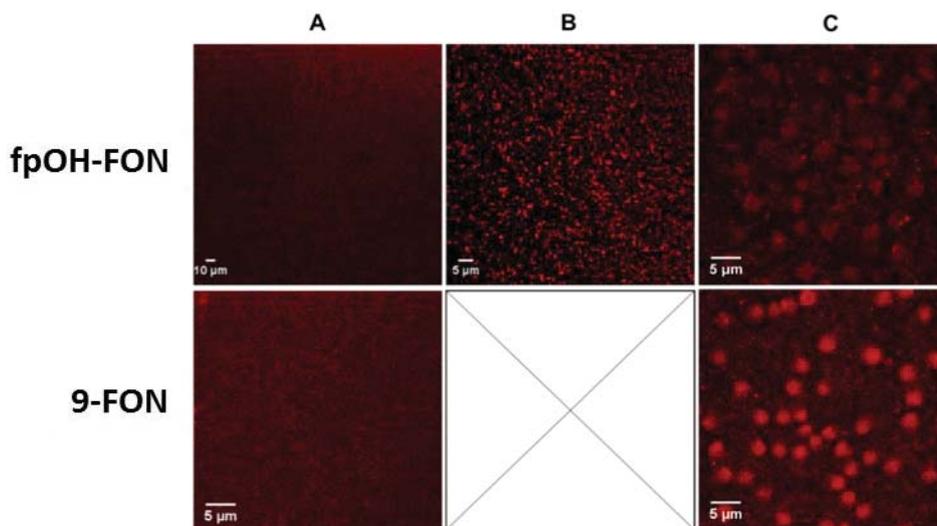


Figure 62 : Images par microscopie confocale de solutions aqueuses de **fpOH-FON** ou **9-FON** seules. A : dépôt sur lamelle de verre. B : mélange avec de l'EØ sur lamelle de verre. C : mélange avec de l'EØ dans un puit de lame Lab-tek ($t = 5 \text{ min}$, $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 520-780 \text{ nm}$).

Un co-marquage des bactéries est réalisé en ajoutant du SYTO 61, marqueur d'acides nucléiques, et révèle que les FONs sont bien localisées en pourtour et non au sein des bactéries. En effet, un enregistrement de coupes selon l'axe (Oz) sur une épaisseur de 3,5 μm confirme sans ambiguïté la localisation des FONs (en rouge) autour des SA marqués au SYTO 61 (en vert) et l'absence de colocalisation, entre les FONs et le SYTO 61 (Figure 63).

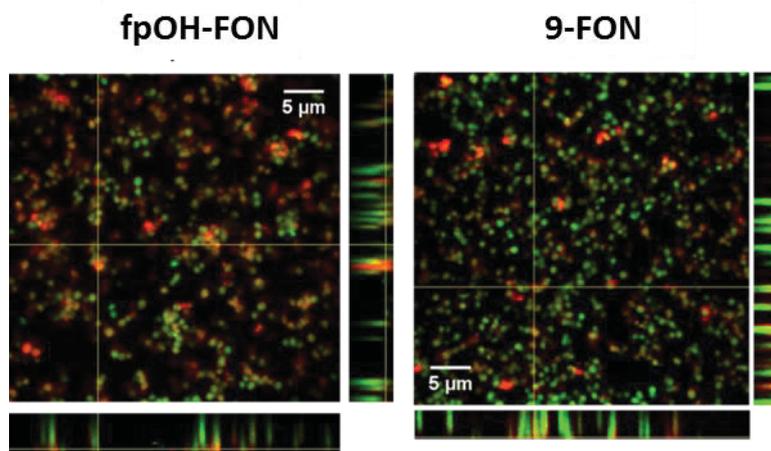


Figure 63 : Images par microscopie confocale de SA en présence de *fpOH-FON* ou de *9-FON* ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 520-580 \text{ nm}$) et de SYTO 61 ($\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 650-750 \text{ nm}$) dans de l'eau physiologique ($t = 5 \text{ min}$).

La toxicité des FONs a été testée sur les SA. Pour cela, de l'iodure de propidium (noté IP, $\lambda_{exc} = 543 \text{ nm}$) a été utilisé. L'IP est un agent intercalant de l'ADN et ne pénètre qu'en cas de rupture de la membrane externe, il est donc utilisé comme marqueur des phénomènes de nécrose. Les images ci-dessous correspondent aux bactéries SA incubées pendant 5 h avec *9-FON* puis additionnés d'IP (Figure 64). Une colocalisation est remarquée (en jaune) mais n'est pas alarmante car c'est ce qui est habituellement observé pour des bactéries seules en l'absence de FONs. De plus, de nombreux points rouges apparaissent sur l'image, prouvant que la mort des bactéries par nécrose n'est pas significative après l'ajout de *9-FON*. Ainsi les FONs sont un moyen d'imager les bactéries sur des temps courts sans induire de nécrose. D'autres études de toxicité, et notamment pour étudier l'apoptose, devront également être réalisées.

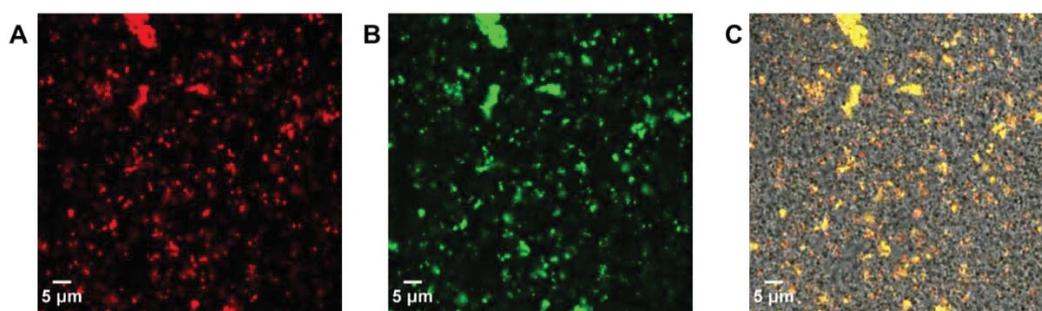


Figure 64 : Images par microscopie confocale de SA non centrifugées en présence de *9-FON* après incubation pendant 5h et ajout d'iodure de propidium. (A) Excitation de *9-FON* ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 520-780 \text{ nm}$). (B) Excitation de l'IP ($\lambda_{exc} = 543 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 640-750 \text{ nm}$). (C) Superposition de (A) et (B).

Les mêmes expériences de marquage sont effectuées avec des FONs dénuées d'acide phosphonique : *fpOEt-FON* et *5-FON*. Aucun marquage particulier n'est observé quel que soit

le temps d'incubation (0, 5 ou 24 h). Ces FONs modèles semblent précipiter dans le milieu de manière aléatoire (à côté ou sur les bactéries) (Figure 65).

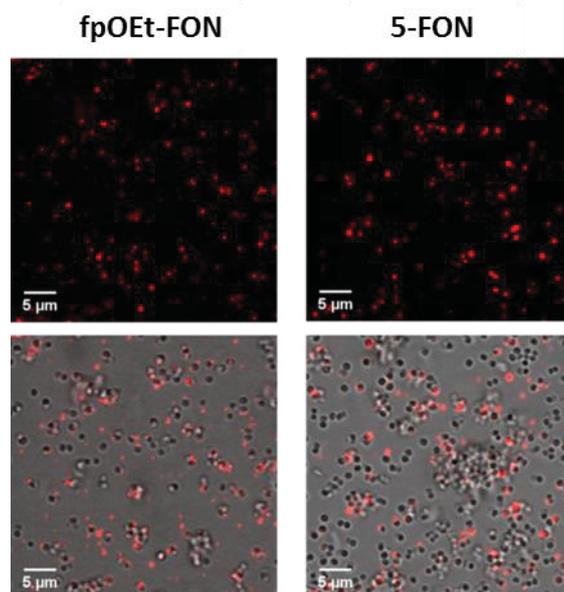


Figure 65 : Images par microscopie confocale de SA en présence de **fpOEt-FON** ou de **5-FON** dans de l'eau physiologique ($t = 5 \text{ min}$, $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 520-780 \text{ nm}$).

III.2.2.2. Pseudomonas Aeruginosa

Les expériences précédentes sont réitérées en présence de PA pour savoir si l'interaction des FONs présentant un acide phosphonique est propre aux SA ou non. Comme en témoignent les images présentées ci-dessous prises quelques minutes après ajout de FONs (Figure 66), le marquage est quasiment absent pour **fpOH-FON** et extrêmement faible pour **9-FON**. Ce marquage apparaît très granuleux, avec une seule FON « accrochée » aux bactéries par endroit. L'ajout de SYTO 61 permet de distinguer l'absence de colocalisation entre les PA et **9-FON**.

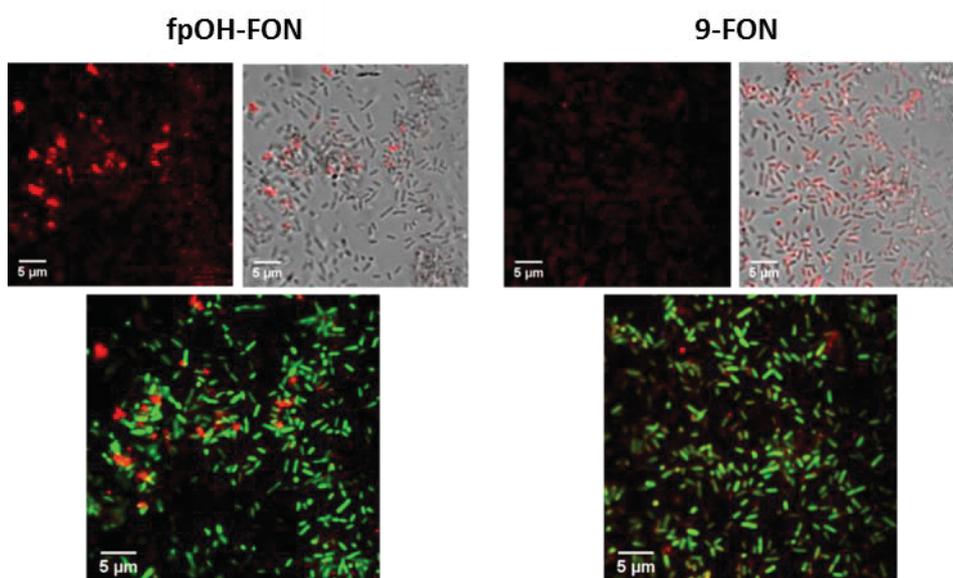


Figure 66 : Images par microscopie confocale de PA en présence de **fpOH-FON** ou de **9-FON** ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 520-580 \text{ nm}$) et de SYTO 61, marqueur d'acides nucléiques ($\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 650-750 \text{ nm}$) dans de l'eau physiologique ($t = 5 \text{ min}$).

Sur les clichés après 5 et 24 h d'incubation des FONs, et à l'inverse des SA, aucun marquage des PA n'est observé après 5 h et 24 h d'incubation que ce soit pour **fpOH-FON** ou **9-FON** (Figure 67).

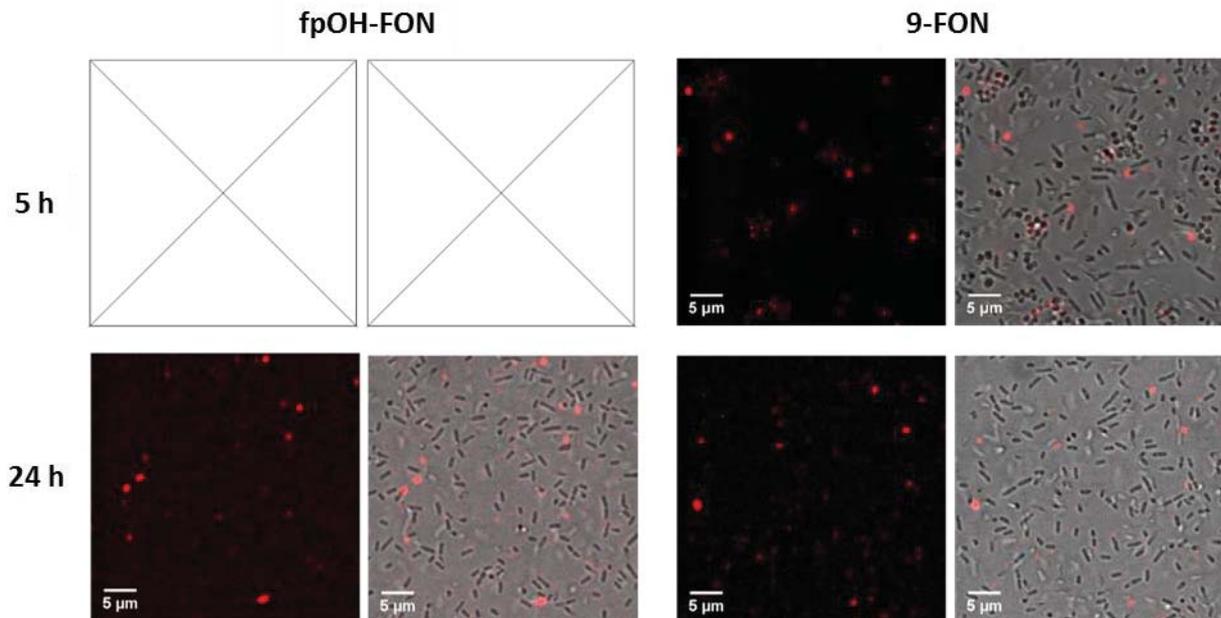


Figure 67 : Images par microscopie confocale de PA en présence de **fpOH-FON** ou de **9-FON** ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 520-780 \text{ nm}$) dans du TSB après incubation pendant 5 h et 24 h et marquage avec du Syto 61 ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 520-780 \text{ nm}$).

Sachant que les bactéries à Gram positif et Gram négatif possèdent toutes deux une membrane bactérienne chargée négativement, cette sélectivité ne peut être attribuée à la charge.¹⁸⁶ Ces bactéries diffèrent par la structure de leur paroi. En leur surface, les Gram- présentent des phospholipides et des lipopolysaccharides (LPS) tandis que les Gram+ possèdent des peptidoglycane (Figure 68).¹³² L'origine du marquage des SA provient donc d'une interaction entre les acides phosphoniques des FONs et la paroi de peptidoglycane. Les acides phosphoniques peuvent interagir avec d'autres entités (ions Ca^{2+}) rapportées s'associer à des antibiotiques (daptomycine) lors de leur pénétration par déstabilisation de la membrane.¹⁸⁷

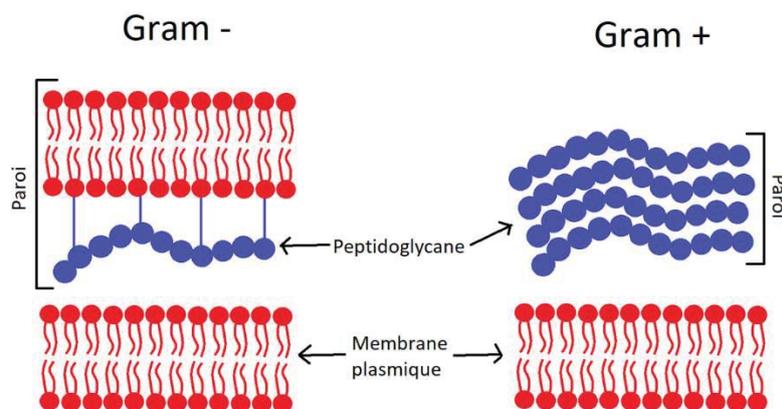


Figure 68 : Représentation schématique de la structure de la paroi de bactéries Gram- et Gram+.

III.2.2.3. Études spectrales

Les bactéries SA ont été incubées pendant 5 min, 5 h et 24 h avec une solution de **fpOH-FON** ou de **9-FON**. Les spectres d'émission ont ensuite été enregistrés. Les spectres de ces FONs dans l'EØ ont également été réalisés pour servir de contrôle (Figure 69). Un décalage hypsochrome de 30 nm du maximum des spectres d'émission est observé au bout de 24 h. Ce décalage fait penser à un délitement des molécules auto-assemblées sous forme de FONs en molécules isolées, comme cela a déjà été observé après internalisation dans des cellules cancéreuses. On peut donc supposer que les FONs se sont en partie dissociés en molécules isolées dans la membrane lipidique, émettent à plus basse longueur d'onde dans un tel milieu apolaire.

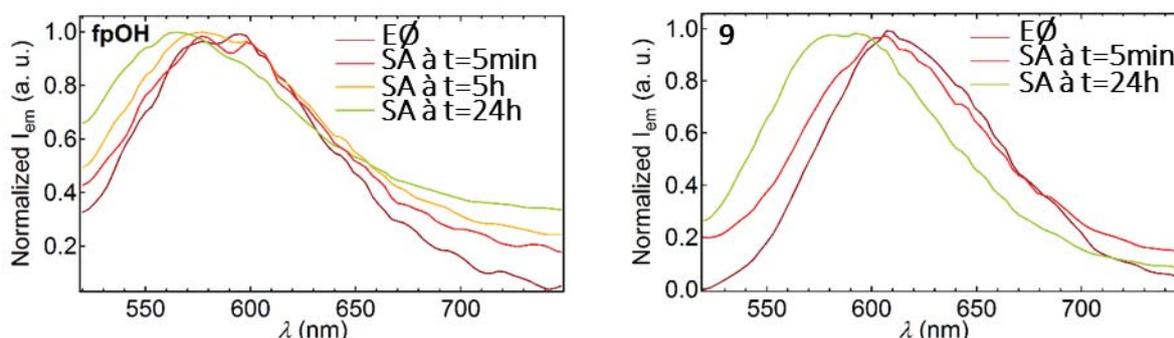


Figure 69 : Analyses spectrales de **fpOH-FON** et **9-FON** dans l'eau physiologique (EØ) (bordeaux), en présence de SA à $t = 5$ min (rouge), $t = 5$ h (orange), $t = 24$ h (vert) ($\lambda_{exc} = 488$ nm ; $\lambda_{em} = 520-780$ nm).

Pour conclure, l'acide phosphonique des FONs semble conduire à une interaction sélective avec les bactéries SA, en s'organisant en corolle autour de ces dernières. Ces FONs jouent donc le rôle d'agents de contraste sélectifs, rapides et biocompatibles. De manière à savoir si cette interaction est typique des bactéries Gram+, d'autres souches Gram+ (*S. pneumoniae*, *S. epidermis*, *E. faecalis*...) et Gram- (*E. coli*, *K. pneumoniae*) devront être testées. De plus, la microscopie super-résolue permettrait d'accéder à une localisation plus fine des FONs à la surface des SA. Enfin, aucun phénomène nécrotique significatif n'a été observé sur des temps courts.

Les perspectives de ce travail reposent également sur l'aspect thérapeutique apporté par les nanoassemblages. L'encapsulation de molécules antibiotiques (comme la vancomycine ou la daptomycine) dans les FONs générerait un traitement potentiel pour éradiquer les bactéries pathogènes en facilitant le transport des antibiotiques au sein des membranes. De plus, les nanoparticules magnétiques recouvrant le cœur FON permettraient d'augmenter l'efficacité du traitement. En effet, récemment, des nanoparticules d'oxyde de fer et l'antibiotique métricilline encapsulés dans une matrice polymérique se sont révélés efficace pour pénétrer des biofilms de *Staphylococcus epidermidis* de 20 mm d'épaisseur suite à l'application d'un champ magnétique externe et éradiquer complètement les bactéries du biofilm.¹⁸⁵

III.2.3. Étude d'internalisation dans des macrophages tumoraux

Cette étude a pour but d'utiliser les FONs comme labels efficaces pour visualiser différents types de macrophages tumoraux. Ces macrophages sont tous issus de la différenciation des monocytes mais peuvent ensuite exprimer deux phénotypes différents qui s'inter-convertissement en permanence en fonction des signaux environnementaux reçus : le phénotype M1 qui encourage l'inflammation et est associé à une activité anti-tumorale et le M2 qui diminue l'inflammation et répare les tissus tumoraux (Figure 70).^{188,189} Les macrophages sont préférentiellement polarisés en phénotype M1 grâce à des lipopolysaccharides (LPS) ou l'interféron gamma (IFN- γ) et en M2 grâce aux cytokines IL-4 ou IL-13. Leur activité diffère dans le sens où les macrophages M1 produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS), nocives pour les cellules cancéreuses. Les M2 produisent des cytokines aux propriétés anti-inflammatoires, qui participent à la résolution de l'inflammation et aux processus de cicatrisation tissulaire, et de l'ornithine, précurseur entre autres de collagène, responsable de la réparation des cellules cancéreuses. Il existe également des macrophages associés aux tumeurs (TAM pour tumor associated macrophages, en anglais). Ils présentent plutôt un phénotype de type M2, induisent une inhibition de la réponse immunitaire et favorisent la croissance tumorale. Le ciblage des macrophages tumoraux semble donc être une stratégie prometteuse pour combattre le cancer, en utilisant des nanovecteurs libérant des principes actifs ayant pour but soit d'altérer le mécanisme de recrutement des TAM,¹⁹⁰ soit de les affaiblir,¹⁹¹ soit de les orienter vers un phénotype M1.¹⁹²

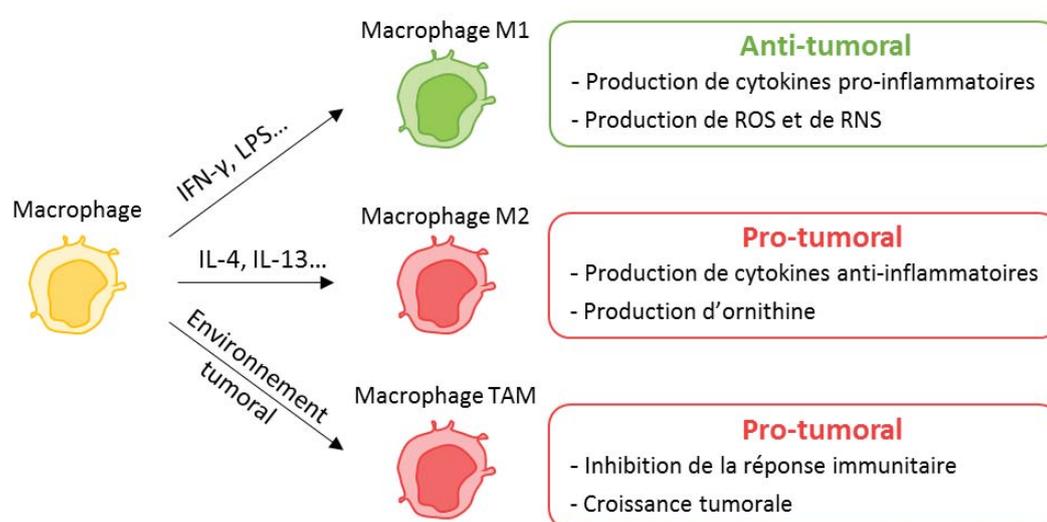


Figure 70 : Polarisation des macrophages en différents phénotypes (M1, M2 et apparenté à M2) en fonction de leur environnement. Leurs effets sont présentés dans les différents encadrés.

Pour cette étude, des nanosphères organiques hydrophiles, constituées de fluorophores **9** et **fpOH**, et hydrophobes, constituées de fluorophores **10** et **19**, ont été choisies car il a été rapporté des différences de prise en charge selon la nature des ligands recouvrant la surface des nanoparticules en fonction de la nature du phénotype du macrophage.¹⁹³

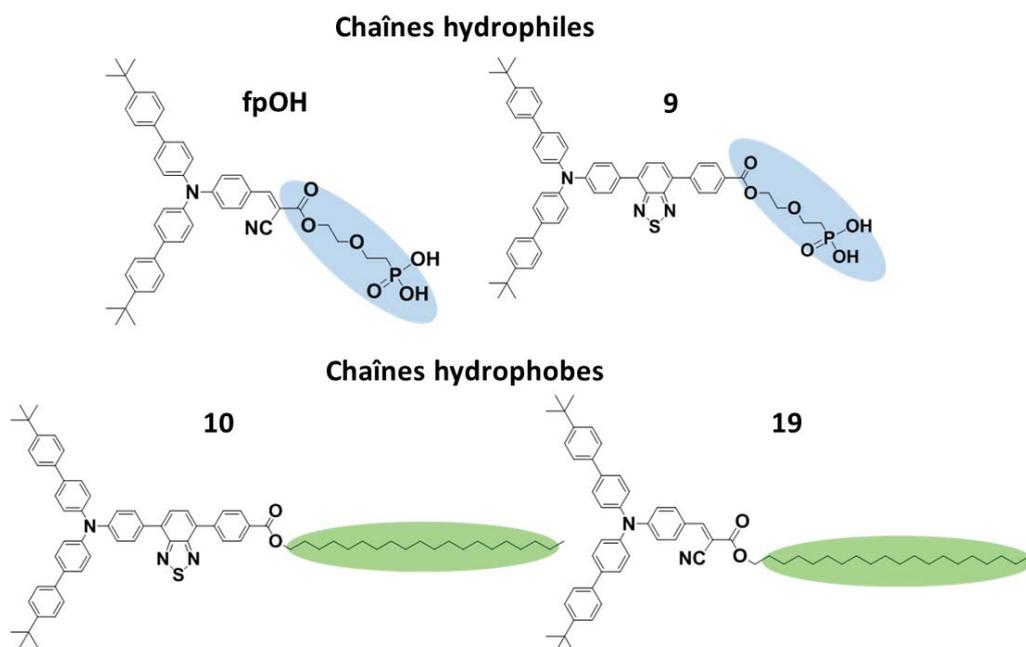


Figure 71 : Rappel de la structure des composés étudiés pour les études d'internalisation dans les macrophages M1 et M2.

Les expériences ont été réalisées sur des macrophages anti-tumoraux M1 et pro-tumoraux M2. Ils ont été obtenus par différenciation de monocytes à l'aide de cytokines GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) pour les macrophages M1 et à partir de cytokines M-CSF (macrophage colony stimulating factor) pour les macrophages M2. Après correction de la RMFI correspondant au canal FL2 (547-627 nm) par le rendement quantique de fluorescence, on observe une internalisation préférentielle des FONs hydrophiles **9** et **fpOH** quel que soit le phénotype du macrophage. Une fois encore, les assemblages **fpOH-FON** sont plus rapidement internalisés que les autres. On peut également remarquer que les M2 endocytent environ 3 fois plus que les M1 (signal de fluorescence plus important). Cette observation est intéressante dans la mesure où une sélectivité vis-à-vis d'un phénotype ou de l'autre est recherchée. Cependant, elle n'est pas totale et nécessite d'être améliorée si le but recherché est ensuite d'encapsuler un principe actif pouvant détruire sélectivement les M2. D'autres fluorophores pourront être testés dans ce but comme les bétaïnes ou celui comportant une chaîne PEG. Il est toutefois nécessaire de rester précautionneux dans l'analyse de ces résultats car des interactions avec les protéines du milieu de culture peuvent avoir lieu.

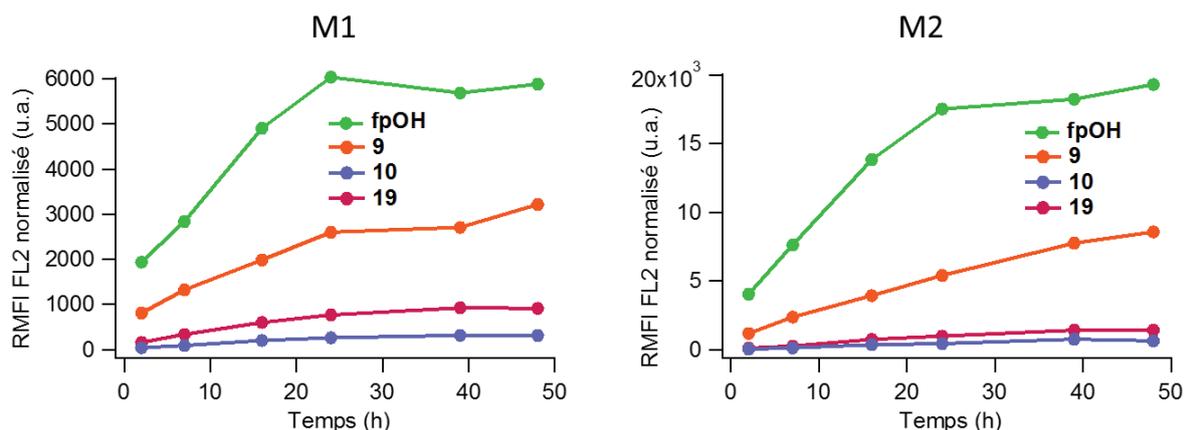


Figure 72 : Mesure de l'intensité relative de fluorescence (RMFI) dans le canal FL2 ($547 < \lambda < 627$ nm) par cytométrie de flux de macrophages M1 et M2 incubés avec **fpOH-FON**, **9-FON**, **10-FON** et **19-FON** ($0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) pendant 2, 7, 16, 24, 39 et 48 h. Le RMFI est normalisé par rapport aux rendements quantiques des composés.

Enfin, des études de différenciation du phénotype pourront être réalisées en ajoutant cette fois des FONs à des monocytes évoluant par la suite en macrophages. De cette façon, l'impact des FONs sur le processus de différenciation pourra être étudié.

Étudions maintenant les interactions entre FONs et agents du système immunitaire.

III.2.4. Étude d'internalisation dans des lymphocytes et monocytes

Dans la perspective d'études *in vivo*, il est essentiel d'étudier la capacité de furtivité, apportée par les fluorophores constituant les FONs, vis-à-vis du système immunitaire. Pour cela, des expériences sont menées sur les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC pour peripheral blood mononuclear cell, en anglais) représentant les entités de défense prépondérantes contre les organismes pathogènes (nanoparticules ou autres cellules). Il s'agit des lymphocytes et des monocytes, types de globule blanc. Les lymphocytes produisent des anticorps ou détruisent les cellules tandis que les monocytes sont des cellules circulantes qui se différencient en macrophage M1 ou M2 après avoir infiltré des sites inflammatoires.

Cette étude a également pour but de mimer l'environnement sanguin et anticiper le devenir des FONs dans ces conditions. Ces considérations sont importantes car de nombreuses cellules cancéreuses possèdent la capacité d'échapper au système immunitaire en altérant la machinerie cellulaire mononucléaire nécessaire à une réponse immunitaire efficace.¹⁹⁴

Les FONs diffèrent cette fois-ci par le caractère chargé ou neutre de leur chaîne principale, mimant ainsi les polymères habituellement utilisés pour recouvrir des nanomatériaux et, en l'occurrence, les nanoassemblages magnéto-fluorescents : l'acide polyacrylique (PAA) et des polymères PEGylés (PEG), décrits dans le chapitre suivant, ou des zwitterions. Les fluorophores comportent donc des unités acide carboxylique **6** (équivalent du PAA), éthylèneglycol **11** (équivalent d'un PEG), ou zwitterionique sous la forme de bétaine, ammonium-sulfonate **13** ou ammonium-carboxylate **14**. Ces ligands de type bétaine représentent une nouvelle approche pour conférer aux nanomatériaux de la furtivité grâce à l'absence de charge en surface. Leurs structures sont rappelées ci-dessous (Figure 73).

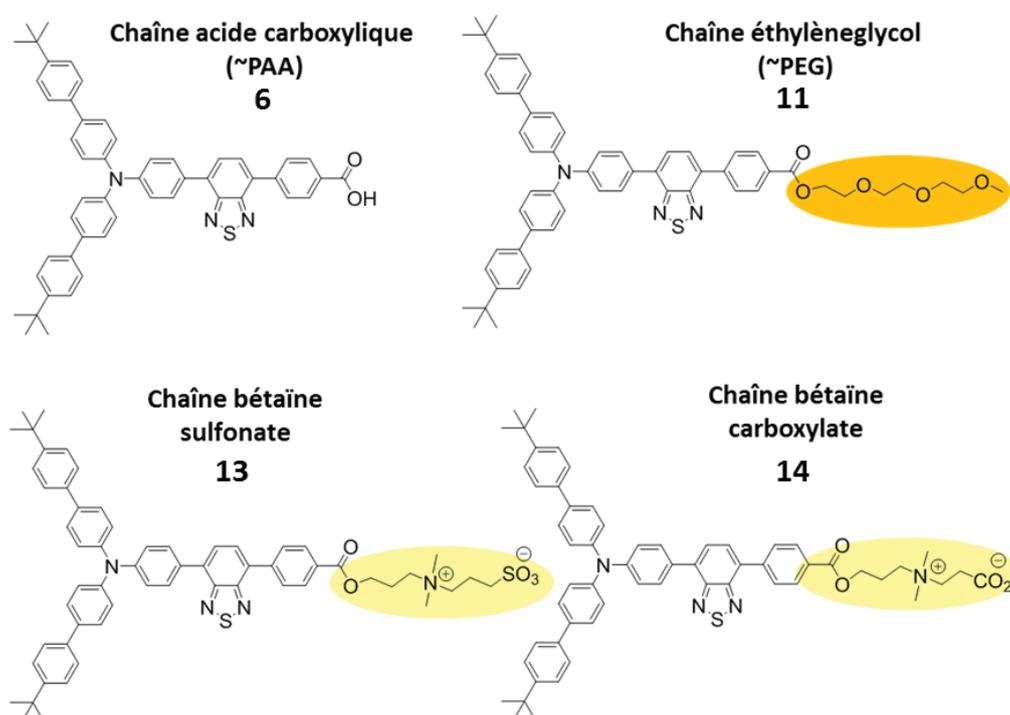


Figure 73 : Rappel de la structure des fluorophores utilisés pour les études d'internalisation dans les lymphocytes et les monocytes.

Pour cette étude, des monocytes et des lymphocytes sont incubés pendant 6 et 24 h avec ces 4 solutions de FONs. Des analyses par cytométrie de flux donnent l'évolution de la RMFI en fonction du temps de contact. La fluorescence est cette fois-ci collectée dans le canal rouge FL3 (645 < λ < 677 nm) car le signal d'émission des FONs étudiées est proche de la gamme de longueur d'onde imposée dans ce canal. Le signal obtenu est ensuite normalisé par rapport au rendement quantique de fluorescence de chaque composé.

Les graphes (Figure 74) montrent d'abord que les lymphocytes n'endocytent quasiment pas de nanoparticules contrairement aux monocytes. De plus, dans le cas des monocytes, l'endocytose des FONs augmente au cours du temps. Après 6 h d'incubation, les FONs constituées de bétaines **13-FON** et **14-FON** apparaissent être les moins endocytées dans les monocytes. La charge globalement neutre de ces systèmes leur apporte donc plus de furtivité que dans le cas de FONs chargées comme **6-FON**. Néanmoins, après 24 h, si les **14-FON** demeurent toujours moins internalisées, les proportions relatives sont modifiées pour les autres FONs et notamment pour **13-FON**, dont le signal dépasse celui de tous les autres types de FONs. Ce phénomène reste encore non expliqué à cette heure.

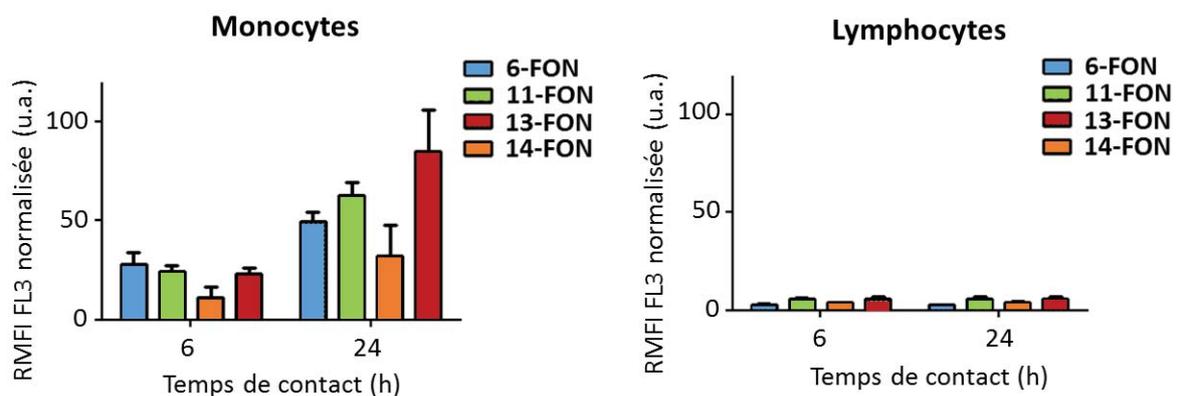


Figure 74 : Mesure réalisées en triplica de l'intensité relative de fluorescence (RMFI) dans le canal FL3 (645 < λ < 677 nm) par cytométrie de flux de monocytes et de lymphocytes incubés avec **6-FON**, **11-FON**, **13-FON** et **14-FON** pendant 6 et 24 h.

III.3. Les FONs pour la thérapie

Maintenant que la potentialité des FONs en tant qu'agents d'imagerie a été attestée, intéressons-nous à leur utilisation en tant qu'agent thérapeutique. En effet, le but de ces travaux de thèse concerne l'encapsulation d'un principe actif et le suivi de sa libération dans la cellule. Tout d'abord, le principe de suivi de cette libération sera présenté. Ensuite, l'encapsulation d'un médicament anticancéreux sera détaillée.

III.3.1. Obtention d'un système de suivi de la libération de molécules

Afin d'établir une preuve de concept de nanovecteurs signalant le relargage de drogues, nous avons imaginé un système de FON « OFF/ON », caractérisé par un état « OFF » (non fluorescent) avant délitement et « ON » (fluorescent) après délitement. Le système modèle retenu consiste en des nanosphères organiques constituées de molécules fluorescentes et d'un inhibiteur de fluorescence : un composé azoïque.

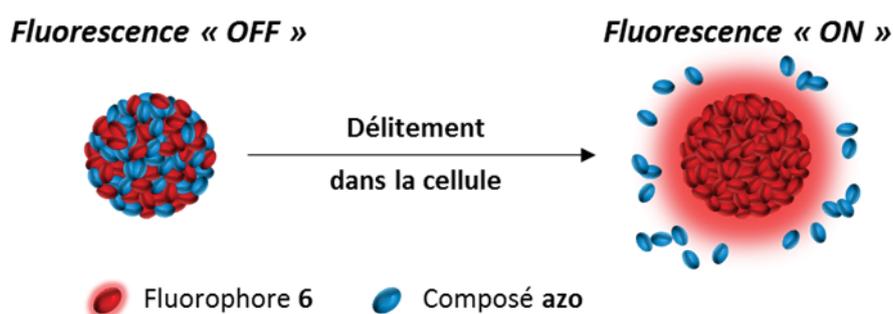


Figure 75 : Représentation schématique du mécanisme envisagé pour le suivi intracellulaire de la délivrance de principe actif. Le système, constitué du fluorophore 6 et du composé azo, est non fluorescent (« OFF ») avant délitement et devient fluorescent (« ON ») après.

Le dérivé azoïque appartient à la famille des composés photochromes, reconnus pour leur non-cytotoxicité, leurs qualités de colorants et leur photostabilité élevée. C'est un inhibiteur de fluorescence très efficace grâce à son transfert d'électron ultra-rapide.¹⁹⁵ Ces composés ont été utilisés comme sondes pour la régulation d'entités biologiques comme les balises moléculaires (molecular beacons en anglais) (Figure 76), l'ADN, les protéines et les oligonucléotides.¹⁹⁶⁻²⁰⁰ Dans le cas des balises moléculaires, après reconnaissance, le déploiement et l'éloignement des entités fluorophore et dérivé azoïque permettent de recouvrer la fluorescence.²⁰⁰ Dans notre cas, la proximité entre le fluorophore et l'azo induite par le confinement spatial sous forme de FON est censée entraîner une extinction de fluorescence des FONs conduisant à un état « OFF ». On espère ainsi recouvrer la fluorescence après désintégration de l'assemblage dans la cellule pour suivre la dégradation spatiotemporelle des assemblages et prouver de manière indirecte la libération de principes actifs

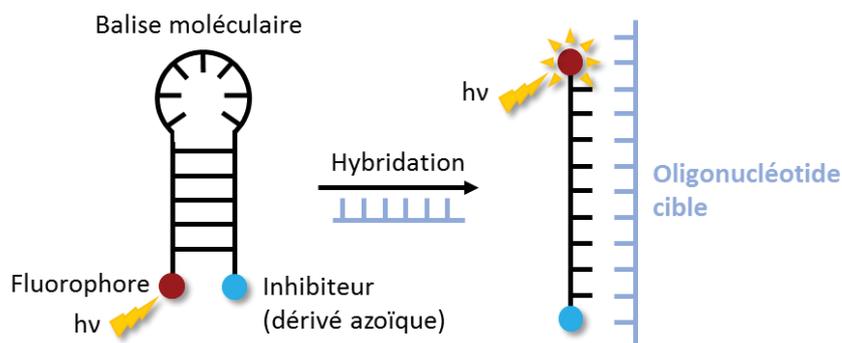


Figure 76 : Principe de fonctionnement des balises moléculaires dont l'émission de fluorescence apparaît après hybridation avec l'ADN cible.

III.3.1.1. Fabrication de nanosphères « OFF/ON »

Le fluorophore choisi pour cette étude est le composé **6**, pour sa grande brillance et son émission décalée dans le rouge. Le composé **azo₆**, quant à lui, présente un coefficient d'absorption molaire élevé de $13\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Il a été synthétisé en 6 étapes^{167,201} pour présenter une structure similaire à celle de **6** et doté d'une fonction $-\text{COOH}$ pour établir a fortiori le même type d'interactions au sein des nanosphères par liaisons H intermoléculaires et interactions de van der Waals (Figure 77).

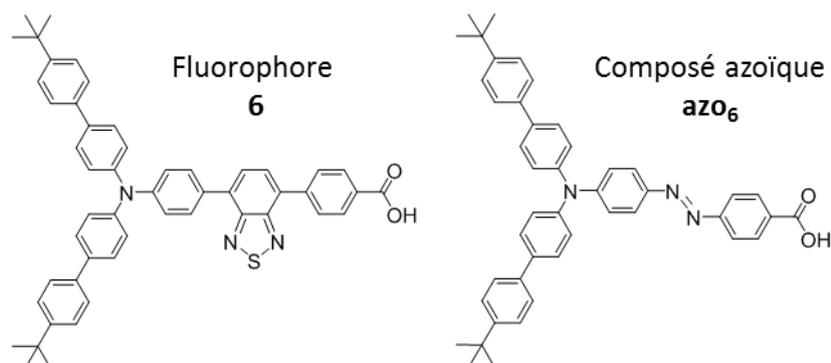


Figure 77 : Rappel des structures du fluorophore **6** et de l'**azo₆**.

Trois types de nanosphères différentes ont été élaborés : **FON** (**6** seul), **AON** (pour nanosphère organique constituée d'**azo** seul) et **FAON** (mélange de **6** et **azo₆** donnant une nanosphère dans un état « OFF » avant délitement). Pour obtenir les nanosphères encapsulant ces deux composés dans une proportion équimolaire 1:1, la procédure de fabrication des FON présentée au chapitre précédent a été adaptée (Figure 78). En effet, il suffit de mélanger deux solutions de **6** et **azo₆** dans le THF ($25\ \mu\text{L}$, $2,9\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) et de les nanoprecipiter dans l'eau ($2,5\ \text{mL}$). Les clichés MET révèlent la formation d'assemblages sphériques bien définis et plutôt homogènes en taille (Figure 78).

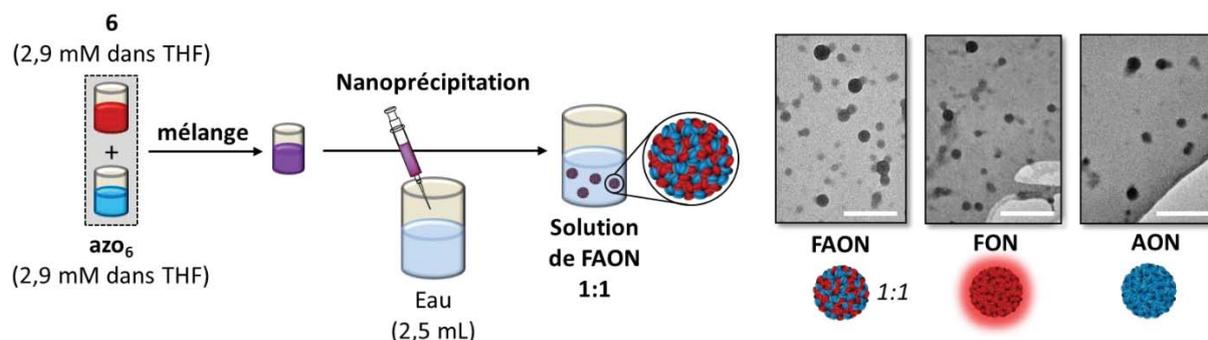


Figure 78 : Schéma de synthèse des nanosystèmes **FAON** et images MET des systèmes synthétisés. Échelle : 200 nm.

En effet, les tailles obtenues par MET et DLS présentent une faible polydispersité ($\sigma \leq 0,27$ et $PDI \leq 0,366$) (Tableau 24). On peut noter qu'une taille plus élevée est obtenue pour **FAON** ce qui a été attribué au fait que les deux espèces sont mélangées et donc encore plus désorganisées que pour les FONs monoconstituant. Les mesures de potentiel zêta ζ démontrent par ailleurs que tous les assemblages forment des suspensions stables avec des valeurs autour de -30 à -40 mV. Pour rappel, **FON** présente une brillance très élevée à $6.10^7 M^{-1}.cm^{-1}$, une émission décalée dans le rouge autour de 640 nm et un déplacement de Stokes égal à $5800 cm^{-1}$. À titre de comparaison un mélange en proportions équivalentes de **FON** et d'**AON** est réalisé et est appelé **FON+AON**. Les propriétés structurales de ce système diffèrent de celles de **FAON**, ce qui est en faveur d'une co-encapsulation du fluorophore et du composé azo au sein du **FAON**.

Tableau 24 : Caractérisations structurales des nanosphères.

Nom	$d_{TEM} (\sigma)$ (nm)	$d_H (PDI)$ (nm)	ζ (mV)
FON	36 (0,24)	62 (0,366)	-40
FAON (1:1)	49 (0,27)	90 (0,226)	-43
AON	35 (0,24)	53 (0,288)	-33
FON+AON	33 (0,27)	53 (0,326)	-34

Pour ce qui est des propriétés photophysiques, les spectres d'absorption et d'émission des nanosphères ainsi que le tableau résumant ces caractéristiques sont présentés ci-après (Tableau 25, Figure 79). Le premier fait marquant à souligner est l'extinction quasiment totale ($\sim 96\%$) de la fluorescence pour **FAON**. Cette extinction est fort probablement due à un phénomène de transfert d'électron photoinduit prouvant la proximité entre les molécules au sein de la nanosphère. L'azo peut jouer le rôle d'oxydant vis-à-vis des fluorophores portés à leur état excité suite au transfert de charge du groupe amino vers le groupe benzothiadiazole. Des mesures en électrochimie seront nécessaires pour déterminer le potentiel d'oxydoréduction de chaque espèce. Pour **FON**, **FAON** et **FON+AON**, les temps de vie ont été modélisés par une loi tri-exponentielle reflétant une nouvelle fois l'hétérogénéité des nanosphères et les interactions intermoléculaires en leur sein. Pour **FON** et **FON+AON**, les composantes des temps de vie et leurs proportions restent globalement identiques. Cependant, le temps de vie est

en moyenne légèrement plus élevé pour **FON+AON** que pour **FON**, ce qui n'a pas trouvé d'explication à ce jour. En revanche, les propriétés dynamiques de fluorescence de l'échantillon **FAON** sont très différentes. En effet, une extinction de la fluorescence est observée avec une valeur de temps de vie moyen environ égale à 0,5 ns. Deux hypothèses peuvent être dressées : soit le fluorophore et l'azo sont encapsulés avec succès dans une même nanosphère, soit l'azo est adsorbé en surface du FON. La diminution globale de chaque composante du temps de vie de **FAON** montre que tous les fluorophores sont impactés par l'azo peu importe leur place dans la nanosphère (en surface, à l'intérieur,...). Cette observation tend à prouver la première hypothèse formulée, à savoir l'encapsulation de l'azo et du fluorophore **6** dans la même nanosphère.

Tableau 25 : Caractéristiques photophysiques des nanosphères.

Nom	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	$\Phi_f^{(a)}$ (%)	$\tau_i (f_i)^{(b)}$ (ns)	$\langle \tau_s \rangle^{(c)}$ (ns)
FON	466	637	11	6,4 (30%); 2,5 (53%); 0,7 (17%)	3,4
FAON (1:1)	465	637	/	1,7 (18%); 0,4 (28%); 0,2 (54%)	0,5
AON	464	/	/	/	/
FON+AON	463	637	/	6,3 (34%); 2,5 (53%); 0,7 (13%)	3,6

^(a) Rendement quantique de fluorescence Φ_f calculé par rapport à la coumarine 540A dans l'éthanol ($\Phi_f = 0,38$). ^(b) Composantes τ_i et leurs proportions f_i en intensité, obtenues après modélisation par une loi multiexponentielle du déclin de fluorescence mesuré à 645 nm après excitation à 450 nm. ^(c) Moyenne des temps de vie $\langle \tau_s \rangle$ calculée à partir des $\tau_i (f_i)$.

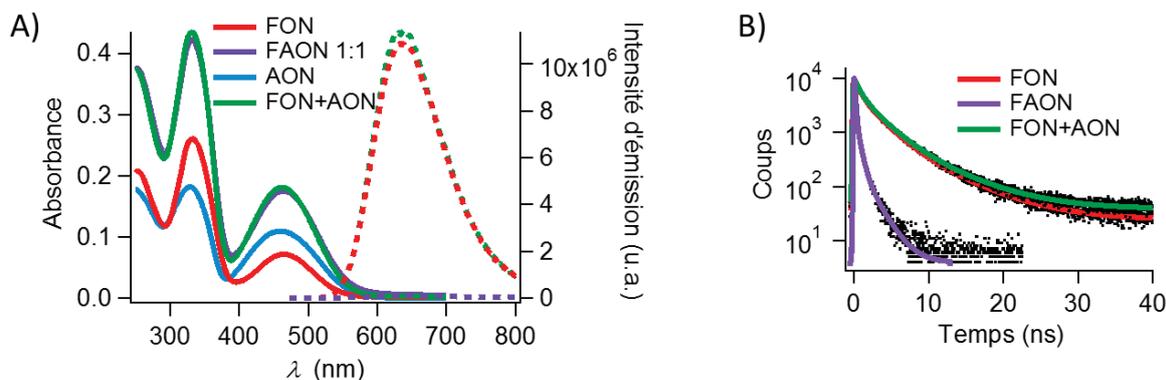


Figure 79 : A) Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (traits pointillés) des nanosystèmes **FON**, **AON** et **FAON (1 :1)** et d'un mélange de **FON** et **AON** dans l'eau. B) Déclins de fluorescence après modélisation, mesures réalisées à 645 nm avec $\lambda_{\text{exc}} = 450$ nm.

III.3.1.2. Étude de l'extinction par la méthode de Stern-Volmer

Dans cette partie, la méthode de Stern-Volmer est utilisée pour évaluer l'amplitude et la nature de l'extinction engendrée par l'azo sur le fluorophore. Pour rappel, l'extinction de l'émission peut être décrite par plusieurs mécanismes. L'extinction statique procède par la formation de complexes non-émissifs entre l'azo et le fluorophore. L'extinction dynamique repose sur la diffusion réciproque de ces molécules puis leur collision.²¹ L'approche de Stern-Volmer permet d'appréhender le type d'extinction mise en jeu. La relation (2) présentée ci-dessous mène à tracer le graphe de Stern-Volmer de $\frac{I_0}{I}$ en fonction de la concentration en inhibiteur (ou quencher en anglais) [Q].

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (2)$$

avec I_0 et I les intensités de fluorescence en l'absence et en présence d'inhibiteur respectivement, $K_{SV} = k_q \tau_0$ la constante de Stern-Volmer avec k_q la constante de vitesse du processus d'extinction bimoléculaire et τ_0 le temps de vie de l'état excité en absence de quencher.²⁰²

Les composés sont étudiés en solution dans le THF et sous forme de nanosphères. Partant d'une solution à $6,50 \cdot 10^{-6}$ M de **6** dans le THF, la concentration en azo est progressivement augmentée de 0 à $2,52 \cdot 10^{-5}$ M par ajouts successifs d'une solution d'azo à $5,80 \cdot 10^{-4}$ M dans une solution de fluorophore à $6,50 \cdot 10^{-6}$ M dans le THF (Tableau 26). Ceci permet de garder la concentration en **6** constante. Après chaque ajout, les spectres d'absorption et d'émission sont enregistrés et présentés ci-dessous (Figure 80A). Du fait de l'absorbance élevée $A > 0,1$, les intensités de fluorescence mesurées sont corrigées en prenant en compte l'effet de filtre interne. La formule de l'émission corrigée est donnée dans le Glossaire.

Tableau 26 : Concentrations en azo et nombre d'équivalent par rapport au fluorophore **6** dans le cas des composés dans le THF et celui des composés sous forme de nanosphères.

THF		Nanosphères	
Concentration en azo (M)	Equivalents	Concentration en azo (M)	Equivalents
0	0	0	0
$1,32 \cdot 10^{-6}$	0,005	$1,67 \cdot 10^{-7}$	0,00625
$2,63 \cdot 10^{-6}$	0,01	$3,33 \cdot 10^{-7}$	0,0125
$5,23 \cdot 10^{-6}$	0,02	$6,66 \cdot 10^{-7}$	0,025
$7,81 \cdot 10^{-6}$	0,03	$1,33 \cdot 10^{-6}$	0,05
$1,04 \cdot 10^{-5}$	0,04	$2,66 \cdot 10^{-6}$	0,1
$1,29 \cdot 10^{-5}$	0,05	$5,32 \cdot 10^{-6}$	0,2
$1,54 \cdot 10^{-5}$	0,06	$7,98 \cdot 10^{-6}$	0,3
$1,79 \cdot 10^{-5}$	0,07	$1,06 \cdot 10^{-5}$	0,4
$2,04 \cdot 10^{-5}$	0,08	$1,33 \cdot 10^{-5}$	0,5
$2,28 \cdot 10^{-5}$	0,09	$2,66 \cdot 10^{-5}$	1
$2,52 \cdot 10^{-5}$	0,1		

Concernant les nanosphères, elles sont préparées selon la procédure décrite au paragraphe précédent où la concentration en fluorophore reste fixe à $2,70 \cdot 10^{-5}$ M et la concentration en **azo** varie de 0 à $2,66 \cdot 10^{-5}$ M, correspondant à un nombre d'équivalents en **azo** variant de 0 à 1 (Tableau 26). Pour éviter les effets de filtre interne et permettre des comparaisons avec les composés dissous dans le THF, les solutions de nanosphères obtenues ont été diluées par 4 avant analyse. En effet, même si le déplacement de Stokes des composés fluorescents est élevé, il est toujours préférable de minimiser le recouvrement entre les spectres d'absorption et d'émission. Les spectres enregistrés pour les nanosphères ont également été corrigés en prenant en compte l'effet de filtre interne et sont présentés ci-dessous (Figure 80B).

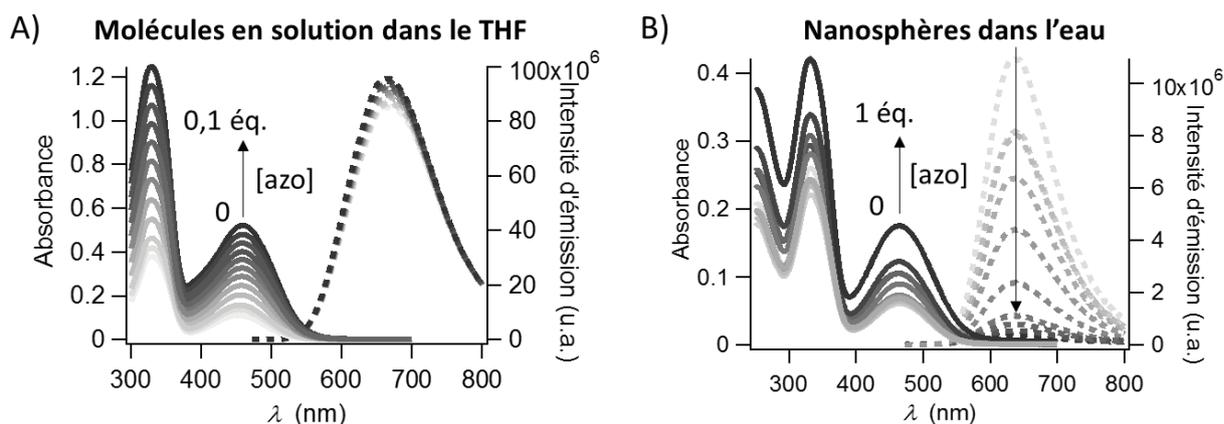


Figure 80 : A) Spectres d'absorption et d'émission corrigés pour les molécules en solution dans le THF. B) Spectres d'absorption et d'émission corrigés pour les molécules sous forme de nanosphères.

Les courbes de Stern-Volmer obtenues à partir de ces graphes sont présentés ci-dessous (Figure 81).

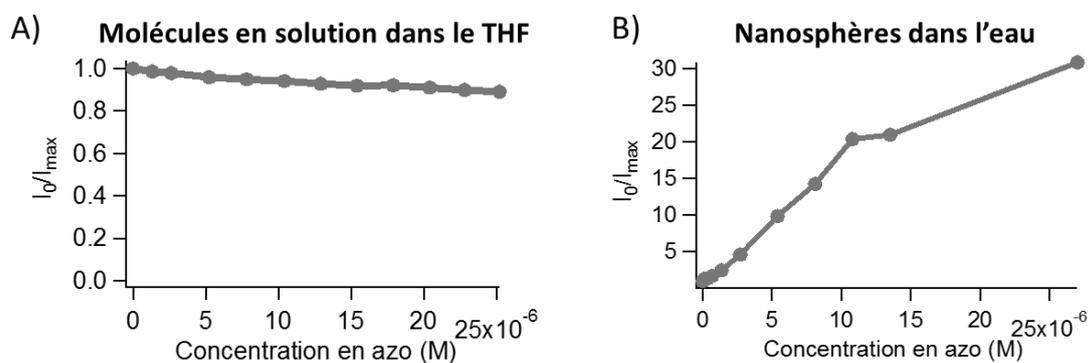


Figure 81 : Graphes de Stern-Volmer des molécules A) en solution dans le THF et B) sous forme de nanosphères. La concentration en fluorophore **6** est de $6,50 \cdot 10^{-6}$ M. $\lambda_{exc} = 465$ nm, $\lambda_{em} = 645$ nm.

Dans le cas du THF, le rapport I_0/I_{max} reste approximativement constant quelle que soit la quantité d'azo ajoutée (Figure 81A). Ceci prouve que l'inhibiteur azo n'a presque aucun impact sur la fluorescence de **6** en solution dans le THF. De plus, les déclins de fluorescence sont modélisés par une loi mono-exponentielle, qui montre la constance du temps de vie aux environs de 5,7 ns.

Dans le cas des nanosphères, le rapport I_0/I_{\max} augmente d'un facteur 30 entre 0 et $2,5 \cdot 10^{-6}$ M (Figure 81B). Le graphe nous donne une constante de Stern-Volmer égale à $K_{SV} = 1,2 \cdot 10^6$ L.mol⁻¹ et une constante de vitesse de l'extinction bimoléculaire égale à $k_q = 3,5 \cdot 10^{14}$ L.mol⁻¹.s⁻¹. Ces valeurs sont très élevées comparées à celles obtenues habituellement, notamment pour les inhibiteurs de fluorescence à base de biopolymères où $k_q = 2,0 \cdot 10^{10}$ L.mol⁻¹.s⁻¹,¹⁹⁷ ou encore l'extinction de fluorescence de l'indole par le dioxygène avec une constante de vitesse $k_q = 12 \cdot 10^9$ L.mol⁻¹.s⁻¹. Ces résultats montrent qu'une description dynamique seule n'explique pas le processus d'extinction rencontré sous la forme de nanosphères. En effet, ce modèle est applicable à des systèmes libres en solution alors que dans le cas des FAONs, les molécules sont figées.

Si l'on veut prendre également en compte une extinction statique de la fluorescence, la formule de Stern-Volmer initiale se trouve alors modifiée comme dans la relation ci-dessous (3).

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_{SV}[Q])(1 + K_S[Q]) \quad (3)$$

avec K_S la constante associée au processus d'extinction statique.

En appliquant cette formule pour modéliser le graphe de Stern-Volmer des nanosphères dans l'eau, on se rend rapidement compte que la représentation classique de I_0/I_{\max} en fonction de la concentration en azo en mol.L⁻¹ ne convient pas (Figure 82A). Cependant, une conversion de cette concentration sous forme de pourcentage molaire d'azo par nanosphère résulte en une meilleure modélisation (Figure 82B). Ces résultats nécessitent d'être approfondis avant toute conclusion.

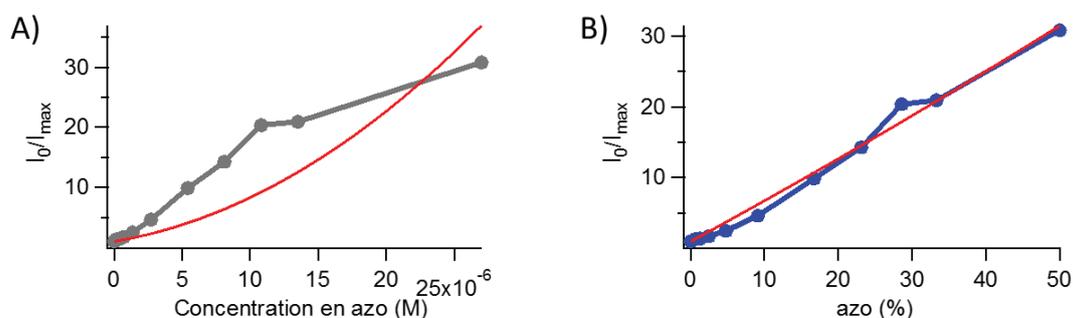


Figure 82 : Graphes de Stern-Volmer des molécules sous forme de nanosphères modélisés par la relation (3) (courbe rouge) avec A) une concentration en azo en mol.L⁻¹ et B) une concentration en % d'azo par nanosphère.

Au sein des FAONs, l'inhibition semble donc gouvernée par divers processus, dont des processus statique et dynamique. Les résultats seront prochainement complétés par des calculs statistiques de répartition des molécules azo au sein des nanosphères. Nous espérons ainsi pouvoir modéliser la dynamique d'extinction de fluorescence en fonction de la concentration en azo et donc de leur distance aux fluorophores.

III.3.1.3. Suivi de la désintégration *in cellulo* au cours du temps

Les mesures photophysiques nous ont permis de confirmer l'obtention de nanosphères « OFF ». Dans cette partie, nous étudierons la désintégration de ces assemblages au cours du temps après internalisation intracellulaire. Il est attendu que la fluorescence soit recouverte au cours du temps, menant à un état « ON ».

Pour cela, des méso 11 sont incubées avec les systèmes **FON** et **FAON** (1:1). Des images ont été obtenues par microscopie confocale de fluorescence (excitation à 488 nm) après 1, 3 et 5 h d'incubation et un marquage du noyau au DAPI (Figure 83). Les points jaunes correspondent à des FONs internalisés dans les cellules et les halos jaunes témoignent eux de la désintégration des assemblages. Ainsi, les images permettent de confirmer la présence et l'intégrité des **FON** dans les cellules après seulement 3 h d'incubation. Concernant les **FAON**, quasiment aucun assemblage n'est détecté avant 5 h d'incubation. Seul un léger halo jaune est observé dans le cytoplasme. Ces résultats suggèrent l'internalisation des assemblages après environ 3 h d'incubation, à l'instar des **FON**, puis leur désagrégation après 5 h, menant à la libération de l'**azo** et à un état « ON » du système.

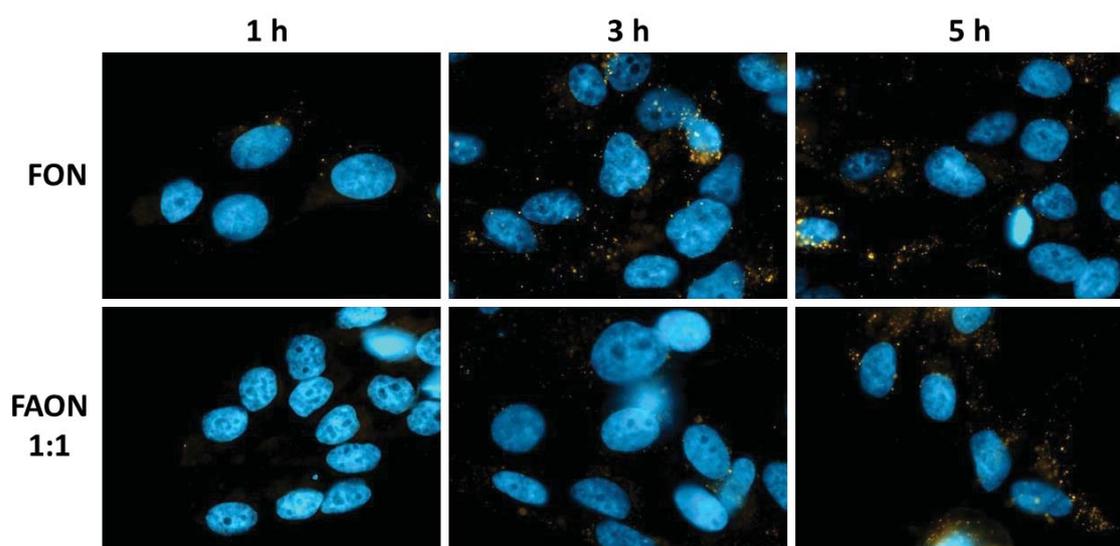


Figure 83 : Clichés de microscopie confocale de fluorescence de méso 11 incubées pendant 1, 3 et 5 h avec les différentes préparations à $0,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de **FON** et **FAON** ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$). Le noyau est coloré en bleu par le DAPI et les nanovecteurs correspondent aux points jaunes.

L'internalisation rapide des assemblages après seulement 3 h n'avait encore jamais fait l'objet d'études au sein du groupe. Pour aller plus loin dans la compréhension du mécanisme d'internalisation de ces FONs, les cellules sont incubées à $4 \text{ }^\circ\text{C}$ avec les nanoparticules (Figure 84). À cette température, la membrane cellulaire est rigidifiée et bloque les processus d'internalisation, qu'ils soient énergie-dépendants (endocytose) ou non (diffusion passive).²⁰³ Ainsi, les interactions des nanoparticules avec les cellules sont limitées à des phénomènes d'adsorption en surface des cellules.²⁰⁴

Pour comparer les proportions de nanoparticules adsorbées et internalisées, des méso 11 sont incubées à $4 \text{ }^\circ\text{C}$ et à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ avec les solutions de **FON** et **FAON**. La durée d'incubation est de 5 h, de ce fait, le signal de fluorescence parvient à apparaître pour les **FAON**. Des analyses par

cytométrie de flux donnent l'évolution de la RMFI collectée dans le canal FL3 ($645 < \lambda < 677$ nm) en fonction de la nature des nanosphères et de la température (Figure 84). Quelle que soit la nature des nanosphères, le signal de fluorescence collecté pour les cellules traitées à 4 °C est très inférieur à celui des cellules traitées à 37 °C. En effet, une diminution de 87 % est observée pour les **FON** et de 76 % pour **FAON**. Ces résultats prouvent que l'internalisation des nanosphères est énergie-dépendant et que leur majorité ne reste pas adsorbée à la surface des cellules mais est internalisée.

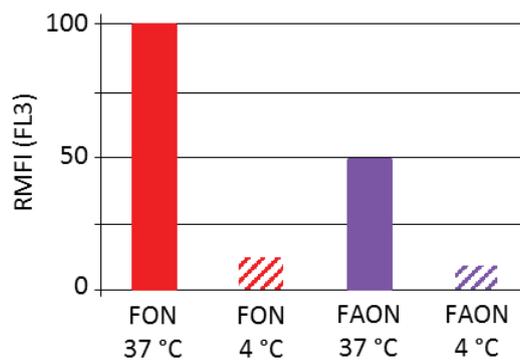


Figure 84 : Mesure de la RMFI dans le canal FL3 ($645 < \lambda < 677$ nm) par cytométrie de flux de méso 11 incubées avec des solutions de **FON** et de **FAON** pendant 5 h à 4 ou 37 °C.

Une étude complémentaire sur le mécanisme d'internalisation a été réalisée en pré-incubant les cellules pendant 1 h avec de la cytochalasine D, molécule inhibant la polymérisation d'actine. L'actine est elle-même responsable de la formation de vésicules d'endocytose dans la membrane plasmique et à leur engouffrement dans la cellule grâce à un mécanisme de polymérisation/dépolymérisation. Ainsi, la cytochalasine D bloquera indirectement l'endocytose médiée par les vésicules.

Les cellules sont ainsi incubées avec une solution de cytochalasine D pendant 1 h pour désactiver la polymérisation de l'actine, puis, les solutions de **FON** et **FAON** sont alors ajoutées avec un temps d'incubation de 5 h comme usuellement. La cytométrie de flux donne l'évolution de la RMFI collectée dans le canal FL3 ($645 < \lambda < 677$ nm) en fonction de la nature des FONs et de la présence ou non de cytochalasine D (Figure 85).

Une perte d'environ 40 % du signal pour **FON** et de 64% de celui de **FAON** montre que chaque type de nanosphère, et surtout **FAON**, est internalisé grâce à la formation de vésicules qui évoluent en endosomes voire en lysosomes. Ainsi, **FAON** semblerait entrer de manière différente par rapport à **FON**, observation pour laquelle nous n'avons pas encore de réponse.

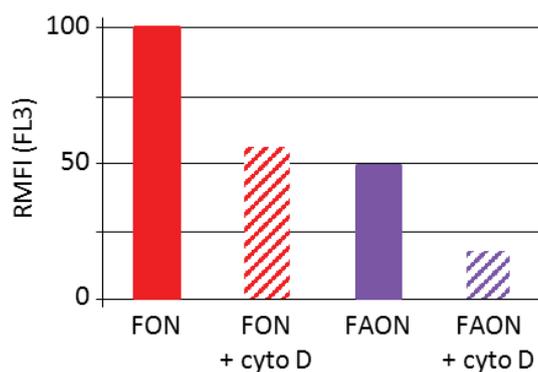


Figure 85 : Mesure de la RMFI dans le canal FL3 ($645 < \lambda < 677 \text{ nm}$) par cytométrie de flux de méso 11 incubées avec des solutions de **FON** et de **FAON** pendant 5 h avec ou sans ajout d'une solution de cytochalasine D ($5 \mu\text{M}$).

Pour conclure, des nanosphères « OFF/ON » ont été obtenues. Elles sont principalement internalisées par des mécanismes d'endocytose et restent peu adsorbées à la surface cellulaire. Une fois dans la cellule, leur désintégration a pu être suivie de manière spatiotemporelle. L'encapsulation de composés au sein des FONs et le suivi de leur libération dans les cellules est donc possible.

III.3.2. Encapsulation d'un agent anticancéreux : la doxorubicine

Dans cette partie, le composé **azo** est maintenant remplacé par un principe actif anticancéreux modèle : la doxorubicine. Ici, la doxorubicine émettra une fois libérée et internalisée dans le noyau.

III.3.2.1. Présentation des systèmes

La doxorubicine commerciale utilisée est présente sous forme hydrophile de chlorure d'ammonium. Afin de permettre sa co-encapsulation avec les composés fluorescents, elle est rendue hydrophobe par déprotonation de sa fonction ammonium en amine. Pour cette étude, les fluorophores **6** et **9** comportant des unités acides carboxyliques ou phosphoniques pouvant interagir via liaisons H avec cette amine ont été choisis.^{205,206} Les structures des fluorophores utilisés et de la doxorubicine sont indiquées ci-dessous (Figure 86).

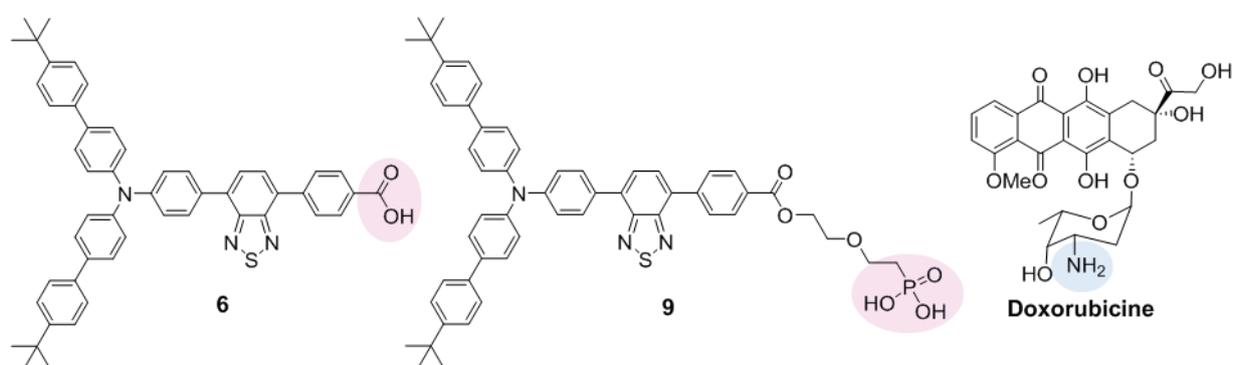


Figure 86 : Structures des fluorophores **6** et **9** présentant des fonctions acides (en rose) et de la doxorubicine présentant une fonction amine (en bleu).

L'introduction de doxorubicine dans la nanosphère s'effectue selon le procédé de fabrication vu au chapitre 2, étendu à un mélange constitué de doxorubicine et de composé **9**. Les assemblages résultants et encapsulant la doxorubicine (dox) sont appelés **6-FONdox** et **9-FONdox**. Les clichés MET ci-dessous (Figure 87) révèlent la formation de nanosphères prouvant que la dox n'affecte pas la morphologie des FONs. Toutefois, la forme des nanosphères **6-FONdox** et **9-FONdox** est moins nette que celles sans dox. La co-précipitation des fluorophores avec la dox modifie le diamètre moyen des nanosphères par rapport aux systèmes avec les fluorophores seuls. Cette observation tend à prouver une co-encapsulation du fluorophore et du principe actif. Les valeurs de potentiel zêta (Tableau 27) après ajout de dox diminuent de -30 à -20 mV pour **6-FON** et de -26 à -23 mV pour **9-FON** témoignant d'une modification des propriétés de surface des nanosphères après ajout du principe actif.

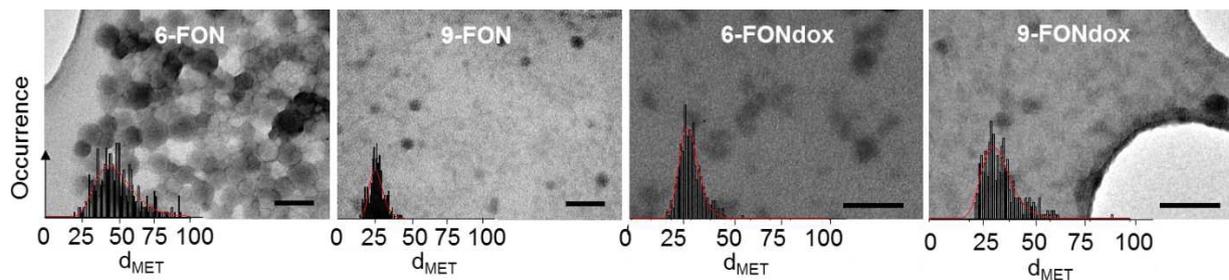


Figure 87 : Clichés MET des 4 types d'assemblages synthétisés.

Tableau 27 : Propriétés structurales et photophysiques des différents FONs synthétisés et de la doxorubicine sous sa forme chlorhydrate dans l'eau.

FON	d_{MET} (σ) (nm)	ζ (mV)	λ_{max}^{abs} (nm)	λ_{max}^{em} (nm)	$\Phi_f^{(a)}$ (%)	$\tau_i (f_i)^{(b)}$ (ns)	$\langle \tau_s \rangle^{(c)}$ (ns)
9-FON	24 (0,20)	-26	466; 335	638	2,2	4,7 (34%); 1,2 (48%); 0,2 (18%)	2,2
9-FONdox	33 (0,23)	-23	473; 336	613	0,3	1,7 (6%); 0,4 (12%); 0,3 (82%)	0,4
6-FON	44 (0,27)	-30	466; 334	625	11,4	6,3 (39%); 2,3 (52%); 0,4 (9%)	3,7
6-FONdox	29 (0,17)	-20	472; 337	616	3,7	4,1 (20%); 1,2 (67%); 0,3 (13%)	1,6
Dox,HCl	-	-	497	595	4,2	1,0 (100%)	1,0

^(a) Rendement quantique de fluorescence Φ_f calculé par rapport à la coumarine 540A dans l'éthanol ($\Phi_f = 0,38$). ^(b) Composantes τ_i et leurs proportions f_i en intensité, obtenues après modélisation par une loi exponentielle du déclin de fluorescence mesuré à 645 nm après excitation à 450 nm. ^(c) Moyenne des temps de vie $\langle \tau_s \rangle$ calculée à partir des $\tau_i (f_i)$.

Les spectres d'émission des assemblages et de la doxorubicine chlorhydrate dans l'eau (**Dox,HCl**) sont présentés ci-après (Figure 88). Les spectres montrent que l'ajout de dox induit systématiquement une extinction de l'émission, évaluée à 80 % pour **6-FON** et à 91 % pour **9-FON**, mais également des temps de vie de fluorescence. Le risque d'une précipitation séparée de la dox et des fluorophores devant être écarté, des solutions résultant de la précipitation des fluorophores dans une solution de doxorubicine dans l'eau ont été préparées. Ces dernières présentent également une extinction de la fluorescence mais en moindres proportions (65 et 84%, respectivement), due au phénomène d'adsorption de la dox à la surface des nanosphères organiques. Ceci tend à prouver que la dox est bien encapsulée dans les nanosphères et non adsorbée à leur surface. De plus, à l'instar des systèmes **FAON** étudiés dans la partie précédente, la diminution globale de chaque composante du temps de vie après encapsulation de dox (**6-FONdox** et **9-FONdox**) montre que tous les fluorophores sont impactés par la dox peu importe leur place dans la nanosphère. Cette observation est également en faveur de l'encapsulation de la dox et des fluorophores au sein des mêmes nanosphères. Enfin, une dernière considération au profit d'une encapsulation réussie repose sur les temps de vie des systèmes **6-FONdox** et **9-FONdox** qui ne présentent pas le signal caractéristique de la doxorubicine libre d'une valeur de 1,0 ns.

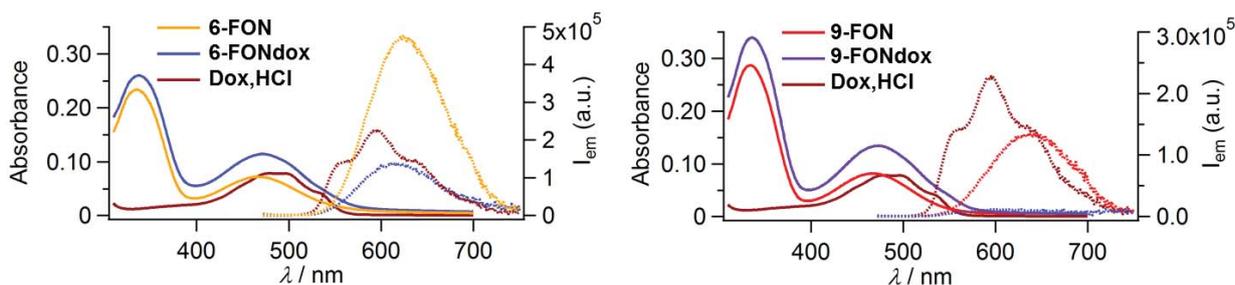


Figure 88 : Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (traits pointillés) ($\lambda_{exc} = 465 \text{ nm}$) des solutions de FONs dans l'eau **6-FON**, **9-FON**, **6-FONdox**, **9-FONdox** et de la doxorubicine chlorhydrate dans l'eau **Dox,HCl**.

III.3.2.2. Étude de l'internalisation des nanophasères

L'internalisation des nanoassemblages fabriqués a été réalisée avec des cellules mésothéliales de tumeur pleurale (mésos 11).

Tout d'abord, il est essentiel de souligner que les nanovecteurs exempts de dox comme **6-FON** et **9-FON** ne présentent pas de toxicité notable après 72 h de mise en contact avec les méso 11 même à forte concentration ($> 1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (Figure 89).

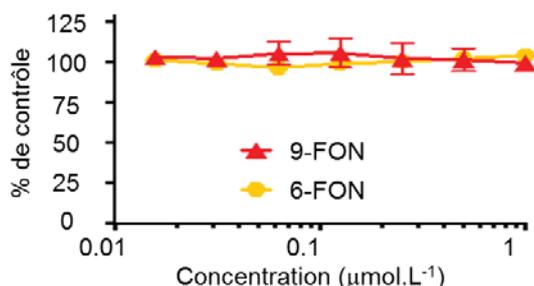


Figure 89 : Test de viabilité cellulaire des méso 11 incubées avec des **6-FON** et des **9-FON** pendant 72 h.

Les images de microscopie confocale réalisées après plusieurs temps d'incubation (24, 48 et 72 h) montrent des points oranges dans le cytoplasme, prouvant l'internalisation par endocytose des nanovecteurs, avec et sans dox (Figure 90).

La doxorubicine libre (**Dox,HCl**) colore le noyau grâce à son émission dans le rouge ($\lambda_{max}^{em} = 595 \text{ nm}$) dès 24 h d'incubation. Lorsqu'elle est encapsulée dans les FONs, un effet retard au niveau de sa libération est observé avec une coloration du noyau après 72 h uniquement. Ceci est en accord avec une encapsulation de la dox dans le nanovecteur et montre que ce dernier permet de contrôler la libération du médicament. En effet, le nano-système développé permet de retarder la diffusion du principe actif passant d'une libération non contrôlée sur quelques heures à une libération prolongée sur plusieurs jours.

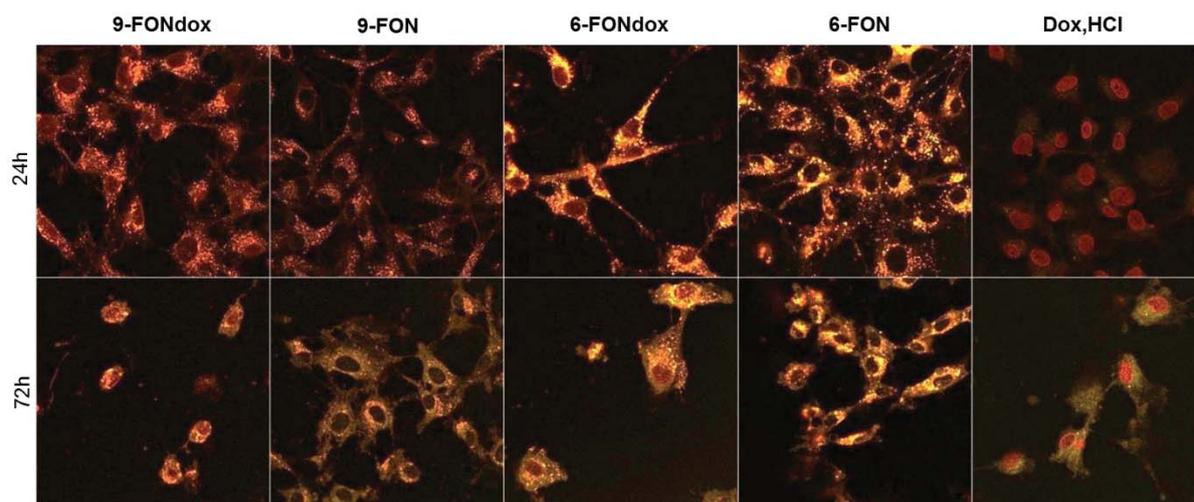


Figure 90 : Clichés de microscopie confocale de fluorescence de méso 11 incubées pendant 24 et 72 h avec les différentes préparations à $0,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FONs et **Dox,HCl** ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$). Le noyau est coloré en rouge par la doxorubicine et les nanovecteurs correspondent aux points orangés après superposition des canaux vert ($\lambda_{\text{em}} = 525/50 \text{ nm}$) et rouge ($\lambda_{\text{em}} = 595/50 \text{ nm}$).

Pour comprendre cette libération retardée et pouvoir l'attribuer à un relargage de la dox *in cellulo* et non à une déstabilisation chimique de l'édifice, l'évolution des solutions de FON dans l'eau a été investiguée à l'aide de mesures photophysiques. Les spectres d'absorption et d'émission des différentes solutions ont été acquis 0, 1, 2 et 7 jours après synthèse (Figure 91).

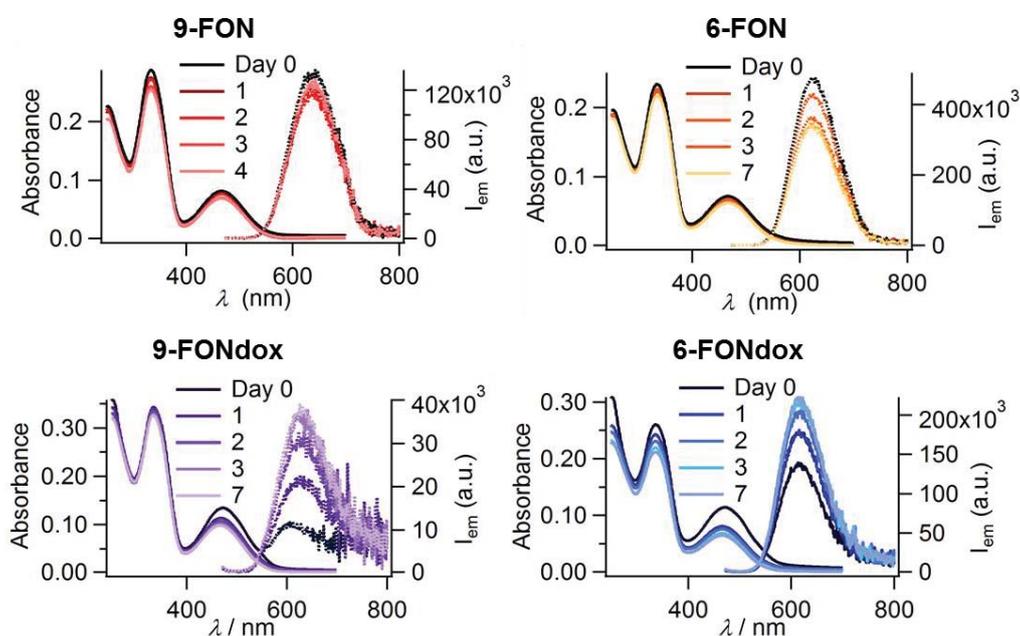


Figure 91 : Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission normalisés par rapport à l'absorption (traits pointillés) ($\lambda_{\text{exc}} = 465 \text{ nm}$) des solutions de FONs dans l'eau : **6-FON**, **9-FON**, **6-FONdox**, **9-FONdox**.

Concernant les nanovecteurs seuls **6-FON** et **9-FON**, les spectres d'absorption sont très peu modifiés, prouvant leur stabilité colloïdale. Les spectres d'émission présentent une légère diminution. Cette évolution ne pouvant être attribuée à une précipitation au vu des spectres

d'absorption, ceci est sûrement dû à un réarrangement progressif des fluorophores dans la nanosphère.

L'évolution des nanovecteurs chargés en dox est différente. En effet, l'absorption diminue légèrement tandis que l'émission augmente considérablement. Cette différence est bien plus marquée dans le cas de **9-FONdox** dont les spectres croissent de 230 % contre 115 % pour **6-FONdox**, correspondant à un recouvrement de 27 et 68 % de la fluorescence de **9-FON** et **6-FON** en l'absence de dox. Ces évolutions suggèrent une réorganisation de la structure de l'assemblage éjectant la dox au cours du temps. La différence observée entre la libération de la dox de **6-FON** et **9-FON** est liée à la différence d'acidité des groupes impliqués. En effet, la liaison entre l'amine de la dox et l'acide phosphonique **9** est connue comme étant plus forte que celle avec l'acide carboxylique **6** qui retiendra donc moins la dox encapsulée.

