

Elaboration et caractérisation de nanoparticules luminescentes par upconversion pour l'imagerie médicale

Nadège Francolon

▶ **To cite this version:**

Nadège Francolon. Elaboration et caractérisation de nanoparticules luminescentes par upconversion pour l'imagerie médicale. Autre. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2015. Français. NNT : 2015CLF22645 . tel-01420112

HAL Id: tel-01420112

https://theses.hal.science/tel-01420112

Submitted on 20 Dec 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

therNuméro d'ordre : D. U. 2645

UNIVERSITE BLAISE PASCAL – CLERMONT-FERRAND

U.F.R. Sciences et Technologies

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

N° 849

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Chimie, Science des Matériaux

Par **Nadège FRANCOLON**

Ingénieur diplômée de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Clermont-Ferrand,

Master Recherche

Elaboration et caractérisation de nanoparticules luminescentes par upconversion pour l'imagerie médicale

Soutenue publiquement le 11 Décembre 2015, devant la commission d'examen

Président

Mme Sylvie BEGIN-COLIN	Professeur – ICPMS, ECPM, Université de Strasbourg

Rapporteurs

M. Michel MORTIER	Directeur de Recherche CNRS – IRCP, Université Pierre et Marie Curie
M. Jean-Olivier DURAND	Directeur de Recherche CNRS - ICGM, Université de Montpellier 2

Examinateurs

Mme Elisabeth MIOT-NOIRAULT	Maître de Conférences, HDR – IMTV, INSERM, Université d'Auvergne

Directeurs de thèse

M. Rachid MAHIOU	Directeur de Recherche CNRS – ICCF, Université Blaise Pascal
M. Damien BOYER	Maître de Conférences – ENSCCF – ICCF, Université Blaise Pascal

Invité

M. Jean-Michel CHEZAL	Professeur - IMTV, INSERM, Université d'Auvergne

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, en collaboration avec de nombreux laboratoires. J'ai eu la chance de travailler avec des personnes venant de domaines très variés que j'aimerai maintenant remercier. J'espère n'oubliez personne dans cette liste exhaustive…

Je remercie tout d'abord le Dr. Anne-Marie Delort, directrice de l'ICCF, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de l'institut, ainsi que le Dr. Fabrice Leroux pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe Matériaux Inorganiques.

Je tiens à remercier mes deux directeurs de thèse, Damien Boyer et Rachid Mahiou, pour m'avoir confié cette thèse et m'avoir encadré pendant ces trois années. Je vous remercie pour votre disponibilité mais aussi pour l'autonomie que vous m'avez donnée. Merci également de m'avoir permis de présenter mes travaux que ce soit à l'échelle de l'Institut mais aussi à l'international. Votre confiance tout au long de ma thèse m'a permis de m'investir pleinement dans ce projet.

Je remercie vivement M. Michel Mortier et M. Jean-Olivier Durand pour avoir pris le temps de se pencher sur cette thèse au titre de rapporteurs.

Mes remerciements vont également à tous les autres membres du jury avec qui j'ai eu la chance de travailler pendant ce projet.

Tout d'abord, je tenais à remercier Mme Sylvie Begin-Colin, pour avoir eu la gentillesse de présider ce jury, ainsi que pour la collaboration très enrichissante qui a été créée. Je la remercie pour l'accueil que j'ai reçu pendant la semaine passée à Strasbourg ainsi que pour son expertise dans le domaine des nanoparticules dendronisées. J'en profite pour remercier toutes les personnes de l'IPCMS que j'ai pu côtoyer, et plus particulièrement Delphine Felder-Flesch et Aurélie Walter, pour la synthèse des dendrons et pour avoir eu la gentillesse de m'initier à la dendronisation.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Mme Elisabeth Miot-Noirault pour avoir examiné ce travail, ainsi qu'à M. Jean-Michel Chezal pour avoir accepté de prendre place dans ce jury. Outre leur présence dans le jury, je leur adresse toute ma gratitude pour l'intérêt constant qu'ils ont porté à ce travail, avec les hauts et les bas qu'a connu ce projet. En tant que chimiste, je les remercie pour avoir pris le temps de m'expliquer les parties plus « obscures » de ce projet, à savoir le domaine biologique que j'ai appris à apprivoiser.

Je remercie également Laurent Morel, professeur à l'Université Blaise Pascal, et plus particulièrement Cédric Hesling et Lia Leccia, pour avoir mené les études de biodistribution et de cytotoxicité. Je les remercie pour l'intérêt qu'ils ont porté à cette étude et pour avoir pris le temps de m'expliquer avec patience le fonctionnement des tests *in vitro*.

J’adresse mes profonds remerciements à Elodie Jouberton sans qui ces travaux de thèse ne seraient pas ce qu’ils sont. Merci encore d’avoir pris autant de temps pour travailler avec moi sur ce début de projet, un peu chaotique… Ce fut un plaisir de pouvoir « bidouiller » ensemble pour enfin avoir des résultats ! Merci encore pour ta détermination sans faille et pour ne jamais avoir baissé les bras. Ces remerciements ne seront pas à la hauteur de la gratitude que j’ai envers toi. Je te souhaite le meilleur pour la suite de tes études et peut-être même une thèse…

Je remercie également à Guillaume Monier et Christine Robert-Goumet pour les analyses réalisées en XPS.

Je tiens à dire un merci particulier à Christelle Blavignac, Lorraine Novais-Gameiro et Claire Szczepaniak pour leur accueil au sein du CICS pendant les séances MET. Ce fut un vrai plaisir de passer ces matinées ensemble et, bien sûr, d’avoir la chance de travailler avec des personnes aussi agréables que compétentes.

J’adresse un grand merci à toutes les personnes de l’Institut que j’ai pu côtoyer de près ou de loin, que ce soit les permanents, techniciens, non-permanents et thésards. Sans oublier personnes, je citerai particulièrement ceux de « chimie 5 » qui ont permis de rendre ces 3 années agréables : Jerem, Arthur, Tony, Audrey, Maï, Léa, Rachod, Pierre, Claire, Martial, Mickael, Diane… Une petite dédicace sportive aux joueurs de volley et de rugby de « chimie 6 ». Une mention spéciale à Camille, présente depuis plus de 7 ans.

Un grand merci à tous les clermontois qui ont su me rendre la thèse plus agréable au moment difficile. Ils seront se reconnaître…

Pour terminer, je voulais remercier tous mes amis et ma famille pour leur soutien inconditionnel pendant toutes ces études. Enfin, j’adresse un clin d’œil à celui qui m’a supporté et une grosse pensée pour ceux qui ont rythmé mes joies et mes peines pendant ces 3 années, ceux qui sont partis et bien évidemment les derniers arrivés dans la famille…

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE……..……1

CHAPITRE I. Les nanoparticules pour le « théranostic »……...9

1. Intérêt des nanoparticules pour l'imagerie et la thérapie médicale 13

1.1. Définition de nanoparticules 13

1.2. Avantages des nanoparticules – Propriétés uniques 14

1.2.1. Concept de nanoparticules hybrides 14

1.2.2. Rapport surface/volume 15

1.2.3. Contrôle morphologique et dimensionnel 15

1.2.4. Nanoparticules *in vivo* 16

1.3. Design des nanoparticules 16

1.4. Domaines d'application des nanoparticules pour le *in vivo* 16

2. Les différentes familles de nanoparticules 19

2.1. Les nanoparticules « souples » 19

2.1.1. Les liposomes 19

2.1.2. Les micelles 20

2.1.3. Les particules polymériques 20

2.1.4. Nanoparticules lipidiques 21

2.2. Nanoparticules « rigides » 21

2.2.1. Les nanoparticules à base de carbone 21

2.2.2. Les nanoparticules à base de métaux 22

2.2.3. Les nanoparticules à base de silice 23

2.2.4. Les quantums dots 24

2.3. Un large choix de synthèse 24

3. Principe général des nanoparticules multifonctionnelles 26

3.1. Les trois générations de nanoparticules 26

3.2. Nanoparticules multifonctionnelles : Principe général 27

3.3. Stratégies de ciblage 28

3.3.1. Ciblage tumoral passif 28
3.3.2. Ciblage tumoral actif 29

4. Intérêt des nanoparticules pour l'imagerie : cas du cancer de la prostate 30

4.1. Le cancer de la prostate 30
4.2. Diagnostic 30
4.3. Le ciblage des cellules tumorales prostatiques 30
4.3.1. La PSMA 31
4.3.2. Ciblage de la PSMA 31