III.3.2.3. Élaboration d'une sonde aux propriétés sur-mesure

De ces observations, un nouveau nanoassemblage, appelé **6+9-FON**, a été testé contenant en proportions équimolaires à la fois les fluorophores **6**, pour sa brillance supérieure, et **9**, pour sa capacité à retenir la dox. Cet assemblage présente des propriétés photophysiques intermédiaires à celles de **6-FON** et **9-FON** (Figure 92, Tableau 28). L'ajout de dox fournit l'assemblage appelé **6+9-FONdox** qui semble mieux retenir la dox que **6-FONdox** puisque, cette fois, 43 % de l'émission du **6+9-FON** est recouverte (Figure 92). L'internalisation des assemblages **6+9-FONdox** dans des méso 11 révèle également une libération retardée de la dox mais cette fois après 48 h et non plus 72 h (Figure 93).

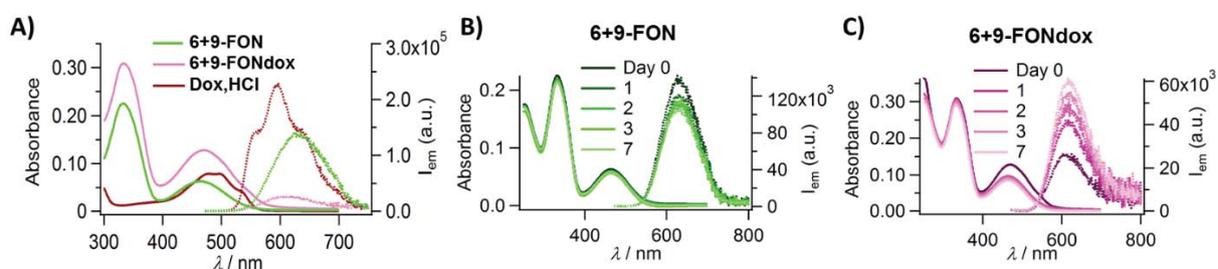


Figure 92 : Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission normalisés par rapport à l'absorption (traits pointillés) ($\lambda_{exc} = 465 \text{ nm}$) A) des solutions **6+9-FON**, **6+9-FONdox** et **Dox,HCl** dans l'eau après synthèse, B) des **6+9-FON** au cours du temps et C) des **6+9-FONdox** au cours du temps.

Tableau 28 : Propriétés structurales et photophysiques des différents FONs synthétisés.

FON	d_{MET} (σ) (nm)	ζ (mV)	λ_{max}^{abs} (nm)	λ_{max}^{em} (nm)	$\Phi_f^{(a)}$ (%)	$\tau_i (f_i)^{(b)}$ (ns)	$\langle \tau_s \rangle^{(c)}$ (ns)
6+9-FON	34 (0,21)	-30	464; 333	630	4,5	2,4 (12%); 0,9 (78%); 0,1 (10%)	2,7
6+9-FONdox	38 (0,19)	-24	472; 334	613	1,1	2,7 (23%); 0,7 (50%); 0,1 (27%)	1,0

^(a) Rendement quantique de fluorescence Φ_f calculé par rapport à la coumarine 540A dans l'éthanol ($\Phi_f = 0,38$). ^(b) Composantes τ_i et leurs proportions f_i en intensité, obtenues après modélisation par une loi exponentielle du déclin de fluorescence mesuré à 645 nm après excitation à 450 nm. ^(c) Moyenne des temps de vie $\langle \tau_s \rangle$ calculée à partir des $\tau_i (f_i)$.

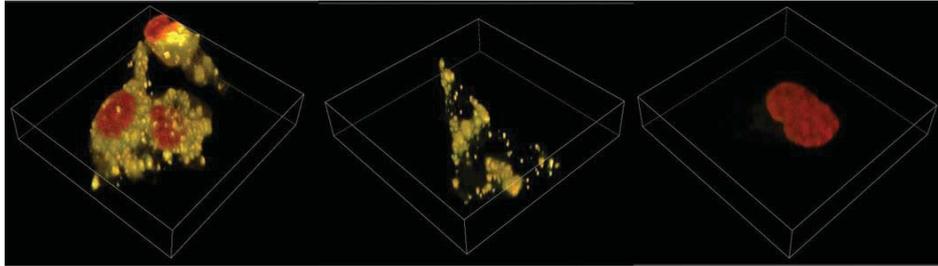


Figure 93 : Clichés 3D de microscopie confocale de méso 11 incubées avec **6+9-FONdox**, **6+9-FON** et **Dox,HCl** pendant 48 h ($\lambda_{exc} = 488$ nm). Le noyau est coloré en rouge par la doxorubicine et les nanovecteurs correspondent aux points orangés.

III.3.2.4. Suivi de la délivrance de la doxorubicine

Les nanosphères **6+9-FONdox** ont également été internalisées dans des cellules d'adénocarcinome pulmonaire (ADCA 117) (Figure 94). On peut noter un halo vert, localisé dans le cytoplasme autour des points orangés correspondant aux nanosphères. Cette observation, déjà rapportée au début de ce chapitre, prouve le délitement des FONs en leur fluorophores constitutifs et permet de conclure que la libération de la doxorubicine a lieu hors des endosomes où les FONs se sont accumulées, comme cela a déjà été prouvé avec des architectures similaires.²⁰

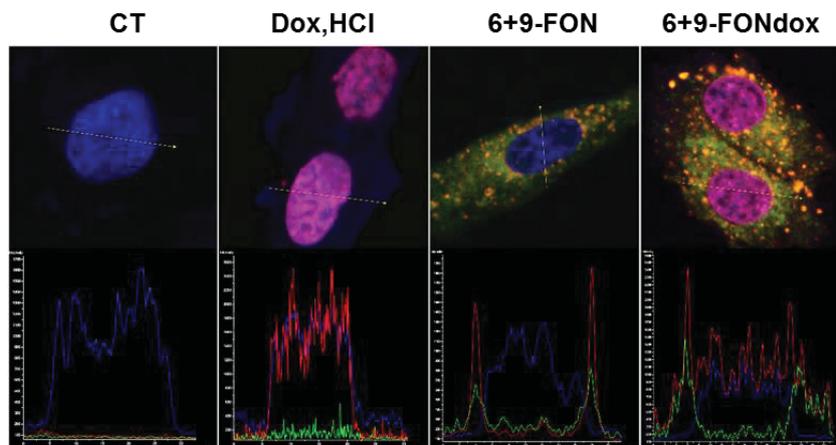


Figure 94 : Clichés de microscopie confocale de fluorescence d'ADCA 117 et empreintes de fluorescence obtenues par détection spectrale après 48 h d'incubation ($\lambda_{exc} = 488$ nm). Contrôle (CT), **Dox,HCl**, **6+9-FON** et **6+9-FONdox**. Les noyaux ont été marqués en bleu au Hoechst 33342, donnant un signal rose pour les noyaux marqués à la dox. Les nanovecteurs correspondent aux points oranges ($\lambda_{em} = 525/50$ and $595/50$ nm).

Contrairement à d'autres systèmes de libération de principe actif comme les liposomes ou les matrices de silice dopées (chapitre 1), le nanovecteur FON est stable colloïdalement, brillant et photostable, et permet de suivre le relargage du médicament.

Pour aller plus loin, il serait intéressant de créer un objet à trois molécules avec un fluorophore, un inhibiteur (**azo**) et un principe actif non fluorescent permettant de suivre la libération du

médicament grâce à la fois au système « OFF/ON » contrôlé par le couple fluorophore/inhibiteur et le solvatochromisme du fluorophore.

D'autres principes actifs, comme des médicaments épigénétiques (vorinostat) reconnus comme traitement prometteur contre le cancer,³ la curcumine, anticancéreux fluorescent dans le vert²⁰⁷, ou encore des antibiotiques (vancomycine, daptomycine)¹⁸⁷ seront testés pour étendre les investigations à d'autres pathologies.

III.4. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons vu que les FONs, grâce à leur brillance, leur signal d'émission dans le rouge et leur absence de cytotoxicité notable, peuvent servir de sondes fluorescentes pour imager diverses entités biologiques, pathogènes ou immunitaires. L'imagerie de cellules cancéreuses (cellules mésothéliales de la plèvre et cellules d'adénocarcinome du poumon) a révélé la dissociation des nanoparticules après internalisation. Le solvatochromisme des fluorophores permet alors de suivre l'état de cohésion de la FON grâce à des variations de la couleur d'émission. Des interactions sélectives, très recherchées, ont pu être mises en évidence entre les unités acides phosphoniques des FONs et la membrane des bactéries *Staphylococcus aureus*. Une internalisation privilégiée avec les macrophages M2 pro-tumoraux a été remarquée et sera exploitée pour permettre l'attaque sélective de ceux-ci par rapport aux macrophages M1 anti-tumoraux. Enfin, l'absence totale d'interactions entre les FONs et les lymphocytes mais une internalisation possible dans les monocytes met une nouvelle fois en exergue la capacité des systèmes à être sélectifs.

Le suivi de l'évolution structurale des nanovecteurs a été réalisé à l'aide d'un système binaire auto-assemblé « OFF/ON » constitué d'un inhibiteur de fluorescence qui perd son activité dès lors que les FONs se dissocient. Ce système permet de suivre de manière spatio-temporelle la libération d'un éventuel principe actif qui serait alors encapsulé dans la FON. Ceci a également permis de confirmer la possibilité d'encapsuler une molécule hydrophobe. En effet, l'encapsulation du principe actif anticancéreux doxorubicine au sein du nanovecteur a été un succès. Les cellules cancéreuses ont été détruites après libération du principe actif de la FON. La combinaison d'un fluorophore, d'un inhibiteur et d'un médicament dans un même nanovecteur offrirait donc un système théranostique idéal.

Pour réduire la diffusion passive du principe actif et étendre les investigations de l'imagerie *in cellulo* à l'imagerie *in vivo*, une coquille de nanoparticules magnétiques pourra recouvrir les FONs et aboutir à un objet multimodal pour l'IRM et la délivrance contrôlée sous l'effet d'un stimulus externe. Le chapitre suivant sera précisément l'occasion de découvrir la synthèse et la caractérisation de tels objets.

Chapitre IV : Synthèse de nanoparticules magnétiques et obtention de nanoassemblages magnéto-fluorescents

IV.1. Introduction	130
IV.2. Synthèse et caractérisations de nanoparticules magnétiques	131
IV.2.1. Présentation et fabrication de nanoparticules magnétiques.....	131
IV.2.2. Caractérisations structurales de nanoparticules magnétiques	133
IV.3. Formation et caractérisation de nanoassemblages hybrides	135
IV.3.1. Procédé de fabrication de nanoassemblages hybrides.....	135
IV.3.2. Propriétés structurales et photophysiques de nanoassemblages hybrides	137
IV.3.2.1. Influence du cœur fluorescent.....	138
IV.3.2.2. Influence de la taille des nanoparticules d'oxyde de fer	142
IV.3.2.3. Influence du polymère stabilisant	144
IV.3.2.4. Test de résistance au photoblanchiment.....	148
IV.4. Etude des propriétés magnétiques des nanoparticules magnétiques et des nanoassemblages hybrides	149
IV.4.1. Propriétés magnétiques des nanoparticules de maghémite	149
IV.4.2. Principaux types de caractérisations magnétiques	151
IV.4.2.1. Mesure des propriétés magnétiques	151
IV.4.2.2. Mesure de relaxométrie.....	152
IV.4.3. Influence de la nature du cœur fluorescent	153
IV.4.3.1. Mesure des propriétés magnétiques	154
IV.4.3.2. Mesure de relaxométrie.....	155
IV.4.4. Influence de l'organisation et de la taille des nanoparticules magnétiques	157
IV.4.4.1. Mesure des propriétés magnétiques	157
IV.4.4.2. Mesure de relaxométrie.....	161
IV.4.5. Influence de la nature du polymère stabilisant.....	163
IV.4.5.1. Mesure des propriétés magnétiques	163
IV.4.5.2. Mesure de relaxométrie.....	164
IV.5. Conclusion	166

IV.1. Introduction

Ce chapitre traite de la fabrication et de la caractérisation des nanoassemblages hybrides aux propriétés magnétiques et fluorescentes. La structure générique de ces nano-objets repose sur un cœur FON recouvert de nanoparticules magnétiques, stabilisé par un polyélectrolyte pouvant être fonctionnalisé par des entités biologiques. Elle est rappelée ci-dessous (Figure 95).

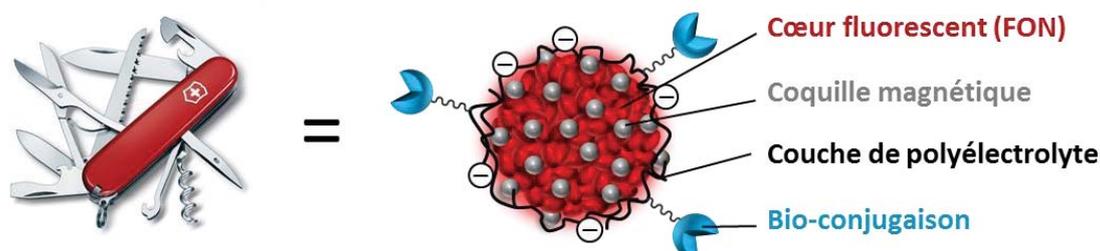


Figure 95 : Structure des nanoassemblages hybrides magnéto-fluorescents développés au laboratoire dans le cadre de ces travaux de thèse.

Tout d'abord, la nature des nanoparticules magnétiques utilisées sera présentée. Comme il existe différents types, nous nous attacherons exclusivement à détailler celles utilisées dans le cadre de ces travaux de thèse, les autres ayant été présentées au chapitre 1. Les nanoparticules d'oxyde de fer, et plus particulièrement la maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) seront celles que nous retiendrons car elles présentent des propriétés de biocompatibilité intéressantes pour des applications en biologie et des potentialités d'hyperthermie magnétique.

Après avoir caractérisé ces nanoparticules, l'élaboration des nanoassemblages sera exposée. Leurs propriétés photophysiques seront présentées à travers l'étude des différents composés constituant les nanoassemblages, à savoir le cœur fluorescent, la coquille magnétique et le polyélectrolyte et l'influence de leur modification.

Enfin, après une courte introduction sur le magnétisme à l'échelle nanométrique et un rappel sur les principaux types de mesures magnétiques, l'examen des propriétés magnétiques des nanoassemblages sera réalisé, en s'intéressant à l'influence des mêmes facteurs que précédemment, à savoir le cœur fluorescent, la coquille magnétique et le polyélectrolyte.

IV.2. Synthèse et caractérisations de nanoparticules magnétiques

Les nanoparticules (NPs) magnétiques sont largement utilisées dans de nombreux domaines, comme encres magnétiques pour les billets de banque ou encore comme fluides magnéto-rhéologiques dans les amortisseurs de voiture.²⁰⁸ Mais elles sont également exploitées dans le domaine médical où leur rôle a été exposé au chapitre 1. Il en existe de différents types mais nous n'aborderons que celles retenues dans le cadre de ces travaux de thèse, à savoir la maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) en raison de sa biocompatibilité. Nous nous attacherons dans un premier temps à décrire comment elles ont été synthétisées au laboratoire. Ensuite, nous définirons les propriétés magnétiques de ces NPs.

IV.2.1. Présentation et fabrication de nanoparticules magnétiques

La maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, constituée exclusivement d'ions fer(III), peut être obtenue par oxydation de la magnétite Fe_3O_4 , composée d'ions fer(II) et fer(III).²⁰⁹ De manière à obtenir un système chimiquement stable dans le temps, nous avons sélectionné la maghémite en tant que matériau pour les NPs développées dans cette thèse. Leurs structures cristallographiques sont présentées ci-après (Figure 96). La maghémite cristallise dans une structure spinelle avec une constante de réseau $a = 8,33 \text{ \AA}$.²¹⁰ Sa maille est constituée de 16 sites octaédriques et 8 sites tétraédriques. Si la totalité de ses sites tétraédriques est occupée par les cations Fe(III) , ceux-ci n'occupent que 40/3 des sites octaédriques. En effet, les 8/3 restants sont des lacunes.²¹⁰ Par conséquent, la formule cristallographique de la maghémite est : $(\text{Fe}^{3+})_8[\text{Fe}^{3+}_{5/6}\square_{1/6}]_{16}\text{O}_{32}$, où \square représente les lacunes, $()$ désigne les sites tétraédriques et $[\]$ représente les sites octaédriques.

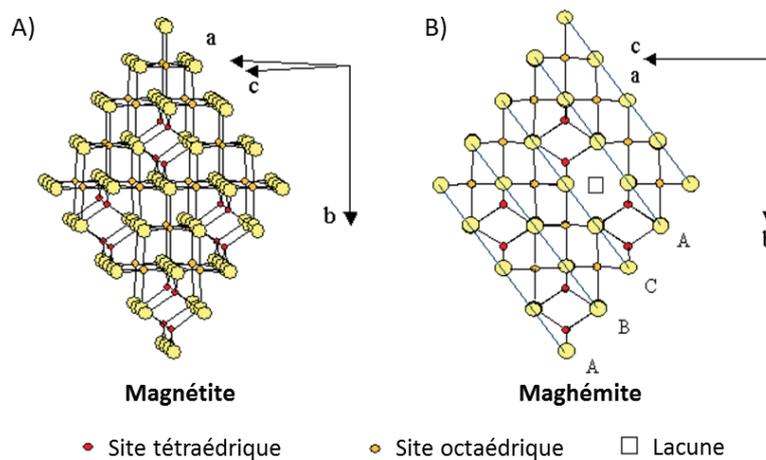
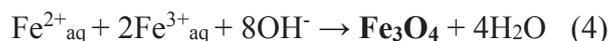


Figure 96 : Structures cristallographiques de A) la magnétite et B) de la maghémite.

Les NPs de maghémite sont usuellement synthétisées par co-précipitation d'ions ferriques Fe(III) et ferreux Fe(II) en milieu basique en adaptant la procédure connue de R. Massart²¹¹ et en respectant les proportions stoechiométriques, sans quoi un déficit en ions Fe(II) favorise la formation ultérieure de bâtonnets d'hématite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). La première étape de synthèse forme de la magnétite selon la réaction d'équation (4).²¹² La magnétite formée peut être utilisée ainsi.

Mais elle peut aussi être oxydée en maghémite à chaud en présence de nitrate de fer (III) et d'acide nitrique, selon la réaction d'équation (5).



Les NPs résultantes sont conservées dans l'acide nitrique dilué pour assurer leur stabilité. En effet, il existe deux gammes de pH pour lesquelles les NPs d'oxyde de fer sont stables : à pH acide entre 1 et 3,5 et à pH basique entre 9 et 11 (Figure 97).

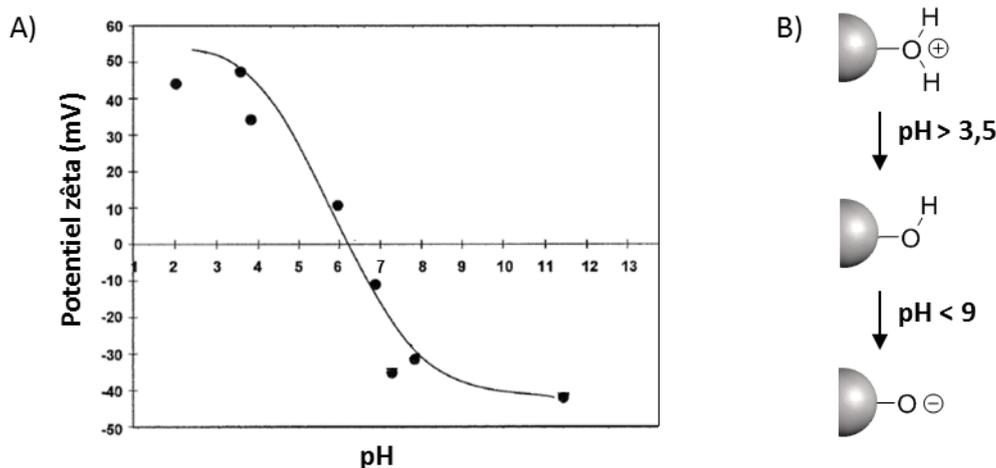


Figure 97 : A) Plage de stabilité colloïdale des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer en fonction du pH, traduite en termes de potentiel zêta. B) Représentation schématique des structures de ces nanoparticules en fonction du domaine de pH.

Contrairement aux autres types de synthèse, comme la décomposition thermique ou la voie polyols, la co-précipitation ne fait appel à aucun surfactant ou solvant qui pourrait induire une toxicité et permet d'obtenir des NPs hydrophiles.^{209,212} La stabilisation s'effectue grâce à l'utilisation de contre-ions de type nitrate NO_3^- ou chlorate ClO_4^- si les NPs sont en milieu acide (forme $-\text{OH}_2^+$), ou de type tétraméthylammonium (TMA^+) ou $(\text{alkyl})_n\text{N}^+$ si les conditions sont basiques (forme $-\text{O}^-$).²¹³ Les NPs disposent de ligands très labiles qui permettent aisément de les fonctionnaliser et de les greffer à d'autres entités par simple échange de ligands.

Après synthèse, un tri en taille est effectué pour diminuer la polydispersité des systèmes. Ce tri repose sur des différences de force ionique.²¹⁴ A force ionique élevée, les charges des NPs qui assurent leur stabilité par répulsion électrostatique sont écrantées, ce qui mène à leur précipitation. Le procédé de tri en taille est schématisé ci-après (Figure 98). Différents types d'agents déstabilisants peuvent être utilisés, comme des solvants organiques ou des sels. Ici, l'acide nitrique a été choisi de manière à éviter toute pollution par un autre composé. La force ionique à appliquer pour induire la déstabilisation des NPs dépend de leur taille. Ainsi, différents volumes en acide sont ajoutés à chaque étape du tri et les NPs les plus grosses précipitent tandis que les plus petites restent dans le surnageant.²¹² Cette séparation est accélérée et améliorée en effectuant une décantation magnétique. La caractérisation des différentes populations de NPs magnétiques obtenues est développée ci-après.

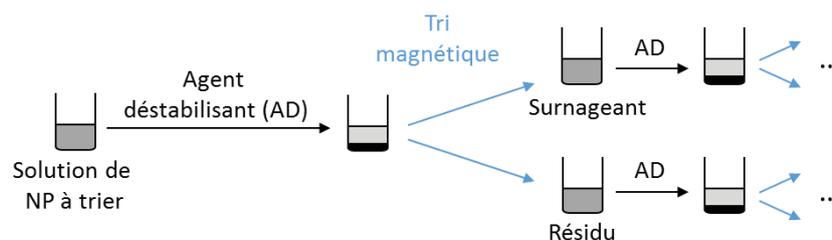


Figure 98 : Schéma explicatif du procédé de tri en taille reposant sur l'ajout d'un agent déstabilisant permettant de floculer la solution de nanoparticules à trier, suivi d'un tri magnétique permettant d'isoler un résidu (plus grosses particules) et un surnageant (moins grosses particules). Le schéma complet du tri en taille permettant d'obtenir les NPs magnétiques synthétisées dans le cadre de ces travaux de thèse est présenté en partie expérimentale (chapitre 6).

IV.2.2. Caractérisations structurales de nanoparticules magnétiques

Avant toute utilisation pour élaborer des nanoassemblages hydrides, les NPs magnétiques synthétisées doivent être caractérisées en termes de géométrie et de stabilité colloïdale.

Pour les NPs « nues » obtenues après synthèse, la microscopie électronique en transmission révèle des NPs sphériques de diamètre allant de 5,6 à 17,4 nm avec une faible polydispersité. Les images MET ainsi que les diamètres correspondants sont montrés ci-après (Figure 99). Les fractions contenant des NPs agrégées ou de taille trop importante ont été écartées.

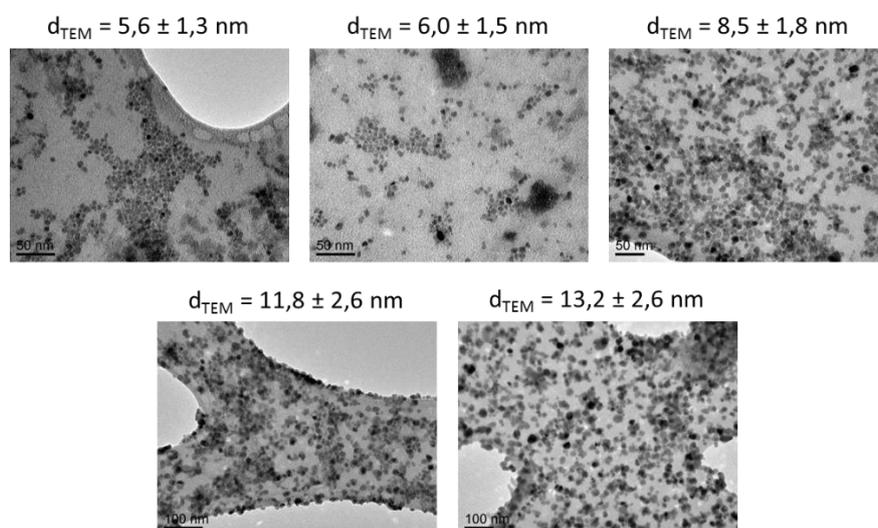


Figure 99 : Images MET de nanoparticules d'oxyde de fer de différentes tailles diluées dans l'éthanol et déposée sur grille de cuivre recouverte de carbone.

Avant que cette synthèse ne soit maîtrisée, le laboratoire utilisait des NPs magnétiques de 8 nm de diamètre MET fournies par le Dr. Jérôme Fresnais du laboratoire PECSA (UMR CNRS 7195, Sorbonne Université). Depuis, le laboratoire CEISAM a été en mesure de synthétiser lui-même ses propres NPs magnétiques. Ainsi, des NPs d'environ 13 nm de diamètre ont été obtenues et seront désormais appelées **mag₁₃**. En revanche, pour les NPs de 8 nm de diamètre, nous avons conservé celles du PECSA et les avons appelées **mag₈**. L'intérêt porté à l'utilisation

de deux tailles différentes est motivée par le fait que les performances magnétiques des NPs magnétiques augmentent avec leur taille.

Ces NPs ont ensuite été recouvertes de polyélectrolyte pour appréhender leur comportement une fois assemblées sous forme de nanomatériaux magnéto-fluorescents, eux-mêmes stabilisés par un polyélectrolyte après fabrication. Pour ces mesures, le **PAA** (acide polyacrylique) a été choisi car c'est un polyélectrolyte modèle, largement accessible commercialement. Des images MET de ces nanoparticules sont présentées ci-après (Figure 100). Leurs caractérisations structurales sont rassemblées dans le tableau ci-après (Tableau 29).

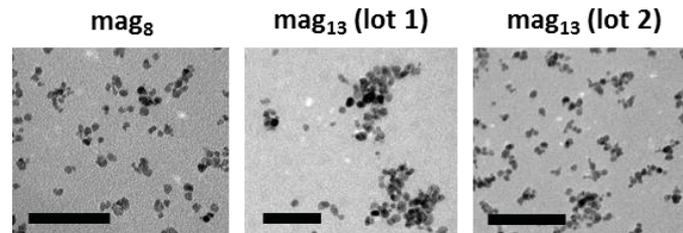


Figure 100 : Clichés MET de nanoparticules d'oxyde de fer libres de différentes tailles (8 et 13 nm) recouvertes de **PAA**, diluées dans l'eau et déposées sur grille de cuivre. Echelle : 100 nm.

Tableau 29 : Caractérisations structurales de nanoparticules d'oxyde de fer **mag₈** et **mag₁₃** dans l'eau et recouverte de **PAA**. Les lots 1 et 2 correspondent à des NPs **mag₁₃** obtenues à l'issue de deux synthèses différentes.

mag	d_{MET} (σ)^(a) (nm)	d_H (PDI)^(b) (nm)	ζ^(c) (mV)
mag₈	7,9 (0,21)	29 (0,172)	-36
mag₁₃ (lot 1)^(d)	13,2 (0,20)	59 (0,235)	-35
mag₁₃ (lot 2)^(e)	12,5 (0,21)	60 (0,143)	-45

^(a) Diamètre MET d_{MET} obtenu par une distribution en taille sur environ 300 nanoparticules magnétiques modélisée par une loi log normale. σ est l'écart type de la population. ^(b) Diamètre hydrodynamique d_H obtenu par mesure DLS. PDI est l'indice de polydispersité de la population. ^(c) Potentiel zêta ζ . ^(d) Le lot 1 a été utilisé lors de l'étude de l'effet de la taille des NPs sur les propriétés magnétiques et de relaxation des nanoassemblages (résultats présentés ci-après dans ce chapitre). ^(e) Le lot 2 a été utilisé pour les expériences de libération contrôlée médiée par hyperthermie magnétique (ces résultats sont présentés dans le chapitre suivant).

De manière générale, le diamètre hydrodynamique des NPs est 4 fois plus élevé que celui obtenu par MET. Cette augmentation est attribuée à la présence d'une couche de solvation autour des NPs. La stabilité électrostatique des NPs est efficacement assurée comme en témoignent les valeurs de potentiel zêta avec des valeurs $\zeta \leq -35$ mV. Elles peuvent donc être utilisées pour former des nanoassemblages hybrides. On peut également remarquer que les diamètres hydrodynamiques et MET des deux lots de **mag₁₃** sont équivalents.

IV.3. Formation et caractérisation de nanoassemblages hybrides

Dans cette partie seront présentées la méthode de fabrication des assemblages hybrides magnéto-fluorescents développés au laboratoire et leurs caractérisations. Les assemblages visés seront de type cœur-coquille, avec un cœur de molécules organiques fluorescentes auto-assemblées (FON) et une coquille magnétique de nanoparticules d'oxyde de fer.

IV.3.1. Procédé de fabrication de nanoassemblages hybrides

Comme pour les FONs, la fabrication de nanoassemblages hybrides magnéto-fluorescents, notés FONmag, repose sur un procédé de nano-précipitation. La cohésion entre le cœur organique et la coquille inorganique est assurée par la présence, dans la structure des fluorophores, de fonctions chélatant les ions Fe(III), comme les acides phosphoniques ou les acides carboxyliques. Les fluorophores retenus sont donc **fpOH**, **9** et **18** pour leur unité acide phosphonique, et **6** et **22** pour leur unité acide carboxylique.

Une solution de fluorophores préalablement dissous dans un solvant miscible à l'eau comme le THF (50 μL , 1,45 mmol.L^{-1}) est nano-précipitée dans une solution de NPs d'oxyde de fer (2,5 mL, 0,006 g.L^{-1} soit 0,11 mmol.L^{-1} dans HNO_3 , pH = 1,4). Ce protocole est schématisé ci-après (Figure 101A). Comme le montre le cliché MET (Figure 101B), des nanoassemblages FONmag présentant une coquille de NPs magnétiques sont obtenus. Différentes images et des mesures photophysiques nous ont amenés à avancer le fait que la formation des FONs est plus rapide que la complexation des NPs magnétiques, d'où la structure cœur-coquille et non une inclusion de NPs magnétiques dans le cœur organique.

La concentration de la solution en NPs d'oxyde de fer avait été optimisée au préalable au laboratoire.¹⁰⁴ En effet, il a été observé que la taille des nanoassemblages diminuait avec la concentration en fer ($d_H = 750 \text{ nm}$ à 0,001 g.L^{-1} , $d_H = 100 \text{ nm}$ à 0,006 g.L^{-1}) jusqu'à atteindre un palier d'une valeur de $d_H = 100 \text{ nm}$ pour des valeurs supérieures à 0,1 g.L^{-1} . L'hypothèse émise repose sur le processus de formation des FONs par nucléation-agrégation. En effet, en présence d'un grand nombre de NPs magnétiques, la probabilité que les nuclei ont de se rencontrer et de croître rapidement est plus faible, d'où des tailles finales pour les assemblages de plus en plus petites lorsque la concentration en fer augmente. Or, comme décrit au chapitre 1, un diamètre entre 30 et 200 nm est idéal pour des utilisations *in vivo*. C'est pourquoi l'obtention de nanoassemblages avec un diamètre hydrodynamique autour de 100 nm nous a amené à fixer une concentration en NPs magnétiques de 0,006 g.L^{-1} .

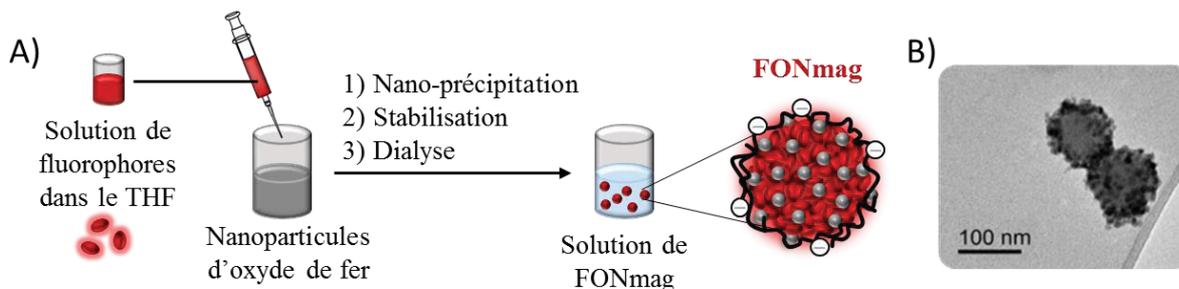


Figure 101 : A) Schéma de synthèse des nanoassemblages hybrides magnéto-fluorescents. B) Image MET des nanoassemblages résultants.

Vient ensuite l'étape de stabilisation des assemblages, cruciale pour éviter l'agrégation des NPs, la dégradation du fluorophore par l'acide nitrique et favoriser le transfert vers une solution de pH neutre compatible avec les milieux biologiques. La stabilisation s'effectue par ajout subséquent à la solution de FONmag de petites molécules ou de polyélectrolyte, choisis de manière à s'adsorber en surface des nanoassemblages sans pour autant les détruire. Il est essentiel de disposer d'une bonne stabilité du lien coquille-agent stabilisant. Par exemple, un polyélectrolyte sera plus stabilisant que des petites molécules de citrate ou d'acide folique, qui, elles, sont relarguées de la surface de l'assemblage au bout de quelques jours, induisant une destruction progressive de l'édifice.^{67,159} C'est pourquoi des polyélectrolytes ont été choisis en tant qu'agents stabilisants. Cependant, il faut que la stabilité du lien cœur-coquille soit supérieure à celle du lien coquille-polyélectrolyte. Il a été observé que si le lien cœur-coquille reposait sur un acide carboxylique et le lien coquille-polyélectrolyte sur un acide phosphonique plus complexant, la plus grande force de l'acide phosphonique impliquait une destruction directe de l'édifice.⁷⁸ Le même phénomène est observé si les liens sont tous les deux basés sur des acides phosphoniques.

Dans ce manuscrit, différents polyélectrolytes sont utilisés. Leurs structures (Figure 102) ainsi que leurs caractéristiques (Tableau 30) sont présentées ci-après. L'acide polyacrylique (**PAA**) utilisé pour ces travaux est un petit polymère fréquemment utilisé pour sa forte affinité pour les oxydes de fer²¹⁵, sa faible toxicité²¹⁶, sa disponibilité commerciale et son faible prix. De plus, il présente uniquement des unités carboxylates et est donc un modèle de comparaison adéquat avec d'autres polymères de structures plus complexes. D'autres polymères possédant des unités polyéthylène glycol en plus des carboxylates ont été synthétisés par Julien Poly de l'IS2M (Institut de Science des Matériaux de Mulhouse) et seront par la suite appelés **PAAPEG** et **PAAPEG_{RAFT}**. Pour rappel, ces fonctions PEG permettent d'augmenter la furtivité du nanoassemblage *in vivo*. **PAAPEG_{RAFT}** a la particularité d'avoir été synthétisé par polymérisation radicalaire contrôlée RAFT (en anglais, reversible addition-fragmentation chain transfer) et présente ainsi une fonction terminale hydrophobe dont l'importance sera discutée ultérieurement. Expérimentalement, le polymère est ajouté à la solution acide de nanoassemblages obtenue. Les masses ajoutées, de 5 mg pour **PAA** et de 15-20 mg pour **PAAPEG** et **PAAPEG_{RAFT}**, ont été préalablement optimisées au laboratoire pour obtenir des systèmes stables. En effet, une trop faible masse de polymère ne permet pas de maintenir la stabilité des assemblages et une masse trop importante conduit à une consommation élevée et inutile en polymères.

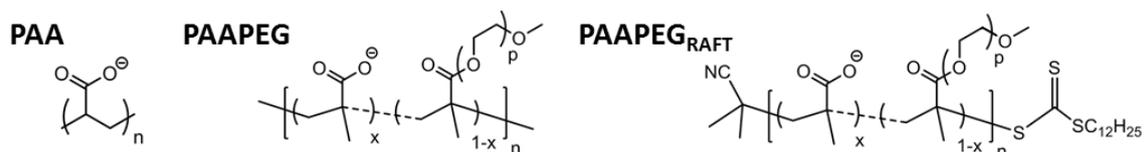


Figure 102 : Structure des polyélectrolytes utilisés comme agents stabilisants dans ce manuscrit.

Tableau 30 : Propriétés des polyélectrolytes utilisés comme agents stabilisants dans ce manuscrit.

Polyélectrolyte	$M_w^{(a)}$ ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	IP ^(b)	n ^(c)	p ^(c)	x ^(d) (%)	[COO ⁻] ^(e) (M)
PAA	$1,8\cdot 10^3$	n.r.	24	0	100	$1,9\cdot 10^{-3}$
PAAPEG	$10,9\cdot 10^4$	1,87	30	43	78	$6,7\cdot 10^{-3}$
PAAPEG _{RAFT}	$5,19\cdot 10^4$	1,30	30	43	80	$6,7\cdot 10^{-3}$

^(a) M_w est la masse molaire moyenne en poids. ^(b) IP est l'indice de polydispersité. ^(c) n et p sont les degrés de polymérisation des chaînes principales et latérales, respectivement. ^(d) x représente la fraction molaire des unités carboxylates de la chaîne principale. ^(e) [COO⁻] est la concentration en unités carboxylates ajoutées à la solution de nanoassemblages.

Ensuite, l'augmentation du pH de la solution par ajout d'ammoniaque jusqu'à une valeur de 9 permet de neutraliser l'acide nitrique et de déprotoner les acides carboxyliques des polymères pour accroître leur affinité avec les NPs d'oxyde de fer en surface. Enfin, une étape de dialyse permet d'éliminer le polymère stabilisant en excès et de neutraliser progressivement la solution jusqu'à un pH de 7, à l'aide de membranes présentant un seuil de coupure adapté aux masses molaires des polymères, 6-8 kDa pour le PAA et 300 kDa pour PAAPEG et PAAPEG_{RAFT}.

IV.3.2. Propriétés structurales et photophysiques de nanoassemblages hybrides

Le procédé de synthèse repose sur le mélange à façon d'entités constituant le nanoassemblage. Différentes combinaisons fluorophore - particule magnétique - polymère peuvent être testées pour obtenir le système le plus performant en termes de propriétés photophysiques, magnétiques et de furtivité pour l'*in vivo*.

Dans ce manuscrit, les combinaisons seront limitées à différents types de cœur pour obtenir une brillance élevée (acides phosphoniques **fpOH**, **18**, **9** et acides carboxyliques **6**, **22**). Pour disposer de propriétés magnétiques plus importantes, deux tailles de nanoparticules d'oxyde de fer seront testées (**mag₈** et **mag₁₃**). Enfin, trois polyélectrolytes (PAA, PAAPEG et PAAPEG_{RAFT}) seront envisagés pour contrôler la biodistribution des nanoassemblages.

L'influence de la nature des différents constituants sur les propriétés structurales et photophysiques des nanoassemblages résultants est alors étudiée.

IV.3.2.1. Influence du cœur fluorescent

Dans cette partie, on s'attachera à étudier l'influence du cœur fluorescent, en termes de brillance et de taille des cœurs, à l'aide du polyélectrolyte modèle **PAA** et des NPs d'oxyde de fer **mag₈**. Différents types de fluorophores présentant des fonctions chélatantes acides phosphoniques (**fpOH**, **9** et **18**) et carboxyliques (**6** et **22**) seront utilisés. Les assemblages résultants seront notés **fpOH-FONmag**, **9-FONmag**, **18-FONmag**, **6-FONmag** et **22-FONmag** respectivement (Tableau 31).

Tableau 31 : Présentation des systèmes utilisés dans l'étude de l'influence du cœur fluorescent.

Nom	Cœur fluorescent	Coquille magnétique	Polyélectrolyte
fpOH-FONmag	fpOH	mag ₈	PAA
9-FONmag	9		
18-FONmag	18		
6-FONmag	6		
22-FONmag	22		

D'un point de vue général, comme le montrent les clichés MET, des nanoassemblages sphériques sont formés quelle que soit la nature du cœur fluorescent (Figure 103). Leurs tailles s'avèrent relativement homogènes. À la première impression, il semblerait que les assemblages **6-FONmag** et **22-FONmag** soient légèrement moins recouverts de NPs d'oxyde de fer en raison du pouvoir moins complexant des unités carboxyliques par rapport à celui des unités phosphoniques.

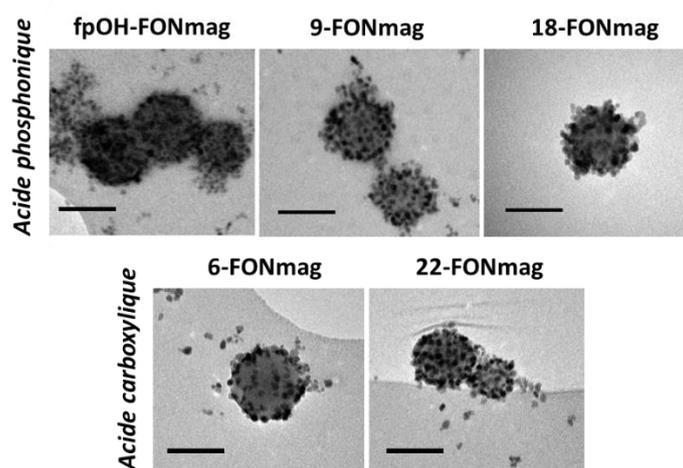


Figure 103 : Clichés de microscopie électronique à transmission (MET) des différents nanoassemblages FONmag constitués d'une coquille de **mag₈** et stabilisés par le polyélectrolyte **PAA**. Comparaison des nanoassemblages obtenus à partir de fluorophores contenant soit un acide phosphonique (haut) soit un acide carboxylique (bas). Echelle : 100 nm.

Intéressons-nous maintenant plus en détails aux caractérisations structurales des nanoassemblages, répertoriées ci-après (Tableau 32). Les nanoassemblages obtenus à partir

d'acides carboxyliques présentent un diamètre MET plus élevé, autour de 91 nm, contre 75 nm pour ceux comportant des acides phosphoniques. Une telle différence, observée précédemment pour les FONs (36-95 nm contre 26-30 nm), corrobore le mécanisme de précipitation, où les FONs se forment d'abord, avant d'être complexées et recouvertes de NPs magnétiques. La taille de l'assemblage est donc imposée par celle des FONs. Ainsi, le composé **22**, plus hydrophobe en raison de la présence des chaînes alkyles et formant des FONs plus grosses, parvient à générer des assemblages hybrides de taille allant jusqu'à 95 nm.

Globalement, des valeurs absolues de potentiel zêta plus élevées sont obtenues pour les nanoassemblages hybrides ($\zeta \sim -44$ mV) par rapport aux FONs ($\zeta \sim -34$ mV), grâce à la forte densité en ions carboxylates du **PAA**. Les valeurs de potentiel zêta ainsi que celles des diamètres hydrodynamiques ($d_H \sim 165$ nm) et d'indice de polydispersité ($PDI \leq 0,208$) indiquent que les FONmag forment des solutions colloïdales stables. Le potentiel zêta légèrement moins négatif obtenu pour **6-FONmag** comparé à celui des autres assemblages est à relier au recouvrement moins important en NPs d'oxyde de fer observé sur les images MET, induisant à son tour une adsorption moindre de chaînes PAA.

Tableau 32 : Propriétés structurales des nanoassemblages hybrides FONmag et des FONs correspondantes en fonction de la nature du fluorophore.

FONmag	d_{MET} (σ) (nm)	d_H (PDI) (nm)	ζ (mV)	FON	d_{MET} (σ) (nm)	ζ (mV)
9-FONmag	72 (0,15)	161 (0,157)	- 44	9-FON	26 (0,21)	- 27
fpOH-FONmag	78 (0,22)	167 (0,190)	- 44	fpOH-FON	28 (0,17)	- 33
18-FONmag	76 (0,17)	168 (0,190)	- 45	18-FON	30 (0,16)	- 32
6-FONmag	86 (0,28)	164 (0,197)	- 35	6-FON	36 (0,24)	- 40
22-FONmag	95	169 (0,208)	- 47	22-FON	95 (0,29)	- 39

La Figure 104 présente les spectres d'extinction (absorption et diffusion) et d'émission des FONmag ainsi que leurs déclin de fluorescence. D'un point de vue global, les spectres d'extinction présentent les deux bandes d'absorption à 420 nm et 350 nm, caractéristiques des fluorophores constituant le cœur fluorescent. La déformation de ces bandes par l'augmentation constante de l'absorbance avec l'énergie résulte de la contribution des NPs d'oxyde de fer.²¹⁷ Les spectres d'émission, quant à eux, suivent la même tendance que celle observée pour les FONs, à savoir une seule bande caractéristique du cœur fluorescent. Toutefois, un décalage hypsochrome de l'émission d'environ 10 nm en présence de NPs magnétiques peut souvent être noté (Tableau 33). Nous n'avons pas d'explication catégorique à ce sujet mais pouvons supposer que les effets de polarité liés à l'eau sont modifiés en raison de la couche de NPs magnétiques remplaçant et repoussant les molécules d'eau à la surface des FONs. Le déplacement de Stokes toujours élevé autour de 6000-7000 cm^{-1} permettra d'obtenir un signal fluorescent se détachant nettement de celui des fluorophores endogènes au cours des observations *in cellulo* en microscopie de fluorescence.

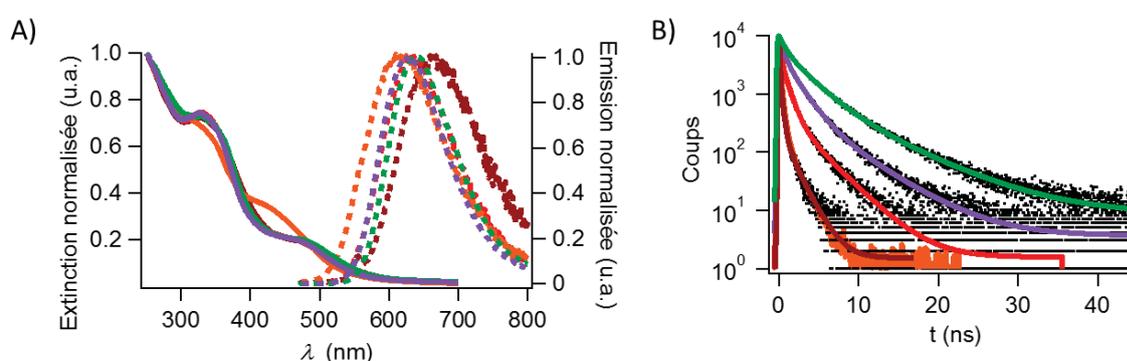


Figure 104 : A) Spectres d'extinction (traits pleins) et d'émission (traits pointillés) des nanoassemblages FONmag dans l'eau en fonction de la nature des fluorophores : **fpOH** (orange), **9** (rouge), **18** (bordeaux), **6** (violet) et **22** (vert). Excitation à 465 nm. B) Déclin de fluorescence après modélisation. Excitation à 450 nm, détection à 645 nm.

Les rendements quantiques de fluorescence des FONmag sont inférieurs à ceux des FONs correspondantes (Tableau 33). Une diminution d'un facteur 3-4 est constatée pour **9** (3-0,7%), **fpOH** (1-0,3%), **6** (11-3,0%) et **22** (18-4,7%) et d'un facteur 100 pour **18** (10%-0,1%). Ces différences sont dues à des transferts d'électrons photoinduits, en compétition avec la fluorescence, vers les NPs d'oxyde de fer, induisant une extinction partielle de l'émission.²¹⁸ Bien que plus faible par rapport à celle des FONs ($3 \cdot 10^7 - 2 \cdot 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), la brillance des FONmag ($2 \cdot 10^6 - 7 \cdot 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) reste encore très élevée et les rend tout à fait adéquats pour des utilisations en bio-imagerie.

Tableau 33 : Propriétés photophysiques des nanoassemblages hybrides et des FONs correspondant en fonction de la nature du fluorophore.

FONmag	Φ_f ^(a) (%)	Brillance (λ) ^(b) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	τ_i (f_i) ^(c) (ns)	$\langle\tau_s\rangle$ ^(d) (ns)
9-FONmag	0,7	1.10 ⁷	329; 460	635	3,2 (22%); 0,8 (50%); 0,1 (28%)	1,1
fpOH-FONmag	0,3	9.10 ⁶	312; 423	615	2,04 (4,5%); 0,56 (22,5%); 0,16 (30%); 0,02 (43%)	0,3
18-FONmag	0,1	2.10 ⁶	327; 465	666	1,56 (10%); 0,28 (24%); 0,03 (66%)	0,24
6-FONmag	3,0	5.10 ⁷	327; 460	627	5,0 (22%); 1,7 (58%); 0,4 (20%)	2,2
22-FONmag	4,7	7.10 ⁷	330; 470	640	6,9 (30%); 2,8 (57%); 0,7 (13%)	3,8

FON	Φ_f ^(a) (%)	Brillance (λ) ^(b) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	τ_i (f_i) ^(c) (ns)	$\langle\tau_s\rangle$ ^(d) (ns)
9-FON	3	4.10 ⁷	334; 468	645	4,6 (29%) ; 1,2 (49%); 0,2 (22%)	2,0
fpOH-FON	1	3.10 ⁷	333; 440	602	1,43 (10%); 0,55 (40%); 0,18 (40%); 0,03 (10%)	0,4
18-FON	10	2.10 ⁸	333; 486	666	1,8 (14%); 0,3 (35%); 0,05 (51%)	0,4
6-FON	11	2.10 ⁹	333; 466	637	6,4 (30%); 2,5 (53%); 0,7 (17%)	3,4
22-FON	18	3.10 ⁸	344; 475	643	9,0 (29%); 3,9 (58%); 1,1 (13%)	5,0

^(a) Rendement quantique de fluorescence Φ_f calculé par rapport à la coumarine 540A dans l'éthanol ($\Phi_f = 0,38$). ^(b) Brillance calculée à $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ à partir de la relation Brillance = $N_{\text{fluorophores}} \cdot \epsilon_{\text{lioluène}} \cdot \Phi_f$, assemblages avec $N_{\text{fluorophores}} = 10^5$ par FON. ^(c) Composantes τ_i et leurs proportions f_i en intensité, obtenues après modélisation par une loi exponentielle du déclin de fluorescence mesuré à 645 nm après excitation à 450 nm. ^(d) Moyenne des temps de vie $\langle\tau_s\rangle$ calculée à partir des τ_i (f_i).

On peut noter que les temps de vie et les rendements quantiques de fluorescence sont plus faibles pour les FONmag à base d'acides phosphoniques. Ceci corrobore les résultats obtenus avec les FONs et s'accorde avec la plus grande densité de NPs magnétiques observée sur les clichés MET, entraînant, de ce fait, une extinction marquée de l'émission.

Mis à part **fpOH-FONmag**, les déclins de fluorescence de tous les nanoassemblages sont modélisés par des lois tri-exponentielles. En comparant les **FONmag** aux **FON**, on peut noter une diminution globale des constantes de temps de l'état excité, due à la présence de la coquille magnétique, tout en conservant leurs proportions relatives. Les NPs jouent donc globalement un rôle d'écran de la fluorescence des FONs sans en modifier la structure. De plus, un calcul des constantes de vitesse pour la désexcitation radiative par fluorescence k_f et pour la désexcitation non radiative k_{nr} donne des valeurs de k_f autour de 0,009 et de k_{nr} autour de 1,816. Ces données prouvent, une fois de plus, que la voie non radiative a une part prépondérante dans le processus de désexcitation.

IV.3.2.2. Influence de la taille des nanoparticules d'oxyde de fer

Dans cette partie, l'influence de la taille des NPs magnétiques est étudiée sur des assemblages composés du cœur fluorescent **9** et du polymère **PAA**. Deux tailles de NPs magnétiques sont considérées : **mag₈** et **mag₁₃** (lot 1). On notera ces assemblages **FONmag₈** et **FONmag₁₃** respectivement (Tableau 34).

Tableau 34 : Présentation des systèmes utilisés dans l'étude de l'influence de la taille des nanoparticules magnétiques.

Nom	Cœur fluorescent	Coquille magnétique	Polyélectrolyte
FONmag₈	9	mag ₈	PAA
FONmag₁₃		mag ₁₃ (lot 1)	

Les images MET fournissent de jolis assemblages dans les deux cas (Figure 105).

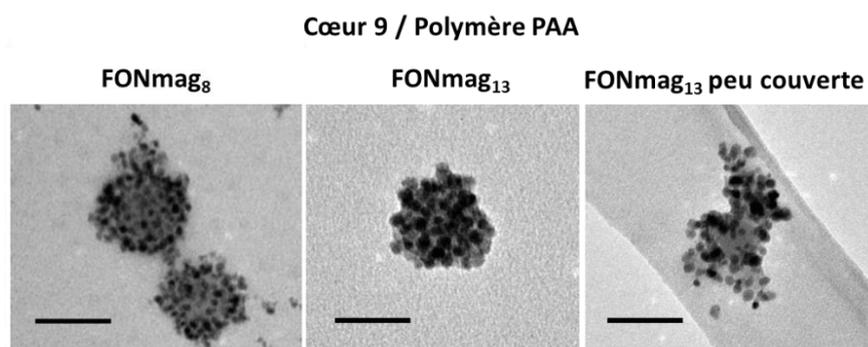


Figure 105 : Clichés de microscopie électronique à transmission (MET) des nanoassemblages avec des nanoparticules de 8 et 13 nm plus ou moins bien recouvertes. Echelle : 100 nm.

Un examen du diamètre obtenu par MET (Tableau 35) révèle des dimensions similaires autour de 70 nm d'un assemblage à l'autre. La taille des **mag₈** engendre sans doute l'obtention de plusieurs couches de NPs magnétiques en surface du FON, ce qui s'avère peut être impossible avec des NPs plus grosses. Cette hypothèse est confortée par l'observation de photos MET qui dévoilent la présence d'une autre population de **FONmag₁₃** (Figure 105), au cœur fluorescent moins recouvert de **mag₁₃**. De nouveau, le PDI ($PDI \leq 0,185$) et le potentiel zêta ($\zeta \leq -44$ mV) des deux types d'assemblage démontre la grande stabilité des solutions colloïdales.

Concernant les propriétés photophysiques, la nature du cœur fluorescent n'étant pas modifiée, il est logique d'observer des spectres d'extinction et d'émission quasiment identiques (Figure 106) et des tendances similaires dans les proportions des trois composantes des déclinés de fluorescence. Les valeurs plus élevées du rendement quantique de fluorescence et du temps de vie moyen pour **FONmag₁₃** confirment une moindre présence des NPs d'oxyde de fer, responsables de l'extinction de fluorescence. Cette observation est confirmée par la mesure de la concentration en fer [Fe] par ICP-AES (Tableau 35), qui montre que la concentration en fer de **FONmag₈** est environ 4 fois plus élevée que celle de **FONmag₁₃**.

Tableau 35 : Propriétés structurales et photophysiques des nanoassemblages avec différentes tailles de nanoparticules magnétiques.

FONmag	d_{MET} (σ)	d_{H} (PDI) (nm)	ζ (mV)	[Fe] (mM)	$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ (nm)	$\Phi_f^{(a)}$ (%)	$\tau_i (f_i)^{(b)}$ (ns)	$\langle \tau_s \rangle^{(c)}$ (ns)
FONmag ₈	72 (0,15)	161 (0,157)	-44	0,66	329; 460	635	0,7	3,2 (22%); 0,8 (50%); 0,1 (28%)	1,1
FONmag ₁₃	70 (0,13)	182 (0,185)	-46	0,16	329; 460	632	1,0	3,4 (26%) ; 1,0 (52%); 0,2 (22%)	1,4

^(a) Rendement quantique de fluorescence Φ_f calculé par rapport à la coumarine 540A dans l'éthanol ($\Phi_f = 0,38$). ^(b) Composantes τ_i et leurs proportions f_i en intensité, obtenues après modélisation par une loi exponentielle du déclin de fluorescence mesuré à 645 nm après excitation à 450 nm. ^(c) Moyenne des temps de vie $\langle \tau_s \rangle$ calculée à partir des $\tau_i (f_i)$.

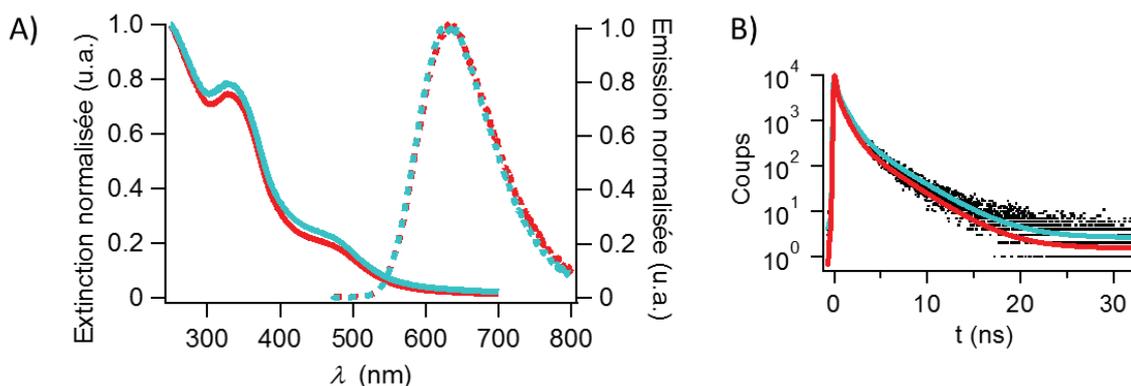


Figure 106 : A) Spectres d'extinction (traits pleins) et d'émission (traits pointillés) des nanoassemblages dans l'eau en fonction de la taille des nanoparticules magnétiques : **mag₈** (rouge) et **mag₁₃** (bleu). Excitation à 465 nm. B) Déclins de fluorescence après modélisation. Excitation à 450 nm, détection à 645 nm.

IV.3.2.3. Influence du polymère stabilisant

Dans cette partie, il s'agit d'étudier l'impact de la nature du polyélectrolyte sur les propriétés des nanoassemblages basés sur un cœur fluorescent **fpOH** et des NPs **mag₈**. Trois polymères présentant différentes structures (**PAA**, **PAAPEG**, **PAAPEG_{RAFT}**) seront étudiés et les assemblages résultants seront appelés **FONmag-PAA**, **FONmag-PAAPEG** et **FONmag-PAAPEG_{RAFT}** respectivement (Tableau 36).

Tableau 36 : Présentation des systèmes utilisés dans l'étude de l'influence de la nature du polyélectrolyte.

Nom	Cœur fluorescent	Coquille magnétique	Polyélectrolyte
FONmag-PAA	fpOH	mag ₈	PAA
FONmag-PAAPEG			PAAPEG
FONmag-PAAPEG_{RAFT}			PAAPEG _{RAFT}

Une fois de plus, les photographies MET (Figure 107) montrent la présence de beaux assemblages. On peut toutefois noter que les NPs d'oxyde de fer sont plus densément rassemblées autour des objets **FONmag-PAAPEG** et **FONmag-PAAPEG_{RAFT}** que dans le cas de **FONmag-PAA**. On remarque également moins de NPs d'oxyde de fer libres pour ces assemblages, comparé à ceux à base de **PAA**. Ceci est dû à l'utilisation de membranes de dialyse de seuil de coupure plus large pour éliminer l'excès de polymères à base de motifs PEG, **PAAPEG** et **PAAPEG_{RAFT}** (MWCO = 300 kDa). La taille de ces pores s'avère suffisamment grande pour laisser passer les NPs magnétiques non complexées, ce qui ne peut avoir lieu pour les membranes utilisées dans le cas du **PAA** (MWCO = 6-8 kDa).

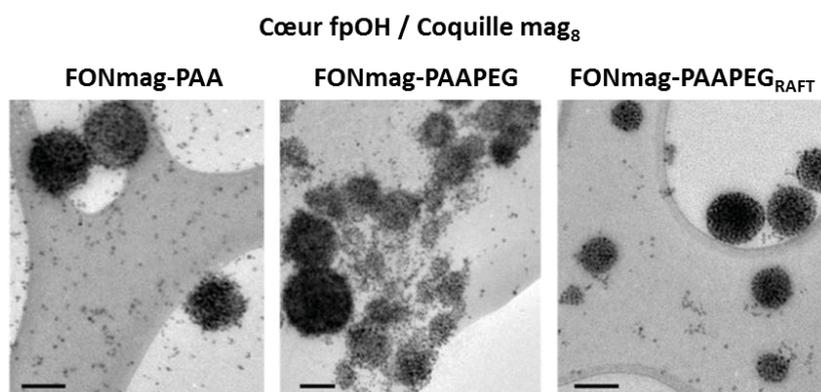


Figure 107 : Clichés de microscopie électronique à transmission (MET) des nanoassemblages **FONmag** avec différents polymères. Echelle : 100 nm.

Les mesures de DLS révèlent des indices de polydispersité tous inférieurs à 0,190 et les potentiels zêta sont inférieurs à -33 mV, prouvant une bonne stabilité colloïdale des systèmes (Tableau 37).

Tableau 37 : Propriétés structurales et photophysiques des nanoassemblages avec différents polymères stabilisants.

FONmag	$d_{\text{MET}} (\sigma)$ (nm)	$d_{\text{H}} (\text{PDI})$ (nm)	ζ (mV)	$\Phi_f^{(a)}$ (%)	$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ (nm)
FONmag- PAA	78 (0,22)	167 (0,190)	- 44	0,3	423	615
FONmag-PAAPEG	91 (0,28)	203 (0,165)	- 33	0,08	428	612
FONmag-PAAPEG _{RAFT}	87 (0,30)	154 (0,107)	- 53	0,02	429	595

^(a) Rendement quantique de fluorescence Φ_f calculé par rapport à la coumarine 540A dans l'éthanol ($\Phi_f = 0,38$).

Les diamètres obtenus par DLS suivent une tendance différente de celle des diamètres MET, tout en restant systématiquement supérieurs à ceux-ci. Cette différence a été attribuée à la présence de la couche de solvation de l'assemblage dans l'eau dont l'épaisseur est d'environ 45 nm pour **FONmag-PAA**, 34 nm pour **FONmag-PAAPEG_{RAFT}** et augmente jusqu'à 56 nm pour **FONmag-PAAPEG**. Il est plus étonnant de noter une diminution du diamètre hydrodynamique pour la couverture des FONmag par le polymère **PAAPEG_{RAFT}**. Nous attribuons cette différence au caractère hydrophobe plus marqué du polymère, dû à la présence de la longue chaîne alkyle de l'agent RAFT, causant une couche compacte à la surface des nanoassemblages et laissant peu d'accès aux molécules d'eau.

Comme dans les autres cas, les spectres d'extinction sont quasiment similaires (Figure 108). L'apparition d'une bande centrée autour de 320 nm, correspondant à l'absorption du chromophore dithioester de l'agent RAFT, confirme la structure du polymère **PAAPEG_{RAFT}**. Le déplacement de Stokes, atteignant les 7000 cm^{-1} , est également appréciablement élevé dans le cas de ces nanoassemblages.

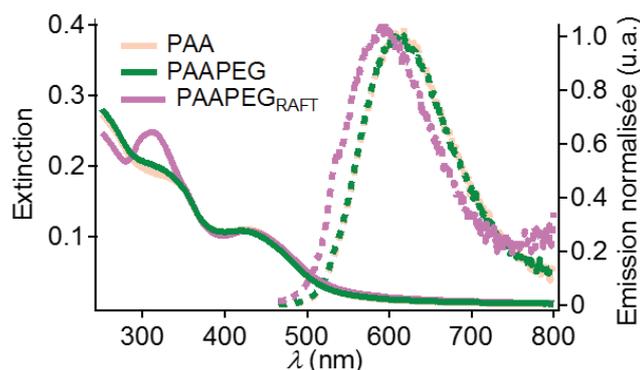


Figure 108 : Spectres d'extinction et d'émission des nanoassemblages dans l'eau en fonction de la nature du polymère stabilisant : **PAA** (beige), **PAAPEG** (vert) et **PAAPEG_{RAFT}** (rose). Excitation à 450 nm.

Si **FONmag-PAA** et **FONmag-PAAPEG** possèdent une émission sensiblement centrée à la même longueur d'onde (612 – 614 nm), un déplacement hypsochrome de l'émission est observé

pour **FONmag-PAAPEG_{RAFT}** à 595 nm. Ce déplacement peut s'expliquer par la présence du résidu hydrophobe de l'agent RAFT sur le polymère qui fait barrière aux molécules d'eau polaires induisant un décalage bathochrome de l'émission. Ces résultats confirment la présence d'une couche de solvation plus restreinte pour **FONmag-PAAPEG_{RAFT}**, comme remarqué précédemment. Une baisse drastique du rendement quantique est observée pour les systèmes avec les polymères PEGylés, notamment pour **FONmag-PAAPEG_{RAFT}** ($\Phi_f = 0,02$ %) et peut s'expliquer par un rassemblement plus dense de NPs magnétiques autour du cœur fluorescent, éteignant en partie l'émission.

Une loi mathématique à quatre exponentielles a été nécessaire pour modéliser les déclin de fluorescence. Les 3 composantes majoritaires sont à peu près identiques pour chaque composé, à savoir $\tau_2 = 0,52-0,57$ ns, $\tau_3 = 0,14-0,16$ ns et $\tau_4 = 0,02-0,03$ ns. La composante de temps long τ_1 diffère entre **FONmag-PAAPEG_{RAFT}** à 1,07 ns et **FONmag-PAA** et **FONmag-PAAPEG** autour de 2 ns et sa contribution est la plus faible avec 1,5-5% du total. La faible valeur observée pour **FONmag-PAAPEG_{RAFT}** prouve le fort lien entre le polymère et l'assemblage par interactions hydrophobes.

Tableau 38 : Déclins de fluorescence après modélisation et leur moyenne pour les FONmag stabilisés avec différents polymères.

FONmag	τ_i (f_i) ^(a) (ns)	$\langle \tau_s \rangle$ ^(b) (ns)
FONmag-PAA	2,04(4,5%); 0,56(22,5%); 0,16(30%); 0,02(43%)	0,28
FONmag-PAAPEG	2,00(5%); 0,57(24,5%); 0,15(26,5%); 0,03(44%)	0,29
FONmag-PAAPEG_{RAFT}	1,07(1,5%); 0,52 (7,5%); 0,14 (13%); 0,02 (78%)	0,09

^(a) Composantes τ_i et leurs proportions f_i en intensité, obtenues après modélisation par une loi exponentielle du déclin de fluorescence mesuré à 600 nm après excitation à 450 nm. ^(b) Moyenne des temps de vie $\langle \tau_s \rangle$ calculée à partir des τ_i (f_i).

Partant des ces observations, une représentation de l'organisation des polymères à la surface des nanoassemblages a été proposée, faisant apparaître la forte densité de NPs obtenues avec le polymère rassembleur **PAAPEG_{RAFT}** qui laisse peu d'accès aux molécules d'eau (Figure 109). Ceci sera d'une importance capitale pour les mesures magnétiques présentées dans la partie suivante.

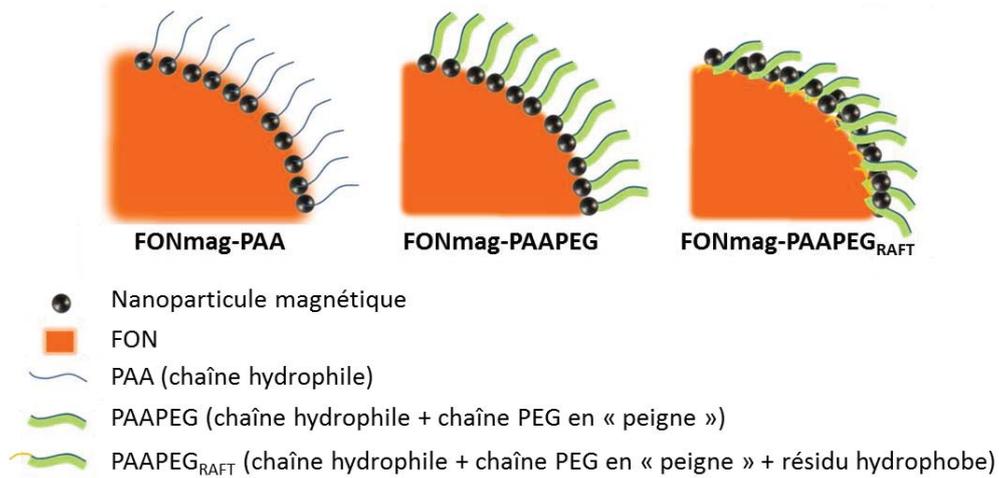


Figure 109 : Représentation de l'organisation des différents polymères à la surface des nanoassemblages.

IV.3.2.4. Test de résistance au photoblanchiment

Un test de résistance au photoblanchiment des solutions de fluorophore seul dans le THF, de FON et de FONmag dans l'eau a été réalisé. Le but de ce test est de savoir quel est l'effet du rassemblement des fluorophores sous forme de FON et celui de la présence de NPs magnétiques sur la résistance au photoblanchiment par rapport aux fluorophores seuls. Ces considérations sont d'une importance cruciale pour des suivis par microscopie de fluorescence.

Pour cela, les solutions de fluorophore **9** dans le THF, de **9-FON** dans l'eau et de **9-FONmag** dans l'eau (**mag8**, **PAA**) ont été étudiées. Une goutte de 10 μL de chaque solution a été déposée sur une lamelle de verre. Une fois la goutte sèche, l'évolution de son intensité d'émission est enregistrée sous microscope à épifluorescence pendant 10 min (excitation à 488 nm, exposition 50 ms, objectif 40x, NA = 0,90, enregistrement toutes les 0,1 s) et est ensuite tracée en fonction du temps (Figure 110). Il est à noter que ces conditions sont bien plus énergétiques que celles employées lors d'observations biologiques par microscopie de fluorescence, notamment en termes d'intensité lumineuse. Les concentrations des solutions étant différentes, l'intensité d'émission est normalisée à 100 % à $t = 0$ min. Un cliché est pris par microscopie de fluorescence avant et après irradiation.

On observe que l'émission de la solution de fluorophores dans le THF passe de 100 à 0 % en 10 min. Ceci est notamment bien visible sur le cliché de microscopie de fluorescence, où l'image apparaît noire après 10 min. Les FONmag résistent mieux avec une émission chutant de 100 à 67% tandis que les FONs présentent un comportement intermédiaire avec un signal résiduel de 25% après 10 min. De ces enregistrements, nous pouvons conclure que l'auto-assemblage des fluorophores sous forme de FONs et notamment la présence d'une coquille inorganique d'oxyde de fer contribuent à limiter considérablement les risques de photodégradation.

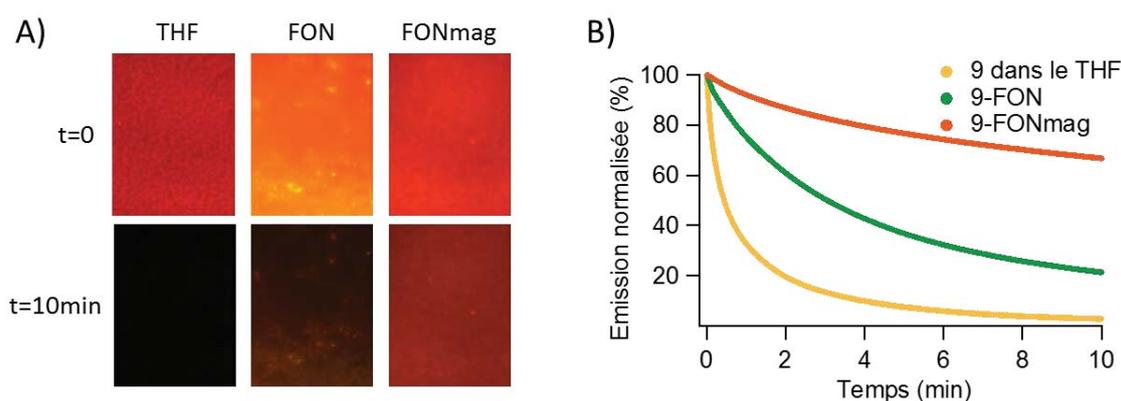


Figure 110 : A) Courbe de résistance au photoblanchiment d'une solution de fluorophores **9** dans le THF (jaune), de **9-FON** dans l'eau (vert) et de **9-FONmag** dans l'eau (orange). B) Clichés de microscopie de fluorescence ($\lambda_{exc} = 488\text{nm}$, exposition 50 ms, objectif 40x, enregistrement toutes les 0,1 s) des différentes solutions.

IV.4. Etude des propriétés magnétiques des nanoparticules magnétiques et des nanoassemblages hybrides

Cette partie abordera dans un premier temps les propriétés magnétiques des nanoparticules de maghémite, puis, dans un second temps, les principaux types de mesures magnétiques réalisées pour caractériser les composés synthétisés et, enfin, l'influence des différentes unités constituant les nanoassemblages hybrides sur les propriétés magnétiques résultantes.

IV.4.1. Propriétés magnétiques des nanoparticules de maghémite

Tout électron possède un **spin** auquel est associé un moment magnétique. La somme des moments magnétiques donne l'aimantation globale du matériau. Ces matériaux magnétiques peuvent être classés en différentes catégories selon l'orientation de leurs spins électroniques, en l'absence et en présence d'un champ magnétique externe. Ces catégories sont représentées dans la figure ci-après (Figure 111). Si l'aimantation du matériau est nulle en l'absence de champ magnétique mais possède une faible aimantation dont la direction est opposée à celle du champ externe appliqué, le matériau est dit **diamagnétique**. Si les spins sont orientés aléatoirement en l'absence de champ mais s'alignent selon la direction d'un champ externe appliqué, il est **paramagnétique**. Pour d'autres types de matériaux, lorsqu'un ordre magnétique est observé en l'absence de champ, on parle de matériaux **ferromagnétiques** et **ferrimagnétiques**. Pour les matériaux ferromagnétiques, les spins des atomes sont orientés parallèlement les uns avec les autres et, pour les matériaux ferrimagnétiques, ils sont orientés antiparallèlement mais leur somme vectorielle est différente de zéro. Enfin, les matériaux dont les spins sont orientés de manière antiparallèle et fournissent une somme vectorielle nulle, sont dits **antiferromagnétiques**.

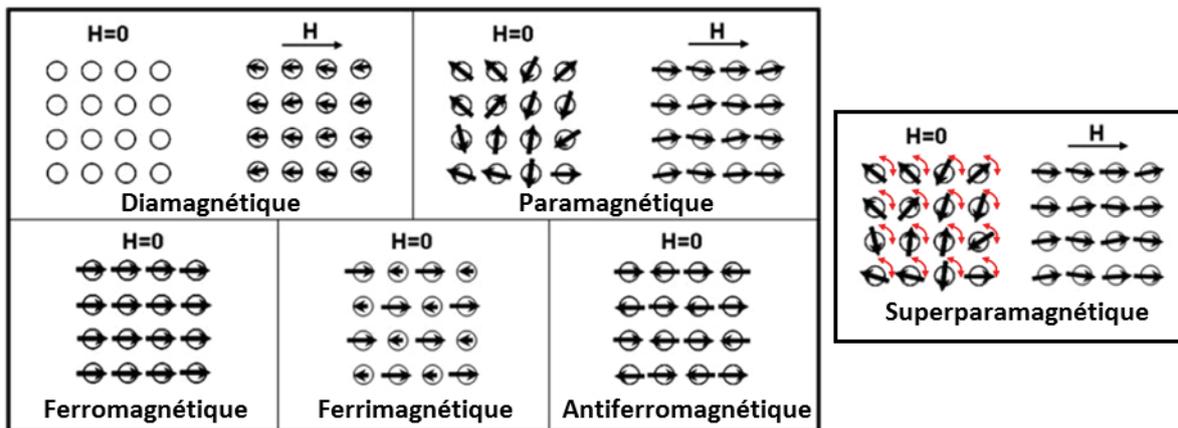


Figure 111 : Représentation des dispositions des spins pour différents types de matériaux, en l'absence ou en présence d'un champ magnétique externe (H).²¹⁹

La maghémite est un matériau ferrimagnétique organisé en domaines présentant des orientations de spin différentes. Lorsque les dimensions deviennent plus petites que celles d'un domaine magnétique, soit 140 nm pour la maghémite,²²⁰ on peut considérer le matériau comme **monodomaine**. Tous les moments magnétiques y sont alignés suivant la même direction et on parle alors de « spin géant » (Figure 112A). C'est le cas des nanoparticules développées dans cette thèse. L'alignement de ces spins géants se fait selon une direction privilégiée, appelée **axe de facile aimantation**.

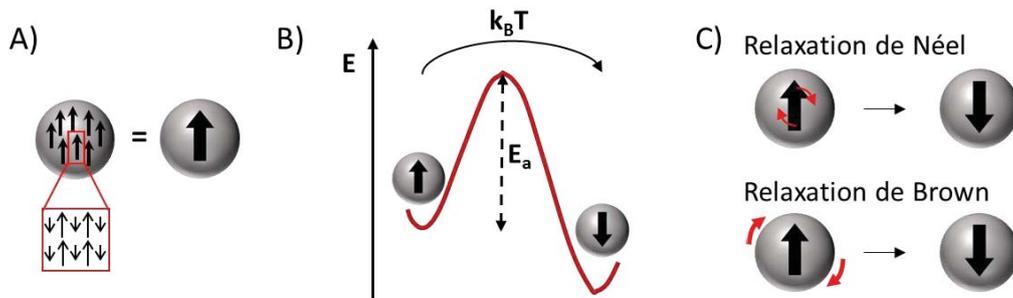


Figure 112 : A) Représentation schématique d'une NP de maghémite ferrimagnétique et de son moment magnétique de spin. B) Profil énergétique d'une NP magnétique. C) Représentation schématique des processus de relaxation magnétique des NPs : relaxation de Néel, où les moments magnétiques de spin fluctuent, et relaxation de Brown, où la particule elle-même bouge.²²¹

Au-delà d'une certaine température, appelée **température de blocage T_b** , ces nanoparticules acquièrent des propriétés **superparamagnétiques**. Ceci signifie qu'en l'absence de champ magnétique extérieur, les spins des NPs ne sont plus bloqués mais fluctuent librement dans l'espace entre leurs deux états énergétiquement stables (Figure 112B), générant une aimantation globale nulle. Ce qui les différencie d'un état paramagnétique est que, en l'absence de champ, les spins fluctuent aléatoirement au lieu d'être bloqués dans des directions aléatoires. Les nanoparticules de maghémite présentées dans cette thèse sont donc superparamagnétiques à température ambiante. Ainsi, les particules ne sont pas attirées les unes par les autres, ce qui évite leur agrégation.

L'énergie pour faire passer les spins d'un état haut (« spin up ») vers un état bas (« spin down ») est l'énergie d'activation donnée par la relation (6).

$$E_a = K_a V \sin^2 \theta \quad (6)$$

avec K_a la constante d'anisotropie, V le volume de la nanoparticule et θ l'angle entre le moment magnétique et l'axe de facile aimantation.

Ainsi, dès lors que l'énergie thermique $k_B T$ apportée est suffisante pour franchir cette barrière d'activation, les moments magnétiques fluctuent librement entre les deux états.

Après l'application d'un champ magnétique, la relaxation des spins vers l'état d'équilibre dépend des contributions collectives de deux processus, nommés relaxation de Néel et relaxation de Brown (Figure 112C). La **relaxation de Néel** correspond à la rotation du moment magnétique au sein de la particule, avec un temps de relaxation caractéristique noté τ_N défini par la relation (7) et qui sera exploité ultérieurement dans ce chapitre. La **relaxation de Brown**

se rapporte à la rotation de la nanoparticule magnétique sur elle-même, avec un temps caractéristique noté τ_B défini par la relation (8).

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{E_a}{k_B T}\right) \quad (7) \qquad \tau_B = \frac{3V_H \eta}{k_B T} \quad (8)$$

avec τ_0 le facteur pré-exponentiel, k_B la constante de Boltzmann, T la température, V_H le volume hydrodynamique de la nanoparticule et η la viscosité du milieu dispersant.

IV.4.2. Principaux types de caractérisations magnétiques

Différents types de mesures peuvent être réalisés pour attester des performances magnétiques des nanoparticules et des nanoassemblages résultants.²⁰⁹ Des mesures du moment magnétique en mode courant continu ont été réalisées en fonction du champ magnétique (cycle d'hystérésis) et de la température (courbes de type zero-field-cooled/field-cooled ou ZFC/FC) pour quantifier l'aimantation des nanoassemblages et appréhender les interactions développées entre les nanoparticules magnétiques du fait de leur assemblage en surface des FONS. Nous avons également mesuré la relaxivité des différents matériaux pour connaître leur réponse en IRM en solution aqueuse. Toutes ces mesures sont présentées ci-après.

IV.4.2.1. Mesure des propriétés magnétiques

La variation de l'aimantation du matériau avec le champ magnétique appliqué fait apparaître des **cycles d'hystérésis** pour les matériaux ferro- et ferrimagnétiques et est représentée ci-après (Figure 113A). On peut relever certains paramètres intéressants comme l'**aimantation à saturation** M_S , qui représente le maximum d'aimantation correspondant à l'alignement maximal de tous les spins en présence d'un champ magnétique extérieur. Plus elle est élevée, plus le système sera performant. L'aimantation restante après avoir retiré le champ magnétique est appelée **aimantation rémanente** M_R . Le **champ coercitif** H_c est l'intensité du champ à appliquer pour obtenir une aimantation nulle. Ainsi, dans le cas de particules purement superparamagnétiques, les valeurs de H_c et M_R sont nulles et les deux branches du cycle d'hystérésis se superposent (Figure 113B).

La température de blocage est donnée par le tracé des courbes **ZFC/FC** (zero-field-cooled/field-cooled) enregistrent l'évolution de l'aimantation avec la température sous un champ donné (Figure 113C). En effet, la température pour laquelle l'aimantation est maximale correspond au changement d'état magnétique des nanoparticules d'un ordre ferrimagnétique à un ordre superparamagnétique. Ainsi, au-delà de cette température de transition, les spins géants des nanoparticules fluctuent librement. Avant de commencer la mesure, l'échantillon est refroidi en l'absence de champ magnétique jusqu'à une température minimale de quelques Kelvin (courbe en pointillés). Les spins sont alors bloqués dans une direction aléatoire et l'aimantation globale est alors presque nulle. Un faible champ magnétique (50 Oe) est alors appliqué (courbe ZFC). À une certaine température, nommée température de blocage T_b ou T_{max} (température maximale) en cas d'interactions entre les NPs, la courbe passe alors par un maximum M_{max} . À

partir de cette température, les moments magnétiques perdent progressivement leur orientation et/ou leurs interactions sous l'effet de la température. L'échantillon est ensuite refroidi jusqu'à la température minimale en présence du même faible champ magnétique de 50 Oe (courbe FC). Les courbes ZFC et FC se superposent jusqu'à la température d'irréversibilité T_{irr} , à partir de laquelle les spins sont progressivement bloqués selon le champ magnétique appliqué. T_{irr} est égale à T_{max} si le système étudié est monodisperse (même structure, forme et taille).

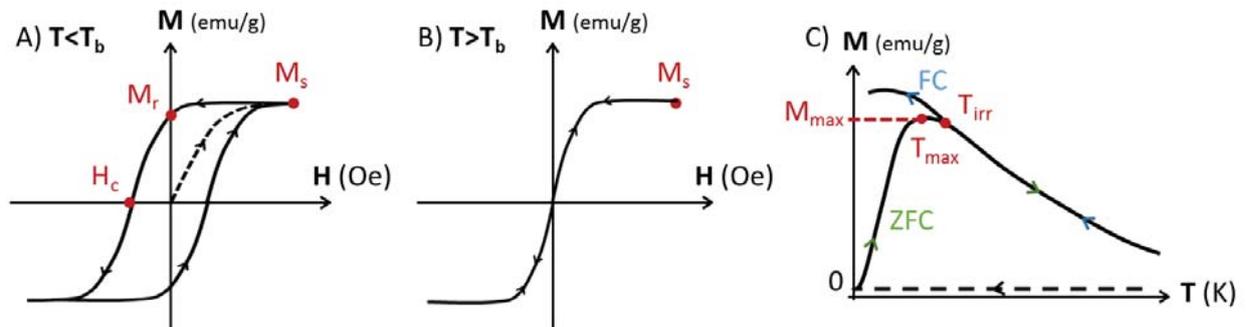


Figure 113 : Représentation d'un cycle d'hystérésis dans le cas d'un matériau superparamagnétique A) pour $T < T_b$, B) pour $T > T_b$ et C) représentation de courbes ZFC/FC.

Les mesures d'aimantation en fonction de la température s'effectuent en présence d'un champ magnétique permanent par application d'un courant continu (mode DC) mais elles peuvent également être effectuées sous un champ fluctuant grâce à l'utilisation d'un courant alternatif (mode AC). Dans ce cas, un champ magnétique alternatif est ajouté au champ magnétique continu pour étudier la dépendance en temps/fréquence de la susceptibilité magnétique du matériau. Cette mesure donne des informations sur les interactions magnétiques entre particules.²²² Elle permet également de déterminer le temps de relaxation de Néel.

Toutes les mesures précédemment détaillées ont été réalisées avec un magnétomètre SQUID (Superconducting Quantum Interference Device). Ce type de magnétomètre est actuellement l'appareil le plus sensible qui existe pour mesurer les variations d'intensité du champ magnétique. La préparation des échantillons nécessite de les lyophiliser et de les intégrer dans une matrice ne présentant pas de signal magnétique (ou peu de signal diamagnétique). Pour cela, environ 3 mg de l'échantillon solide sont enveloppés dans un ruban de téflon qui est ensuite comprimé à l'aide d'une presse pour donner une pastille à analyser. Toutes les mesures magnétiques ont été menées en étroite collaboration avec Dr. Claudio Sangregorio et Andrea Guerrini du laboratoire ICCOM-CNR (Istituto di Chimica dei Composti OrganoMetallici, Sesto Fiorentino, Italie).

IV.4.2.2. Mesure de relaxométrie

L'estimation des temps de relaxation longitudinale et transversale T_1 et T_2 , définis au chapitre 1, est importante car leurs valeurs vont refléter l'efficacité des nanoassemblages magnétiques en tant qu'agents de contrastes pour l'IRM. Un relaxomètre est alors utilisé et donne l'évolution de la relaxivité en fonction du champ magnétique. Son mode de fonctionnement a été décrit au chapitre 1. Grâce à la formule (9), la relaxivité est normalisée par rapport à la concentration en fer de l'échantillon C_{Fe} et la contribution diamagnétique de l'eau retirée.

$$r_i = \frac{1}{C_{Fe}} \left(\left(\frac{1}{T_i} \right)_{\text{éch}} - \left(\frac{1}{T_i} \right)_{\text{eau}} \right) \text{ avec } i = 1 \text{ ou } 2 \quad (9)$$

La relaxivité est tracée en fonction de la fréquence et fournit un graphe appelé profil relaxométrique, ou profil NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion) (Figure 114). Dans le cas d'un agent de contraste négatif en T₂ comme la maghémite, le meilleur contraste sera obtenu pour les systèmes présentant un rapport r₂/r₁ entre la relaxivité transversale r₂ et la relaxivité longitudinale r₁ le plus élevé possible. D'un point de vue pratique, les échantillons sont analysés sous forme liquide (concentration en fer autour de 0,3 mmol.L⁻¹) dans un tube placé entre deux bobines.

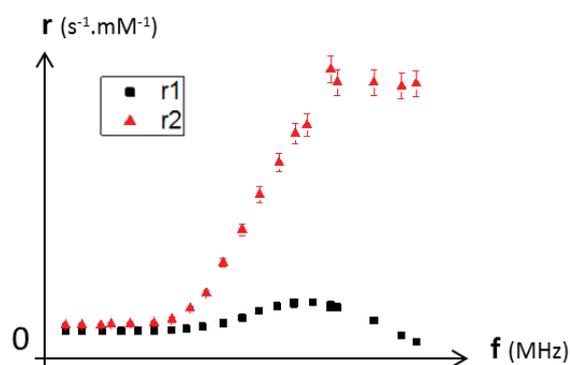


Figure 114 : Représentation d'un profil de relaxométrie NMRD.

Les mesures de relaxométrie ont été effectuées en étroite collaboration avec Prof. Alessandro Lascialfari et Dr. Martina Basini du département de physique de l'Université de Milan (Università degli Studi di Milano, Milano, Italy).

IV.4.3. Influence de la nature du cœur fluorescent

Dans cette partie, l'influence de la nature du cœur fluorescent est étudiée à partir de nanoassemblages différant par leur cœur et présentant des **mag₈** et du **PAA** en surface. Les trois cœurs sont constitués de fluorophores comportant tous des unités acides phosphoniques mais de structure distincte : **fpOH**, **9** et **18** (Tableau 39). Les résultats seront systématiquement comparés à ceux obtenus dans le cas de NPs magnétiques **mag₈** modèles non assemblées.

Tableau 39 : Présentation des systèmes utilisés dans l'étude de l'influence du cœur fluorescent.

Nom	Cœur fluorescent	Coquille magnétique	Polyélectrolyte
fpOH-FONmag	fpOH	mag ₈	PAA
9-FONmag	9		
18-FONmag	18		

IV.4.3.1. Mesure des propriétés magnétiques

Ici, les courbes de l'évolution de l'aimantation en fonction de la température à 50 Oe (courbe ZFC/FC) ou du champ magnétique à 2,5 K ainsi que les courbes de relaxation sont tracées.

Pour chaque échantillon, il est impossible de superposer les courbes ZFC et FC pour des températures inférieures à 50 K environ (Figure 115A). Cette irréversibilité thermique est cohérente avec le caractère superparamagnétique des NPs. Les courbes ZFC/FC présentent la même allure et les températures maximales T_{max} obtenues à partir de ces courbes varient peu entre 52 et 56 K, prouvant que les NPs magnétiques sont de même taille et arrangées de la même manière autour de chaque cœur fluorescent (Tableau 40). On peut néanmoins observer que pour les NPs magnétiques seules, la valeur de T_{max} est égale à 47 K. Cette valeur inférieure prouve que le fait d'assembler les NPs magnétiques autour du cœur fluorescent entraîne des interactions interparticules qui déplacent le T_{max} vers les hautes températures. Ces valeurs étant inférieures à la température ambiante pour les trois différents cœurs montrent que les systèmes sont dans un état superparamagnétique à température ambiante.

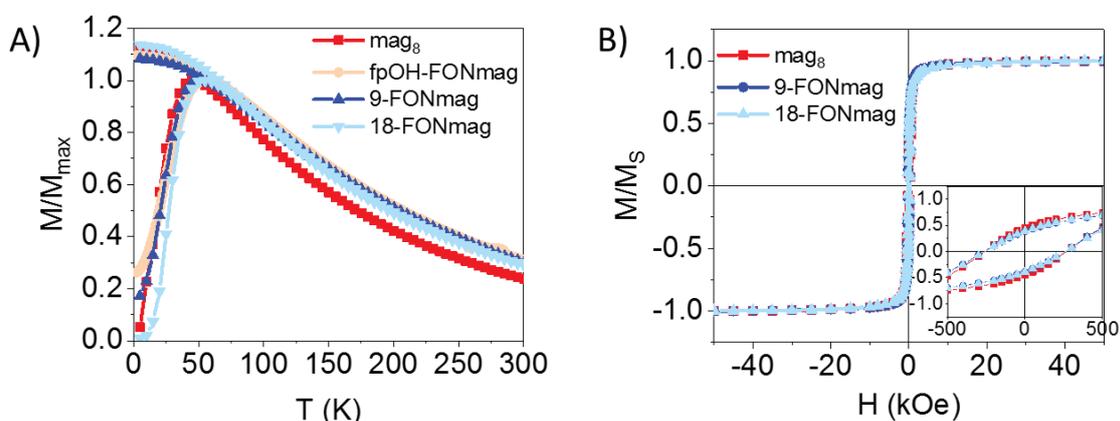


Figure 115 : A) Courbes ZFC/FC normalisées par rapport au maximum de l'aimantation ZFC pour les différents assemblages. Le champ magnétique appliqué est de 50 Oe. B) Courbes d'aimantation en fonction du champ magnétique appliqué acquises à 2,5 K et normalisées par rapport à l'aimantation à saturation. Un zoom sur les bas champs magnétiques entre -400 et 400 Oe est présenté.

Tableau 40 : Valeurs des températures maximales T_{max} obtenues à partir des courbes ZFC/FC et des champs coercitifs H_c et des rapports M_R/M_S obtenus à partir des courbes d'aimantation en fonction du champ magnétique.

Composé	T_{max} (K)	H_c (Oe)	M_R/M_S
mag ₈	47	261	0,48
fpOH-FONmag	56	-	-
9-FONmag	52	261	0,40
18-FONmag	53	261	0,40

Les courbes d'aimantation en fonction du champ magnétique ont été enregistrées à 2,5 K (Figure 115B). Pour toutes ces courbes, une boucle d'hystérésis est observée, soulignant le caractère ferrimagnétique des échantillons à basse température en accord avec les mesures ZFC/FC. Les courbes de tous les nanoassemblages se superposent et le champ coercitif H_c reste très faible à une valeur de 261 Oe, quelles que soient la nature du cœur fluorescent et la configuration assemblée ou isolée des NPs magnétiques (Tableau 40). Cependant, le rapport des aimantations rémanente et à saturation, noté M_R/M_S , est proche de 0,50 pour les NPs **mag8** ($\sim 0,48$) ce qui témoigne d'une anisotropie uniaxiale et d'une absence d'interaction magnétique dipôle-dipôle.^{223,224} En revanche, pour les nanoassemblages, cette valeur est autour de 0,40, ce qui souligne la présence d'interactions dipolaires à basses températures.

IV.4.3.2. Mesure de relaxométrie

Les courbes de relaxation longitudinale et transversale ont également été tracées (Figure 116). Les valeurs au maximum de la courbe et la fréquence associée sont rassemblées dans le tableau ci-après (Tableau 41).

On observe en premier lieu que les valeurs de relaxivité r_2 sont plus élevées que celles de r_1 . Ceci est dû au fait que les NPs d'oxyde de fer induisent des hétérogénéités locales au niveau du champ magnétique permanent, ce qui entraîne une relaxation longitudinale des protons rapide, dominée par un mécanisme de type spin-spin. En outre, les courbes de relaxation longitudinale r_1 mettent en exergue le comportement caractéristique de NPs superparamagnétiques : un plateau à basses fréquences et une crête suivie d'une diminution de la relaxivité à hautes fréquences.²²⁵

Comparés aux NPs **mag8** seules, tous les nanoassemblages présentent des propriétés de contraste plus intéressantes. En effet, pour les nanoassemblages, la valeur de r_1 est abaissée et celle du r_2 augmentée, donnant un rapport r_2/r_1 de 16-17 à 60 MHz, fréquence utilisée en clinique ($\sim 1,5$ T), contre un rapport de 7 seulement pour les NPs libres. Ceci est dû à un effet additif des moments magnétiques induit par la grande concentration en NPs magnétiques autour d'un même assemblage, que l'on ne retrouve pas entre les NPs libres.

L'Endorem, agent de contraste précédemment commercialisé, est utilisé en tant qu'élément de comparaison car il s'agit d'un système similaire à ceux qui font l'objet de cette étude. En effet, l'Endorem est constitué de NPs d'oxyde de fer superparamagnétiques d'environ 5 nm de diamètre MET et assemblées à l'aide d'un polymère (Dextran). Par comparaison avec l'Endorem qui présente un rapport r_2/r_1 de 11, les nanoassemblages possèdent des propriétés de relaxation supérieures. De façon intéressante, un déplacement de la valeur maximale de r_1 vers les hautes fréquences en comparant l'Endorem ($f = 7,2$ MHz) avec les NPs **mag8** et les FONmag ($f \sim 4,4$ MHz) peut être observé.

Enfin, la nature du cœur fluorescent ne semble pas affecter les relaxivités r_1 et r_2 . En effet, les courbes des trois systèmes sont approximativement superposées.

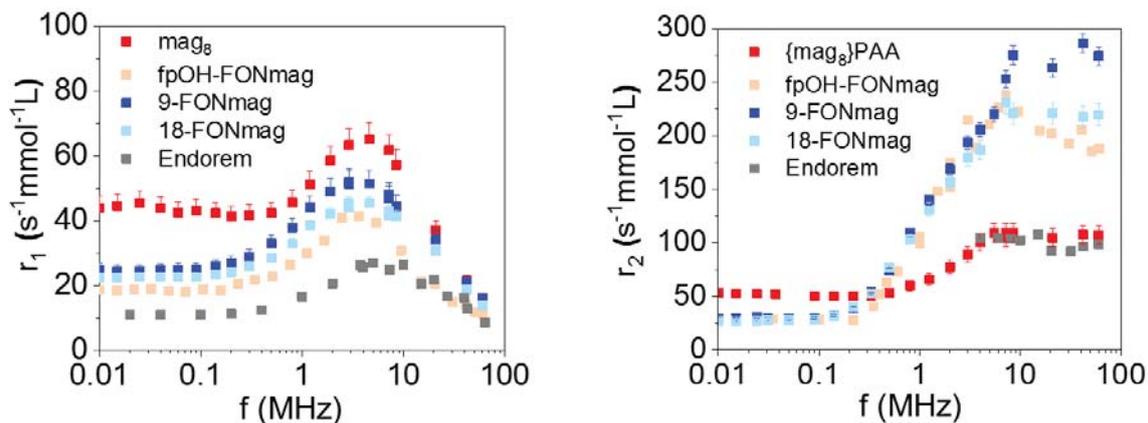


Figure 116 : Courbes de relaxation longitudinale (r_1) et transversale (r_2) des nanoassemblages et de l'agent de contraste Endorem (en $s^{-1}.mmol^{-1}.L$) en fonction de la fréquence (en MHz).

Tableau 41 : Relaxivités transversale (r_1) et longitudinale (r_2) maximales à la fréquence correspondante. Rapport r_2/r_1 mesuré à 60 MHz et à 25 °C pour les nanoassemblages et l'Endorem.

Composé	$r_{1,max}$ ($L.mmol^{-1}.s^{-1}$) [Fréquence]	$r_{2,max}$ ($L.mmol^{-1}.s^{-1}$) [Fréquence]	r_2/r_1 à 60 MHz
mag ₈	65 [4,6 MHz]	109 [7,2 MHz]	7
fpOH-FONmag	42 [3,7 MHz]	238 [7,2 MHz]	17
9-FONmag	51 [4,6 MHz]	286 [42 MHz]	17
18-FONmag	45 [4,6 MHz]	231 [7,2 MHz]	16
Endorem	27 [7,2 MHz]	107 [15 MHz]	11

Pour conclure, la nature du cœur fluorescent exerce un faible impact sur les propriétés magnétiques et de relaxométrie des nanoassemblages. Par ailleurs, le fait d'assembler les NPs sous forme de FONmag permet d'augmenter fortement le contraste r_2/r_1 .

IV.4.4. Influence de l'organisation et de la taille des nanoparticules magnétiques

Dans un premier temps, nous étudierons les différences entre les NPs individuelles et celles assemblées sous forme de FONmag. Ensuite, nous verrons l'influence de la taille des NPs magnétiques (8 et 13 nm) des nanoassemblages sur leurs propriétés magnétiques qu'elles soient libres ou sous forme d'assemblages. Pour cela, les nanoassemblages étudiés sont basés sur un même cœur fluorescent **9**, le **PAA** comme polymère de couverture et des nanoparticules de 8 et 13 nm (Tableau 42). Il est attendu que la réponse du matériau sous l'effet d'un champ magnétique augmente avec la taille des NPs magnétiques.

Tableau 42 : Présentation des systèmes utilisés dans l'étude de l'influence de l'organisation et la taille des nanoparticules magnétiques.

Composé	Cœur fluorescent	Coquille magnétique	Polyélectrolyte
mag ₈	-	mag ₈	PAA
FONmag ₈	9		
mag ₁₃	-	mag ₁₃ (lot 1)	
FONmag ₁₃	9		

IV.4.4.1. Mesure des propriétés magnétiques

Tout d'abord, les courbes de première aimantation à 300 K ont été tracées (Figure 117). Elles ne montrent aucune différence significative entre les 4 types de systèmes qui présentent une aimantation à saturation autour de 30 A.m².kg⁻¹.

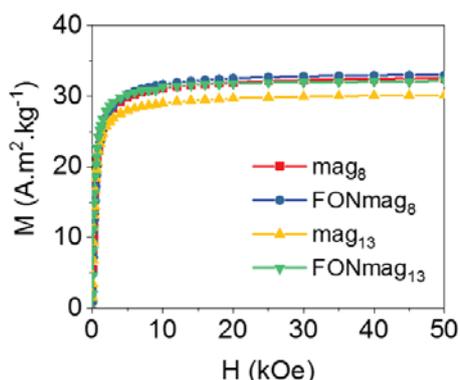


Figure 117 : Courbes de première aimantation en fonction du champ magnétique appliqué acquises à 300 K.

Ensuite, en comparant les NPs avant/après assemblage sous forme de FONmag, les courbes ZFC/FC obtenues à basse température pour **mag₈** et celles obtenues pour **FONmag₈** montrent une diminution de l'aimantation M_{\max} accompagnée d'une augmentation de T_{\max} pour le système **FONmag₈** (Figure 118A, Tableau 43). Ceci témoigne de la présence d'interactions dipolaires des NPs après assemblage sous forme de FONmag.²²⁶

Comparons maintenant l'allure des courbes ZFC/FC pour les édifices ou les NPs seules à base de NPs **mag₁₃** avec celles des systèmes à base de NPs **mag₈** (Figure 118A). Une augmentation de la valeur de T_{max} et un élargissement de la courbe de ZFC est observée. Cet élargissement, encore plus marqué dans le cas des NPs **mag₁₃** seules, semble indiquer la présence de fortes interactions dipôle-dipôle non attendues dans le cas de NPs libres. Une augmentation de 5 nm du diamètre des NPs magnétiques provoque une augmentation de la valeur de T_{max} que ce soit pour les NPs libres (+117 K) ou sous forme de nanoassemblage (+95 K) (Tableau 43). L'augmentation de la valeur de T_{max} en augmentant le diamètre des NPs magnétiques est logique car la barrière énergétique $E_a = K_aV$ à franchir augmente.

Enfin, en comparant les systèmes **mag₁₃** et **FONmag₁₃**, on peut noter une diminution de la valeur de T_{max} de 17 K pour les assemblages de NPs magnétiques (Figure 118A). Ce résultat est incohérent car le fait d'assembler les NPs magnétiques **mag₁₃** devrait, comme pour les **mag₈**, augmenter le T_{max} . Ceci confirme l'existence d'agrégation entre les NPs de 13 nm libres, comme en témoigne la présence d'un plateau à basse température sur la courbe FC pour les systèmes à base de NPs de 13 nm.

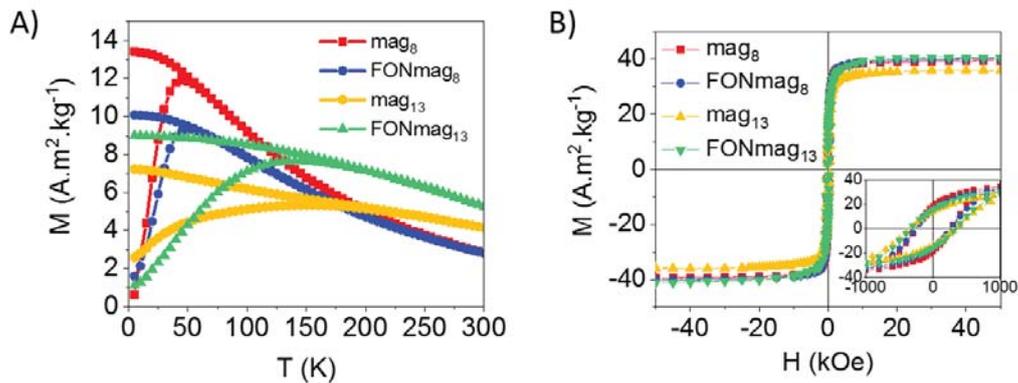


Figure 118 : A) Courbes ZFC/FC des différents assemblages. Le champ magnétique appliqué est de 50 Oe. B) Courbes d'aimantation en fonction du champ magnétique appliqué acquises à 2,5 K. Un zoom sur les bas champs magnétiques entre -1000 et 1000 Oe est présenté.

Les courbes d'aimantation en fonction du champ magnétique appliqué sont présentées ci-avant (Figure 118B). En comparant les NPs **mag₈** libres ou assemblées sous forme de **FONmag₈**, on peut noter que l'assemblage des NPs magnétiques autour des cœurs fluorescents ne modifie pas la valeur de H_c (Tableau 43). Ceci prouve que le champ coercitif dépend principalement de la taille des NPs magnétiques. Pour les NPs **mag₈**, le rapport M_R/M_S est égal à $0,48 \approx 0,50$ (Tableau 43), ce qui est attendu pour des systèmes n'interagissant pas. Pour les **FONmag₈** ce rapport est plus bas autour de 0,40, prouvant l'existence d'interactions magnétiques dipôle-dipôle. Ce phénomène explique la légère augmentation de T_{max} à 52 K observée quand les NPs sont assemblées proches les unes des autres (Tableau 43).

Les boucles d'hystérésis obtenues à 2,5 K font apparaître un champ coercitif légèrement plus élevé pour les systèmes **mag₁₃** et **FONmag₁₃** ($H_c = 335$ Oe) que celui des systèmes **mag₈** et **FONmag₈** ($H_c = 261$ Oe) comme attendu (Figure 118B, Tableau 43). Cette augmentation avec l'augmentation de la taille des nanoparticules est logique car H_c dépend du volume des NPs.

En nous s'intéressant aux systèmes **mag₁₃** et **FONmag₁₃**, nous remarquons que les rapports M_R/M_S sont égaux à $0,38 \neq 0,50$ que les NPs soient assemblées ou libres (Tableau 43). Ceci est à corrélérer avec les résultats obtenus au travers des courbes ZFC/FC et confirme l'existence de NPs agrégées pour **mag₁₃**.

Tableau 43 : Valeurs des températures maximales T_{max} obtenues à partir des courbes ZFC/FC et des champs coercitifs H_c et des rapports M_R/M_S obtenus à partir des courbes d'aimantation en fonction du champ magnétique.

FONmag	T_{max} (K)	H_c (Oe)	M_R/M_S
mag₈	47	261	0,48
FONmag₈	52	261	0,40
mag₁₃	164	335	0,38
FONmag₁₃	147	335	0,38

Des mesures supplémentaires ont été réalisées avec un champ magnétique alternatif pour avoir accès à la dépendance en temps/fréquence de l'aimantation. Ceci permettra de confirmer l'existence d'interactions dipôle-dipôle et de remonter à l'énergie d'activation impliquée dans la relaxation de Néel. Ces mesures consistent à tracer l'évolution du rapport de l'aimantation M sur le champ magnétique appliqué H , appelé susceptibilité magnétique et noté χ , en fonction de la température à différentes fréquences f . La susceptibilité est une valeur complexe et peut s'écrire selon la relation (10).

$$\frac{M}{H} = \chi = \chi' - i\chi'' \quad (10)$$

avec χ' la partie réelle de la susceptibilité et χ'' la partie imaginaire de la susceptibilité.²²⁷

Les évolutions de χ' et χ'' en fonction de la température pour **mag₈** et **FONmag₈** sont données dans les graphes ci-après (Figure 119A, Figure 120A). La formule de la relaxation de Néel permet de relier la fréquence f avec la température maximale selon la relation (11) présentée ci-dessous. Cette relation peut être linéarisée en traçant $\ln(1/2\pi f)$ en fonction de $1/T_{max}$ selon la relation (12). Cette formule n'est valable que pour des systèmes ne présentant pas d'interaction magnétique.

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{E_a}{k_B T_{max}}\right) \quad (11)$$

$$\ln(\tau) = \ln(\tau_0) + \frac{E_a}{k_B T_{max}}, \text{ avec } \tau = \frac{1}{2\pi f} \quad (12)$$

avec E_a l'énergie d'activation, k_B la constante de Boltzmann, T_{max} la température pour laquelle la susceptibilité réelle χ' est maximale et τ_0 le facteur pré-exponentiel.

Pour des NPs superparamagnétiques qui n'interagissent pas entre elles, le facteur pré-exponentiel τ_0 est compris entre 10^{-12} et 10^{-8} s. La présence d'interactions dipolaires entre NPs a pour effet de diminuer la valeur de τ_0 . D'après les graphes tracés ci-après (Figure 119B, Figure

120B), on trouve une valeur de τ_0 égale à 2.10^{-15} s pour **FONmag₈** et 1.10^{-12} s pour **mag₈**. Ceci prouve l'existence d'interactions dans le cas de **FONmag₈** mais une absence d'interaction dans le cas de **mag₈**. Cette modélisation n'est donc pas appropriée pour décrire la dynamique des systèmes **FONmag₈** mais est suffisante pour conclure sur la présence de ces interactions supposées précédemment à la lecture des valeurs des rapports M_R/M_S .

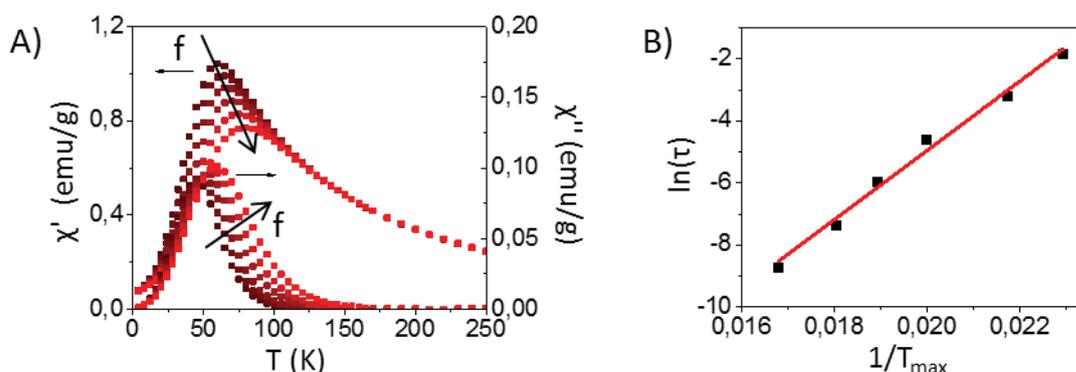


Figure 119 : A) Évolution des parties réelle et imaginaire de la susceptibilité magnétique en fonction de la température en champ alternatif montrant la dépendance en fréquence de 1 à 1000 Hz (1, 4, 16, 63, 250 et 1000 Hz) pour les NPs **mag₈**. B) Évolution de $\ln(\tau)$ en fonction de l'inverse de la température pour laquelle la susceptibilité réelle χ' est maximale.

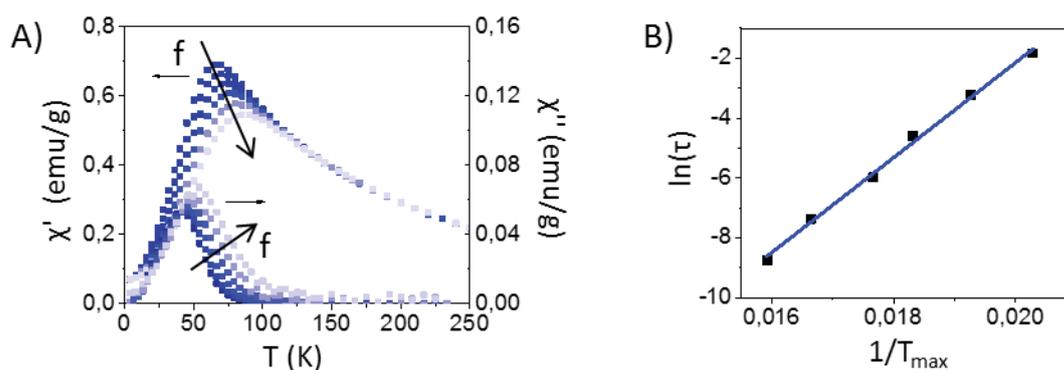


Figure 120 : A) Évolution des parties réelle et imaginaire de la susceptibilité magnétique en fonction de la température en champ alternatif montrant la dépendance en fréquence de 1 à 1000 Hz (1, 4, 16, 63, 250 et 1000 Hz) pour **FONmag₈**. B) Évolution de $\ln(\tau)$ en fonction de l'inverse de la température pour laquelle la susceptibilité réelle χ' est maximale.

Le calcul de l'énergie d'activation E_a est donc possible pour le système **mag₈**. L'ordonnée à l'origine nous donne $E_a/k_B = 1120$ K, d'où une valeur de E_a de $1,55.10^{-20}$ J soit $9,3 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Ces valeurs sont en accord avec les données de la littérature où l'on peut trouver que E_a est égal à $2,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$ pour des NPs de maghémite de 7,5 nm de diamètre.²²⁸

Concernant les **mag₁₃**, la faible concentration des échantillons a donné des mesures trop bruitées pour réaliser les mêmes calculs. On observe néanmoins deux contributions aux courbes AC obtenues pour les **mag₁₃**, avec un épaulement autour de 220 K, en plus du signal à 70 K, attribué à la présence d'agrégats. En comparant ces résultats avec ceux des nanoassemblages **FONmag₁₃**, le signal à 220 K peut être attribué aux agrégats.

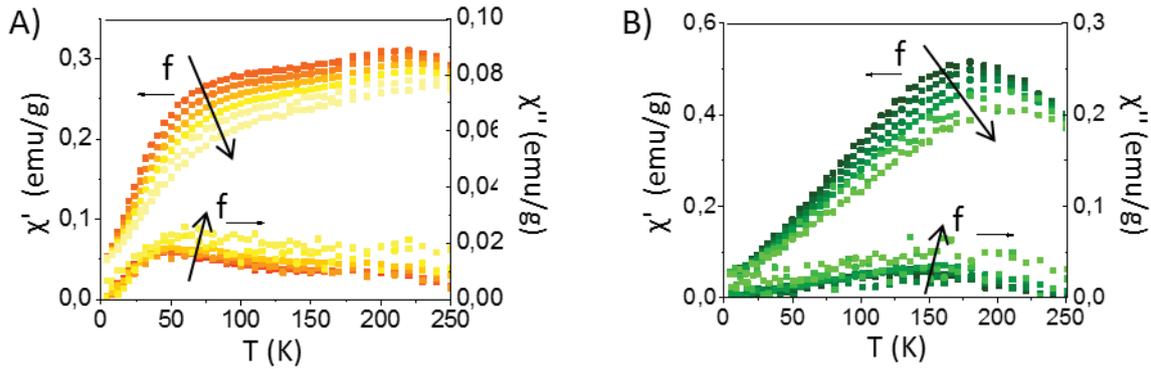


Figure 121 : A) Évolution des parties réelle et imaginaire de la susceptibilité magnétique en fonction de la température en champ alternatif montrant la dépendance en fréquence de 1 à 1000 Hz (1, 4, 16, 63, 250 et 1000 Hz) pour **mag₁₃**. B) Idem pour **FONmag₁₃**.

Des recherches sont donc menées pour comprendre d'où vient ce phénomène d'agrégation observé pour les NPs **mag₁₃** et confirmé par les diverses mesures magnétiques. Pour cela, un millilitre d'une solution de NPs **mag₁₃**, à concentration en fer connue, est lyophilisée. La poudre résultante est pesée et permet de calculer la quantité de matière en γ -Fe₂O₃. On peut alors en déduire par soustraction la quantité de matière en **PAA**. Les résultats (Tableau 44) montrent que cette quantité est nettement supérieure dans le cas des NPs **mag₁₃** par rapport à celle des NPs **mag₈**. L'excès de **PAA** serait donc responsable d'une agrégation entre les NPs magnétiques par pontage. Une autre hypothèse pourrait venir d'une mauvaise dispersion des NPs au moment de la couverture avec les **PAA**. Ainsi, les NPs seraient déjà agrégées avant l'étape de stabilisation.

Tableau 44 : Quantités relatives de nanoparticules d'oxyde de fer et de polymère **PAA**.

FON mag	wt% γ -Fe ₂ O ₃	wt% PAA
mag₈	28	72
FONmag₈	5	-
mag₁₃	6	94
FONmag₁₃	11	-

IV.4.4.2. Mesure de relaxométrie

Les mesures de relaxivité sont présentées dans la figure et le tableau ci-après (Figure 122, Tableau 45). La diminution de la valeur de r_1 et l'augmentation de celle de r_2 lors du passage de NPs seules à leur assemblage en FONmag observées pour les systèmes à base de NPs de 8 nm n'a étonnamment pas lieu pour les NPs de 13 nm, ce qui est sûrement dû au phénomène d'agrégation décrit précédemment.

La comparaison des NPs seules de **mag₈** avec celles de **mag₁₃** donne également un résultat surprenant puisque les valeurs de r_1 et r_2 sont systématiquement inférieures dans le cas de NPs plus grosses. Ceci est probablement dû à l'agrégation induite par le champ magnétique. Pour éviter ces phénomènes d'agrégation, la solution serait de réaliser ces mesures dans un liquide visqueux ou un gel comme l'alcool polyvinylique (PVA) ou l'agarose, ce qui est actuellement en cours d'étude. Ce phénomène se répercute sur les nanoassemblages puisque **FONmag₈** présentent également des propriétés magnétiques supérieures à celles de **FONmag₁₃**.

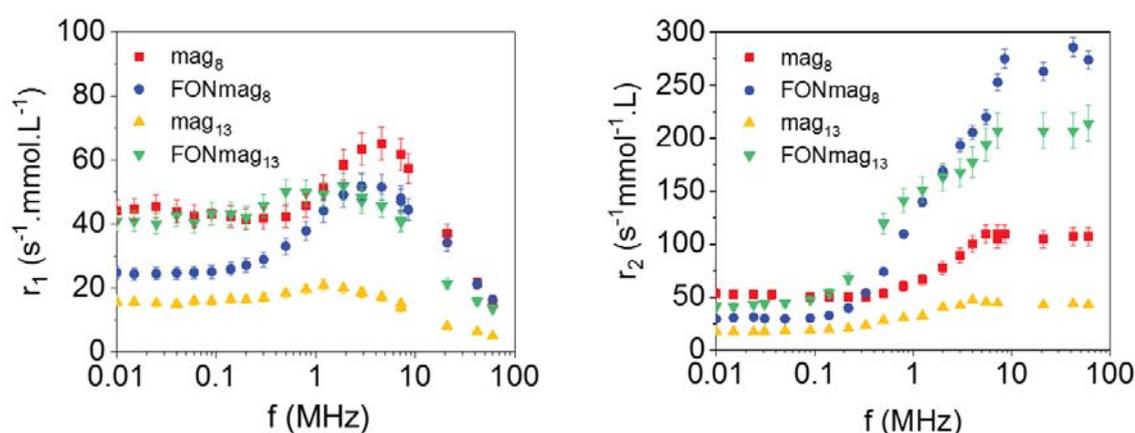


Figure 122 : Courbes de relaxation longitudinale (r_1) et transversale (r_2) des nanoassemblages et de l'agent de contraste Endorem (en $s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$) en fonction de la fréquence (en MHz).

Tableau 45 : Relaxivités transversale (r_1) et longitudinale (r_2) maximales à la fréquence correspondante. Rapport r_2/r_1 mesuré à 60 MHz et à 25 °C pour les nanoassemblages.

FON mag	$r_{1,\text{max}}$ ($\text{L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) [Fréquence]	$r_{2,\text{max}}$ ($\text{L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) [Fréquence]	r_2/r_1 à 60 MHz
mag₈	65 [4,6 MHz]	109 [7,2 MHz]	7
FONmag₈	51 [4,6 MHz]	286 [42 MHz]	17
mag₁₃	20 [1,2 MHz]	47 [4 MHz]	9
FONmag₁₃	52 [1,8 MHz]	215 [60 MHz]	17

Pour conclure sur l'impact de la taille des NPs magnétiques, il serait nécessaire de réitérer les mesures concernant les **mag₁₃** avec une nouvelle préparation mieux dialysée pour éliminer l'excès de **PAA**. L'optimisation de la couverture en NPs magnétiques en surface des **FONmag₁₃** permettrait également d'obtenir de meilleurs résultats avec ces systèmes, qui auraient alors des propriétés supérieures à celles des assemblages à base de **mag₈**. Les systèmes développés sont des agents de contraste négatif performants pour l'IRM grâce à leur haute relaxivité r_2 ($r_2 \sim 286 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et leur rapport r_2/r_1 élevé (~ 17).

IV.4.5. Influence de la nature du polymère stabilisant

Dans cette partie, l'influence de la nature du polymère stabilisant est étudiée en se penchant sur des systèmes constitués cette fois d'un cœur **fpOH**, de NPs de 8 nm et de trois différents polymères : **PAA**, **PAAPEG**, **PAAPEG_{RAFT}** (Tableau 46). Comme dans la partie concernant l'influence du cœur fluorescent, il est attendu que les propriétés magnétiques soient peu modifiées étant donnée l'identité entre les nanoparticules magnétiques.

Tableau 46 : Présentation des systèmes utilisés dans l'étude de l'influence de la nature du polyélectrolyte.

Nom	Cœur fluorescent	Coquille magnétique	Polyélectrolyte
FONmag-PAA	fpOH	mag _s	PAA
FONmag-PAAPEG			PAAPEG
FONmag-PAAPEG _{RAFT}			PAAPEG _{RAFT}

IV.4.5.1. Mesure des propriétés magnétiques

Les mesures de ZFC/FC montrent que la température maximale augmente légèrement pour les systèmes stabilisés par des polymères PEGylés passant de 28 K pour le **PAA** à 33-35 K pour les polymères PEGylés (Figure 123A, Tableau 47). Cette observation témoigne d'une plus grande interaction dipôle-dipôle entre NPs magnétiques et corrobore l'hypothèse selon laquelle les systèmes PEGylés augmentent la densité en NPs magnétiques autour de l'assemblage.

L'évolution de l'aimantation en fonction du champ magnétique à 2,5 K a donc été enregistrée et les courbes se superposent (Figure 123B).

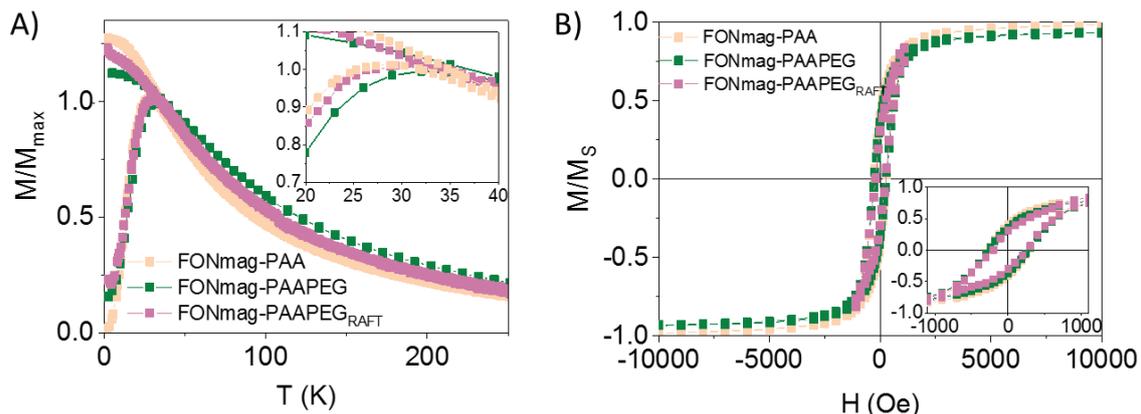


Figure 123 : A) Courbes ZFC/FC normalisées par rapport au maximum de l'aimantation ZFC pour les différents assemblages. Le champ magnétique appliqué est de 50 Oe. B) Courbes d'aimantation en fonction du champ magnétique appliqué acquises à 2,5 K et normalisées par rapport à l'aimantation à saturation. Un zoom sur les bas champs magnétiques entre -1000 et 1000 Oe est présenté.

Le rapport M_R/M_s , situé dans la gamme 0,32-0,40 dévoile la présence d'interactions dipolaires à 2,5 K ce qui est également confirmé par les valeurs de champ coercitif qui varient peu entre

224 et 273 Oe (Tableau 47). Ces interactions sont plus marquées avec le polymère rassembleur **PAAPEG_{RAFT}** qui induit une forte densité en NPs.

Tableau 47 : Valeurs des températures maximales T_{max} obtenues à partir des courbes ZFC/FC et des champs coercitifs H_c et des rapports M_R/M_S obtenus à partir des courbes d'aimantation en fonction du champ magnétique.

FON mag	T_{max} (K)	H_c (Oe)	M_R/M_S
FONmag-PAA	28	273	0,40
FONmag-PAAPEG	35	273	0,35
FONmag-PAAPEG _{RAFT}	33	224	0,32

Enfin, la courbe d'aimantation en fonction du champ magnétique appliqué à 310 K ne montre pas d'irréversibilité (cycle fermé) témoignant du caractère superparamagnétique des assemblages (Figure 124). Ces mesures indiquent que les propriétés magnétiques sont peu dépendantes de la nature du polymère stabilisant.

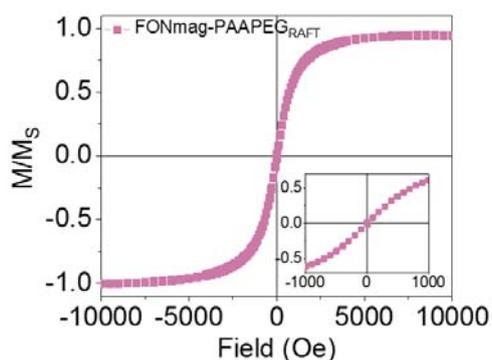


Figure 124 : Courbe d'aimantation en fonction du champ magnétique appliqué acquise à 310 K et normalisée par rapport à l'aimantation à saturation. Un zoom sur les bas champs magnétiques entre -1000 et 1000 Oe est présenté.

IV.4.5.2. Mesure de relaxométrie

D'après les profils NMRD r_1 et r_2 (Figure 125), la nature du polymère n'a que très peu d'effet sur les valeurs de r_2 dont les maxima restent autour de $120 \text{ L.mmol}^{-1}.\text{s}^{-1}$. On peut donc en conclure que les NPs magnétiques sont de même nature, ce qui est en accord avec le protocole expérimental utilisant le même type de NPs. De plus, les systèmes ont une relaxivité identique à celle de l'Endorem. En revanche, une baisse significative de la valeur de r_1 est observée pour le système avec **PAAPEG_{RAFT}**. L'origine de cette baisse provient sûrement de la plus forte densité en NPs magnétiques autour de l'assemblage mais également de la présence de fonctions hydrophobes dans le polymère, rendant l'accès aux molécules d'eau plus difficile. En comparaison avec l'agent de contraste commercial de référence, l'Endorem, les nanoassemblages possèdent donc des propriétés de relaxation équivalentes pour une couche de

PAA et de PAAPEG mais supérieures pour une couche de PAAPEG_{RAFT}, avec une valeur élevée du rapport r_2/r_1 égale à 21 à la fréquence clinique de 60 MHz.

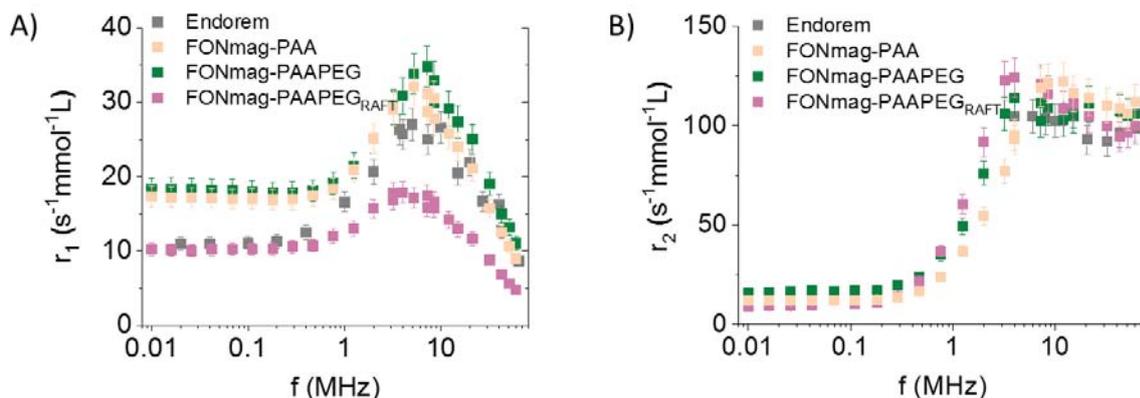


Figure 125 : Courbes de relaxation longitudinale (r_1) et transversale (r_2) des nanoassemblages et de l'agent de contraste Endorem (en $s^{-1}.mmol^{-1}.L$) en fonction de la fréquence (en MHz).

Tableau 48 : Relaxivités transversale (r_1) et longitudinale (r_2) maximales à la fréquence correspondante. Rapport r_2/r_1 mesuré à 60 MHz et à 25 °C pour les nanoassemblages et l'Endorem.

Composé	$r_{1,max}$ ($L.mmol^{-1}.s^{-1}$) [Fréquence]	$r_{2,max}$ ($L.mmol^{-1}.s^{-1}$) [Fréquence]	r_2/r_1 à 60 MHz
FONmag-PAA	32 [6 MHz]	122 [12 MHz]	12
FONmag-PAAPEG	34 [7 MHz]	115 [4 MHz]	9
FONmag-PAAPEG _{RAFT}	19 [5 MHz]	125 [4 MHz]	21
Endorem	28 [7 MHz]	105 [4 MHz]	11

IV.5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons vu comment obtenir des nanoassemblages hybrides. Le choix de la nature des différents constituants (fluorophore, nanoparticule magnétique et polymère) est important car il permet de moduler à façon la structure de l'assemblage en fonction du but désiré.

Les caractérisations magnétiques des assemblages permettent d'espérer une efficacité élevée en hyperthermie magnétique. Ces aspects seront détaillés dans le chapitre suivant. De plus, des mesures de relaxation ont permis de conclure que les systèmes obtenus sont des agents de contraste négatif performants pour l'IRM grâce à leur haute valeur de relaxivité transversale r_2 ($r_2 \sim 286 \text{ L.mmol}^{-1}.\text{s}^{-1}$) et leur rapport r_2/r_1 élevé (~ 21).

Les propriétés photophysiques ne sont pas en reste. En effet, l'émission est décalée dans le rouge ($\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} = 615\text{-}666 \text{ nm}$), le déplacement de Stokes est élevé ($\sim 7000 \text{ cm}^{-1}$) et la brillance est adéquate pour l'imagerie de fluorescence par microscopie.

Le prochain chapitre sera l'occasion d'exploiter au mieux les informations récoltées, en réalisant des mesures d'hyperthermie magnétique et en internalisant les systèmes dans des cellules cancéreuses.

Chapitre V : Les nanoassemblages hybrides comme agents thérapeutiques

V.1. Introduction	170
V.2. Internalisation <i>in cellulo</i> de nanoassemblages hybrides	171
V.2.1. Internalisation dans des monocouches de cellules tumorales	171
V.2.2. Internalisation dans des sphéroïdes multicellulaires de cellules tumorales	174
V.3. Contrôle de la libération d'un composé par hyperthermie magnétique	177
V.3.1. Caractérisations structurales, photophysiques et magnétiques.....	179
V.3.2. Étude de la délivrance par hyperthermie magnétique	182
V.4. Bio-conjugaison du peptide TAT en surface des nanoassemblages	185
V.4.1. Synthèse des nanoassemblages bio-conjugués.....	186
V.4.2. Caractérisations structurales et photophysiques.....	187
V.4.3. Imagerie de cellules MuStem	189
V.4.3.1. Etudes de cytotoxicité et de prolifération cellulaire.....	189
V.4.3.2. Evolution du marquage cellulaire au cours du temps	191
V.4.3.3. Suivi spatio-temporel <i>in cellulo</i> des nanoassemblages	192
V.5. Conclusion	195

V.1. Introduction

Cette partie traite de l'utilisation des nanoassemblages hybrides permettant la libération contrôlée d'un principe actif ou disposant d'un système de ciblage actif assuré par la bio-conjugaison d'entités biologiques. En effet, le but final des nano-objets développés dans le cadre de ces travaux de thèse est de mener le nanovecteur vers la zone cible désirée et de contrôler et de suivre la libération d'un principe actif *in vivo* sous l'application d'un stimulus externe. La présence de nanoparticules (NPs) superparamagnétiques en surface de l'assemblage nous a logiquement conduits vers l'utilisation d'un stimulus magnétique appliqué à des expériences d'hyperthermie magnétique, définie au chapitre 1.

Dans une première partie, la possibilité d'internaliser les nanoassemblages dans des cellules cancéreuses et de les imager sera abordée. Effectivement, avant d'envisager des études *in vivo*, il est nécessaire de confirmer l'internalisation *in cellulo*.

Ensuite, la délivrance par hyperthermie magnétique sera détaillée. À cette occasion, la capacité de chauffage et de délitement des nanoassemblages sous l'effet d'un champ magnétique alternatif sera développée.

La troisième et dernière partie traitera de la bio-conjugaison de peptides, et notamment du peptide TAT (voir description dans le chapitre 1), en surface des nanoassemblages pour augmenter leur ciblage. Leurs potentialités en tant que sondes de bio-imagerie seront alors comparées à celles de quantum dots dont la brillance, du même ordre de grandeur que celle des FONs, est souvent mise en avant comme avantage concurrentiel.

V.2. Internalisation *in cellulo* de nanoassemblages hybrides

Dans cette toute première partie, le but sera de prouver la potentialité des nano-objets magnéto-fluorescents en tant qu'agents d'imagerie. L'objectif sera également d'observer l'effet de la nature du polymère recouvrant l'assemblage sur la cinétique d'internalisation cellulaire et l'existence d'interactions préférentielles entre les différents types de polymère et les cellules. Pour cela, nous avons considéré les trois nanoassemblages **FONmag-PAA**, **FONmag-PAAPEG** et **FONmag-PAAPEG_{GRAFT}**, différant par leur seul polyélectrolyte de surface (**PAA**, **PAAPEG** et **PAAPEG_{GRAFT}**, décrits au chapitre 4) tandis que leur cœur (**fpOH**) et leur coquille magnétique (**mag₈**) demeurent identiques (Tableau 49). Dans toute cette partie, des cellules mésothéliales de tumeur pleurale (méso 11) ont été choisies pour les études d'internalisation cellulaire.

Tableau 49 : Présentation des systèmes utilisés dans l'étude de l'influence de la nature du polyélectrolyte sur l'internalisation cellulaire.

Nom	Cœur fluorescent	Coquille magnétique	Polyélectrolyte
FONmag-PAA	fpOH	mag ₈	PAA
FONmag-PAAPEG			PAAPEG
FONmag-PAAPEG_{GRAFT}			PAAPEG _{GRAFT}

V.2.1. Internalisation dans des monocouches de cellules tumorales

Des études de microscopie confocale de fluorescence ont été réalisées après 24 h d'incubation des nanoassemblages à une concentration en fer de 2,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Avant acquisition, le milieu de culture est lavé avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) pour éliminer les nano-objets en excès. Les cellules sont ensuite traitées avec de l'AlexaFluor 647 conjugué à de l'agglutinine de germe de blé pour marquer les membranes cellulaires (vert) et avec du Hoechst 33342 pour marquer les noyaux (bleu). Les clichés obtenus révèlent des points très lumineux, représentés en rouge, qui sont attribués aux nanoassemblages internalisés (Figure 126). Une projection selon l'axe Z atteste sans ambiguïté de l'internalisation et de la localisation dans le cytoplasme quelle que soit la nature du polymère. Aucun assemblage n'est présent au sein des noyaux ou de la membrane. Les méso adhérentes conservent leur forme allongée ce qui est en faveur d'une absence de cytotoxicité, confirmée par des tests de viabilité cellulaire sur 72 h (Figure 127).

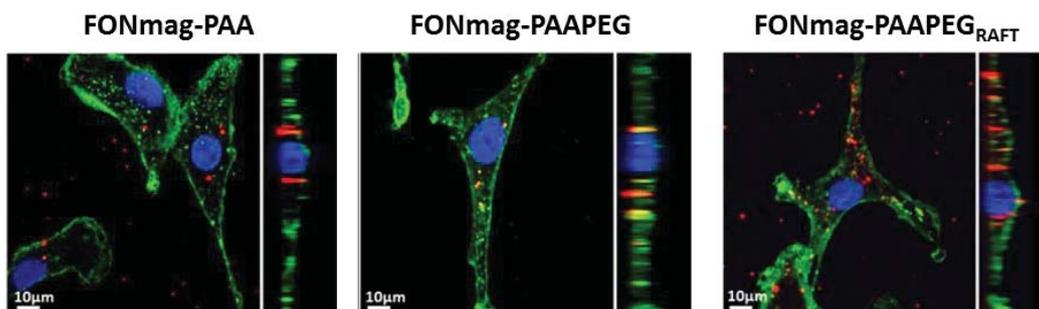


Figure 126 : Clichés de microscopie confocale de fluorescence de méso 11 incubées pendant 24 h avec des nanoassemblages magnéto-fluorescents présentant différents polyélectrolytes (**PAA**, **PAAPEG** et **PAAPEG_{RAFT}**) ($[Fe] \sim 2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Les nanoassemblages sont en rouge, la membrane apparaît en vert grâce à l'AlexaFluor 647 conjugué à de l'agglutinine de germe de blé et le noyau est coloré en bleu à l'aide de Hoechst 33342. Chaque image inclue une projection orthogonale selon Z. Echelle : 10 μm .

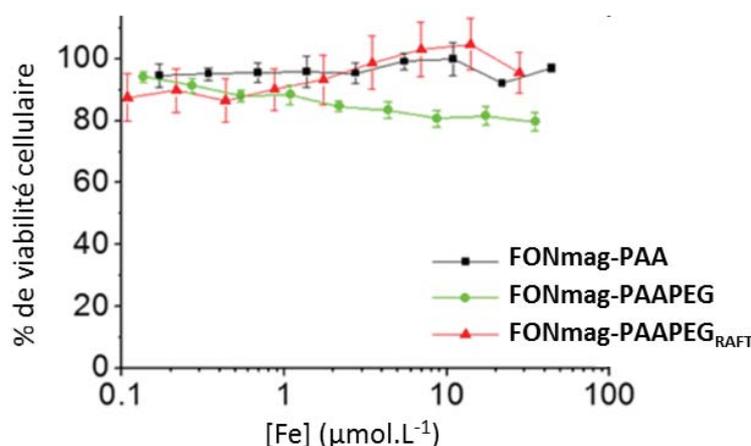


Figure 127 : Test de viabilité cellulaire des méso 11 incubées avec des nanoassemblages magnéto-fluorescents présentant différents polyélectrolytes (**PAA**, **PAAPEG** et **PAAPEG_{RAFT}**) pendant 72 h pour $[Fe] \in [0,1 ; 100] \mu\text{mol L}^{-1}$.

Une estimation de la concentration en fer internalisée dans les méso a été réalisée. Il s'agit ici d'observer l'influence de la nature du polymère recouvrant les FONmag sur l'internalisation. Pour cela, des mesures ICP-AES ont été privilégiées pour leur précision par rapport à une évaluation par cytométrie de flux qui n'aurait donné qu'un nombre de nanoassemblages par cellule et aurait nécessité une correction du RMFI par rapport au rendement quantique de fluorescence des assemblages pouvant être modifié en milieu cellulaire. Expérimentalement, 80 μL de **FONmag-PAA** et **FONmag-PAAPEG_{RAFT}** sont ajoutés par puit de 5 mL de milieu de culture contenant 250 000 cellules. Après 24 h d'incubation, les cellules sont décollées à l'aide de trypsine, lavées puis rassemblées en un culot, qui, après dissolution dans l'acide chlorhydrique concentré et dilution dans l'eau, est analysé par ICP-AES. La concentration en fer obtenue est ensuite normalisée par rapport au nombre de cellules présentes après 24 h pour obtenir un résultat en pg de fer par cellule. Chaque mesure est faite en duplica à partir des mêmes lots de nanoassemblages pour éviter tout biais provenant de la concentration en fer intrinsèque à l'échantillon. Les résultats rassemblés dans le tableau ci-après (Tableau 50) montrent l'internalisation de 0,33 pg de fer par cellule pour **FONmag-PAA** et 0,59 pg de fer par cellule pour **FONmag-PAAPEG_{RAFT}**.

Tableau 50 : Concentration en fer internalisée après 24 h d'incubation des méso 11 avec des nanoassemblages **FONmag-PAA** et **FONmag-PAAPEG_{RAFT}** et le contrôle sans ajout de nanoassemblages.

	[Fe] (mM) ^(a)	[Fe] (pg/cellule)
Méso 11 seules	-	0,09 ± 0,04
FONmag-PAA	6,8.10 ⁻³	0,33 ± 0,01
FONmag-PAAPEG_{RAFT}	3,6.10 ⁻³	0,59 ± 0,07

^(a) Concentration en fer des solutions de nanoassemblages dans le milieu de culture.

La comparaison de l'internalisation suivant la nature du polymère **PAA** ou **PAAPEG_{RAFT}** n'est pas aisée. En effet, les solutions d'assemblages ne présentent pas la même concentration initiale. Or, il est fortement probable que la quantité internalisée dépende de la concentration en nano-objets. Les mêmes manipulations devraient être répétées avec la même concentration initiale en fer. De plus, ces assemblages possèdent une taille sensiblement différente, 78 nm pour **FONmag-PAA** et de 87 nm pour **FONmag-PAAPEG_{RAFT}**, ce qui peut également avoir un impact sur leur endocytose. Si l'on raisonne en termes de nombre de nanoassemblages endocytés, on observe qu'environ 9.10³ **FONmag-PAA** et 3.10⁴ **FONmag-PAAPEG_{RAFT}** sont internalisés après incubation de 8.10⁸ **FONmag** (avec 10¹⁰ **FONmag**/mL). Ceci est en accord avec les données de la littérature.¹⁷⁶

De précédentes études avaient été réalisées sur l'internalisation de nanoassemblages hybrides **FONmag-PAA** avec 600 000 cellules épithéliales de tumeur mammaire (MDA-MB-468). À titre de comparaison, pour une concentration en fer de 2,4.10⁻² mM des solutions de nano-objets dans le milieu de culture, une concentration de 1,3 pg de fer par cellule avait été obtenue après 24 h d'internalisation, soit 4 fois plus que dans les mesures présentées ci-dessus. La concentration en solution ajoutée étant également 4 fois plus élevée, la différence significative observée entre les mesures prouve que la quantité de fer endocytée dépend de la quantité de fer ajoutée aux cellules. Ainsi, la dilution excessive des nanoparticules avant internalisation fait que les concentrations en nanoassemblages ne sont pas suffisantes pour conclure. De plus, toutes les cellules n'internalisent pas de la même manière. Les méso 11 et les MDA-MB-468 auraient donc des capacités d'internalisation différentes.

V.2.2. Internalisation dans des sphéroïdes multicellulaires de cellules tumorales

L'utilisation de monocouches cellulaires constitue la première étape incontournable lors d'investigations biologiques avant d'envisager toute extension *in vivo*. Cependant, cette méthode souffre de limitations, notamment dans le cas du traitement du cancer. Premièrement, la culture de monocouches cellulaires est un modèle artificiel qui ne reproduit pas correctement les conditions de croissance et d'adhésion des cellules tumorales *in vivo*. Deuxièmement, les tumeurs solides sont faites d'amas compacts de cellules, empêchant la diffusion profonde des médicaments anticancéreux. Ainsi, un nouveau mode de culture en trois dimensions, appelé sphéroïde multicellulaire de cellules tumorales (MTCS pour multicellular tumor cell spheroid en anglais), a vu le jour pour mieux appréhender les conditions de croissance *in vivo*²²⁹ et générer des tissus artificiels complexes en 3 dimensions (3D).²³⁰ Dans le cadre de ces travaux, des MTCS de méso 11 ont été formés (Figure 128). Ils résultent de l'assemblage compact de 2.10^4 cellules, créant une structure sphérique n'adhérant pas au milieu dans lequel ils sont cultivés.

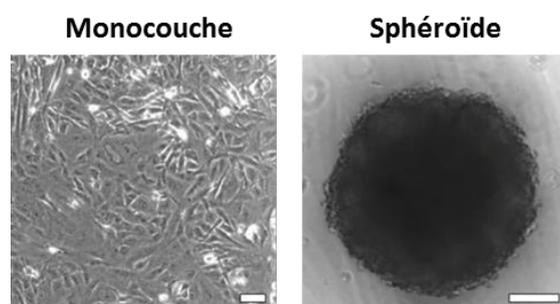


Figure 128 : Clichés de microscopie optique en transmission de méso 11 formant une monocouche (objectif 60x) ou assemblées sous forme de sphéroïde (objectif 40x). Echelle : 100 μm .

Les concentrations en nanoassemblages ajoutés aux sphéroïdes ($[\text{Fe}] \sim 50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) sont plus élevées que celles utilisées pour des cellules cultivées en monocouches pour tenir compte de la grande densité cellulaire présente dans les sphéroïdes. Après 24 h d'incubation, le milieu de culture est lavé avec une solution de PBS pour éliminer les nano-objets en excès. Les cellules sont traitées avec du Hoechst 33342 pour marquer les noyaux (bleu). Les reconstructions 3D des acquisitions selon l'axe Z nous permettent d'observer le maintien de la structure des sphéroïdes sous la forme d'amas cellulaires sphériques denses (Figure 129A).

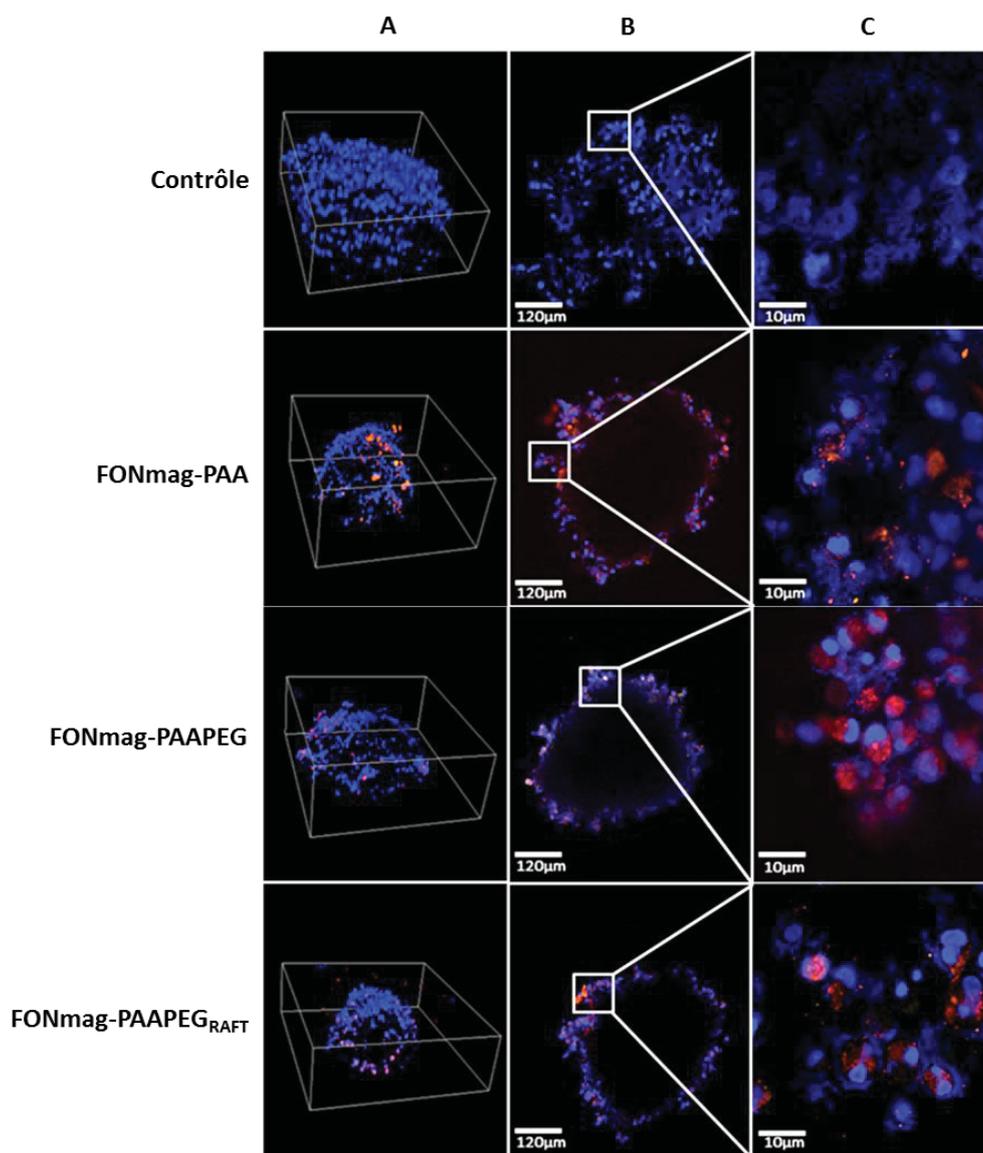


Figure 129 : Clichés de microscopie confocale de fluorescence de sphéroïdes de méso 11 ($\sim 2 \cdot 10^4$ cellules) incubés ou non pendant 24 h avec des nanoassemblages magnéto-fluorescents présentant différents polyélectrolytes (**PAA**, **PAAPEG** et **PAAPEG_{RAFT}**) ($[\text{Fe}] \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). A) Reconstructions 3D des acquisitions selon l'axe Z. B) Sections des sphéroïdes dans des plans équatoriaux. C) Zoom sur les cellules en périphérie des sphéroïdes. Les nanoassemblages sont en rouge ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 570\text{--}620 \text{ nm}$) et le noyau est coloré en bleu à l'aide de Hoechst 33342 ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 425\text{--}475 \text{ nm}$).

Les points rouges, correspondant aux nanoassemblages, se révèlent être fortement présents en périphérie des sphéroïdes comme en témoignent les clichés de leurs sections (Figure 129B) et ce quel que soit le type de nanoassemblage (Figure 129C). L'absence de lumière collectée au centre du sphéroïde résulte de sa grande épaisseur ($\sim 400 \mu\text{m}$ de diamètre) et de sa haute densité cellulaire. Il est donc difficile de conclure sur la présence éventuelle de FONmag au centre des sphéroïdes.

C'est pourquoi des expériences de transparisation ont été réalisées. L'ajout d'une solution de RapiClear® avant l'observation en microscopie permet de visualiser le sphéroïde dans son intégralité en rendant transparents les tissus initialement opaques (Figure 130). Les clichés obtenus montrent également une internalisation des nanoassemblages (points rouges) au centre des sphéroïdes que ce soit pour FONmag-PAA ou pour FONmag-PAAPEG_{RAFT}.

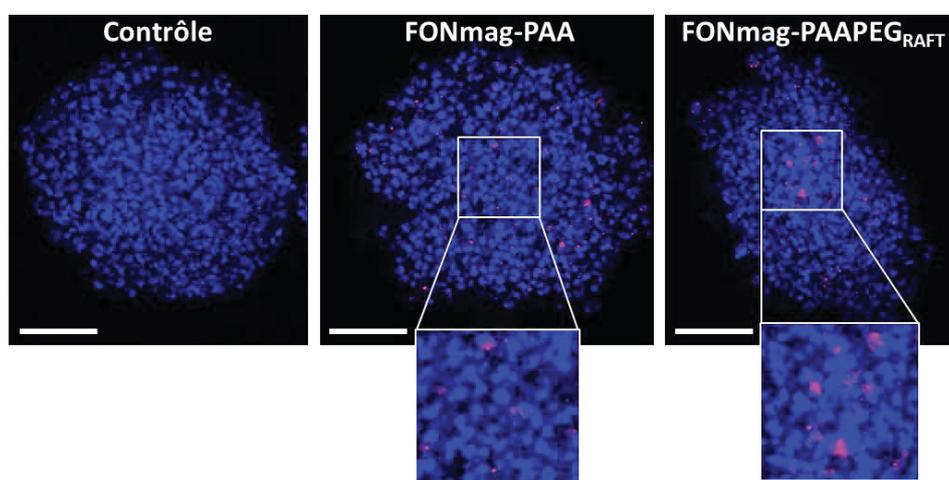


Figure 130 : Clichés de microscopie confocale de fluorescence de sphéroïdes de méso 11 incubés ou non pendant 72 h avec des nanoassemblages magnéto-fluorescents présentant différents polyélectrolytes (PAA et PAAPEG_{RAFT}) ($[Fe] \sim 50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) puis transparisés à l'aide d'une solution de RapiClear®. Les nanoassemblages sont en rouge ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 570\text{--}620 \text{ nm}$) et le noyau est coloré en bleu à l'aide de Hoechst 33342 ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 425\text{--}475 \text{ nm}$). Echelle : 120 μm .

Pour conclure, l'utilisation de FONmag pour l'imagerie de fluorescence de cellules du cancer de la plèvre est possible. Les images obtenues montrent que les nanoassemblages, à l'instar des FONs, sont bien internalisés dans des cellules, à des taux de 0,5 pg de fer par cellule, mais peuvent également diffuser à l'intérieur de sphéroïdes, systèmes mimant le micro-environnement tumoral.

constitués de chaînes en C₁₀ (**22** et **azo22**) fondent plus aisément que ceux basés sur des unités *t*Bu (**6** et **azo6**).

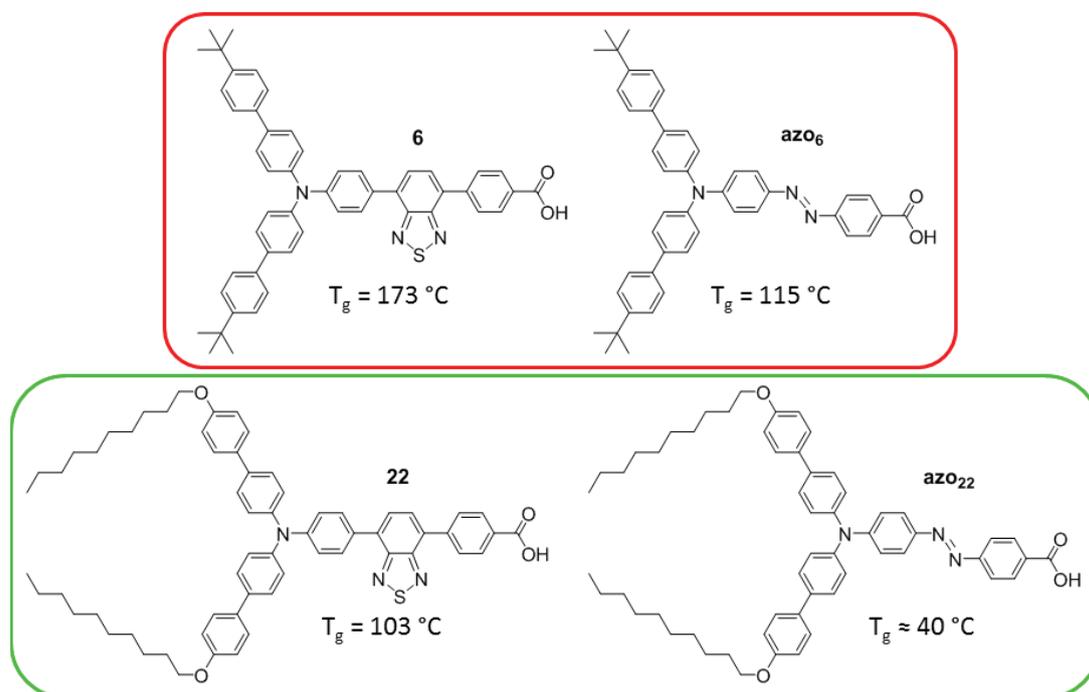


Figure 132 : Structures des molécules utilisées dans cette étude et valeurs de la température de transition vitreuse T_g .

Dans les deux cas, le polymère recouvrant les nano-objets résultants est le polymère modèle **PAA**. Les FONmag sans composé **azo** sont également étudiés pour comparaison. La structure des systèmes est explicitée dans le tableau ci-après (Tableau 51).

Tableau 51 : Présentation des systèmes utilisés dans l'étude du suivi de la libération du composé **azo** par hyperthermie magnétique.

Nom	Cœur organique	Coquille magnétique	Polyélectrolyte
6-FONmag	6	mag ₈	PAA
6-FAONmag	6+azo ₆		
22-FONmag	22		
22-FAONmag	22+azo ₂₂		

V.3.1. Caractérisations structurales, photophysiques et magnétiques

Les images MET des assemblages (Figure 133) et leurs propriétés (Tableau 52) sont décrites ci-après. Les clichés MET révèlent une couverture en NPs magnétiques plus importante pour les nanoassemblages **22-FONmag** et **22-FAONmag** comparés aux nanoassemblages **6-FONmag** et **6-FAONmag**. Ces mêmes systèmes ont également une taille plus importante, ce qui a déjà été observé précédemment lors de l'utilisation de fluorophores hydrophobes (chapitre 2). Enfin, la présence du composé **azo** induit une augmentation de la taille de l'assemblage, ce qui a aussi été noté lors de l'encapsulation d'**azo** ou de **dox** dans les FONs (chapitre 3).

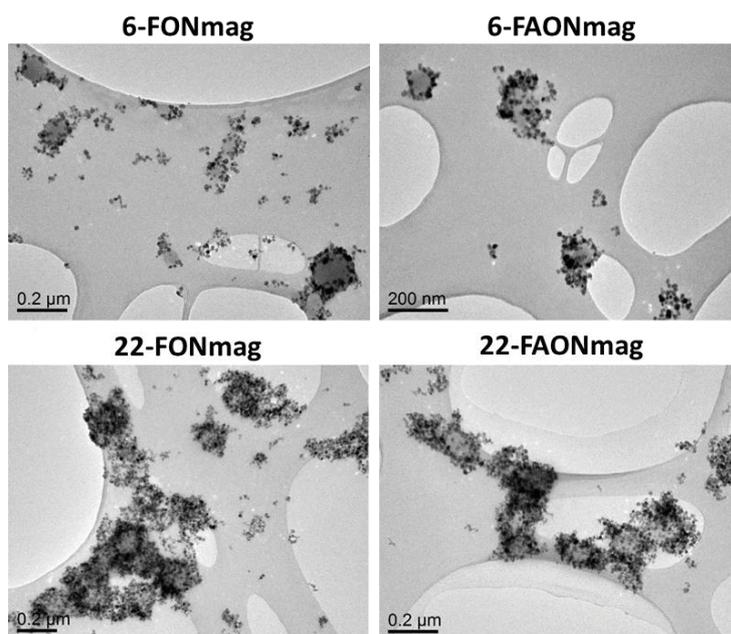


Figure 133 : Clichés MET des FONmag et FAONmag étudiés.

Tableau 52 : Propriétés photophysiques des nanoassemblages hybrides utilisés dans cette étude. Le cœur fluorescent est constitué du fluorophore **6** ou **22**, les nanoparticules magnétiques sont des **mag₁₃** et le polymère est le **PAA**.

FONmag	d_{TEM} (nm)	d_{H} (PDI) (nm)	ζ (mV)	$\Phi_f^{(a)}$ (%)	$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ (nm)
6-FONmag	103 ± 22	120 (0,236)	-57	0,74	324; 475	635
6-FAONmag	122 ± 26	185 (0,250)	-63	0	324; 475	-
22-FONmag	124 ± 31	138 (0,208)	-59	1,79	328; 481	635
22-FAONmag	145 ± 32	174 (0,237)	-61	0	328; 481	-

^(a) Rendement quantique de fluorescence Φ_f calculé par rapport à la coumarine 540A dans l'éthanol ($\Phi_f = 0,38$).

À première vue, d'après les photos MET, on pourrait penser que les nano-objets réalisés à partir du fluorophore **22** sont agrégés. En réalité, nous attribuons ce phénomène au séchage de la goutte de solution sur la grille MET, rassemblant les FONmag. En effet, les mesures de potentiel zêta ($\zeta \sim -60\text{mV}$), de diamètre hydrodynamique ($d_H \sim 154\text{ nm}$) et d'indice de polydispersité (PDI $\sim 0,230$) prouvent que ces systèmes ne sont pas agrégés si bien que les clichés MET ne reflètent pas correctement l'état des FONmag en solution.

Une fois encore les propriétés de fluorescence correspondent à ce qui avait été observé sous forme de FON ou de FONmag₈, à savoir un rendement quantique de fluorescence plus élevé pour les composés à base de **22** et une longueur d'onde d'émission maximale autour de 635 nm. De plus, en observant les spectres d'absorption et d'émission (Figure 134), il apparaît clairement que la fluorescence est éteinte en présence d'azo, comme précédemment observé sous forme de FONs (chapitre 3).

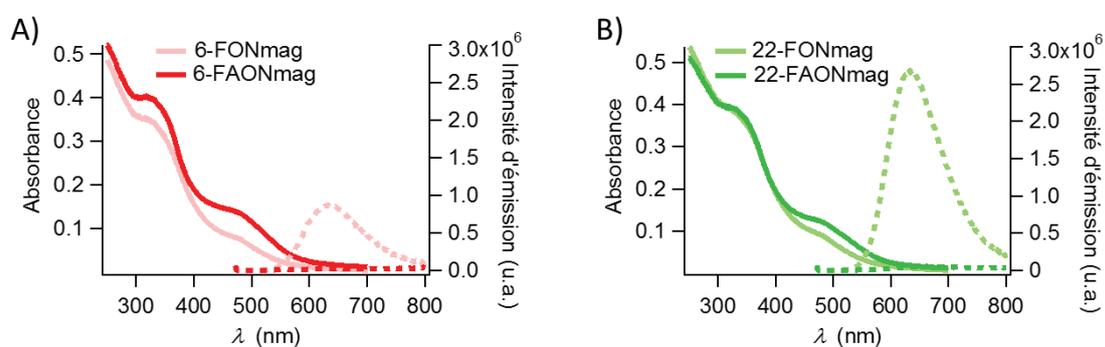


Figure 134 : Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (traits pointillés) des solutions aqueuses de nanoassemblages FONmag A) avec le fluorophore **6** et B) avec le fluorophore **22**. Excitation à 465 nm.

La réponse de ces assemblages sous un champ magnétique alternatif a été étudiée. Intéressons-nous tout d'abord aux mesures des propriétés de chauffage (SAR) des échantillons. L'étude est menée avec 300 μL d'une solution à environ 20 mM en fer (Tableau 53). Les caractéristiques du champ magnétique alternatif ont été fixées à une fréquence f de 342 kHz et une intensité H de 14,3 $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$, correspondant à un produit $H\cdot f$ égal à $4,9\cdot 10^6 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ et donc inférieur à la limite de tolérance pour des applications sur une zone localisée du corps humain (chapitre 1).¹⁵³

Tableau 53 : Concentrations en fer et propriétés magnétiques des échantillons.

	[Fe] ^(a) (mM)	Champ magnétique		SAR ^(b) (W.g ⁻¹)
		f (kHz)	H (kA.m ⁻¹)	
mag₁₃	19,2	342	14,3	121
6-FONmag	19,2	342	14,3	117
6-FAONmag	20,8	342	14,3	102
22-FONmag	21,8	342	14,3	116
22-FAONmag	21,0	342	14,3	139

^(a) Les mesures de concentration en fer [Fe] sont réalisées par ICP-AES. ^(b) Les mesures de SAR ont été effectuées en triplica et calculées à partir de la formule $SAR = \frac{1}{m_{Fe}} \left(\sum_i c_i m_i \frac{dT}{dt} \right)$ détaillée au chapitres 1 et 6.

Les valeurs obtenues sont relativement identiques et satisfaisantes comparées aux données de la littérature. En effet, pour des NPs de magnétite de 10 et 16 nm de diamètre, il est décrit que le SAR avoisine 32 et 61 $\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivement.²³¹ Par comparaison avec les NPs magnétiques **mag₁₃** seules, les assemblages présentent des valeurs de SAR peu différentes (SAR $\sim 121 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$). Une diminution d'environ 20 $\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$ est même observée pour les systèmes **6-FAONmag**. Une explication peut être trouvée dans le fait que les systèmes soient faiblement recouverts de NPs magnétiques. Toutefois, une augmentation du SAR est notée pour les nano-objets avec le fluorophore hydrophobe **22-FAONmag** (SAR $\sim 139 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$). On peut conclure que l'assemblage des NPs magnétiques sous forme de FONmag a peu d'influence sur les propriétés de chauffage.

V.3.2. Étude de la délivrance par hyperthermie magnétique

Après avoir caractérisé d'un point de vue structural, photophysique et magnétique ces assemblages, l'étude de la délivrance du composé azoïque par hyperthermie magnétique est menée. Pour cela, 300 μL de solutions de FONmag à environ 20 mM sont préparés. Chaque solution est soumise à un champ magnétique alternatif pendant une durée de 25 minutes. Les concentrations exactes et les caractéristiques du champ sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 54). 5 μL de la solution sont prélevés à 5, 10, 15, 20 et 30 min pour suivre la cinétique de délivrance et dilués pour obtenir des solutions de 400 μL . Chaque solution est ensuite caractérisée pour déterminer le profil d'échauffement, la concentration en fer et l'intensité d'émission de fluorescence.

Tableau 54 : Concentrations en fer et propriétés magnéto-thermales des échantillons.

	[Fe] ^(a) (mM)	Champ magnétique		ΔT_{max} (K)
		f (kHz)	H (kA.m ⁻¹)	
6-FONmag	21,2	342	14,3	4,5
6-FAONmag	22,1	342	14,3	4,6
22-FONmag	20,6	342	14,3	4,1
22-FAONmag	17,4	342	14,3	4,5

^(a) Les mesures de concentration en fer [Fe] sont réalisées par ICP-AES.

Les courbes d'échauffement des systèmes en fonction du temps sont présentées ci-après (Figure 135A). Chaque système présente des profils semblables avec une élévation de température globale entre 4 et 5 °C (Tableau 54).

Le dosage en fer des différents prélèvements de 5 μL au cours du temps montre une forte variation de la concentration en fer pour les échantillons à base de fluorophore **22** (Figure 135B). Ceci s'explique par une sédimentation des NPs magnétiques au fond du contenant où est effectué le prélèvement. Pour les assemblages à base de fluorophore **6**, ce phénomène est pratiquement absent, les nanoassemblages semblent rester stables dans le temps. L'explication avancée pour expliquer l'instabilité des nanoassemblages à base de fluorophore **22** est un délitement progressif de ceux-ci. En effet, le fluorophore **22** possède une température de transition vitreuse ($T_g = 103$ °C) inférieure à celle du **6** ($T_g = 173$ °C) et peut donc « fondre » plus aisément. Ainsi, à l'inverse des nano-objets à base de fluorophore **6**, ceux à base de **22** semblent se déliter.

L'évolution de l'intensité de fluorescence en fonction du temps est également représentée ci-après (Figure 135C). Une augmentation de la fluorescence plus ou moins marquée est constatée quelle que soit la nature de l'échantillon. Cette augmentation semble confirmer une déstructuration de l'assemblage supramoléculaire. En effet, les NPs magnétiques n'entourent plus l'assemblage et n'éteignent donc plus sa fluorescence.

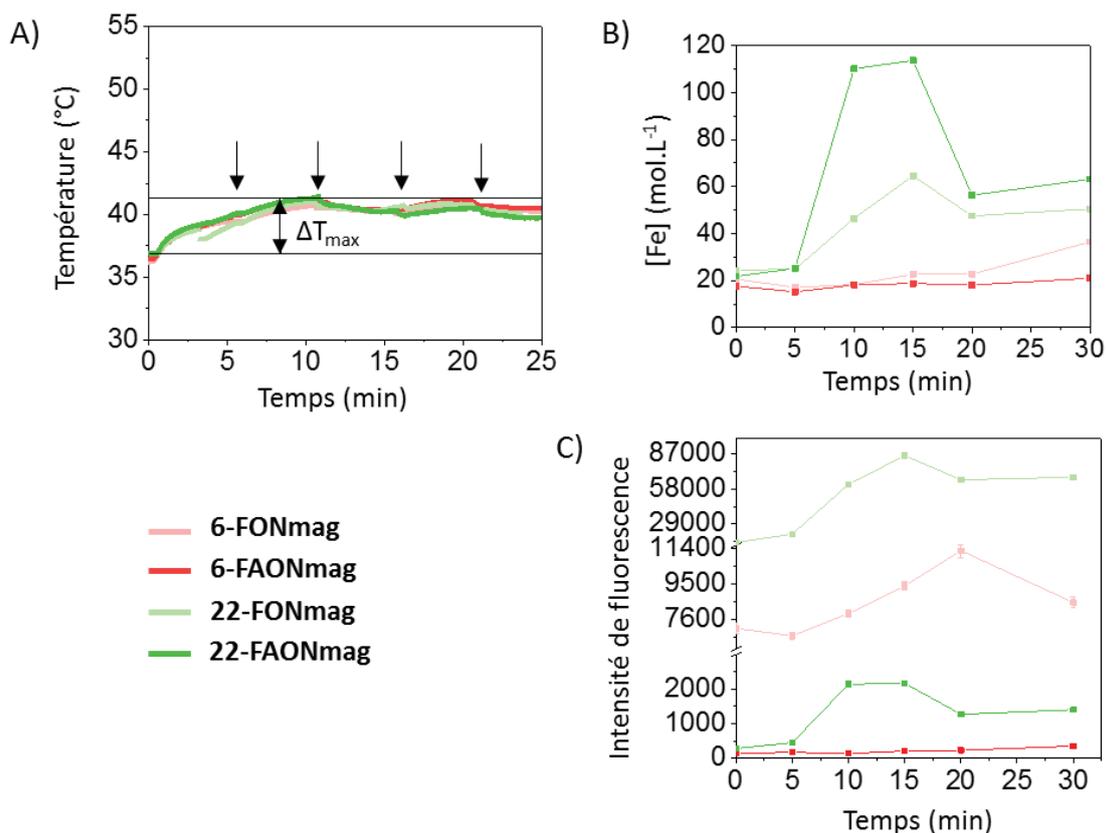


Figure 135 : A) Profil de chauffage des assemblages sous l'effet d'un champ magnétique alternatif ($f = 342$ kHz et $H = 14,3$ kA.m⁻¹). B) Évolution de la concentration en fer au cours du temps. C) Évolution de la fluorescence au cours du temps ($\lambda_{exc} = 465$ nm ; $\lambda_{em.} = 645$ nm).

Les spectres d'émission réalisés cinq jours après les expériences d'hyperthermie tendent à confirmer les observations faites le jour même (Figure 135C), ce qui prouverait que cette déstructuration de l'assemblage est pérenne au cours du temps (Figure 136).

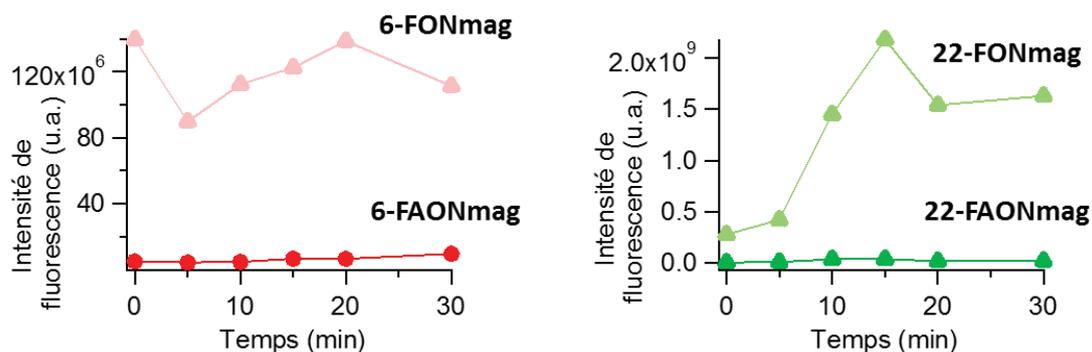


Figure 136 : Évolution du signal de fluorescence en fonction du temps et de la nature des assemblages.

Enfin, il a été noté que la déstructuration supposée des édifices est accompagnée d'un rougissement de la solution (Figure 137). Des études de spectroscopies Raman vont être prochainement menées pour comprendre l'origine de ce changement de couleur qui interroge pour le moment.

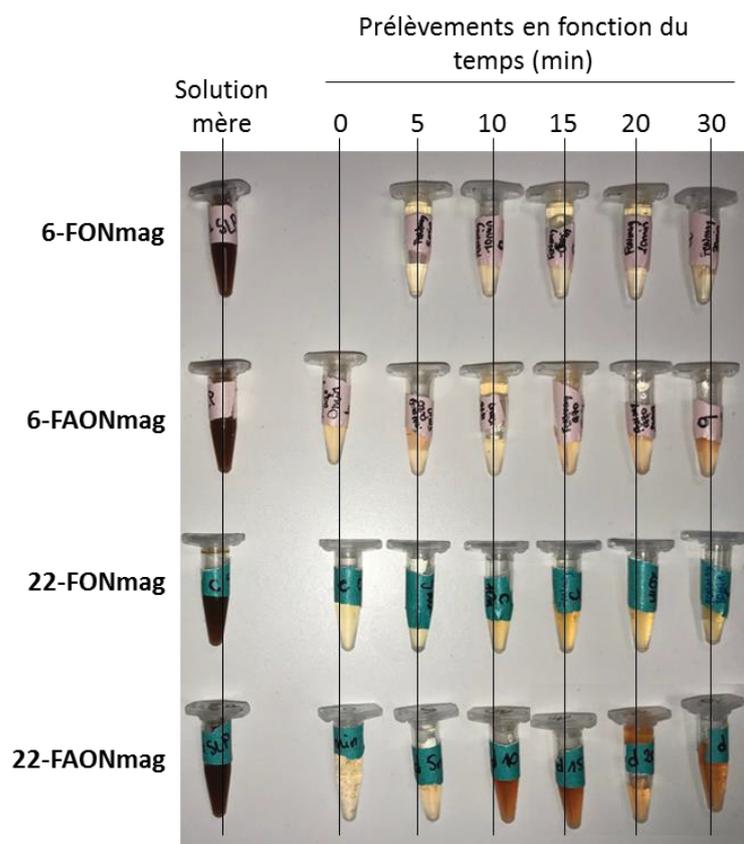


Figure 137 : Photographies de la solution mère et des solutions prélevées aux différents temps après application d'un champ magnétique alternatif ($t=0, 5, 10, 15, 20$ et 30 minutes). On observe un rougisement de la solution en fonction du temps et notamment pour les composés à base de fluorophore 22.

Pour conclure, il semble donc possible de déliter un nanoassemblage à une température de 40°C sur commande à l'aide d'hyperthermie magnétique si sa température de transition vitreuse T_g est inférieure ou égale à 103°C . Ces tests se sont donc révélés prometteurs en ce qui concerne la libération contrôlée d'un principe actif sous stimulus magnétique. Les perspectives résident donc dans la réalisation d'expériences d'hyperthermie sur des cellules ayant internalisé des nano-objets constitués de fluorophore et de principe actif et dans l'étude de la mortalité cellulaire thermo-induite.

V.4. Bio-conjugaison du peptide TAT en surface des nanoassemblages

Le but de cette étude est d'obtenir des outils de diagnostic dans le cadre d'un traitement à base de cellules souches adultes résidentes du muscle, appelées MuStem, pour lutter contre la dystrophie musculaire de Duchenne. Cette maladie génétique neurodégénérative touche les sujets mâles et conduit à des décès prématurés vers l'âge de 20 ans. Pour cela, le potentiel des nanoassemblages hybrides en tant qu'agents de marquage et de suivi de cellules sur le long terme par microscopie de fluorescence sera testé. Leur bio-conjugaison avec le peptide TAT (mentionné au chapitre 1) et les effets sur le devenir des nanoassemblages résultants seront également présentés. En effet, le greffage de TAT devrait provoquer non seulement une rupture endosomale et un relargage dans le cytoplasme après internalisation, mais également un ciblage de la membrane nucléaire.

Dans un premier temps, des études de cytotoxicité et de prolifération seront menées avec les nanoassemblages hybrides sur les MuStem. L'évolution de la répartition des nanoassemblages au cours des cycles de division cellulaire sera étudiée. Ensuite, un protocole utilisant des nano-objets magnéto-fluorescents comme sondes *in vitro* pour du suivi cellulaire sur le long terme sera mis en place. Enfin, le devenir des nanoassemblages *in cellulo* et la possibilité de cibler plus spécifiquement le noyau grâce au greffage du peptide TAT en surface des assemblages seront détaillés (Figure 138). Des études d'internalisation et d'observation sous microscope ont également été menées sur des quantum dots. Ces derniers ont servi de comparatifs pour leur utilisation ubiquitaire comme sondes luminescentes en sciences du vivant.