5. Conclusion 32

CHAPITRE II. Les nanoparticules pour l'upconversion 35

1. Imagerie par fluorescence : enjeux du biomédical 39

1.1. Interactions tissu-lumière – Contraintes liées aux milieux biologiques 39
1.1.1. Phénomènes d'absorption et de diffusion 39
1.1.2. Autofluorescence des tissus 40
1.2. Matériaux luminescents : avantages et inconvénients 42
1.3. Conclusion 43

2. Les matériaux pour l'upconversion 44

2.1. Luminescence des ions de terres rares 44
2.1.1. Configuration électronique des ions de terres rares 44
2.1.2. Luminescence des ions de terres rares 46
2.2. Luminescence par upconversion - Mécanismes 47
2.3. Design des nanoparticules pour l'upconversion 50
2.3.1. Choix des ions dopants 50
2.3.2. Choix de la matrice hôte 52

3. Description du projet 53

3.1. Présentation de la matrice de fluorure 54
3.1.1. Structure cristalline de $NaYF_4$ 54
3.1.2. Synthèse et morphologie 55

3.2. Activation par des ions de terres rares 58
3.3. Amélioration des propriétés optiques 60
3.4. Application pour le biomédical : hydrophilisation des nanoparticules 61
3.5. Conclusion 65
CHAPITRE III. Synthèses et caractérisations de nanoparticules pour l'upconversion 67
1. Synthèse et caractérisation de $NaYF_4:Ln^{3+}$ 71
1.1. $NaYF_4$ dopé Yb^{3+}/Er^{3+} et Yb^{3+}/Tm^{3+} 71
1.1.1. Principe et méthode 71
1.1.2. Caractérisations structurales et morphologiques 72
1.2. $NaYF_4$ dopé Yb^{3+}, Tm^{3+} et Gd^{3+} 74
1.3. Etude des propriétés optiques 75
1.3.1. Spectre d'excitation anti-Stokes de la matrice $NaYF_4$:Yb^{3+}, Er^{3+} 76
1.3.2. Conversion Infrarouge → Visible 76
1.3.3. Conversion Infrarouge → Proche Infrarouge 78
1.3.4. Conversion Infrarouge → Ultraviolet 80
2. Enrobage par une coquille de $NaYF_4$ non dopée 81
2.1. Protocole 82
2.2. Caractérisations structurales et morphologiques 82
2.3. Propriétés optiques 84
3. Conclusion 86
CHAPITRE IV. Hydrophilisation des nanoparticules 89
1. Enrobage par une coquille de silice 93
1.1. Principe et méthode 93
1.2. Protocole 94
1.3. Caractérisations structurale et morphologique 94
1.4. Propriétés optiques 97
1.5. Conclusion 97
2. Echange de ligands : PEG-phosphate 98

2.1. Principe et méthode 98
2.2. Protocoles 99
2.3. Caractérisation des UCNPs PEGylées 99
2.3.1. Spectroscopie Infrarouge 100
2.3.2. Analyse XPS 102
2.4. Conclusion 104
3. Echange de ligands : les dendrons 104
3.1. Principe et méthode 105
3.2. Protocole 106
3.3. Caractérisation du greffage des dendrons 107
3.4. Conclusion 109
4. Conclusion – Comparatif des différentes voies d'hydrophilisation 109
CHAPITRE V. Résultats biologiques et imagerie 113
1. Etude *in vitro* – cytotoxicité et biodistribution 117
1.1. Etude de la cytotoxicité des UCNPs hydrophiles sur les cellules LNCaP 117
1.2. Etude de la biodistribution 119
1.2.1. Microscopie électronique en transmission 119
1.2.2. Microscopie confocale biphotonique 120
1.2.3. Microscopie hyperspectrale CytoViva 120
1.2.4. Conclusion 122
2. Imagerie 122
2.1. Etude de validation du système 123
2.1.1. Injections sous cutanées 124
2.1.2. Injection intramusculaire 124
2.1.3. Conclusion 125
2.2. Etude *in vivo* des UCNPs@dendron sur souris saines 126
2.2.1. Etude de l'élimination des UCNPs@dendron 126
2.2.2. Etude de biodistribution des UCNPs@dendron 128
2.2.3. Conclusion 132

2.3. Etude des UCNPs@dendron sur souris présentant une tumeur 132
2.3.1. Validité de l'imagerie intratumorale 132
2.3.2. Etude de biodistribution des UCNPs@dendron 133
2.4. Etude préliminaire des UCNPs@PEG-phosphate sur souris saines 134
2.5. Conclusion de l'étude *in vivo* 135
3. Etudes *in vitro* et *in vivo* – Conclusion et perspectives 136
CHAPITRE VI. Etude de la matrice $NaLuF_4$ 139
1. Avantages de la matrice $NaLuF_4$ 143
2. Synthèse 143
3. Résultats 144
3.1. Caractérisations structurales et morphologiques 144
3.2. Propriétés optiques 147
4. Imagerie par tomographie par rayon X 149
4.1. Principe de la technique 149
4.2. Premiers essais d'imagerie par tomographie CT 149
5. Conclusion 151
CONCLUSION GENERALE 155
REFERENCES 163
ANNEXES 175
ANNEXE A : TECHNIQUES EXPERIMENTALES DES CARACTERISATIONS 177
ANNEXE B : PRESENTATION ET MISE AU POINT DE L'EQUIPEMENT IVIS SPECTRUM® 179

INTRODUCTION GENERALE

Utiliser la lumière pour observer l'intérieur du corps humain est une idée qui remonte à plusieurs siècles. Il n'est pas nécessaire de disposer d'une source lumineuse particulièrement puissante pour constater que la lumière peut se propager au travers des tissus biologiques peu épais comme la main, sans être complètement absorbée. Cependant, à l'exception de cas très isolés, l'étude optique des tissus biologiques ne s'est que très peu développée avant ces quinze dernières années. En revanche, des techniques d'imagerie reposant sur des phénomènes physiques comme la Résonance Magnétique Nucléaire ont été mises en œuvre beaucoup plus rapidement, et sont aujourd'hui largement employées dans le domaine médical. Dans le domaine de l'imagerie optique, seuls quelques prototypes commencent à être introduits en hôpital. Même si l'absorption de la lumière par les différents constituants des tissus biologiques (eau, hémoglobine, protéines) ne constitue pas un obstacle majeur, cette lacune résulte des difficultés à mettre en œuvre les méthodes optiques à cause des phénomènes d'absorption et surtout de diffusion. Le corps humain est en effet relativement transparent pour des longueurs d'onde rouges et proches infrarouges. C'est pour cette raison que les régions peu épaisses du corps humain (main, oreille, joue) apparaissent rouges lorsqu'elles sont éclairées en transmission par une source blanche. Le rayonnement proche infrarouge, invisible à l'œil, traverse encore mieux les tissus. Le développement de sources puissantes et de détecteurs fonctionnant dans l'infrarouge a donc facilité l'imagerie optique des tissus. Les méthodes sont en général basées sur la conservation de la cohérence spatiale et/ou temporelle : microscopie confocale, interférométrie à faible longueur de cohérence (OCT ou Optical Coherence Tomography) et techniques non linéaires basées par exemple sur la génération d'harmoniques ou l'absorption multiphotonique.