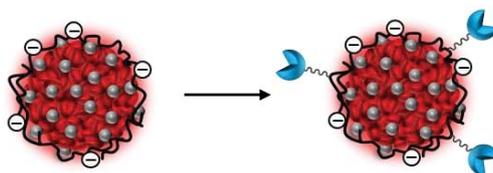


Figure 138 : Représentation schématique de la bio-conjugaison de nano-objets hybrides avec le peptide TAT.

V.4.1. Synthèse des nanoassemblages bio-conjugués

Pour cette étude, des nanoassemblages à base de fluorophore **9**, choisi pour sa brillance et sa bonne capacité à chélater les ions fer, de NPs **mag₈** et de **PAA** seront utilisés. Le **PAA** est choisi pour la présence, dans sa structure, de nombreux acides carboxyliques (24 unités COOH/**PAA**) permettant de greffer des entités biologiques via un couplage peptidique. La bio-conjugaison du peptide TAT s'effectue en deux étapes (Figure 139).

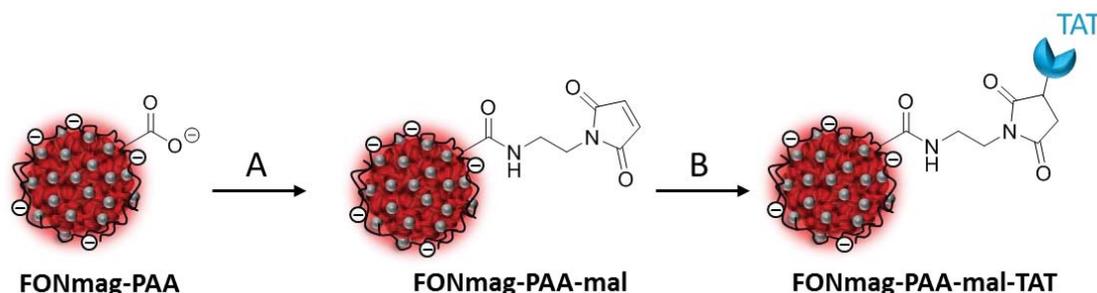


Figure 139 : Représentation schématique de la voie de synthèse pour obtenir des nanoassemblages bio-conjugués avec du TAT **FONmag-PAA-mal-TAT** à partir de nanoassemblages **FONmag-PAA**.

A : 1) EDC, NHS, 2) N-(2-aminoéthyl)maléimide, 3) Dialyse. B : 1) TAT, 2) Vivaspin.

Le greffage du TAT en surface du nanoassemblage nécessite un espaceur moléculaire pour ne pas bloquer l'accès au peptide. Le N-(2-aminoéthyl)maléimide a précédemment prouvé son efficacité en tant qu'espaceur.¹⁰⁶ Celui-ci possède une amine pouvant réagir sur le **PAA** du nanoassemblage et une fonction maléimide. C'est pourquoi le peptide TAT choisi pour cette étude est modifié avec un acide aminé cystéine dont la fonction thiol permettra d'assurer le lien avec le maléimide. Le nombre de chaînes polymères **PAA** par nanoassemblage a été évalué à $\sim 10^4$ **PAA**/**FONmag** en moyenne selon la méthode décrite dans le chapitre 6, ce qui nous permet d'adapter les quantités de lien maléimide ajouté, de toute façon en large excès.

L'ajout du lien procède par l'activation de l'acide carboxylique du **PAA** à l'aide de N-hydroxysuccinimide (NHS) et du N-éthyl-N'-(3-(diméthyl-amino)propyl)carbodiimide (EDC), largement utilisé comme agent de couplage pour les réactions en milieu aqueux. Le NHS appauvrit l'atome porteur de la double liaison C=O, facilitant ainsi l'addition nucléophile de la fonction amine du maléimide. Le sel trifluoroacétate du N-(2-aminoéthyl)maléimide est ajouté après augmentation du pH à 9 pour déprotoner l'ammonium et disposer ainsi d'une amine. Une dialyse avec une membrane présentant un seuil de coupure de 10 kDa élimine l'excès de maléimide. L'assemblage obtenu est appelé **FONmag-PAA-mal**.

Avant couplage, un traitement du TAT-SH avec le tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) est effectué pour réduire les ponts disulfures formés entre les fonctions thiol. Cette réaction s'effectue sous flux de diazote pour éviter toute reformation des liaisons S-S. Après élimination de l'excès de TCEP par dialyse (MWCO = 500-1000 Da), le TAT peut être couplé aux assemblages. La réaction s'effectue également sous flux de diazote pour les mêmes raisons. L'étape de purification de l'excès de peptide s'est révélée très délicate. En effet, le recours à des membranes de dialyse (MWCO = 10 kDa) entraîne une purification longue (72 h), incomplète et laborieuse (devant être menées à 4 °C). La purification par aimantation entraîne

une agrégation irréversible transformant les nanoassemblages en amas micrométriques inutilisables pour les expériences d'internalisation cellulaire. C'est pourquoi des membranes de filtration par centrifugation (MWCO = 100 kDa, Vivaspin®) ont été utilisées et permettent de purifier rapidement et sans induire d'agrégation. L'assemblage final est nommé **FONmag-PAA-mal-TAT**.

D'après les clichés MET (Figure 140), la structure des assemblages bio-conjugués reste intègre, c'est-à-dire qu'ils n'ont pas été détruits par la centrifugation et n'ont pas l'air de s'agréger.

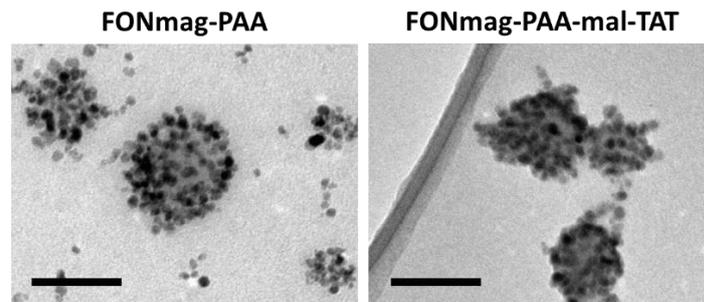


Figure 140 : Clichés de microscopie électronique à transmission (MET) des nanoassemblages **FONmag-PAA** et **FONmag-PAA-mal-TAT**. Echelle : 100 nm.

V.4.2. Caractérisations structurales et photophysiques

Les propriétés structurales sont rassemblées ci-après (Tableau 55). La diminution du potentiel zêta en valeur absolue $|\zeta|$ de 25 mV après greffage du TAT est attribuée au fait que les carboxylates du **PAA**, apportant la charge négative, ont réagi avec le N-(2-aminoéthyl)maléimide mais aussi à la charge positive apportée par les acides aminés du TAT. Le diamètre MET reste sensiblement le même après greffage. La légère diminution de 6 nm après greffage pourrait s'expliquer par l'utilisation des membranes de filtration par centrifugation de 100 kDa de seuil de coupure. En effet, cette taille de pore permet de laisser passer les NPs magnétiques libres donc celles peu solidaires du reste de l'assemblage sont retirées. Cependant, le diamètre hydrodynamique augmente de 68 nm, ce qui serait en faveur d'un greffage du peptide TAT, non détectable en MET. Enfin les valeurs d'indice de polydispersité ($PDI \leq 0,400$) et d'écart type ($\sigma \leq 0,25$) montrent que les suspensions de nanoassemblages présentent une stabilité colloïdale élevée.

Tableau 55 : Propriétés structurales des nanoassemblages hybrides **FONmag-PAA**, **FONmag-PAA-mal** et **FONmag-PAA-mal-TAT**.

Système	d_{MET} (σ) ^(a) (nm)	d_H (PDI) ^(b) (nm)	ζ ^(c) (mV)
FONmag-PAA	75 (0,18)	149 (0,151)	-46
FONmag-PAA-mal	66 (0,15)	140 (0,145)	-22
FONmag-PAA-mal-TAT	69 (0,25)	217 (0,375)	-21

^(a) Diamètre MET d_{MET} obtenu par une distribution en taille sur environ 200 FONs modélisée par une loi log normale. σ est l'écart type de la population. ^(b) Diamètre hydrodynamique d_H obtenu par mesure DLS. PDI est l'indice de polydispersité de la population. ^(c) Potentiel zêta ζ .

Les spectres d'absorption et d'émission ainsi que les déclin de fluorescence sont rassemblés ci-après (Figure 141). Les spectres d'absorption de **FONmag-PAA** et **FONmag-PAA-mal** se superposent excepté celui concernant **FONmag-PAA-mal-TAT**, qui subit un léger décalage hyperchrome. L'émission, quant à elle, présente un décalage hypsochrome de 11 nm après ajout du lien maléimide. Cette différence, même si elle peut paraître faible, avait été précédemment observée lors de la bio-conjugaison d'EGF (facteur de croissance épidermique, présenté au chapitre 1) et est donc la marque d'un greffage réussi.¹⁰⁶

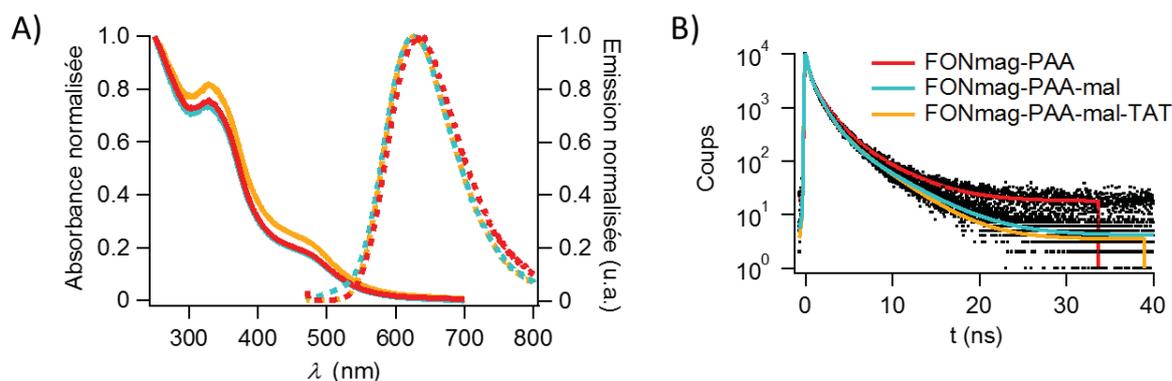


Figure 141 : A) Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (traits pointillés) des nanoassemblages dans l'eau : **FONmag-PAA** (rouge), **FONmag-PAA-mal** (vert) et **FONmag-PAA-mal-TAT** (jaune). Excitation à 465 nm. B) Déclin de fluorescence après modélisation. Excitation à 450 nm, détection à 645 nm.

Le tableau ci-après présente les données concernant les propriétés photophysiques des assemblages (Tableau 56). Les valeurs de rendement quantique restent relativement constantes avant et après greffage ($\sim 0,8-0,9\%$). Les déclin de fluorescence sont modélisés par une loi tri-exponentielle faisant apparaître une diminution du temps de vie moyen $\langle \tau_s \rangle$ après ajout du maléimide, comme observé lors de précédentes études de bio-conjugaison avec la protéine EGF.¹⁰⁶

Tableau 56 : Propriétés photophysiques des nanoassemblages hybrides **FONmag-PAA**, **FONmag-PAA-mal** et **FONmag-PAA-mal-TAT**.

Système	Φ_f ^(a) (%)	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	τ_i (f_i) ^(b) (ns)	$\langle\tau_s\rangle$ ^(c) (ns)
FONmag-PAA	0,8	329; 460	635	4,2 (28%); 1,4 (51%); 0,3 (21%)	2,0
FONmag-PAA-mal	0,9	329; 460	626	4,4 (21%); 1,2 (55%); 0,3 (24%)	1,7
FONmag-PAA-mal-TAT	0,8	329; 460	626	3,7 (27%); 1,1 (53%); 0,2 (20%)	1,6

^(a) Rendement quantique de fluorescence Φ_f calculé par rapport à la coumarine 540A dans l'éthanol ($\Phi_f = 0,38$). ^(b) Composantes τ_i et leurs proportions f_i en intensité, obtenues après modélisation par une loi exponentielle du déclin de fluorescence mesuré à 645 nm après excitation à 450 nm. ^(c) Moyenne des temps de vie $\langle\tau_s\rangle$ calculée à partir des τ_i (f_i).

Pour conclure, des études photophysiques nous ont permis d'attester du greffage du TAT en surface des nanovecteurs dont la structure reste intègre.

V.4.3. Imagerie de cellules MuStem

Les analyses biologiques réalisées dans cette partie ont été effectuée en étroite collaboration avec les biologistes et les microscopistes Karl Rouger, Laurence Dubreuil, Isabelle Leroux et Romain Fleurisson du laboratoire PAnTher (Physiopathologie Animale et bioThérapie du muscle et du système nerveux, UMR 703, INRA, Oniris, Nantes).

V.4.3.1. Etudes de cytotoxicité et de prolifération cellulaire

Des études de cytotoxicité et de prolifération ont été réalisées avec les assemblages **FONmag-PAA**, **FONmag-TAT**. Les tests de viabilité, basés sur la morphologie des cellules, définissent les cellules étalées comme vivantes et les cellules rondes comme en souffrance. La proportion de cellules étalées (~ 94 % pour **FONmag-PAA** et **FONmag-TAT**) étant bien supérieure à celle des cellules rondes (~ 6 %), les systèmes se révèlent atoxiques vis-à-vis des cellules MuStem (Figure 142). L'absence de mortalité significative fait des nanoassemblages synthétisés des objets biocompatibles.

Les mêmes expériences ont été réalisées avec des quantum dots commerciaux (PlasmaChem[®], CdTe fonctionnalisés en surface par des unités COOH, $\lambda_{\max}^{\text{em}} = 650$ nm, $d_{\text{MET}} = 3,8$ nm). Ces sondes lumineuses utilisées en imagerie du vivant ont été choisies de manière à présenter des propriétés d'émission et de fonctionnalisation de surface très proches de celles des FONmag pour éviter tout biais expérimental. On peut observer que la proportion de cellules en souffrance (~ 60 %) est bien plus importante que celle des cellules en bonne santé (~ 40 %). Les Qdots induisent donc une mortalité significative chez les cellules MuStem.

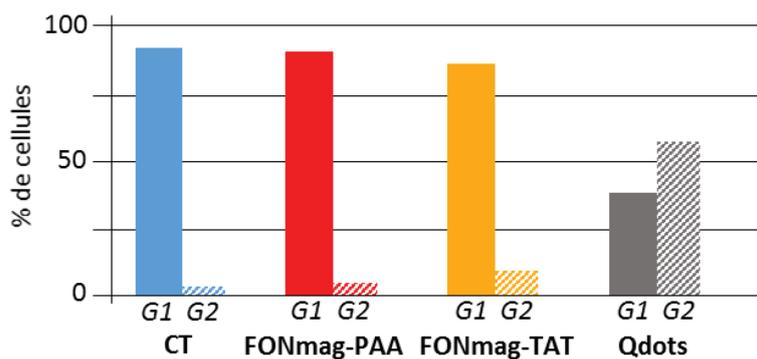


Figure 142 : Morphologie des cellules MuStem observées en lumière blanche après 1 jour d'incubation de ces cellules avec des nanoassemblages avec ou sans TAT ou des Qdots. G1 : cellules étalées, vivantes. G2 : cellules rondes, en souffrance. Résultats obtenus sur 300 cellules.

En outre, l'internalisation des FONmag, que ce soit avec ou sans bio-conjugaison de TAT, ne présente aucune incidence sur la prolifération. En effet, comme le montre le graphe ci-après (Figure 143), le nombre de doublements cellulaires en présence de ces assemblages est le même qu'en leur absence (condition contrôle). Le graphe permet également de constater que l'internalisation des Qdots a un impact délétère sur la prolifération des cellules MuStem. Après 4 jours de contact, on observe 2 doublements de moins par rapport aux FONmag. Cette tendance va en s'aggravant après 8 jours, où 4 doublements en moins sont obtenus par rapport aux FONmag. De plus, pour être observés, ils nécessitent des concentrations 10 à 100 fois plus élevées en nanoparticules que celles des FONmag, rendant ces dernières compétitives en termes de biocompatibilité.

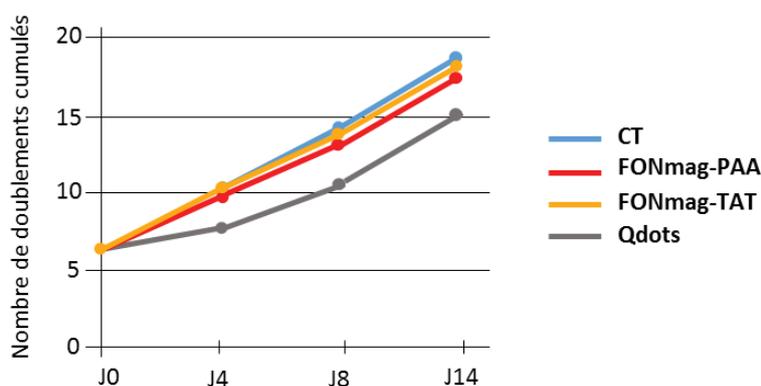


Figure 143 : Effet des nanoparticules sur la prolifération cellulaire. Nombre de doublements cumulés en fonction du temps de contact des nanoassemblages ou des quantum dots avec les cellules.

Ces observations sur la prolifération sont confirmées par des vidéos « timelapse » où une image est acquise en microscopie confocale toutes les 20 minutes pendant 13 h pour chacune des conditions. Les cellules ayant internalisé des FONmag se divisent continuellement et aisément tandis que celles ayant internalisé des Qdots ne se divisent pas.

Ces vidéos montrent également une répartition aléatoire des FONmag dans les cellules MuStem après division cellulaire. En effet, parfois les nanoassemblages sont répartis équitablement et parfois une cellule récupère tout le matériel tandis que l'autre n'en a aucun.

En outre, il est à noter une absence de photosensibilité des assemblages sous irradiation lumineuse répétée. Même après environ 40 irradiations de 1,6 secondes soit environ 1 min au total, les assemblages n'induisent pas la formation d'espèces toxiques pour la cellule.

V.4.3.2. Evolution du marquage cellulaire au cours du temps

L'internalisation des assemblages a ensuite été suivie au cours du temps. Des études de microscopie confocale de fluorescence ont été réalisées à 1, 4, 10 et 14 jours après incubation à une concentration en fluorophore de $0,30 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Pour chacun de ces temps d'incubation, les cellules sont lavées au bout de 24 h pour éliminer les nanoassemblages non internalisés. De cette manière, la cellule se divise avec le matériel internalisé. Des clichés ont été pris en nombre suffisant pour pouvoir quantifier de manière robuste le nombre de cellules marquées à partir d'un comptage à l'œil. Les résultats obtenus sont rassemblés dans la figure ci-après (Figure 144).

Concernant les FONmag, avec ou sans TAT, la totalité des cellules sont marquées et le demeurent à hauteur de 90 à 100 % au bout de 4 jours. La proportion de cellules marquées chute brutalement à environ 7 % pour **FONmag-PAA** et 3 % pour **FONmag-TAT** à 10 jours, puis est nulle après 14 jours. Il est à noter que ces résultats sont indépendants de la quantité de nanoparticules internalisées. En effet, la présence d'une unique particule dans une cellule fait qu'elle compte comme marquée. Ceci explique la chute importante observée après 10 jours.

Les Qdots présentent un pourcentage de cellules marquées bien plus faible après 1 jour (~ 69 %) qui chute drastiquement après 4 jours (~ 2 %). Par comparaison avec les Qdots, les assemblages FONmag permettent donc d'effectuer un suivi des cellules MuStem par imagerie plus long (4 fois plus long).

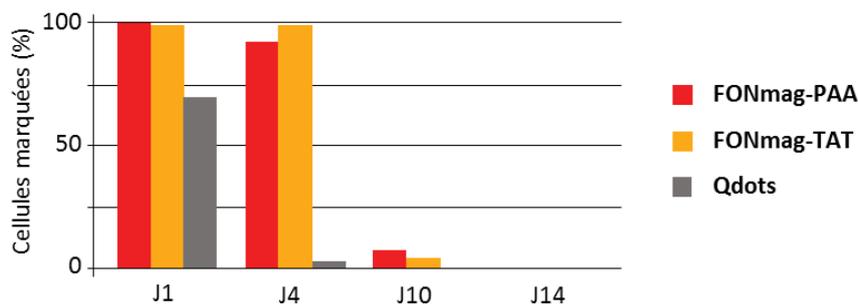


Figure 144 : Evolution du nombre de cellules marquées en fonction du temps d'incubation.

V.4.3.3. Suivi spatio-temporel *in cellulo* des nanoassemblages

L'étude du devenir des objets internalisés est primordiale lorsque leur suivi à long terme est désiré et, en particulier, leur localisation spatio-temporelle dans la cellule. Pour cela, les cellules sont traitées à l'aide de LysoTracker® Green révélant les lysosomes en vert en microscopie de fluorescence. Les nanoassemblages non colocalisés avec les lysosomes sont en rouge ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 680 \text{ nm}$) et ceux colocalisés sont en jaune. Les clichés de microscopie confocale sont pris à 1, 4, 10 et 14 jours après incubation des cellules avec les différents objets (Figure 145).

D'abord, on observe globalement une disparition progressive des nanoparticules, interprétée comme résultant de leur partage continu au cours des cycles de division cellulaire.

Ensuite, après 10 jours, les **FONmag-TAT** apparaissent à côté des lysosomes (points rouges) tandis que les **FONmag-PAA** sont encore localisés majoritairement dans les lysosomes (points jaunes). Ceci tendrait à prouver que l'ajout de TAT permet d'assurer l'échappement endosomal des nanoassemblages hybrides. Ce résultat est appréciable car, si les nanoassemblages ne sont pas dégradés dans les lysosomes, ils permettront de suivre plus longtemps les cellules. De plus, il s'agit d'une première étape dans le marquage des noyaux bien qu'ici aucun ciblage de la membrane nucléaire ne soit malheureusement observé.

La disparition brutale du signal d'émission des Qdots après seulement 4 jours d'incubation est confirmée par les clichés de microscopie. Les images ne laissent apparaître aucun signal attribuable aux Qdots. Ainsi, comparés aux Qdots, les FONmag sont à nouveau plus performants pour le suivi les cellules MuStem car quelques-uns d'entre eux sont encore observables après 14 jours d'incubation. De futures mesures sur seulement quelques cellules incubées avec des FONmag permettront de comprendre le devenir des nanoassemblages après plusieurs jours d'internalisation.

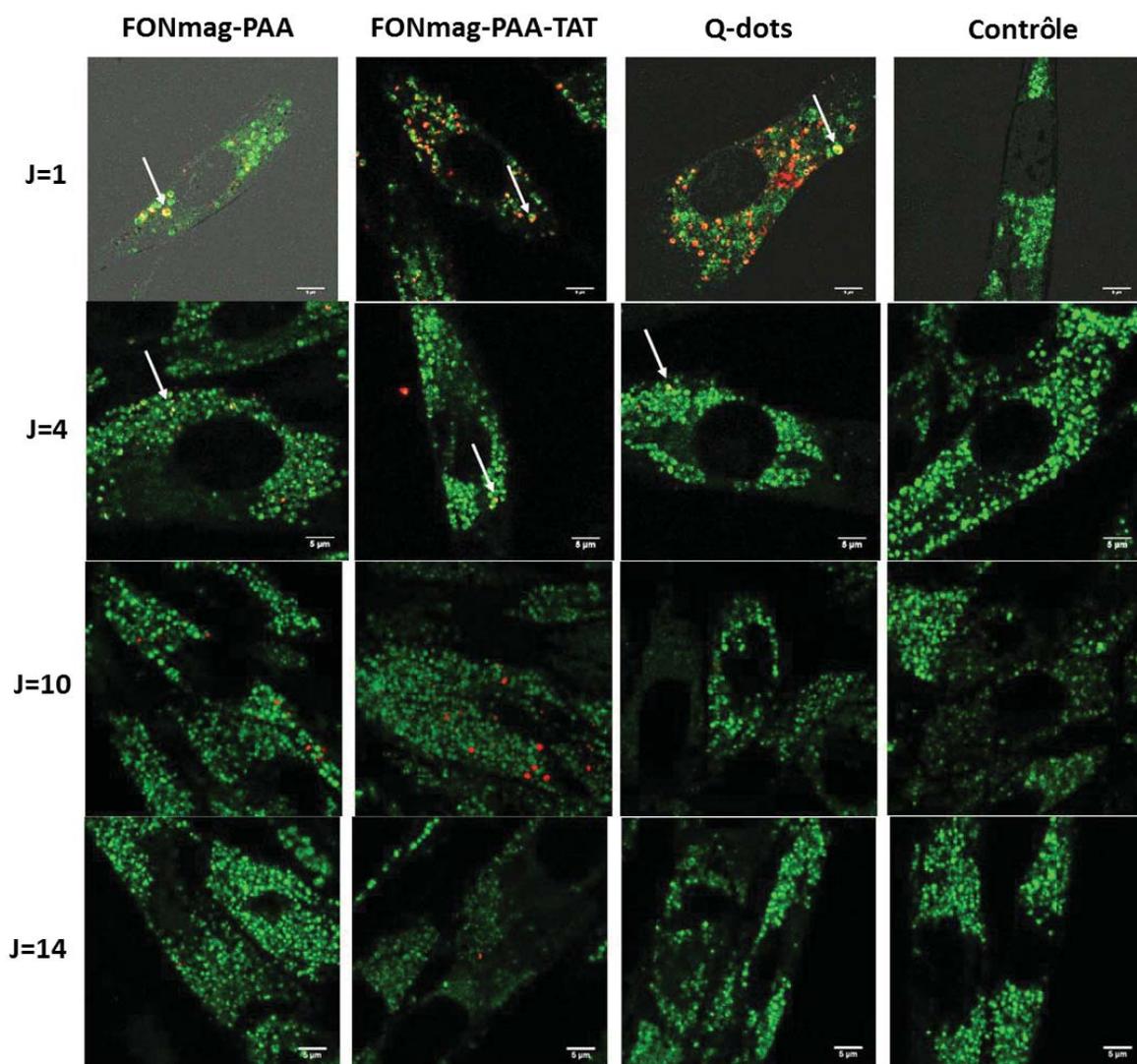


Figure 145 : Clichés de microscopie confocale de fluorescence de cellules MuStem incubées pendant 1, 4, 10 et 14 jours avec des nanoassemblages **FONmag-PAA** et **FONmag-PAA-TAT** ($0,30 \mu\text{mol.L}^{-1}$) et des **Qdots** ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 589-643 \text{ nm}$). Les lysosomes sont colorés en vert à l'aide de **LysoTracker[®] Green** ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 491-536 \text{ nm}$) pour révéler les lysosomes, les nanoassemblages non colocalisés avec les lysosomes sont en rouge ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 589-643 \text{ nm}$) et ceux colocalisés sont en jaune (superposition des deux signaux). Echelle : $5 \mu\text{m}$.

La présence des nanoassemblages dans les endosomes précoces a également été étudiée. Pour cela, la protéine EEA1 (Early Endosome Antigen 1, en anglais) impliquée dans la fusion des endosomes précoces a été détectée avec un système en cascade : anticorps anti-EEA1 combiné à un anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à l'AlexaFluor 488. Les images obtenues révèlent une légère colocalisation entre les assemblages et les endosomes précoces localisés par la présence de l'EEA1 après 1 et 4 jours d'incubation et une absence totale de colocalisation après 10 jours. Ceci signifie que tous les objets étudiés passent très peu de temps dans les endosomes précoces.

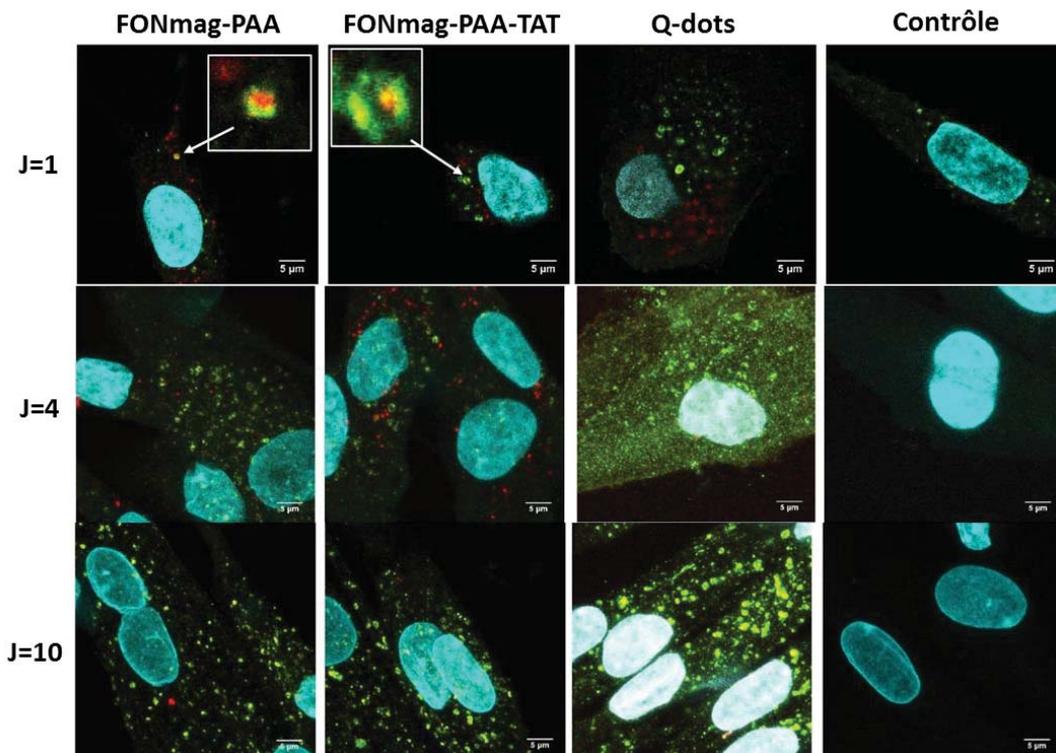


Figure 146 : Clichés de microscopie confocale de fluorescence de cellules MuStem incubées pendant 1, 4 et 10 jours avec des nanoassemblages **FONmag-PAA** et **FONmag-PAA-TAT** ($0,30 \mu\text{mol.L}^{-1}$) et des *Qdots*. Les noyaux sont colorés au DAPI, les endosomes précoces sont colorés en vert à l'aide d'anticorps anti-EEA1 combinés à des anticorps secondaires de chèvre anti-lapin couplés à de l'Alexa Fluor 488 ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 491-536 \text{ nm}$) pour révéler les lysosomes, les nanoassemblages non colocalisés avec les lysosomes sont en rouge ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 491-536 \text{ nm}$) et ceux colocalisés sont en jaune (superposition des deux signaux).

Pour conclure, les assemblages développés sont donc globalement appropriés pour du suivi cellulaire sur le long terme. En effet, à l'inverse des quantum dots, ils ne bloquent pas la prolifération cellulaire, sont non-cytotoxiques et encore observables dans les cellules après 10 jours d'incubation. De plus, les nanoassemblages bio-conjugués avec le peptide TAT assurent l'échappement endosomal. Cependant, aucun ciblage au noyau n'a été constaté.

V.5. Conclusion

Ce chapitre a été l'occasion de montrer que les nanoassemblages hybrides sont internalisés dans les cellules cancéreuses, qu'elles soient arrangées en monocouches ou en sphéroïdes. De plus, les études d'hyperthermie magnétiques ont prouvé la possibilité de déliter l'assemblage pour en libérer un éventuel principe actif encapsulé. Ces résultats sont une première preuve de concept de la potentialité de ces assemblages comme agents théranostiques. Dans cette approche, un principe actif encapsulé dans les nano-objets serait libéré de manière contrôlée à l'aide du stimulus induit par l'hyperthermie magnétique. Enfin, le suivi à long terme des cellules MuStem a également été testé. Par rapport aux Qdots, les systèmes développés ne sont pas cytotoxiques, n'altèrent pas le devenir des cellules en bloquant leur prolifération et permet d'imager jusqu'à 10 jours après internalisation. De plus, la bio-conjugaison de TAT en surface des nano-objets est un succès car elle permet d'augmenter les chances d'échappement endosomal de l'assemblage, nécessaire au suivi sur le long terme des cellules.

Conclusion générale

Ce travail de thèse a permis de démontrer la potentialité des nano-architectures supramoléculaires hybrides couplant des fluorophores et des nanoparticules magnétiques avec une haute densité en unités actives pour des applications en théranostique. Dans un premier temps, l'objectif a été d'améliorer les propriétés de fluorescence et de magnétisme des nano-objets. Dans un second temps, le but a été d'utiliser les nanoassemblages fluorescents pour valider la stratégie d'encapsulation d'un agent anti-cancéreux et le suivi de sa libération *in cellulo*. Enfin, dans un troisième temps, des expériences d'hyperthermie magnétique ont démontré la possibilité de contrôler la dissociation des nanoassemblages hybrides sous l'effet d'un champ magnétique alternatif dans la perspective de contrôler ultérieurement le relargage de principes actifs alors encapsulés. Une bio-conjugaison d'agents de ciblage en surface de ces nanoassemblages a été effectuée afin de cibler la membrane nucléaire de cellules souches dans le cadre de thérapie cellulaire.

La première étape de ce travail a reposé sur la synthèse de fluorophores et de nanoparticules magnétiques plus performants que ceux largement utilisés au laboratoire jusqu'alors. D'un point de vue photophysique, ces nouveaux systèmes, en solution dans le THF, se sont révélés nettement plus brillants (jusqu'à 10^4 contre $700 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ initialement) et dont l'émission est plus décalée vers le rouge (jusqu'à 676 contre 621 nm initialement). Concernant les entités magnétiques, des nanoparticules magnétiques de plus grand diamètre ($\sim 13 \text{ nm}$) ont été obtenues. Malgré quelques soucis d'agrégation rencontrés, nous pouvons espérer une réponse exacerbée sous l'effet d'un champ magnétique par rapport à celle obtenue jusqu'à présent avec des nanoparticules de 8 nm de diamètre. En effet, l'état d'agrégation des systèmes synthétisés n'a pas permis de le confirmer pour le moment. L'assemblage des unités fluorescentes et/ou magnétiques, que ce soit sous forme de FONs ou de nanoassemblages hybrides, s'est avéré être un succès tant au niveau structural que photophysique. Effectivement, des nano-objets sphériques de taille nanométrique (environ 30 nm de diamètre pour les FONs et 80 nm pour les FONmag) et de brillance élevée ($\sim 10^8$ - $10^9 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), jusqu'à 1000 fois supérieure à celle des quantum dots ont été obtenus. Concernant les propriétés magnétiques, le fait d'assembler les NPs sous forme de FONmag a fourni des agents de contraste négatif performants pour l'IRM grâce à leur haute relaxivité transversale r_2 ($r_2 \sim 286 \text{ L.mmol}^{-1}.\text{s}^{-1}$) et leur rapport r_2/r_1 élevé (~ 17).

L'étape suivante a reposé sur l'utilisation de FONs comme agents de marquage *in cellulo*. En effet, la stabilité colloïdale des FONs en conditions biologiques a permis de pousser les observations jusqu'à 3 jours d'incubation cellulaire, contre un jour dans la plupart des études de la littérature. Les FONs ont été internalisées dans différents types de lignées de cellules cancéreuses de la plèvre et du poumon (mésosarcome et ADCA). Une internalisation rapide par endocytose a été obtenue après à peine 3 h d'incubation, malgré la présence d'un potentiel de surface négatif, menant alors à un marquage brillant du cytoplasme. L'encapsulation d'un composé azoïque au sein des FONs a permis d'élaborer un système « OFF/ON » efficace pour suivre le délitement des FONs *in cellulo*, qui s'accompagne d'un recouvrement progressif de leur fluorescence. De la doxorubicine a également été encapsulée avec succès, faisant des FONs

de véritables nanovecteurs théranostiques. En effet, ces systèmes permettent de retarder la diffusion du principe actif vers le noyau de la cellule, passant d'une libération non contrôlée sur quelques heures à une libération prolongée sur plusieurs jours. Concernant les bactéries, un marquage membranaire sélectif et quasiment immédiat (5 min) de la souche *Staphylococcus aureus* a été réalisé grâce à l'utilisation de FONs comportant des unités acides phosphoniques. Une interaction privilégiée entre les FONs comportant ces mêmes groupes acides et les macrophages M2 pro-tumoraux au détriment de M1 anti-tumoraux a également été remarquée. Enfin, un marquage spécifique des monocytes et non des lymphocytes a été démontré, renforçant la capacité d'interactions sélectives des FONs avec le micro-environnement tumoral.

La dernière étape a porté sur l'exploitation des propriétés des nanoassemblages hybrides. Ces derniers ont tout d'abord été internalisés avec succès dans des cellules cancéreuses en monocouche mais également sous forme de sphéroïdes, servant de nouveaux modèles de tumeurs pour minimiser les expérimentations animales. À l'inverse des quantum dots, les nano-systèmes ne bloquent pas la prolifération cellulaire, sont atoxiques et restent encore observables dans les cellules après 10 jours d'incubation (cellules musculaires MuStem). De plus, si la bioconjugaison du peptide TAT en surface des nanoassemblages n'a pas abouti au ciblage de la membrane nucléaire de cellules mésenchymateuses musculaires (MuStem), elle a pu néanmoins assurer leur échappement endosomal. La dégradation *in cellulo* des nano-objets dans les lysosomes a ainsi été minimisée, ce qui est très recherché pour la libération de principes actifs le suivi cellulaire, notamment sur le long terme. En outre, des expériences d'hyperthermie magnétique ont montré qu'un contrôle à distance du délitement des FONmag pouvait être réalisé. En effet, le pouvoir chauffant des assemblages ($SAR \sim 140 \text{ W.g}^{-1}$ avec des NPs de 13 nm) est suffisant pour faire fondre à 40 °C le cœur fluorescent constitué de fluorophores présentant des groupes fluidifiants ($T_g = 103 \text{ °C}$). L'efficacité de l'hyperthermie magnéto-induite peut être efficacement modulée en fonction de la nature des NPs magnétiques mais également des propriétés structurales des fluorophores et de leurs interactions intermoléculaires au sein des FONs.

Ainsi, des nanomatériaux magnéto-fluorescents multimodaux pouvant encapsuler un principe actif ont été développés. Tout en étant biodégradables, ces systèmes offrent une combinaison efficace et originale de bio-imagerie multi-échelle et de vectorisation contrôlée de principes actifs, ce qui les rend compétitifs par rapport à d'autres objets développés dans ce domaine d'application.

Perspectives

De nombreuses perspectives s'ouvrent à la suite de ces travaux.

En ce qui concerne l'obtention de nanoparticules magnétiques plus performantes, il sera primordial de finaliser les études pour confirmer l'amélioration des propriétés magnétiques et de contraste IRM. Les analyses magnétiques sur les nanoparticules magnétiques de 13 nm ont été réitérées. Les résultats encourageants obtenus tout récemment aboutiront à des expériences IRM de nanoassemblages injectés dans des modèles murins, résultat indispensable pour tendre vers des applications *in vivo*.

À propos de l'utilisation des nano-composés en tant que labels fluorescents, il sera intéressant de mieux comprendre la nature de leurs interactions avec les cellules. Pour les bactéries, des études complémentaires pourront être menées pour mieux appréhender les interactions impliquées dans le marquage membranaire. La nature de la couronne de protéines formée autour des nanoassemblages sera également un point important à soulever pour mieux comprendre les mécanismes d'internalisation dans les cellules et d'intractions avec les bactéries. Pour les macrophages, des études de différenciation du phénotype pourront être réalisées en incubant au préalable des FONs dans des monocytes évoluant en macrophages. Ces expériences permettront d'observer si les FONs ont un impact sur l'évolution des macrophages en phénotype M1 ou M2. Enfin, il sera aussi nécessaire de poursuivre les expériences de bio-conjugaison pour greffer différents types de protéines, d'acide nucléique ou d'anticorps dans le but d'obtenir un ciblage accru vers l'organite cellulaire désiré, notamment dans le cadre du traitement de tumeurs solides.

Au sujet de la commande à distance des propriétés thérapeutiques des nanoassemblages, les essais d'hyperthermie magnétique effectués à l'aide d'un composé modèle mimant le principe actif pourront être étendus à des systèmes encapsulant des médicaments. Ceci permettra de contrôler la libération du médicament et de ne plus compter sur sa diffusion passive hors du nanovecteur par délitement naturel dans les endosomes. Des expériences *in cellulo* sur ces nano-systèmes pourront être planifiées pour confirmer la mort cellulaire induite sous l'effet d'un champ magnétique alternatif externe. De plus, le guidage magnétique pourra être exploité pour la pénétration et le traitement facilité de biofilms bactériens à l'aide de FONmag chargés en antibiotiques (vancomycine, daptomycine).

Chapitre VI : Partie expérimentale

VI.1. Organic compounds	204
VI.1.1. Organic compound characterizations	204
<i>General procedure</i>	204
<i>NMR Spectroscopy</i>	204
<i>Low resolution mass spectroscopy</i>	204
<i>High resolution mass spectroscopy</i>	204
<i>Thermal scanning calorimetry analyses</i>	204
VI.1.2. Photophysical experiments	204
<i>UV-visible absorption spectroscopy</i>	204
<i>Fluorescence spectroscopy</i>	205
<i>Fluorescence intensity decays</i>	205
VI.2. Syntheses of photoactive organic compounds	206
VI.3. Nanoassemblies	221
VI.3.1. Nanoassembly characterizations	221
<i>Size and surface potential</i>	221
<i>Electronic microscopy</i>	221
<i>Fluorescence microscopy</i>	221
<i>Magnetic measurements</i>	221
<i>NMR relaxometry</i>	222
<i>Magnetic hyperthermia of aqueous suspensions</i>	222
<i>Iron titration</i>	223
<i>Quantification of the number of PAA chains per FONmag nanoassembly</i> ²³³	223
VI.3.2. Syntheses of organic nanospheres	225
VI.3.2.1. General procedure	225
<i>Synthesis of fluorescent organic nanospheres (FONs)</i>	225
VI.3.2.2. Azo-doped FONs	225
<i>Synthesis of fluorescent azo organic nanospheres (FAONs)</i>	225
<i>Synthesis of azo organic nanospheres (AONs)</i>	225
<i>Synthesis of FON+AON</i>	225
VI.3.2.3. Doxorubicin-doped FONs	225
<i>Synthesis of mixed FONs</i>	225
<i>Synthesis of neutral doxorubicin (dox)</i>	225

<i>Synthesis of dox-doped FONs</i>	226
<i>Synthesis of adducts of FONs with dox.HCl</i>	226
VI.3.3. Syntheses of hybrid nanoassemblies	227
VI.3.3.1. Iron oxide nanoparticle synthesis	227
VI.3.3.2. Magnetic nanoassemblies	229
<i>Synthesis of magnetic nanoassemblies (mag-PAA)</i>	229
VI.3.3.3. Magneto-fluorescent nanoassemblies	229
<i>Synthesis of magneto-fluorescent nanoassemblies (FONmag-polyelectrolyte)</i>	229
<i>Synthesis of magneto-azo nanoassemblies (FAONmag-PAA)</i>	230
<i>Lyophilization</i>	230
<i>Re-dispersion procedure</i>	230
VI.3.3.4. TAT-bioconjugated nanoassemblies	230
<i>Synthesis of FONmag-PAA-mal</i>	230
<i>Synthesis of FONmag-PAA-mal-TAT</i>	231
VI.4. Biological studies in cellulose	232
VI.4.1.1. Azo-doped FONs (FAONs)	232
<i>Cell culture</i>	232
<i>Azo-free and azo-doped FON internalization</i>	232
<i>Confocal fluorescence imaging</i>	232
VI.4.1.2. Doxorubicin-doped FONs	232
<i>Cell culture</i>	232
<i>Dox-free and dox-doped FONs internalization</i>	232
<i>Cell viability assay</i>	233
<i>Confocal fluorescence imaging</i>	233
VI.4.1.3. FONmag with different polymers	233
<i>Cell culture and multicellular spheroid formation</i>	233
<i>FONmag internalization</i>	233
<i>Clearing of multicellular spheroids</i>	234
<i>Cell viability assay</i>	234
<i>Confocal fluorescence imaging</i>	234
VI.4.1.4. TAT-bioconjugated nanoassemblies	234
<i>Cell culture and internalization</i>	234
<i>TAT-free and TAT-functionalized FON internalization</i>	234
<i>Flow cytometry</i>	235
<i>Cell proliferation experiments</i>	235
<i>Immunofluorescence Analysis</i>	235

<i>Confocal fluorescence imaging</i>	235
VI.4.1.5. Bacteria	235
VI.4.1.6. Monocytes, lymphocytes and macrophages.....	236
<i>Lymphocyte and monocyte culture and FON internalization</i>	236
<i>Monocyte differentiation and FON internalization in macrophages</i>	236

VI.1. Organic compounds

VI.1.1. Organic compound characterizations

General procedure

All chemical reagents and solvents were purchased from commercial sources (Aldrich, Acros, SDS) and used as received. The azobenzene derivative (azo) was previously obtained in 6 steps with a global yield of 40 %.^{167,201} Spectroscopic grade solvents purchased from Aldrich were used for spectroscopic measurements. All air-sensitive reactions were performed under argon or nitrogen using a vacuum line. Analytical TLC was performed on Kieselgel F-254 pre-coated plates. Visualization was done using a UV lamp. Flash chromatography was carried out using silica gel 60 (230–400 mesh) from SDS.

NMR Spectroscopy

¹H NMR, ¹³C NMR, ³¹P NMR spectra were recorded on Bruker 300 MHz or 400 MHz spectrometers. Chemical shifts δ were reported in ppm relative to TMS and referenced to the residual deuterated solvent.

Low resolution mass spectroscopy

Low-resolution mass spectra (LRMS) were obtained by electrospray ion trap mass spectrometry (LC-Esquire, Bruker) in a positive-ion mode.

High resolution mass spectroscopy

High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained either by electrospray ionization (EI) coupled with a high resolution ion trap orbitrap (LTQ-Orbitrap, ThermoFisher Scientific) or by MALDI TOF-TOF (Autoflex III, Bruker), both working in positive-ion mode.

Thermal scanning calorimetry analyses

Thermal properties were measured by using differential scanning calorimetry (Netzsch- Maia DSC 200 F3) in alumina caps under a nitrogen flow at a scan rate of 20 °C.min⁻¹ over the temperature range [-10°C - 250°C].

VI.1.2. Photophysical experiments

UV-visible absorption spectroscopy

UV-visible absorption spectra were recorded using a Varian Model Cary 5E spectrophotometer (175-3300 nm). This apparatus is equipped with an integrating sphere DRA 2500 (205-2500 nm), useful for the analysis of hybrid nanoassemblies. Molar absorption coefficients ϵ were obtained thanks to Beer-Lambert law by an average of at least two distinctly prepared solutions with less than 10% variation.

Fluorescence spectroscopy

A Fluorolog 2 spectrofluorimeter was used (Jobin-Yvon/Horiba). Solutions were previously diluted in order to get an absorbance around 0.1 to avoid inner filter effects. Correction for the emission spectra with regard to the spectral response of the detector was automatically applied. Most of the time, excitation was performed at 465 nm and emission recorded from 472 to 800 nm. The fluorescence quantum yield of species *i* ($\phi_f(i)$) was determined in solution, referred to coumarin 540 A in ethanol ($\phi_f(\text{ref}) = 0.38$),²³² thanks to the relation :

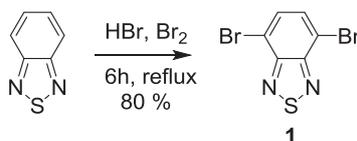
$$\phi_f(i) = \phi_f(\text{ref}) \cdot \frac{I_{\text{em},i}}{I_{\text{em},\text{ref}}} \cdot \frac{n_i^2}{n_{\text{ref}}^2} \cdot \frac{(1 - 10^{-A(\text{ref})})}{(1 - 10^{-A(i)})}$$

with $\phi_f(\text{ref})$ is the reference fluorescence quantum yield, $I_{\text{em},i}$ and $I_{\text{em},\text{ref}}$ are the integrals of the emission spectra of the species *i* and reference obtained at the same excitation wavelength, n_i and n_{ref} are the refractive indices of solvent in which the species *i* and reference were dissolved and $A(i)$ et $A(\text{ref})$ are the absorbance of the species *i* and reference at the excitation wavelength.

Fluorescence intensity decays

Fluorescence time decays were measured in water or HBSS using the fully automated spectrofluorimeter (model Fluotime 300, PicoQuant) following the time-correlated photon counting method. Excitation was performed using a pulsed laser diode (LDH-D-C-450B) working at 450 ± 10 nm with a 70 ps full width at half maximum, or a pulsed LED (PLS 340) working at $340 \text{ nm} \pm 10$ nm with a 500 ps full width at half maximum. Fluorescence decays were recorded using a Hybrid-PMT detector combined with an acquisition temporal resolution up to 25 ps. Long-pass edged filters purchased from Semrock centered at 473 nm (BPL01-473R-25) or 355 nm (BPL01-355R-25) were used to discard any possible contribution of excitation light scattering by the nanoassembly solutions. Fluorescence decays were fitted by a multi-exponential law.

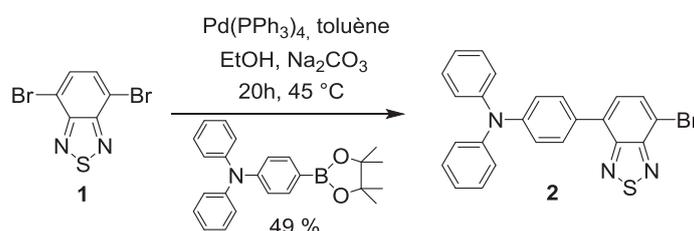
VI.2. Syntheses of photoactive organic compounds



4,7-dibromo-2,1,3-benzothiadiazole **1**. To a solution of benzothiadiazole (1.17 g, 8.6 mmol, 1 eq.) in HBr (15 mL) was added dropwise a solution of Br₂ (4.12 g, 1.33 mL, 25.8 mmol, 3 eq.) in HBr (20 mL). The mixture was refluxed for 6 h. After cooling at room temperature, the solution was alkalized with KOH, then a solution of Na₂S₂O₃ was added. After filtration and washing with water and then water:ethanol 1:1, compound **1** was isolated as a white powder (1.99 g, 80 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.73 (s, 2H).

HRMS: m/z(ESI+) 292.8380 ([M]⁺ = C₆H₃N₂SBr₂⁺ requires 638.8378).

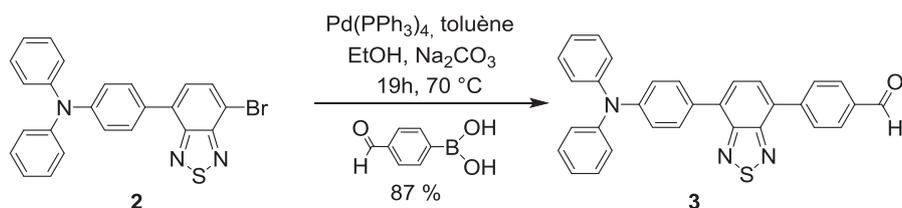


4,7-bromobenzo[2,1,3]*thiadiazol-4-yl*-*N,N*-*diphenylaniline* **2**. To a solution of **1** (1.2 g, 4.1 mmol, 1.5 eq.) in toluene (24 mL) were added 4-(diphenylamino) phenylboronic acid pinacol ester (1.0 g, 2.7 mmol, 1 eq.), ethanol (16 mL), and a solution of Na₂CO₃ (16 mL, 2 mol.L⁻¹). The solution was degassed with argon and Pd(PPh₃)₄ (1.5 %mol, 50 mg, 0.04 mmol, 0.02 eq.) was added. The reaction was carried out at 45 °C overnight. CH₂Cl₂ was added and the organic layer was washed three times with water. The product was purified by silica gel chromatography using a gradient of eluents (dichloromethane:petroleum ether, 0:100 to 20:80) to provide **2** (601 mg, 49 %) as an orange solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.89 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.32 (m, 4H), 7.21 (m, 6H), 7.10 (dt, *J* = 7.2 Hz, *J* = 2.2 Hz, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 154.0, 153.2, 148.5, 147.4, 133.5, 132.4, 130.0, 129.9, 129.5, 127.3, 125.1, 123.6, 122.7, 112.2.

HRMS: m/z(ESI+) 458.0310 ([M+H]⁺ = C₂₄H₁₇BrN₃S⁺ requires 458.0327).

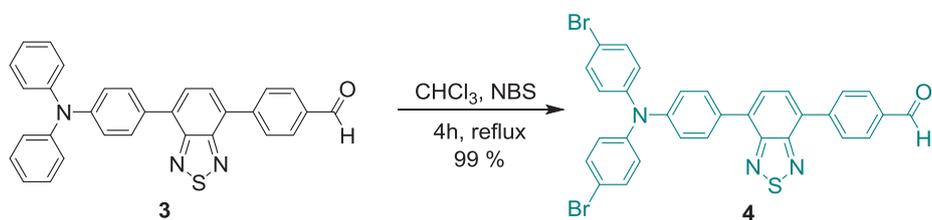


*4-(7-(4-(diphenylamino)phenyl)benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-4-yl)benzaldehyde 3*. To a solution of **2** (0.53 g, 1.15 mmol, 1 eq.) in toluene (9 mL) were added 4-formylphenylboronic acid (190 mg, 1.27 mmol, 1.1 eq.), ethanol (7 mL) and an aqueous solution of Na₂CO₃ 2M (7 mL). The mixture was degassed with argon and Pd(PPh₃)₄ (3 %mol, 40 mg, 0.03 mmol, 0.03 eq.) was added. The reaction was carried out at 70 °C for one night. CH₂Cl₂ was added and the organic layer was washed three times with water. The product was purified by chromatography (CH₂Cl₂:petroleum ether, from 0:100 to 20:80) to provide **3** (483 mg, 87 %) as an orange solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.12 (s, 1H), 8.17 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 8.06 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.86 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.31 (t, *J* = 7.4 Hz, 4H), 7.21 (m, 6H), 7.08 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 192.0, 154.1, 154.0, 148.5, 147.5, 143.5, 135.8, 134.2, 131.0, 130.4, 130.1, 130.1, 129.9, 129.5, 129.2, 127.1, 125.2, 123.6, 122.7.

LRMS: m/z(EI-TOF) 484.2 ([M]⁺=C₃₁H₂₁N₃OS⁺ requires 484.1).

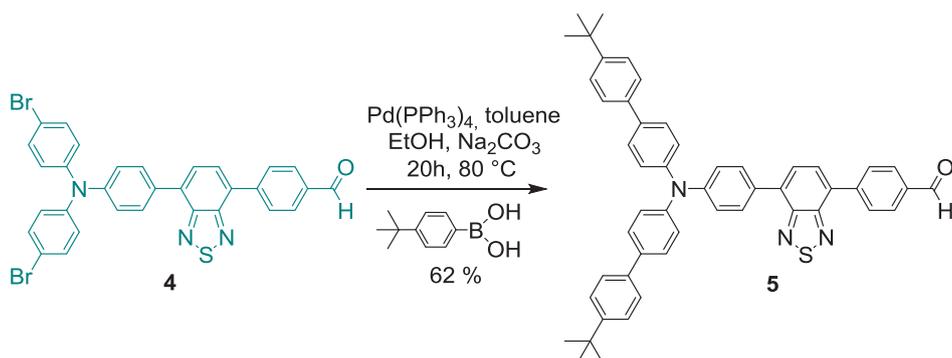


*4-(7-(4-(bis(4-bromophenyl)amino)phenyl)benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-4-yl)benzaldehyde 4*. To a solution of **3** (473 mg, 0.98 mmol, 1 eq.) in chloroform (30 mL), was added N-bromosuccinimide (358 mg, 2 mmol, 2.05 eq.). The mixture was refluxed for 4 h. CHCl₃ was removed under reduced pressure and acetonitrile was added, the product was precipitated in water to provide a red solid (620 mg, 99 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.11 (s, 1H), 8.17 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.20 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.04 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 192.0, 154.1, 154.0, 147.5, 146.2, 143.4, 135.9, 133.8, 132.7, 131.7, 131.4, 130.4, 130.1, 129.9, 129.1, 127.4, 126.3, 123.5, 116.4.

HRMS: m/z(ESI⁺) 638.9626 ([M]⁺= C₃₁H₁₉N₃OSBr₂⁺ requires 638.9616).

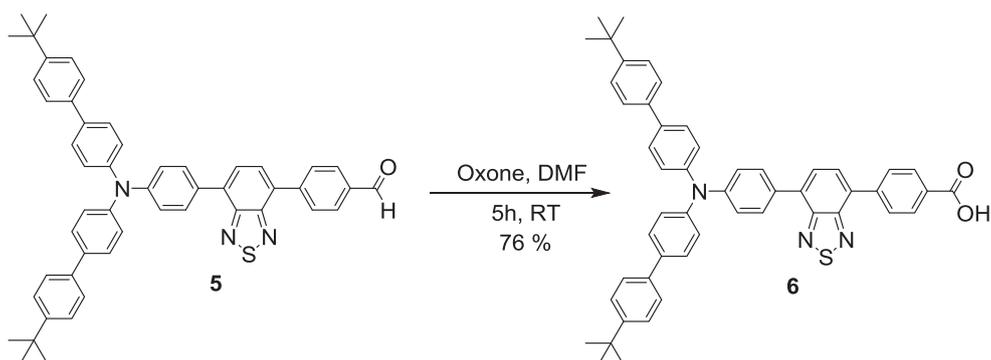


4-(7-(4-(bis(4'-(tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazol-4-yl)benzaldehyde **5**. To a solution of **4** (619 mg, 0.97 mmol, 1 eq.) in toluene (10 mL) Pd(PPh₃)₄ (3 % mol, 35 mg, 0.03 mmol, 0.03 eq.) was added. The mixture was degassed with argon. 4-tert-butylphenylboronic acid (433 mg, 2.43 mmol, 2.5 eq.) dissolved in methanol (2 mL) and a solution of Na₂CO₃ 2M (2 mL) were added. The reaction was carried out at 80° C for one night. Dichloromethane was added and the organic layer was washed three times with water. The product was purified by silica gel chromatography using a gradient of eluents (CH₂Cl₂:petroleum ether, 0:100 to 20:80) to provide a red solid (450 mg, 62 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.12 (s, 1H), 8.18 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 8.06 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.95 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.87 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.5 Hz, 8H), 7.48 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H), 7.30 (t, *J* = 8.5 Hz, 6H), 1.38 (s, 18H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 192.0, 154.2, 154.0, 150.1, 148.3, 146.4, 143.6, 137.8, 136.2, 135.8, 134.2, 131.1, 130.8, 130.3, 130.1, 129.9, 129.2, 128.0, 127.2, 126.5, 125.9, 125.2, 123.2, 34.6, 31.5.

HRMS: m/z(ESI+) 747.3258 ([M]⁺ = C₅₁H₄₅N₃OS⁺ requires 747.3283).



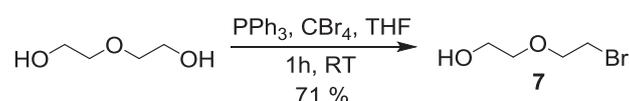
4-(7-(4-(bis(4'-(tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazol-4-yl)benzoic acid **6**. To a solution of aldehyde **5** (0.75 g, 1 mmol, 1 eq.) in DMF (6 mL) was added oxone (0.92 g, 3 mmol, 3 eq.). The reaction mixture was allowed to stir at room temperature for 5 h. The resulting thick reaction mixture was dissolved in dichloromethane and washed three times with water. The extracted organic phase was washed further with NaCl and dried over anhydrous Na₂SO₄. After solvent removal under reduced pressure, the product was purified by

silica gel chromatography using a gradient of eluents (dichloromethane:methanol, 100:0 to 98:2) to obtain compound **6** as an orange powder (0.75 g, 76 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.29 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.10 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.83 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 8H), 7.47 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H), 7.32 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H), 1.38 (s, 18H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 171.4, 154.2, 154.0, 150.1, 148.2, 146.4, 142.9, 137.8, 136.2, 134.0, 131.3, 130.9, 130.6, 130.3, 129.4, 129.1, 128.8, 128.0, 127.2, 126.5, 125.9, 125.2, 123.3, 34.7, 31.5.

HRMS: m/z(ESI+) 763.3215 ([M]⁺ = C₅₁H₄₅N₃O₂S⁺ requires 763.3232).

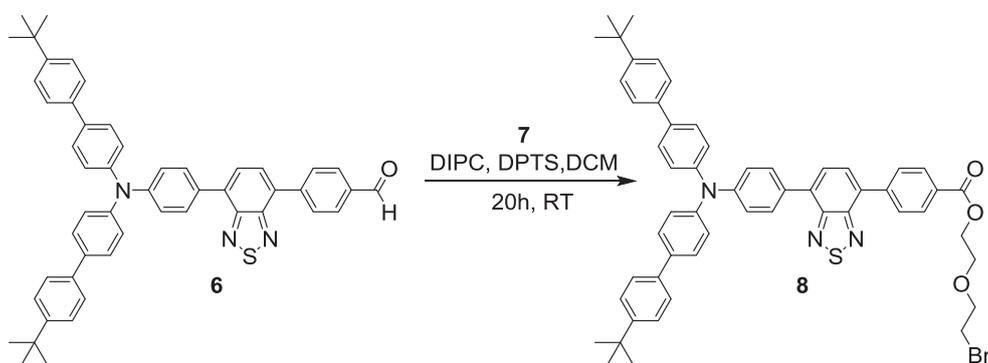


2-(2-bromoethoxy)ethanol **7**. To a solution of diethylene glycol (5 g, 47.1 mmol, 3 eq.) and triphenylphosphine (4.12 g, 15.7 mmol, 1 eq.) in anhydrous tetrahydrofuran (10 mL), previously cooled at 0 °C, was added carbon tetrabromide (5.21 g, 16.6 mmol, 1 eq.) portionwise to avoid overheating of the solution. The reaction mixture was allowed to stir at room temperature for 2 h. After solvent removal under reduced pressure, the crude oil was purified by silica gel chromatography (ethyl acetate:petroleum ether, 1:1) to obtain compound **7** as a colorless oil (1.88 g, 71 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.82 (t, 2H, *J* = 5.8 Hz), 3.75 (m, 2H, *J* = 4.2 Hz), 3.62 (m, 2H, *J* = 4.2 Hz), 3.49 (t, 2H, *J* = 5.9 Hz).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 72.2, 71.0, 61.8, 30.6.

LRMS (CI-NH₃): m/z 186.01 ([MNH₄]⁺ = C₄H₉BrO₂NH₄⁺ requires 186.11).



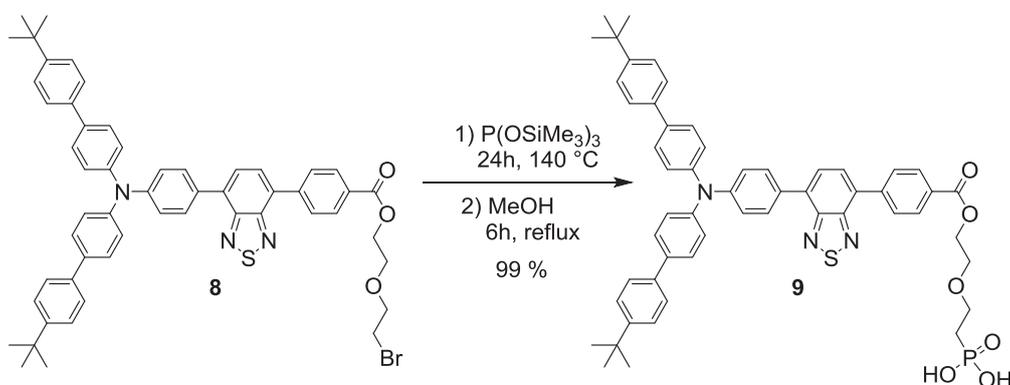
2-(2-bromoethoxy)ethyl *4-(7-(4-(bis(4'-(tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-4-yl)benzoate* **8**. To a mixture of **7** (65.9 mg, 0.39 mmol, 1 eq.), **6** (299 mg, 0.39 mmol, 1 eq.) and 4-(dimethylamino)pyridinium 4-toluenesulfonate (57.4 mg, 0.20 mmol, 0.5 eq.) in dichloromethane (15 mL) was added N,N'-diisopropylcarbodiimide (121 μL, 0.78 mmol, 2 eq.). The reaction mixture was allowed to stir at room temperature for 20 h.

The reaction mixture was evaporated under reduced pressure and purified by silica gel chromatography (dichloromethane) to provide compound **8** as a red powder (200 mg, 51 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.08 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.94 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.82 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 8H), 7.47 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H), 7.30 (t, *J* = 9.1 Hz, 6H), 4.55 (m, 2H), 3.90 (m, 4H), 3.52 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 1.37 (s, 18H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 166.64, 154.27, 150.30, 146.60, 142.39, 137.98, 136.38, 134.07, 131.62, 130.32, 129.77, 129.49, 129.15, 128.17, 127.44, 126.06, 125.33, 123.46, 71.50, 69.50, 64.39, 34.85, 31.71, 30.58.

HRMS: m/z(ESI+) 913.2912 ([M]⁺ = C₅₅H₅₂N₃O₃BrS⁺ requires 913.2907).



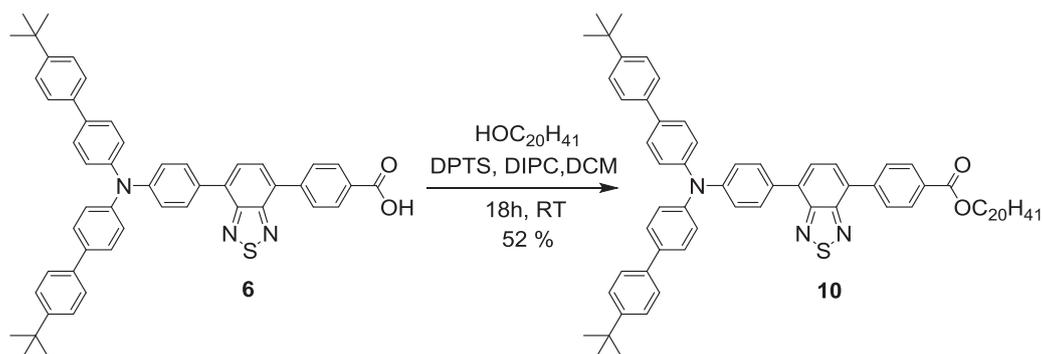
(2-(2-((4-(7-(4-(bis(4'-(tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-4-yl)benzoyl)oxy)ethoxy)ethyl)phosphonic acid **9**. Tris(trimethylsilyl)phosphite (2 mL, 6 mmol, 55 eq.) was added to compound **8** (100 mg, 0.11 mmol, 1 eq.) introduced in a flame-dried flask under argon. The reaction mixture was allowed to stir for 24 h at 140 °C under argon atmosphere. To the reaction mixture was added methanol (2 mL), the mixture was then stirred for an additional 6 h at 60 °C and methanol was removed under reduced pressure. The crude red product was then precipitated in methanol and filtered to give without any further purification compound **9** as a pure red powder (100 mg, 99 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.24 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.17 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.08 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.83 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.49 (m, 12H), 7.28 (m, 6H), 4.52 (m, 2H), 3.82 (m, 6H), 1.37 (s, 18H).

¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 166.9, 154.2, 150.3, 146.6, 142.3, 138.0, 136.3, 133.6, 130.4, 130.3, 129.5, 129.5, 129.1, 128.2, 126.7, 126.1, 125.3, 123.4, 77.6, 64.3, 62.6, 34.9, 31.7.

³¹P NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 31.14.

HRMS: m/z(ESI+) 915.3451 ([M]⁺ = C₅₅H₅₄N₃O₆PS⁺ requires 915.3471).

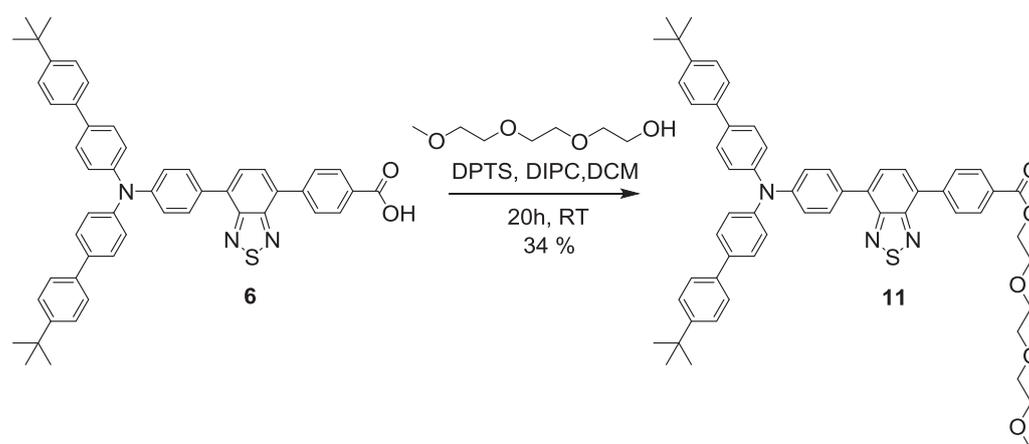


Icosyl 4-(7-(4-(bis(4'-(tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazol-4-yl)benzoate **10**. To a mixture of **6** (80 mg, 0.10 mmol, 1 eq.), eicosanol (37 mg, 0.12 mmol, 1.2 eq.) and 4-(dimethylamino)pyridinium 4-toluenesulfonate (12 mg, 0.05 mmol, 0.5 eq.) in dichloromethane (10 mL) was added N,N'-diisopropylcarbodiimide (24 μ L, 0.15 mmol, 1.5 eq.). The reaction mixture was allowed to stir at room temperature for 18 h. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure and was purified by silica gel chromatography using a gradient of eluents (petroleum ether:dichloromethane, 10:0 to 6:4) to provide a red powder (28 mg, 52 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.22 (d, J = 6 Hz, 2H), 8.07 (d, J = 6 Hz, 2H), 7.94 (d, J = 6 Hz, 2H), 7.85 (d, J = 6 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 9 Hz, 1H), 7.55 (d, J = 6 Hz, 8H), 7.47 (d, J = 6 Hz, 4H), 7.31 (m, 6H), 4.37 (t, J = 6 Hz, 2H), 1.81 (m, 2H), 1.55 (s, 2H), 1.37 (s, 18H), 1.26 (s, 32H), 0.88 (m, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 166.6, 154.2, 150.1, 148.2, 146.4, 138.6, 137.8, 131.0, 130.0, 129.3, 129.9, 128.0, 127.3, 126.6, 125.9, 125.1, 123.3, 65.5, 34.7, 32.1, 31.5, 29.9, 29.5, 28.9, 26.2, 22.8, 14.3.

HRMS: m/z(ESI+) 1043.6356 ($[M]^+$ = C₇₁H₈₅N₃O₂S⁺ requires 1043.6363).

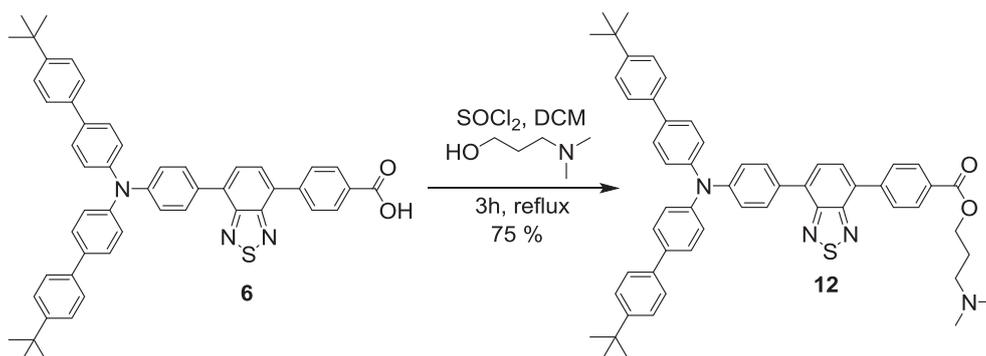


2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethyl 4-(7-(4-(bis(4'-(tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazol-4-yl)benzoate **11**. To a mixture of 2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethan-1-ol (7 mg, 42 mmol, 1 eq.), **6** (32 mg, 0.42 mmol, 1 eq.) and 4-(dimethylamino)pyridinium 4-toluenesulfonate (6.1 mg, 21 mmol, 0.5 eq.) in dichloromethane

(3 mL) was added N,N'-diisopropylcarbodiimide (13 μ L, 84 mmol, 2 eq.). The reaction mixture was allowed to stir at room temperature for 20 h. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure and was purified by silica gel chromatography using a gradient of eluents (petroleum ether:dichloromethane, 10:0 to 0:10) to afford a red powder (38 mg, 34 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.25 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.05 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.89 (m, 2H), 7.72 (m, 2H), 7.53 (m, 8H), 7.47 (m, 4H), 7.3 (m, 6H), 4.53 (m, 2H), 3.88 (m, 2H), 3.76 (m, 2H), 3.69 (m, 4H), 3.56 (m, 2H), 3.38 (s, 3H), 1.38 (s, 18H).

HRMS: m/z (ESI+) 910.4257 ($[\text{M}+\text{H}]^+ = \text{C}_{58}\text{H}_{60}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}^+$ requires 910.4254).

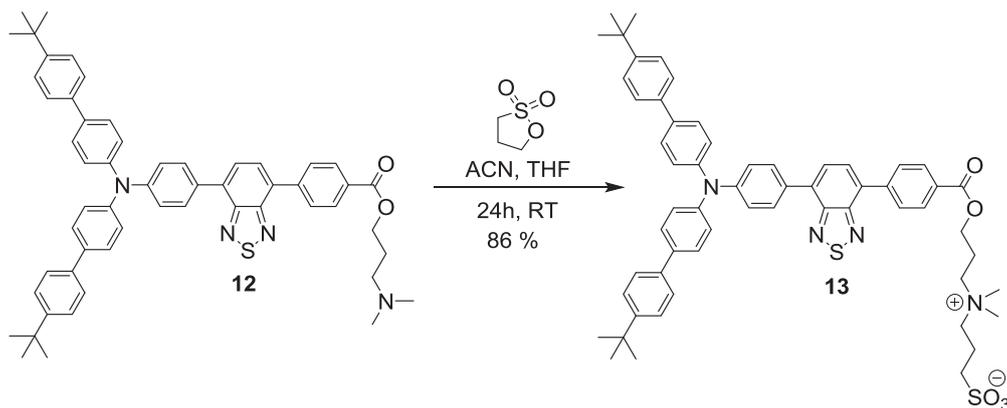


3-(dimethylamino)propyl 4-(7-(4-(bis(4'-(tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino) phenyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazol-4-yl)benzoate **12**. To a solution of **6** (120 mg, 0.157 mmol, 1 eq) in anhydrous dichloromethane (7 mL) was added SOCl_2 (0.07 mL, 0.966 mmol, 6.1 eq). The reaction mixture was refluxed for 3h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was evaporated to eliminate the excess of SOCl_2 . Then a very large excess of N,N-dimethylpropanamine (5 mL) was added. The reaction mixture was stirred at 40°C for one day. After cooling, water was added to precipitate compound **12** and eliminate the excess of alcohol. The solid was dissolved in DCM, washed with water and brine, dried over Na_2SO_4 and evaporated to dryness. The crude product was purified by silica gel chromatography using a gradient of eluents (dichloromethane:methanol, 10:0 to 9:1) to provide compound **12** as a red solid (94 mg, 75 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.21 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 8.07 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.93 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.84 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 7.5 Hz, 8H), 7.46 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 7.32 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.28 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 4.44 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.61 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.38 (s, 6H), 2.06 (m, 2H), 1.37 (s, 18H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 166.5, 154.2, 154.1, 150.1, 148.2, 146.4, 142.1, 137.8, 136.2, 133.9, 131.4, 130.9, 130.2, 130.0, 129.8, 129.3, 128.9, 128.0, 127.3, 126.5, 125.9, 125.1, 123.3, 63.3, 56.2, 45.0, 34.7, 31.5, 26.6.

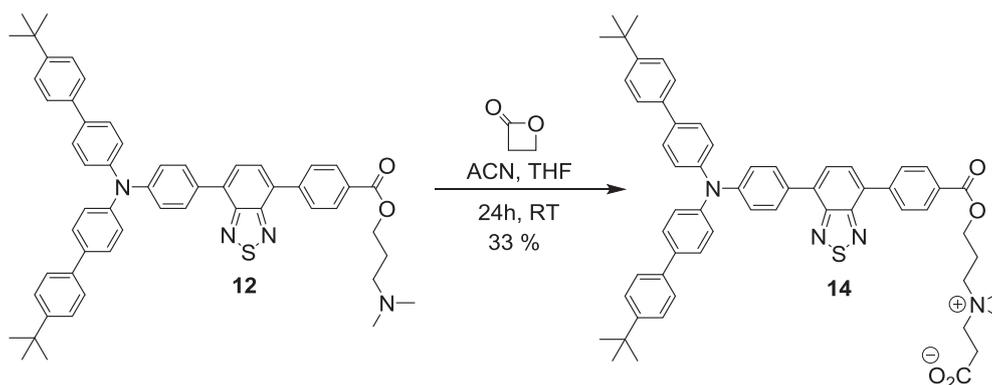
HRMS: m/z (ESI+) 849.4175 ($[\text{M}+\text{H}]^+ = \text{C}_{56}\text{H}_{57}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}^+$ requires 849.4202).



3-((3-((4-(7-(4-(bis(4'-(tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazol-4-yl)benzoyl)oxy)propyl)dimethylammonio)propane-1-sulfonate **13**. To a solution of **12** (45 mg, 0.053 mmol, 1 eq.) in acetonitrile (15 mL) and THF (2 mL) was added 1,3-propanesultone (10 mg, 0.082 mmol, 1.5 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature for one day. During this period, the product formed as a red precipitate. The latter was then filtered and washed with water to eliminate the excess of sultone and provide compound **13** as a red solid (45 mg, 86 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.19 (m, 4H), 8.04 (m, 4H), 7.65 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H), 7.57 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H), 7.46 (m, 4H), 7.20 (m, 6H), 4.39 (m, 2H), 3.07 (s, 6H), 2.73 (m, 2H), 2.22 (m, 2H), 2.03 (m, 2H), 1.31 (s, 18H).

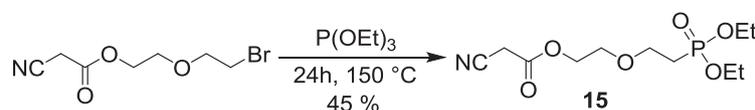
HRMS: m/z(ESI+) 993.4061 ($[M+Na]^+ = C_{59}H_{62}N_4O_5S_2Na^+$ requires 993.4059).



4 - ((3 - ((4 - (7 - (4 - (bis (4' - (tert-butyl) - [1,1'-biphenyl] - 4 -yl) amino) phenyl) benzo [c] [1,2,5]thiadiazol-4-yl)benzoyl)oxy)propyl)dimethylammonio)butanoate **14**. To a solution of **12** (56 mg, 0.066 mmol, 1 eq.) in acetonitrile (15 mL) was added β -propiolactone (24 mg, 0.33 mmol, 5 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature for one day. During this period, the product formed as a red precipitate. The latter was then filtered and washed with water to eliminate the excess of β -propiolactone and provide compound **14** as a red solid (20 mg, 33 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.19 (m, 4H), 8.04 (m, 4H), 7.65 (d, J = 9 Hz, 4H), 7.59 (d, J = 9 Hz, 4H), 7.46 (d, J = 8.1 Hz, 4H), 7.21 (m, 6H), 4.37 (m, 2H), 3.50 (m, 2H), 3.06 (s, 6H), 2.72 (m, 2H), 2.27 (m, 2H), 2.16 (s, 2H), 1.31 (s, 18H).

HRMS: m/z(ESI+) 921.4449 ($[M+H]^+ = C_{60}H_{61}N_4O_4S^+$ requires 921.4414).



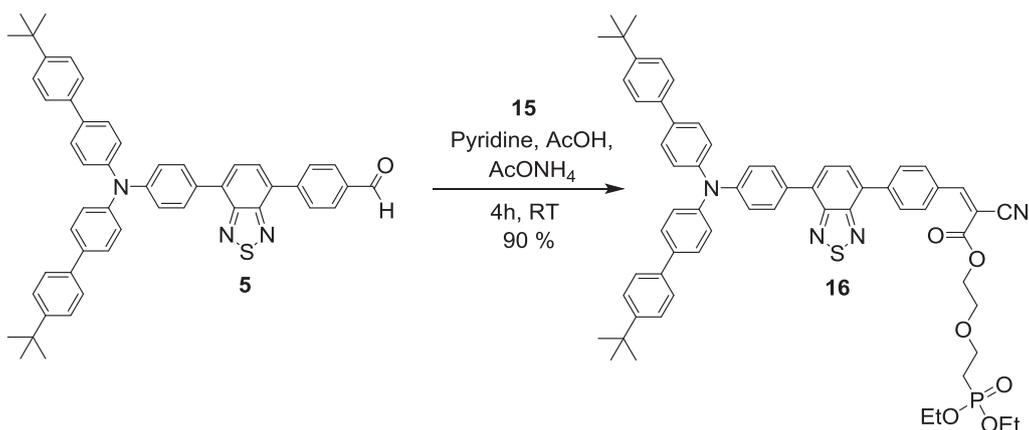
2-(2-(diethoxyphosphoryl)ethoxy)ethyl 2-cyanoacetate **15**. To a solution of 2-(2-bromoethoxy)ethyl 2-cyanoethanoate (1.53 g, 6.5 mmol, 1 eq.) and triethylphosphite (1.11 mL, 6.5 mmol, 1 eq.) was deaerated with argon and heated at 150°C during 24 h under argon atmosphere. After cooling down to room temperature, the crude mixture was purified by silica gel chromatography (ethyl acetate:petroleum ether, 1:1) to afford compound **15** as colorless oil (850 mg, 45 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.35 (m, 2H), 4.11 (m, 4H), 3.75 (dt, J = 7.3 Hz, 2H), 3.70 (m, 2H), 3.51 (s, 2H), 2.09 (dt, J = 7.5 Hz, 2H), 1.32 (t, J = 7.2 Hz, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 163.1, 113.0, 68.1, 65.6, 65.3, 61.8 (d, $2J(C-P)$ = 6 Hz), 27.0 (d, $1J(C-P)$ = 140 Hz), 24.8, 16.5.

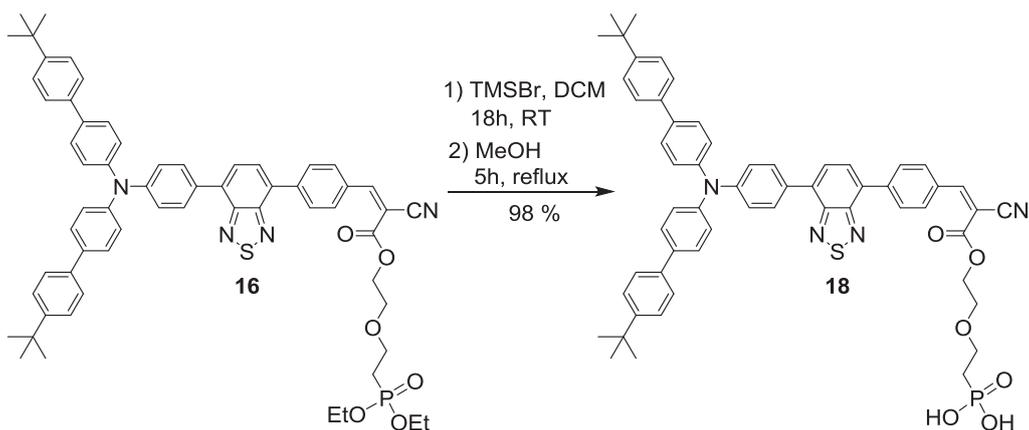
³¹P NMR (160 MHz, CDCl₃) δ 28.1.

HRMS: m/z(ESI+) 294.1112 ($[M+H]^+ = C_{11}H_{21}NO_6P^+$ requires 294.1106).



2-(2-(diethoxyphosphoryl)ethoxy)ethyl (Z)-3-(4-(7-(4-(bis(4'-(tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazol-4-yl)phenyl)-2-cyanoacrylate **16**. To a solution of **5** (350 mg, 0.47 mmol, 1 eq.) and **15** (164 mg, 0.56 mmol, 1.2 eq.) in anhydrous pyridine (3.5 mL) were added glacial acetic acid (0.9 mL) and ammonium acetate (catalytic amount). The reaction mixture was allowed to stir up at room temperature for 4 h. Then it was poured into water and the crude solid was filtered and washed with EtOH:H₂O (1:1). Precipitation in petroleum ether afforded compound **16** as a dark red powder (422 mg, 90 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.35 (s, 1H), 8.20 (s, 2H), 7.98 (m, 6H), 7.55 (d, *J* = 8.4 Hz, 8H), 7.49 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 7.30 (m, 6H), 4.12 (m, 6H), 3.80 (m, 4H), 2.15 (m, 2H), 1.37 (s, 18H), 1.34 (s, 6H).



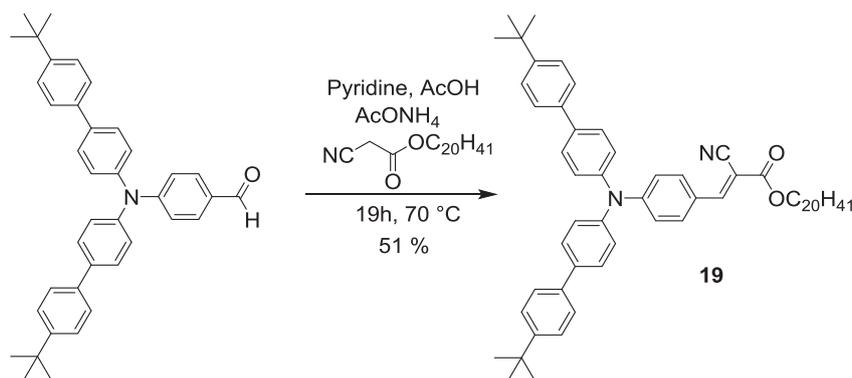
(*Z*)-2-(2-((3-(4-(7-(4-(bis(4'-(*tert*-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-4-yl)phenyl)-2-cyanoacryloyl)oxy)ethoxy)ethyl)phosphonic acid **18**. Trimethylsilyl bromide (400 μ L, 3.03 mmol, 20 eq.) was added to a solution of **16** (150 mg, 0.15 mmol, 1 eq.) in anhydrous dichloromethane (4 mL). The reaction mixture was allowed to stir for 18 h at room temperature under argon atmosphere. Excess of trimethylsilyl bromide and solvent were removed under reduced pressure to give a crude red solid which was further dissolved in anhydrous methanol. The mixture was then stirred for an additional 5 h under argon atmosphere and methanol was removed under reduced pressure. The crude red product was then dissolved in dichloromethane and petroleum ether was added in order to precipitate compound **18** as an orange solid (142 mg, 98 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.49 (s, 1H), 8.28 (s, 2H), 8.16 (s, 2H), 8.05 (m, 2H), 7.95 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.62 (m, 8H), 7.50 (m, 4H), 7.30 (m, 6H), 4.32 (m, 2H), 3.78 (m, 4H), 2.03 (m, 2H), 1.40 (s, 18H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 162.2, 153.1, 152.2, 152.0, 148.2, 144.6, 135.5, 134.0, 129.8, 128.9, 128.8, 128.6, 128.3, 127.8, 126.2, 125.7, 124.6, 124.2, 123.4, 121.3, 114.1, 77.6, 66.3, 54.2, 37.6, 32.9, 29.9.

^{31}P NMR (160 MHz, CDCl_3) δ 22.75.

HRMS: m/z (ESI+) 966.3580 ($[\text{M}]^+ = \text{C}_{58}\text{H}_{55}\text{N}_4\text{O}_6\text{PS}^+$ requires 966.3574).

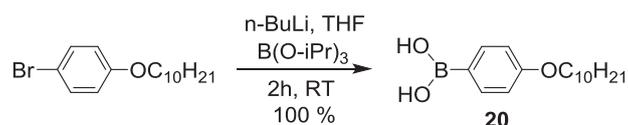


Icosyl(E)-3-(4-(bis(4'-(tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)-2-cyanoacrylate **19**. Under argon atmosphere, aldehyde (100 mg, 0.19 mmol, 1 eq.) and icosyl 2-cyanoacetate (249 mg, 0.75 mmol, 4 eq.) were dissolved in anhydrous pyridine (2 mL), glacial acetic acid (0.6 mL) and ammonium acetate (catalytic amount). The reaction mixture was then heated at 70 °C for 19 h. After cooling down to room temperature, the solution was poured into water under stirring to precipitate a red compound. Purification by silica gel column chromatography (petroleum ether:dichloromethane, 6:4) afforded compound **19** as an orange vitreous solid (85 mg, 51 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.10 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 7.53 (m, 12H), 7.27 (m, 4H), 7.09 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 4.28 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.75 (m, 2H), 1.37 (s, 18H), 1.25 (m, 32H), 0.87 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 207.0, 163.9, 154.0, 152.4, 150.6, 144.8, 138.3, 137.5, 133.3, 128.4, 126.7, 126.4, 126.0, 119.8, 116.8, 97.7, 66.5, 34.7, 32.1, 31.5, 31.1, 29.9, 29.7, 29.7, 29.5, 29.4, 28.8, 27.0, 22.8, 14.3.

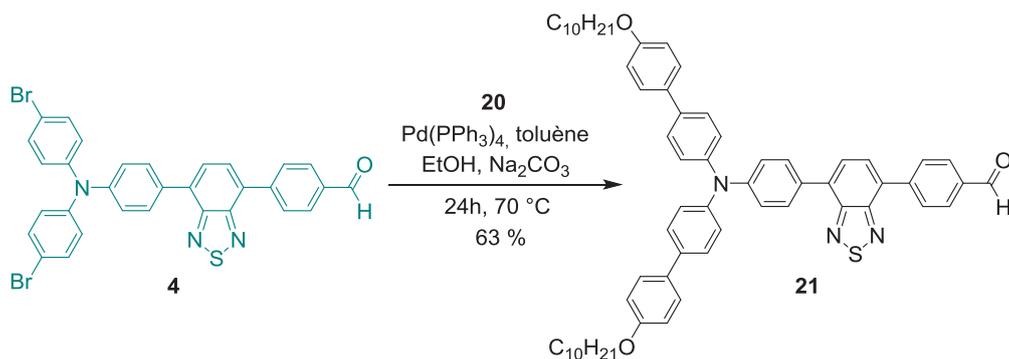
HRMS: *m/z*(MALDI-TOF) 907.5709 ([*M*+Na]⁺ = C₆₂H₈₀N₂O₂Na⁺ requires 907.6117).



4-(decyloxy)phenylboronic acid **20**. In a Schlenk tube under argon, a solution of 1-bromo-4-(decyloxy)benzene (1 g, 3.2 mmol, 1 eq.) in THF (17 mL) was deaerated with argon. The reaction mixture was cooled down to -48 °C and *n*-butyllithium (3.5 mL, 3.7 mmol, 1.2 eq.) was added dropwise. The reaction mixture was allowed to stir 30 minutes and triisopropyl borate (1 mL, 4.3 mmol, 1.3 eq.) was added. After reaching room temperature, the mixture was left to react 2 h. Hydrochloric acid (6 mL) was added and the organic phase was extracted with diethyl ether, washed with brine and dried over Na₂SO₄. Solvent was removed under reduced pressure and provide compound **20** as a white-beige solid (0.89 g, 100 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.67 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.95 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 3.87 (m, 4H), 1.80 (m, 2H), 1.55 (m, 2H), 1.27 (s, 12H), 0.88 (m, 3H).

HRMS: *m/z*(ESI-) 276.2020 ([*M*-H]⁻ = C₁₆H₂₆O₃B⁻ requires 276.2011).

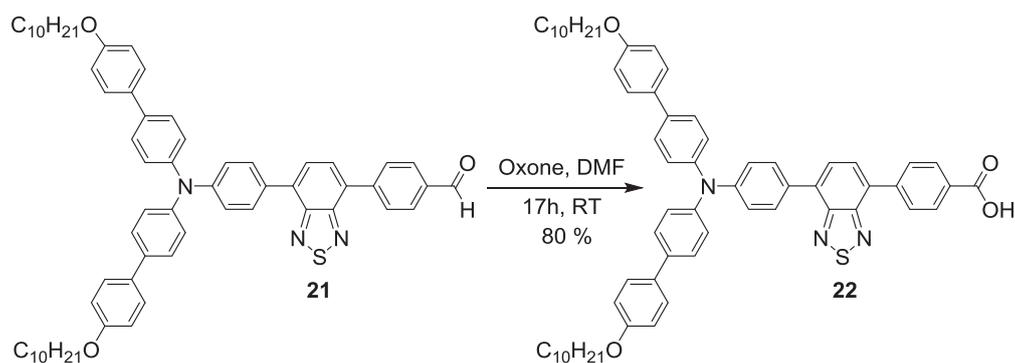


4-(7-(4-(bis(4'-(decyloxy)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-4-yl)benzaldehyde **21**. To a solution of **4** (770 mg, 1.2 mmol, 1 eq.) in toluene (28 mL), Pd(PPh₃)₄ (3 %mol, 68 mg, 0.06 mmol, 0.05 eq.) was added. The mixture was degassed with argon. **20** (1 g, 3.6 mmol, 3 eq.) dissolved in ethanol (7 mL) and an aqueous solution of Na₂CO₃ (3.5 mL, 2 M) were added. The reaction mixture was again deoxygenated and the reaction was carried out at 70° C for one night. The organic phase was extracted with dichloromethane, washed with water and then brine and dried over Na₂SO₄. Solvent was removed under reduced pressure and the product was purified by silica gel chromatography using a gradient of eluents (dichloromethane:petroleum ether, 0:1 to 1:0) to provide a red solid (722 mg, 63 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.06 (s, 1H), 8.12 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 8.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.88 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.80 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 7.46 (m, 8H), 7.23 (m, 6H), 6.92 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 3.94 (t, *J* = 6.6 Hz, 4H), 1.76 (m, 4H), 1.43 (m, 4H), 1.23 (s, 24H), 0.84 (m, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 192.2, 158.9, 154.4, 154.2, 148.5, 146.2, 143.8, 136.3, 136.0, 134.4, 133.2, 131.2, 130.7, 130.4, 130.3, 130.1, 129.4, 128.0, 127.8, 127.3, 125.5, 123.1, 115.1, 68.4, 32.2, 29.9, 29.9, 29.8, 29.7, 26.4, 23.0, 14.5.

HRMS: m/z(ESI+) 947.5092 ([M]⁺ = C₆₃H₆₉N₃O₃S⁺ requires 947.5060).

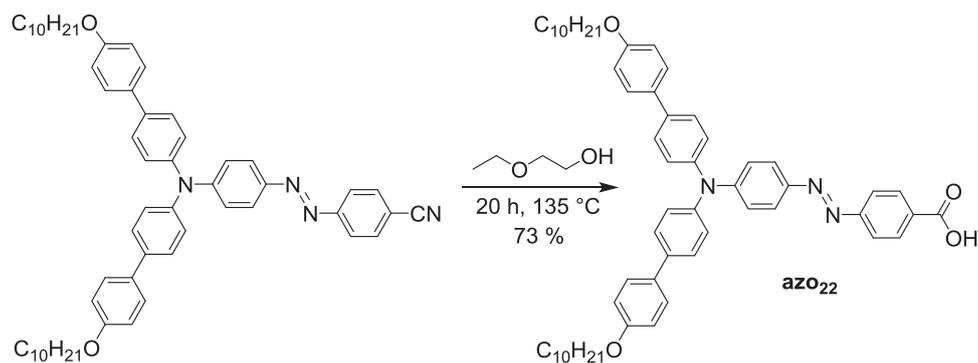


4-(7-(4-(bis(4'-(decyloxy)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-4-yl)benzaldehyde **21**. To a solution of aldehyde **21** (37 mg, 0.04 mmol, 1 eq.) in DMF (1.5 mL) was added oxone (48 mg, 0.08 mmol, 2 eq.). The reaction mixture was allowed to stir at room temperature for 17 h. The resulting thick reaction mixture was dissolved in dichloromethane and washed three times with water. The extracted organic phase was washed further with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After solvent removal under reduced pressure, the product was purified by silica gel chromatography using a gradient of eluents (dichloromethane:petroleum ether, 0:1 to 1:0) to obtain compound **6** as an orange powder (30 mg, 80 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.30 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.85 (m, 4H), 7.52 (m, 8H), 7.30 (m, 6H), 6.96 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 4.00 (t, *J* = 6.3 Hz, 4H), 1.81 (m, 4H), 1.48 (m, 4H), 1.28 (s, 24H), 0.88 (m, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 169.3, 158.3, 154.6, 146.5, 145.8, 138.5, 136.3, 132.4, 130.9, 130.5, 129.3, 128.8, 123.1, 114.8, 68.1, 31.9, 29.6, 29.6, 29.4, 29.3, 26.1, 22.7, 14.1.

HRMS: m/z(ESI⁺) 964.5099 ([M+H]⁺ = C₆₃H₇₀N₃O₄S⁺ requires 964.5087).



(E)-4-((4-(bis(4'-(decyloxy)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)diazenyl)benzoic acid **azo22**. To a solution of nitrile (50 mg, 0.06 mmol, 1 eq.) in 2-ethoxyethanol (4 mL) was added potassium hydroxide (3 mol.L⁻¹, 1 mL, 50 eq.). The reaction mixture was allowed to stir at reflux (135 °C) for 20 h. Water was added and the reaction mixture was acidified with hydrochloric acid (1 mol.L⁻¹). Then an extraction was performed using dichloromethane and water. The extracted organic phase was washed further with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After solvent removal under reduced pressure, the product was purified by silica gel chromatography using dichloromethane to obtain compound **azo22** as dark red powder (37 mg, 73 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.92 (m, 4H), 7.53 (m, 8H), 7.14 (m, 6H), 7.00 (d, 4H), 4.02 (t, *J* = 6.6 Hz, 4H), 1.80 (m, 4H), 1.50 (m, 4H), 1.28 (s, 24H), 0.91 (m, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 177.3, 171.5, 159.1, 156.4, 151.7, 147.3, 145.4, 137.5, 133.0, 131.6, 128.2, 128.1, 126.3, 125.3, 122.7, 121.4, 115.2, 68.5, 32.3, 30.1, 30.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.6, 26.4, 23.0, 21.0, 14.5.

HRMS: *m/z*(ESI-) 856.5064 ([M-H]⁻ = C₅₇H₆₆N₃O₄⁻ requires 856.5053).

VI.3. Nanoassemblies

VI.3.1. Nanoassembly characterizations

Size and surface potential

The hydrodynamic diameter and size dispersion of the nanoassemblies were determined by dynamic light scattering (DLS) by means of a nanoparticle size analyzer Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments) equipped with a 4 mW He-Ne laser, operating at 633 nm, and a photomultiplier detector collecting backscattered light at an angle of 175°. Measurements were carried out at 20 °C on aqueous solutions of nanoassemblies. For each sample, intensity measurements were carried out in a multi-acquisition mode implying automatically adjusted correlograms, and averaged measurements on 3 acquisitions. Nanoassembly mean sizes and distribution widths were obtained by fitting each correlogram with a Cumulants algorithm.

Measurements of surface potential ζ were carried out by means of a Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments). The samples were placed in disposable folded capillary cells (DTS1070). 3 measurements were realized for each sample and the zeta potential was calculated from electrophoretic mobility dispersion fitted by the Smoluchowski model.

Electronic microscopy

Nanoparticle morphology was investigated by transmission electron microscopy (TEM) on a MO-Jeol 1230 (80 kV) apparatus. Solutions of nanoparticles (diluted by 2, 4 μ L) were deposited onto holey carbon-coated copper grids (300 mesh). Some FON solutions were formerly stained by RuO₄. The size distribution of nanoassemblies was determined by counting a larger number of nano-objects (~300) using Image J software. The mean deviation μ and the standard deviation σ were obtained by fitting histograms with a lognormal function thanks to the formula:

$$f(x) = \frac{1}{x\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(\ln(x)-\mu)^2}{2\sigma^2}\right)$$

Fluorescence microscopy

Wide-field fluorescence microscopy was performed by means of a Nikon Eclipse Ti working in inverted mode (oil-immersion objective Plan Apo, 60x, NA = 1.4.) Excitation was performed using a Hamamatsu Xenon-mercury lamp with appropriate long-pass filter (>515 nm) and excitation wavelength at 482 nm.

Magnetic measurements

Magnetic measurements were collected with a Quantum Design MPMS-5S SQUID magnetometer. All magnetic measurements were performed on pellets of dry powders. The powders were collected in a Teflon® band which was then pressed into pellets in order to prevent nanocrystal orientation under the external magnetic field. The magnetization curves were measured at 2.5 and 310 K from +50 to -50 kOe. All data were corrected from diamagnetic contribution due to water and the sample holder, which was separately measured. The thermal dependence of magnetization was recorded from 10 to 300 K upon ZFC and FC

conditions. ZFC magnetizations were measured by cooling samples in a zero magnetic field and then increasing the temperature in the presence of a 50 Oe magnetic field, whereas FC curves were recorded by cooling the samples in the same probe field at 50 Oe.

NMR relaxometry

Measurements of the ^1H NMR longitudinal (T_1) and transverse (T_2) relaxation times were performed at room temperature on sample solutions diluted with water in the $0.01 \text{ MHz} \leq \nu \leq 60 \text{ MHz}$ frequency range. Generation and detection of the NMR signal involved a Smartracer Stellar relaxometer (using the fast-field-cycling technique) for $\nu \leq 10 \text{ MHz}$ and a Stellar Spinmaster spectrometer for $\nu > 10 \text{ MHz}$. For the very low field range ($\nu < 3.2 \text{ MHz}$ for T_1 and $\nu < 4 \text{ MHz}$ for T_2), *ad hoc* pre-polarized sequences were used to increase the ^1H NMR signal. In the second case, the standard radio-frequency excitation sequences of Carr–Purcell–Meiboom–Gill (T_2) and saturation (T_1) recovery were used. The efficiency of the samples as MRI contrast agents was determined from the measured T_1 and T_2 by calculating the nuclear longitudinal r_1 and transverse r_2 relaxivities as given by

$$r_i = \frac{1}{C_{\text{Fe}}} \left(\left(\frac{1}{T_i} \right)_{\text{sample}} - \left(\frac{1}{T_i} \right)_{\text{dia}} \right) \text{ with } i = 1 \text{ ou } 2$$

where $\left(\frac{1}{T_i} \right)_{\text{sample}}$ is the measured relaxation rate, $\left(\frac{1}{T_i} \right)_{\text{dia}}$ the diamagnetic contribution of Millipore[®] water ($\sim 4 \text{ s}^{-1}$), and C_{Fe} the iron concentration in mmol.L^{-1} for each sample.

Magnetic hyperthermia of aqueous suspensions

Prior to the caloric measurements, the temperature of the aqueous nanoparticle suspension was stabilized to $37.0 \text{ }^\circ\text{C}$. The alternating magnetic field was generated with a DM100 System (NanoScale Biomagnetics, Spain). The field was set up at 14.3 kA/m and the magnetic field frequency at 342 kHz . The suspensions of magnetic nanoassemblies ($300 \text{ }\mu\text{L}$, $[\text{Fe}] \sim 20 \text{ mmol.L}^{-1}$) were placed inside the coil in 0.5 mL Eppendorf tubes. The temperature increase was recorded with an infrared thermal imaging camera (FLIR SC7000) in real time, every second, in a temperature range of 37 to $42 \text{ }^\circ\text{C}$. The temperature elevation was measured as a function of time (dT/dt) at the initial linear slope ($t \approx 30 \text{ s}$) in order to evaluate the heating effect in terms of specific loss power. SAR is defined as the power dissipation per unit mass of iron (W.g^{-1}) and was calculated as follows:

$$\text{SAR} = \frac{1}{m_{\text{Fe}}} \left(\sum_i c_i m_i \frac{dT}{dt} \right)$$

where m_{Fe} is the total mass of iron in the sample, c_i is the specific heat capacity of species in solution ($c_{\text{water}} = 4185 \text{ J.L}^{-1}.\text{K}^{-1}$), m_i their mass.

Iron titration

Iron titration was performed by ICP-AES thanks to Carole La and Marion Rivoal (LPGN, UMR CNRS 6112 – University of Nantes).

Nanoassemblies in aqueous solutions. To magnetic nanoassembly suspensions (50 μL) was added concentrated hydrochloric acid (450 μL , 12 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). After two nights of acidic etching, Millipore[®] water was added (4.5 mL). The solution was allowed to sonicate 5 minutes before automatic titration by ICP-AES.

Nanoassemblies internalized in cells.

Step 1: cell monolayer culture. See part FONmag with different polymers, cell culture.

Step 2: internalization of nanoassemblies. Meso 11 cells (2.5×10^5 cells/well) were seeded on 6-well plates. After 24 h, solutions of **FONmag-PAA** and **FONmag-PAAPEGRAFT** (final iron concentrations of 6.8 and 3.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively) were added (6 wells per condition) and allowed to be in contact for 24 h. Each well was washed once with PBS and trypsinized (0.05 % trypsin/0.02 % ethylenediaminetetraacetic acid EDTA) (Invitrogen) for 5 minutes. PBS (500 μL) was added and the 6 wells from the same condition were pooled together. The number of cells per conditions was determined. Cells were then centrifuged at 1200 rpm for 5 min. The supernatant was removed and cells were re-suspended in PBS (1 mL) to wash them. Cells were centrifuged another time at 6000 rpm for 1 min. The supernatant was removed to give a cell pellet.

Step 3: ICP-AES measurement. To cell pellets was added concentrated hydrochloric acid (500 μL , 12 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). After two nights of acidic etching, Millipore[®] water was added (2.5 mL). The solution was allowed to sonicate 5 minutes before automatic titration by ICP-AES.

Quantification of the number of PAA chains per FONmag nanoassembly²³³

Principle. Quantification of the free carboxylic acid functions of the polyelectrolyte PAA coating was performed by colorimetric titration with toluidine blue O (TBO), based on electrostatic interactions (Figure 147). Under alkaline conditions, TBO adsorbs on the negatively carboxylate units of the PAA coating. After washing away TBO in excess, the nanoparticle solution is treated with sodium dodecyl sulfate (SDS) to break the electrostatic interactions with bound TBO, and the released TBO is titrated using UV-vis absorption spectroscopy.

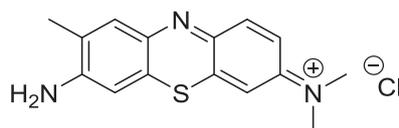


Figure 147 : Chemical structure of toluidine blue O.

Sample preparation. A solution of TBO (23 mg, 3.8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) in NaOH (20 mL, 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) was prepared. 250 μL of this solution was added to the FONmag suspension (1 mL) and the mixture was heated at 40 °C during 15 min. The resulting FONmag suspension was washed 7 times using repetitive magnetic decantations and rinsed with NaOH solution (1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 1

mL). For each washing step, the solution was heated up to 40 °C during 5 min. Then sodium dodecyl sulfate (SDS) in water (8.7 mmol.L⁻¹, 1 mL) was added to the FONmag precipitate. The suspension was magnetized and the supernatant was analyzed with UV-visible spectroscopy.

Calibration curve. A solution of TBO (0.15 mg) in a solution of sodium dodecyl sulfate (SDS) in water (10 mL, 8.7 mmol.L⁻¹) was prepared and diluted by 2, 4 and 8 to obtain a 4 point-calibration curve (Figure 148) at 633 nm thanks to Beer-Lambert's law.

ϵ (TBO) = 26 394 L.mol⁻¹.cm⁻¹ at 630 nm.

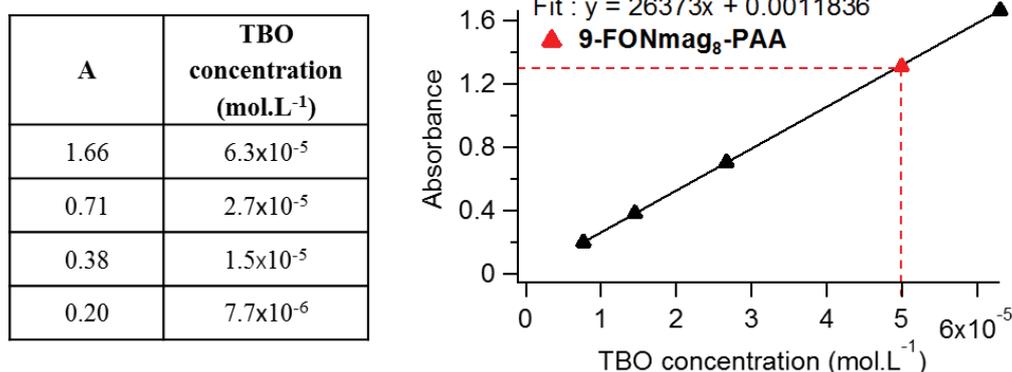


Figure 148 : Calibration curve obtained by UV-vis absorption spectroscopy of TBO solutions of known concentration.

For **9-FONmag₈-PAA**, the TBO concentration was found to be 5x10⁻⁵ mol.L⁻¹, giving 3x10¹⁶ TBO molecules or COOH units per mL. Given the number of FONmag of about 10¹⁰ per mL, as estimated from previous correlated titrations (inductively coupled plasma – atomic emission spectroscopy for iron and absorbance for the organic core of the magnetofluorescent nanoassemblies),⁶⁷ the number of COOH units per **9-FONmag₈-PAA** could be assessed to be 3x10⁶ on average. The number of COOH per PAA is around 24, so 1.3x10⁵ PAA chains were found to coat each **9-FONmag₈-PAA** nanoassembly.

VI.3.2. Syntheses of organic nanospheres

VI.3.2.1. General procedure

Synthesis of fluorescent organic nanospheres (FONs)

Stock solutions of fluorophores were prepared in spectrophotometric grade THF with a 1.45 mmol.L⁻¹ concentration. A small amount of the stock solution (50 μL) was injected in one shot under vigorous stirring into a larger volume of Millipore[®] water (2.5 mL) by means of a vortex. The resulting solution concentration was 29 μmol.L⁻¹. The solutions were stored at 4 °C.

VI.3.2.2. Azo-doped FONs

Synthesis of fluorescent azo organic nanospheres (FAONs)

Stock solutions of fluorophore **6** and **azo** compound were prepared in spectrophotometric grade THF with a 2.9 mmol.L⁻¹ concentration. 25 μL of fluorophore **6** stock solution and 25 μL of **azo** stock solution were mixed together to generate a 1:1 **6:azo** ratio. The whole volume (50 μL) was added under vigorous stirring into Millipore[®] water (2.5 mL) as described above for FON and gave **FAON**.

Synthesis of azo organic nanospheres (AONs)

A stock solution of **azo** was prepared in spectrophotometric grade THF with a 1.45 mmol.L⁻¹ concentration. A small amount of the stock solution (50 μL) was injected in one shot under vigorous stirring into a larger volume of Millipore[®] water (2.5 mL) by means of a vortex. The resulting solution concentration was thus 29 μmol.L⁻¹.

Synthesis of FON+AON

Solutions of **FON+AON** were simply synthesized by mixing 1.25 mL of solutions of **FON** and **AON** with a 29 μmol.L⁻¹ concentration. The resulting solution concentration was thus twice as low as those of **FON** and **AON** solutions and reached 14.5 μmol.L⁻¹.

VI.3.2.3. Doxorubicin-doped FONs

Synthesis of mixed FONs

Stock solutions of both fluorophores were prepared in spectrophotometric grade THF with a 1.45 mmol.L⁻¹ concentration. 25 μL of fluorophore **6** stock solution and 25 μL of fluorophore **9** stock solution were mixed together to generate a 1:1 **6:9** ratio. The whole volume (50 μL) was added under vigorous stirring into Millipore[®] water (2.5 mL) as described above and gave **6+9-FON**.

Synthesis of neutral doxorubicin (dox)

Dox.HCl (2.06 mg) was dissolved in a solution of ammonium hydroxide (2 mL, 1.6 mmol.L⁻¹) adjusted to pH = 8.7. Two drops of concentrated ammonium hydroxide (1 mol.L⁻¹) were added

to reach pH = 11.6. The solution color turned from red to violet. After adding THF (2 mL), the solution was treated with ethyl acetate (5 mL) to extract doxorubicin in its neutral form. The extraction was repeated twice. The extracted organic phases were collected together and evaporated under reduced pressure. The remaining dark grains were discarded and the red viscous liquid dried under vacuum until forming a red solid powder corresponding to the neutral form of doxorubicin that is soluble in organic solvents. The compound was stored under argon at room temperature until use.

Synthesis of dox-doped FONs

Stock solutions of the selected fluorophores were prepared separately in spectrophotometric grade THF with a concentration twice as high as those of FONs alone (namely 2.9 mmol.L⁻¹). A stock solution of neutral doxorubicin was also prepared in spectrophotometric grade THF with a 2.9 mmol.L⁻¹ concentration. 25 µL of the fluorophore stock solution and 25 µL of the drug stock solution were mixed together to generate a 1:1 dox:fluorophore ratio. The whole volume (50 µL) was added under vigorous stirring into Millipore[®] water (2.5 mL) as described above.

Synthesis of adducts of FONs with dox.HCl

An aqueous dox.HCl solution (1.45 mmol.L⁻¹, 50 µL) was diluted in Millipore[®] water (2.45 mL) to generate a solution with a 29 µmol.L⁻¹ concentration. A small amount (50 µL) of fluorophore stock solutions (1.45 mmol.L⁻¹) was quickly added in the diluted dox.HCl solution (2.5 mL) to generate a 1:1 fluorophore:dox.HCl ratio in the same concentrations as those reported for dox-doped FONs **dox-FON**.

VI.3.3. Syntheses of hybrid nanoassemblies

VI.3.3.1. Iron oxide nanoparticle synthesis

All of the solutions were deoxygenated with argon for 30 min. Aqueous acidic solutions of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mol.L^{-1}) and $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2 mol.L^{-1}) were separately prepared in HCl (2 mol.L^{-1}). 6.6 mL of the former and 1.7 mL of the latter were mixed together, and the resulting solution heated up to $70 \text{ }^\circ\text{C}$ under argon atmosphere and vigorous stirring. Tetrapropylammonium hydroxide solution (1 mol.L^{-1} , 64.4 mL) was then injected at a 0.7 mL.min^{-1} rate using a syringe pump, and vigorous stirring was continued for 20 min.²³⁴ The supernatant was removed and the nanoparticles washed with distilled water by using a magnet. This procedure was repeated twice and finally 50 mL of H_2O was added to the wet powder.

To oxidize magnetite into maghemite, an oxidizing solution was prepared by mixing 7.6 g of $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, 30 mL of HNO_3 (2 mol.L^{-1}) and 44 mL of H_2O . It was added to the nanoparticle solution (50 mL). The mixture was heated up to $80 \text{ }^\circ\text{C}$ during 1 h. The supernatant was removed by using a magnet and the nanoparticles were washed twice with HNO_3 (2 mol.L^{-1}), then suspended in distilled water. The supernatant was removed and put aside. The residue was then suspended in distilled water and the supernatant removed and put aside. The two phases of supernatant were mixed to get 150 mL of nanoparticle solution.

Size sorting was accomplished by a series of magnetization steps based on ionic strength differences.^{214,235} Nitric acid (2 mol.L^{-1} , $\text{pH} = 1.4$) was added to the solution in order to induce destabilization. When destabilization occurred, the precipitate, named residue, was separated from the supernatant by magnetic sedimentation as depicted on the images below (Figure 149). By this way, 8 different populations were obtained but 3 of them finally precipitated and were thrown away. For each batch, the iron concentration and size distribution were determined using elemental analyses and transmission electron microscopy and stored in HNO_3 (2 mol.L^{-1} , $\text{pH} = 1.4$) at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. TEM images were represented below (Figure 150).

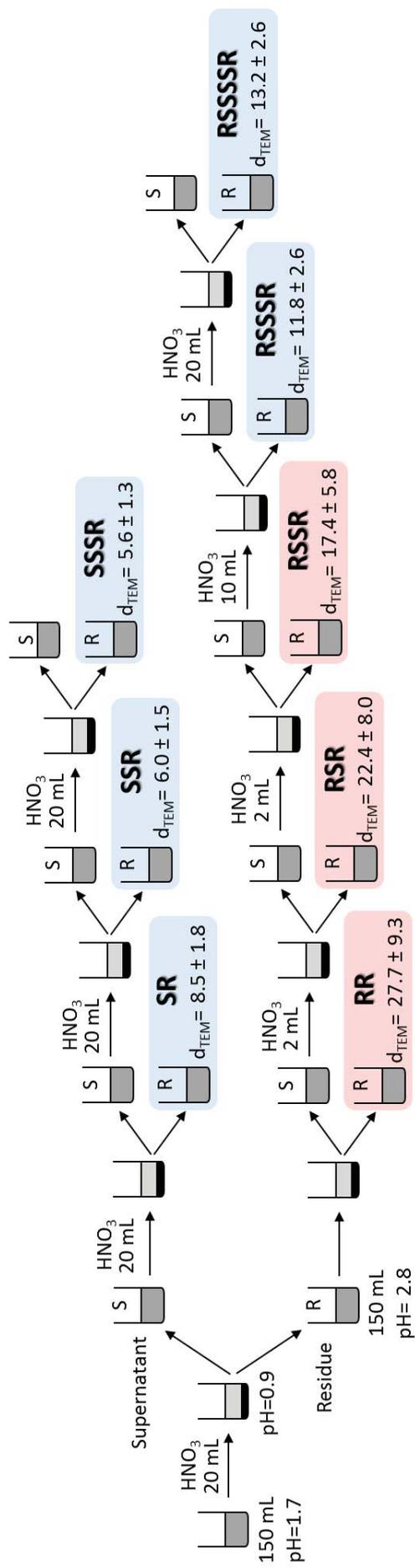


Figure 149 : Size sorting procedure after the oxidizing step. $[HNO_3] = 2\text{ mol.L}^{-1}$. S = Supernatant, R = Residue.

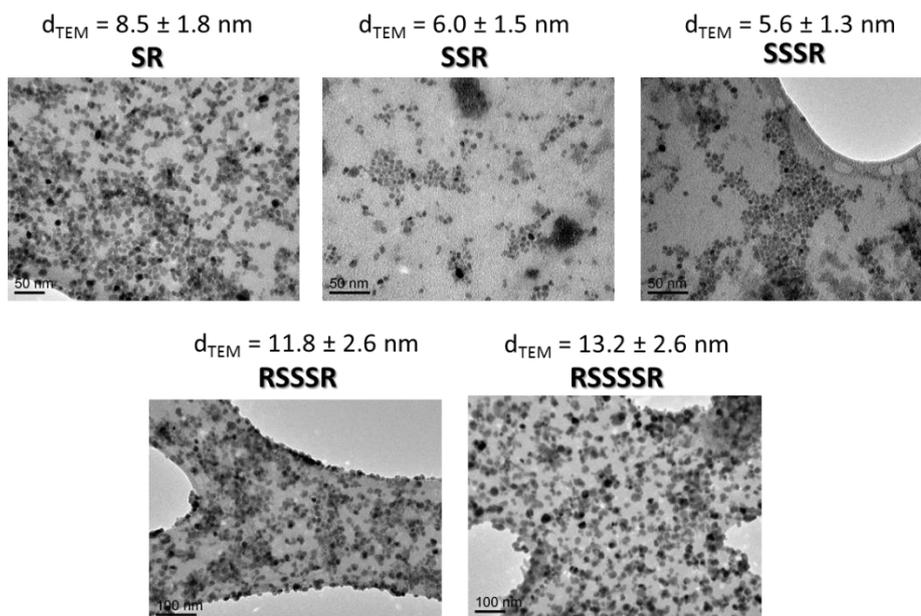


Figure 150 : TEM images and size distributions of the 5 populations of magnetic nanoparticles obtained after size sorting.

VI.3.3.2. Magnetic nanoassemblies

PAAPEG and **PAAPEG_{GRAFT}** were provided by Julien Poly from IS2M (Institut de Science des Matériaux de Mulhouse – UMR 7361). **PAA** was purchased from Sigma-Aldrich and used as received.

Synthesis of magnetic nanoassemblies (mag-PAA)

To a solution of maghemite nanoparticles in nitric acid (2.5 mL, 0.006 wt. %, pH = 1.4) was added polyacrylic acid **PAA** (2.1 kDa, 5 mg) as a powder. Then, ammonium hydroxide (1 mol.L⁻¹) was added dropwise under stirring until pH = 9 was reached. The resulting solution was allowed to stir for a further 30 min. Purification was achieved by a dialysis using a Spectra Por membrane (Standard Grade Regenerated Cellulose; cut-off: 8-10 kDa) against Millipore[®] water (600 mL) over 24 h changing the dialysis water 5 times so that the final pH solution reaches a value of 7. The solutions were stored at 4 °C.

VI.3.3.3. Magneto-fluorescent nanoassemblies

Synthesis of magneto-fluorescent nanoassemblies (FONmag-polyelectrolyte)

To a solution of maghemite nanoparticles in nitric acid (2.5 mL, 0.006 wt. %, pH = 1.4) was injected a stock solution of fluorophores (0.1 wt%, THF, 50 μL) under vortex stirring. Then, polyacrylic acid **PAA** (1.8 kDa, 5 mg) was added as a powder. Ammonium hydroxide (1 mol.L⁻¹) was added dropwise under stirring until pH = 9 was reached. The resulting solution was allowed to stir for a further 30 min. Purification was achieved by dialysis using a Spectra Por membrane (Standard Grade Regenerated Cellulose; cut-off: 8-10 kDa) against Millipore[®] water

(600 mL) over 24 h, changing the dialysis water 5 times so that the final pH solution reaches a value of 7. The solutions were stored at 4 °C.

The same experimental procedure can be applied to the two other polymers **PAAPEG** (109 kDa, 15 mg) and **PAAPEG_{GRAFT}** (51.9 kDa, 15 mg) with a purification achieved by a dialysis using a Spectra Por membrane (Standard Grade Regenerated Cellulose; cut-off: 300 kDa).

Synthesis of magneto-azo nanoassemblies (FAONmag-PAA)

Stock solutions of fluorophore **6** and **azo** compound were prepared in spectrophotometric grade THF with a 2.9 mmol.L⁻¹ concentration. 25 µL of fluorophore **6** stock solution and 25 µL of **azo** stock solution were mixed together to generate a 1:1 **6:azo** ratio. The whole volume (50 µL) was added under vigorous stirring into a solution of maghemite nanoparticles in nitric acid (2.5 mL, 0.006 wt. %, pH = 1.4). Then, polyacrylic acid **PAA** (1.8 kDa, 5 mg) was added as a powder. Ammonium hydroxide (1 mol.L⁻¹) was added dropwise under stirring until pH = 9 was reached. The resulting solution was allowed to stir for a further 30 min. Purification was achieved by dialysis using a Spectra Por membrane (Standard Grade Regenerated Cellulose; cut-off: 8-10 kDa) against Millipore[®] water (600 mL) over 24 h, changing the dialysis water 5 times so that the final pH solution reaches a value of 7. The solutions were stored at 4 °C.

The same experimental procedure can be applied to the other fluorophore **22**.

Lyophilization

In order to store the resulting magneto-fluorescent nanoassemblies FONmag over a long period of time in the solid state, the solutions were placed in 18 mL glass vials such that the height of the liquid was not higher than 1 cm. The solution was allowed to freeze using liquid nitrogen. Lyophilization was performed over 9 h to 12 h to yield a dark red powder that was stored at -18 °C.

Re-dispersion procedure

Magneto-fluorescent nanoassembly redispersion was easily performed by adding the adequate solvent (water or physiological media) to the lyophilized sample. No ultrasound treatment was required since the nanoassemblies undergo no aggregation upon redispersion. By this way, the iron concentration could be increased by adding less solvent than the initial volume before lyophilization.

VI.3.3.4. TAT-bioconjugated nanoassemblies

Synthesis of FONmag-PAA-mal

To a solution of **FONmag-PAA** (4 mL, [Fe] = 0.70 mM, pH = 7, 7.7x10³ PAA per FONmag-PAA, 12 µmol COOH, 1 eq.) was acidified until pH = 4 by adding a dilute nitric acid solution (0.06 mmol.L⁻¹). To this solution, N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) (1.86 mg, 12 µmol, 1 eq.) and N-hydroxysuccinimide (1.40 mg, 12 µmol, 1 eq.) were added to transform the polyelectrolyte acrylate units into activated ester moieties. The reaction mixture was then allowed to stir for 1 hour before adding ammonium

hydroxide solution NH_4OH (1 mol.L^{-1}) until reaching $\text{pH} = 9$. Then, the solution was allowed to react with N-(2-aminoethyl)maleimide trifluoroacetate salt (5.44 mg, $21 \text{ } \mu\text{mol}$, 1.8 eq.). After 12 h of stirring at room temperature, the resulting translucent solution was purified by a dialysis procedure using a Spectra Por membrane (Standard Grade Regenerated Cellulose; cut-off: 10 kDa) against Millipore[®] water over 12 h to remove unreacted N-(2-aminoethyl)maleimide trifluoroacetate salt. The dispersion of functionalized **FONmag-PAA-mal** nanoassemblies was stored at $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ overnight.

Synthesis of FONmag-PAA-mal-TAT

To a solution of TAT ($200 \text{ } \mu\text{L}$, $10 \text{ } \mu\text{M}$, 1.6 kDa, 2 nmol) in Hank's Balanced Salt solution (HBSS) under nitrogen, tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) (1.2 mg, 0.17 M in the final HBSS solution) was added to reduce the disulfide bonds into reactive thiol units. The reaction was allowed to stir for 1 hour at room temperature under nitrogen. Purification of the activated protein was performed by dialysis using a Spectra Por membrane (Standard Grade Regenerated Cellulose; cut-off: 0.5–1 kDa) against HBSS buffer solution over 3 h under nitrogen to remove the excess reducing agent. The solution of activated TAT was added under nitrogen to a previously deoxygenated solution of **FONmag-PAA-mal** (2 mL). The solution was then allowed to stir for 12 h at room temperature before purification by a Vivaspın 2 centrifugal ultrafiltration device (polyethersulfone membrane; cut-off: 100 kDa) against HBSS buffer to remove unreacted TAT. The solution of bioconjugated **FONmag-PAA-mal-TAT** was stored at $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ overnight before biological investigation. For optimal results, since TAT is quite a fragile protein, all solutions should be lyophilized and stored at $-18 \text{ } ^\circ\text{C}$ and used within one month after preparation, at the risk of facing complete loss of the conjugated TAT bioactivity.

VI.4. Biological studies in cellulo

VI.4.1.1. Azo-doped FONs (FAONs)

Cell culture

Meso 11 cell line was established from pleural fluids of patients. All cells were maintained in RPMI medium (Invitrogen) supplemented with 2 mmol.L⁻¹ glutamine, 100 IU/mL penicillin, 0.1 mg.mL⁻¹ streptomycin and 10 % heat-inactivated foetal calf serum (FCS) (Eurobio), and grown in a humidified atmosphere of 37 °C and 5 % CO₂. For all experiments, the cell cultures at a confluence of about 80–90 % were washed once with phosphate buffered saline (PBS) and trypsinized (0.05 % trypsin/0.02 % ethylenediaminetetraacetic acid EDTA) (Invitrogen) for 5 minutes. The cells were re-suspended in culture medium.

Azo-free and azo-doped FON internalization

Meso 11 cells were seeded on a μ -slide 8-well Ibitreat microscopy chamber (Ibidi) at 5.10³ cells per well. After 24 h, solutions of nanospheres were added to RPMI (200 μ L), so that a final concentration of 0.25 μ mol.L⁻¹ was obtained. The cell culture medium was then replaced with the adequate freshly prepared solutions. The cells were left in contact with nanospheres for 1, 3 and 5 h. Each well was washed with PBS and incubated with 5 μ g.mL⁻¹ Hoechst 33342 for nucleus staining prior to fixation with 4 % paraformaldehyde for 15 minutes.

Confocal fluorescence imaging

Confocal fluorescence imaging was performed using a Nikon A1R Si microscope, equipped with Ar⁺ and He–Ne lasers as excitation sources and an oil-immersion objective (Plan Apo, 60 \times , NA = 1.4).

VI.4.1.2. Doxorubicin-doped FONs

Cell culture

All cell lines (mesothelioma Meso 13 and Meso 34, and lung adenocarcinoma ADCA 117 and ADCA 211) were established from pleural fluids of patients. All cells were maintained in RPMI medium (Invitrogen) supplemented with 2 mmol.L⁻¹ glutamine, 100 IU/mL penicillin, 0.1 mg.mL⁻¹ streptomycin and 10 % heat-inactivated foetal calf serum (FCS) (Eurobio), and grown in a humidified atmosphere of 37 °C and 5 % CO₂. For all experiments, the cell cultures at a confluence of about 80–90 % were washed once with phosphate buffered saline (PBS) and trypsinized (0.05 % trypsin/0.02 % ethylenediaminetetraacetic acid EDTA) (Invitrogen) for 5 minutes. The cells were re-suspended in culture medium and eosin was used to determine viability before seeding.

Dox-free and dox-doped FONs internalization

Cells were seeded on a μ -slide 8-well Ibitreat microscopy chamber (Ibidi) at 5.10³ cells per well. After 24 h, solutions of FONs, dox-doped FONs and dox.HCl were added to RPMI (200 μ L), so that a final doxorubicin concentration of 0.25 μ mol.L⁻¹ was obtained. The cell culture

medium was then replaced with the adequate freshly prepared solutions. The cells were left in contact with dox-free, dox-doped FONs or dox.HCl for 24, 48 or 72 h. Each well was washed with PBS and incubated with $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ Hoechst 33342 for nucleus staining prior to fixation with 4 % paraformaldehyde for 15 minutes.

Cell viability assay

Cells were seeded in 96-well plates at a density of $5 \cdot 10^3$ cells/well in culture medium for 24 h. Then, dox-free or dox-doped FONs, and doxorubicin were added for an additional 72 h and viability was measured using CellTiter-Glow® kit from PROMEGA.

Confocal fluorescence imaging

Confocal fluorescence imaging was performed using a Nikon A1R Si microscope, equipped with Ar^+ and He–Ne lasers as excitation sources and an oil-immersion objective (Plan Apo, 60 \times , NA = 1.4). 405 and 488 nm laser wavelengths were used for Hoechst 33342, and dox or FON excitation, respectively. Emission was recorded sequentially using emission filters at 450 nm (blue channel), 525 (green channel), or 595 nm (red channel). FONs emitted in both green and red channels and while doxorubicin emission signal could be recorded only in the red channel.

VI.4.1.3. FONmag with different polymers

Cell culture and multicellular spheroid formation

Cell monolayer culture. The mesothelioma cell line Meso 11 was established from the pleural fluids of patients. All cells were maintained in RPMI medium (Invitrogen) supplemented with 2 mmol.L^{-1} glutamine, 100 IU/mL penicillin, 0.1 mg.mL^{-1} streptomycin and 10 % heat-inactivated foetal calf serum (FCS) (Eurobio), and grown in a humidified atmosphere of 37 °C and 5 % CO_2 . For all experiments, the cell cultures at a confluence of about 80–90 % were washed once with phosphate buffered saline (PBS) and trypsinized (0.05 % trypsin/0.02 % ethylenediaminetetraacetic acid EDTA) (Invitrogen) for 5 minutes. The cells were re-suspended in culture medium and eosin was used to determine viability before seeding.

Multicellular spheroid culture. Meso 11 cells were seeded into a Nunclon Sphera 96-well microplate (Thermoscientific) at a density of $2 \cdot 10^4$ cells.well $^{-1}$ in 180 μL of a culture medium. Cells were centrifuged at 800 g for 1 min. After 48 h of incubation at 37 °C and 5% CO_2 , the 3D multicellular spheroid structure was established.

FONmag internalization

Internalization in monolayer. Meso 11 cells were seeded on a μ -slide 8-well Ibitreat microscopy chamber (Ibidi). After 24 h, solutions of **FONmag-PAA**, **FONmag-PAAPEG** and **FONmag-PAAPEG_{RAFT}** (final iron concentrations of 3.3, 2.6, and $2.09 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectively) were added and allowed to be in contact for 24 h. Each well was washed with PBS and incubated with a $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ WGA–AlexaFluor 647 conjugate for 10 min at 37 °C. The cells were then

washed twice with PBS and incubated with a 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Hoechst 33342 for nucleus staining and 4 % paraformaldehyde for 15 min.

Internalization in spheroid. Meso 11 spheroids were treated with **FONmag-PAA**, **FONmag-PAAPEG** and **FONmag-PAAPEG_{GRAFT}** (final iron concentrations of 65.7, 52.2, and 41.7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively) for 24 h. Each well was washed with PBS and incubated with a 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Hoechst 33342 for nucleus staining and 4 % paraformaldehyde for 15 min. Meso 11 MTCSs were washed once with PBS and transferred into a μ -slide angiogenesis plate (Ibidi) for imaging.

Clearing of multicellular spheroids

Multicellular spheroid clearing was performed after the internalization step. PBS was removed from wells containing the multicellular spheroids which were cleared by adding 20 μL of RapiClear[®] in each well. Confocal imaging can be done immediately.

Cell viability assay

5000 cells were grown in the appropriate culture medium (200 μL) for 24 h. They were then incubated for various periods of time with a solution of nanoassemblies dispersed in Millipore[®] water. The cell viability was evaluated by using MTT assays. A solution of MTT (20 μL , 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) was added to the cells which were incubated for a further 2 h-2 h 30 at 37 °C. The supernatant solution was removed and DMSO (200 μL) was added to dissolve the colored oxidized product. Absorbance read-out at 570 nm provides viability of the incubated cells by comparison with reference cells.

Confocal fluorescence imaging

Confocal fluorescence imaging was performed using a Nikon A1R Si microscope, equipped with Ar^+ and He-Ne lasers as excitation sources and an oil-immersion objective (Plan Apo, 60 \times , NA = 1.4).

VI.4.1.4. TAT-bioconjugated nanoassemblies

Cell culture and internalization

Isolation of MuStem cells (human bone marrow-mesenchymal stem cells) was previously described.²³⁶ Cells were thawed. MuStem cells were seeded on 3-well plates for incubation times of 1 day (7 500 cell/ cm^2) and 4, 10 and 14 days (2 500 cell/ cm^2). Cell cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 . Before use, cells were dissociated with TrypLE (Gibco[®]) and viability was determine thanks to a Malassez hemocytometer.

TAT-free and TAT-functionalized FON internalization

MuStem cells (2.8×10^6 cells/well) were seeded on a μ -slide 8-well Ibitreat microscopy chamber (Ibidi). Solutions of **FONmag-PAA** and **FONmag-TAT** ($0.30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and quantum dots (PlasmaChem[®], COOH functionalized CdTe, $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} = 650 \text{ nm}$, diameter of 3.8 nm, 0.05

mg.mL⁻¹) were added and allowed to be in contact for 1, 4, 10 and 14 days. Each well was washed with PBS and incubated with LysoTracker Green for 10 min at 37 °C. The cells were then washed with PBS and imaged without additional treatment.

Flow cytometry

Samples were acquired using a FACS Aria flow cytometer (BD Biosciences) and data were analyzed using FlowJo software (FlowJo, Ashland, Oregon). For each labeling, at least 15,000 viable cells were considered.

Cell proliferation experiments

For cell proliferation experiments, MuStem cells (2.5x10⁶ cells/well) were seeded at in 6-well plates. Solutions of **FONmag-PAA** and **FONmag-TAT** (0.30 μmol.L⁻¹) and quantum dots (PlasmaChem[®], COOH functionalized CdTe, λ_{max}^{em} = 650 nm, diameter of 3.8 nm, 0.05 mg.mL⁻¹) were added. MuStem cell population growth was monitored over a period of 14 days under the culture conditions described above. Cells were washed twice with PBS and dissociated with TrypLE (Gibco[®], 500 μL). Cell number and viability was determined using a Cytoo cell counter.

Immunofluorescence Analysis

MuStem cells were fixed in 2% paraformaldehyde (PFA) in PBS (10 min, RT) and permeabilized with 0.3% triton X-100 (15 min, RT). Cells were washed three times with PBS. After incubation (30 min, RT) in blocking buffer (10 % goat serum in PBS), cells were washed three times with PBS and then incubated with Early Endosomal Antigen 1 (EEA1) Rabbit Polyclonal Antibody (overnight, 4 °C). Cells were washed three times with PBS. Then cells were incubated with Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 488. Cells were finally stained (15 min, 37°C) with DAPI fluorescent cell-permeable DNA probe (Life Technologies Ltd, Paisley, UK).

Confocal fluorescence imaging

Confocal fluorescence imaging was performed using a LSM780 Zeiss (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) equipped with a Fiji image analysis software v.2. 405 and 488 nm laser wavelengths were used for DAPI, LysoTracker[®] Green or Alexa Fluor 488, and FONmag or Qdots excitation, respectively. Emission was recorded at λ_{em} = 491–536 nm for DAPI, LysoTracker[®] Green or Alexa Fluor 488, and λ_{em} = 589–643 nm for FONmag or Qdots.

VI.4.1.5. Bacteria

Bacteria Staphylococcus Aureus (SA) and Pseudomonas Aeruginosa (PA) were seeded in culture flasks with TSB (tryptic soya broth) and let grow overnight. Then, bacteria were washed with TSB and suspended in 950 μL of TSB to get 10⁶ bacteria per well. They were incubated for various periods of time (5 min, 5 h and 24 h) with FON solutions (50 μL) and washed with physiological water before imaging.

VI.4.1.6. Monocytes, lymphocytes and macrophages

Lymphocyte and monocyte culture and FON internalization

Blood samples were collected from healthy donors (EFS, French Blood Authority). PBMCs were separated using Ficoll gradient (Eurobio). Cells were resuspended in RPMI 1640 medium (Gibco®) supplemented with 2mM L-glutamine (Gibco®), 100 U/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin and 10% of heat-inactivated foetal calf-serum (Dominique Dutsher®) at the concentration of $5 \cdot 10^5 \text{ mL}^{-1}$ (2.5×10^6) and seeded into 6-well plate (Nunc). FONs (40µL) were added during 2, 7, 16, 24, 39 and 48 h in the well at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. After these different incubation times, cells were collected and centrifugated during 5 mins at 800 g. Supernatant was removed and cells harvested in PBS. Samples were analysed by flow cytometry (FACSCalibur; Becton Dickinson®) after adding TO-PRO-3 Iodide 642/661 (ThermoFisher). The nature of the cell (monocyte or lymphocyte) was differentiated with FSC/SSC parameter. Results were analyzed with the FACS Flowjo Software (Tree Star Inc®).

Monocyte differentiation and FON internalization in macrophages

Monocytes were seeded in six-well plates at a density of 10^5 cells in culture medium. To obtain M1 macrophages, the medium was supplemented with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor at 20 ng/mL (Cellgenix, Freiburg im Breisgau, Germany) and to obtain M2 macrophages, the medium was supplemented with M-CSF at 50 ng/mL (Isokine, Kopavogur, Iceland). 10^5 cells (1 mL) were seeded in each wells during 3 days at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. To control differentiation, M1 and M2 macrophages were collected and labeled with anti-CD14-fluoresceinisothiocyanate (FITC) (Beckman Coulter, Fullerton, CA) and anti-CD163- allophycocyanin (APC) (R&D Systems) antibodies or IgG2a-FITC (Beckman Coulter) and IgG1-APC (R&D Systems) isotype controls. Viability was assessed using TO-PRO-3 Iodide 642/661 (ThermoFisher). Analysis of the cells was performed using flow cytometry (FACSCalibur; Becton Dickinson®). FON solutions (40 µL) were added for various periods (2, 7, 16, 24, 39 and 48 h). Cells were collected and centrifugated during 5 mins at 800 g. Supernatant were removed and cells harvested in PBS. Samples were analysed by flow cytometry (FACSCalibur; Becton Dickinson®) after adding TO-PRO-3 Iodide 642/661 (ThermoFisher). Results were analyzed with the FACS Flowjo Software (Tree Star Inc®).

Glossaire de photophysique

a) Luminescence, fluorescence et phosphorescence	240
b) Rendement quantique de fluorescence.....	241
c) Brilliance	242
d) Déplacement de Stokes	242
e) Photoblanchiment.....	242
f) Solvatochromisme.....	242
g) Déclin de fluorescence	243
h) Extinction de fluorescence	244
i) Fenêtre de transparence des tissus biologiques ou fenêtre thérapeutique.....	246

a) Luminescence, fluorescence et phosphorescence

Le terme de luminescence, inventé par Eilhard Wiedemann en 1888, désigne l'émission de lumière après excitation par différentes sources : électrique, chimique, thermique, mécanique ou lumineuse. La fluorescence et la phosphorescence, deux types de luminescence bien connus, correspondent à l'émission de lumière après excitation par absorption de photons. L'absorption d'un échantillon en solution homogène et non diffusante est caractérisée par la loi de Beer-Lambert :

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

avec $A(\lambda)$ l'absorbance à la longueur d'onde λ du composé, I_{λ}^0 et I_{λ}^t les intensités des faisceaux incident et transmis, $\varepsilon(\lambda)$ le coefficient d'absorption molaire à la longueur d'onde λ ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), l le trajet optique (cm) et c la concentration molaire de la solution en ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). L'absorption repose sur une transition électronique qui s'effectue en environ 10^{-15} s.

Après excitation, les molécules passent d'un état électronique fondamental S_0 à un état excité S_n de plus haute énergie, comme illustré dans le diagramme de Perrin-Jablonski (Figure 151). La relaxation pour passer de l'état S_n à l'état S_1 s'effectue de manière non radiative par conversion interne (CI) et par relaxation vibrationnelle (RV), où la molécule cède de l'énergie à son environnement. Puis, la désactivation de l'état excité S_1 vers S_0 peut se faire de manière radiative par **fluorescence**, d'une durée de 10^{-10} à 10^{-7} s. La fluorescence correspond à une transition entre deux états électroniques de même multiplicité de spin. Le retour à l'état fondamental peut également s'effectuer selon un processus non radiatif par couplage vibrationnel vers l'état S_0 (conversion interne) ou vers l'état T_1 (croisement intersystème). Or, selon la règle de Kasha, l'émission d'un photon procède généralement depuis l'état excité de plus basse énergie, ce qui se rapporte à étudier la transition $S_1 \rightarrow S_0$.

Après croisement intersystème de l'état excité S_1 vers l'état triplet T_1 , on peut à nouveau assister à une relaxation radiative depuis T_1 vers S_0 . On parle alors de **phosphorescence**, d'une durée de 10^{-6} à 1 s. La phosphorescence correspond à une transition entre deux états électroniques de multiplicités de spin différentes. Sinon, T_1 évolue vers S_0 par un retour non radiatif avec un croisement intersystème et une relaxation vibrationnelle.

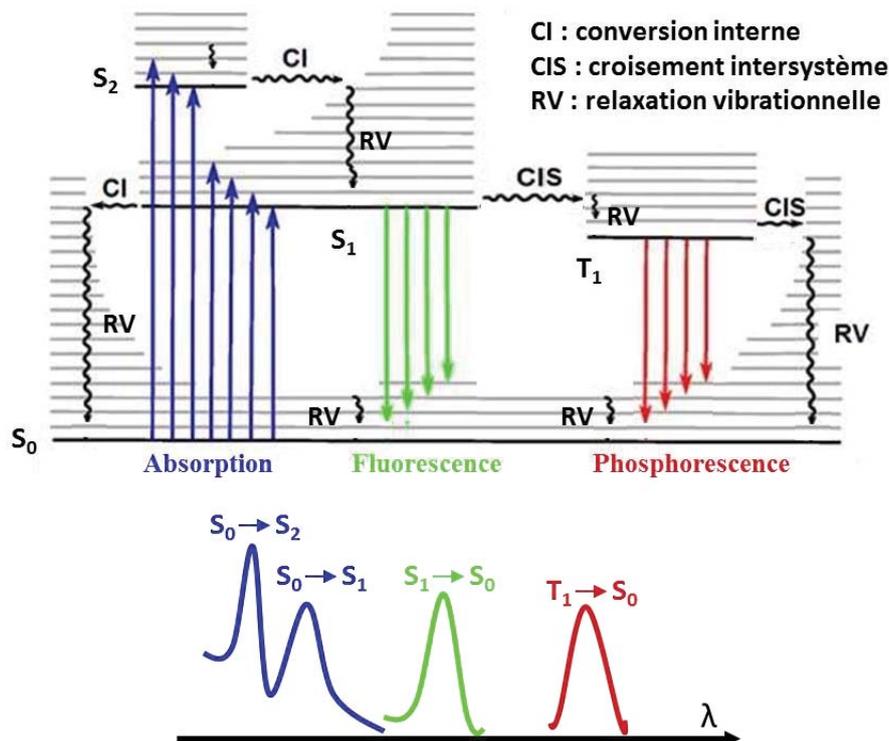


Figure 151 : Diagramme de Perrin-Jablonski et spectres d'absorption et d'émission correspondants.²⁰²

b) Rendement quantique de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence ϕ_f correspond au rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés par le système dans le même temps. Dans la pratique, on acquiert les spectres d'absorption et d'émission du composé à analyser et d'une référence à la même longueur d'onde d'excitation, pour s'affranchir de paramètres expérimentaux tels que la réponse spectrale du détecteur ou l'intensité incidente de la source. Ce rendement est calculé à partir de l'équation ci-après :

$$\phi_f(i) = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}} = \phi_f(\text{ref}) \cdot \frac{I_{em,i}}{I_{em,ref}} \cdot \frac{n_i^2}{n_{ref}^2} \cdot \frac{(1 - 10^{-A(\text{ref})})}{(1 - 10^{-A(i)})}$$

où $\phi_f(\text{ref})$ est le rendement quantique de fluorescence connu d'une espèce de référence, $I_{em,i}$ et $I_{em,ref}$ les intégrales des spectres d'émission obtenus à la même longueur d'onde d'excitation de l'espèce i et de la référence, n_i et n_{ref} les indices de réfraction des solvants dans lesquels sont dissous l'espèce i et la référence et $A(i)$ et $A(\text{ref})$ les absorbances de l'espèce i et de la référence à la longueur d'onde d'excitation. Ce nombre est compris entre 0, pour un composé non fluorescent, et 1, correspondant à un photon émis pour un photon absorbé. Les fluorophores utilisés en imagerie biologique doivent présenter un rendement quantique de fluorescence élevé pour disposer d'un bon rapport signal/bruit en microscopie, notamment par rapport au signal d'autofluorescence des tissus (Voir **Fenêtre de transparence des tissus biologiques ou**

fenêtre thérapeutique). Cependant, cette donnée ne reflète pas totalement l'intensité de fluorescence du composé car elle ne tient pas compte du nombre de photons absorbés. Il faut donc s'intéresser à une autre donnée, la brillance.

c) Brillance

La brillance est le produit du rendement quantique de fluorescence par le coefficient d'absorption molaire, soit :

$$\text{Brillance}(\lambda) = \phi_f \cdot \varepsilon(\lambda)$$

Le coefficient d'absorption molaire $\varepsilon(\lambda)$, exprimé en $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, va traduire la capacité d'une molécule à absorber la lumière. En général, une brillance avoisinant $10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ permet de limiter la quantité de lumière apportée (et donc de protéger les cellules de photo-dommages) en s'assurant d'une intensité de fluorescence suffisamment élevée pour une observation aisée en microscopie.

d) Déplacement de Stokes

Le déplacement de Stokes correspond au décalage en énergie entre le maximum de la bande d'absorption du premier état excité et celui de la bande d'émission. Il est dû à la perte d'énergie par relaxation vibrationnelle de l'état excité avant émission de l'état excité correspondant. Plus la différence de géométrie entre le niveau excité initial, nommé état de Franck-Condon, et le niveau vibrationnel le plus bas est grande, plus le déplacement de Stokes est élevé. Un déplacement de Stokes élevé de l'ordre de 5000 cm^{-1} obtenu avec des molécules flexibles permet d'éviter une réabsorption de la fluorescence et donc une diminution de l'intensité détectée, même s'il s'accompagne souvent d'une diminution du rendement quantique de fluorescence.

e) Photoblanchiment

Le photoblanchiment est défini comme l'affaiblissement de l'intensité de fluorescence suite à une irradiation lumineuse intense ou prolongée.²³⁷ Il implique une transformation photochimique irréversible du fluorophore. L'assemblage de milliers de molécules au sein d'une même nanoparticule permet de pallier ce phénomène. Plus la brillance du composé est élevée, moins l'irradiation doit être élevée et moins le risque de photoblanchiment sera présent.

f) Solvatochromisme

Un composé est dit solvatochrome lorsque l'énergie de ses bandes d'absorption ou d'émission dépend de la polarité du solvant. On parle de déplacement **bathochrome** (solvatochromisme positif) si la longueur d'onde est déplacée vers le rouge et de déplacement **hypsochrome** (solvatochromisme négatif) si elle est déplacée vers le bleu.

g) Déclin de fluorescence

L'enregistrement du déclin de l'intensité de fluorescence permet de remonter à la durée de vie de l'espèce excitée, après une impulsion lumineuse. Ce déclin du signal de fluorescence reflète les processus radiatifs (ici, la fluorescence) et non radiatifs de l'état excité. Cette mesure est essentielle pour comprendre la dynamique de l'état excité pouvant traduire un changement d'environnement. Lors de la mesure, c'est l'intensité de fluorescence $I(t)$ émise par la molécule d'intérêt M portée dans son premier état excité singulet M^* qui va être mesurée et est décrite par :

$$I(t) = k_f [M^*] = k_f [M^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right)$$

avec I_0 l'intensité de fluorescence à l'instant initial et τ_s la durée de vie de l'état excité S_1 .

La relaxation de l'espèce M^* peut être décrite par l'équation :

$$-\frac{d[M^*]}{dt} = (k_f + k_{nr})[M^*]$$

avec k_f la constante de vitesse pour la désexcitation radiative par fluorescence et k_{nr} la constante de vitesse pour la désexcitation non radiative par conversion interne de S_1 vers S_0 ou par croisement intersystème de S_1 vers T_1 .

Après intégration et en posant que $[M^*] = [M^*]_0$ à $t = 0$, on obtient :

$$[M^*] = [M^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right)$$

$$\text{avec } \tau_s = \frac{1}{k_f + k_{nr}}.$$

Ce qui nous donne une équation, notée (13), utilisée pour déterminer les valeurs de k_f et de k_{nr} à partir de celles du temps de vie et du rendement quantique de fluorescence :

$$\boxed{\phi_f = \frac{k_f}{k_f + k_{nr}} = k_f \tau_s} \quad (13)$$

En pratique, un pulse d'excitation (ici, 450 nm) est généré par un faisceau laser subnanoseconde puis envoyé sur l'échantillon à analyser dont les molécules M sont promues dans un état excité. Le recourt à un pulse d'excitation est nécessaire car, en général, le temps de vie correspondant à un processus radiatif par fluorescence est de l'ordre de la nanoseconde. Les photons émis sont détectés par un photomultiplicateur. Dans ce manuscrit, les déclins de fluorescence des solutions de fluorophores ou de nanoassemblages sont enregistrés à 645 nm, longueur d'onde du maximum d'émission. La méthode utilisée est appelée « Time Correlated Single Photon Counting » (TCSPC). Elle repose sur un histogramme reflétant la détermination, renouvelée un grand nombre de fois, du temps nécessaire pour la détection d'un photon unique (Figure 152). La résolution temporelle que nous puissions obtenir avec les instruments au cours de ces travaux est de 140 ps.

L'histogramme peut être modélisé par une loi mathématique mono- ou multi-exponentielle selon l'équation (14) suivante :

$$I(t) = \sum_i a_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right), \text{ avec } f_i = \frac{a_i}{\sum_j a_j} \text{ ou } \frac{a_i \tau_i}{\sum_j a_j \tau_j} \quad (14)$$

avec τ_i les constantes de temps pondérées par leurs facteurs pré-exponentiels a_i (exprimés en nombre de coups) et f_i les fractions représentant les proportions en amplitude ou en intensité, respectivement, des différents temps de vie avec $\sum_i f_i = 1$.

De manière générale, les résultats sont présentés de la manière suivante : $\tau_i (f_i)$ et le temps de vie moyen sera donné par : $\langle \tau_s \rangle = \sum_i f_i \tau_i$ avec les fractions définies dans l'équation (14).

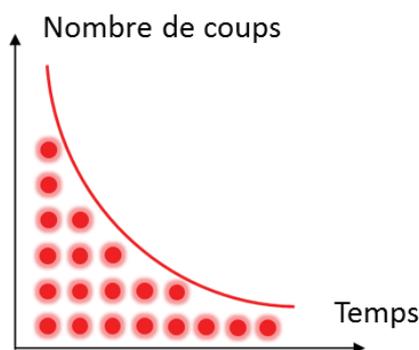


Figure 152 : Allure de l'histogramme et de la modélisation d'un déclin de fluorescence enregistré avec la méthode TCSPC. Chaque point rouge représente un photon arrivé au détecteur.

h) Extinction de fluorescence

Elle est définie par la relaxation non-radiative de l'état excité du fluorophore. Cette relaxation peut être due à des relaxations unimoléculaires (CI et CIS) soit à des interactions intermoléculaires impliquant des collisions (**extinction dynamique de fluorescence**) ou la formation de complexes non fluorescents à l'état fondamental (**extinction statique de fluorescence**).²⁰²

Les **effets de filtre interne** correspondent à la réabsorption des photons émis (par la molécule fluorescente ou une autre molécule) lors de transferts d'énergie radiatifs. Ce phénomène a le plus souvent lieu dans le cas de solutions concentrées et induit une minimisation du signal d'émission attendu. Pour que l'effet de filtre interne ait lieu, il faut que le spectre d'absorption recouvre une partie du spectre d'émission. Il existe également un effet de filtre interne en absorption qui correspond à l'absorption d'une partie de la lumière excitatrice lorsque la solution est concentrée (typiquement $A > 0,1$). Dans ces travaux, et notamment au chapitre 3, ces corrections ont été nécessaires à l'analyse de solutions très concentrées obtenus par ajout successifs d'une solution d'extincteur de fluorescence (composé azoïque) dans une solution de fluorophores. Pour effectuer une correction en absorption et en émission, la formule ci-dessous a été appliquée (15).

$$I_{\text{corrigée}}^{\text{em}}(\lambda_{\text{em}}) = I^{\text{em}} \times \underbrace{\frac{\text{Abs}(\text{F}+\text{I})}{\text{Abs}(\text{F})}}_{\substack{\text{à } \lambda_{\text{exc}} \\ \text{Correction en absorption}}} \times \underbrace{\frac{1}{10^{-\text{Abs}(\text{I})}}}_{\substack{\text{à } \lambda_{\text{em}} \\ \text{Correction en émission}}} \quad (15)$$

avec $I_{\text{corrigée}}^{\text{em}}(\lambda_{\text{em}})$ l'intensité d'émission corrigée à la longueur d'émission λ_{em} , I^{em} l'intensité d'émission à corriger, F le fluorophore et I l'inhibiteur de fluorescence, $\text{Abs}(\text{X})$ l'absorption de l'espèce X et λ_{exc} la longueur d'onde d'excitation.

Parmi les nombreux mécanismes bimoléculaires responsables de l'extinction de la fluorescence, on retrouve les transferts d'électrons, de charges ou de protons photo-induits. Par exemple, les transferts d'électrons impliquent une réaction d'oxydoréduction entre deux espèces différentes formant un complexe retournant à l'état fondamental sans émission de photon. Il existe également d'autres processus comme le **transfert d'énergie** vers une autre espèce de façon radiative ou non radiative. Parmi les transferts non radiatifs (c'est-à-dire sans réabsorption directe d'un photon émis), on peut distinguer le transfert d'énergie par résonance de type Förster ou **FRET** (Förster resonance energy transfer, en anglais). Ce phénomène désigne le transfert d'énergie entre l'état excité d'un système dit « donneur » vers un second système dit « accepteur » d'énergie. Il est uniquement possible si la distance entre le donneur et l'accepteur est faible, de 1 à 10 nm, et s'il y a recouvrement entre les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur.

L'inhibition de la fluorescence peut également s'effectuer entre les molécules de fluorophores elles-mêmes. Un phénomène récemment mis en évidence décrit ces interactions intermoléculaires : l'**extinction induite par agrégation** (en anglais ACQ, pour aggregation-caused quenching) et son pendant, l'**émission induite par agrégation** (en anglais AIE, pour aggregation-induced emission)^{46,238}. L'agrégation est due à des interactions de van der Waals entre les squelettes moléculaires formant des agrégats moins émissifs que la molécule libre (ACQ) ou plus émissifs (AIE). L'AIE est due au fait que l'empilement des squelettes π inhibe les mouvements et donc les rotations responsables des processus de conversion interne non radiatifs.

i) Fenêtre de transparence des tissus biologiques ou fenêtre thérapeutique

Pour des applications en biologie, il est préférable de disposer de signaux de fluorescence entre 650 et 900 nm pour se situer dans la première fenêtre de transparence des tissus biologiques, encore appelée fenêtre thérapeutique (Figure 153).²³⁹ L'émission du fluorophore est alors peu réabsorbée par les entités constitutives des tissus (eau, hémoglobine, protéines). C'est également dans cette fenêtre que la lumière pénètre le mieux dans les tissus. De plus, la fluorescence naturelle des tissus, dite autofluorescence, est minimale. Pour disposer de système présentant une telle émission décalée dans le rouge, il est nécessaire de diminuer l'écart énergétique entre les états excité S_1 et fondamental S_0 . Cette stabilisation est souvent obtenue par extension de systèmes π -conjugués et/ou par introduction d'unités électro-donneuses et -acceptrices donnant lieu à un fort transfert de charge (système push-pull en anglais).

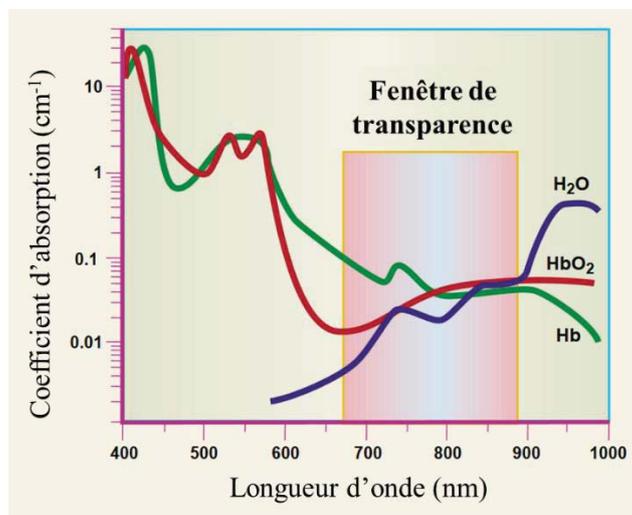


Figure 153 : Spectre d'absorption des tissus biologiques faisant apparaître la première fenêtre de transparence.

Références bibliographiques

1. Aftab, S. *et al.* Nanomedicine: An effective tool in cancer therapy. *Int. J. Pharm.* **540**, 132–149 (2018).
2. Fitzmaurice, C. *et al.* Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study Global Burden. *JAMA Oncol.* **3**, 524–548 (2017).
3. Sobot, D., Mura, S. & Couvreur, P. How can nanomedicines overcome cellular-based anticancer drug resistance? *J. Mater. Chem. B* (2016). doi:10.1039/C6TB00900J
4. Shapira, A., Livney, Y. D., Broxterman, H. J. & Assaraf, Y. G. Nanomedicine for targeted cancer therapy: Towards the overcoming of drug resistance. *Drug Resist. Updat.* **14**, 150–163 (2011).
5. Fredman, G. *et al.* Targeted nanoparticles containing the proresolving peptide Ac2-26 protect against advanced atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Sci. Transl. Med.* **7**, (2015).
6. Cegla, J. Microneedle-array patches loaded with hypoxia-sensitive vesicles provide fast glucose-responsive insulin delivery. *Ann. Clin. Biochem.* **52**, 720 (2015).
7. Wilson, B. *et al.* Poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease. *Brain Res.* **1200**, 159–168 (2008).
8. Mu, H. *et al.* Potent Antibacterial Nanoparticles against Biofilm and Intracellular Bacteria. *Sci. Rep.* **6**, 1–9 (2016).
9. Qadri, S. *et al.* Metallic nanoparticles to eradicate bacterial bone infection. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **13**, 2241–2250 (2017).
10. Amoroso, A. J. & Pope, S. J. A. Using lanthanide ions in molecular bioimaging. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 4723–4742 (2015).
11. Coll, J.-L. Cancer optical imaging using fluorescent nanoparticles. *Nanomedicine* **6**, 7–10 (2011).
12. Terai, T. & Nagano, T. Small-molecule fluorophores and fluorescent probes for bioimaging. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **465**, 347–359 (2013).
13. *The Molecular Probes Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies - 11th edition.* (Life Technologies, 2010).
14. Johnson, L. V, Walsh, M. L., Chen, B. & Buchanan, J. M. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Froc. Natl. Acad. Sc. USA Cell Biol.* **77**, 990–994 (1980).
15. Panchuk-voloshina, N. *et al.* Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates. *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 1179–1188 (1999).
16. Gao, M. *et al.* Targeted imaging of EGFR overexpressed cancer cells by brightly fluorescent nanoparticles conjugated with cetuximab. *Nanoscale* **8**, 15027–15032

- (2016).
17. ATTO-TEC - Fluorescent Labels and Dyes. at <<http://www.attotec.com/index.php?id=128&L=1>>
 18. Reineck, P. & Gibson, B. C. Near-Infrared Fluorescent Nanomaterials for Bioimaging and Sensing. *Adv. Opt. Mater.* **5**, 1600446 (2017).
 19. Bourg-heckly, G. & Mordonet, S. Photodiagnostic et chirurgie guidés par la fluorescence. *Actual. Chim.* **397–398**, 41–45 (2015).
 20. Mérian, J., Gravier, J., Navarro, F. & Texier, I. Fluorescent nanoprobe dedicated to in vivo imaging: From preclinical validations to clinical translation. *Molecules* **17**, 5564–5591 (2012).
 21. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd edition*. (Springer US, 2006).
 22. Chen, S. *et al.* Human serum albumin (HSA) coated liposomal indocyanine green for in vivo tumor imaging. *RSC Adv.* **6**, 15220–15225 (2016).
 23. Saxena, V., Sadoqi, M. & Shao, J. Enhanced photo-stability, thermal-stability and aqueous-stability of indocyanine green in polymeric nanoparticulate systems. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **74**, 29–38 (2004).
 24. Day, R. N. & Davidson, M. W. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 2887 (2009).
 25. Stepanenko, O. V., Stepanenko, O. V., Kuznetsova, I. M., Verkhusha, V. V. & Turoverov, K. K. Beta-Barrel Scaffold of Fluorescent Proteins: Folding, Stability and Role in Chromophore Formation. *Int Rev Cell Mol Biol* **302**, 221–278 (2013).
 26. Jensen, E. C. Use of fluorescent probes: their effect on cell biology and limitations. *Anat. Rec.* **295**, 2031–2036 (2012).
 27. Battistelli, G., Cantelli, A., Guidetti, G., Manzi, J. & Montalti, M. Ultra-bright and stimuli-responsive fluorescent nanoparticles for bioimaging. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **8**, 139–150 (2016).
 28. Jiang, S., Gnanasammandhan, M. K. & Zhang, Y. Optical imaging-guided cancer therapy with fluorescent nanoparticles. *J. R. Soc. Interface* **7**, 3–18 (2010).
 29. Zhang, W.-H., Hu, X.-X. & Zhang, X.-B. Dye-Doped Fluorescent Silica Nanoparticles for Live Cell and In Vivo Bioimaging. *Nanomaterials* **6**, 81 (2016).
 30. Montalti, M., Prodi, L., Rampazzo, E. & Zaccheroni, N. Dye-doped silica nanoparticles as luminescent organized systems for nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 4243–4268 (2014).
 31. Xu, Z. *et al.* Multifunctional silica nanoparticles as a promising theranostic platform for biomedical applications. *Mater. Chem. Front.* **1**, 1257–1272 (2017).
 32. Braeken, Y., Cheruku, S., Ethirajan, A. & Maes, W. Conjugated polymer nanoparticles for bioimaging. *Materials (Basel)*. **10**, 1–23 (2017).
 33. Reisch, A. & Klymchenko, A. S. Fluorescent Polymer Nanoparticles Based on Dyes: Seeking Brighter Tools for Bioimaging. *Small* **12**, 1968–1992 (2016).

34. Fernando, L. P. *et al.* Mechanism of Cellular Uptake of Highly Fluorescent Conjugated Polymer Nanoparticles. *Biomacromolecules* **11**, 2675–2682 (2010).
35. Fischer, I., Kaeser, A., Peters-Gumbs, M. A. M. & Schenning, A. P. H. J. Fluorescent π -conjugated polymer dots versus self-assembled small-molecule nanoparticles: What's the difference? *Chem. - A Eur. J.* **19**, 10928–10934 (2013).
36. Müller, J. G., Atas, E., Tan, C., Schanze, K. S. & Kleiman, V. D. The role of exciton hopping and direct energy transfer in the efficient quenching of conjugated polyelectrolytes. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 4007–4016 (2006).
37. Nune, S. K. *et al.* Nanoparticles for biomedical imaging. *Expert Opin. Drug Deliv.* **6**, 1175–1194 (2009).
38. Lee, S. & Chen, X. Dual-modality probes for in vivo molecular imaging. *Mol. Imaging* **8**, 87–100 (2009).
39. Bogart, L. K. *et al.* Nanoparticles for imaging, sensing, and therapeutic intervention. *ACS Nano* **8**, 3107–3122 (2014).
40. Debbage, P. & Jaschke, W. Molecular imaging with nanoparticles: Giant roles for dwarf actors. *Histochem. Cell Biol.* **130**, 845–875 (2008).
41. Li, Z.-H., Peng, J. & Chen, H.-L. Bioconjugated Quantum Dots as Fluorescent Probes for Biomedical Imaging. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **11**, 7521–7536 (2011).
42. Sun, X. & Lei, Y. Fluorescent carbon dots and their sensing applications. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **89**, 163–180 (2017).
43. Wolfbeis, O. S. An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 4743–4768 (2015).
44. Bozzuto, G. & Molinari, A. Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 975–999 (2015).
45. Fery-Forgues, S. Fluorescent organic nanocrystals and non-doped nanoparticles for biological applications. *Nanoscale* **5**, 8428–8442 (2013).
46. Mei, J., Leung, N. L. C., Kwok, R. T. K., Lam, J. W. Y. & Tang, B. Z. Aggregation-Induced Emission: Together We Shine, United We Soar! *Chem. Rev.* **115**, 11718–11940 (2015).
47. Vasudevan, D., Gaddam, R. R., Trinchi, A. & Cole, I. Core-shell quantum dots: Properties and applications. *J. Alloys Compd.* **636**, 395–404 (2015).
48. Yao, J., Yang, M. & Duan, Y. Chemistry, biology, and medicine of fluorescent nanomaterials and related systems: New insights into biosensing, bioimaging, genomics, diagnostics, and therapy. *Chem. Rev.* **114**, 6130–6178 (2014).
49. Guo, C. X. *et al.* A new class of fluorescent-dots: Long luminescent lifetime bio-dots self-assembled from DNA at low temperatures. *Sci. Rep.* **3**, 1–6 (2013).
50. Zheng, Y., Sadeghimakki, B., Jahed, N. M. S. & Sivoththaman, S. Scalable Non-injection Synthesis of Cd-Free Copper Indium Sulfide/Zinc Sulfide Quantum Dots for Third-Gen Photovoltaic Application. *MRS Adv.* **1**, 2193–2198 (2016).
51. Reiss, P., Carrière, M., Lincheneau, C., Vaure, L. & Tamang, S. Synthesis of

- Semiconductor Nanocrystals, Focusing on Nontoxic and Earth-Abundant Materials. *Chem. Rev.* **116**, 10731–10819 (2016).
52. Zhu, S. *et al.* Highly photoluminescent carbon dots for multicolor patterning, sensors, and bioimaging. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 3953–3957 (2013).
 53. Chen, T.-H. & Tseng, W.-L. Self-Assembly of Monodisperse Carbon Dots into High-Brightness Nanoaggregates for Cellular Uptake Imaging and Iron(III) Sensing. *Anal. Chem.* [acs.analchem.7b02193](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02193) (2017). doi:10.1021/acs.analchem.7b02193
 54. Faklaris, O. *et al.* Photoluminescent diamond nanoparticles for cell labeling: Study of the uptake mechanism in mammalian cells. *ACS Nano* **3**, 3955–3962 (2009).
 55. Hsiao, W. W. W., Hui, Y. Y., Tsai, P. C. & Chang, H. C. Fluorescent Nanodiamond: A Versatile Tool for Long-Term Cell Tracking, Super-Resolution Imaging, and Nanoscale Temperature Sensing. *Acc. Chem. Res.* **49**, 400–407 (2016).
 56. Chang, Y. R. *et al.* Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds. *Nat. Nanotechnol.* **3**, 284–288 (2008).
 57. Whitesides, G., Mathias, J. & Seto, C. Molecular self-assembly and nanochemistry: a chemical strategy for the synthesis of nanostructures. *Science.* **254**, 1312–1319 (1991).
 58. Whitesides, G. M. Self-Assembly at All Scales. *Science.* **295**, 2418–2421 (2002).
 59. Lei, T. & Pei, J. Solution-processed organic nano- and micro-materials: design strategy, growth mechanism and applications. *J. Mater. Chem.* **22**, 785–798 (2012).
 60. Patra, A., Chandaluri, C. G. & Radhakrishnan, T. P. Optical materials based on molecular nanoparticles. *Nanoscale* **4**, 343–359 (2012).
 61. Xing, P. & Zhao, Y. Multifunctional Nanoparticles Self-Assembled from Small Organic Building Blocks for Biomedicine. *Adv. Mater.* 7304–7339 (2016). doi:10.1002/adma.201600906
 62. Genin, E. *et al.* ‘Hyper-Bright’ Near-Infrared Emitting Fluorescent Organic Nanoparticles for Single Particle Tracking. *Adv. Mater.* **26**, 2258–2261 (2014).
 63. Kasai, H. *et al.* A novel preparation method of organic microcrystals. *Jpn. J. Appl. Phys.* **31**, 1132–1134 (1992).
 64. Asahi, T., Sugiyama, T. & Masuhara, H. Laser Fabrication and Spectroscopy of Organic Nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* **41**, 1790–1798 (2008).
 65. Ibanez, A., Maximov, S., Guiu, A., Chaillout, C. & Baldeck, P. L. Controlled nanocrystallization of organic molecules in sol-gel glasses. *Adv. Mater.* **10**, 1540–1543 (1998).
 66. Brosseau, A. *et al.* Multicolor Emission of Small Molecule-Based Amorphous Thin Films and Nanoparticles with a Single Excitation Wavelength. *Chem Mater.* **20**, 6597–6599 (2008).
 67. Faucon, A. *et al.* Tuning the Architectural Integrity of High-Performance Magneto-Fluorescent Core-Shell Nanoassemblies in Cancer Cells. *J. Colloid Interface Sci.* **479**, 139–149 (2016).
 68. Wakamiya, A., Mori, K. & Yamaguchi, S. 3-Boryl-2,2'-bithiophene as a versatile core

- skeleton for full-color highly emissive organic solids. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **46**, 4273–4276 (2007).
69. Parthasarathy, V. *et al.* Dipolar versus octupolar triphenylamine-based fluorescent organic nanoparticles as brilliant one- and two-photon emitters for (Bio)imaging. *Small* **7**, 3219–3229 (2011).
 70. Breton, M. *et al.* Solvatochromic dissociation of non-covalent fluorescent organic nanoparticles upon cell internalization. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 13268–13276 (2011).
 71. Faucon, A. *et al.* Are Fluorescent Organic Nanoparticles Relevant Tools for Tracking Cancer Cells or Macrophages? *Adv. Healthc. Mater.* **4**, 2727–2734 (2015).
 72. Li, K. & Liu, B. Polymer-encapsulated organic nanoparticles for fluorescence and photoacoustic imaging. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 6570–6597 (2014).
 73. Key, J. & Leary, J. F. Nanoparticles for multimodal in vivo imaging in nanomedicine. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 711–726 (2014).
 74. Kermarrec, E. Nouveaux états quantiques de spin induits par frustration magnétique sur le réseau kagome. (2012).
 75. Shen, Z., Wu, A. & Chen, X. Iron Oxide Nanoparticle Based Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Mol. Pharm.* **14**, 1352–1364 (2017).
 76. Mansfield, P. & Maudsley, A. A. Medical imaging by NMR. *Br. J. Radiol.* **50**, 188–194 (1977).
 77. Tan, A. L. *et al.* High-resolution MRI assessment of Dactylitis in psoriatic arthritis shows flexor tendon pulley and sheath-related enthesitis. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 185–189 (2015).
 78. Linot, C. *et al.* PEGylated Anionic Magnetofluorescent Nanoassemblies: Impact of Their Interface Structure on Magnetic Resonance Imaging Contrast and Cellular Uptake. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 14242–14257 (2017).
 79. Rybicki, F. J. & Ersoy, H. Biochemical Safety Profiles of Gadolinium-Based Extracellular Contrast Agents and Nephrogenic Systemic Fibrosis. *J Magn Reson Imaging* **26**, 1190–1197 (2007).
 80. Perazella, M. A. Current status of gadolinium toxicity in patients with kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **4**, 461–469 (2009).
 81. U.S.FoodandDrugAdministration. U S Food and Drug Administration. at <<https://www.fda.gov/>>
 82. Bünzli, J. C. G. On the design of highly luminescent lanthanide complexes. *Coord. Chem. Rev.* **293–294**, 19–47 (2015).
 83. Yan, G. P., Robinson, L. & Hogg, P. Magnetic resonance imaging contrast agents: Overview and perspectives. *Radiography* **13**, 5–19 (2007).
 84. Rohrer, M., Bauer, H., Mintorovitch, J., Requardt, M. & Weinmann, H. J. Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Invest. Radiol.* **40**, 715–724 (2005).
 85. Hedayatnasab, Z., Abnisa, F. & Daud, W. M. A. W. Review on magnetic nanoparticles

- for magnetic nanofluid hyperthermia application. *Mater. Des.* **123**, 174–196 (2017).
86. Akinc, A. & Battaglia, G. Exploiting Endocytosis for Nanomedicines. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **5**, 1–24 (2013).
 87. Lartigue, L. *et al.* Biodegradation of iron oxide nanocubes: High-resolution in situ monitoring. *ACS Nano* **7**, 3939–3952 (2013).
 88. Kolosnjaj-Tabi, J. *et al.* The One Year Fate of Iron Oxide Coated Gold Nanoparticles in Mice. *ACS Nano* **9**, 7925–7939 (2015).
 89. Filiale Guerbet en France. at <<http://www.guerbet.com/fr/>>
 90. Lu, C. W., Hsiao, J. K., Liu, H. M. & Wu, C. H. Characterization of an iron oxide nanoparticle labelling and MRI-based protocol for inducing human mesenchymal stem cells into neural-like cells. *Nature* **7**, 1–12 (2017).
 91. Nonat, A. Complexes de lanthanides(III) pour le développement de nouvelles sondes magnétiques et luminescentes. (2007).
 92. Bertorelle, F. *et al.* Fluorescence-modified superparamagnetic nanoparticles: Intracellular uptake and use in cellular imaging. *Langmuir* **22**, 5385–5391 (2006).
 93. Zhou, L., Zhang, X., Liu, L., Wei, Y. & Yuan, J. Multifunctional Fluorescent Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Targeted Cell Imaging Applications. *Chinese J. Chem.* **35**, 977–983 (2017).
 94. Alcantara, D. *et al.* Fluorochrome-functionalized magnetic nanoparticles for high-sensitivity monitoring of the polymerase chain reaction by magnetic resonance. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **51**, 6904–6907 (2012).
 95. Insin, N. *et al.* Incorporation of Iron Oxide Nanoparticles and Quantum Dots into Silica Microspheres. *ACS Nano* **2**, 197–202 (2008).
 96. Howes, P. *et al.* Magnetic conjugated polymer nanoparticles as bimodal imaging agents. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 9833–9842 (2010).
 97. Lee, J. H., Jun, Y. W., Yeon, S. I., Shin, J. S. & Cheon, J. Dual-mode nanoparticle probes for high-performance magnetic resonance and fluorescence imaging of neuroblastoma. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **45**, 8160–8162 (2006).
 98. Sheng, Y., Li, S., Duan, Z., Zhang, R. & Xue, J. Fluorescent magnetic nanoparticles as minimally-invasive multi-functional theranostic platform for fluorescence imaging, MRI and magnetic hyperthermia. *Mater. Chem. Phys.* **204**, 388–396 (2018).
 99. Cho, M. *et al.* Characterization and optimization of the fluorescence of nanoscale iron oxide/quantum dot complexes. *J. Phys. Chem. C* **118**, 14606–14616 (2014).
 100. Chen, O. *et al.* Magneto-fluorescent core-shell supernanoparticles. *Nat. Commun.* **5**, 1–8 (2014).
 101. Béalle, G. *et al.* Ultra magnetic liposomes for MR imaging, targeting, and hyperthermia. *Langmuir* **28**, 11834–11842 (2012).
 102. Ishow, E. & Faucon, A. Magnetic and fluorescent reverse nanoassemblies. (2014).
 103. Faucon, A. *et al.* Organic nanoparticles as a central platform of magnetofluorescent nano-assemblies toward two-photon bioimaging applications. *SPIE Nanosci. + Eng.*

- 8464, (2012).
104. Faucon, A. *et al.* Photoactive chelating organic nanospheres as central platforms of bimodal hybrid nanoparticles. *J. Mater. Chem. C* **1**, 3879–3886 (2013).
 105. Faucon, A. *et al.* Highly cohesive dual nanoassemblies for complementary multiscale bioimaging. *J. Mater. Chem. B* **2**, 7747–7755 (2014).
 106. Faucon, A. *et al.* Bioconjugated fluorescent organic nanoparticles targeting EGFR-overexpressing cancer cells. *Nanoscale* **9**, 18094–18106 (2017).
 107. Liu, D. & Auguste, D. T. Cancer targeted therapeutics: From molecules to drug delivery vehicles. *J. Control. Release* **219**, 632–643 (2015).
 108. Wilhelm, S. *et al.* Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat. Rev. Mater.* **1**, 1–12 (2016).
 109. Chen, Z. *et al.* Controlled release of free doxorubicin from peptide-drug conjugates by drug loading. *J. Control. Release* **191**, 123–130 (2014).
 110. Torrice, M. Does nanomedicine have a delivery problem? *ACS Cent. Sci.* **2**, 434–437 (2016).
 111. Maeda, H. Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond. *J. Control. Release* **164**, 138–144 (2012).
 112. Elsabahy, M., Heo, G. S., Lim, S., Sun, G. & Wooley, K. L. Polymeric Nanostructures for Imaging and Therapy. *Chem. Rev.* **115**, 10967–11011 (2015).
 113. Hillaireau, H. & Couvreur, P. Nanocarriers' entry into the cell: Relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2873–2896 (2009).
 114. Cagel, M., Grotz, E., Bernabeu, E., Moretton, M. A. & Chiappetta, D. A. Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. *Drug Discov Today* **00**, (2016).
 115. Huynh, N. T., Passirani, C., Saulnier, P. & Benoit, J. P. Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. *Int. J. Pharm.* **379**, 201–209 (2009).
 116. zur Mühlen, A., Schwarz, C. & Mehnert, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - Drug release and release mechanism. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **45**, 149–155 (1998).
 117. Weissig, V., Pettinger, T. K. & Murdock, N. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 4357–4373 (2014).
 118. Junyaprasert, V. B. & Morakul, B. Nanocrystals for enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Asian J. Pharm. Sci.* **10**, 13–23 (2015).
 119. Pillai, G. Nanomedicines for Cancer Therapy : An Update of FDA Approved and Those under Various Stages of Development. *SOJ Pharm Pharm Sci* **1**, 1–13 (2014).
 120. Bobo, D. *et al.* Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharm Res.* **33**, 2373–2387 (2016).
 121. Albanese, A., Tang, P. S. & Chan, W. C. W. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **14**, 1–16 (2012).
 122. Panariti, A., Miserocchi, G. & Rivolta, I. The effect of nanoparticle uptake on cellular

- behavior: Disrupting or enabling functions? *Nanotechnol. Sci. Appl.* **5**, 87–100 (2012).
123. Wilhelm, S. *et al.* Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat. Rev. Mater.* **1**, 1–12 (2016).
 124. Bae, Y. H. & Park, K. Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility. *J. Control. Release* **153**, 198–205 (2011).
 125. Lundqvist, M. *et al.* The evolution of the protein corona around nanoparticles: A test study. *ACS Nano* **5**, 7503–7509 (2011).
 126. Aggarwal, P., Hall, J. B., McLeland, C. B., Dobrovolskaia, M. A. & McNeil, S. E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 428–437 (2009).
 127. Amoozgar, Z. & Yeo, Y. Recent advances in stealth coating of nanoparticle drug delivery systems. **4**, 219–233 (2012).
 128. Danhier, F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *J. Control. Release* **244**, 108–121 (2016).
 129. Mallick, A. *et al.* Dual drug conjugated nanoparticle for simultaneous targeting of mitochondria and nucleus in cancer cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 7584–7598 (2015).
 130. Polo, E., Collado, M., Pelaz, B. & Del Pino, P. Advances toward More Efficient Targeted Delivery of Nanoparticles in Vivo: Understanding Interactions between Nanoparticles and Cells. *ACS Nano* **11**, 2397–2402 (2017).
 131. Nicole J. Yang, M. J. H. Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins. *Methods Mol Biol* 29–53 (2015). doi:10.1007/978-1-4939-2272-7
 132. Bassaglia, Y. *Biologie cellulaire*. (2004).
 133. Conner, S. D. & Schmid, S. L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**, 37–43 (2003).
 134. Huang, J. G., Leshuk, T. & Gu, F. X. Emerging nanomaterials for targeting subcellular organelles. *Nano Today* **6**, 478–492 (2011).
 135. Kafshgari, M. H., Harding, F. J. & Voelcker, N. H. Insights into Cellular Uptake of Nanoparticles. *Curr. Drug Deliv.* 63–77 (2015). doi:10.2174/1567201811666140821110631
 136. Verma, A. & Stellacci, F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* **6**, 12–21 (2010).
 137. Mitchell, H. D. *et al.* Cells Respond to Distinct Nanoparticle Properties with Multiple Strategies As Revealed by Single-Cell RNA-Seq. *ACS Nano* **10**, 10173–10185 (2016).
 138. Martens, T. F., Remaut, K., Demeester, J., De Smedt, S. C. & Braeckmans, K. Intracellular delivery of nanomaterials: How to catch endosomal escape in the act. *Nano Today* **9**, 344–364 (2014).
 139. Varkouhi, A. K., Scholte, M., Storm, G. & Haisma, H. J. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *J. Control. Release* **151**, 220–228 (2011).