Coupler ces différentes techniques en un même objet est un challenge qui donne lieu actuellement à une recherche intensive. Elle s'appuie en premier sur une ingénierie maîtrisée de nanoparticules (NPs) multifonctionnelles dont la composition et le design répondent à un cahier des charges précis et ciblent l'imagerie multimodale au sens large.

En effet, les nanotechnologies ont fait leur entrée dans le vivant et sont en passe de révolutionner la médecine de demain, puisque ces NPs peuvent s'insérer au cœur des cellules et y importer leurs propriétés physiques. Elles peuvent être à la fois des nano-traceurs pour l'imagerie médicale, des nano-vecteurs pour transporter des agents thérapeutiques à leur cible ou encore des nano-foyers pour brûler les cellules malignes. Combiner ces potentialités revient à inventer et à faire émerger de nouvelles solutions diagnostiques, thérapeutiques et réparatrices à la fois.

Les sondes d'imagerie multimodale contiennent généralement deux ou plusieurs fonctions qui permettent leur détection et leur localisation par des techniques d'imagerie complémentaires. En combinant les avantages de ces différentes techniques, les NPs ont le potentiel multimodal pour s'affranchir des limitations de sensibilité et de résolution qu'une approche d'imagerie unique pourrait avoir.

Les sondes luminescentes nanométriques (nanoluminophores) servant de marqueurs pour visualiser la présence d'espèces auxquelles elles sont attachées à la façon d'une « lanterne » sont des outils incontournables de la biologie actuelle. Elles sont en effet considérées comme des sondes confinant fortement la lumière et désignées par le terme anglais de "hot spots". Cependant, avec peu d'informations sur la localisation anatomique précise et la physiologie de l'organe, la quantification de la concentration de la sonde *in vivo*, dans une région définie ou un volume d'intérêt reste un défi. Un challenge pour le chercheur est de créer de nouveaux édifices ou NPs plus complexes, utilisables efficacement tant sur le plan diagnostic que thérapeutique. Ces NPs multifonctionnelles sont en premier lieu spécifiquement dédiées au ciblage de tumeurs malignes (ou cancéreuses) voire à leur remédiation.

En effet, en France, le cancer représente la première cause de mortalité chez l'homme et la seconde chez la femme. En 2012, le cancer a représenté une des maladies les plus meurtrières puisque sur les 355 000 nouveaux cas de cancer déclarés, 148 000 décès ont été estimés. Le nombre de nouveaux cas de cancers estimés en 2012 a doublé depuis 1980 (+107,6% chez l'homme et + 111,4% chez la femme) et tend à encore doubler d'ici 2030. Cette augmentation est naturellement liée à l'allongement de l'espérance de vie et à l'accroissement de la population mais également à l'exposition de plus en plus fréquente à des facteurs à risques.

Par conséquent, le diagnostic et la thérapie du cancer sont devenus des enjeux sociétaux majeurs dans le domaine de la santé publique. Il est désormais avéré qu'un dépistage précoce du cancer améliore l'efficacité de sa prise en charge. En effet, le diagnostic du cancer à un stade prématuré est devenu indispensable afin de minimiser des traitements lourds et d'augmenter les taux de rémission. De plus, des thérapies moins traumatisantes vont permettre de diminuer les effets secondaires des traitements actuels (principalement chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie).

Dans ce contexte, un nouveau domaine de recherche interdisciplinaire nommé le « théranostic », vocable générique correspondant à la combinaison contractée des termes thérapie et diagnostic, a émergé.

Notre projet, d'ordre interdisciplinaire, s'est inscrit dans cette démarche et a ainsi eu pour but de développer des nouveaux agents multimodaux permettant d'abonder vers le théranostic du cancer de la prostate. Ce cancer est le plus répandu des cancers chez l'homme avec environ 71 000 nouvelles personnes concernées par an en France. Ce cancer étant fortement lié à l'âge, l'augmentation de l'espérance de vie va induire une croissance du risque pour un homme de déclarer un cancer de la prostate au cours de sa vie. Une amélioration de la prise en charge a cependant permis de reculer le nombre de décès suite à ce cancer, ce qui le place actuellement au troisième rang des décès par cancer chez l'homme, après les cancers colorectal et pulmonaire.

Les nanotechnologies, comme souligné plus haut, ont marqué un tournant dans ces recherches et tendent à révolutionner la lutte contre le cancer, tant dans le domaine de la détection précoce que dans de nouvelles approches thérapeutiques.

Ce travail de thèse est ancré dans ce contexte puisqu'il a pour but le développement de NPs luminescentes dont les propriétés optiques particulières vont permettre un diagnostic du cancer de la prostate sans endommagement majeur des tissus ainsi qu'une possible thérapie localisée. Dans un premier temps, le défi majeur est de mettre à profit des propriétés de luminescence anti-Stokes afin d'imager en profondeur dans la fenêtre de faible absorption des tissus, grâce à la combinaison duale d'une excitation et d'une émission se produisant dans le proche infrarouge. Dans un second temps, l'aspect thérapie localisée *in situ* peut-être envisagé. En effet, l'idée est de convertir, au voisinage de tumeurs malignes, un rayonnement excitateur infrarouge en rayonnement ultraviolet, qui lui est susceptible d'être fortement absorbé et ainsi engendrer une destruction de la tumeur ciblée.

La stratégie est de synthétiser des NPs « intelligentes » de type cœur/coquille dont les différentes composantes seront élaborées comme suit. Le cœur inorganique, de taille et de morphologie contrôlées, permettra d'apporter les propriétés de luminescence permettant le diagnostic ou la thérapie selon sa composition. La coquille permettra, quant à elle, d'améliorer la biocompatibilité et la furtivité des nano-objets et offrira la possibilité de venir greffer à leur surface des vecteurs ou clés de reconnaissance spécifiques de cellules tumorales.

L'étude biologique de ces NPs innovantes est alors un point crucial de cette étude. Dans un premier temps, l'analyse *in vitro* permet d'apprécier leur potentielle toxicité ainsi que leur biodistribution au sein des cellules. Dans un second temps, l'imagerie des nano-objets *in vivo*, qui est le point décisif de ce projet, rendu possible grâce à l'acquisition d'un équipement d'imagerie sur petit animal, est abordée. Le développement et la mise au point de cet appareil est un outil important de validation des capacités optiques des NPs élaborées. Outre cet aspect, l'imagerie sur le petit animal permet aussi d'étudier la toxicité, la biodistribution et les processus d'élimination des NPs luminescentes.

Le premier chapitre de ce manuscrit est dédié aux nanotechnologies utilisées actuellement pour le théranostic des cancers. Après avoir présenté l'intérêt des NPs dans le domaine du médical et plus particulièrement pour l'imagerie et la thérapie, les différentes NPs décrites dans la littérature sont répertoriées. Par la suite, le principe général des NPs multifonctionnelles dans le médical est décrit, amenant ainsi vers les différentes techniques de ciblage tumoral. Enfin, le cas du cancer de la prostate est exposé ainsi que la stratégie à adopter afin de cibler particulièrement ce type de tumeur.

Le second chapitre est consacré à une étude bibliographique des NPs luminescentes pour l'imagerie médicale par fluorescence mettant ainsi en avant les différents enjeux de cette technique. Les NPs à luminescence anti-Stokes, ou par upconversion, utilisées dans ce travail sont présentées par la suite

afin de comprendre les mécanismes optiques. Par ailleurs, nous avons focalisé notre projet autour de la matrice $NaYF_4$ avec les synthèses référencées, l'optimisation des propriétés optiques et, enfin, les différentes voies d'hydrophilisation possibles.

Le troisième chapitre traite de la synthèse des cœurs luminescents $NaYF_4$ par décomposition thermique et de l'étude de leurs propriétés optiques, ainsi que de l'amélioration de ces dernières par l'ajout d'une coquille non dopée.

Dans le quatrième chapitre, différentes voies d'hydrophilisation sont présentées permettant de rendre les NPs biocompatibles et stables dans un milieu physiologique. Deux méthodes sont présentées : l'enrobage par une coquille de silice et l'hydrophilisation par échange de ligands hydrophiles.

Le cinquième chapitre est axé sur l'étude biologique *in vitro* et *in vivo* des NPs hydrophiles précédentes. La première partie présente l'étude de la cytotoxicité des nano-objets sur des cultures cellulaires ainsi que l'étude de la biodistribution *via* différentes techniques de microscopie. La seconde partie permet de mettre en avant l'intérêt de ces NPs pour réaliser de l'imagerie sur le petit animal. De plus, les résultats des essais de biodistribution et de processus d'élimination sur le petit animal sont présentés.

Le dernier chapitre est consacrée à un autre cœur de fluorure, $NaLuF_4$, dont la composition permet d'accroître les propriétés de luminescence anti-Stokes ou upconversion mais également de pouvoir réaliser de l'imagerie par tomographie par rayons X. Ce chapitre « bonus » est un travail complémentaire qui ouvre la voie à des NPs multimodales.

Enfin, nous résumons l'ensemble des résultats obtenus, et différentes perspectives pour la suite de ce projet sont exposées.

CHAPITRE I.
Les nanoparticules pour le « théranostic »

SOMMAIRE

1. Intérêt des nanoparticules pour l'imagerie et la thérapie médicale 13

1.1. Définition de nanoparticules 13

1.2. Avantages des nanoparticules – Propriétés uniques 14

1.2.1. Concept de nanoparticules hybrides 14

1.2.2. Rapport surface/volume 15

1.2.3. Contrôle morphologique et dimensionnel 15

1.2.4. Nanoparticules *in vivo* 16

1.3. Design des nanoparticules 16

1.4. Domaines d'application des nanoparticules pour le *in vivo* 16

2. Les différentes familles de nanoparticules 19

2.1. Les nanoparticules « souples » 19

2.1.1. Les liposomes 19

2.1.2. Les micelles 20

2.1.3. Les particules polymériques 20

2.1.4. Nanoparticules lipidiques 21

2.2. Nanoparticules « rigides » 21

2.2.1. Les nanoparticules à base de carbone 21

2.2.2. Les nanoparticules à base de métaux 22

2.2.3. Les nanoparticules à base de silice 23

2.2.4. Les quantums dots[45, 4645, 46] 24

2.3. Un large choix de synthèse 24

3. Principe général des nanoparticules multifonctionnelles 26

3.1. Les trois générations de nanoparticules 26

3.2. Nanoparticules multifonctionnelles : Principe général 27

3.3. Stratégies de ciblage 28

3.3.1. Ciblage tumoral passif 28

3.3.2. Ciblage tumoral actif 29

4. Intérêt des nanoparticules pour l'imagerie : cas du cancer de la prostate 30

4.1. Le cancer de la prostate 30

4.2. Diagnostic 30

4.3. Le ciblage des cellules tumorales 30

4.3.1. La PSMA 31

4.3.2. Ciblage de la PSMA 31

5. Conclusion 32

1. Intérêt des nanoparticules pour l'imagerie et la thérapie médicale

De nos jours, les nanoparticules (NPs) dans le domaine du vivant et plus particulièrement pour la nanomédecine[1] sont devenues incontournables. De par leurs versatilités, les nanoparticules sont en pleine effervescence. Les nanotechnologies utilisées en cancérologie[2] représentent alors un champ de recherche interdisciplinaire, regroupant la biologie, la chimie, l'ingénierie et la médecine.

Dans le cas d'une application en cancérologie, le but est de parvenir à une concentration minimale d'agents thérapeutiques dans les sites tumoraux, permettant une détection non invasive et/ou une destruction de cellules cancéreuses tout en minimisant les dommages potentiels des cellules saines environnantes. Ce dispositif permettrait alors d'avoir une prise en charge précoce des patients permettant ainsi d'augmenter les taux de survie. Dans cette optique, il est primordial de créer des agents multifonctionnels, porteurs d'une contribution majeure dans la thérapie et le diagnostic de cancers[3], domaine connu sous le terme de théranostic (ou théranostique).

1.1. Définition de nanoparticules

Une nanoparticule est un objet ayant au moins une de ses dimensions inférieure à 100 nm (10^{-7}m), résultant de l'assemblage de quelques centaines à quelques milliers d'atomes[4]. Il en existe une variété quasi-infinie, certaines à l'état naturel, d'autres développées par l'homme[5].

A titre de comparaison avec des structures naturelles, les nanoparticules se situent dans la gamme de taille des protéines (figure 1).

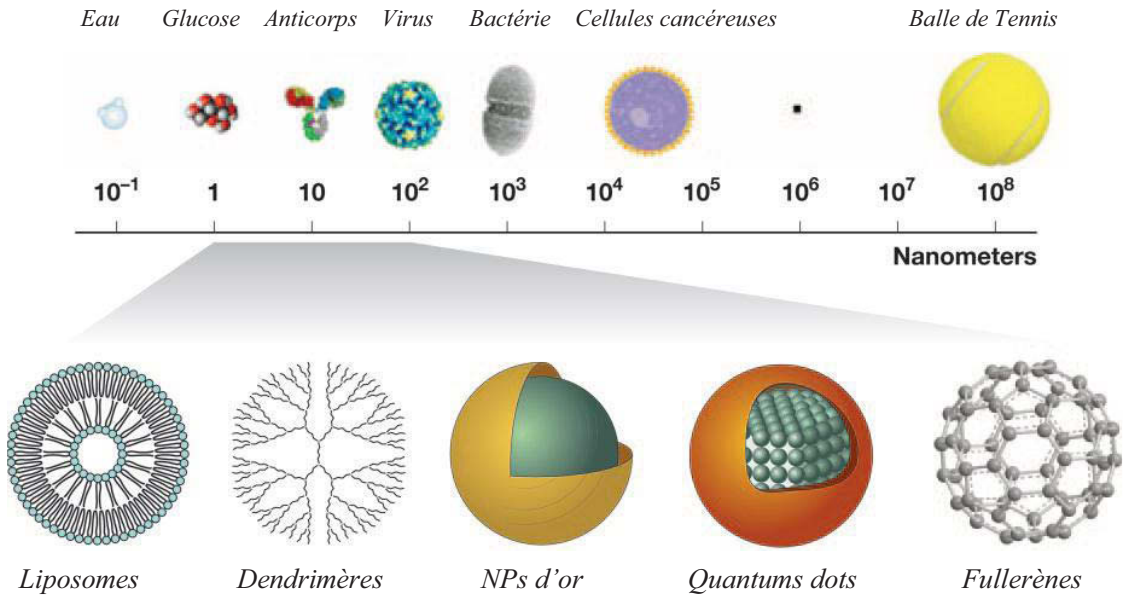


Figure 1 : Echelle logarithmique présentant le domaine dimensionnel des nanoparticules[6]

1.2. Avantages des nanoparticules – Propriétés uniques

Les nanoparticules possèdent des propriétés qui les distinguent du même composé macroscopique, du fait de leurs faibles tailles et de l'ingénierie qu'elles offrent. Les quatre principales propriétés qui font des nanoparticules des objets uniques pour la nanomédecine sont développées ci-dessous.

1.2.1. Concept de nanoparticules hybrides

Les avantages des nanoparticules sont le large choix de compositions apportant des propriétés intrinsèques, leurs enrobages et les différents ajouts possibles (ligands…) permettant ainsi d'utiliser la nanoparticule comme une plateforme sur laquelle viennent s'assembler des structures bien définies : à savoir qu'une modification, même infime, d'une de ces composantes va pouvoir entrainer une multitude de possibilités dans le domaine de la biologie.