140. Sawant, R. R. *et al.* Polyethyleneimine-lipid conjugate-based pH-sensitive micellar carrier for gene delivery. *Biomaterials* **33**, 3942–3951 (2012).
141. Bechara, C. & Sagan, S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett.* **587**, 1693–1702 (2013).
142. Mura, S., Nicolas, J. & Couvreur, P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nat. Mater.* **12**, 991–1003 (2013).
143. Yatvin, M., Weinstein, J., Dennis, W. & Blumenthal, R. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. *Science (80-.).* **202**, 1290–1293 (1978).
144. Celsion Corporation. ThermoDox | Celsion. (2016). at <<https://celsion.com/thermodox/>>
145. Min, K. H. *et al.* Tumoral acidic pH-responsive MPEG-poly(β -amino ester) polymeric micelles for cancer targeting therapy. *J. Control. Release* **144**, 259–266 (2010).
146. MagForceAG. MagForce AG – NanoTherm® Therapy. at <<http://www.magforce.de/en/produkte/nanotherm-therapie.html>>
147. N’Guyen, T. T. T. *et al.* Functional iron oxide magnetic nanoparticles with hyperthermia-induced drug release ability by using a combination of orthogonal click reactions. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 14152–14156 (2013).
148. Fortin, J. P. *et al.* Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 2628–2635 (2007).
149. Jordan, A. *et al.* Effects of Magnetic Fluid Hyperthermia (MFH) on C3H mammary carcinoma in vivo. *Int. J. Hyperth.* **13**, 587–605 (1997).
150. Jordan, A., Scholz, R., Wust, P., Fähling, H. & Roland Felix. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **201**, 413–419 (1999).
151. Fine, J. S. Iron poisoning. *Curr. Probl. Pediatr.* **30**, 71–90 (2000).
152. Pankhurst, Q., Connolly, J., Jones, S. & Dobson, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.* 1–16 (2003). doi:10.1088/0022-3727/36/13/201
153. Hergt, R., Dutz, S. & Röder, M. Effects of size distribution on hysteresis losses of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *J. Phys. Condens. Matter* **20**, 1–12 (2008).
154. Johannsen, M., Thiesen, B., Wust, P. & Jordan, A. Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer. *Int. J. Hyperth.* **26**, 790–795 (2010).
155. Martinez-Boubeta, C. *et al.* Learning from nature to improve the heat generation of iron-oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia applications. *Sci. Rep.* **3**, 1–8 (2013).
156. Lartigue, L. *et al.* Cooperative organization in iron oxide multi-core nanoparticles potentiates their efficiency as heating mediators and MRI contrast agents. *ACS Nano* **6**, 10935–10949 (2012).
157. Di Corato, R. *et al.* Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs. *Biomaterials* **35**, 6400–6411 (2014).
158. Schieber, M. M. *Experimental Magnetochemistry: nonmetallic magnetic materials.*

- (North-Holland Publishing Company, 1967).
159. Faucon, A. Nanomatériaux moléculaires fluorescents et magnétiques pour la bio-imagerie multi-échelle. (2014).
 160. Daou, T. J. *et al.* Coupling Agent Effect on Magnetic Properties of Functionalized Magnetite-Based Nanoparticles. *Chem Mater.* **20**, 5869–5875 (2008).
 161. Pilgram, K., Zupan, M. & Skiles, R. Bromination of 2,1,3-Benzothiadiazoles. 2–6 (1970).
 162. Kaplánek, R. & Paleta, O. Amphiphilic perfluoroalkylated sulfones and sulfonate betaines. *J. Fluor. Chem.* **128**, 789–796 (2007).
 163. Armentrout, R. S. & McCormick, C. L. Water soluble polymers. 76. Electrolyte responsive cyclocopolymers with sulfobetaine units exhibiting polyelectrolyte or polyampholyte behavior in aqueous media. *Macromolecules* **33**, 419–424 (2000).
 164. Han, H.-S. *et al.* Spatial charge configuration regulates nanoparticle transport and binding behavior in vivo. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 1414–1419 (2013).
 165. Lennox, A. J. J. & Lloyd-Jones, G. C. Selection of boron reagents for Suzuki–Miyaura coupling. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 412–443 (2014).
 166. Hofmann, K. *et al.* Solvatochromism and linear solvation energy relationship of diol- and proline-functionalized azo dyes using the Kamlet-Taft and Catalán solvent parameter sets. *New J. Chem.* **32**, 2180–2188 (2008).
 167. Girard, P. *et al.* Strong Color Tuning of Self-Assembled Azo-Derived Phosphonic Acids upon Hydrogen Bonding. *ChemPhotoChem* **1**, 6–11 (2017).
 168. Faucon, A. *et al.* Fluorescent carboxylic and phosphonic acids: comparative photophysics from solution to organic nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 12748–12756 (2013).
 169. Fonseca, C., Simoes, S. & Gaspar, R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J. Control. Release* **83**, 273–286 (2002).
 170. Su, J. *et al.* Giant Amplification of Photoswitching by a Few Photons in Fluorescent Photochromic Organic Nanoparticles. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **55**, 3662–3666 (2016).
 171. Bareras-Urbina, C. G. *et al.* Nano- and Micro-Particles by Nanoprecipitation: Possible Application in the Food and Agricultural Industries. *Int. J. Food Prop.* **19**, 1912–1923 (2016).
 172. Breton, M. *et al.* Solvatochromic dissociation of non-covalent fluorescent organic nanoparticles upon cell internalization. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 13268–13276 (2011).
 173. Miladi, K., Sfar, S., Fessi, H. & Elaissari, A. *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines.* (2016). doi:10.1007/978-3-319-41421-8
 174. Cho, E. J. *et al.* Nanoparticle characterization: State of the art, challenges, and emerging technologies. *Mol. Pharm.* **10**, 2093–2110 (2013).
 175. Lim, J., Yeap, S., Che, H. & Low, S. Characterization of magnetic nanoparticle by

- dynamic light scattering. *Nanoscale Res. Lett.* **8**, 1–14 (2013).
176. Torrisi, V. *et al.* Preventing Corona Effects : Multiphosphonic Acid Poly(ethylene glycol) Copolymers for Stable Stealth Iron Oxide Nanoparticles. *Biomacromolecules* **15**, 3071–3179 (2014).
 177. Moore, T. L. *et al.* Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 6287–6305 (2015).
 178. Chan, W. C. W. & Nie, S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science (80-.)*. **281**, 2016–2018 (1998).
 179. Sevrain, C. M., Berchel, M., Couthon, H. & Jaffrès, P.-A. Phosphonic acid: preparation and applications. *Beilstein J. Org. Chem.* **13**, 2186–2213 (2017).
 180. Blanquart, C., Brochard, P., Cherie-Challine, L., Chouaid, C. & Galtaeau-Salle, F. Synthèse des Journées Francophones du Mésothéliome. in *Journées Francophones du Mésothéliome* (2017).
 181. Kou, L., Sun, J., Zhai, Y. & He, Z. The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian J. Pharm. Sci.* **8**, 1–8 (2013).
 182. van Onzen, A. H. A. M., Albertazzi, L., Schenning, A. P. H. J., Milroy, L.-G. & Brunsveld, L. Hydrophobicity determines the fate of self-assembled fluorescent nanoparticles in cells. *Chem. Commun.* **53**, 1626–1629 (2017).
 183. Jouenne, T. Biofilms bactériens. *Techniques de l'Ingénieur* **33**, 1–15 (2016).
 184. Chung, H. J. *et al.* Ubiquitous Detection of Gram-Positive Bacteria with Bioorthogonal Magneto fluorescent Nanoparticles. *ACS Nano* **5**, 8834–8841 (2011).
 185. Geilich, B. M., Gelfat, I., Sridhar, S., van de Ven, A. L. & Webster, T. J. Superparamagnetic iron oxide-encapsulating polymersome nanocarriers for biofilm eradication. *Biomaterials* **119**, 78–85 (2017).
 186. Perrin, M. L., Burzurí, E. & Zant, H. S. J. van der. Nanomaterial–microbe cross-talk: physicochemical principles and (patho)biological consequences. *Chem. Soc. Rev* **44**, 902–919 (2015).
 187. Boudjemaa, R. *et al.* Failure of daptomycin to kill *Staphylococcus aureus*: impact of bacterial membrane fatty acid composition. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, (2018).
 188. Mills, C. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit. Rev. Immunol.* **32**, 463–88 (2012).
 189. Almatroodi, S. A., McDonald, C. F., Darby, I. A. & Pouniotis, D. S. Characterization of M1/M2 Tumour-Associated Macrophages (TAMs) and Th1/Th2 Cytokine Profiles in Patients with NSCLC. *Cancer Microenviron.* **9**, 1–11 (2016).
 190. Cuccarese, M. F. *et al.* Heterogeneity of macrophage infiltration and therapeutic response in lung carcinoma revealed by 3D organ imaging. *Nat. Commun.* **8**, 1–10 (2017).
 191. Zeisberger, S. M. *et al.* Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: A new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br. J. Cancer* **95**, 272–281 (2006).

192. Rodell, C. B. *et al.* TLR7/8-agonist-loaded nanoparticles promote the polarization of tumour-associated macrophages to enhance cancer immunotherapy. *Nat. Biomed. Eng.* **1**, 1 (2018).
193. Qie, Y. *et al.* Surface modification of nanoparticles enables selective evasion of phagocytic clearance by distinct macrophage phenotypes. *Sci. Rep.* **6**, 1–10 (2016).
194. Baine, M. J. *et al.* Transcriptional profiling of peripheral blood mononuclear cells in pancreatic cancer patients identifies novel genes with potential diagnostic utility. *PLoS One* **6**, 1–10 (2011).
195. Li-lin, J. *et al.* Intramolecular photoinduced electron-transfer in azobenzene-perylene diimide Intramolecular photoinduced electron-transfer in. *Chinese Phys. B* **19**, 1–7 (2010).
196. Lubbe, A. S., Szymanski, W. & Feringa, B. L. Recent developments in reversible photoregulation of oligonucleotide structure and function. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 1052–1079 (2017).
197. Deiana, M. *et al.* Probing the binding mechanism of photoresponsive azobenzene polyamine derivatives with human serum albumin. *RSC Adv.* **7**, 5912–5919 (2017).
198. Adam, V. *et al.* Expanding the Toolbox of Photoswitches for DNA Nanotechnology Using Arylazopyrazoles. *Chem. - A Eur. J.* **24**, 1062–1066 (2018).
199. Lubbe, A. S. *et al.* Photoswitching of DNA hybridization using a molecular motor. *J. Am. Chem. Soc.* jacs.7b09476 (2018). doi:10.1021/jacs.7b09476
200. Tyagi, S. & Kramer, F. R. Molecular Beacons: Probes that Fluoresce Upon Hybridization. *Nat. Biotechnol.* **14**, 303–308 (1996).
201. Ishow, E. *et al.* Two-photon fluorescent holographic rewritable micropatterning. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 8970–8971 (2007).
202. Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications.* (Wiley-VCH, 2002).
203. Vranic, S. *et al.* Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry. *Part. Fibre Toxicol.* **10**, 1–16 (2013).
204. Wilhelm, C., Gazeau, F., Roger, J., Pons, J. N. & Bacri, J. C. Interaction of anionic superparamagnetic nanoparticles with cells: Kinetic analyses of membrane adsorption and subsequent internalization. *Langmuir* **18**, 8148–8155 (2002).
205. Krishnamohan Sharma, C. V. & Clearfield, A. Three-dimensional hexagonal structures from a novel self-complementary molecular building block. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4394–4402 (2000).
206. Sadakiyo, M., Yamada, T., Honda, K., Matsui, H. & Kitagawa, H. Control of crystalline proton-conducting pathways by water-induced transformations of hydrogen-bonding networks in a metal-organic framework. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 7701–7707 (2014).
207. Wilken, R., Veena, M. S., Wang, M. B. & Srivatsan, E. S. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol. Cancer* **10**, 1–19 (2011).
208. Levy, M. Nanostructures Magnétiques pour le Diagnostic et la Thérapie : Hyperthermie,

- Relaxation Magnétique et Devenir dans l'Organisme. (2011).
209. Thanh, N. T. K. *Magnetic Nanoparticles: From Fabrication to Clinical Applications*. (2012).
 210. Lak, A. *Synthesis and Characterization of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles*. (Institut für Elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik, Braunschweig, 2013).
 211. Massart, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Trans. Magn.* **17**, 1247–1248 (1981).
 212. Laurent, S. *et al.* Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications (vol 108, pg 2064, 2008). *Chem. Rev.* **108**, 2064–2110 (2008).
 213. Lucas, I. T., Durand-Vidal, S., Dubois, E., Chevalet, J. & Turq, P. Surface charge density of maghemite nanoparticles: Role of electrostatics in the proton exchange. *J. Phys. Chem. C* **111**, 18568–18576 (2007).
 214. Lefebure, S., Dubois, E., Cabuil, V., Neveu, S. & Massart, R. Monodisperse magnetic nanoparticles: Preparation and dispersion in water and oils. *J. Mater. Res.* **13**, 2975–2981 (1998).
 215. Chanteau, B., Fresnais, J. & Berret, J. F. Electrosteric enhanced stability of functional sub-10 nm cerium and iron oxide particles in cell culture medium. *Langmuir* **25**, 9064–9070 (2009).
 216. Kadajji, V. G. & Betageri, G. V. Water soluble polymers for pharmaceutical applications. *Polymers (Basel)*. **3**, 1972–2009 (2011).
 217. Cherepy, N. J., Liston, D. B., Lovejoy, J. A., Deng, H. & Zhang, J. Z. Ultrafast Studies of Photoexcited Electron Dynamics in γ - and α -Fe₂O₃ Semiconductor Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **102**, 770–776 (1998).
 218. Turro, N. J. *et al.* Spectroscopic Probe of the Surface of Iron Oxide Nanocrystals. *Nano Lett.* **2**, 325–328 (2002).
 219. Jeong, U., Teng, X., Wang, Y., Yang, H. & Xia, Y. Superparamagnetic colloids: Controlled synthesis and niche applications. *Adv. Mater.* **19**, 33–60 (2007).
 220. O'Handley, R. . *Modern Magnetic Materials Principles and Application*. (2000).
 221. Abenojar, E. C., Wickramasinghe, S., Bas-Concepcion, J. & Samia, A. C. S. Structural effects on the magnetic hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles. *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* **26**, 440–448 (2016).
 222. Sreeja, V. & Joy, P. A. Effect of inter-particle interactions on the magnetic properties of magnetite nanoparticles after coating with dextran. *Int. J. Nanotechnol.* **8**, 907–915 (2011).
 223. Casula, M. F. *et al.* Magnetic resonance imaging contrast agents based on iron oxide superparamagnetic ferrofluids. *Chem. Mater.* **22**, 1739–1748 (2010).
 224. Stoner, E. C. & Wohlfarth, E. P. A Mechanism of Magnetic Hysteresis in Heterogeneous Alloys. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. A. Math. Phys. Sci.* **240**, 599–642 (1948).
 225. Roch, A., Muller, R. N. & Gillis, P. Theory of proton relaxation induced by

- superparamagnetic particles. *J. Chem. Phys.* **110**, 5403–5411 (1999).
226. Kechrakos, D. & Trohidou, K. Magnetic properties of dipolar interacting single-domain particles. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **58**, 12169–12177 (1998).
 227. Bałanda, M. AC susceptibility studies of phase transitions and magnetic relaxation: Conventional, molecular and low-dimensional magnets. *Acta Phys. Pol. A* **124**, 964–976 (2013).
 228. Romanus, E. *et al.* Energy barrier distributions of maghemite nanoparticles. *Nanotechnology* **18**, 1–8 (2007).
 229. Weiswald, L. B., Bellet, D. & Dangles-Marie, V. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia (United States)* **17**, 1–15 (2015).
 230. Fennema, E., Rivron, N., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C. & De Boer, J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol.* **31**, 108–115 (2013).
 231. Lartigue, L. *et al.* Water-dispersible sugar-coated iron oxide nanoparticles. An evaluation of their relaxometric and magnetic hyperthermia properties. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 10459–10472 (2011).
 232. Reynolds, G. A. & Drexhage, K. H. New coumarin dyes with rigidized structure for flashlamp-pumped dye lasers. *Opt. Commun.* **13**, 222–225 (1975).
 233. Chen, F. Dual functionalization of magnetic nanoparticles by electroactive molecules and antibodies for platelet antigens detection. (Ecole Centrale Lyon, Université de Lyon, 2017).
 234. Salazar, J. S. *et al.* Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in 10 - 40 nm Range : Composition in Terms of Magnetite / Maghemite Ratio and Effect on the Magnetic Properties. *Chem. Mater.* **23**, 1379–1386 (2011).
 235. Hougounenq, P. Toxicologie des Nanoparticules d'Oxyde de Fer : Impact des Modifications de Surface. (2012).
 236. Lorant, J. Cellules souches adultes MuStem : phénotype, myogénicité, immunomodulation et contexte immunologique d'administration in vivo. (2016).
 237. Diaspro, A., Chirico, G., Usai, C., Ramoino, P. & Dobrucki, J. Photobleaching. *Handb. Biol. Confocal Microsc.* 690–702 (2006). doi:doi: 10.1007/978-0-387-45524-2_39
 238. Ma, X. *et al.* Fluorescence Aggregation-Caused Quenching versus Aggregation-Induced Emission: A Visual Teaching Technology for Undergraduate Chemistry Students. *J. Chem. Educ.* **93**, 345–350 (2016).
 239. Weissleder, R. A clearer vision for in vivo imaging. *Nat. Biotechnol.* **19**, 316–317 (2001).

PEGylated Anionic Magnetofluorescent Nanoassemblies: Impact of Their Interface Structure on Magnetic Resonance Imaging Contrast and Cellular Uptake

Camille Linot,[†] Julien Poly,^{*,‡} Joanna Boucard,[§] Daniel Pouliquen,[†] Steven Nedellec,[⊥] Philippe Hulin,[⊥] Nadège Marec,^{||} Paolo Arosio,[#] Alessandro Lascialfari,^{#,§} Andrea Guerrini,[¶] Claudio Sangregorio,[¶] Marc Lecouvey,^{#,∇} Lénaïc Lartigue,[§] Christophe Blanquart,^{*,†} and Eléna Ishow^{*,§,Ⓜ}

[†]IRS UN, INSERM-UMR 1232, CRCINA, 8 quai Moncoussu, 44007 Nantes, France

[‡]IS2M, UMR, CNRS 7361, Université de Haute-Alsace, 15 rue Jean Starcky, 68057 Mulhouse, France

[§]CEISAM, UMR, CNRS 6230, Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes, France

[⊥]INSERM, UMS 016, UMS, CNRS 3556, Université de Nantes, 8 quai Moncoussu, 44007 Nantes, France

^{||}Plateforme CytoCell, INSERM, UMR 1232, Université de Nantes, 44007 Nantes, France

[#]Department of Physics, Università di Pavia, via Bassi, 27100 Pavia, Italy

[§]Department of Physics, Università degli Studi di Milano and INSTM, via Celoria 16, 20133 Milano, Italy

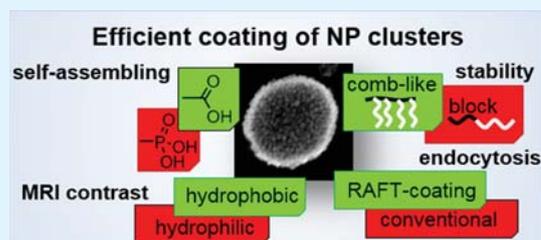
[¶]ICCOM-CNR via Madonna del Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino, Fiorentino, Italy

[∇]CSPBAT-UMR CNRS 7244, Université de Villetaneuse–Paris 13, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France

Supporting Information

ABSTRACT: Controlling the interactions of functional nanostructures with water and biological media represents high challenges in the field of bioimaging applications. Large contrast at low doses, high colloidal stability in physiological conditions, the absence of cell cytotoxicity, and efficient cell internalization represent strong additional needs. To achieve such requirements, we report on high-payload magnetofluorescent architectures made of a shell of superparamagnetic iron oxide nanoparticles tightly anchored around fluorescent organic nanoparticles. Their external coating is simply modulated using anionic polyelectrolytes in a final step to provide efficient magnetic resonance imaging (MRI) and fluorescence imaging of live cells. Various structures of PEGylated polyelectrolytes have been synthesized and investigated, differing from their iron oxide complexing units (carboxylic vs phosphonic acid), their structure (block- or comblike), their hydrophobicity, and their fabrication process [conventional or reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT)-controlled radical polymerization] while keeping the central magnetofluorescent platforms the same. Combined photophysical, magnetic, NMRD, and structural investigations proved the superiority of RAFT polymer coatings containing carboxylate units and a hydrophobic tail to impart the magnetic nanoassemblies (NAs) with enhanced-MRI negative contrast, characterized by a high r_2/r_1 ratio and a transverse relaxation r_2 equal to 21 and 125 $s^{-1} \text{ mmol}^{-1} \text{ L}$, respectively, at 60 MHz clinical frequency ($\sim 1.5 \text{ T}$). Thanks to their dual modality, cell internalization of the NAs in mesothelioma cancer cells could be evidenced by both confocal fluorescence microscopy and magnetophoresis. A 72 h follow-up showed efficient uptake after 24 h with no notable cell mortality. These studies again pointed out the distinct behavior of RAFT polyelectrolyte-coated bimodal NAs that internalize at a slower rate with no adverse cytotoxicity. Extension to multicellular tumor cell spheroids that mimic solid tumors revealed the successful internalization of the NAs in the periphery cells, which provides efficient deep-imaging labels thanks to their induced T_2^* contrast, large emission Stokes shift, and bright dotlike signal, popping out of the strong spheroid autofluorescence.

KEYWORDS: multimodal nanoassemblies, organic nanoparticles, iron oxide nanoparticles water-soluble RAFT polymers, fluorescence, MRI, live cells, spheroids



INTRODUCTION

Multifunctional nanoassemblies (NAs) comprising units with complementary properties have emerged as must-have systems in the field of bioimaging for the past decade.^{1,2} They advantageously enable cross-correlation analyses to avoid false

Received: February 5, 2017

Accepted: April 5, 2017

Published: April 5, 2017



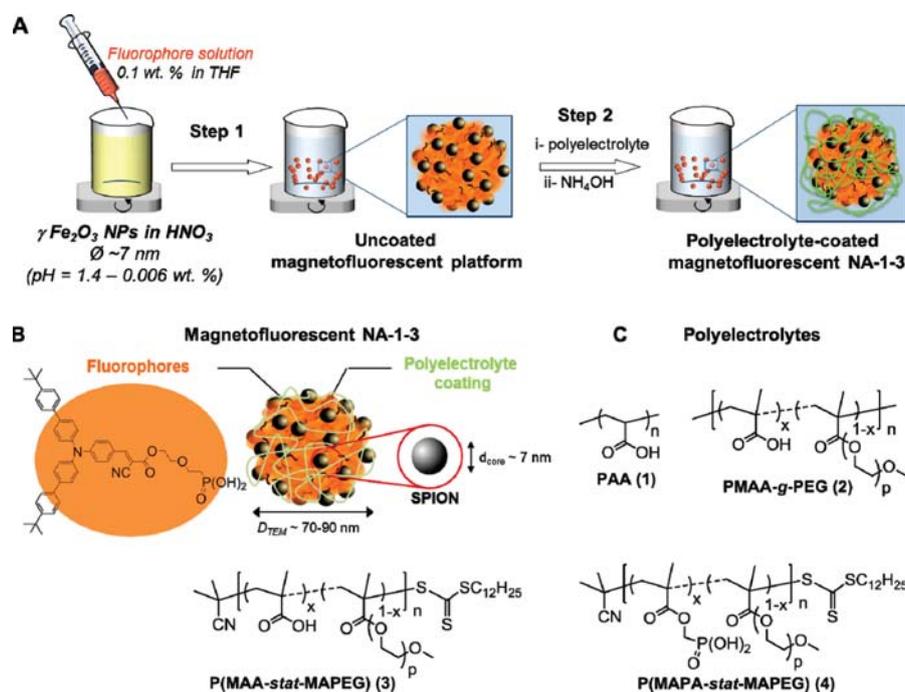


Figure 1. (A) Two-step fabrication process of NAs. (B) Schematic structure of the magnetofluorescent NAs stabilized with an anionic polyelectrolyte coating, chelating the shell of magnetic nanoparticles. (C) Structure of the synthesized iron oxide complexing polyelectrolytes.

positives and adapt more easily to the location or target to be examined, opening the path toward personalized medicine. In this respect, magnetofluorescent nanostructures represent attractive multimodal imaging agents that can bridge the gap between in vitro and in vivo investigations. They facilitate high-resolution diagnosis under simple handling and addressing conditions without requiring specific protection equipment against ionizing radiation.^{3,4} Designing complex architectures with high performances thus represents one big challenge, while colloidal and chemical stability, biodegradability, and non-significant toxicity represent even higher stakes. For these reasons, superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs), regarded as noncytotoxic,⁵ have widely been used as efficient negative contrast agents in magnetic resonance imaging (MRI) thanks to their large transverse relaxivity r_2 and their possible biodegradation upon mineralization and sequestration in iron-loading and transferring proteins.^{6,7} Small superparamagnetic magnetite Fe_3O_4 or maghemite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles with diameters of less than 10 nm have attracted special attention because they are cleared faster in vivo compared to larger nanoparticles.^{8–10} To provide higher imaging contrast, recent interest has been paid to the tight clustering of SPIONs within single NAs of larger sizes, so that high-magnetic-field inhomogeneity is produced, speeding up the transverse relaxation of the surrounding water protons because of strong spin dephasing.^{3,10–14} Cross-linked silica or latex matrixes have been much praised in the past to encapsulate fluorescent and magnetic units. Owing to their poor biodegradability capabilities, they are nowadays being supplanted by hydrophilic polymers and liposomes that simply entrap functional units upon phase demixing and offer potential clinical transfer.^{15,16} However, the later associations face one main drawback, relying on the absence of specific interactions between the stabilizing chains/shells and the assembled iron oxide nanoparticles. Uncontrolled progressive release of SPIONs can occur because

of natural liposome rupture or small ion decomplexation; hence, steric or charge repulsions are lost and lead to deleterious nanoparticle agglomeration and reduced contrast efficiency. Seeking stable associations with a high magnetic contrast while keeping hydrodynamic diameters of less than 200 nm large thus represents a high challenge. Such NAs were fabricated in nitric acid, which precluded any further biological use.¹⁷ We thus resorted to polyelectrolytes such as poly(acrylic acid) (PAA), containing strong iron oxide chelating units, to stabilize the outer surface of the core–shell structures in water. By contrast, small citrate ions were revealed to be unable to ensure tight cohesion of the whole structure in vitro and led to conducted progressive disassembling of the magnetic nanoparticles and fluorescent core.¹⁸ Thus, PAA has currently appeared as a very attractive biocompatible stabilizing ligand because it displays a strong affinity for iron oxide,^{19,20} little toxicity²¹ and multiple anchoring points, limiting its detachment from the iron oxide surface, even after in vivo injection.²² More recently, poly(phosphonic acid) (PPA), known for its even larger association to iron, was also shown to form a very strong stabilizing shell around SPIONs.^{23,24} While most of studies have largely investigated the impact of the diameter of SPIONs and magnetic NAs on MRI contrast and cellular uptake,^{5,25} the effects of the polymer shell architecture have much more rarely been scrutinized.^{26,27} Yet, evidence has been reported on the consequences of gold nanoparticle surface structuration (regular vs irregular) with molecular brushes^{25,28} onto the membrane penetration mechanism, while polymer geometries (cyclic vs linear) of polyester nanocarriers influence the pharmacokinetics of drug delivery.²⁹

In order to focus on the impact of the polymer architectures, regardless of the length of the polymer main chain and the shape of the NAs, we have targeted biocompatible hydrophilic polymers, differing only by their geometry, hydrophobicity, and chelating strength of SPIONs, to stabilize the outer surface of

high-density magnetofluorescent architectures in water and physiological media. Because PEGylation offers limited protein adsorption and additional increased blood circulation time for further in vivo investigations,^{8,30} three distinct architectures containing poly(ethylene glycol) (PEG) chains were explored, varying in terms of the iron oxide chelating affinity (carboxylic vs phosphonic acids) and hydrophobicity (with or without alkyl fragment) compared to the PEG-devoid polyelectrolyte.

NMR and transmission electron microscopy (TEM) measurements have originally been combined with fluorescence ones to investigate the impact of the polymer coating on the relaxivity properties of the NAs and gain insight into the structure of their interface with solutions. To point out the effect of such microstructures on cell interactions, biological studies, facilitated by the high brightness of the fluorescent NA platform, were performed on malignant pleural mesothelioma (MPM) cancer cells, a very severe cancer contracted after exposure to asbestos and facing a poor prognosis of a 12-month median survival time only with the currently administered drugs. Fluorescence confocal imaging and MRI investigations allowed us to track cell uptake of the magnetofluorescent NAs by two MPM cell lines and revealed high colloidal and chemical stability, no cytotoxicity effect, and progressive internalization over 24 h, the speed of which depends on the polymer nature. These biological experiments were successfully extended to multicellular tumor cell spheroids (MTCSs), known as dense structures of thousands of self-assembled cancer cells and representing novel responsible alternative models of solid tumors inoculated in small living animals. All of the reported studies point out the high benefit of using well-controlled polymer coatings, such as those issued from controlled radical polymerization, and provide a very general and simple synthetic approach toward efficient and versatile multimodal nanolabels for future in vivo cell tracking.

RESULTS AND DISCUSSION

Fabrication of High-Density Magnetofluorescent NAs.

The fabrication of magnetofluorescent NAs proceeded in two stages that allowed us to tailor the stabilizing polyelectrolyte without changing the nature and ratio of the functional constituents of the magnetofluorescent platform (Figure 1A). In the first step, SPIONs, fabricated following alkaline coprecipitation of iron(II) and iron(III) salts and further oxidation of Fe₃O₄ magnetite into γ -Fe₂O₃ maghemite with iron(III) nitrate, were dispersed in nitric acid solutions (pH 1.4) at a 0.006 wt % iron concentration.³¹ Adding a concentrated solution of small hydrophobic fluorophores, substituted with phosphonic acid functionality and endowed with solid-state emission properties, simply formed fluorescent organic nanoparticles (FONs) upon nanoprecipitation. FONs usually form by adding a water-miscible solution of fluorophores into a large volume of water. Using water-insoluble fluorophores actually represents a novel strategy to generate FONs that represent an emerging class of emissive nanomaterials for sensitive bioimaging and has proven to induce no cell mortality and low photobleaching.^{32,33} Intermolecular π - π aggregation, promoted by hydrophobic effects, causes spontaneous nanoprecipitation of small hydrophobic fluorophores into bright nanoparticles containing more than 10⁵ dyes. In our case, the presence of phosphonic units drives self-assembly of SPIONs all around the FON surface through chelation by the outer red-emitting fluorophores placed at the water-FON interface.

FON nanoprecipitation actually operates first because SPION complexation requires prior exchange of the labile-stabilizing nitrate anions with the strongly interacting phosphonic units.¹⁷ In this way, SPION incorporation inside the organic core does not occur, and raspberry-like hybrid nanostructures are exclusively obtained with SPIONs attached around the FON surface.

The second step of the fabrication process consisted of colloidal stabilization of the NA magnetic shells using polyelectrolytes with a strong affinity for iron oxide (Figure 1B). A typical procedure consists of adding the polyelectrolytes as powders to the acidic solutions of NAs, increasing the pH to 9 by adding a few drops of a 1.3 mol·L⁻¹ ammonium hydroxide solution to favor deprotonation of the acidic units. After standing for 15 min, the solution was dialyzed using membranes with an adapted molecular weight cutoff to remove the nongrafted polymers. To realize such a stabilization, various polyelectrolytes with similar-sized main functional chains were targeted and differ in their geometry, charge density, and hydrophobicity. Commercial linear block PAA_{2000-co}-PEG₂₄₀₀ copolymers were first used but were unable to generate stable NAs, and only intractable material was obtained. This effect tends to recall previous studies on 400-nm-large alumina oxide nanoparticles³⁴ showing preferential adsorption of block PEGylated anionic copolymers involving acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid sodium salt monomers (AMPS-*b*-PEG) over comblike statistical copolymers (AMPS-*stat*-PEG). In such block copolymers, the strongly adsorbed sulfonate chains on the nanoparticle surface led to large aggregates that are, however, stabilized by electrostatic repulsions thanks to the long anionic chains (100 units). We suspect here the same phenomenon, except that the much shorter methacrylate chains (28 units) do not provide enough charge density to stabilize the NAs while the PEG chain organization may be partly impaired, causing inhomogeneous distributions of steric repulsions. We thus privileged comblike structures involving poly(methacrylic acid) (PMAA) or poly[(methacryloyloxy)methylphosphonic acid] as the main chains and PEG₂₀₀₀ or PEG₁₁₀₀ as the side chains to allow for a better “crown”-like organization of the polymer, with the (meth)acrylate heads pointing to the NA and the PEG side chains extending into water all the way around the NA surface. Short main chains of 25 repetitive units were deliberately targeted because longer chains were reported to bridge several NAs, causing severe aggregation in water.¹⁸ Hence, four polymers were used to assess the effects exerted by a controlled polymer topology and composition as well as the presence of PEG chains on the NA structures and their interactions with biological media: commercially available PAA with no PEG units (1), PMAA-*g*-PEG (2) issued from random esterification of PMAA chains with PEG, P(MAA-*stat*-MAPEG) (3), and P(MAPA-*stat*-MAPEG) (4) fabricated following reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization of PEG-vinyl macromonomers with the corresponding methacrylic acid or (methacryloyloxy)-methylphosphonic acid monomers, respectively (Figure 1C). Among the various controlled radical polymerization strategies, RAFT polymerization is nowadays highly favored because it generates water-soluble and biocompatible polymers with narrow polydispersity indices and finely controlled architectures.^{35,36} In addition, it is revealed to be compatible with a large number of functional monomers and provides easy access to complex copolymers and ready-to-use terminal reactive groups with no need for protection-deprotection steps. In this

way, polymers containing various chelating units like carboxylate, phosphonate, or sulfur could be easily generated to ensure colloidal stability of metal oxide and metallic nanoparticles upon efficient complexation.^{24,37}

The polymer characteristics are gathered in Table 1. The RAFT polymers described in this contribution bear a

Table 1. Structural Characteristics of Iron Oxide Chelating Polyelectrolytes Employed as Coatings

polyelectrolyte	M_n (g mol ⁻¹) ^a	M_w (g mol ⁻¹)	PI ^a	n^b	p^b	x (%) ^b
1	n.a.	1.8×10^3	n.a.	24	0	100
2	5.86×10^4	10.9×10^4	1.87	30	43	78
3	3.99×10^4	5.19×10^4	1.30	30	43	80
4	2.68×10^4	3.75×10^4	1.40	25	23	60

^aPI designates the polydispersity index determined from SEC analyses using DMF as the solvent. ^b n = degree of polymerization of the main chain, p = degree of polymerization of the side chains, and x = molar fraction of the acid comonomer units in the main chain, as depicted in Figure 1C.

trithiocarbonate chain end. It was previously described that this functional group does not induce any noticeable cytotoxicity.³⁸ The 2-cyano-2-propyldodecyl trithiocarbonate (CPDTC) functional unit was thus used as a RAFT agent suitable for the controlled polymerization of methacrylates. Its alkyl substituent advantageously imparts the polymer architecture with additional hydrophobicity, which allowed us to study the direct impact of a partly hydrophobic coating on the MRI performance and cellular uptake without modifying the overall number of anionic units and their complexing ability.

The tolerance of the RAFT mechanism to various functional groups enabled the direct copolymerization of a PEG methacrylate macromonomer with either MAA or MAPA, following simple synthetic procedures in solution. The comblike topology was obtained here by a graft-through method.³⁹ The statistical distribution of the two types of monomer units was ensured by the similar reactivity ratios of the selected methacrylate comonomers.

Influence of the PEG Coating and Complexing Units on the NA Structure. TEM measurements revealed a tremendous difference in the NA structure depending on the complexing units of the polyelectrolytes. Phosphonic acid

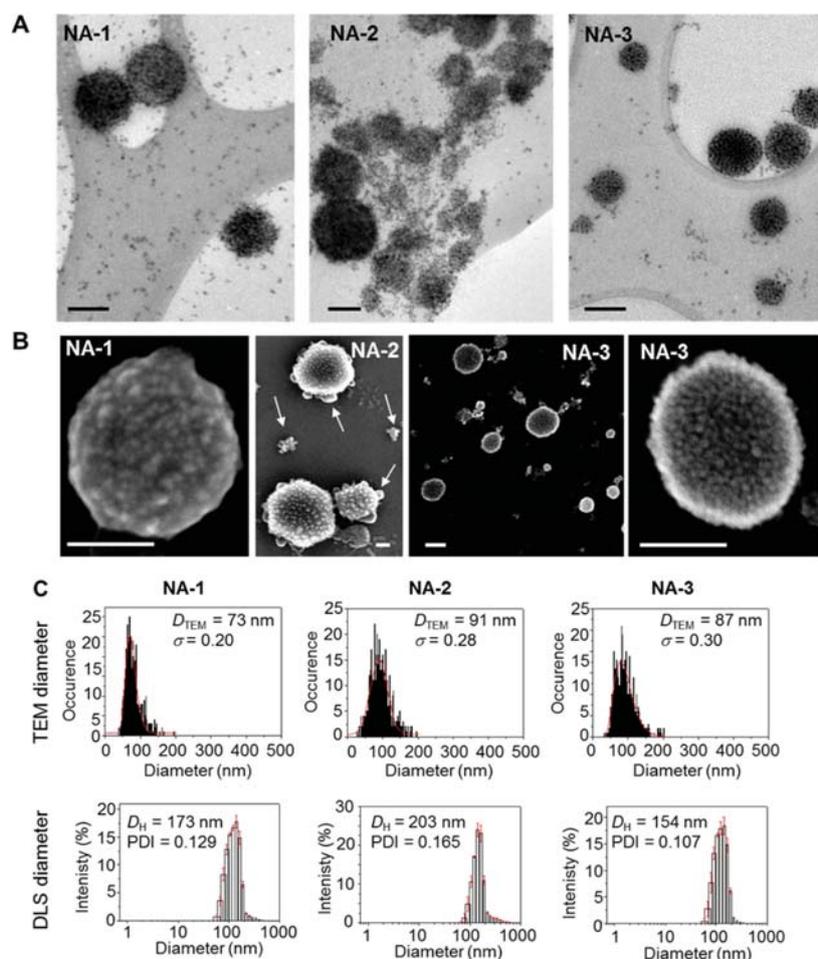


Figure 2. (A) TEM imaging on holey carbon-coated copper grids and (B) SEM imaging on a silicon wafer of magnetofluorescent NA-1, NA-2, and NA-3. Scale bar: 100 nm. White arrows indicate fused or melted NA-2. (C) Histograms of diameter distributions of NA-1, NA-2, and NA-3 assessed by TEM measurements (D_{TEM}) and DLS analyses in water (D_H). Note that the TEM diameter distributions follow a log-normal function (red curve).

Table 2. Structural and Photophysical Characterization of Magnetofluorescent NAs Coated with PAA (1), PMAA-g-PEG (2), and P(MAA-*stat*-MAPEG) (3) Polyelectrolytes

NA	D_{TEM} (nm) (standard deviation)	D_{H} (nm)/PDI	ζ (mV)	[Fe] (mM)	$\lambda^{\text{max}}(\text{abs})$ (nm)	$\lambda^{\text{max}}(\text{em})$ (nm)	Φ_{r} ($\times 10^{-2}$)
NA-1	73 (0.20)	173/0.129	-51.9 ± 6.4	0.384	423	614	1.45
NA-2	91 (0.28)	203/0.165	-32.6 ± 5.7	0.543	428	612	0.83
NA-3	87 (0.30)	154/0.107	-53.0 ± 10.5	0.459	429	595	0.20

containing polyelectrolytes yielded neat separation between maghemite nanoparticles and clearer globules, ascribed to organic matter due to their lower electronic contrast (Figure S1). By contrast, all polyelectrolytes containing carboxylic acid units generated well-defined spherical structures (here dubbed NA-1, NA-2, and NA-3), as shown by TEM imaging (Figure 2A). Here, we want to point out that no such NAs could be formed by simply mixing polymer solutions with SPIONs (Figure S2).

Because TEM imaging of the acidic NA solution, namely, before the addition of any polyelectrolyte, showed also the same raspberry-like structure,¹⁷ we concluded that PPA is so complexing with respect to the fluorescent core that it stripped SPIONs out and pulled them apart. No improvement could be obtained by decreasing the molar fraction of phosphonic acid monomer units down to 20% to avoid such competitive complexation interactions as detected by TEM imaging (Figure S3). Obviously, choosing the right order in the complexation affinity from the center to the outer part of multishell structures is crucial to achieving stable NAs, and tremendous solubilization of a metal oxide core upon privileged cation complexation by the shell was even reported in the past.⁴⁰ A similar situation was already observed when the fluorophores of the core were substituted with a carboxylic acid unit.¹⁸ The latter proved insufficient to retain the complexed iron oxide nanoparticles after coating with PAA exerting competitive multifold attachment. Hence, only PAA-based (1) and PMAA-based (2) polyelectrolytes and 3 were retained for the following studies.

Looking carefully at the corresponding NA structure as a function of the polyelectrolyte structure, a superior density of SPIONs could be observed at the surface of both NA-2 and NA-3. For the latter two, less isolated maghemite nanoparticles could be observed, contrary to NA-1 involving a PAA-stabilizing coating (Figure 2A). Interestingly, scanning electron microscopy (SEM) imaging reveals NAs twice as large as those detected by TEM, along with giant well-defined aggregates (400–500 nm large; Figure 2B). Because argon plasma treatment was applied for a few seconds to gain electronic contrast, we suspect partial melting of the self-assembled organic core of the NAs and even fusion for several of them. This results in enlarged diameters as well as large aggregates with small peripheral protuberances (especially for NA-2) ascribed to the initial NAs. Thus, SEM imaging indirectly indicated the soft core's character of the raspberry-like magnetofluorescent NAs. Overall, the mean dry diameters D_{TEM} evaluated by a TEM size log-normal distribution varied between 70 and 90 nm with a relatively low standard deviation ($\sigma < 0.30$; Table 2 and Figure 2C). The PEGylated NAs were found to be slightly larger by a few nanometers as a result of the larger size of polymers 2 and 3. Interestingly, the hydrodynamic diameters D_{H} of NA dispersions in water, measured by dynamic light scattering (DLS), followed quite a distinct trend. The D_{H} values were found at 170–200 nm, systematically larger than the dry diameters D_{TEM} , as a result of the surrounding hydration shells. NA-3 appeared to be smaller, with $D_{\text{H}} = 154$

nm, which suggests a less extended coating in water due to the presence of the hydrophobic⁴¹ chains of the RAFT agent, as was already reported for PEG chains grafted to phospholipids with long alkyl chains.⁴² The lack of similar trends between both D_{H} and D_{TEM} values emphasizes the importance of complementary measurements and the complex impact of Coulombic and dipolar interactions on the recruitment of water molecules, as was also exemplified by the charge potential ζ measurements. A lesser ζ potential was found for NA-2 with a PMAA-g-PEG coating, issued from conventional polymerization, whereas NA-1 and NA-3 with PAA- and RAFT-based coatings, respectively, yielded largely negative ζ values ($\zeta < -51$ mV). All NAs show similar hydrodynamic diameters in water, NaCl solutions of varying concentration (0.1, 0.3, and 0.5 mmol L⁻¹), HBSS, and RPMI, indicating no aggregation process (Figure S4A). A 15-day follow-up of the NAs in potential storage media (water, NaCl, and HBSS) revealed also large colloidal stability because no aggregation could be detected (Figure S4B). Far from being contradictory, the large absolute ζ value and the low D_{H} value for NA-3 indicate the formation of a very compact shell of PEG chains at the NA surface, leaving little access to water molecules, which can exert quite an influence on the MRI contrast and relaxivity properties.

Photophysical Properties and Impact of the Polymer Coating on the Emission Properties. The absorption spectra of NAs appear to be very similar, and the contributions of the three structural components could be noticed (Figure 3):

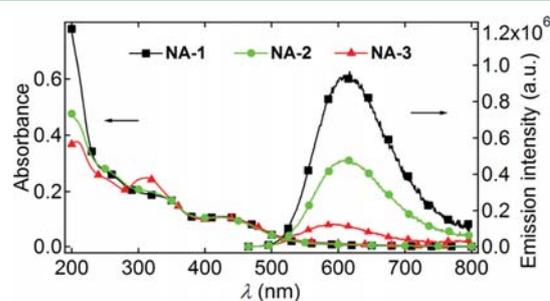


Figure 3. UV–visible absorption (left axis) and emission (right axis; $\lambda_{\text{exc}} = 450$ nm) of aqueous solutions of magnetofluorescent NA-1, NA-2, and NA-3.

(i) the low-energy band at 420 nm is ascribed to a charge-transfer transition within the FONs' fluorophores; (ii) the monotonous increase in the absorbance at higher energy relies on the $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticle extinction spectrum; (iii) finally, the large tail around 200–250 nm is related to the UV absorption of the C=O chromophores contained in the PAA or PMMA carboxylate units (Figure S5). For a P(MAA-*stat*-MAPEG) coating, one could distinguish an additional maximum at 311 nm that is characteristic of the RAFT trithiocarbonate ends, remaining uncleaved after treatment with ammonia.⁴³ Excitation in the absorption band of the

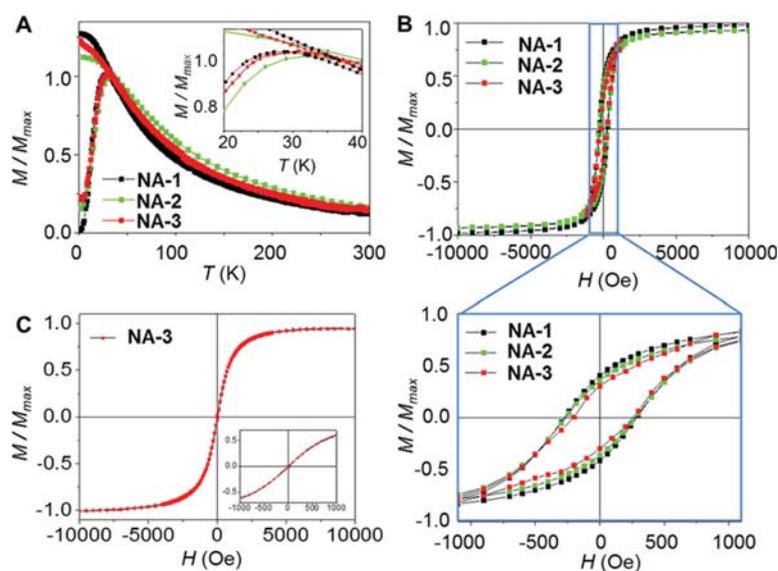


Figure 4. (A) ZFC–FC curves for magnetofluorescent NA-1, NA-2, and NA-3. The curves are normalized to the maximum of the ZFC magnetizations. (B) Plot of magnetization M/M_{\max} versus applied magnetic field at 2.5 K and enlargement at low magnetic fields. (C) Plot of magnetization M/M_{\max} versus applied magnetic field at 310 K for NA-3.

Table 3. Maximum Longitudinal r_1 and Transverse r_2 Relaxivities [$@$ Corresponding Frequency] and the r_2/r_1 Ratio Measured at 25 °C for NA-1, NA-2, NA-3, and Commercial Contrast Agent Endorem for Comparison and the Magnetic Properties of NA-1, NA-2, and NA-3 Measured at 2.5 K

	$r_{1,\max}$ ($\text{s}^{-1} \text{mmol}^{-1}\text{L}$) [$@\nu$ (MHz)]	$r_{2,\max}$ ($\text{s}^{-1} \text{mmol}^{-1}\text{L}$) [$@\nu$ (MHz)]	r_2/r_1 @8.5/21.3/60 MHz	T_{\max} (K)	H_c (kA m^{-1})	M_R/M_S
NA-1	32 [6]	122 [12]	4/5/12	28	22	0.40
NA-2	34 [7]	115 [4]	3/4/9	35	22	0.35
NA-3	19 [5]	125 [4]	7/9/21	33	18	0.32
Endorem	28 [7]	105 [4]	4/5/11	-	-	-

fluorophores at 450 nm provides an emission signal whose maximum varies between 595 and 614 nm (Figure 3 and Table 2). This emission band is typical of the FON core, which is centered at 605 nm in water in the absence of SPIONs.⁴⁴ A large Stokes shift, defined as the difference in energy between the absorption and emission maxima of the NA spectra, is found around 7000 cm^{-1} . This large energy difference is worth noting because it greatly facilitates label detection in live cells where endogenous fluorophores usually display autofluorescence, weakly shifted from excitation.

Because the FON fluorophores display strong positive solvatochromism,^{45,46} the hypsochromic shift observed for NA-3 compared to NA-1 and NA-2 again reflects significant differences in the interactions with water molecules, which may stem from the lipophilic chains of the RAFT ends organized in a close and tight fashion at the surface of the magnetofluorescent structures. Such an assumption is reinforced by the notable decrease in the fluorescence emission quantum yield observed with NA-3 compared to the other two NAs. Recent studies have actually reported on the efficient dynamic and static emission quenching of fluorophores in the presence of RAFT polymers containing dithiocarbonate transfer agents,⁴⁷ which implies a close vicinity between RAFT polymers and fluorophores. Such dynamic quenching was also confirmed by fluorescence time-resolved measurements recorded at 600 nm after a 450 nm excitation (Table S1 and Figure S6). A four exponential fit was required to model the fluorescence decay. While the three major lifetime components τ_2 , τ_3 , and τ_4 are

found to be almost identical for all NAs at 0.52–0.57, 0.14–0.16, and 0.02–0.03 ns, respectively, the longer component τ_1 largely differs between NA-3 at 1.07 ns and NA-1 and NA-2 at around 2 ns. From the intensity-averaged fractions, the latter time component contributes to the total emission decay by only 1.5–5%. We thus presume that τ_1 characterizes the fluorophores that are placed at the periphery of the nanoplateform and sense in a more privileged way the polyelectrolyte coating. The quenching phenomenon observed for NA-3 thus indirectly proves the strong attachment of RAFT-derived P(MAA-*stat*-MAPEG) at the surface of the magnetofluorescent NAs because dynamic quenching is very negligible at concentrations as low as $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ for both the polyelectrolyte and fluorescent units.

All of the above-reported structural and photophysical characterizations conduct us to propose a tentative scheme to describe the organization and extension of the polyelectrolyte chains around the FON surface, which would lead for polyelectrolyte 3 to stronger interchain interactions with $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles due to the less extended chains, especially in water (Figure S7).

Zero-Field-Cooled (ZFC)–Field-Cooled (FC) Magnetic Measurements and Low-Temperature Hysteresis. In order to probe the possible influence of the polyelectrolyte coating onto the magnetic properties of the NAs, we performed static magnetic measurements. ZFC and FC curves, giving information on magnetic interactions between SPIONs at the FON surface, were traced by recording the temperature

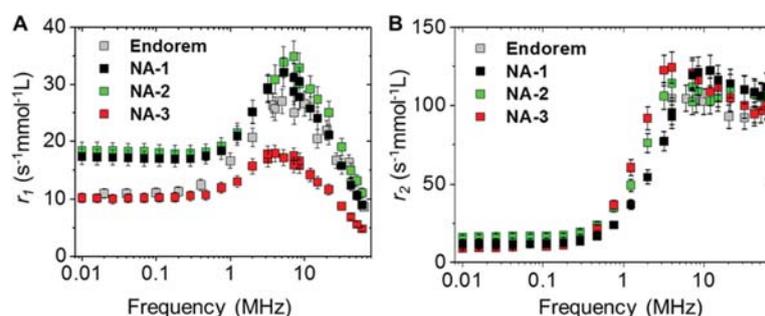


Figure 5. (A) Longitudinal r_1 and (B) transverse r_2 relaxivities of NA-1, NA-2, NA-3, and commercial contrast agent Endorem as a function of the proton Larmor frequency.

dependence of the magnetization under a 50 Oe magnetic field (Figure 4A).

For all samples, the thermal irreversibility characteristic of an assembly of single domain magnetic particles is observed below ca. 40 K, pointing out that the investigated systems are in the superparamagnetic state at room temperature. Except for a slight shift of the maximal temperature T_{\max} at 35 and 33 K for NA-2 and NA-3, respectively, against 28 K for NA-1 assigning larger dipole–dipole interactions and more closely arranged SPIONs upon coating with PEGylated polyelectrolytes (Table 3), all curves display the same shape, in agreement with the same general NA architecture and identical-sized SPIONs (Figure 4A). We thus recorded the magnetization evolution as a function of the magnetic field at 2.5 K where ZFC–FC measurements indicate that SPIONs are blocked in their ferromagnetic state (Figure 4B). Again, the magnetization curves superimposed fairly well with the values of the reduced remanence M_R/M_S (namely, the ratio of the remanence to saturation magnetization) in the 0.32–0.40 range, which as commonly observed for maghemite nanoparticles.¹⁵ Similarly, the coercive field H_c for all samples also changed only slightly from 18 to 22 kA m⁻¹ (from 226 to 276 Oe) when the nature of the polyelectrolyte coating was varied. Conversely, at room temperature, namely, 310 K, no irreversibility was observed, indicating that all NAs are in the superparamagnetic state (Figures 4C and S8).

From these measurements, we can thus conclude that the static magnetic properties of all NAs are exclusively ruled by the shell of SPIONs attached on the FON core and are almost independent of the nature of the polyelectrolyte coating.

NMRD Measurements and MRI Contrast as a Function of the Polyelectrolyte Coating. Because MRI contrast brought by SPIONs is dictated by their relaxivity properties, we recorded their NMRD profiles, which give access to the longitudinal r_1 and transverse r_2 relaxivities. Because relaxation of water protons close to the NA surface is also probed, any microscopic difference due to the polyelectrolyte coating can be inferred (Figure 5). With the difference between the data recorded at room and physiological temperatures being within 10%, we reported the NMR results obtained at room temperature to better discuss the physical mechanisms involved in the nuclear relaxation. For comparison purposes with a clinically used contrast agent, we retained Endorem made of a multicore structure ($D_H \sim 120$ nm) of 5-nm-large SPIONs self-assembled with dextran polymer.

Because SPIONs induce strong distortions of the local magnetic field, proton relaxation is largely dominated by a spin–spin relaxation mechanism, giving rise to r_2 relaxivities far

larger than the r_1 ones for frequencies higher than several megahertz. Hence, most of the studies have focused on measuring r_2 values just at the (very few) clinical fields^{12,13,48,49} but do not report on r_1 versus frequency behavior. Yet, the later investigations provide precious information on the dominant mechanisms of nuclear relaxation in different frequency ranges and on the water diffusion time. Therefore, they give insight into the NA structure, its spin dynamics, and the hydrated environment. The r_1 versus frequency (ν) profiles for all three NAs display a typical superparamagnetic behavior: a decrease in the relaxivity at high frequency, a midfield peak at ν_{\max} , and a low-field plateau (Figure 5A).⁵⁰ Interestingly, the typical “dispersion” feature for SPIONs with diameters of less than 10 nm, occurring between the frequency corresponding to the maximum r_1 and the low-frequency region, does not appear clearly in the $r_1(\nu)$ curves. Because the dispersion, generally reduced for small particles, is correlated to the magnetic anisotropy of the SPIONs, we can surmise in the case of NAs an increase in the anisotropy.⁵¹ At high frequencies, Curie relaxation prevails because of the presence of a high local magnetic field induced by the magnetization of SPIONs, subjected to a relatively high external static magnetic field, with this local field being dynamically mediated by the diffusion correlation time. The curves for all NAs converge toward similar values, as expected for the studied samples, displaying identical static magnetic behaviors. The most striking features are the significantly lower r_1 values found for NA-3 at ν_{\max} and in the low-frequency region (Table 3).

Because all NAs share the same core–shell configuration and static magnetic properties, the difference encountered in the r_1 relaxivity of NA-3 cannot be related to the latter effects. We suggest a possible explanation that could rely on the dynamics of water molecules, namely, their diffusion and retention time, as well as their access closer or farther from to the magnetic shell.^{42,52} The smaller hydration sphere found for NA-3 by DLS (see Table 2) suggests the existence of a restricted solvation sphere due to strongly attached PEG side chains and hydrophobic dodecyl RAFT end chains. At a first glance, the restricted solvation sphere could erroneously evoke a closer diffusion of water to the NA surface. Actually, the presence of a hydrophobic part in the NA-3 polyelectrolyte prevents water from diffusing into the coating, while the hydrophilicity of the other NAs allows water molecules to move closer to the SPION core inside the NA coating itself. Therefore, the difference in the r_1 relaxivity could be explained by the presence of dodecyl RAFT end chains in NA-3.

In contrast to r_1 dispersions, similar r_2 profiles were found for all NAs with maximum r_2 values of around 120 s⁻¹ mmol⁻¹ L,

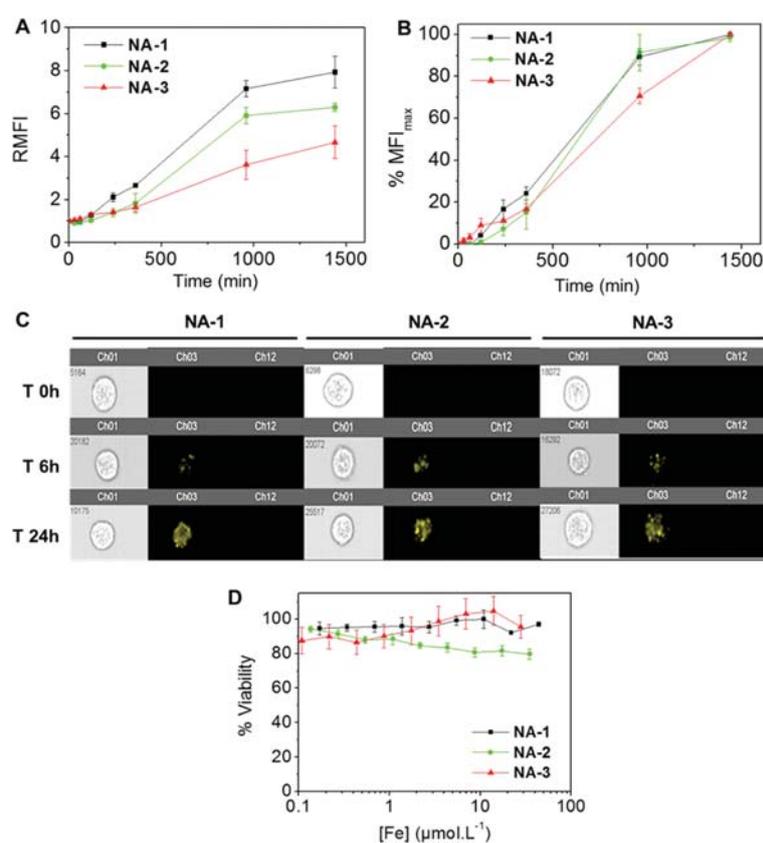


Figure 6. Meso 11 cells incubated with NA-1, NA-2, and NA-3 in RPMI supplemented with 10% FBS: (A) absolute and (B) normalized MFI evolution over time of incubation. (C) Imaging flow cytometry at 0, 6, and 24 h. (D) Cell viability assay after a 72 h incubation period for $[\text{Fe}] = 0.1\text{--}100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

in agreement with identical magnetic cores (Figure 5B). In fact, local dephasing of the nuclear magnetization is mostly caused by the high electronic magnetization of the SPIONs clustered around the FON core. This represents the prevailing mechanism inducing nuclear transverse relaxation, which is partially described by an approximate heuristic model in the framework of the so-called motional average regime.^{10,53} Unfortunately, the actual models (like the universal scaling law proposed by Sandre et al.)⁵⁴ are not able to describe the whole transverse NMRD curve (r_2 vs ν) or explain the relaxation mechanisms as a function of the applied magnetic field. Nevertheless, because the transverse relaxivity r_2 represents the fundamental parameter to assess the MRI efficiency for a superparamagnetic material, the reported experimental data demonstrate that our nanoparticles act as promising negative contrast agents. Moreover, the low r_1 and high r_2 values for NA-3 yield a large r_2/r_1 ratio that represents a parameter as important as the r_2 relaxivity to assess the efficiency of negative contrast agents. In the case of NA-3, such a ratio is about 21 at 60 MHz clinical frequency, which is 2–3-fold higher than those for NA-1, NA-2, and Endorem. These NMRD studies demonstrate the large importance of considering both the transverse and longitudinal relaxivities to probe the interface of complex magnetic nanostructures and evaluate the microscopic mechanisms underlying the nuclear relaxation that is quite largely influenced by the spin topology and water diffusion path. Deciphering the fundamental physical mechanisms ruling the nuclear relaxation should thus open novel perspectives regarding the synthesis of novel coatings with high

efficiency (namely, higher transverse and/or longitudinal relaxivities) for improved MRI contrast.

Kinetics of Cellular Internalization and Cell Toxicity Assays in Mesothelioma Cancer Cells. Adherent mesothelioma cells (Meso 11), a cell line established from the pleural fluid of patients affected by MPM, were incubated with NA-1, NA-2, and NA-3 in a RPMI medium supplemented with 10% serum. The amount of administered NAs was referred to their iron content, titrated by elemental analyses by means of inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) following acidic mineralization. The kinetics of NAs' uptake was carried out by following the fluorescence and magnetic responses of single cells. The fluorescent signal and cell viability were assessed by means of imaging flow cytometry after usual protocols to detach the cells and treatment for 30 min with Zombie NIR, serving as a fluorescent marker that lights up in the presence of dead cells. In this way, a single excitation at 488 nm allowed for dual excitation of the NAs and fluorescent marker and simultaneous detection of their respective emission signals in two distinct nonoverlapping channels (channel 3, 560–595 nm for NAs; channel 12, 745–800 nm for Zombie NIR permeant to dead cells). Figure 6A displays the kinetics of uptake over a 24 h incubation period for NA-1, NA-2, and NA-3 at an iron concentration of 2–3 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The mean fluorescence intensity (MFI) steadily increased for all three NAs and started saturating after around 16 h for NA-1 and NA-2.

At very early times up to 4 h, only a few NAs were internalized. This result was confirmed by imaging flow

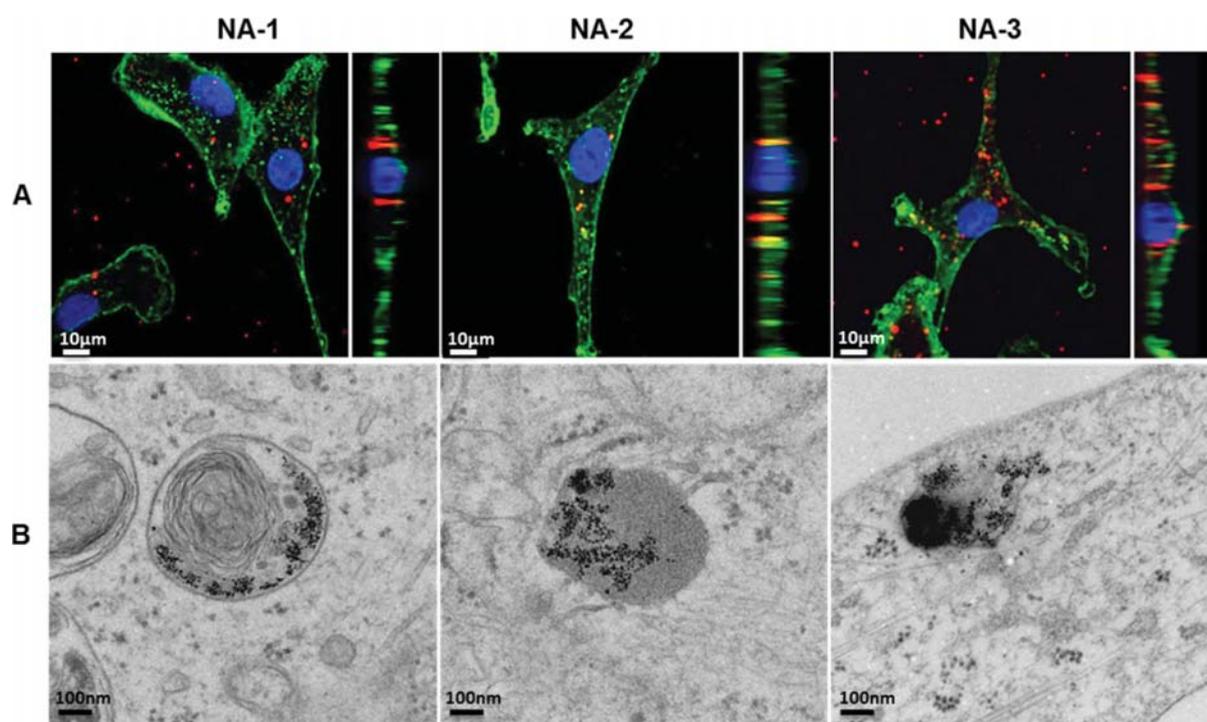


Figure 7. Meso 11 cells incubated with magnetofluorescent NA-1, NA-2, and NA-3 for 24 h. (A) Confocal fluorescence microscopy showing the NAs in red, the WGA–AlexaFluor 647-stained cellular membrane in green, and the Hoechst-stained nuclei in blue. Pictures include an XY orthogonal projection. (B) TEM imaging of fixed cells.

cytometry showing dimmed fluorescence signals at 6 h and very bright ones at 24 h inside the cells (Figure 6C). The slow rate of uptake is actually related to the negative charge of the investigated NAs that have to overcome the electrostatic repulsions exerted by the phospholipids of the cytoplasmic membrane.⁵⁵ Interestingly, at longer times, NA-3 tends to internalize at a significantly slower rate compared to NA-1 and NA-2, as exemplified by the normalized MFI signal (Figure 6B). This result is quite surprising because both PMAA-*g*-PEG and P(MAA-*stat*-MAPEG) contain the same functional groups and PEG chain length. At first, one could look at differential interactions with the serum proteins that adsorb on the nanoparticle surface and govern the dynamic of uptake.

We thus investigated by electrophoresis the nature of the protein corona that could form around all three kinds of NAs. The latter were incubated for 1 h at an iron concentration of $[\text{Fe}] = 2.1\text{--}2.9 \text{ mmol L}^{-1}$ in a cell culture medium (a RPMI medium supplemented with 10% FBS). The nanoparticle–protein complexes were extracted by centrifugation, and the supernatant was loaded into the wells of a polyacrylamide electrophoresis gel. After migration for 90 min and revelation under UV irradiation, three bands for all NAs were visible (Figure S9). One of them was found in the range of 50–60 kDa molecular weight and could be identified as being bovine serum albumin (BSA), as confirmed by comparative elution of a BSA reference sample. The other two bands were found in the range of 10–30 kDa and attributed to apolipoproteins (apoAI and apoAII), in agreement with common reports in the literature regarding the interactions of iron oxide nanoparticles with human serum proteins.^{56,57} It is worth noting that very few nonspecific interactions occur between the NAs and cell culture medium despite the relatively high NA concentration used in the study to distinguish protein complex traces. This

observation features weak protein adsorption, which is highly sought for further in vivo investigations. As all three NAs display the same patterns under the investigated experimental conditions, we can reasonably ascribe the distinct uptake rates of NA-3 to their intrinsic comblike polyelectrolyte coating. As deduced from the above photophysical and magnetic studies, the hydrophobic RAFT polymers tend to organize in quite a compact fashion at the NA surface. The generated nanoarchitectures thus display a distinctly structured surface, which makes the uptake rate continuous with no negative impact on the cell viability.

This observation is of utmost importance as the actual tendency is to advertise fast uptake for fast therapeutics delivery with little consideration of cytotoxicity. Indeed, positively charged nanoobjects display faster internalization in usually less than 1 h, which causes large cell mortality due to extensive permeation of the cell membrane, unable to readapt in front of the sudden flow of nanoparticles.⁵⁸ In our case, cell viability assay based on the use of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide compound (MTT reagent) after 72 h of incubation with the different NAs revealed no cytotoxicity for NA-3 and NA-1 over the broad range of iron concentrations from 0.1 to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figure 6D). A slightly higher level of cytotoxicity for NA-2 was found, although such a value, below 20%, is often regarded as insignificant. The images collected using imaging flow cytometry show no change in the cell phenotype over 24 h, which reinforces the noncytotoxic properties of all NAs (Figure 6C). To ascertain the cellular entry of both the magnetic and fluorescent components of the NAs, complementary magnetophoresis measurements were performed on cells incubated with Meso 11 after 4, 8, and 24 h ($[\text{Fe}] = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$). Such experiments consist of measuring the velocity of cells subjected

to a magnetic field gradient, which is directly correlated with the cellular load of iron oxide. Because of the low amount of magnetic materials used with regard to the literature and the associated uncertainty, comparative results between the distinctly coated NAs would be irrelevant. As illustrated in Figure S10, all NAs nicely followed the same trend of continuous iron oxide uptake over 24 h. These results indicate tight association of both the magnetic shell onto the fluorescent core, making such nanoobjects particularly attractive for bimodal imaging. They thus emphasize the clear advantage of NAs comprising FONs as fluorescent cores and a shell of magnetic nanoparticles. In this way, very bright fluorescent and magnetic nanostructures are obtained, enabling high detection sensitivity and easy follow-up.

Multimodal Imaging Properties in Live Cells. To prove the potentiality of the magnetofluorescent NAs as multimodal imaging agents, we performed confocal fluorescence microscopy, MRI, and TEM investigations of cells after NA incubation for 24 h. The culture medium was washed with phosphate-buffered saline (PBS) to remove NAs in excess. The cells were treated successively with an Alexa Fluor 647 conjugate of wheat germ agglutinin (WGA; green) and Hoechst (blue) to stain the cell membranes and nuclei, respectively (Figure 7A). Confocal fluorescence imaging revealed very bright dots, depicted in red, which can be assigned to internalized NAs. An XY projection clearly revealed the internalization of NA and their unambiguous location inside the cytoplasm. Again, no impact of the NAs could be noticed on the adherent Meso 11 cells that keep their elongated shape, which confirms the cell viability assays and absence of cytotoxicity. To gain an even better definition of the NA location, we took advantage of the iron oxide electronic contrast and performed TEM experiments. Most of protocols involve cell detachment and centrifugation to generate a cell pellet, which can damage the cell architecture. To avoid partial cell destructuration, cells were directly fixed in an Epon resin and properly stained. TEM observation of the cell monolayers showed well-contrasted dark dots, included in larger structures that remind one of endosomes, especially for NA-1 (Figure 7B).

Careful observations at such a magnification allow us notice small packets of dark dots instead of a random dispersion. This feature is to correlate with previous *in vivo* and *in vitro* observations where the magnetofluorescent structure was kept, with no dissembling of the fluorescent core from the magnetic shell.²² Therefore, incrementing a stabilizing PMAA- or PAA-based polyelectrolyte coating with PEG chains does not impair the emission properties and the ability of generating tight hybrid NAs. The novel PEGylated NAs thus represent very attractive agents for correlative light electron microscopy, which is currently getting much attention because a high spatial resolution of biological structures can henceforth be achieved.²

The NA multimodality property is extended to MRI investigations to anticipate *in vivo* experiments in the future. A novel series of cells incubated with the magnetofluorescent NAs at an iron concentration of 2–3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for 24 h was prepared. It is worth noting that such a concentration is actually 10–10² times lower than the commonly recommended iron doses for conventional MRI on humans (0.5–10 mg kg⁻¹).^{59,60} After the usual recuperation procedure, the cells were deposited in small wells dug into a matrix of well-degassed 1% low-melting agarose gel, filling a glass cylinder (Figure 8A).⁶¹ The wells were sealed by pouring on top a still liquid and a cooled agarose solution. Careful air degassing is requested to avoid

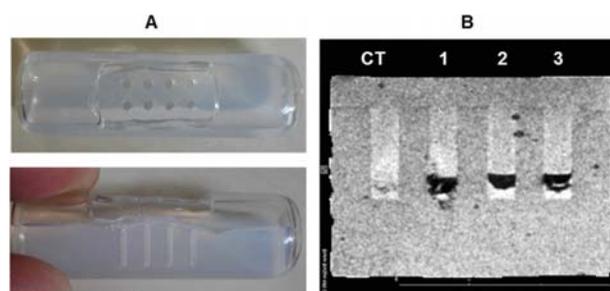


Figure 8. (A) Homemade glass cylinder filled with 1% low-melting agarose gel displaying eight small wells dug with a plastic comb (top and lateral views). (B) T_2^* map of MRI images of Meso 11 control cells (CT) and cells incubated with magnetofluorescent NA-1, NA-2, and NA-3 for 24 h.

dramatic quenching effects of MRI contrast due to entrapped paramagnetic dioxygen. A T_2 sequence was used in relation with the negative contrast properties of iron oxide nanoparticles. Unlike control cells devoid of NAs and providing no significant signal, the cells incubated with all NAs showed a clear MRI dark contrast (Figure 8B). Taking the control cells as a reference, we found an average darkening MRI contrast enhancement of -80% . This value is notably high given the low amount of SPIONs, which validates the strategy of assembling individual superparamagnetic nanoparticles around a larger fluorescent core to generate enhanced responses. The resulting supramolecular architecture, stabilized by additional polyelectrolytes, thus retains the properties of the isolated units while offering novel ones thanks to the high density of the associated functional units.

Extension to Labeling 3D Cancer Spheroids. Although biological investigations using cell monolayers represent the first compulsory step before envisaging any *in vivo* extensions, they still suffer from severe limitations, especially in the case of cancer treatment. First, the culture of cell monolayers is an artificial model that does not properly reproduce the growth and adhesion conditions of tumor cells *in vivo*. Second, solid tumors are made of compact cell clusters, preventing deep diffusion of the examined drugs. Hence, a novel culture mode of cells in three dimensions (3D), called a multicellular tumor cell spheroid (MTCS), is nowadays boosting considerable attention to better apprehend the *in vivo* pathophysiological growing conditions⁶² and generate 3D complex artificial tissues.⁶³ The MTCS results from the assembling of 2×10^4 cells, creating a spherical structure of densely packed cells with no adhesion on the surrounding culture material. Phenotype modifications are inevitably induced and may considerably impact the cellular uptake mechanism. We thus elaborated MTCSs out of the Meso 11 mesothelioma cell lines and incubated them with a larger amount of magnetofluorescent NAs (40–60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ iron concentration) to take into account the high cell density within the 3D cell arrangements. After the usual washing steps and nucleus staining with Hoechst, confocal fluorescence imaging was performed. Reconstituted images from Z-stack acquisitions allowed us to visualize the compact spherical cell organization of MTCSs and assess their diameters to be around 400 μm . Bright red-emissive spots could only be seen in the treated spheroids and could logically be assigned to the magnetofluorescent NAs (Figure 9A). Because of the high cell density and large thickness of MTCSs, no light transmission could pass through (Figure S11); hence,

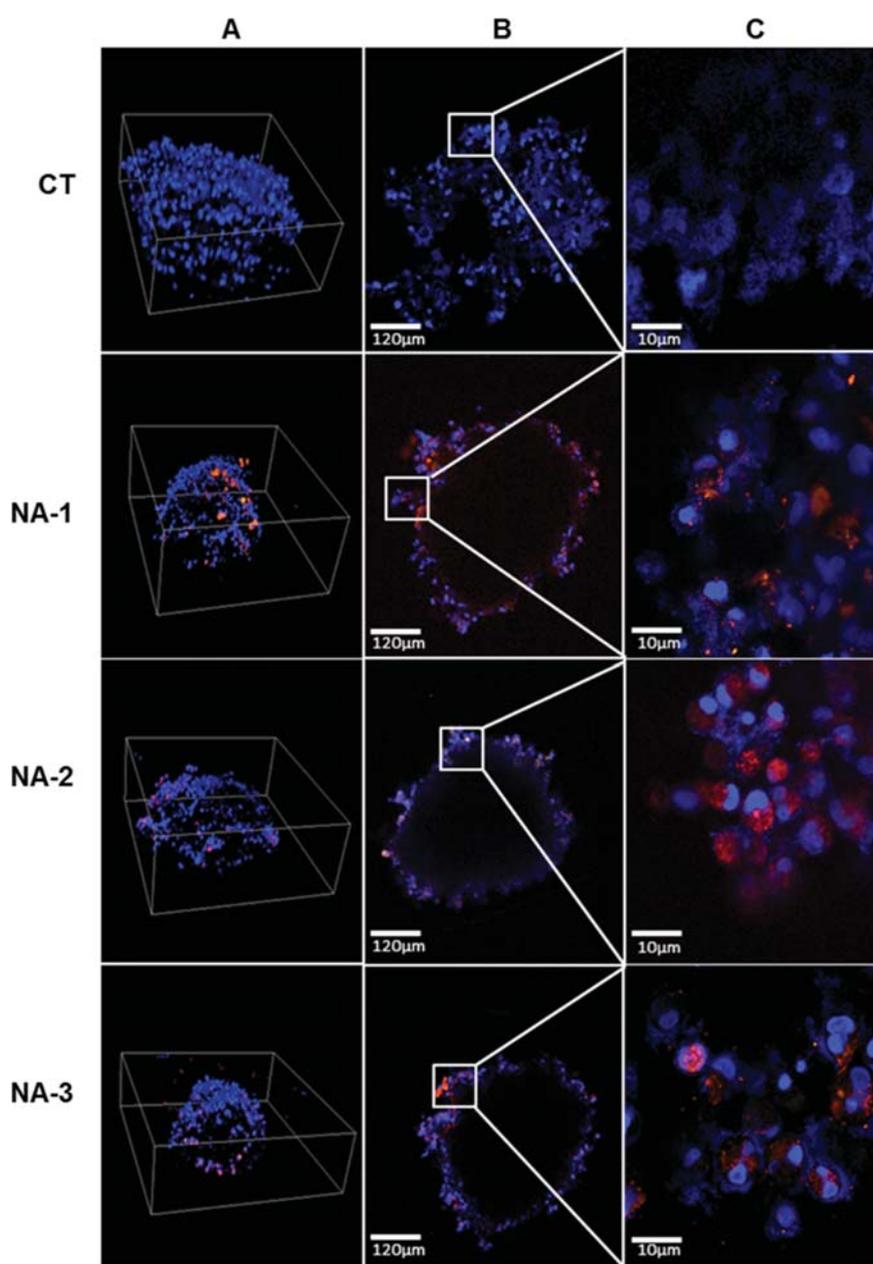


Figure 9. Confocal fluorescence imaging of Meso 11 MTCs ($\sim 2 \times 10^4$ cells) incubated with magnetofluorescent NA-1, NA-2, and NA-3 for 24 h and suspended in a PBS solution: (A) 3D reconstructions of Z-multistack acquisitions; (B) sections of the spheroid equatorial planes; (C) magnification of the peripheral shell of Meso 11 cells: blue, emissive Hoechst-stained nuclei ($\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 425\text{--}475$ nm); red, emissive magnetofluorescent NAs ($\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 570\text{--}620$ nm).

no emission could be collected from the spheroid center. Therefore, the images of spheroid equatorial planes may be confusing because the cells in the middle of the structure form a quenched black hole surrounded by a shell of labeled cells (Figure 9B).

Magnification of the shell areas provides strong intracellular staining by all three kinds of magnetofluorescent NAs (Figure 9C). These quite remarkable images point out the fact that our multimodal NAs are again well-internalized in self-assembled cells and represent bright emissive nanotrackers without blurring the emission of other stained areas thanks to their spotlike signals. Complementary MRI experiments following

the same protocol as that described above and using a T_2^* sequence revealed again notable MRI negative contrast (Figure S12). Compared to the experiments performed on free Meso 11 cells, the reduced response originates from the nanotracker's uptake, limited to the periphery cells, as nicely illustrated by confocal fluorescence imaging.

Before concluding these studies, a natural question arising from these investigations relies on the biodegradability of FON@mag NAs to serve as future in vivo trackers. It is worth recalling that their structure is based on the noncovalent association between three components (a fluorescent core made of small self-assembled molecules, iron oxide nano-

particles, and finally biodegradable polyelectrolytes) through electrostatic, hydrogen-bonding, or π - π interactions. The absence of a covalent linkage should thus easily lead to the natural dissembling over time of all three components, as already evidenced in a recent study; hence, the biodegradability is ruled by each constitutive unit. It turns out that iron oxide nanoparticles have recently been proven, through systematic TEM investigations, to undergo progressive destruction and assimilation by the "iron chain" involving ferritin (in charge of loading iron) and ferroportin (in charge of exporting iron) living media.^{6,7,64} As for FONs, the supramolecular association of their hydrophobic fluorophores, mainly driven by van der Waals interactions and hydrogen bonding, progressively leads to dissolution of the core into individual molecules upon interaction with the lipid membrane of the endosomal/lysosomal compartments where FONs or FON@mag accumulate.^{18,45,46} Such dissolution could be demonstrated through the dramatic fluorescence shift from red to greenish as a result of differentiated surroundings of the solvatochromic fluorophores, which could only be explained by changes in the solvation and polarity as a result of FON dissociation. All of these elements open attractive potentialities for further in vivo use because the biodegradability and not just the biocompatibility has nowadays become a mandatory criteria to meet.