Il est alors utile d'introduire le terme de nanoparticules hybrides qui est une combinaison à l'échelle nanométrique ou moléculaire de composantes généralement organiques et inorganiques. Dans le cas de nanoparticules fonctionnelles, différentes stratégies sont envisageables :

- La structure homogène : la partie organique est répartie de façon uniforme dans la matrice minérale
- Les nanoparticules de type « cœur-coquille »[7]
- Les nanoparticules multicouches : la diversité des couches inorganiques et/ou organiques va permettre d'accroitre les propriétés des particules
- La structure multifonctionnelle, qui est la combinaison des possibilités citées ci-dessus

Ces différentes particules sont brièvement schématisées dans la figure 2.

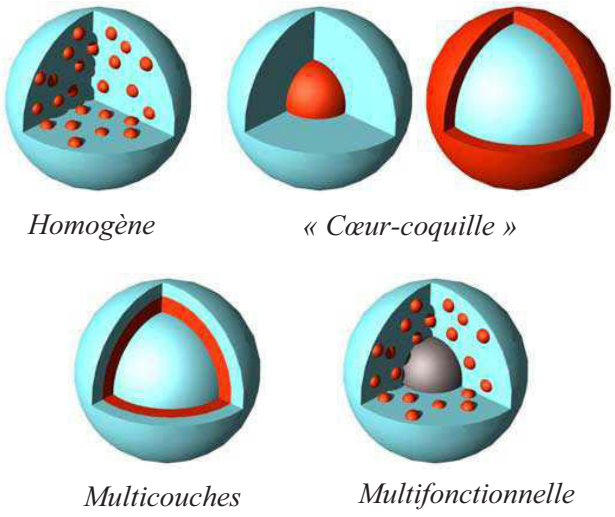


Figure 2 : Exemples des différentes architectures de nanoparticules hybrides
(bleu : composante inorganique / rouge : composante organique)[8]

1.2.2.Rapport surface/volume

Le diamètre nanométrique[5] des nanoparticules implique une grande surface spécifique pouvant entrainer une modification des propriétés chimiques, mécaniques, optiques, électriques et magnétiques.

En effet, plus la particule est petite, plus une grande proportion des atomes qui la constituent se trouve à la surface. A titre d'exemple, le rapport surface/volume pour une particule de 60 nm de diamètre est 1000 fois plus important qu'une particule possédant un diamètre de 60 µm. Comme le matériau sous forme nanométrique présente une surface plus importante, la réactivité est alors fortement améliorée.

1.2.3.Contrôle morphologique et dimensionnel

Dans le cas d'applications biologiques, la forme géométrique des nanoparticules, ainsi que leur taille, sont des facteurs cruciaux puisqu'ils modifient leurs propriétés physico-chimiques. Le très large choix de synthèses, développées à l'heure actuelle, permet de faire varier ces paramètres et d'accéder ainsi à une multitude de nano-objets avec une forme (sphères, tubes, cubes, prismes…) et des tailles différentes. Ceci est rendu possible grâce à une croissance sélective d'une phase cristallographique. De nombreuses études ont été réalisées afin d'évaluer les effets de ces paramètres sur l'accumulation de nanoparticules[9-11].

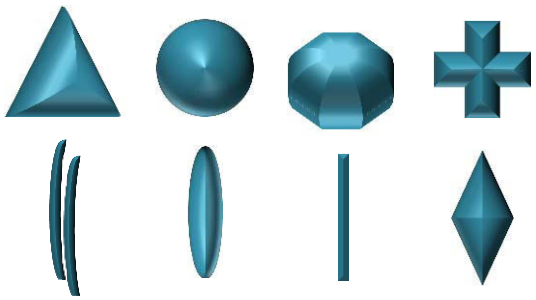


Figure 3 : Différentes formes possibles pour les nanoparticules (liste non exhaustive)

La morphologie des nanomatériaux peut avoir des effets sur la cinétique de dépôt et d'absorption dans le corps. Par exemple, Gratton et al[9] ont déterminé l'influence de la forme d'une nanoparticule de plus de 100 nm sur l'absorption dans les cellules : les bâtonnets montrent la plus forte absorption, suivie par les sphères, les cylindres et les cubes. Dans les études avec des nanoparticules de 100 nm, les sphères présentent un avantage sensible par rapport aux bâtonnets[12].

En ce qui concerne la taille finale des nano-objets, celle-ci impactera les lieux d'accumulation des nanoparticules dans le corps. Comme le décrit en détail la partie 3 de ce chapitre, les nanomatériaux les plus larges auront tendance à s'accumuler dans des zones de faible vascularisation (comme une tumeur solide) alors que des nanoparticules dont le diamètre est inférieur à 5nm s'élimineront par le système rénal.

1.2.4. Nanoparticules *in vivo*

Un des avantages de ces particules de petites tailles est sa pénétration aisée dans les tissus et même les cellules, permettant aux cliniciens et médecins de cibler et détecter des changements histopathologiques, cellulaires et même moléculaires pendant un diagnostic ou un traitement. Ce sont donc leurs capacités à éviter les défenses immunitaires et leur capacité à cibler une population spécifique qui en font des vecteurs prometteurs.

1.3. Design des nanoparticules

Afin d'être utilisées à des fins d'imagerie *in vivo*, les nanoparticules doivent répondre à certaines exigences[13] :

- *Les propriétés physico-chimiques* : Les nano-objets étant incorporés dans un milieu biologique, ils doivent être stables et ne doivent pas être dégradés ou rejetés par le milieu environnant. La stabilité en solution est donc primordiale pour ce type d'applications. En effet, le but des particules est de pouvoir circuler *via* le flux sanguin jusqu'à des cellules ou tissus dits « cibles » puis être éliminées.

- *La taille* : Il est préférable que leur diamètre soit compris entre 30 et 150 nm. En effet, des nanoparticules plus petites seraient filtrées rapidement à travers le système rénal et des nanoparticules plus larges seraient retenues dans le système réticulo-endothélial (RES), y compris les ganglions lymphatiques, le foie et la rate. Des nano-objets dont le diamètre est compris dans la gamme citée pourront circuler dans le corps dans le but de s'accumuler dans un lieu spécifique et ainsi améliorer les performances de détection et/ou thérapie.

- *La concentration des agents* : Ce critère est largement dépendant des méthodes de détection et de la sensibilité de l'appareil utilisé. Dans le cas de thérapie, le but est d'atteindre une concentration minimale en nano-agents au niveau des tumeurs afin de détruire les cellules cancéreuses sans endommager les cellules saines.

- *Le nombre de fonctions ciblantes* : Cette caractéristique est importante pour avoir un ciblage efficace et est en relation avec le type de cible et les ligands utilisés (cf partie 3 du chapitre I).

1.4. Domaines d'application des nanoparticules pour le *in vivo*

De nombreux domaines de recherche se sont ouverts à ces nouveaux matériaux dits « intelligents ». En effet, la modulation de la composition et des propriétés structurales ou morphologiques des nanoparticules va permettre d'adapter tout nanomatériau à des applications spécifiques.

Un des domaines les plus étudiés actuellement est la délivrance d'excipients ou d'agents thérapeutiques[14, 15], connue sous le nom de « drug delivery », permettant en particulier des applications en oncologie pour réaliser de la thérapie ciblée. *Via* une vectorisation en surface des nanoparticules, il devient alors possible de concentrer des nanoparticules porteuses de principes actifs dans des zones cibles. La thérapie ciblée et personnalisée est alors envisageable, permettant d'augmenter la sélectivité des tumeurs à traiter et ainsi réduire les effets néfastes des chimiothérapies utilisées actuellement.