CONCLUSIONS

In this study, we have demonstrated the modular fabrication of high-density core-shell magnetofluorescent NAs whose stabilizing external coating only takes place in a final step. In this way, the incidence of the charge density, the chemical nature of the chelating anionic units, the structure, the hydrophobicity, and the length of the polyelectrolytes could be independently studied without impacting the general core-shell architecture of the self-assembled magnetofluorescent probes. Long polyanionic chains ($n \approx 50$ repetitive units) or block copolymers could not successfully stabilize the ~ 100 -nm-large NAs because of interassembly bridging. By contrast, comblike polyelectrolytes, comprising short anionic main chains ($n \approx 25$ repetitive units) based on poly(methyl methacrylate), brought remarkable colloidal stability. Interestingly, replacing the acrylate units with phosphonate ones destroyed the shell of the iron oxide nanoparticles around the FON core, leading to naked FONs. These results emphasize the clear advantage of using polyelectrolytes instead of small anionic ligands thanks to their intrinsic multifold attachment, provided that they do not exert detrimental competitive interactions with the outer shell. Compared to conventional radical polymerization, RAFT-controlled radical polymerization yielded polyelectrolytes with a narrow chain-length dispersion. The incorporation of alkyl RAFT agents induced local hydrophobic effects at the NA surface, generating a more compact solvated structure. In this way, restricted water diffusion to the NA surface is caused by the alkyl chains of the RAFT-controlled polyelectrolytes, which predominantly affects the longitudinal relaxivity r_1 of the resulting magnetofluorescent NAs and provides enhanced MRI contrast through r_2/r_1 values as high as 21 at 60 MHz clinical frequency. The lipophilicity and tight organization of the alkyl chains at the NA surface are also suspected of influencing the NA internalization rate in mesothelioma cancer cells, which showed more progressive uptake without notable cytotoxicity. Labeling of MTCSs, resulting from the compaction of thousands of mesothelioma cancer cells could also be performed with all

NAs whose dual-mode MRI and fluorescence imaging capabilities were proven to be effective. Further investigations on these magnetofluorescent NAs displaying easily tunable surface modification are underway to gain insight into the uptake mechanism, in vivo distribution, and biodegradation as a function of the polyelectrolyte coating that requires accurate control, like those issued from RAFT polymerization, before any clinical transfer can be envisaged.

EXPERIMENTAL SECTION

Polymer Synthesis and Characterization. *Materials.* Azobisisobutyronitrile (AIBN; Sigma-Aldrich, 98%) was recrystallized twice from methanol prior to use. [(2-Methylacryloyl)oxy]-methylphosphonic acid (MAPA) was purchased from Specific Polymers ("MPAC1 Acid") and used as received. Poly(acrylic acid) (PAA; average $M_n = 1800$ g mol⁻¹), poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (average $M_n = 1100$ and 2000 g mol⁻¹ at 50 wt % in H₂O for MAPEG₁₁₀₀ and MAPEG₂₀₀₀, respectively), methacrylic acid (99%), and 2-cyano-2-propyl dodecyl trithiocarbonate (CPDTC; 97%) were purchased from Sigma-Aldrich and used as received. Poly(methacrylic acid) (PMMA) homopolymer TP942 ($M_w = 6218$ g mol⁻¹; $M_n = 2609$ g mol⁻¹) was purchased from Coatex Co. Poly(ethylene glycol) methyl ether (PEG₂₀₀₀; $M_w = 2000$ g mol⁻¹) was purchased from Clarian Co., Ltd. Methanol (Fischer, 99.5%) was used as received. *N,N*-Dimethylformamide (DMF; Alfa Aesar, 99.8%) was distilled under reduced pressure over CaH₂ prior to use.

Synthesis of PMAA-g-PEG₂₀₀₀ (2). A total of 50 g of PMMA was placed in a four-necked flask and mixed with 0.34 g of a 50 wt % NaOH solution (corresponding to 2.5 mol % PMMA carboxylic functions). To the medium were added 95.76 g (corresponding to 29 mol % PMMA carboxylic functions) of PEG₂₀₀₀, and the reaction mixture was heated to 80 °C and gradually placed under vacuum (~ 50 mbar). After distillation of water, the temperature of the reaction mixture was gradually increased to 175 °C. The reaction time was measured from the moment that the reaction medium reached 170 °C. The reaction was continued for a further 4 h. After completion of the reaction, the reaction vessel was returned to atmospheric pressure and the heat turned off. Once the temperature of the reaction mixture reached 90 °C, the melted polymer was diluted to 50 wt % in water. The polymer was purified by dialysis against distilled water using a dialysis membrane with a 3500–5000 molecular weight cutoff (Spectra/Por2, Spectrum Medical Industries, Inc., Laguna Hills, CA) at 20 °C. The polymer was obtained after lyophilization. The yield of the esterification reaction was controlled by measuring the acidic index before and after the reaction. The grafting efficiency was evaluated to be 23% by determining the unreacted carboxylic acid content of the coupling polymer with an acid-base titration technique.

Synthesis of Poly(MAA-stat-MAPEG₂₀₀₀) (3). The targeted molar fraction in MAA was 80%. A total of 14 mg of AIBN (8.5×10^{-2} mmol), 55.5 mg of CPDTC (1.61×10^{-2} mmol), 344 mg of MAA (4.00 mmol), 2.0 mL of methanol, and 4.00 g of the solution of MAPEG₂₀₀₀ at 50 wt % in water (1.00 mmol) were added in this order into a dried Schlenk flask. The solution was thoroughly deoxygenated by four freeze-pump-thaw cycles. The flask was filled with nitrogen gas and placed in an oil bath maintained at 70 °C for 24 h under magnetic stirring. The solvents were then evaporated under reduced pressure. Analysis by ¹H NMR confirmed the almost total conversion of the methacrylate functional groups (>99%). The molecular weight of the sample was determined by size-exclusion chromatography (SEC) in DMF.

Synthesis of Poly(MAPA-stat-MAPEG₁₁₀₀) (4). Two samples were synthesized, with targeted molar fractions of MAPA of either 20% or 60%. For synthesis of the former, 3.9 mg of AIBN (0.25 equiv), 32.6 mg of CPDTC (9.44×10^{-2} mmol, 1 equiv), 85.0 mg of MAPA (5 equiv), 2.0768 g of MAPEG₁₁₀₀ (20 equiv), and 5.0 mL of DMF were added in this order into a dried Schlenk flask. The solution was thoroughly deoxygenated by four freeze-pump-thaw cycles. The flask was filled with nitrogen gas and placed in an oil bath maintained at 70 °C for 24 h under magnetic stirring. The solvent was then evaporated

under reduced pressure. The experimental procedure was the same for synthesis of the second sample, with the following proportions for the reactants: 7.8 mg of AIBN (0.25 equiv), 65.3 mg of CPDTC (1.89×10^{-1} mmol, 1 equiv), 510.0 mg of MAPA (15 equiv), 2.0768 g of MAPEG₁₁₀₀ (10 equiv), and 5.0 mL of DMF. Analysis by ¹H NMR confirmed the almost total conversion of the methacrylate functional groups (>99%). The molecular weights of the samples were determined by SEC in DMF.

SEC Polymer Characterization. The molecular weights were determined by SEC in DMF containing LiBr at a concentration of 10 mmol L⁻¹. Solutions of samples with concentrations of around 5 mg mL⁻¹ were prepared and filtered (PTFE membrane; 0.20 μm) before injection. The flow rate was 0.9 mL min⁻¹ (50 °C). The following Agilent 1260 Infinity series setup was used: a G1310B isocratic pump; a G1322A degasser; a G1329B autosampler; a G1316A thermostated column compartment equipped with a set of Polymer Laboratories PLgel columns (nominal particle size: 5 μm) composed of a guard column (50 × 7.5 mm) and two MIXED-D columns (300 × 7.5 mm); a G1314B variable wavelength detector; a G7800A multidetector suite equipped with a MDS refractive index detector. Calibration was performed using a set of EasiVial polystyrene PS-M standards. Agilent GPC/SEC software and a multidetector upgrade were used to determine the molar mass values and distributions.

Fabrication and Structural Characterization of Polyelectrolyte-Coated NAs. *NA Fabrication.* A solution of phosphonic acid fluorophores,¹⁷ dissolved in THF (50 μL, 0.1 wt %), was added under vigorous stirring to a solution of maghemite nanoparticles in nitric acid (2.5 mL, 0.006 wt %, pH 1.2). After a few seconds, the magnetofluorescent NAs were formed. The polyelectrolyte of interest was added as a powder [added amounts: 1, 5 mg; 2, 17 mg; 3, 18 mg], and then ammonium hydroxide (1 mol L⁻¹) was added dropwise under stirring until pH 9 was reached. The resulting translucent solution was allowed to stir for a further 30 min and dialyzed using a Spectra Por membrane [standard grade regenerated cellulose; cutoffs of 8–10 kDa for 1 and 300 kDa for 2 and 3 against Millipore water (600 mL)] for over 24 h to remove excess polymers and reach neutral pH. The resulting solution was spread into small vials (2 mL content) and lyophilized. The vials were finally stored at -18 °C until solution reconstitution with water, phosphate-buffered saline (PBS), or a cell culture medium.

DLS Characterization. The hydrodynamic diameter D_H and size dispersion of the nanoobjects were determined by DLS by means of a Cordouan (Vasco 3) nanoparticle size analyzer equipped with a 40 mW diode laser operating at 658 nm. Measurements were collected in a backscattering mode at an angle of 135°. Measurements were carried out at 25 °C on aqueous solutions of nanoparticles. For each sample, intensity measurements were carried out in a multiaquisition mode implying automatically adjusted correlograms and averaged measurements on six acquisitions. Nanoparticle mean sizes and distribution widths were obtained by fitting each correlogram with a Cumulants algorithm. Measurements of the surface potential ζ were carried out by means of a Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern). The samples were placed in quartz cells. Several measurements were realized for each sample according to a predefined operating procedure.

TEM Analyses. Nanoparticle morphology was investigated by TEM [MO-Jeol 123S0 (80 kV)]. All NA solutions were deposited onto holey carbon-coated copper grids (300 mesh).

Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Measurements. *Steady-State Fluorescence Measurements.* UV-visible absorption spectra were recorded using a Varian Cary SE spectrophotometer equipped with a DRA 2500 integrating sphere. A fluorolog 2 spectrofluorimeter was used (Jobin-Yvon/Horiba). Correction for the emission spectra with regard to the spectral response of the detector was automatically applied. Fluorescence quantum yields were determined in solution, referred to Coumarine 540 A in ethanol ($\Phi_f = 0.38$).⁶⁵

Time-Resolved Fluorescence Measurements. Fluorescence time decays were measured in water using the fully automated spectrofluorimeter (Fluotime 300, PicoQuant), following the time-correlated photon-counting method. Excitation was performed using a

pulsed-laser diode (LDH-D-C-450B) working at 450 ± 10 nm with a 70 ps full width at half-maximum. The excitation and emission polarizers were set in the vertical position and at a magic angle (54.7°) to obtain polarization-independent fluorescence signals. Fluorescence decays were recorded using a Hybrid-PMT detector combined with an acquisition temporal resolution of up to 25 ps. A 473 nm Notch filter (BPL01-473R-25) purchased from Semrock was used to discard any possible contribution of excitation light scattering).

Static and Dynamic Magnetic Measurements. *Magnetization Measurements.* Magnetic measurements were collected with a Quantum Design MPMS-SS SQUID magnetometer. All magnetic measurements were performed on dry powders. The samples were pressed into pellets in order to prevent nanocrystal orientation under the external magnetic field. The magnetization curves were measured at 2.5 and 310 K from +50 to -50 kOe. All data were corrected for diamagnetic contribution due to the sample holder, which was separately measured. The thermal dependence of magnetization was recorded from 10 to 300 K upon ZFC and FC conditions. ZFC magnetizations were measured by cooling samples in a zero magnetic field and then increasing the temperature in the presence of a 50 Oe magnetic field, whereas FC curves were recorded by cooling the samples in the same probe field at 50 Oe.

NMR Relaxometry Measurements. Measurement of the ¹H NMR longitudinal (T_1) and transverse (T_2) relaxation times was performed at room temperature on sample solutions diluted with water in the 0.01 MHz $\leq \nu \leq 60$ MHz frequency range. Generation and detection of the NMR signal involved a Smartracer Stellar relaxometer (using the fast-field-cycling technique) for $\nu \leq 10$ MHz and a Stellar Spinmaster spectrometer for $\nu > 10$ MHz. For the very low field range ($\nu < 3.2$ MHz for T_1 and $\nu < 4$ MHz for T_2), ad hoc prepolarized sequences were used to increase the ¹H NMR signal. In the second case, the standard radio-frequency excitation sequences of Carr–Purcell–Meiboom–Gill (T_2) and saturation (T_1) recovery were used. The efficiency of the samples as MRI contrast agents was determined from the measured T_1 and T_2 by calculating the nuclear longitudinal r_1 and transverse r_2 relaxivities as given by

$$r_i = \frac{(1/T_i)_{\text{meas}} - (1/T_i)_{\text{dia}}}{c_{\text{Fe}}}$$

where $(1/T_i)_{\text{meas}}$ is the measured relaxation rate, $(1/T_i)_{\text{dia}}$ the diamagnetic contribution of Millipore water (~ 4 s⁻¹), and c_{Fe} the iron concentration in mmol L⁻¹ for each sample.

Photophysical Characterization. UV-visible absorption spectra were recorded using a Varian Cary SE spectrophotometer equipped with a DRA 2500 integrating sphere. A Fluorolog 2 spectrofluorimeter was used (Jobin-Yvon/Horiba). Correction for the emission spectra with regard to the spectral response of the detector was automatically applied. Fluorescence quantum yields were determined in solution, referred to Coumarine 540 A in ethanol ($\Phi_f = 0.38$).⁶⁵

Cell Culture, Internalization, and Bioimaging. *Cell Culture.* The mesothelioma cell line Meso 11 was established from the pleural fluids of patients. All cells were maintained in an RPMI medium (Invitrogen) supplemented with 2 mmol L⁻¹ glutamine, 100 IU mL⁻¹ penicillin, 0.1 mg mL⁻¹ streptomycin, and 10% heat-inactivated fetal calf serum (Eurobio) and grown in a humidified atmosphere of 37 °C and 5% CO₂. For all experiments, the cell cultures at a confluence of about 80–90% were washed once with PBS and trypsinized [0.05% trypsin/0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); Invitrogen] for 5 min. The cells were resuspended in a culture medium, and eosin was used to determine the viability before seeding.

3D Spheroid Culture. Meso 11 cells were seeded into a Nunclon Sphera 96-well microplate (Thermoscientific) at a density of 2×10^4 cells well⁻¹ in 180 μL of a culture medium. Cells were centrifuged at 800g for 1 min. After 48 h of incubation at 37 °C and 5% CO₂, the 3D spheroid structure was established.

Flow Cytometry Studies. Meso 11 cells were seeded on a 6-well plate at 2×10^5 cells well⁻¹. After 24 h, solutions of NA-1, NA-2, and NA-3 (final iron concentrations of 3.3, 2.6, and 2.09 μmol L⁻¹) were added and allowed to be in contact for 30, 60, 120, 240, 360, 960, and

1440 min. Then, each well was washed with PBS and incubated with 300 μL of trypsin/EDTA for 5 min. A total of 700 μL of a culture medium was added, and the cell suspensions were centrifuged at 800g for 5 min. The cell pellets were resuspended in PBS (50 μL) containing Zombie NIR (Biolegend), diluted to $1/_{50}$, and incubated for 30 min at room temperature. Analyses were performed using an ImageStreamX imaging flow cytometer (Amnis Corp., Seattle, WA) equipped with INSPIRE software. A 40 \times magnification was used for all samples. A total of 10^4 living cells were analyzed for each condition. Data analysis was performed using the IDEAS software (Amnis Corp.). The NAs and Zombie NIR were excited with a 488 nm argon-ion laser (power 100 mW). Fluorescence signals of the NAs and Zombie NIR were collected on channel 3 (560–595 nm) and channel 12 (745–800 nm), respectively. Intensity-adjusted bright-field images were collected on channel 1 (430–480 nm). The gating strategy for analysis involved the selection of focused live cells first on the viability marker and then on the NA fluorescence.

Cell Monolayer Fixation and TEM Imaging. Meso 11 cells were seeded on a 6-well plate at 5×10^5 cells well^{-1} . After 24 h, solutions of NA-1, NA-2, and NA-3 (final iron concentrations of 3.3, 2.6, and 2.09 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively) were added and allowed to be in contact for 24 h. The cells were washed with a phosphate buffer (5 mL) and fixed in a 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ phosphate buffer containing 1.6% glutaraldehyde for 1 h at 4 $^{\circ}\text{C}$. They were washed with 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer at pH 7.2 (0.5 mL) and postfixed in 1% osmium tetroxide and a cacodylate buffer for 1 h at 4 $^{\circ}\text{C}$. After fixation, the samples were rinsed with a cacodylate buffer, dried with increasing concentrations of ethanol and propylene oxide, embedded in an EMBed-812 resin (Agar Scientific, Stansted, U.K.), and further polymerized. The resulting embedded cells were cut with an UltraCut E microtome (Leica, Wetzlar, Germany) and placed onto copper grids. TEM observation of the grids was performed using a JEM-1010 microscope (JEOL, Tokyo, Japan), operating at an accelerated voltage of 100 kV.

Confocal Fluorescence and TEM. Confocal fluorescence imaging was performed using a Nikon A1R silicon microscope, equipped with Ar⁺ and He–Ne lasers as excitation sources and an oil-immersion objective Plan Apo (60 \times ; NA = 1.4). TEM imaging were obtained using an Axio Observer Z1 Zeiss microscope using two distinct objectives (oil-immersion objective, A Pln, 63 \times , NA = 1.4; DICIII, objective A Pln, 40 \times , 0.5 Ph₂). Cell imaging: Meso 11 cells were seeded on a μ -slide 8-well ibitreat microscopy chamber (Ibidi). After 24 h, solutions of NA-1, NA-2, and NA-3 (final iron concentrations of 3.3, 2.6, and 2.09 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively) were added and allowed to be in contact for 24 h. Each well was washed with PBS and incubated with a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ WGA–Alexa Fluor 647 conjugate for 10 min at 37 $^{\circ}\text{C}$. The cells were then washed twice with PBS and incubated with a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Hoechst for nucleus staining and 4% paraformaldehyde for 15 min. Spheroid imaging: Meso 11 spheroids were treated with NA-1, NA-2, and NA-3 (final iron concentrations of 65.7, 52.2, and 41.7 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively) for 24 h. Each well was washed with PBS and incubated with a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Hoechst for nucleus staining and 4% paraformaldehyde for 15 min. Meso 11 MTCSs were washed once with PBS and transferred into a μ -slide angiogenesis plate (Ibidi) for imaging.

MRI of Cell Monolayers and Spheroids. A scaffold was designed according to a glass cylinder (54 mm \times 27 mm). The ghost background was filled by 1% low-melting agarose gel (type I, Sigma-Aldrich), and two rows of four wells were created thanks to a plastic comb designed by a 3D printer. Monolayers of Meso 11 cells were seeded in the first row's wells at a density of 2×10^4 cells well^{-1} in PBS. A total of 16 Meso 11 MTCSs were seeded on each of the second row's well. The top of the scaffold was filled by 1% low-gelling agarose gel (type I, Sigma-Aldrich). All MRI studies were performed with a Biospec Avance III MR scanner (Bruker Biospin, Wissembourg, France) using a 20-cm-bore, 7 T magnet equipped with a BGA12S gradient/shim system capable of 675 mT m^{-1} maximum gradient strength. A 35-mm-diameter volume coil was used.

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsami.7b01737.

SDS-PAGE and magnetophoresis protocols and additional TEM, photophysical, and MRI characterization (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: julien.poly@uha.fr. Phone: +33-3-8960-8802.

*E-mail: christophe.blanquart@univ-nantes.fr. Phone: +33-2-2808-0238.

*E-mail: elena.ishow@univ-nantes.fr. Phone: +33-2-5112-5375.

ORCID

Eléna Ishow: 0000-0002-2965-1224

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding

The “Ligue contre le cancer 44” is gratefully acknowledged for its strong support as well as CNRS through its “Mission pour l’Interdisciplinarité” board (program “Nano Challenge: Health and Welfare”/ETHICAM project) and its France–Italy partnership (program PICS/MOCACINO project) and Région des Pays de la Loire through the Ph.D. program of LUMOMAT RFI (ONASSIS project).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We deeply acknowledge Carole La (LPGN, UMR CNRS 6112, Université Nantes), Brigitte Bouchet (INRA Nantes–Angers), and Eric Gautron (IMN, UMR 6502, Université Nantes), Louis Ryo and François-Xavier Lefèvre (CEISAM, UMR, CNRS 6230, Université Nantes), Florence Franconi (PIAM, Angers), Thierry Guizouarn (ISCR, UMR, CNRS 6226, Université de Rennes 1), Juliette Desfrançois (Plateforme CytoCell, IN-SERM, UMR 1232, Nantes), Florence Gazeau and Claire Wilhelm (MSC, UMR, CNRS 7057, Université Paris Diderot), and Jérôme Fresnais (PHENIX, UMR, CNRS 8234, Université Pierre et Marie Curie) for ICP-OES iron titrations, access to the TEM platform, glass-blowing and SEM measurements, MRI measurements, SQUID measurements, flow cytometry, access to magnetophoresis facilities, and for providing acidic solutions of SPIONS, respectively.

■ REFERENCES

- (1) Prado, Y.; Daffe, N.; Michel, A.; Georgelin, T.; Yaacoub, N.; Greneche, J.-M.; Choueikani, F.; Otero, E.; Ohresser, P.; Arrio, M.-A.; Cartier-dit-Moulin, C.; Sainctavit, P.; Fleury, B.; Dupuis, V.; Lisnard, L.; Fresnais, J. Enhancing the magnetic anisotropy of maghemite nanoparticles via the surface coordination of molecular complexes. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 10139.
- (2) de Boer, P.; Hoogenboom, J. P.; Giepmans, B. N. G. Correlated Light and Electron Microscopy: Ultrastructure Lights Up! *Nat. Methods* **2015**, *12*, 503–513.
- (3) Feld, A.; Merkl, J.-P.; Kloust, H.; Flessau, S.; Schmidtke, C.; Wolter, C.; Ostermann, J.; Kampferbeck, M.; Eggers, R.; Mews, A.; Schotten, T.; Weller, H. A Universal Approach to Ultrasmall Magneto-

Fluorescent Nanohybrids. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 12468–12471.

(4) Chen, O.; Riedemann, L.; Etoc, F.; Herrmann, H.; Coppey, M.; Barch, M.; Farrar, C. T.; Zhao, J.; Bruns, O. T.; Wei, H.; Guo, P.; Cui, J.; Jensen, R.; Chen, Y.; Harris, D. K.; Cordero, J. M.; Wang, Z. W.; Jasanoff, A.; Fukumura, D.; Reimer, R.; Dahan, M.; Jain, R. K.; Bawendi, M. G. Magneto-Fluorescent Core-Shell Supernanoparticles. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5093.

(5) Reddy, L. H.; Arias, J. L.; Nicolas, J.; Couvreur, P. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 5818–5878.

(6) Mazuel, F.; Espinosa, A.; Luciani, N.; Reffay, M.; Le Borgne, R.; Motte, L.; Desboeufs, K.; Michel, A.; Pellegrino, T.; Lalatonne, Y.; Wilhelm, C. Massive Intracellular Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles Evidenced Magnetically at Single-Endosome and Tissue Levels. *ACS Nano* **2016**, *10*, 7627–7638.

(7) Lartigue, L.; Alloeyue, D.; Kolosnjaj-Tabi, J.; Javed, Y.; Guardia, P.; Riedinger, A.; Péchoux, C.; Pellegrino, T.; Wilhelm, C.; Gazeau, F. Biodegradation of Iron Oxide Nanocubes: High-Resolution In Situ Monitoring. *ACS Nano* **2013**, *7*, 3939–3952.

(8) Gupta, A. K.; Gupta, M. Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995–4021.

(9) Lee, P.-W.; Hsu, S.-H.; Wang, J.-J.; Tsai, J.-S.; Lin, K.-J.; Wey, S.-P.; Chen, F.-R.; Lai, C.-H.; Yen, T.-C.; Sung, H.-W. The Characteristics, Biodistribution, Magnetic Resonance Imaging and Biodegradability of Superparamagnetic Core-Shell Nanoparticles. *Biomaterials* **2010**, *31*, 1316–1324.

(10) Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064–2110.

(11) Vuong, Q. L.; Berret, J. F.; Fresnais, J.; Gossuin, Y.; Sandre, O. A Universal Scaling Law to Predict the Efficiency of Magnetic Nanoparticles as MRI T2-Contrast Agents. *Adv. Healthcare Mater.* **2012**, *1*, 502–512.

(12) Paquet, C.; de Haan, H. W.; Leek, D. M.; Lin, H. Y.; Xiang, B.; Tian, G. H.; Kell, A.; Simard, B. Clusters of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Encapsulated in a Hydrogel: A Particle Architecture Generating a Synergistic Enhancement of the T-2 Relaxation. *ACS Nano* **2011**, *5*, 3104–3112.

(13) Hickey, R. J.; Koski, J.; Meng, X.; Riggelman, R. A.; Zhang, P. J.; Park, S. J. Size-Controlled Self-Assembly of Superparamagnetic Polymersomes. *ACS Nano* **2014**, *8*, 495–502.

(14) Béalle, G.; Di Corato, R.; Kolosnjaj-Tabi, J.; Dupuis, V.; Clément, O.; Gazeau, F.; Wilhelm, C.; Ménager, C. Ultra Magnetic Liposomes for MR Imaging, Targeting, and Hyperthermia. *Langmuir* **2012**, *28*, 11834–11842.

(15) Casula, M. F.; Floris, P.; Innocenti, C.; Lascialfari, A.; Marinone, M.; Corti, M.; Sperling, R. A.; Parak, W. J.; Sangregorio, C. Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents Based on Iron Oxide Superparamagnetic Ferrofluids. *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 1739–1748.

(16) Di Corato, R.; Béalle, G.; Kolosnjaj-Tabi, J.; Espinosa, A.; Clément, O.; Silva, A. K. A.; Ménager, C.; Wilhelm, C. Combining Magnetic Hyperthermia and Photodynamic Therapy for Tumor Ablation with Photoresponsive Magnetic Liposomes. *ACS Nano* **2015**, *9*, 2904–2916.

(17) Faucon, A.; Fresnais, J.; Brosseau, A.; Hulin, P.; Nedellec, S.; Hemez, J.; Ishow, E. Photoactive Chelating Organic Nanospheres as Central Platforms of Bimodal Hybrid Nanoparticles. *J. Mater. Chem. C* **2013**, *1*, 3879–3886.

(18) Faucon, A.; Benhelli-Mokrani, H.; Fleury, F.; Dubreil, L.; Hulin, P.; Nedellec, S.; Doussineau, T.; Antoine, R.; Orlando, T.; Lascialfari, A.; Fresnais, J.; Lartigue, L.; Ishow, E. Tuning the Architectural Integrity of High-Performance Magnetofluorescent Core-Shell Nanoassemblies in Cancer Cells. *J. Colloid Interface Sci.* **2016**, *479*, 139–149.

(19) Fresnais, J.; Berret, J.-F.; Frka-Petesic, B.; Sandre, O.; Perzynski, R. Electrostatic Co-Assembly of Iron Oxide Nanoparticles and

Polymers: Towards the Generation of Highly Persistent Superparamagnetic Nanorods. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 3877–3881.

(20) Chanteau, B.; Fresnais, J.; Berret, J. F. Electrosteric Enhanced Stability of Functional Sub-10 nm Cerium and Iron Oxide Particles in Cell Culture Medium. *Langmuir* **2009**, *25*, 9064–9070.

(21) Kadajji, V. G.; Betageri, G. V. Water Soluble Polymers for Pharmaceutical Applications. *Polymers* **2011**, *3*, 1972–2009.

(22) Faucon, A.; Maldiney, T.; Clément, O.; Hulin, P.; Nedellec, S.; Robard, M.; Gautier, N.; De Meulenaere, E.; Clays, K.; Orlando, T.; Lascialfari, A.; Fiorini-Debuisschert, C.; Fresnais, J.; Ishow, E. Highly Cohesive Dual Nanoassemblies for Complementary Multiscale Bioimaging. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 7747–7755.

(23) Torrisi, V.; Graillet, A.; Vitorazi, L.; Crouzet, Q.; Marletta, G.; Loubat, C.; Berret, J. F. Preventing Corona Effects: Multiphosphonic Acid Poly(ethylene glycol) Copolymers for Stable Stealth Iron Oxide Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 3171–3179.

(24) Markiewicz, K. H.; Seiler, L.; Misztalewska, I.; Winkler, K.; Harrisson, S.; Wilczewska, A. Z.; Destarac, M.; Marty, J. D. Advantages of Poly(Vinyl Phosphonic Acid)-Based Double Hydrophilic Block Copolymers for The Stabilization of Iron Oxide Nanoparticles. *Polym. Chem.* **2016**, *7*, 6391–6399.

(25) Verma, A.; Stellacci, F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* **2010**, *6*, 12–21.

(26) Ashby, J.; Pan, S. Q.; Zhong, W. W. Size and Surface Functionalization of Iron Oxide Nanoparticles Influence the Composition and Dynamic Nature of Their Protein Corona. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 15412–15419.

(27) Saha, K.; Rahimi, M.; Yazdani, M.; Kim, S. T.; Moyano, D. F.; Hou, S.; Das, R.; Mout, R.; Rezaee, F.; Mahmoudi, M.; Rotello, V. M. Regulation of Macrophage Recognition through the Interplay of Nanoparticle Surface Functionality and Protein Corona. *ACS Nano* **2016**, *10*, 4421–4430.

(28) Huang, R.; Carney, R. P.; Ikuma, K.; Stellacci, F.; Lau, B. L. T. Effects of Surface Compositional and Structural Heterogeneity on Nanoparticle-Protein Interactions: Different Protein Configurations. *ACS Nano* **2014**, *8*, 5402–5412.

(29) Nasongkla, N.; Chen, B.; Macaraeg, N.; Fox, M. E.; Fréchet, J. M. J.; Szoka, F. C. Dependence of Pharmacokinetics and Biodistribution on Polymer Architecture: Effect of Cyclic versus Linear Polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3842–3843.

(30) Setyawati, M. I.; Tay, C. Y.; Docter, D.; Stauber, R. H.; Leong, D. T. Understanding and Exploiting Nanoparticles' Intimacy with The Blood Vessel and Blood. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 8174.

(31) Ménager, C.; Sandre, O.; Mangili, J.; Cabuil, V. Preparation and Swelling of Hydrophilic Magnetic Microgels. *Polymer* **2004**, *45*, 2475–2481.

(32) Fery-Forgues, S. Fluorescent organic nanocrystals and non-doped particles for biological applications. *Nanoscale* **2013**, *5*, 8428–8437.

(33) Fischer, I.; Petkau-Milroy, K.; Dorland, Y. L.; Schenning, A.; Brunsveld, L. Self-Assembled Fluorescent Organic Nanoparticles for Live-Cell Imaging. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 16646–16650.

(34) Bouhamed, H.; Boufi, S.; Magnin, A. Alumina interaction with AMPS-MPEG copolymers produced by RAFT polymerization: Stability and rheological behavior. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *333*, 209–220.

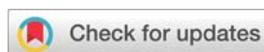
(35) McCormick, C. L.; Lowe, A. B. Aqueous RAFT Polymerization: Recent Developments in Synthesis of Functional Water-Soluble (Co)polymers with Controlled Structures. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 312–325.

(36) Boyer, C.; Bulmus, V.; Davis, T. P.; Ladmiral, V.; Liu, J.; Perrier, S. Bioapplications of RAFT Polymerization. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5402–5436.

(37) Tian, J.; Zheng, F.; Zhao, H. Nanoparticles with Fe₃O₄-Nanoparticle Cores and Gold-Nanoparticle Coronae Prepared by Self-Assembly Approach. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 3304–3312.

(38) Pissuwan, D.; Boyer, C.; Gunasekaran, K.; Davis, T. P.; Bulmus, V. In Vitro Cytotoxicity of RAFT Polymers. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 412–420.

- (39) Sumerlin, B. S.; Matyjaszewski, K. Molecular Brushes—Densely Grafted Copolymers. In *Macromolecular Engineering*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007; pp 1103–1135.
- (40) Mignot, A.; Truillet, C.; Lux, F.; Sancey, L.; Louis, C.; Denat, F.; Boschetti, F.; Bocher, L.; Gloter, A.; Stephan, O.; Antoine, R.; Dugourd, P.; Luneau, D.; Novitchi, G.; Figueiredo, L. C.; de Morais, P. C.; Bonneviot, L.; Albela, B.; Ribot, F.; Van Lokeren, L.; Dechamps-Olivier, I.; Chuburu, F.; Lemercier, G.; Villiers, C.; Marche, P. N.; Le Duc, G.; Roux, S.; Tillement, O.; Perriat, P. A Top-Down Synthesis Route to Ultrasmall Multifunctional Gd-Based Silica Nanoparticles for Theranostic Applications. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 6122–6136.
- (41) Ishow, E.; Faucon, A. Magnetic and Fluorescent Reverse Nanoassemblies. U.S. 14/218,368, PCT/EP2015/055711, March 2015.
- (42) Johnson, N. J. J.; He, S.; Nguyen Huu, V. A.; Almutairi, A. Compact Micellization: A Strategy for Ultrahigh T-1 Magnetic Resonance Contrast with Gadolinium-Based Nanocrystals. *ACS Nano* **2016**, *10*, 8299–8307.
- (43) Willcock, H.; O'Reilly, R. K. End Group Removal and Modification of RAFT Polymers. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 149–157.
- (44) Faucon, A.; Lenk, R.; Hemez, J.; Gautron, E.; Jacquemin, D.; Le Questel, J.-Y.; Graton, J.; Brosseau, A.; Ishow, E. Fluorescent Carboxylic and Phosphonic Acids: Comparative Photophysics from Solution to Organic Nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 12748–12756.
- (45) Faucon, A.; Benhelli-Mokrani, H.; Córdova, L. A.; Brulin, B.; Heymann, D.; Hulin, P.; Nedellec, S.; Ishow, E. Long-Term Fate of Fluorescent Organic Nanoparticles as Bioimaging Agents in Cancer Cells and Macrophages. *Adv. Healthcare Mater.* **2015**, *4*, 2727–2734.
- (46) Breton, M.; Prevel, G.; Audibert, J. F.; Pansu, R.; Tauc, P.; Le Pioufle, B.; Francais, O.; Fresnais, J.; Berret, J. F.; Ishow, E. Solvatochromic Dissociation of Non-Covalent Fluorescent Organic Nanoparticles upon Cell Internalization. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 13268–13276.
- (47) Farinha, J. P. S.; Relógio, P.; Charreyre, M.-T.; Prazeres, T. J. V.; Martinho, J. M. G. Understanding Fluorescence Quenching in Polymers Obtained by RAFT. *Macromolecules* **2007**, *40*, 4680–4690.
- (48) Nandwana, V.; Ryoo, S. R.; Kanthala, S.; De, M.; Chou, S. S.; Prasad, P. V.; Dravid, V. P. Engineered Theranostic Magnetic Nanostructures: Role of Composition and Surface Coating on Magnetic Resonance Imaging Contrast and Thermal Activation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 6953–6961.
- (49) Poselt, E.; Kloust, H.; Tromsdorf, U.; Janschel, M.; Hahn, C.; Masslo, C.; Weller, H. Relaxivity Optimization of a PEGylated Iron-Oxide-Based Negative Magnetic Resonance Contrast Agent for T2-Weighted Spin-Echo Imaging. *ACS Nano* **2012**, *6*, 1619–1624.
- (50) Roch, A.; Muller, R. N.; Gillis, P. Theory of Proton Relaxation Induced by Superparamagnetic Particles. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 5403–5411.
- (51) Terment, L.; Mayoh, D. A.; Lees, M. R.; Davies, G. L. Heparin-Stabilised Iron Oxide for MR Applications: A Relaxometric Study. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 3065–3074.
- (52) Meledandri, C. J.; Ninjbadgar, T.; Brougham, D. F. Size-controlled magnetoliposomes with tunable magnetic resonance relaxation enhancements. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 214–222.
- (53) Gossuin, Y.; Gillis, P.; Hocq, A.; Vuong, Q. L.; Roch, A. Magnetic Resonance Relaxation Properties of Superparamagnetic Particles. *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2009**, *1*, 299–310.
- (54) Vuong, Q. L.; Berret, J.-F.; Fresnais, J.; Gossuin, Y.; Sandre, O. A Universal Scaling Law to Predict the Efficiency of Magnetic Nanoparticles as MRI T2-Contrast Agents. *Adv. Healthcare Mater.* **2012**, *1*, 502–512.
- (55) Meng, H.; Xia, T.; George, S.; Nel, A. E. A Predictive Toxicological Paradigm for the Safety Assessment of Nanomaterials. *ACS Nano* **2009**, *3*, 1620–1627.
- (56) Lartigue, L.; Hugounenq, P.; Alloyeau, D.; Clarke, S. P.; Lévy, M.; Bacri, J.-C.; Bazzi, R.; Brougham, D. F.; Wilhelm, C.; Gazeau, F. Cooperative Organization in Iron Oxide Multi-Core Nanoparticles Potentiates Their Efficiency as Heating Mediators and MRI Contrast Agents. *ACS Nano* **2012**, *6*, 10935–10949.
- (57) Janschel, M.; Stumpf, P.; Graf, C.; Rühl, E.; Müller, R. H. Adsorption Kinetics of Plasma Proteins on Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide (USPIO) Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2012**, *428*, 125–133.
- (58) Xia, T.; Kovochich, M.; Liong, M.; Zink, J. I.; Nel, A. E. Cationic Polystyrene Nanosphere Toxicity Depends on Cell-Specific Endocytic and Mitochondrial Injury Pathways. *ACS Nano* **2008**, *2*, 85–96.
- (59) Weinstein, J. S.; Varallyay, C. G.; Dosa, E.; Gahramanov, S.; Hamilton, B.; Rooney, W. D.; Muldoon, L. L.; Neuwelt, E. A. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: diagnostic magnetic resonance imaging and potential therapeutic applications in neuro-oncology and central nervous system inflammatory pathologies, a review. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2010**, *30*, 15–35.
- (60) Wrynn, A. S.; Mac Sweeney, C. P.; Franconi, F.; Lemaire, L.; Pouliquen, D.; Herlidou, S.; Leonard, B. E.; Gandon, J.-M.; de Certaines, J. D. An In-Vivo Magnetic Resonance Imaging Study of The Olfactory Bulbectomized Rat Model of Depression. *Brain Res.* **2000**, *879*, 193–199.
- (61) Tanimoto, A. T.; Pouliquen, D.; Kreft, B. P.; Stark, D. D. Effects of Spatial Distribution on Proton Relaxation Enhancement by Particulate Iron Oxide. *J. Magn. Reson. Imaging* **1994**, *4*, 653–657.
- (62) Weiswald, L.-B.; Bellet, D.; Dangles-Marie, V. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia* **2015**, *17*, 1–15.
- (63) Fennema, E.; Rivron, N.; Rouwkema, J.; van Blitterswijk, C.; de Boer, J. Spheroid Culture as A Tool for Creating 3D Complex Tissues. *Trends Biotechnol.* **2013**, *31*, 108–115.
- (64) Levy, M. L. F.; Lagarde, F.; Maraloui, V. A.; Blanchin, M. G.; Gendron, F.; Wilhelm, C.; Gazeau, F. Degradability of Superparamagnetic Nanoparticles in a Model of Intracellular Environment: Follow-up of Magnetic, Structural and Chemical Properties. *Nanotechnology* **2010**, *21*, 395103–395200.
- (65) Reynolds, L.; Gardecki, J. A.; Frankland, S. J. V.; Horng, M. L.; Maroncelli, M. Dipole Solvation in Nondipolar Solvents: Experimental Studies of Reorganization Energies and Solvation Dynamics. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 10337–10354.

Cite this: *Nanoscale*, 2017, 9, 18094

Bioconjugated fluorescent organic nanoparticles targeting EGFR-overexpressing cancer cells†

Adrien Faucon,^a Houda Benhelli-Mokrani,^b Fabrice Fleury,^b Stéphanie Dutertre,^c Marc Tramier,^{c,d} Joanna Boucard,^a Lénaïc Lartigue,^a Steven Nedellec,^e Philippe Hulin^e and Eléna Ishow^{✉*}

The field of optical bioimaging has considerably flourished with the advent of sophisticated microscopy techniques and ultra-bright fluorescent tools. Fluorescent organic nanoparticles (FONs) have thus recently appeared as very attractive labels for their high payload, absence of cytotoxicity and eventual biodegradation. Nevertheless, their bioconjugation to target specific receptors with high imaging contrast is scarcely performed. Moreover, assessing the reality of bioconjugation represents high challenges given the sub-nanomolar concentrations resulting from the commonly adopted nanoprecipitation fabrication process. Here, we describe how the combination of a magnetic shell allows us to easily generate red-emitting FONs conjugated with the epidermal growth factor ligand (EGF), a small protein promoting cancer cell proliferation by activating the EGF receptor (EGFR) pathway. Dual color fluorescence correlation spectroscopy combined with immunofluorescence is originally harnessed in its time trace mode to unambiguously demonstrate covalent attachment between the FON and EGF at sub-nanomolar concentrations. Strong asymmetric clustering of EGF-conjugated FONs is observed at the membrane of MDA-MB-468 human breast cancer cells overexpressing EGF receptors using super-resolution fluorescence microscopy. Such high recruitment of EGF-conjugated FONs is attributed to their EGF multivalency (4.7 EGF per FON) which enables efficient EGFR activation and subsequent phosphorylation. The large hydrodynamic diameter ($D_H \sim 301$ nm) of EGF-conjugated FONs prevents immediate engulfment of the sequestered receptors, which provides very bright and localized spots in less than 30 minutes. The reported bioconjugated nanoassemblies could thus serve as ultra-bright probes of breast cancer cells with EGFR-overexpression that is often associated with poor prognosis.

Received 1st September 2017,
Accepted 25th October 2017

DOI: 10.1039/c7nr06533g

rsc.li/nanoscale

Introduction

Smart nanomaterials have represented a boosting and highly competitive research field in nanomedicine since a decade only, opening innovative therapy and diagnostic approaches.^{1,2} Compared to traditional medicines, they enable live follow-up

of stem cell therapies for the regeneration of pathological tissues, efficient targeting of malignant cells, or *in vivo* cross diagnostics to cite only a few of advantageous characteristics.^{3,4} These unique potentialities stem from nanometric dimensions that are similar to those of biological components, and the opportunity to combine various complementary functionalities (imaging, targeting, drug delivery, curing) within a single architecture.⁵ With the considerable advances accomplished in fluorescence microscopy in terms of resolution and sensitivity, emissive organic nanoprobe have become indisputable tools to address complex biological mechanisms or assist drug delivery under live cell conditions.^{6–8} Unlike molecular fluorophores prone to fast photobleaching, emissive nanoparticles display large photostability, enabling extensive imaging over time.^{9–12} In this context, ultra-bright fluorescent organic nanoparticles (FONs), made of non-doped fluorescent dyes,^{13–15} and emissive π -conjugated polymer nanoparticles (P-dots),¹⁶ represent very attractive alternatives to quantum dots. The latter suffer from the presence of cytotoxic heavy metals, photoblinking, surface quenching effect and cumber-

^aCEISAM–UMR CNRS 6230, Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes, France

^bUFIP–UMR CNRS 6286, Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes, France

^cMicroscopy Rennes Imaging Center (MRIC), Biosit – UMS CNRS 3480/US INSERM 018, University of Rennes 1, 35043 Rennes, France

^dInstitut de Génétique et Développement de Rennes, UMR CNRS 6290, Université de Rennes 1, 2 avenue du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes, France

^eINSERM UMS 016-UMS CNRS 3556, 8 quai Moncoussu, 44007 Nantes, France.

E-mail: elena.ishow@univ-nantes.fr

† Electronic supplementary information (ESI) available: Photophysical properties of FON_m nanoassemblies conjugated with cysteine and triphenylmethanol, fluorescence intensity time traces recorded by FCS for control experiments, and cell viability assay. See DOI: 10.1039/c7nr06533g

some ligand exchange to achieve biocompatible dispersions even though considerable advances have been made to address these issues.¹⁷ Furthermore, FONs and P-dots are simply obtained upon nano-precipitation of either small hydrophobic π -conjugated fluorophores or semi-conductive polymers, dissolved in water-miscible solvents, in water. However, they face delicate functionalization processes when it comes to bioconjugation. Covalent introduction requires additional tedious synthetic modifications that could durably impair the emissive properties of the fluorescent organic backbones. To overcome these limitations, self-assembling with amphiphilic counterparts (poly(ethylene glycol) (PEG) containing hydrophobic and carboxylic acid units, or lipophilic peptides) has been reported to yield functionalizable FONs¹⁸ or P-dot^{19–21} nanostructures, following a classical carbodiimide-activated peptide coupling method. Cohesion of the resulting nanostructure is then exclusively ensured by van der Waals interactions between the hydrophobic units of both partners, assembled from a pre-mixed solution in THF after injection in water, or from prior injection of the organic dye solution into an aqueous solution of the complementary amphiphilic species. Although such a route could at first appear attractive for its simplicity and versatility, immediate concerns are raised about the *in vitro* structural stability of the bioconjugated organic nanoparticles. Interactions with the lipid content of living organisms can lead to competitive dissolution, hence false positive or emission loss is generated.²² Moreover, the adopted nanoprecipitation process precludes the use of saline buffer or concentrated solutions of hydrophobic dyes that would irreversibly precipitate because of mere salting or supersaturation effects. To circumvent these issues, we have recently reported on the fabrication of magnetic FONs (here simply designated as FONs for clarity purposes), with high colloidal stability in serum and saline media up to 0.5 mol L⁻¹ NaCl, by capping their surface with iron oxide nanoparticles, and anionic polyelectrolytes.²³ These hybrid architectures were obtained by nanoprecipitating small chelating fluorophores with strong affinity to iron oxide into a solution of maghemite (γ -Fe₂O₃) nanoparticles (NPs). Moreover, the magnetic part allows for an easy purification procedure by magnetic trapping. Such core-shell magneto-fluorescent nanoassemblies displayed great structural cohesion, even after *in vivo* administration, thereby permitting a reliable magnetic resonance imaging (MRI)/fluorescence correlation at iron doses ten times lower than usual.²⁴

In order to endow FONs with biological activities, we want to show that such architectures offer again much promise as they can easily be bioconjugated upon covalent attachment of dedicated proteins on their outer polyelectrolyte coating. To this aim, we have targeted the epidermal growth factor receptor (EGFR), a transmembrane glycoprotein (170 kDa), largely implied in the regulation of cell proliferation, differentiation and apoptosis.²⁵ For these reasons, EGFR nowadays constitutes an important target for anti-cancer therapy, all the more since EGFR overexpression in solid tumors has been associated with poor clinical prognosis. FONs bioconjugated with the

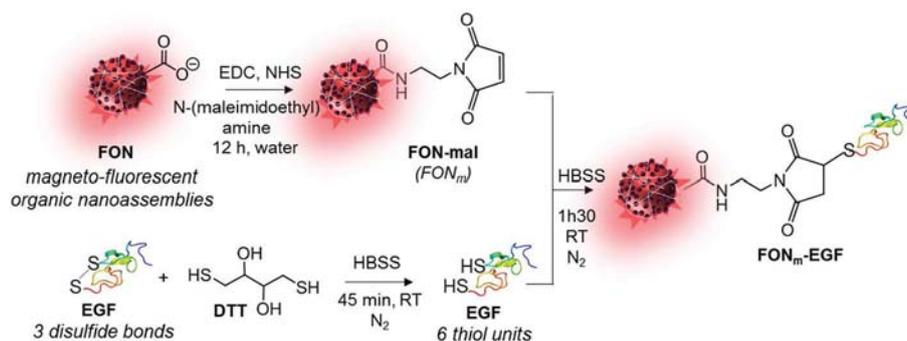
EGF ligand were shown to successfully bind EGFR and activate EGFR phosphorylation within the first fifteen minutes. Dual color fluorescence correlation spectroscopy, combined with immunofluorescence, was originally employed to validate bioconjugation and revealed ultra-high sensitive detection of coupled nano-objects at sub-nanomolar concentrations. Finally, super-resolution fluorescence microscopy performed on MDA-MB-468 human breast cancer cells, overexpressing EGFR, revealed strongly asymmetric localization of EGF-bioconjugated FONs at the plasma membrane, opening horizons towards fast and highly-contrasted detection of malignant cells.

Results and discussion

Fabrication and validation of bioconjugated FON-EGF nanoassemblies

Maintaining the activity of EGF after bioconjugation implies the use of a linker to bring enough internal mobility to the protein.²⁶ We chose thiol-maleimide covalent coupling for its simplicity and biocompatibility and the low content of cysteine residues (6 in total for EGF giving rise to 3 disulfide bonds), located far from the active recognition site.²⁷ This required prior introduction of maleimide units onto the surface of the magneto-fluorescent FONs, coated with polyacrylic acid (PAA). Magnetic FONs were prepared according to literature procedures and comprised a non-doped core of red-emitting fluorophores, surrounded by a shell of 7 nm-large magnetic γ -Fe₂O₃ NPs,²⁸ further stabilized with small PAA chains ($M_w = 1.8$ kDa) to avoid interassembly aggregation.²³ Their final mean diameter was assessed to be $D_{\text{TEM}} = 90 \pm 18$ nm and $D_{\text{H}} = 194$ nm (PDI = 0.45) from transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS) analyses, respectively. They were first treated with *N*-hydroxysuccinimide (NHS) and the water-soluble coupling agent *N*-ethyl-*N'*-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide (EDC) to transform the polyelectrolyte acrylate units into activated ester moieties, and further reacted with *N*-(2-aminoethyl)maleimide trifluoroacetate salt after increasing the solution pH to 9 (Scheme 1). Dialysis was performed overnight to remove unreacted reagents. Before coupling, EGF underwent reducing treatment using dithiothreitol (DTT) to regenerate free cysteine residues after disulfide bond cleavage.²⁶ Coupling between FON-maleimide (FON_m) and activated EGF was then conducted under an inert atmosphere for 1 h 30 min. Further dialysis to remove the non-grafted protein ($M_w = 6.1$ kDa) was performed at 4 °C using a 100 kDa cut-off membrane against HBSS buffer. The resulting FON_m-EGF solution was then aliquoted, quickly frozen in liquid nitrogen, and stored at -18 °C for several weeks. Each sample was then thawed before use.

All these functionalization steps were followed using DLS and fluorescence measurements that were more sensitive than TEM analyses to evidence the impact of surface modification on dynamic solvation. A progressive increase in the mean hydrodynamic diameter D_{H} was noticed when going from pris-



Scheme 1 Experimental pathway toward the bioconjugation of magneto-fluorescent FONs with EGF.

tine FON ($D_H = 194$ nm) to FON-maleimide ($D_H = 244$ nm) and finally FON_m -EGF ($D_H = 301$ nm) (Fig. 1a). Contrary to DLS measurements in solution, TEM analyses, conducted under dry conditions, revealed only the FON core, the organic functionalization and solvation shell being not detectable. For this reason, TEM diameters (D_{TEM}) were found substantially smaller than hydrodynamic diameters (Table 1 – Fig. S1 in the ESI[†]), and are quite similar for all three kinds of nanoassemblies, thereby proving the absence of FON structural modification upon conjugation. Magnetic measurements performed on both FON and FON_m nanoassemblies brought

additional proof about the nanoassembly integrity after maleimide conjugation on the surrounding iron oxide nanoparticles. Indeed, first magnetization curves showed almost identical profiles at 300 K and similar values of the saturation magnetization M_s at 30 emu g^{-1} , indicating that no change occurred in the arrangement of iron oxide NPs (Fig. S2[†]).

We thus suspect that the large evolution of D_H values features extensive deorganization of the compact hydration shell around the nanoassembly surface upon loss of the carboxylate units as shown by the diminution of the zeta surface potential ζ (Table 1).

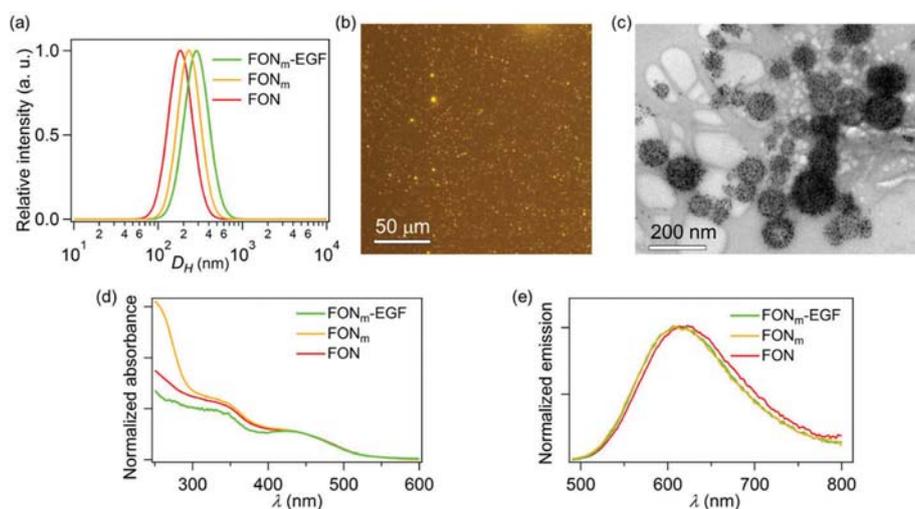


Fig. 1 (a) Log-normal size distributions measured by DLS for FON, FON_m , and FON_m -EGF nanoassemblies. (b) Fluorescence microscopy imaging ($\lambda_{exc} = 480$ nm, $\lambda_{em} > 520$ nm), and (c) TEM imaging of FON_m -EGF nanoassemblies. (d) Absorption spectra, and (e) emission spectra ($\lambda_{exc} = 450$ nm) of FON, FON_m , and FON_m -EGF nanoassemblies.

Table 1 Structural and photophysical characteristics of FON, FON-maleimide (FON_m) and FON_m -EGF

Sample	D_{TEM} (nm) (std dev.)	D_H^a (nm)/PDI	ζ^a (mV)	$\lambda^{\max}(\text{abs})$ (nm)	$\lambda^{\max}(\text{em})$ (nm)	$\Phi_f (\times 10^{-2})$	$\langle \tau_s \rangle^b$ (ns)
FON	90 ± 18	194 (0.45)	-33	426	620	1.4	0.86
FON_m	69 ± 8	244 (0.40)	-22	426	611	1.8	1.22
FON_m -EGF	78 ± 15	301 (0.47)	-21	426	609	6.7	n.a.

^a Measured in HBSS solution. ^b Average amplitude excited state lifetime calculated from the multi-exponential decay using a global fit analysis after $I_f(t) = \sum_i a_i \exp(-t/\tau_i)$ with $\langle \tau_s \rangle = \frac{\sum_i a_i \tau_i}{\sum_i a_i}$ amplitude-weighted excited state average lifetime.

The colloidal stability of the functionalized nanoassemblies was assessed by the quite constant value of the polydispersity index (PDI) around 0.45 (Table 1) and further proved by fluorescence microscopy ($\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} > 520 \text{ nm}$) showing well-dispersed and mobile emissive red spots (Fig. 1b). Bioconjugation was further proved by UV-vis absorption spectroscopy with the disappearance of the band at 250 nm, characterizing the α,β -conjugated system of the maleimide units (Fig. 1d). Steady-state fluorescence measurements also revealed subtle changes with a slight hypsochromic shift $\Delta\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ of the emission band after excitation at 450 nm, namely $\Delta\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} = -9$ and -11 nm for FON-maleimide and FON_m-EGF respectively, with regard to the emission band for pristine FONs centered at 620 nm (Fig. 1e). The complex behavior of the fluorescence decay has been thoroughly discussed elsewhere and ascribed to distinct chemical surroundings around the fluorophores (especially those embedded in the core and those at the surface in close contact with the iron oxide NPs).²⁸ The evidence of bioconjugation using emission measurements in the case of fluorescent organic nanoparticles was validated by treating the maleimide units with an excess of cystein or triphenylmethanethiol (Fig. S3 and Table S1 in the ESI†). In both cases, the photophysical evolution of FON-maleimide followed the same trend: the emission spectra underwent a hypsochromic shift while the fluorescence decay was substantially lengthened, as a result of the disruption of the π -system of maleimide that promotes fluorescence quenching upon photo-induced electron transfer.²⁹

Ultra-sensitive detection of bioconjugation using dual color fluorescence correlation spectroscopy at sub-nanomolar concentrations

The bioactivity of bioconjugated proteins is commonly checked by performing dotblot analyses using complementary antibodies and fluorescence revelation. After reducing treatment, EGF did not show any drop of activity upon reacting

with the anti-EGF antibody. Nevertheless, this method revealed to be negative for the bioconjugated FON_m-EGF. The absence of response stems from the quite diluted solutions of FONs or P-dots, usually obtained upon nanoprecipitation. The latter process actually yields solution in the subnanomolar range ($\sim 0.2 \text{ nmol L}^{-1}$ in our case – see the Experimental section for more details), which precludes classical investigations lacking picomolar sensitivity. We thus resorted to fluorescence correlation spectroscopy (FCS) coupled to confocal microscopy, relying on the analysis of cross-correlated temporal fluctuations of the fluorophore emission signal in volumes as small as 1 fL, which offers high spatial resolution.³⁰ Such a method advantageously gives access to the description of dynamic biological phenomena down to the picomolar concentration, which allows for the follow-up of protein–protein or protein–ligand association with low affinity constants, nucleic acid pairing, or enzyme turnover to cite only a few,³¹ without requiring specific isolation of the studied entities out of the cellular medium.³² Dual color FCS, involving two detection channels, offers the additional advantage of correlating the signals emitted by two fluorophores, thereby proving their spatial connection in the case of mutual interactions or attachment.³³ Hence, we tested the bioconjugation of FON_m-EGF through immunofluorescence coupled with dual color FCS analyses. To this aim, a solution of FON_m-EGF was successively incubated with a primary antibody (ABI) and a secondary antibody tagged with a fluorescent dye (ABII*), each step being followed by magnetic trapping and extensive washing with HBSS to remove the excess of antibody (Fig. 2a).

At this step, choosing the right dye revealed to be crucial to detect both traces with a reduced risk of cross-talk between the two channels. Since FONs emit above 600 nm, the goat anti-rabbit IgG (H + L) secondary antibody conjugated with Alexa Fluor@405 dye was retained to separately detect the traces of both the FON core and antibody's dye in the red (581–654 nm) and blue (415–455 nm) channels, respectively. Steady-state

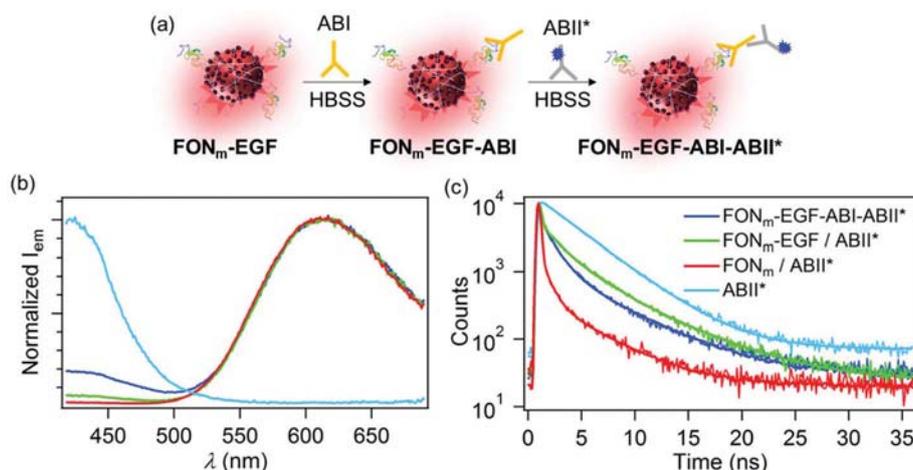


Fig. 2 (a) Structure of the immunoconstruct with FON_m-EGF for FCS measurements. (b) Emission spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$) and (c) fluorescence decays ($\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 430 \text{ nm}$) of the immunoconstruct FON_m-EGF-ABI-ABII*, control samples (FON_m-EGF/ABII*, FON_m/ABII*) and the fluorescent antibody ABII*.

fluorescence measurements upon excitation at 340 nm where AlexaFluo@405 absorbs revealed a clear emission signal at 422 nm for the immunoconstruct FON_m-EGF-ABI-ABII*, which is typical of AlexaFluo@405's emission. Control experiments involving FON_m-EGF or FON_m solutions treated with ABII* and washed out twice using magnetic trapping showed only traces of blue emission, indicating weak non-specific adsorption (Fig. 2b). Time-resolved fluorescence analyses, recorded at 430 nm upon excitation in the absorption band of Alexafluor@405 ($\lambda^{\text{max}}(\text{abs}) = 350 \text{ nm}$), disclose a significantly more rapid fluorescence decay for the immunoconstruct FON_m-EGF-ABI-ABII*, which can tentatively be explained by efficient photoinduced electron transfer toward the iron oxide shell,²⁸ thereby reflecting the close localization of ABII* and its covalent attachment to FON_m-EGF-ABI (Fig. 2c). Interestingly, an even faster fluorescence decay could be noticed for the control experiment FON_m/ABII*. Since electron transfer exponentially decreases with the distance,³⁴ this faster decrease can reasonably be ascribed to the direct contact of ABII* onto the FON_m surface through non-specific adsorption, albeit to a very low extent since only negligible fluorescence signal was detected using steady-state emission measurements.

With all these photophysical elements in hands, dual-color FCS experiments could advantageously be performed using a single excitation source at 405 nm. This enables simultaneous detection of the ABII dye and the FON core that displays a

large Stokes shift $\Delta\bar{\nu}$ of its emission signal ($\Delta\bar{\nu} \approx 7000 \text{ cm}^{-1}$; $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}} = 426 \text{ nm}$), and avoids technical alignments of two laser beams, which could skew the quantification of the partner concentrations by calculating the ratio of their correlated amplitudes. Time traces were then monitored for 240 s in both the blue and red channels at a 10 ms frequency rate, which averaged out any orientation reported to be in the 100 μs range for 160 nm-large dimers of gold nanoparticles.³⁵ FCS measurements were carried out on the FON_m-EGF-ABI-ABII* immunoconstruct and compared with those obtained for FON alone, the ABI-ABII* pair, and the mixtures FON_m/ABI-ABII*, FON_m/ABII* and FON_m-EGF/ABII* prepared with similar concentrations based on steady-state fluorescence measurements.

In the first step, we analyzed the normalized autocorrelation curves $G(\tau)$, inferred from the fluorescence intensity time trace $I(t)$, with τ featuring the lag time (Fig. 3a). The first important observation relies on the normalized $G_{\text{R}}(\tau)$ curves of the red channel that progressively shift to longer lag times when going from FON_m, FON_m-EGF, and finally FON_m-EGF-ABI-ABII*. A similar slower decrease was also observed for the normalized $G_{\text{B}}(\tau)$ curve of the immunoconstruct that was drawn from intensity fluctuations in the blue channel (Fig. S4 in the ESI†). This right shift to longer lag times actually features slower diffusion of the detected entities, which directly correlates with the progressive size increase upon conjugation. Fitting the autocorrelation curves $G_{\text{R}}(\tau)$ provided the transla-

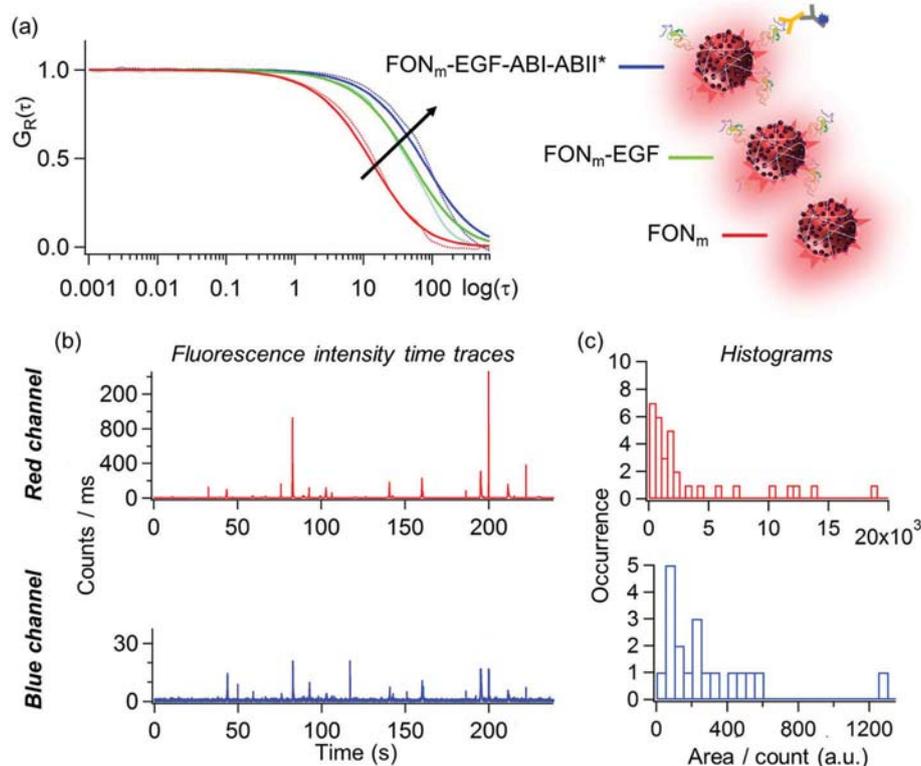


Fig. 3 (a) Autocorrelograms for the immunoconstruct, FON_m-EGF and FON_m nanoassemblies; detection in the red channel (581–654 nm) (dashed line: experimental curve; bold line: fit). (b) Fluorescence intensity time traces of the immunoconstruct FON_m-EGF-ABI-ABII* and (c) the corresponding histograms of the peak areas recorded in the red (581–654 nm) and blue (415–455 nm) channels over 6 min upon excitation at 405 nm.

tional diffusion coefficient D values that dropped from $2.29 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ for $\text{FON}_m/\text{ABII}^*$ to $1.02 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ for $\text{FON}_m\text{-EGF}/\text{ABII}^*$, and eventually down to $0.67 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ for the immunoconstruct $\text{FON}_m\text{-EGF-ABI-ABII}^*$. Upon applying the Stokes–Einstein equation and assuming the nanoassemblies to be spherical, the hydrodynamic diameters D_{FCS} could be calculated to be 184 and 414 nm for FON_m and $\text{FON}_m\text{-EGF}$ respectively after treatment with ABII^* , and finally 646 nm for $\text{FON}_m\text{-EGF-ABI-ABII}^*$. The D_{FCS} values follow the same trend as that measured by DLS for the D_{H} hydrodynamic diameter of FON_m and $\text{FON}_m\text{-EGF}$ although the values are slightly distinct. We ascribe this difference to the washing steps based on magnetic trapping to remove the unbound protein or antibody after bioconjugation, which may also conduct to size sorting of nanoparticles as a result of their distinct sedimentation speed in the presence of a magnetic field.

In the second step, we carefully looked at the time traces due to the quite large dimensions of the nanoassemblies ($\sim 10^7 \text{ nm}^3$) with respect to the observation volume (10^9 nm^3) and the low concentrations of the samples.

The ABI-ABII^* pair provided only continuous fluorescence fluctuations in the blue channel and background noise in the red channel, thereby proving the absence of cross-talk between both channels for AlexaFluor@405 (Fig. S4a in the ESI†). By contrast, FON nanoassemblies displayed intense discrete and fine peaks in the red channel, that can reasonably be ascribed to those of single or a few interacting nanoassemblies, diffusing through the reduced focal volume (Fig. S5b in the ESI†). The associated dimmed peaks in the blue channel actually arose from light scattering (Fig. S5b in the ESI†). These signatures actually result from the high payload of fluorescent units comprised of the FON core (above 10^4) and the relatively large dimensions of the nanoassembly ($D_{\text{H}} > 190 \text{ nm}$). To provide reliable analyses, we first considered the peaks that were significantly higher than the averaged noise (especially for the blue channel) and integrated the area under each selected peak. The histogram of the peak area A_{B} in the blue channel showed a broader distribution for the immunoconstruct, which is shifted to significantly higher values than those obtained for all control experiments (Fig. 3c, Fig. S6a–c in the ESI†). Reporting the peak area A_{B} in the blue channel

as a function of the peak area A_{R} in the red channel again emphasized the larger contribution of the blue signal for the immunoconstruct (Fig. 4a).

In addition, the number of events correlating both signals was also found larger for the immunoconstruct as shown in the histogram in Fig. 4b. On average, the ratio $A_{\text{B}}/A_{\text{R}}$ was found to be around 6.9% for $\text{FON}_m\text{-EGF-ABI-ABII}^*$, namely one order of magnitude larger than those calculated for $\text{FON}_m\text{-EGF}/\text{ABII}^*$ (0.3%), $\text{FON}_m/\text{ABI-ABII}^*$ (0.5%) and $\text{FON}_m/\text{ABII}^*$ (0.7%). All these observations allow us to confidently consider that the blue signal for the immunoconstruct originates from antibody-AlexaFluor@405 conjugates, tightly grafted on the FON surface instead of being merely adsorbed, which in turn indirectly validates FON functionalization with EGF. These FCS measurements thus represent to our knowledge the first experiments performed on fluorescent organic nanoparticles to evidence their bioconjugation, based on the monitoring of correlated time traces that become a sensitive tool for single nanoparticle detection. They show the general potentiality of using dual color FCS to indirectly validate the complex architecture of bioconjugated emissive NPs at very low concentrations, provided that the biological element comprises a fluorescent label with no spectral overlap with the emissive NPs.

Efficient phosphorylation of EGF receptors triggered by $\text{FON}_m\text{-EGF}$

To go a step further and test the bioactivity of $\text{FON}_m\text{-EGF}$ in live cells, we incubated them with MDA-MB-468 cancer cells, a series of metastatic breast cancer cell lines at the M. D. Anderson Cancer Center in Houston, TX³⁶ and they are known for their overexpression of EGFR amounting to around 1.3×10^6 EGFRs per cell.³⁷ EGF-binding-mediated activation of EGFRs leads to their dimerization as recently demonstrated by super-resolution microscopy³⁸ and their further phosphorylation which, in turns, provokes a cascade of signaling processes ruling the fate of the cells.³⁹ Detecting the phosphorylated EGFR form (pEGFR) thus evidences efficient EGF binding. Since the phosphorylation of EGFR occurs shortly after EGF incubation, all analyses were conducted in duplicate right after incubating the cancer cells with $\text{FON}_m\text{-EGFs}$,

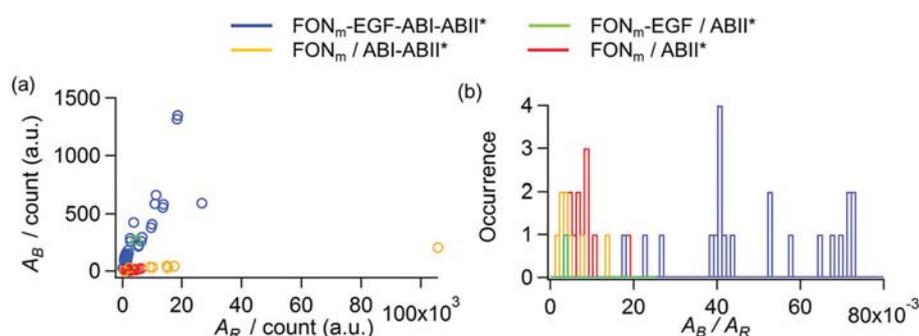


Fig. 4 (a) Areas of the time-correlated signals recorded in the blue A_{B} (ordinate) and red A_{R} (abscissa) channels. (b) Histograms of the area ratios $A_{\text{B}}/A_{\text{R}}$ of the time-correlated blue and red signals. The signals were recorded for the immunoconstruct $\text{FON}_m\text{-EGF-ABI-ABII}^*$, and control experiments $\text{FON}_m\text{-EGF}$ and FON_m , mixed with ABII^* or FON_m , mixed with ABI-ABII^* , after two cycles of magnetic trapping and washing with HBSS.

namely at times 15, 30 and 60 min. Control experiments were carried out with free EGF at a 10 ng m L^{-1} concentration (corresponding to 1.6 nmol L^{-1}) and FONs devoid of EGF and maleimide to avoid possible interference with maleimide. The concentrations of both EGF and FON reference solutions were adjusted to that for $\text{FON}_m\text{-EGF}$, based on UV-vis absorption and emission measurements. For each incubation time, the cells were harvested, lysed with an appropriate buffer and shortly sonicated. After centrifugation of the cellular extract, the supernatant solution was recuperated, and the cellular proteins were separated by using sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The proteins were then blotted on a nitrocellulose membrane. The phosphorylated EGFR levels and total EGFR were further analyzed by immunoblotting as described in the Experimental section and the fluorescence signals were revealed by means of a Blot scanner. After 15 min of incubation with $\text{FON}_m\text{-EGF}$ nanoassemblies or EGF, we could clearly observe the phosphorylated EGFR form which does not yield significant signals for the untreated control cells (Ctl) and cells incubated with FONs (yellow arrows in Fig. 5a). The time evolution of the pEGFR band, relatively to the amount of EGF (Fig. 5b), is reported in Fig. 5c, after background correction. At 30 min incubation, the pEGFR band dramatically decreased and fully disappeared after 1 h incubation time. This result demonstrates the early phosphorylation of EGFR induced by EGF and $\text{FON}_m\text{-EGF}$ which vanishes within 30 min. These first experiments thus reveal the efficient binding of $\text{FON}_m\text{-EGF}$ to EGFR, albeit to a lesser extent than free EGF, as a result of the steric crowding effects

exerted by the nearby large FON surface. Similar observations were already noticed with EGF attached to smaller entities like cyanine dyes.⁴⁰

It is finally worth noting that no significant cytotoxicity was found following trypan blue cell viability assays under all experimental conditions ($\text{FON}_m\text{-EGF}$, EGF and FON) (Fig. S7 in the ESI†). This proves that EGFR activation in the nanomolar concentration does not induce severe apoptosis as already observed for HeLa cells below a certain threshold of activated receptors.^{39,41,42}

Super-resolution imaging of $\text{FON}_m\text{-EGF}$ clustering at the cell membrane

The spatial arrangement of $\text{FON}_m\text{-EGF}$ around the MDA-MB-468 cancer cells was further investigated using confocal fluorescence microscopy. Keeping the incubation time less than 1 h ensured us that FONs and $\text{FON}_m\text{-EGF}$ were little subjected to endocytosis. Previous experiments with various lines of cells indeed showed that 4 to 6 h were at least required to observe significant nanoparticle uptake, as a result of their negatively charged surface.⁴³ The cells, incubated as above, were washed twice with PBS to remove the nanoparticles in excess, and fixed using formaldehyde after nucleus staining with Hoechst, a DNA-specific dye emitting in the blue. For comparison purposes, the same protocol was applied to cells incubated with FONs or EGF only, serving as negative controls. Fluorescence of the FON core was detected above 600 nm, using a 488 nm excitation source while the nuclei were observed upon UV excitation. The most striking difference

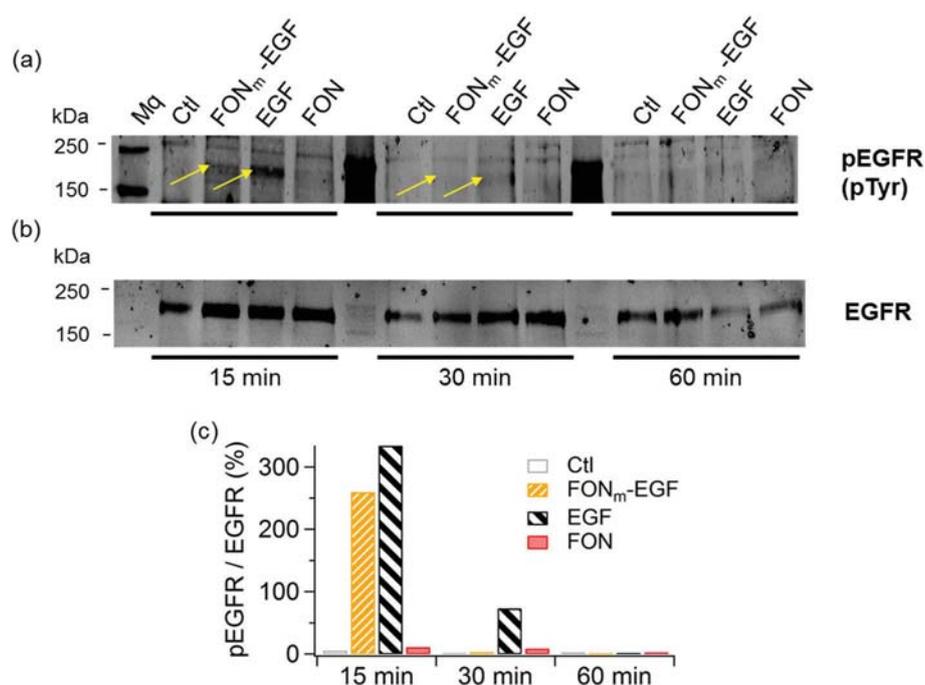


Fig. 5 EGFR phosphorylation in MDA-MB-468 cancer cells incubated with $\text{FON}_m\text{-EGF}$, EGF and FON for 15, 30 and 60 min. Protein extracts were analyzed by western blotting. Phosphorylated EGFR (pEGFR) and EGFR were detected using (a) the anti-phosphotyrosine antibody (pTyr), and (b) the anti-EGFR antibody, respectively. Yellow arrows denote pEGFR. (c) Ratio of the pEGFR signal to EGFR signal after background correction.

between cells treated with $\text{FON}_m\text{-EGFs}$ and cells treated with FONs was noticed for a 30 min incubation time (Fig. 6a and b). Whereas the latter displayed only very few red emitting dots, the former showed a high number of large bright dots, organized in a surprisingly asymmetric fashion around the cell membrane (inset Fig. 6b). No such observations could be obtained when using $\text{FON}_m\text{-EGF}$ solutions, stored more than one month in a freezer. Since EGF is known as a fragile protein, the lack of remaining nanoassemblies and agglomerates around the cells, complemented with the absence of detectable traces of p-EGFR, could simply be ascribed to the advanced loss of the conjugated EGF bioactivity.

For each large aggregate, zoom-in imaging revealed a diffuse red halo around the cells that is dimmer for cells displaying no large aggregate around. In order to gain insight into the nature of the aggregate, super-resolution imaging was performed using structured illumination microscopy (SIM). Well-resolved red-emitting spots were found locally concentrated close to the cell periphery (Fig. 6c). Plotting their fluorescence profile as a function of the distance gave emissive spots with full-width half-maximum of ~ 200 nm as exemplified in Fig. 6d, which could be ascribed to individual FONs. Such asymmetric accumulation recalls previous reports on wave-mediated sequestration of EGFR within cells expressing a high level of EGFR, as a result of a dynamic network of activated EGFR-containing tubules.⁴⁴ Since EGF is linked to large nanoparticles, migration of the EGF-EGFR complexes toward

the cell center may be partly impaired. Hence, $\text{FON}_m\text{-EGF}$ aggregated at the periphery membrane and formed bright spots, contrasting with the diffuse red signal inside the cytoplasm stemming from a minority of internalized $\text{FON}_m\text{-EGF}$. Nevertheless, local accumulation of $\text{FON}_m\text{-EGF}$ seems to promote a high concentration of activated EGFRs above a certain threshold, which in turn is able to induce the phosphorylation cascade as already demonstrated in earlier studies involving MCF7 cells and 800 nm-large latex beads conjugated to EGF.⁴¹ To our surprise, $\text{FON}_m\text{-EGF}$ could also be detected within the nucleus of cancer cells after a 1 h incubation time after reconstituting images from Z-stack acquisitions (Fig. 7a). Such localization is all the more astonishing since FONs have always been reported to remain in the cytoplasm or endosomes/lysosomes after engulfment.^{23,43} A plausible explanation for this unexpected finding could be related to the binding of trafficking proteins to the EGF-EGFR complex, that can transport the complex down to the nucleus.^{45,46} In this case, hardly 2% of the total activated EGFR were reported to translocate to the nucleus. Nevertheless, the large FON's size questions about a straightforward diffusion into the nucleus. Actually, FON's hydrodynamic diameter is around 200 nm large, which should preclude any direct penetration inside the nucleus through the 20 nm-wide pores. FON's fractioning due to partial dissembling of the constitutive units of the nanoassemblies could be envisaged. But *in vivo* studies have evidenced in the past strong cohesion of the fluorescent and

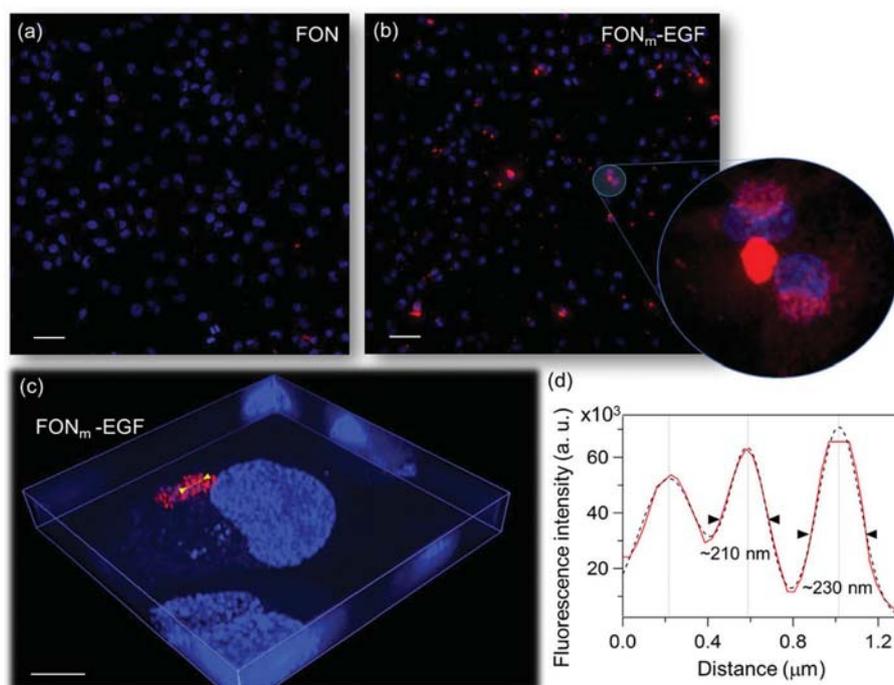


Fig. 6 Confocal fluorescence microscopy imaging of MDA-MB-468 cells incubated with (a) FON, and (b) $\text{FON}_m\text{-EGF}$ for 30 min ($\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 595/50$ nm), and zoom-in view. Scale bar: 50 μm . (c) Cluster resolution of MDA-MB-468 cells incubated with $\text{FON}_m\text{-EGF}$ using structured illumination microscopy ($\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 525/50$ nm). Scale bar: 10 μm . The blue and red emission colors correspond to nuclei stained with Hoechst, and the FON core respectively. (d) Fluorescence intensity profile between the yellow triangles indicated in Fig. 6c (red line) and the Gaussian fit of the detected peaks (dashed black line).

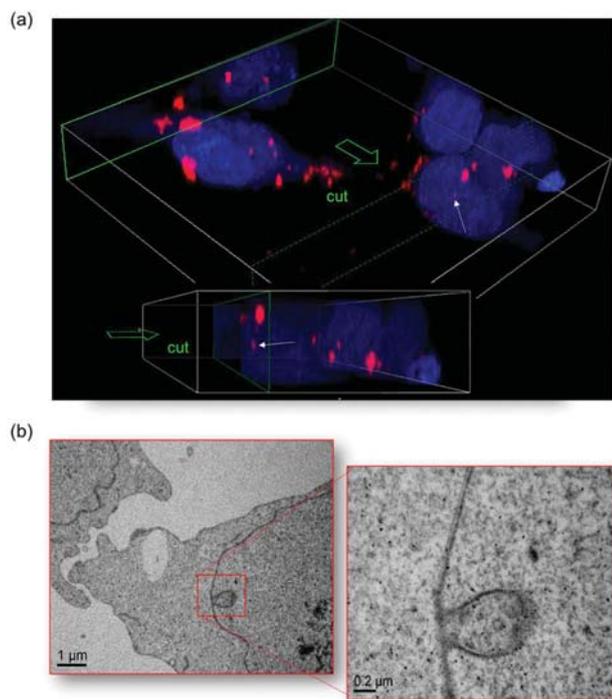


Fig. 7 (a) Z-Stack reconstitution of MDA-MB-468 incubated with $\text{FON}_m\text{-EGF}$ for 1 h using confocal fluorescence microscopy ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 595/50 \text{ nm}$). White arrows denote fluorescent spots inside the nucleus. (b) TEM imaging of MDA-MB-468 incubated with $\text{FON}_m\text{-EGF}$ for 1 h after EPON inclusion.

magnetic core, even after systemic injection.²⁴ Transmission electron microscopy (TEM) performed on MDA-MB-468 incubated with $\text{FON}_m\text{-EGF}$ revealed strong invagination of the nuclear envelope (Fig. 7b), recalling other observations performed on gold nanoparticles bioconjugated with aptamers, albeit displaying a much smaller size.⁴⁷

We thus suspect that large deformation of the nuclear membrane operates to entirely wrap the activated bioconjugated nanoassemblies and helps for their internalization into the nucleus. The large energy costs could be counterbalanced by the quite deformable FON's core that is based on a non-polymerized organic core. Elasticity of the latter was already shown in the past in magneto-fluorescent wires where embedded fluorescent organic nanospheres flattened under the pressure exerted by the surrounding aligned magnetic nanoparticles.⁴⁸ This result questions the nanoparticle's ability to reach a specific location in living cells as a result of its mechanical deformations whose investigations are beyond the scope of the current studies and will require thorough rheological studies at the nanoscale.

Conclusions

In conclusion, ultra-bright fluorescent nanoparticles have successfully been coupled with small proteins like EGF and their bioconjugation characterized for the first time by combining

immunofluorescence and dual-color fluorescence correlation spectroscopy. The latter technique revealed to be powerful to demonstrate tight coupling of the protein by following the time traces of both the FON core and a secondary fluorescent antibody. Given the quite diluted conditions, single nanoparticle tracking was therefore realized. Activation of EGF receptors with the anionically charged bioconjugated FON_m was clearly demonstrated with cancer cells overexpressing EGFR, leading to neat nanoparticle immobilization in less than 30 min and release of phosphorylated EGFR. To our great surprise, strong asymmetric clustering of nanoparticles was noticed at the plasma membrane, which opens perspectives of using bioconjugated-FONs to reveal with high contrast the presence of EGFR-overexpressing cancer cells. Localization of single nanoparticles could even be detected inside the nucleus, as a result of the sequestration of the pEGFR/ $\text{FON}_m\text{-EGF}$ complex. These unexpected observations question the underlying biological mechanisms related to the triggering role of large EGF-active nanoparticles. They will require further dynamic studies, using FCS in live cells,⁴⁹ to tackle specific staining of EGFR, caveolae⁵⁰ and endosomes involved in cell regulation and receptor internalization, down to the nucleus.

Materials and methods

Bioconjugation of FONs

FON-maleimide (FON_m). An aqueous solution of FONs (4 $\mu\text{mol Fe}$, 10 mL, pH = 7), prepared according to literature procedures,²⁴ was acidified until pH = 4 by adding a dilute nitric acid solution (0.06 mmol L^{-1}). *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) (4.2 mg, 40 μmol , 10 eq.) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) (3.6 mg, 40 μmol , 10 eq.) were then added to the dispersion and the resulting mixture was stirred for an extra 1 h using a vortex. The dispersion of activated FONs was alkalized by adding an ammonium hydroxide solution (1 mol L^{-1}) until reaching pH = 9. *N*-(2-Aminoethyl)maleimide trifluoroacetate salt (13.5 mg, 53 μmol , 13 eq.) was added to react with the activated ester units and the resulting dispersion was stirred for a further 16 h. The resulting translucent solution was dialyzed using a Spectra Por membrane (Standard Grade Regenerated Cellulose; cut-off: 8–10 kDa) against Millipore water (600 mL) over 12 h. The dispersion of functionalized FON_m nanoassemblies was stored at 4 °C overnight.

Bioconjugated $\text{FON}_m\text{-EGF}$. To a solution of EGF (400 μL , 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 6 kDa, 33 nmol) in Hank's Balanced Salt solution (HBSS) under nitrogen, dithiothreitol (DTT) (1.2 mg, 20 mmol L^{-1} in the final HBSS solution) was added to reduce the disulfide bonds into reactive thiol units. The reaction was allowed to stir for 45 min at room temperature under nitrogen. Purification of the activated protein was performed by dialysis using a Spectra Por membrane (Standard Grade Regenerated Cellulose; cut-off: 0.5–1 kDa) against HBSS buffer solution under nitrogen to remove the excess reducing agent. The solution of activated EGF (300 μL , 24.7 nmol) was added under

nitrogen to a previously deoxygenated solution of FON_m (5 mL). The solution was then allowed to stir for 1 h 30 at room temperature before purification by a dialysis procedure using a Spectra Por membrane (Standard Grade Regenerated Cellulose; cut-off: 100 kDa) against HBSS buffer to remove unreacted EGF. Finally, saturation of the non-reacted maleimide units was performed with DTT (10 mmol L⁻¹) for 10 min at room temperature and the solution was dialyzed at 4 °C using a Micro Float-A-Lyzer container from Spectrum company (Standard Grade Regenerated Cellulose; cut-off: 0.5–1 kDa). The solution of bioconjugated FON_m-EGF was frozen using liquid nitrogen and stored at -18 °C for a maximum of 1 month. For optimal results, since EGF is quite a fragile protein, all solutions should be used within one month after preparation, at the risk of facing complete loss of the conjugated EGF bioactivity.

Immunofluorescence validation of FON_m-EGF

FON_m-EGF-ABI-ABII* immunoconstruct. The bioconjugated FON_m-EGF nanoassemblies were magnetically decanted at 4 °C overnight using an Adem-Mag Modulo (Ademtech). They were further dispersed in HBSS (600 µL) containing 1% bovine serum albumin (BSA). A first incubation was performed with a primary antibody (rabbit polyclonal anti-EGF, Abcam, 1 mg mL⁻¹, 1 µL) (ABI). The solution was allowed to stir for 1 h at 4 °C. Three cycles of magnetic decantation and re-dispersion in HBSS buffer with 1% BSA were performed to remove the antibody in excess. A second incubation was performed with a fluorescent secondary antibody (goat anti-rabbit (GAR) polyclonal IgG (H + L), Alexa Fluor® 405 conjugate (ABII*) (Abcam, 2 µg mL⁻¹, 1 µL)). The solution was again stirred for a further 1 h at 4 °C and subjected to three cycles of magnetic decantation and re-dispersion in HBSS buffer with 1% BSA to remove the secondary antibody in excess. A first negative control (CT1) was prepared by mixing the primary and secondary antibodies (ABI-ABII*) and a second negative control (CT2) was prepared by adding the secondary antibody directly to the FON_m-EGF solution (FON_m-EGF/ABII*) to take into account nonspecific adsorption in the absence of primary antibodies. Purification of the latter negative control was performed following the dialysis procedure reported above.

Quantification of the number of conjugated EGF proteins per FON_m. By measuring the emission intensity at 430 nm of both a reference solution of ABII* with a known concentration in the µg mL⁻¹ range (I_{ref}) and the FON_m-EGF-ABI-ABII* solution (I_s) and determining the absorbance at 401 nm for the reference solution (A_{sref}) that corresponds to the maximum absorption wavelength of Alexa Fluor® 405 ($\epsilon_{\text{max}} = 34\,600 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) grafted to ABII, one could infer the concentration of dyes c_s in the sample solution measured in a 1 cm-long quartz cuvette ($c_s = I_s/I_{\text{ref}} \times A_{\text{sref}}/\epsilon_{\text{max}}$). Knowing that 2 dyes are conjugated to one ABII and assuming quantitative binding between EGF and ABI, as well as ABI and ABII*, the concentration of EGF (c_{EGF}) becomes simply $c_{\text{EGF}} = c_{\text{sref}}/2$. In our case, the EGF concentration was found in the nanomolar range, namely $c_{\text{EGF}} \approx 1.1 \text{ nmol L}^{-1}$. Given the number of FONs

of about 1.3×10^{11} per mL, as estimated from previous correlated titrations (inductively coupled plasma – atomic emission spectroscopy for iron and absorbance for the organic core of the magnetofluorescent nanoassemblies),^{2,3} the number of grafted EGF proteins per FON core could be assessed to be 4.7 on average.

Cell culture and incubation

MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132TM) cells were grown in RPMI media (Gibco, Life Technologies) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) and penicillin–streptomycin at a final concentration of 0.1 mg mL⁻¹, all from Gibco company. The cells were trypsinized and seeded for 24 h in Ibidi 8-well plates, at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere. The experiments for phosphorylated EGFR expression and bioimaging were performed each in duplicate. The culture medium was replaced with freshly prepared complete cell culture medium (200 µL). Two aliquots of FON_m-EGF solution (100 µL each) were thawed and added to 1200 µL of complete cell culture medium to reach a final volume of 1400 µL. Three wells of the culture plate were added each with the newly prepared FON_m-EGF solution (150 µL) so as to analyze the cell response after a 15, 30 and 60 min incubation time, and the plates were gently stirred to homogenize the mixture before incubation. The same procedure was reproduced for a solution of FONs and EGF. A lyophilized FON solution (2 mL before lyophilization) was reconstituted in HBSS (1 µL) and a 120 µL volume of this solution was added to 1280 µL of complete culture medium to reach a final volume of 1400 µL. 150 µL of the resulting solutions were added to three novel wells. A 50 mL aliquot of EGF solution, reconstituted in HBSS (1 mg mL⁻¹) and frozen at -20 °C, was thawed and sequentially diluted to 1/10⁵ to reach a final concentration of 10 ng mL⁻¹, in the same range as that for the bioconjugated FON_m-EGF solution. A 120 µL volume of this diluted solution is added to 1280 µL of complete culture medium to reach a final volume of 1400 µL, and 150 µL of the resulting solutions were added to three novel wells.

Western blotting analysis

Cell lysis and protein resolution. MDA MB-468 cells were treated with FON_m-EGF, FONs, and EGF for 15, 30 and 60 min. They were subsequently rinsed with saline buffer and incubated with the lysis buffer (100 mmol L⁻¹ potassium phosphate (pH 7.8) and 0.2% (v/v) Triton X-100 supplemented with protease and phosphatase inhibitors) on ice for 15 min. They were then collected and detached by gentle scraping. The lysate solutions were stored in 1.5 mL microcentrifuge tubes at 4 °C and subjected to ultrasounds (Fisher Scientific, CL 18 model) for 15 s (1 s-long pulse with a 1 s-delay between two successive pulses). After centrifugation at 14 000 rpm for 10 min at 4 °C, 50 µL of the supernatant were withdrawn and stored at 4 °C. An equal volume 2× Laemmli sample buffer (0.125 mol L⁻¹ Tris-HCl buffer at pH 6.8 containing 4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue) was added to the supernatant. The protein samples were

separated by electrophoresis on an 8% SDS-PAGE gel and blotted onto a nitrocellulose membrane.

Immunofluorescence staining and revelation. The nitrocellulose membrane was immersed in blocking buffer (0.05% (v/v) Tween-20 in Tris phosphate-buffered saline (TPBS) containing 5% (v/v) bovine serum albumin (BSA)) for 30 min with gentle agitation. A blocking solution containing two primary antibodies, rabbit anti-phosphoTyrosine EGFR (purchased from Cell Signaling Technology) and mouse anti-EGFR (purchased from Thermo Scientific) diluted to 1 : 1000 was added to the membrane which was incubated overnight at 4 °C. The membrane was washed three times for 10 min with TPBS buffer, and further incubated with secondary antibodies (goat anti-rabbit conjugated to AlexaFluor780 and goat anti-mouse conjugated to AlexaFluor680 diluted to 1 : 10 000 in blocking buffer) for 30 min at RT. The membrane was washed three times for 10 min with TPBS buffer. The protein bands were resolved by recording the fluorescence signals at 700 and 800 nm with an Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biosciences).

Cell viability assay. A 96-well plate was seeded with MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132TM), subsequently grown for 24 h, at 37 °C, under a 5% CO₂ atmosphere in the culture medium (100 µL), made of RPMI media (Gibco, Life Technologies), 1% (v/v) penicillin–streptomycin and enriched with 10% FBS. Each experiment was conducted in duplicate and involved the separate addition of FON_m-EGF, EGF and FON nanoassemblies following the same concentrations as those used for conducting the phosphorylation activation. The cells were incubated for 1 h, 4 h and 24 h, at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere. For each time, the cells were rinsed with PBS (100 µL) once and trypsinized with 50 µL. After 5 min of incubation, a 50 µL volume of complete culture medium was added to each well. After homogenization, a 25 µL sample was retrieved from each well and mixed with 25 µL of 0.4% trypan blue solution (Aldrich – solution prepared in 0.81% sodium chloride and 0.06% potassium phosphate, dibasic). Two-chamber cell counting slides (Bio-Rad) were loaded with the trypan blue solution and readily counted with an automatic cell counter (Bio-Rad, TC20 model) to limit cell degradation.

Steady-state and time-resolved fluorescence measurements

Steady-state fluorescence measurements. UV-visible absorption spectra were recorded using a Varian Model Cary 5E spectrophotometer equipped with an integrating sphere DRA 2500. A Fluorolog 2 spectrofluorimeter was used (Jobin-Yvon/Horiba). Correction for the emission spectra with regard to the spectral response of the detector was automatically applied. Fluorescence quantum yields were determined in solution, referred to as coumarin 540 A in EtOH ($\Phi_f = 0.38$).⁵¹ FTIR spectra were recorded on solid samples dispersed in a KBr matrix using an infrared Bruker Tensor 27 spectrometer.

Time-resolved fluorescence measurements. Fluorescence time decays were measured in water or HBSS using the fully automated spectrofluorimeter (model Fluotime 300, PicoQuant) following the time-correlated photon counting method. Excitation was performed using a pulsed laser diode

(LDH-D-C-450B) working at 450 ± 10 nm with a 70 ps full width at half maximum, or a pulsed LED (PLS 340) working at $340 \text{ nm} \pm 10$ nm with a 500 ps full width at half maximum. Fluorescence decays were recorded using a Hybrid-PMT detector combined with an acquisition temporal resolution up to 25 ps. Long-pass edged filters purchased from Semrock centered at 473 nm (BPL01-473R-25) or 355 nm (BPL01-355R-25) were used to discard any possible contribution of excitation light scattering by the nanoassembly solutions.

Nanoparticle structural characterization

The hydrodynamic diameter and size dispersion of FON, FON_m and their bioconjugated forms were determined by dynamic light scattering (DLS) by means of a nanoparticle size analyzer Cordouan (Vasco 3) equipped with a 40 mW diode laser operating at 658 nm. Measurements were collected in a backscattering mode at an angle of 135°. Measurements were carried out at 25 °C on aqueous solutions of NPs. For each sample, intensity measurements were carried out in multi-acquisition mode implying automatically adjusted correlograms, and averaged measurements on 6 acquisitions. Nanoparticle mean sizes and distribution widths were obtained by fitting each correlogram with a Cumulants algorithm. Measurements of the surface potential ζ were carried out by means of a Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern). The samples were placed in quartz cells. Several measurements were realized for each sample according to a predefined operating procedure.

Transmission electron microscopy (TEM)

TEM was performed using two distinct instruments Hitachi HF2000-FEG (100 kV) or MO-Jeol 123S0 (80 kV). Solutions of nanoassemblies were deposited onto holey carbon-coated copper grids (300 meshes) for all compounds. The average diameter D_{TEM} was determined using Gaussian distributions after statistical counting of more than 150 nanoassemblies.

Confocal fluorescence microscopy

Confocal fluorescence imaging was performed using a Nikon A1R Si microscope, equipped with an Ar⁺ laser as an excitation source, an oil-immersion objective ($\times 60$, NA 1.4, Plan Apo).

Super-resolution microscopy

Super Resolution Structured Illumination Microscopy was performed using a Nikon N-SIM microscope, with the dedicated oil immersion objective ($\times 100$, NA 1.49 Plan Apo). Three dimensional optical sectioning was performed respecting Nyquist sampling rate (15 cycles of structure illumination per plane per channel, Z step at 0.12 nm), and super resolution image reconstruction was performed using Nikon Imaging Software algorithms. All cell samples were fixed using formaldehyde (3.7% in PBS) for 15 min at room temperature, and their nuclei were stained with Hoechst, a blue emitting staining agent ($\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm, $\lambda_{\text{exc}} = 460$ nm). Mounting was performed using Prolong® anti-fade diamond medium (ThermoFisher – Life Technologies).

Fluorescence correlation spectroscopy

Fluorescence correlation spectroscopy was performed using a time-correlated single-photon counting (TCSPC) confocal microscope Leica SP8 (Manheim, Germany). This microscope was equipped with a single molecule detection (SMD) module based on Picoquant hardware (Berlin, Germany). Fluorescence excitation was realized with a 405 nm continuous laser through a water objective with a high-numerical aperture objective ($\times 63$, NA 1.2) mounted on an inverted microscope (Leica DMI 6000 CS). The fluorescence emission after passing through a pinhole set at 1 Airy unit was directed to the external port connected to a two-color coupling module with a 505 nm dichroic mirror splitting the fluorescence in two channels equipped with 435/20 nm and 617/34 nm bandpass filters respectively. Two optical fibers were used to couple two single-photon avalanche diode (SPAD) detectors, and associated with a photon counting detector module (MPD from PDM) for the blue channel and a red sensitive SPAD (TauSPAD from Picoquant) for the red channel, which allows for single photon counting.

The autocorrelation curves $G(\tau)$ were obtained from the fluorescence intensity time trace $I(t)$ as follows (eqn (1)).

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t+\tau)I(t) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} - 1 \quad (1)$$

where τ denotes the lag time and $\langle I(t) \rangle$ the time average intensity.

The autocorrelation function was fitted using eqn (2).

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \frac{1}{\sqrt{\left(1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_D}\right)}} \quad (2)$$

with $\langle N \rangle$ denoting the average number of fluorescent units in the confocal volume, r_0 and z_0 the radial and axial dimensions of the observation volume, respectively, determined from calibration experiments.

The resulting fit gave access to the hydrodynamic diffusional correlation time, τ_D , and thereby to the diffusion coefficient D (eqn (3)).

$$D = \frac{r_0^2}{4\tau_D} \quad (3)$$

The hydrodynamic diameter D_{FCS} was eventually inferred from the Stokes–Einstein equation (eqn (4)).

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (4)$$

where $R_H = D_{\text{FCS}}/2$ is the hydrodynamic radius, k_B is the Boltzmann constant, T is the solution temperature and η is the dynamic viscosity of water considered as equal to that of the sample solution.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

Ouest Valorisation SATT is deeply acknowledged for its funding regarding the NABIDI project, the University of Nantes for its funding of the NDC and NANOTRIF projects in the framework of the Interdisciplinarity project call 2014 and 2017, and finally the Région Pays de la Loire through the RFI LUMOMAT programme funding the ONASSIS project. We deeply acknowledge Carole La (LPGN, UMR CNRS 6112 – University of Nantes) for ICP-OES iron titrations, Brigitte Bouchet for access to the INRA Nantes-Angers TEM platform, Thierry Guizouarn (ISCR, UMR CNRS 6226 – University of Rennes), and Brenda Guillet for joining the group for her master internship and her kind experimental help. The Nikon Excellence Center of Nantes (CENN)-MicroPICell and IBISA-Microscopy Rennes Imaging Center (MRIc) are acknowledged for providing easy access to high-performing imaging microscopy facilities. We are deeply grateful to Ouest Valorisation SATT for its funding and especially Franck Merly from Ouest Valorisation SATT for his precious scientific advice.

Notes and references

- 1 A. Sangtani, O. K. Nag, L. D. Field, J. C. Breger and J. B. Delehanty, *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2017, **9**, e1466.
- 2 X. Y. Chen, S. S. Gambhir and J. Cheon, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 841–841.
- 3 R. Duncan and R. Gaspar, *Mol. Pharmaceutics*, 2011, **8**, 2101–2141.
- 4 S. Sengupta and A. Kulkarni, *ACS Nano*, 2013, **7**, 2878–2882.
- 5 A. Albanese, P. S. Tang and W. C. W. Chan, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2012, **14**, 1–16.
- 6 K. K. Ng and G. Zheng, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 11012–11042.
- 7 J. Schill, A. Schenning and L. Brunsveld, *Macromol. Rapid Commun.*, 2015, **36**, 1306–1321.
- 8 J. Mei, N. L. C. Leung, R. T. K. Kwok, J. W. Y. Lam and B. Z. Tang, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 11718–11940.
- 9 A. Faucon, H. Benhelli-Mokrani, L. A. Córdova, B. Brulin, D. Heymann, P. Hulin, S. Nedellec and E. Ishow, *Adv. Healthcare Mater.*, 2015, **4**, 2727–2734.
- 10 E. R. Reddy, S. Yellanki, R. Medishetty, L. Konada, N. P. Alamuru, D. Haldar, K. V. L. Parsa, P. Kulkarni and M. Rajadurai, *ChemNanoMat*, 2015, **1**, 567–576.
- 11 O. S. Wolfbeis, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 4743–4768.
- 12 D.-E. Lee, H. Koo, I.-C. Sun, J. H. Ryu, K. Kim and I. C. Kwon, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 2656–2672.
- 13 S. Fery-Forgues, *Nanoscale*, 2013, **51**, 8428–8437.
- 14 J. Zhang, R. Chen, Z. Zhu, C. Adachi, X. Zhang and C.-S. Lee, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, **7**, 26266–26274.
- 15 E. Ishow, A. Brosseau, G. Clavier, K. Nakatani, P. Tauc, C. Fiorini-Debuisschert, S. Neveu, O. Sandre and A. Leautic, *Chem. Mater.*, 2008, **20**, 6597–6599.

- 16 C. Wu and D. T. Chiu, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52**, 3086–3109.
- 17 D. Radenkovic, H. Kobayashi, E. Ramsey-Semmelweis and A. M. Seifalian, *Nanomedicine*, 2016, **12**, 1581–1592.
- 18 M. Gao, H. F. Su, G. W. Lin, S. W. Li, X. S. Yu, A. J. Qin, Z. J. Zhao, Z. F. Zhang and B. Z. Tang, *Nanoscale*, 2016, **8**, 15027–15032.
- 19 C. Wu, T. Schneider, M. Zeigler, J. Yu, P. G. Schiro, D. R. Burnham, J. D. McNeill and D. T. Chiu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 15410–15417.
- 20 C. S. Almeida, I. K. Herrmann, P. D. Howes and M. M. Stevens, *Chem. Mater.*, 2015, **27**, 6879–6889.
- 21 C. Yang, H. Liu, Y. Zhang, Z. Xu, X. Wang, B. Cao and M. Wang, *Biomacromolecules*, 2016, **17**, 1673–1683.
- 22 M. Breton, G. Prevel, J. F. Audibert, R. Pansu, P. Tauc, B. Le Pioufle, O. Francais, J. Fresnais, J. F. Berret and E. Ishow, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 13268–13276.
- 23 A. Faucon, H. Benhelli-Mokran, F. Fleury, L. Dubreil, P. Hulin, S. Nedellec, T. Doussineau, R. Antoine, T. Orlando, A. Lascialfari, J. Fresnais, L. Lartigue and E. Ishow, *J. Colloid Interface Sci.*, 2016, **479**, 139–149.
- 24 A. Faucon, T. Maldiney, O. Clément, P. Hulin, S. Nedellec, M. Robard, N. Gautier, E. De Meulenaere, K. Clays, T. Orlando, A. Lascialfari, C. Fiorini-Debuisschert, J. Fresnais and E. Ishow, *J. Mater. Chem. B*, 2014, **2**, 7747–7755.
- 25 R. N. Jorissen, F. Walker, N. Pouliot, T. P. J. Garrett, C. W. Ward and A. W. Burgess, *Exp. Cell. Res.*, 2003, **284**, 31–53.
- 26 K. E. Sapsford, W. R. Algar, L. Berti, K. B. Gemmill, B. J. Casey, E. Oh, M. H. Stewart and I. L. Medintz, *Chem. Rev.*, 2013, **113**, 1904–2074.
- 27 P. Diagaradjane, J. M. Orenstein-Cardona, N. E. Colon-Casasnovas, A. Deorukhkar, S. Shentu, N. Kuno, D. L. Schwartz, J. G. Gelovani and S. Krishnan, *Clin. Cancer Res.*, 2008, **14**, 731–741.
- 28 A. Faucon, J. Fresnais, A. Brosseau, P. Hulin, S. Nedellec, J. Hemez and E. Ishow, *J. Mater. Chem. C*, 2013, **1**, 3879–3886.
- 29 T. Matsumoto, Y. Urano, T. Shoda, H. Kojima and T. Nagano, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 3375–3377.
- 30 M. Sauer, J. Hofkens and J. Enderlein, *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From Ensemble to Single Molecules*. Wiley-VCH, Weinheim, 2011.
- 31 S. T. Hess, S. H. Huang, A. A. Heikal and W. W. Webb, *Biochemistry*, 2002, **41**, 697–705.
- 32 L. Shang and G. U. Nienhaus, *Acc. Chem. Res.*, 2017, **50**, 387–395.
- 33 S. Padilla-Parra, N. Auduge, M. Coppey-Moisan and M. Tramier, *Microsc. Res. Tech.*, 2011, **74**, 788–793.
- 34 B. Valeur and M. N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley, VCH Verlag, Weinheim, 2nd edn, 2012, p. 592.
- 35 S. Bidault, A. Devilez, V. Maillard, L. Lermusiaux, J.-M. Guigner, N. Bonod and J. Wenger, *ACS Nano*, 2016, **10**, 4806–4815.
- 36 R. Cailleau, M. Olivé and Q. V. Cruciger, *In Vitro*, 1978, 911–915.
- 37 J. Filmus, M. N. Pollak, R. Cailleau and R. N. Buick, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985, **128**, 898–905.
- 38 P. Winckler, L. Lartigue, G. Giannone, F. De Giorgi, F. Ichas, J. B. Sibarita, B. Lounis and L. Cognet, *Sci. Rep.*, 2013, **3**, 2387.
- 39 J. S. Rush, L. M. Quinalty, L. Engelman, D. M. Sherry and B. P. Ceresa, *J. Biol. Chem.*, 2012, **287**, 712–722.
- 40 J. H. Ryu, M. Shin, S. A. Kim, S. Lee, H. Kim, H. Koo, B. S. Kim, H. K. Song, S. H. Kim, K. Choi, I. C. Kwon, H. Jeon and K. Kim, *Biomaterials*, 2013, **34**, 9149–9159.
- 41 A. R. Reynolds, C. Tischer, P. J. Verveer, O. Rocks and P. I. H. Bastiaens, *Nat. Cell Biol.*, 2003, **5**, 447–453.
- 42 L. Wu, F. Xu and B. M. Reinhard, *Nanoscale*, 2016, **8**, 13755–13768.
- 43 C. Linot, J. Poly, J. Boucard, D. Pouliquen, S. Nedellec, P. Hulin, N. Marec, P. Arosio, A. Lascialfari, A. Guerrini, C. Sangregorio, M. Lecouvey, L. Lartigue, C. Blanquart and E. Ishow, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, **9**, 14242–14257.
- 44 J. D. Orth, E. W. Krueger, S. G. Weller and M. A. McNiven, *Cancer Res.*, 2006, **66**, 3603–3610.
- 45 Y. Yuan, S. Chen, T. Paunesku, S. C. Gleber, W. C. Liu, C. B. Doty, R. Mak, J. J. Deng, Q. L. Jin, B. Lai, K. Brister, C. Flachenecker, C. Jacobsen, S. Vogt and G. E. Woloschak, *ACS Nano*, 2013, **7**, 10502–10517.
- 46 A. Benmerah, *Curr. Biol.*, 2004, **14**, R314–R316.
- 47 D. H. M. Dam, J. H. Lee, P. N. Sisco, D. T. Co, M. Zhang, M. R. Wasielewski and T. W. Odom, *ACS Nano*, 2012, **6**, 3318–3326.
- 48 J. Fresnais, E. Ishow, O. Sandre and J. F. Berret, *Small*, 2009, **5**, 2533–2536.
- 49 K. Bacia, S. A. Kim and P. Schwille, *Nat. Methods*, 2006, **3**, 83–89.
- 50 C. Mineo, G. N. Gill and R. G. W. Anderson, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 30636–30643.
- 51 L. Reynolds, J. A. Gardecki, S. J. V. Frankland, M. L. Horng and M. Maroncelli, *J. Phys. Chem. C*, 1996, **100**, 10337–10354.

Small Molecule-Based Fluorescent Organic Nanoassemblies with Strong Hydrogen Bonding Networks for Fine Tuning and Monitoring Drug Delivery in Cancer Cells

Joanna Boucard, Camille Linot, Thibaut Blondy, Steven Nedellec, Philippe Hulin, Christophe Blanquart,* Lénaïc Lartigue, and Eléna Ishow*

Bright supramolecular fluorescent organic nanoassemblies (FONs), based on strongly polar red-emissive benzothiadiazole fluorophores containing acidic units, are fabricated to serve as theranostic tools with large colloidal stability in the absence of a polymer or surfactant. High architectural cohesion is ensured by the multiple hydrogen-bonding networks, reinforced by the dipolar and hydrophobic interactions developed between the dyes. Such interactions are harnessed to ensure high payload encapsulation and efficient trapping of hydrophobic and hydrogen-bonding drugs like doxorubicin, as shown by steady state and time-resolved measurements. Fine tuning of the drug release in cancer cells is achieved by adjusting the structure and combination of the fluorophore acidic units. Notably delayed drug delivery is observed by confocal microscopy compared to the entrance of hydrosoluble doxorubicin, demonstrating the absence of undesirable burst release outside the cells by using FONs. Since FON-constituting fluorophores exhibit a large emission shift from red to green when dissociating in contact with the lipid cellular content, drug delivery could advantageously be followed by dual-color spectral detection, independently of the drug staining potentiality.

This dual imperative requires the combination of drugs with signaling units that can now be smartly addressed by using well-designed functional nanomaterials, commonly referred as to nanometric drug delivery systems (DDS).^[1] NanoDDS actually offer the great advantage of preferential accumulation in cancerous tissues due to passive enhanced and permeation retention effect,^[2] while their nanometer size allows for large surface-to-volume ratio interactions, and simultaneous assembling of various functional compounds within a single object.^[3] Using fluorescent probes as drug tracers has appeared as the most attractive approach for the very high sensitivity of photodetectors and its easy implementation to carry out mandatory pharmacokinetics and cellular investigations, prior to any small-animal and clinical trials.^[4] To reach this goal, most of the engineered emissive nanoDDS incorporate the fluorescent labels and drugs

mixed together in liposomes,^[5] polymeric vesicles,^[6] micelles,^[7] or capsules,^[8] and dendrimers^[9] by taking advantage of electrostatic or van der Waals interactions between the active guests and host matrices.^[10] Since 60% of the active drugs display low water solubility, their encapsulation requires carefully engineered amphiphilic matrices to achieve good vectorization and limit drug agglomeration in physiological media.^[11] This increases the level of synthetic complexity or compels to tedious covalent binding between the matrix and the tracers or drugs whose activation or release requires further adequate stimuli.^[12] In order to considerably simplify the amount of constituents and avoid dye and drug leakage in water, self-assemblies of small hydrophobic molecules have recently appeared as very attractive alternatives.^[13] They are expected to dissociate into individual components only in contact with the cellular lipid constituents, which limits undesirable burst release in the blood stream. Moreover, compared to polymeric matrices, they offer the superior advantage of little local viscosity increase that occurs by progressive erosion of polymers, impairing drug diffusion into the diseased tissues.^[14] Finally, they exhibit larger drug payloads and minimized drug partition thanks to a higher mixing entropy stemming from their small molecule-based composition.^[15] One particularly promising class of molecular

1. Introduction

Controlling and monitoring drug delivery constitute high medical challenges to avoid harmful side effects and enhance the efficiency of treatments. In this way, unprecedented levels of therapeutic safety and personalized medicine will be achieved.

J. Boucard, Dr. L. Lartigue, Prof. E. Ishow
CEISAM-UMR CNRS 6230
Université de Nantes
2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes, France
E-mail: elena.ishow@univ-nantes.fr

Dr. C. Linot, T. Blondy, Dr. C. Blanquart
CRCINA INSERM
INSERM U1232

Université de Nantes, Université d'Angers
8 quai Moncoussu, 44007 Nantes, France
E-mail: christophe.blanquart@inserm.fr

Dr. S. Nedellec, Dr. P. Hulin
INSERM Nantes UMS 016-UMS CNRS 3556
8 quai Moncoussu, 44007 Nantes, France

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/smll.201802307>.

DOI: 10.1002/smll.201802307

nanoassemblies relies on fluorescent organic nanoparticles (FONs) that have recently emerged for less than a decade and are fabricated out of small π -conjugated fluorophores.^[16] The latter are merely self-assembled into bright FONs through a straightforward solvent-shift nanoprecipitation process consisting in the quick addition of a concentrated organic stock solution into a large volume of water. Stable colloidal suspensions are obtained without requiring additional surfactants, so that FONs have proved remarkable for live cell imaging,^[17] near-infrared cell tracking,^[18] metal cation sensors,^[19] and more recently super-resolution fluorescence microscopy upon photo-switching.^[20] They nowadays fiercely compete with quantum dots in terms of emission versatility, brightness efficiency, and biocompatibility thanks to the absence of heavy metals, and their large amount of self-assembled dyes up to $\approx 10^4$ – 10^5 depending on the size. Curiously, FONs have scarcely been harnessed to entrap molecular hydrophobic drugs despite their apparent structural match and the simplicity of the nanoprecipitation process. In this respect, only two examples have been reported in the literature and involved for both of them covalently linked fluorophores and dyes.^[21] The first example regarded tetraphenylethylene-based fluorophores bound to doxorubicin,^[22] a well-known hydrophobic anticancer drug, whose ulterior photodecaging required blue light. In addition, since full emission quenching was observed upon fluorescence resonance energy transfer, FON internalization could not be followed. Drug release was signaled through blue emission recovery of the disconnected fluorophores, which unavoidably yields large tissue autofluorescence due to the high excitation energy. Similar limitations were also noticed with perylene derivatives transformed as chlorambucil prodrugs that recovered blue emission after bond breaking at low pH.^[21a] These rare examples show that the design of FONs, amenable to develop strong association with hydrophobic and neutral pharmaceuticals without resorting to covalent linkage, has not been explored yet, and will represent a very attractive and versatile approach to offer theranostic nanomedicines with minimized amount of excipients or stabilizing agents. In addition, targeting drug release upon FON dissociation, characterized by a change of emission color in the red/green spectral region more compatible with the first biological transparency window and higher spectral detection sensitivity, will offer the great twofold advantage of a monitoring independent on the drug electronic nature and a large emission contrast. As numerous drugs contain protic units (amino, carboxylic, or phosphonic), strong networks of intermolecular hydrogen-bonds^[23] are expected to strongly enhance the cohesion between the dyes and the drugs confined within the nanoassemblies, thereby contributing to reinforce the already existing noncovalent van der Waals interactions.^[24] With this strategy in mind, we want to show herein that smart FONs made of solvatochromic fluorophores, endowed with acidic units (carboxylic, phosphonic), will represent a novel design to generate nanoDDS with dual capability of high drug encapsulation and two-color drug release monitoring. To our knowledge, generating FONs displaying acidic units to encapsulate hydrophobic and protic pharmaceuticals, which requests subtle structural hydrophobic–hydrophilic balance to ensure FON formation, has surprisingly never been explored so far. In order to demonstrate the applicability of this

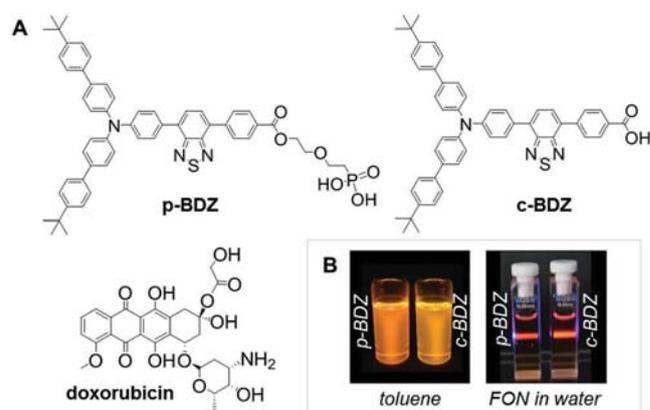


Figure 1. A) Structures of p-BDZ, c-BDZ as FON units and doxorubicin. B) p-BDZ and c-BDZ in toluene ($\lambda_{\text{exc}} = 365$ nm) and as FONs in water ($\lambda_{\text{exc}} = 450$ nm).

novel approach, we took as a hydrogen-bonding drug model the archetypal amino-containing and anthracycline anticancerous doxorubicin, often used as liposomal formulation,^[21b] and studied its release in water and in cellulose by using confocal microscopy as well as steady-state and time-resolved fluorescence measurements.

2. Results and Discussion

2.1. Design and Structural Comparative Character of Hydrogen-Bonding x-BDZ FONs

Two strongly polar and red-emissive fluorescent dyes, differing by the strength of their acidic units, have been devised. They incorporate a benzothiadiazole (BDZ) unit, known for its high photostability and fluorescence efficiency (Figure 1),^[25] and imparting large charge transfer when combined to electron-withdrawing groups.^[26]

Their structure contains additional bulky groups to prevent strong aggregation and emission quenching after self-assembling as FONs.^[27] No crystalline structure is indeed formed, as revealed by thermal analyses using differential scanning calorimetry showing glass transition temperatures T_g at 145 and 173 °C for p-BDZ and c-BDZ, respectively (Figure S1, Supporting Information). Such amorphous behavior advantageously limits segregation and expulsion risks in case of drug doping, which can operate in solid lipid nanocarriers in the absence of emulsifiers due to undesirable recrystallization at biological temperatures.^[28] We finally targeted the phosphonic and carboxylic acids as acidic units, since they are the most commonly encountered organic acids, provide stable compounds, and display substantial distinct acidobasicity constants that can impact the nanoDDS cohesion. After a six to eight-step synthetic procedure (Scheme S1 of the Supporting Information for synthetic details), the phosphonic (p-BDZ) and carboxylic (c-BDZ) derivatives were obtained as bright red powders that were readily soluble in almost all solvents, except cyclohexane and alcoholic solvents to a lesser extent. Both compounds p-BDZ and c-BDZ, generically noted x-BDZ in the following, display significantly higher T_g values (146 and 173 °C, respectively) than that of their

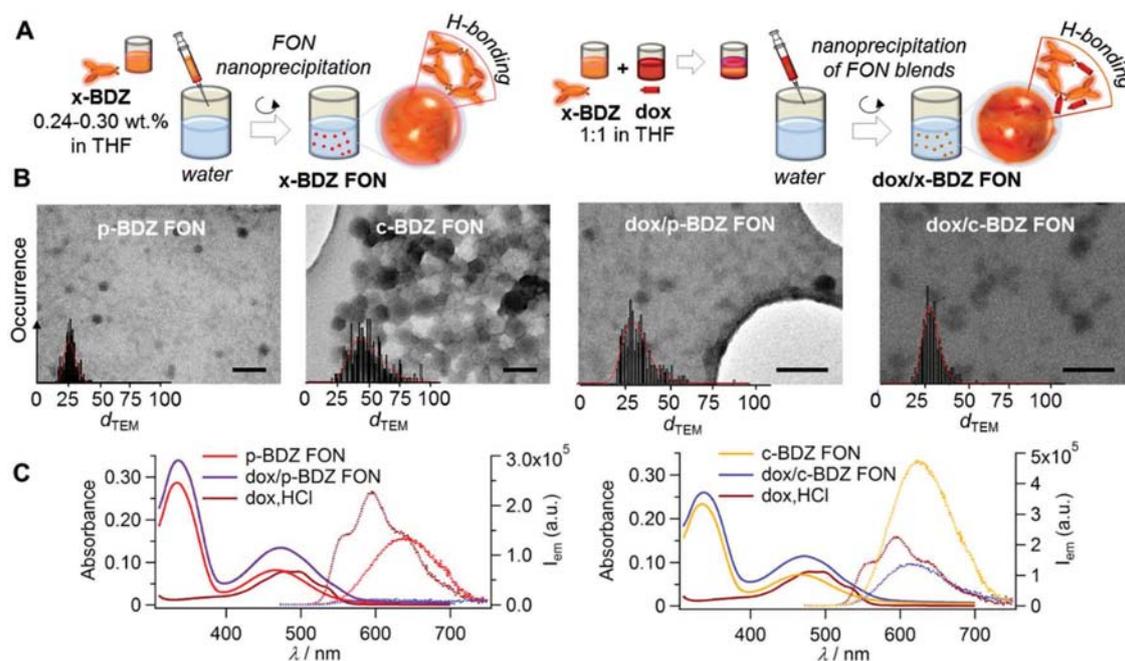


Figure 2. A) Schematic description of the nanoprecipitation method to fabricate pristine FON and FON blends out of stock solutions in THF (50 μL) added to a large amount of water (2.5 mL). B) TEM imaging of pristine and dox-doped **x-BDZ** FONs (scale bar: 50 nm). C) UV-vis absorption and emission spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 465 \text{ nm}$) of **p-BDZ** and **c-BDZ** FONs, dox-doped **p-BDZ** and **c-BDZ** FONs and dox.HCl in water.

benzaldehyde precursor ($T_g = 96 \text{ }^\circ\text{C}$), devoid of protic units, which already show the strong interactions developed between the acidic units upon hydrogen-bonding.

Nanoprecipitation in a large volume of water from a 1.45 mmol L^{-1} tetrahydrofuran (THF) solution yielded spherical FONs that could clearly be characterized by transmission electron microscopy (TEM) without additional staining (Figure 2A). The aromatic backbones thus efficiently counterbalanced the protic character of the acidic units and ethylenoxy chains, leading to water-insoluble nanomaterials.

Interestingly, their TEM diameters d_{TEM} were found systematically larger for **c-BDZ** ($44 \pm 3 \text{ nm}$) than for **p-BDZ** ($24 \pm 2 \text{ nm}$) (Figure 2B). Such differences have been ascribed to the higher first acidity for $-\text{PO}_3\text{H}_2$ ($\text{p}K_{\text{a}1} = 1.1\text{--}2.3$)^[29] than for $-\text{CO}_2\text{H}$ ($\text{p}K_{\text{a}} = 3.2\text{--}4.2$)^[29a] units. Since FONs are here formed after a nucleation-aggregation process given the respective amounts of solvents used, the lower the solute concentration, the larger the FON final size. Hence, ionized or strong hydrogen-bonding dyes tend to generate smaller FONs, as noticed for **p-BDZ** or already reported urea dyes.^[30]

In the prospect of biological studies, colloidal stability was eventually investigated in saline media and culture media ((Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) supplemented with 8% serum). Since dynamic light scattering measurements could not properly be carried out with **p-BDZ** FONs given their small size and scattering effects, UV-vis absorption and emission measurements, as well as epifluorescence microscopy were privileged. They revealed no detectable micrometric aggregation of FONs that would have caused significant light scattering and hypochromic change in the intensity signal, making FONs fully suitable for further in cellulose experiments (Figure S2, Supporting Information).

2.2. Acidity Impact on Photophysical Properties of **x-BDZ** Fluorophores and FONs

Significant differences regarding the photophysical properties were actually noted between **p-BDZ** and **c-BDZ**. Both compounds display similar absorption spectra with a low-energy band centered at 454 nm in THF solution, and 466 nm as FON (Figure S3, Supporting Information) as a result from charge transfer from the triphenylamino to the benzothiadiazole moiety. By contrast, a noticeable bathochromic shift of the emission band, peaking at 664 and 661 nm for **p-BDZ** and **c-BDZ**, respectively, was observed in THF solution. This shift reveals to be exacerbated in FONs with an emission maximum at 638 and 625 nm for **p-BDZ** and **c-BDZ**, respectively (Figure 2C; Table S1, Supporting Information). We ascribed this discrepancy to the stronger acidic character of $-\text{PO}_3\text{H}_2$ acid units as compared to $-\text{CO}_2\text{H}$, consequently inducing stronger hydrogen bonding interactions. This impact of hydrogen bonding on the radiative excited state is particularly true when considering the fluorescence quantum yield Φ_f which notably drops from THF solution to aqueous FON suspensions, namely from 25 to 2.2% for **p-BDZ** and 27 to 11% for **c-BDZ**, respectively (Table S1, Supporting Information). This considerable decrease was found to partly result from radiationless deactivation through strong vibrational coupling with water O–H oscillators. Indeed, replacing H_2O with D_2O caused a 50 and 37% increase in the emission quantum yield Φ_f for **p-BDZ** and **c-BDZ** FONs, respectively, confirmed by a similar increase in the intensity averaged lifetimes of the excited states (33 and 22%, respectively) (Figure S4 and Table S2, Supporting Information). We can thus conclude on strong cohesion of a water shell around the protic FONs and suspect that similar results would apply to

Table 1. Structural and photophysical properties of dox-free **x-FON** and dox-doped **dox/x-FON** nanoassemblies in water. All syntheses have been repeated three times.

FON	d_{TEM} (σ) in nm	ζ (mV)	$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ (nm)	Φ_f ($\times 10^{-2}$)
p-BDZ	24 \pm 2 (0.20 \pm 0.03)	-26 \pm 1	466, 335	638	2.2 ^{a)}
dox/p-BDZ	33 \pm 1 (0.23 \pm 0.01)	-23 \pm 2	473, 336	613	0.2 ^{b)}
c-BDZ	44 \pm 3 (0.27 \pm 0.01)	-30 \pm 2	466, 334	625	11.4 ^{a)}
dox/c-BDZ	29 \pm 1 (0.17 \pm 0.01)	-20 \pm 1	472, 337	616	2.3 ^{b)}
cp-BDZ	34 (0.21 \pm 0.01)	-30 \pm 2	464, 333	630	4.5 ^{a)}
dox/cp-BDZ	38 (0.19 \pm 0.01)	-24 \pm 1	472, 334	613	0.5 ^{b)}
dox.HCl	–	–	497	595	4.2

^{a)}Measured from coumarin 540 A; ^{b)}One can notice a 81, 58, and 61% drop of the intensity-averaged lifetimes ($\langle \tau_s \rangle$) of dox-free **p-BDZ**, **c-BDZ**, and **cp-BDZ** FONs when the latter are doped with doxorubicin upon nanoprecipitation.

any kind of polar FONs, since local organization of water molecules has recently been evidenced by nonlinear hyper-Rayleigh measurements.^[31]

2.3. Doxorubicin Encapsulation and Delivery Monitoring in Cancer Cells

We next introduced doxorubicin to form theranostic molecular nanoblends. The fluorescent dye and anticancerous drug were mixed in a 1:1 ratio in THF and added in water under fast stirring as above described. This ratio could be regarded as the optimal one, as it ensures high drug loading, efficient FON formation, and dox encapsulation, and finally easier comparison with nonassociated components to understand the behavior of the resulting doped nanoassemblies. The resulting nanoassemblies showed by TEM similar morphologies as those of pristine **BDZ** FONs, proving that dox does not impede the nanoprecipitation process (Figure 2B). It is worth noting that the negative charge of the surface potential ζ measured by zeta-metry decreased from -26 to -23 mV for **p-BDZ** and -30 to -20 mV for **c-BDZ** FONs upon dox doping (Table 1).

This evolution tends to prove strong association between **x-BDZ** and dox in its neutral form, confirmed by a change in the nanoparticle size (Table 1). Photophysical measurements also allowed us to rule out segregation and formation of nanoparticles made exclusively of dox and **x-BDZ** during precipitation. Indeed, both doped nanoassemblies **dox/p-BDZ** and **dox/c-BDZ** underwent dramatic emission quenching as evidenced by the considerable decrease in the emission intensity (up to 91 and 80% respectively) (Figure 2C) and fluorescence intensity decay (Table 1; Figure S5 and Table S3, Supporting Information). In this respect, time-resolved fluorescence measurements are particularly instructive, since the time components inferred from decay modeling of the dox-doped **dox/x-BDZ** nanoassembly emission did not contain the lifetime of free doxorubicin, found at 1.00 ns (Table S3, Supporting Information). The large change undergone in the emission decay of doped nanoassemblies compared to those of the separated constituents thus indicates full association of the molecular drug and dyes into nanoassemblies. At this stage, the necessity to purify the dox-doped FON

solution to remove nonassociated compounds, especially doxorubicin, could reasonably be ruled out. Interestingly, nanoprecipitation of **x-BDZ** FONs in a solution containing dox.HCl also showed quite a large fluorescence quenching of FONs compared to aqueous solution, though to a lesser extent than that observed for doped **dox/x-BDZ** FONs (84 and 65% for **dox/p-BDZ** and **dox/c-BDZ** FONs, respectively) (Figures S6 and S7, and Table S4, Supporting Information). These results indicate that the encapsulation strategy starting from neutral compounds is superior to the approach based on electrostatic interactions between charged water-soluble molecules, as recently reported.^[32] They also indirectly prove the higher hydrogen-bonding interactions of phosphonic acid units with dox, since **p-BDZ** underwent larger quenching effects in the presence of dox. Finally, from the above-reported photophysical measurements and the millisecond process of nanoprecipitation,^[33] composition of the nanoblends can reasonably be assumed as mirroring the composition of the stock organic mixtures.

In order to test dox release using the nanoblends, we used fluorescence imaging, since doxorubicin stains the nuclei in red upon intercalation into DNA to inhibit cell replication. Meso cancer cells, found in malignant mesothelioma, a very severe cancer caused by asbestos inhalation, were here chosen since nanomedicine nowadays represents great promise as therapeutic alternative to molecular drugs displaying very poor patient outcome.^[34] Control experiments were carried out using dox.HCl as well as **x-BDZ** FONs for which no significant cell mortality was detected for concentrations up to 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figure 3A).

Confocal fluorescence microscopy done after various times of incubation ($t = 24, 48, 72$ h) revealed small bright red-orange spots inside the cytoplasm for both **dox/x-BDZ** and **x-BDZ** FONs, which is typical of FON cell uptake by endocytosis. The image purposely shows false colors to better evidence FON evolution (Figure 3C). White and red colors were assigned to emission in the green and red channels, respectively. At time 24 h, **x-BDZ** FONs appeared pinkish as a result of the overlay of their emission signals in both green and red channels. At times 48 and 72 h, one can notice a very interesting feature for **c-BDZ** FONs showing a signal mostly white, while such evolution took longer for **p-BDZ** FONs owing to the larger cohesion imparted by the intermolecular hydrogen bonds between the phosphonic acid units. This observation indicates that FONs structurally evolved due to the modification of the fluorophore surroundings. Previous studies involving strongly solvatochromic fluorophores constituting FONs let us suggest that FONs dissociate in contact with the phospholipids of the endosome membrane instead of the cytoplasmic membrane.^[35] In the latter case, FONs would have dissolved and stained the cytoplasmic membrane, which is actually not observed and contradicts the dot-like spreading of FONs inside the cells after uptake. Hence, the separated fluorophores underwent apolar surroundings where they emit at lower wavelengths. A similar assumption could be applied to **dox/x-BDZ** FONs, delivering their dox content upon progressive dissociation. Indeed, red staining of the nuclei by doxorubicin was found for all conditions, albeit notably delayed for **dox/x-BDZ** FONs blends, with a maximum reached after 72 h against 48 h for dox.HCl (Figure 3B). The green-grayish color that could be detected for cells treated by dox.HCl, known for

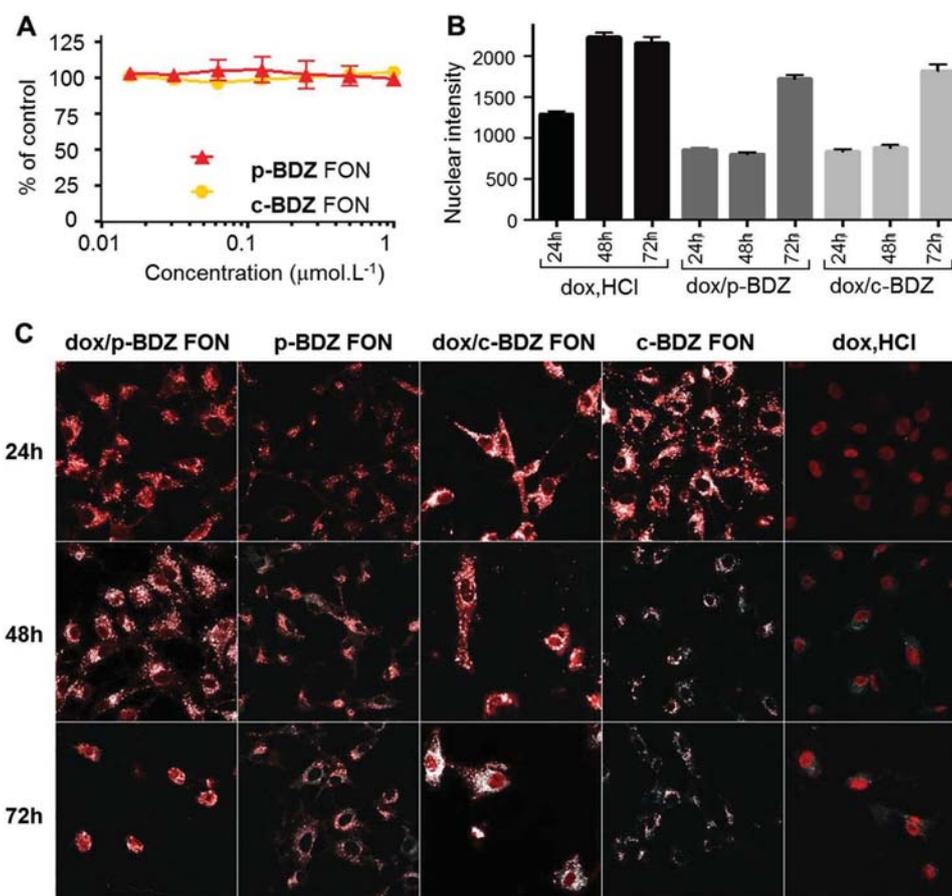


Figure 3. A) Cell viability of meso-13 cells incubated with **p-BDZ** and **c-BDZ** FONs using CellTiter-Glo assays. B) Averaged fluorescence evolution in the nuclei over incubation time (statistics on 80 cells). C) Fluorescence confocal microscopy (false colors) of meso-13 cells treated with dox-free and **dox/x-BDZ** FON blends ($0.25 \mu\text{mol L}^{-1}$), and dox.HCl ($0.25 \mu\text{mol L}^{-1}$) at 24, 48 and 72 h incubation time ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$). **x-BDZ** FONs appeared initially as bright pinkish spots from the overlay of the green channel ($\lambda_{\text{em}} = 525/50 \text{ nm}$) with the red channel ($\lambda_{\text{em}} = 595/50 \text{ nm}$) where dox emits and stains the cell nuclei.

its low fluorescence quantum yield ($\Phi_f = 0.04$),^[36] is actually due to cell autofluorescence which usually appears close to the excitation wavelength ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$), namely in the green region. So, the delayed red staining of the nuclei for **dox/x-BDZ** FONs compared to dox.HCl, free to diffuse, appears as a logic consequence of trapped dox inside **dox/x-BDZ** FONs. Dox liberation would thus stem from progressive FON “dissolution,” proving that **x-BDZ** FONs can act as efficient drug nanocarriers, amenable to trigger and signal the release of drugs that would not be fluorescent, and eventually kill cancer cells after 72 h (the cells indeed appear dead, with a collapsed phenotype). It is worth noting that the targeted **p-BDZ** and **c-BDZ** fluorophores innovatively differ from aggregation-induced emitters, as emission is required from closely packed and individual dyes after FON dissociation.^[37]

2.4. Deciphering NanoDDS Cohesion in Solution Using Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Measurements

In order to better understand this evolution and disentangle biological from chemical effect, we investigated the structural

stability of pristine and blend FONs in water over time. Since the dyes and drug showed broad adsorption peaks due their protic and strongly hydrophobic character, analyses involving high performance liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry were unfortunately unsuccessful. We thus resorted to steady-state and time-resolved fluorescence measurements, well-adapted down to sub-nanomolar concentrations. The fluorescence spectra and emission lifetimes were recorded right after FON nanoprecipitation in water as well as after 1, 2, 3, and 7 days (Figure 4A,B; Figure S8, Supporting Information).

Very little changes in absorption were observed for **p-BDZ** and **c-BDZ** FON solutions in water, proving their excellent colloidal stability. The emission spectra were found more sensitive with a 15 and 27% decrease for **p-BDZ** and **c-BDZ** FONs, respectively. Precipitation as a possible origin for this diminution can unambiguously be ruled out on the basis of constant absorbance. Although further investigations will be required, we actually suspect progressive reorganization of the fluorophores inside the nanospheres, left in a metastable state after the fast nanoprecipitation process. Interestingly, the evolution of **dox/x-BDZ** nanoassemblies is quite distinct. The absorption

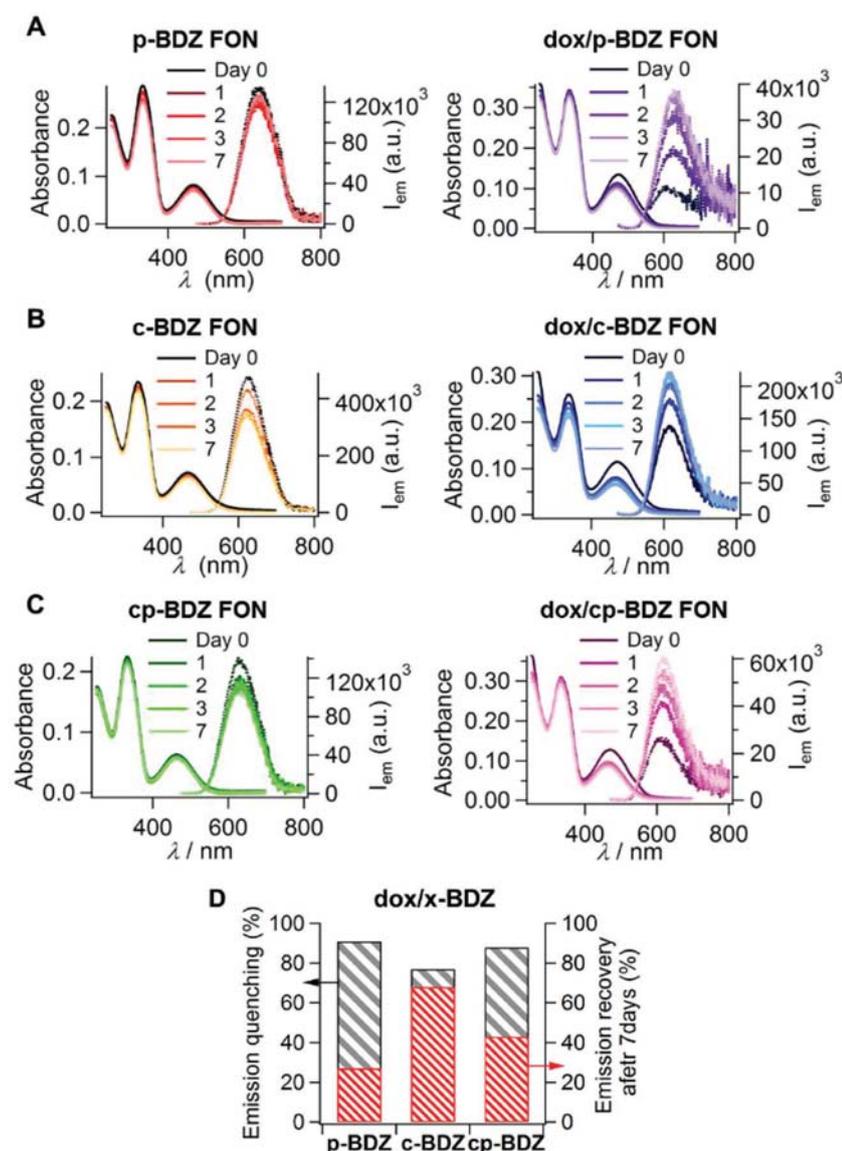


Figure 4. UV-vis absorption and emission spectra ($\lambda_{exc} = 465$ nm) of dox-free and dox-doped **x-BDZ** FONs in water after 0, 1, 2, 3 and 7 days: A) **p-BDZ** and **dox/p-BDZ**, B) **c-BDZ** and **dox/c-BDZ**, C) **cp-BDZ** and **dox/cp-BDZ**. D) Left axis: Emission quenching of **dox/x-BDZ** compared to **x-BDZ** FONs upon nanoprecipitation in water of a **dox/x-BDZ** (1:1) mixture prepared in THF (gray hashed area). Right axis: emission recovery of **dox/x-BDZ** FON solutions in water, regarding to **x-BDZ** FON solution emission after 7 days (red hashed area).

band in the visible, where both dox and **x-BDZ** contribute decreased quite notably while the emission spectra rose by 230 and 115% for **dox/p-BDZ** and **dox/c-BDZ** FONs, respectively, after absorption correction. If we refer to the final emission values reached by pristine FONs, we end up with a recovery of 27 and 68% of the initial emission intensity for **p-BDZ** and **c-BDZ** before mixing with dox (Figure 4D). Both the reduction in absorbance and the increase in emission suggest a progressive release of dox out of **x-BDZ** FONs over time. However, due to the inferior acidity of carboxylic acid over phosphonic one, the moieties in **c-FON** obviously retain less the encapsulated doxorubicin.

2.5. Fine Tuning and Dual-Color Monitoring of Drug Delivery Using Acidic Fluorescent Nanoblends

To test such assumption and benefit at the same time from brighter and stronger dox-interacting FONs, we fabricated a novel blend based on **p-BDZ** and **c-BDZ** within a single scaffold. We chose a 1:1 ratio and produced **cp-BDZ** FONs by precipitating in water the mixture prepared in THF, as earlier described. The resulting blend has intermediate photophysical properties between **p-BDZ** and **c-BDZ** FON ones ($\Phi_f = 4.5\%$ and $\langle\tau_s\rangle = 2.65$ ns) (Figure 5A and Table 1). Interestingly, the time components τ_i found for the **cp-BDZ** nanoblend neatly differ from those of **p-BDZ** and **c-BDZ** FONs, again proving that both constituents are tightly assembled and interacting within the nanoparticles (Table S3, Supporting Information).

When mixed with dox, the doped **dox/cp-BDZ** FONs displayed again largely quenched emission by 88%. Photophysical follow-up showed after 3 days similar features as those recorded for **dox/p-BDZ** and **dox/c-BDZ**. Especially, the emission intensity progressively recovered after 3 days up to 43% of the emission signal of **cp-BDZ** FONs devoid of dox (Figure 4C).

Biological assays with **dox/cp-BDZ** FONs were then performed to test this novel composition in terms of drug release and signaling after incubation with meso 13 cancer cells. Delayed dox staining of the nuclei was also detected using **dox/cp-BDZ** FONs when compared to cells treated with Dox.HCl. However, the delay of release was half-reduced by 24 h by comparison with **dox/x-BDZ** monoblends, and could be observed with three other lines of mesothelioma or lung adenocarcinoma cells, discarding any biological artifact or cytotoxicity effects (Figures S9 and S10, Supporting Information). When looking more carefully at one lung adenocarcinoma cancer cell lines by means of spectral detection, a diffuse green halo was noticed outside the nuclei, and located around the bright orange spots characteristic of **cp-BDZ** FONs (Figure 5C). No spatial overlap took place with the red signal arising exclusively from the nuclei stained by the released doxorubicin. This observation echoes with previous reports on the disassembling of FONs made of solvatochromic fluorophores after cell internalization.^[35a] Since BDZ units exhibit strong solvatochromism in emission, from yellow in lipophilic media to red in polar media (Figure 6), we propose that the green color arises from partial dissolution of **dox/cp-BDZ** FONs into individual fluorophores. In this way, doxorubicin release occurs out of the endosomes where FON blends accumulated, as previously proved with similar architectures.^[38]

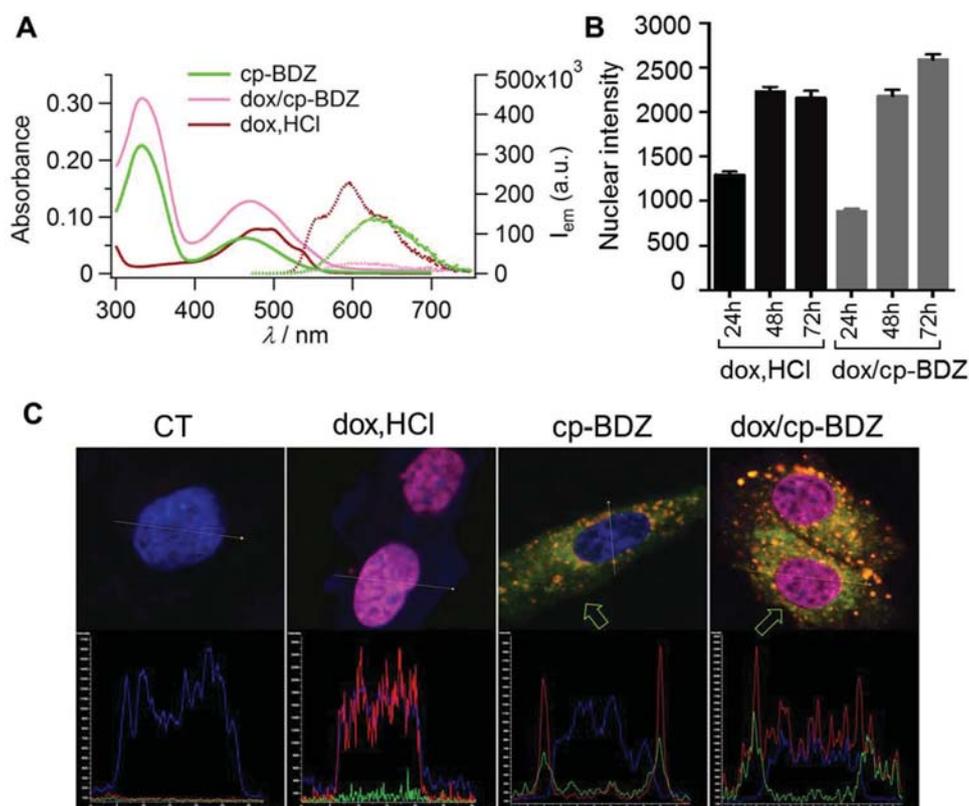


Figure 5. A) UV-vis absorption and emission spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 465 \text{ nm}$) of dox-free and dox-doped **cp-BDZ** FONs and dox.HCl in water. B) Averaged fluorescence evolution in the nuclei over incubation time (statistics on 30 cells). C) Fluorescence confocal microscopy of ADCA 117 cells and fluorescence traces after 48 h incubation time ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$): control (CT), treated with dox.HCl, dox-free and dox-doped **cp-BDZ** FON blends. The nuclei were stained in blue with Hoechst, giving magenta signal from cells treated with dox emitting in the red; **cp-BDZ** FONs appeared as bright yellow-orange spots outside the nuclei ($\lambda_{\text{em}} = 525/50$ and $595/50 \text{ nm}$). Note the green-yellowish halo with dox-free and dox-doped **cp-BDZ** FONs.

3. Conclusion

In conclusion, we have demonstrated that benzothiadiazole dyes incorporating both π -conjugated and acidic units allow for the generation of bright orange-red FONs that can efficiently encapsulate hydrophobic drugs containing amino units. Phosphonic acid units revealed to be strongly cohesive compared to carboxylic ones, leading to lower drug release in water. By contrast, the emission properties of carboxylic dyes were found larger than their phosphonic homologues, which was exacerbated in FONs as a result of differentiate strengths of intermolecular hydrogen-bonds. To obtain a good compromise in terms of emission and incorporated drug stability, the combination of carboxylic and phosphonic fluorophores was proved to be a very attractive alternative, as FON molecular nature advantageously permits the fabrication of blends with properties directly correlated to the weighted contributions of the mixed units. Finally, by using strongly solvatochromic FON-forming fluorophores, drug release could be detected by simply tracking the emission color change as a result of FON disassembling into individual fluorophores by contact with the lipid endosomal membrane. FONs, conjugating acidic units with extensive charge transfer throughout a π -conjugated backbone represent very promising theranostic tools adapted to real-time monitoring of the liberation of nonfluorescent drugs. Extension to in vivo use is

currently envisaged by considering the further addition of biocompatible and stealthy amphiphilic polyelectrolytes to protect doped FONs from immediate clearance by the mononuclear phagocyte system. These studies also question the structural evolution of FONs in water which is still largely overlooked and will be further investigated owing to its importance in the context of biodegradability imperatives.

4. Experimental Section

Synthesis of 4-(7-(4-(bis(4-(tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)benzo[c][1,2,5]thiazol-4-yl)benzoic acid (4, c-BDZ): To a solution of aldehyde **2** (0.75 g, 1 mmol, 1 eq.) in dimethylformamide (DMF) (6 mL) was added oxone (0.92 g, 3 mmol, 3 eq.). The reaction mixture was allowed to stir at room temperature for 5 h. The resulting thick reaction mixture was dissolved in dichloromethane and washed three times with water. The extracted organic phase was washed further with brine and dried over anhydrous Na_2SO_4 . After solvent removal under reduced pressure, the product was purified by silica gel chromatography using a gradient of eluants (dichloromethane:methanol, 100:0 to 98:2) to obtain compound **2** (**c-BDZ**) as a bright orange powder (0.75 g, 76%). T_{g} 173 °C. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.29 (d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, 2H), 8.10 (d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, 2H), 7.93 (d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, 2H), 7.83 (d, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H), 7.78 (d, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H), 7.55 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 8H), 7.47 (d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, 4H), 7.32 (d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, 2H), 7.28 (d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, 4H), 1.38 (s, 18H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 171.4, 154.2, 154.0, 150.1, 148.2, 146.4, 142.9,

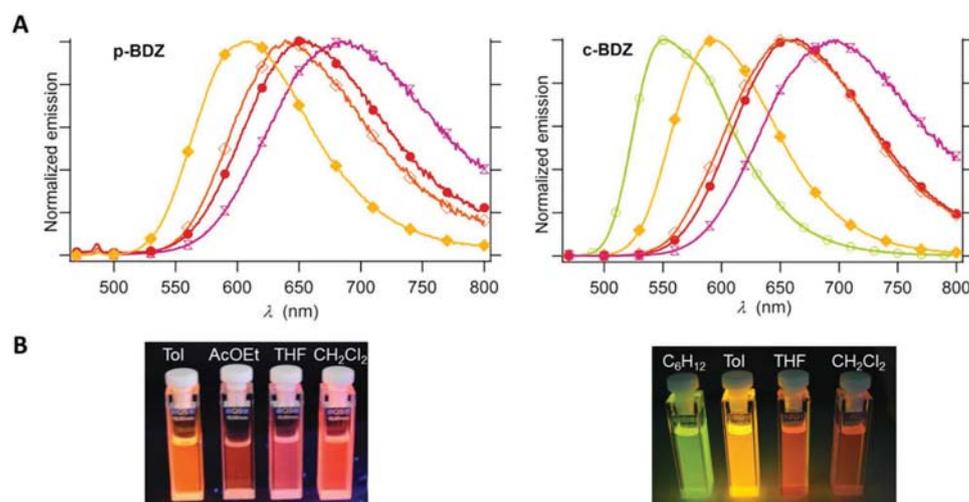


Figure 6. A) Emission spectra of **p-BDZ** and **c-BDZ** compounds dissolved in cyclohexane (O), toluene (◆), AcOEt (◇), THF (●), and CH₂Cl₂ (X) ($\lambda_{\text{exc}} = 465$ nm). B) Emission of solutions in quartz cells under illumination with a mercury lamp ($\lambda_{\text{exc}} = 365$ nm).

137.8, 136.2, 134.0, 131.3, 130.9, 130.6, 130.3, 129.4, 129.1, 128.8, 128.0, 127.2, 126.5, 125.9, 125.2, 123.3, 34.7, 31.5. UV-vis (toluene), $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$ (ϵ_{max} (mol⁻¹ L cm⁻¹): 460 (1.78 × 10⁴), 333 (5.69 × 10⁴) nm, $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ (Φ_{f}): 592 (0.58) nm. HRMS (ESI+), m/z (M⁺, 100%): for C₅₁H₄₅N₃O₂S calculated 763.3232, found 763.3215.

2-(2-bromoethoxy)ethyl 4-(7-(4-(bis(4'-tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl) benzo[c][1,2,5]thiadiazol-4-yl)benzoate (5): To a mixture of 2-(2-bromoethoxy)ethanol (65.9 mg, 0.39 mmol, 1 eq.), carboxylic acid derivative **4** (299 mg, 0.39 mmol, 1 eq.), and 4-(dimethylamino)pyridinium 4-toluenesulfonate (57.4 mg, 0.20 mmol, 0.5 eq.) in dichloromethane (15 mL) was added *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (121 μ L, 0.78 mmol, 2 eq.). The reaction mixture was allowed to stir at room temperature for 20 h. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure and purified by silica gel chromatography using dichloromethane as an eluent to provide compound **5** as a red powder (200 mg, 51%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.08 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.94 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.82 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 8H), 7.47 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H), 7.30 (t, *J* = 9.1 Hz, 6H), 4.55 (m, 2H), 3.90 (m, 4H), 3.52 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 1.37 (s, 18H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 166.64, 154.27, 150.30, 146.60, 142.39, 137.98, 136.38, 134.07, 131.62, 130.32, 129.77, 129.49, 129.15, 128.17, 127.44, 126.06, 125.33, 123.46, 71.50, 69.50, 64.39, 34.85, 31.71, 30.58. HRMS (ESI+): m/z (M⁺, 100%) for C₅₅H₅₂N₃O₃BrS⁺ calculated 913.2912, found 913.2907.

(2-(2-(4-(7-(4-(bis(4'-tert-butyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazol-4-yl)benzoyl)oxy)ethoxy)ethyl)phosphonic acid (6, p-BDZ): Tris(trimethylsilyl)phosphite (2 mL, 6 mmol, 55 eq.) was added to compound **5** (100 mg, 0.11 mmol, 1 eq.) introduced in a flame-dried flask under argon. The reaction mixture was allowed to stir for 24 h at 140 °C under argon atmosphere. To the reaction mixture was added methanol (2 mL), the mixture was then stirred for an additional 6 h at 60 °C and methanol was removed under reduced pressure. The crude red product was precipitated in methanol and filtered to give without any further purification compound **6 (p-BDZ)** as a pure red powder (100 mg, 100%). *T_g* 146 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.24 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.17 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.08 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.83 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.43–7.55 (m, 12H), 7.22–7.33 (m, 6H), 4.52 (m, 2H), 3.82 (m, 6H), 1.37 (s, 18H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 166.93, 154.15, 150.28, 146.59, 142.31, 137.98, 136.33, 133.57, 130.42, 130.30, 129.53, 129.45, 129.11, 128.18, 126.72, 126.06, 125.32, 123.41, 77.56, 64.31, 62.61, 34.86, 31.72. ³¹P NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 31.14. UV-vis (toluene), $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$ (ϵ_{max} (mol⁻¹ L cm⁻¹): 462 (1.49 × 10⁴), 335 (4.89 × 10⁴) nm, $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ (Φ_{f}): 604 (0.45) nm. HRMS (ESI+), m/z (M⁺, 100%): for C₅₅H₅₄N₃O₆PS⁺ calculated 915.3471, found 915.3451.

Pristine x-BDZ FONs: Stock solutions of **x-BDZ** fluorophores were prepared in spectrophotometric grade THF with 0.15 and 0.12 wt% concentrations of **p-BDZ** and **c-BDZ**, respectively, to take into account the difference in molecular weight and keep the molar concentrations equal from one sample to another (here equal to 1.45 mmol L⁻¹). A small amount of the stock solution (50 μ L) was injected in one shot under vigorous stirring into a larger volume of Millipore water (2.5 mL) by means of a vortex. The resulting solution concentration is thus 29 μ mol L⁻¹. When dealing with the **cp-BDZ** mixture, the concentrations of each dye in the stock solution were half those of the stock solutions made exclusively of **p-BDZ** or **c-BDZ** compounds.

Synthesis of Neutral Doxorubicin (dox): Dox.HCl (2.06 mg) was dissolved in a solution of ammonium hydroxide (2 mL) adjusted to pH = 8.7. Two drops of concentrated ammonium hydroxide were added to reach pH = 11.6. The solution color turned from red to violet. After adding THF (2 mL), the solution was treated with ethyl acetate (5 mL) to extract doxorubicin in its neutral form. The extraction was repeated twice. The extracted organic phases were collected together and evaporated under reduced pressure. The remaining dark grains were discarded and the red viscous liquid dried under vacuum until forming a red solid powder corresponding to the neutral form of doxorubicin that is soluble in organic solvents. The compound was stored under argon at room temperature until use.

Dox-Doped x-BDZ FONs (dox/x-BDZ): Stock solutions of pristine **x-BDZ** FONs were prepared separately in spectrophotometric grade THF with a concentration twice as high as those of pristine **x-BDZ** FONs (namely, 0.30 and 0.24 wt% for **p-BDZ** and **c-BDZ**, respectively). A stock solution of neutral doxorubicin was also prepared in spectrophotometric grade THF with a 0.17 wt% concentration. 25 μ L of the fluorophore stock solution and 25 μ L of the drug stock solution were mixed together to generate a 1:1 **dox/x-BDZ** ratio. The whole volume (50 μ L) was added under vigorous stirring into Millipore water (2.5 mL) as described above.

Adducts of x-BDZ with dox.HCl (x-BDZ: dox.HCl): An aqueous dox.HCl solution (0.085 wt%, 50 μ L) was diluted in Millipore water (2.45 mL) to generate a solution with a 29 μ mol L⁻¹ concentration. A small amount (50 μ L) of **x-BDZ** stock solutions (namely 0.15 and 0.12 wt% for **p-BDZ** and **c-BDZ**, respectively) was quickly added in the diluted dox.HCl solution (2.5 mL) to generate a 1:1 **x-BDZ:dox.HCl** ratio in the same concentrations as those reported for dox-doped **x-BDZ** FONs.

Steady-State Measurements: UV-visible absorption spectra were recorded using a Varian Model Cary SE spectrophotometer equipped with an integrating sphere DRA 2500. Molar absorption coefficients were obtained by an average of at least two measurements with less than 10% variation. Fluorolog 2 spectrofluorimeter was used (Jobin-Yvon/Horiba). Correction for the emission spectra with regard to the spectral response

of the detector was automatically applied. Fluorescence quantum yields were determined in solution, referred to coumarin 540 A in EtOH ($\Phi_f = 0.38$).^[39]

Time-Resolved Fluorescence Measurements: Fluorescence intensity decays were measured by the time-correlated single-photon counting method with a femtosecond laser excitation at 450 nm at the magic angle provided by a Spectra-Physics setup composed of a Titanium-Sapphire Tsunami laser pumped by a doubled YAG laser (Millennia), pumped itself by a two-laser diode array, and doubling LBO crystals. Light pulses at 900 nm were selected by optoacoustic crystals at a repetition rate of 4 MHz, and then doubled at 450 nm. Fluorescence photons were detected at 580 nm through a monochromator by means of a Hamamatsu MCP R3809U photomultiplier, connected to a constant-fraction discriminator. The time-to-amplitude converter was purchased from Tennelec. Pulse deconvolution was performed from the time profile of the exciting pulse recorded under the same conditions using a Ludox solution. The fluorescence data were analyzed by a nonlinear least-squares global method using the Globals software package developed at the Laboratory for Fluorescence Dynamics at the University of Illinois at Urbana-Champaign (Globals software, Irvine, CA, USA).

Cell Culture: All cell lines (mesothelioma Meso 13 and Meso 34, and lung adenocarcinoma ADCA 117 and ADCA 211) were established from pleural fluids of patients. All cells were maintained in RPMI medium (Invitrogen) supplemented with 2 mmol L⁻¹ glutamine, 100 IU mL⁻¹ penicillin, 0.1 mg mL⁻¹ streptomycin, and 10% heat-inactivated foetal calf serum (Eurobio), and grown in a humidified atmosphere of 37 °C and 5% CO₂. For all experiments, the cell cultures at a confluence of about 80–90% were washed once with phosphate buffered saline (PBS) and trypsinized (0.05% trypsin/0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)) (Invitrogen) for 5 min. The cells were resuspended in culture medium and eosin was used to determine viability before seeding.

x-BDZ FON and Dox/x-BDZ FON Internalization: Cells were seeded on a μ -slide 8-well Ibitreat microscopy chamber (Ibidi) at 5×10^3 cells per well. After 24 h, solutions of x-BDZ FONs, dox/x-BDZ FONs, and dox.HCl were added to RPMI (200 μ L) so that a final doxorubicin concentration of 0.25 μ mol L⁻¹ was obtained. The cell culture medium was then replaced with the adequate freshly prepared solutions. The cells were left in contact with dox-free, dox-doped x-BDZ FONs, or dox.HCl for 24, 48, or 72 h. Each well was washed with PBS and incubated with 5 μ g mL⁻¹ Hoechst for nucleus staining prior to fixation with 4% paraformaldehyde for 15 min.

MTT Cell Viability Assay: Cells were seeded in 96-well plates at a density of 5×10^3 cells per well in culture medium for 24 h. Then, dox-free or dox-doped x-BDZ FONs and doxorubicin were added for an additional 72 h and viability was measured using CellTiter-Glow kit from PROMEGA.

Confocal Fluorescence Imaging: Confocal fluorescence imaging was performed using a Nikon A1R Si microscope, equipped with an oil-immersion objective (Plan Apo, 60 \times , NA = 1.4).

Cell Imaging: 405 and 488 nm laser wavelengths were used for Hoechst and dox or x-BDZ FON excitation, respectively. Emission was recorded sequentially using emission filters at 450/50 nm (blue channel), 525/50 (green channel), or 595/50 nm (red channel). FONs emitted in both green and red channels and while doxorubicin emission signal could be recorded only in the red channel.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

The Région des Pays de la Loire through the LUMOMAT RFI program of (ONASSIS PhD project), ARSMeso44, and the Interdisciplinarity

program of Université de Nantes are gratefully acknowledged for their strong support.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords

drug delivery, dual-color, fluorescence, hydrogen bonding, organic nanoparticles

Received: June 17, 2018

Revised: July 8, 2018

Published online: August 26, 2018

- [1] a) C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 7743; b) L. Ma, M. Kohli, A. Smith, *ACS Nano* **2013**, 7, 9518.
- [2] Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.* **1986**, 46, 6387.
- [3] a) E.-K. Lim, T. Kim, S. Paik, S. Haam, Y.-M. Huh, K. Lee, *Chem. Rev.* **2015**, 115, 327; b) G. Chen, I. Roy, C. Yang, P. N. Prasad, *Chem. Rev.* **2016**, 116, 2826.
- [4] a) M. Vendrell, D. T. Zhai, J. C. Er, Y. T. Chang, *Chem. Rev.* **2012**, 112, 4391; b) M. Y. Berezin, S. Achilefu, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 2641.
- [5] N. Grimaldi, F. Andrade, N. Segovia, L. Ferrer-Tasies, S. Sala, J. Veciana, N. Ventosa, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, 45, 6520.
- [6] P. Tanner, P. Baumann, R. Enea, O. Onaca, C. Palivan, W. Meier, *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 1039.
- [7] W.-C. Wu, C.-Y. Chen, Y. Tian, S.-H. Jang, Y. Hong, Y. Liu, R. Hu, B. Z. Tang, Y.-T. Lee, C.-T. Chen, W.-C. Chen, A. K.-Y. Jen, *Adv. Funct. Mater.* **2010**, 20, 1413.
- [8] S. Vrignaud, J. P. Benoit, P. Saulnier, *Biomaterials* **2011**, 32, 8593.
- [9] L. M. Bronstein, Z. B. Shifrina, *Chem. Rev.* **2011**, 111, 5301.
- [10] J. Ramos, J. Forcada, R. Hidalgo-Alvarez, *Chem. Rev.* **2013**, 114, 367.
- [11] a) R. Duncan, R. Gaspar, *Mol. Pharmaceutics* **2011**, 8, 2101; b) J. Rieger, C. Passirani, J.-P. Benoit, K. Van Butsele, R. Jérôme, C. Jérôme, *Adv. Funct. Mater.* **2006**, 16, 1506.
- [12] a) A. Maksimenko, D. T. Bui, D. Desmaele, P. Couvreur, J. Nicolas, *Chem. Mater.* **2014**, 26, 3606; b) K. Cai, X. He, Z. Song, Q. Yin, Y. Zhang, F. M. Uckun, C. Jiang, J. Cheng, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 3458.
- [13] a) X. Pengyao, Z. Yanli, *Adv. Mater.* **2016**, 28, 7304; b) N. T. Huynh, C. Passirani, P. Saulnier, J.-P. Benoit, *Int. J. Pharm.* **2009**, 379, 201.
- [14] C. Wong, T. Stylianopoulos, J. A. Cui, J. Martin, V. P. Chauhan, W. Jiang, Z. Popovic, R. K. Jain, M. G. Bawendi, D. Fukumura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 2426.
- [15] K. Naito, *Chem. Mater.* **1994**, 6, 2343.
- [16] S. Fery-Forgues, *Nanoscale* **2013**, 51, 8428.
- [17] a) J. Schill, A. Schenning, L. Brunsveld, *Macromol. Rapid Commun.* **2015**, 36, 1306; b) X. Zhang, X. Zhang, L. Tao, Z. Chi, J. Xu, Y. Wei, *J. Mat. Chem. B* **2014**, 2, 4398.
- [18] a) E. Genin, Z. H. Gao, J. A. Varela, J. Daniel, T. Bsaibess, I. Gosse, L. Groc, L. Cognet, M. Blanchard-Desce, *Adv. Mater.* **2014**, 26, 2258; b) J. Zhang, R. Chen, Z. Zhu, C. Adachi, X. Zhang, C.-S. Lee, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, 7, 26266.
- [19] Y. Yang, X. Wang, Q. Cui, Q. Cao, L. Li, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8, 7440.
- [20] J. Su, T. Fukaminato, J.-P. Placial, T. Onodera, R. Suzuki, H. Oikawa, A. Brosseau, F. Brisset, R. Pansu, K. Nakatani, R. Métivier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 3662.

- [21] a) A. Jana, K. S. P. Devi, T. K. Maiti, N. D. P. Singh, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7656; b) X. Xue, S. Jin, C. Zhang, K. Yang, S. Huo, F. Chen, G. Zou, X.-J. Liang, *ACS Nano* **2015**, *9*, 2729.
- [22] M. L. Hauck, S. M. LaRue, W. P. Petros, *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 4004.
- [23] a) C. V. Krishnamohan Sharma, A. Clearfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4394; b) M. Sadakiyo, T. Yamada, K. Honda, H. Matsui, H. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 7701.
- [24] H.-J. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3924.
- [25] B. A. D. Neto, P. H. P. R. Carvalho, J. R. Correa, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1560.
- [26] a) S.-Y. Liou, C.-S. Ke, J.-H. Chen, Y.-W. Luo, S.-Y. Kuo, Y.-H. Chen, C.-C. Fang, C.-Y. Wu, C.-M. Chiang, Y.-H. Chan, *ACS Macro Lett.* **2016**, *5*, 154; b) E. R. Reddy, S. Yellanki, R. Medishetty, L. Konada, N. P. Alamuru, D. Halder, K. V. L. Parsa, P. Kulkarni, M. Rajadurai, *ChemNanoMat* **2015**, *1*, 567; c) L. Wu, F. Xu, B. M. Reinhard, *Nanoscale* **2016**, *8*, 13755.
- [27] K. K. Ng, G. Zheng, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 11012.
- [28] S. Mukherjee, S. Ray, R. S. Thakur, *Ind. J. Pharm. Sci.* **2009**, *71*, 349.
- [29] a) R. G. Franz, *AAPS PharmSci.* **2001**, *3*, 1; b) C. M. Sevrain, M. Berchel, H. Couthon, P.-A. Jaffrès, *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 2186.
- [30] B. Balan, C. Vijayakumar, S. Ogi, M. Takeuchi, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 11224.
- [31] J. Daniel, F. Bondu, F. Adamietz, M. Blanchard-Desce, V. Rodriguez, *ACS Photonics* **2015**, *2*, 1209.
- [32] J. H. Lee, K. Y. Kim, H. Jin, Y. E. Baek, Y. Choi, S. H. Jung, S. S. Lee, J. Bae, J. H. Jung, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 3380.
- [33] D. Horn, J. Rieger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4330.
- [34] K. Binnemars-Postma, G. Storm, J. Prakash, *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*,
- [35] a) A. Faucon, H. Benhelli-Mokrani, L. A. Córdova, B. Brulin, D. Heymann, P. Hulin, S. Nedellec, E. Ishow, *Adv. Healthcare Mater.* **2015**, *4*, 2727; b) M. Breton, G. Prevel, J. F. Audibert, R. Pansu, P. Tauc, B. Le Pioufle, O. Francais, J. Fresnais, J. F. Berret, E. Ishow, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 13268.
- [36] P. Changenet-Barret, T. Gustavsson, D. Markovitsi, I. Manet, S. Monti, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 2937.
- [37] Y. Yuan, B. Liu, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 2537.
- [38] A. Faucon, H. Benhelli-Mokrani, F. Fleury, L. Dubreil, P. Hulin, S. Nedellec, T. Doussineau, R. Antoine, T. Orlando, A. Lascialfari, J. Fresnais, L. Lartigue, E. Ishow, *J. Colloid Interface Sci.* **2016**, *479*, 139.
- [39] L. Reynolds, J. A. Gardecki, S. J. V. Frankland, M. L. Horng, M. Maroncelli, *J. Phys. Chem. C* **1996**, *100*, 10337.

Titre : Nanomatériaux magnéto-fluorescents pour la bio-imagerie multimodale et la libération contrôlée de principes actifs.

Mots clés : Nanomatériaux hybrides, fluorescence, nanomagnétisme, bio-imagerie, théranostique, hyperthermie magnétique.

Résumé : Ce travail de thèse consiste en l'élaboration et en la caractérisation de nano-outils théranostiques pour deux objectifs. Le premier objectif concerne le diagnostic cellulaire ciblé (cellules cancéreuses et musculaires, bactéries, macrophages) grâce à des nanomatériaux détectables par microscopie de fluorescence et IRM. Le second est lié à la thérapie par libération contrôlée de principes actifs, notamment anti-cancéreux, encapsulés dans des nanomatériaux. En effet, la taille nanométrique de ces objets leur confère des potentialités de ciblage de tissus (cellules) tumoraux, diminuant ainsi les effets secondaires. Ces objets sont des nanoassemblages supramoléculaires constitués d'un cœur de molécules fluorescentes solvatochromes et d'une coquille de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer. Le cœur émissif, appelé FON pour nanoparticule organique fluorescente, émet un signal brillant dans le rouge

compatible avec la première fenêtre de transparence des tissus biologiques. Les FONs se révèlent non cytotoxiques et peu sensibles au photoblanchiment. L'aptitude des FONs à se déliter une fois internalisées in cellulo et leur hydrophobicité permettent la vectorisation de médicaments hydrophobes. La libération de ces derniers est alors suivie in cellulo par microscopie de fluorescence. Cette libération peut être contrôlée par hyperthermie grâce à l'échauffement des nanoparticules magnétiques lors de l'application d'un champ magnétique alternatif. Ces dernières pourront aussi être exploitées pour suivre l'évolution in vivo de tumeurs par IRM. Toutes ces propriétés combinées ouvrent la voie vers des potentialités théranostiques où la nanomédecine personnalisée est très recherchée.

Title : Magneto-fluorescent nanomaterials for multimodal bioimaging and controlled drug delivery.

Keywords : Hybrid nanomaterials, fluorescence, nanomagnetism, bioimaging, theranostics, magnetic hyperthermia.

Abstract : These PhD studies consist in the design and characterizations of theranostic nano-tools to meet two requirements. The first one is cell-targeted diagnostics (cancer and muscle cells, bacteria, macrophages) using nanomaterials detectable by fluorescence microscopy and MRI. The second aims at controlling the release of drugs, including anticancerous ones, encapsulated in nanomaterials. The nanometric size of these objects enables enhanced accumulation in tumor tissue (cells), thereby decreasing toxicity side-effects. These objects are supramolecular nanoassemblies composed of a fluorescent solvatochrom organic core coated by a shell of magnetic iron oxide nanoparticles. The emissive core, named FON for fluorescent organic nanoparticle, shows a bright red-

shifted emission signal compatible with the first biological tissue transparency window. FONs exhibit no cytotoxicity and little photobleaching. The ability of FONs to disassemble once internalized in cellulo and their hydrophobicity enable hydrophobic drugs vectorization. In this way, in cellulo drug delivery can be followed-up by fluorescence microscopy. Drug delivery can be controlled with magnetic hyperthermia thanks to the heating properties due to an alternative magnetic field applied to magnetic nanoparticles. Furthermore, magnetic nanoparticles allow tumor evolution to be monitored in vivo using MRI. All these combined properties pave the way toward theranostic potentialities where personalized nanomedicine is highly requested.