Le diagnostic, à savoir principalement l'imagerie médicale, représente un domaine d'application majeur auquel la nanomédecine peut apporter de réelles améliorations. En effet, selon leurs compositions, les nanoparticules jouent le rôle de traceurs ou d'agents de contraste. A l'heure actuelle, un très grand nombre de techniques d'imagerie est utilisé en clinique et leur développement est devenu d'un intérêt majeur. On peut citer brièvement les techniques suivantes[13] : l'imagerie par fluorescence, l'ultrasonographie (échographie), l'imagerie par rayons X, la tomographie par émission de positons (PET-scan) ou encore l'imagerie par résonnance magnétique (IRM). Ces techniques sont dites non invasives et peu traumatisantes. Elles utilisent des rayonnements répartis sur l'ensemble du spectre électromagnétique comme le montre la figure 4.

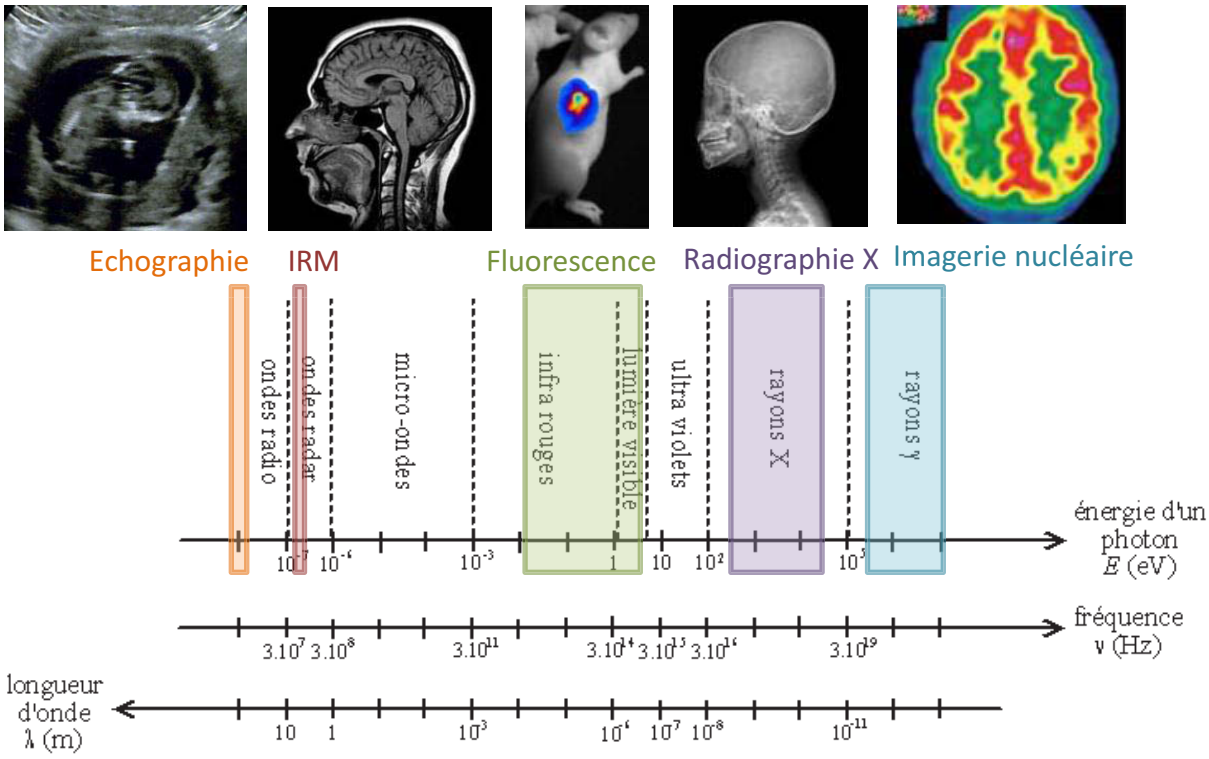


Figure 4 : Représentation des modalités d'imagerie en fonction des ondes électromagnétiques utilisées

Le terme « théranostic » est né au cours de la dernière décennie et défini l'association des applications thérapeutiques et diagnostiques (figure 5). Le but est ici d'avoir des nanoparticules permettant un diagnostic efficace, une délivrance de médicaments ou thérapie (*via* hyperthermie par exemple) tout en contrôlant la réponse à la thérapie appliquée[16-19].

Ce concept novateur implique donc que la combinaison des deux outils permettrait une posologie ciblée, une gestion plus aisée des malades grâce à un traitement personnalisé, une diminution des risques liés aux traitements et une réduction des coûts.

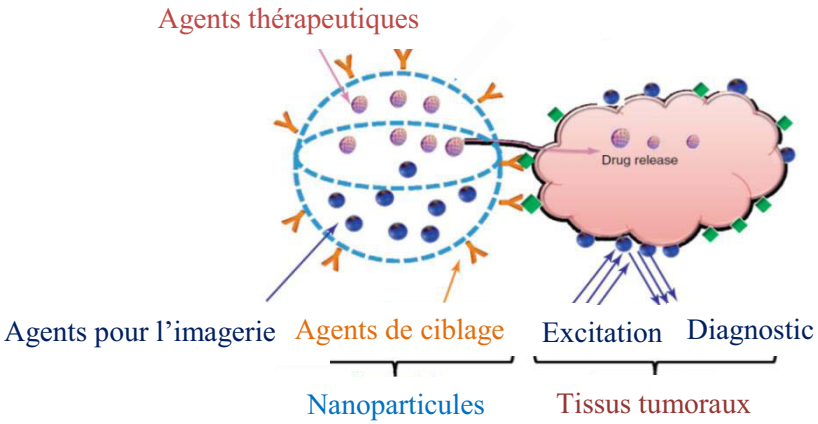


Figure 5 : Illustration du concept de théranostic grâce aux nanoparticules[17]

Le perpétuel développement des nanoparticules ouvre donc la voie à de nouvelles perspectives et les nanoparticules multifonctionnelles tendent alors à remplir deux ou plusieurs fonctions comme le présente la figure 6.

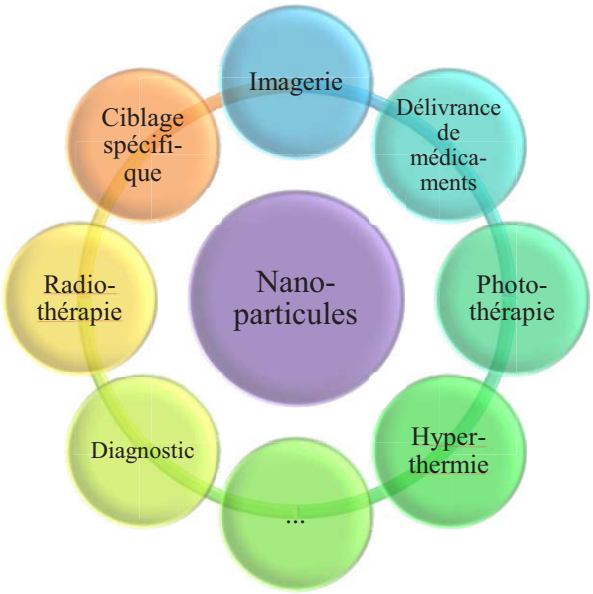


Figure 6 : Différentes fonctions envisageables des nanoparticules pour le théranostic

Par exemple, de nombreuses études sont réalisées à l'heure actuelle sur des nanoparticules d'oxyde de fer[20, 21] aux propriétés magnétiques intéressantes : ces nanoparticules sont à la fois utilisées en tant qu'agents de contraste pour l'IRM et en tant qu'agents thérapeutiques. Leurs propriétés magnétiques autorisent leur guidage dans le corps par l'action d'un champ magnétique, visant à concentrer les nano-objets dans les zones cibles, puis à réaliser une thérapie par hyperthermie en provoquant leur échauffement sous l'action d'un champ magnétique plus intense.

Ce challenge a également été abordé avec l'utilisation de nanoparticules possédant des propriétés optiques spécifiques qui seront développées dans le second chapitre de ce manuscrit. Notre projet s'inscrit dans ce cadre et tend à développer des objets multifonctionnels.

2. Les différentes familles de nanoparticules

De nombreuses nanoparticules ont été étudiées et testées pour l'imagerie et/ou la thérapie. La liste ci-dessous est une liste non exhaustive et ne relate que les nanoparticules les plus couramment utilisées. Il est possible de les classer en deux catégories selon leurs propriétés physico-chimiques : « souples » et « rigides ».

2.1. Les nanoparticules « souples »

Ce type de nanoparticules sont des matériaux organiques (lipides, protéines, polymères) et peuvent voir leur forme changer si elles sont sollicitées mécaniquement ou en contact avec une surface.

2.1.1. Les liposomes

Ce sont des nanoparticules d'inspiration biologique puisqu'elles prennent exemple sur l'organisation des membranes cellulaires. Il s'agit d'une structure vésiculaire constituée d'une bicouche phospholipidique concentrique et d'un cœur aqueux. Cette organisation spontanée est dûe au caractère amphiphile des phospholipides. Leur taille varie entre 50 nm et plusieurs micromètres.

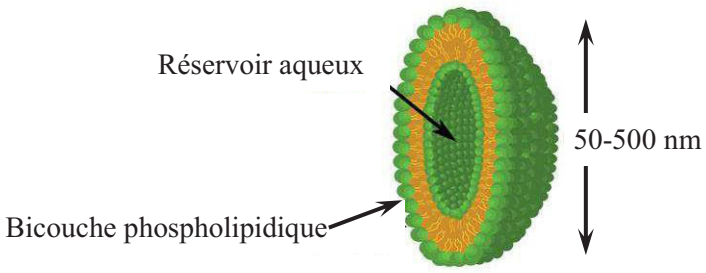


Figure 7 : Représentation d'un liposome[22]

Ce type de particule a été largement utilisé comme outils pour la dermatologie[22], la biologie, et la médecine[23] en tant que transporteurs (ou « cargos ») de principes actifs ou d'agents d'imagerie. A l'heure actuelle, des formulations d'agents anticancéreux ont fait leurs preuves comme le doxorubicin (doxil®) par exemple[24].

De par leur taille, leurs caractères hydrophiles et hydrophobes ainsi que leur biocompatibilité, les liposomes représentent des candidats idéaux pour ce type d'applications *in vivo*. De plus, il est possible de moduler leur taille, composition, charge de surface grâce aux différentes méthodes de synthèse permettant de développer une grande variété de nano-objets. Cependant les liposomes présentent plusieurs inconvénients tels qu'une faible capacité d'encapsulation, une stabilité modérée et une libération précoce des principes actifs dans le sang.

2.1.2.Les micelles

Ce sont des auto-assemblages de molécules amphiphiles qui forment ainsi des structures de type « cœur-coquille ». Le caractère amphiphile de ces molécules est dû à la présence d'un pôle hydrophile s'orientant vers les éléments aqueux et d'un pôle hydrophobe s'orientant vers les éléments organiques. Ces molécules s'auto-assemblent donc pour regrouper leurs parties hydrophobes et exposer leurs parties hydrophiles en surface. Différents types de micelles peuvent être obtenues selon le surfactant utilisé[25] : micelles à base de phospholipides ou de surfactants pegylés, micelles à base de copolymères… Les micelles polymériques sont très stables *in vitro* et *in vivo*, biocompatibles et ont fait déjà l'objet d'essais cliniques[26].

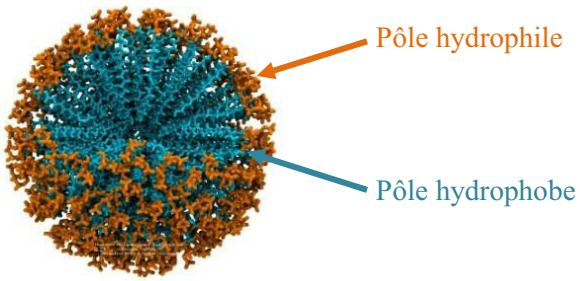


Figure 8 : Représentation d'une micelle

2.1.3.Les particules polymériques

La plupart des nanoparticules polymériques utilisées en nanomédecine sont biocompatibles et ont l'avantage d'être biodégradables par l'organisme. Elles sont également propices à l'encapsulation et à la délivrance d'une gamme importante de molécules thérapeutiques. Différents polymères ont été étudiés pour former ces nanoparticules : le poly(acide lactique) (PLA), le poly(acide glycolique) (PGA) et le poly(lactide-coglycolide) (PLGA) étant les plus fréquemment utilisés. De plus, l'utilisation de copolymères à blocs, par exemple un bloc hydrophobe et un bloc hydrophile, permet d'obtenir des particules fonctionnalisées capables d'améliorer leur biodistribution.

Différentes stratégies sont employées avec ce type de nanoparticules comme le présente la figure 9. En effet, les polymères peuvent se présenter soit sous la forme de nanosphères constituées de matrice de polymère dans laquelle le principe actif est dispersé ou adsorbé en surface, soit sous la forme de nanocapsules comportant un réservoir dans lequel le principe actif est protégé par une fine paroi de polymère de quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur[27] (de même le principe actif peut être adsorbé en surface).

Leur principal point faible provient de leur toxicité non négligeable, une fois ces polymères structurés sous forme de nanoparticules, et la présence de solvants organiques utilisés pour leur élaboration reste problématique.

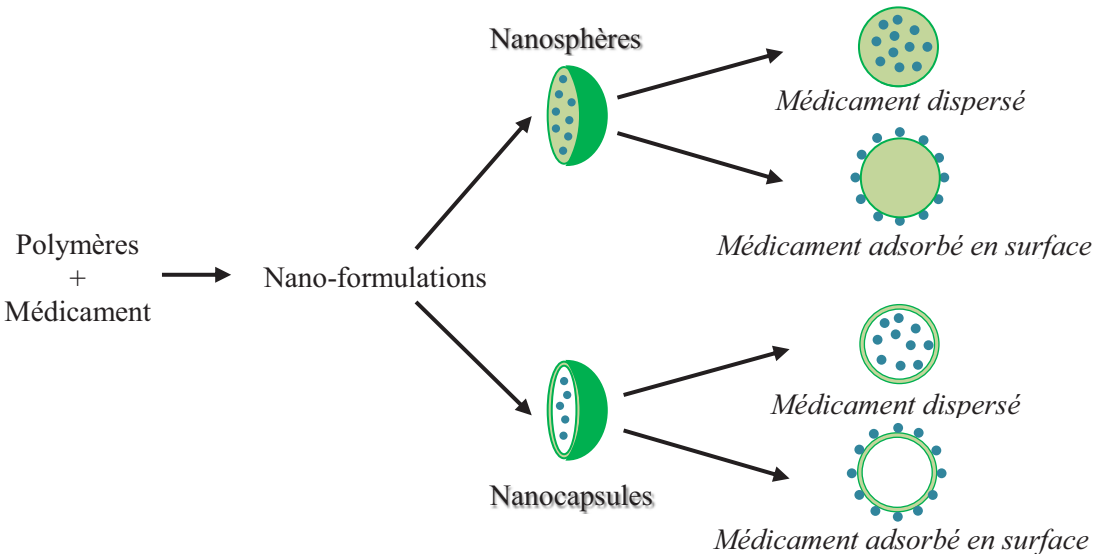


Figure 9 : Différentes stratégies de formation de nanoparticules polymériques pour la délivrance de principe actif [27]

2.1.4. Nanoparticules lipidiques

Ces nanoparticules, constituées d'un cœur lipidique, généralement à base de triglycérides, biodégradables et non toxiques, peuvent être de nature diverse :

- *Les SLN*[28] (« Solid Lipid Nanoparticles ») ou nanoparticules lipidiques solides sont constituées d'une matrice de lipides qui est solide à température ambiante (ainsi qu'à la température du corps humain). Cette matrice plus ou moins cristallisée est ensuite stabilisée par une couche de surfactants. Ces particules ont l'avantage d'être plus stables que les liposomes et peuvent également encapsuler une quantité supérieure de molécules lipophiles. Cependant ces particules présentent des inconvénients tels qu'une augmentation de la taille des nanoparticules ou une tendance à gélifier de manière imprévue.
- *Les LNC*[29] (« Lipid NanoCapsules ») ou nanocapsules lipidiques qui sont constituées d'un cœur lipidique liquide entouré d'une coquille solide.
- *Les lipoprotéines d'origine naturelle ou synthétique*.

2.2. Nanoparticules « rigides »

Ces nanoparticules rigides sont composées d'un cœur inorganique et qui nécessitent, dans le cas d'application médicale, un enrobage par une composante biocompatible.

2.2.1. Les nanoparticules à base de carbone

La grande diversité de morphologie et de composition des nanoparticules à base de carbone leur confère de grandes propriétés pour les applications médicales[30]. Les principales sont les suivantes et sont représentées dans la figure 10.

- *Les fullerènes* : ce sont des cages constituées d'atomes de carbone qui sont liés entre eux en hybridation sp^2. Ces structures peuvent contenir de 28 à 1500 atomes de carbone mais la forme la plus étudiée est le C_{60}. Cette dernière est sphérique et possède 60 atomes de carbone. Il est également possible de créer des fullerènes multicouches dont les dimensions vont de 4 à 36 nm. La forme C_{60} est couramment utilisée en tant que plateforme pour le théranostic *via* l'addition d'agents en surface tels que des nanoparticules d'oxyde de fer[31] ou des atomes métalliques[32]. En outre, une modification chimique de la structure va permettre la délivrance ciblée de gènes ou de médicaments[33].

- *Les nanofeuillets de carbone* : Le graphite est composé d'une série de couches superposées d'un réseau hexagonal d'atomes de carbone dont chaque atome est lié à 3 carbones voisins dans un réseau planaire. Lorsque ces couches sont séparées en monocouche, d'épaisseur de l'ordre du nanomètre, il est possible d'obtenir des feuillets de graphène. Ce matériau possède des propriétés très intéressantes : une surface spécifique élevée (2630 m^2/g), une conductivité électronique exceptionnelle et une forte résistance mécanique. De même que pour les fullerènes, une fonctionnalisation aisée de ce composé va permettre des applications en théranostic (délivrance de médicaments)[34].

- *Les nanotubes de carbone :* Enroulés dans un réseau hexagonal d'atomes de carbones constituant une nanofeuille de graphène, ces cylindres creux peuvent avoir des diamètres inférieurs à 1 nm et des longueurs atteignant plusieurs millimètres. Les nanotubes peuvent avoir une seule ou plusieurs couches, pouvant ainsi atteindre des diamètres de 100 nm. Ces particules sont largement étudiées puisque leur fonctionnalisation va permettre de réaliser de la délivrance de molécules thérapeutiques[35, 36].

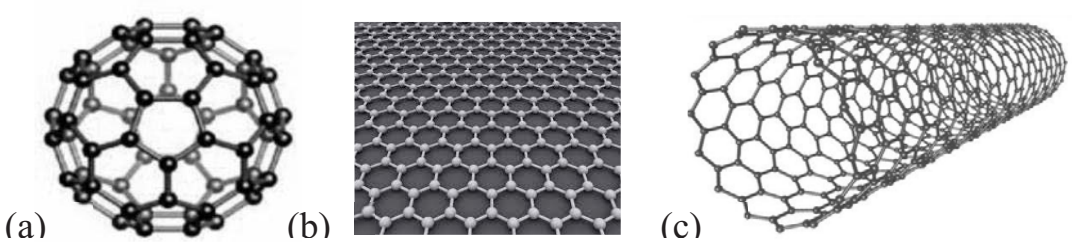


Figure 10 : Représentation schématique (a) fullerène C_{60} (b) nanofeuillets de carbone (c) nanotubes de carbone

Ces nanoparticules ont été étudiées *in vitro* et *in vivo* et ont montré une cytotoxicité significative, avec un effet important lié à la forme et la taille[37-39].

2.2.2. Les nanoparticules à base de métaux

La majorité des métaux a été étudiée à l'échelle nanométrique ce qui a permis de mettre en évidence l'intérêt de certains d'entre eux pour des applications médicales. D'une manière générale, les nanoparticules dites « métalliques » sont constituées d'un cœur et/ou d'une coquille métallique ou d'oxydes métalliques.

Différents métaux tels que l'or[40], l'argent[41], les oxydes de fer[20, 21] ou le cuivre[42] ont permis des applications médicales telles que l'imagerie par résonnance magnétique, la libération de molécules, la thérapie photothermique…

Pour imager ces nanoparticules, chacune des techniques mises en œuvre utilise des propriétés différentes et donc des équipements variés. Par exemple, les nanoparticules d'or peuvent être imagées grâce à leurs propriétés de résonnance plasmon de surface alors que les nanoparticules d'oxydes de fer utilisent leurs propriétés magnétiques. La figure 11 illustre la multifonctionnalité de ces dernières.

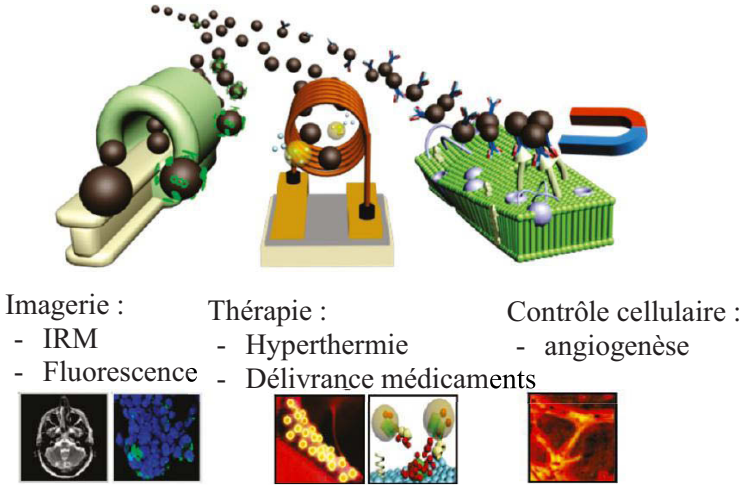


Figure 11 : Exemple des nanoparticules d'oxydes de fer, véritable plateforme pour le théranostic[43]

2.2.3. Les nanoparticules à base de silice

Ce type de nanoparticules, et plus particulièrement leur synthèse, a largement été étudié, permettant ainsi d'avoir un contrôle aisé de leur taille et de leur morphologie, notamment *via* des procédés par chimie douce ou sol-gel (méthode Stöber, émulsion inverse…)[8].

La silice est fréquemment utilisée puisqu'elle possède des propriétés chimiques et mécaniques de choix pour des applications médicales et plus particulièrement pour l'imagerie optique. En soit, la silice ne possède pas de propriétés intéressantes pour réaliser de l'imagerie mais ce matériau est biocompatible et est utilisé en tant que coquille pour certains matériaux possédant une toxicité intrinsèque. Elle se combine ainsi facilement à des agents d'imagerie. Par exemple, la silice est transparente dans sur une gamme de longueurs d'onde allant de l'ultraviolet à l'infrarouge. Les particules peuvent donc être rendues luminescentes par l'incorporation d'ions de terres rares, tel que l'Europium trivalent (Eu^{3+})[8].

Par ailleurs, les nanoparticules de silice sont fréquemment utilisées sous forme mésoporeuse, devenant un matériau de choix pour l'encapsulation d'agents tels que des nanoparticules d'or ou d'oxydes de fer. Ces particules représentent ainsi une plateforme d'intérêt pour fixer un large choix de fonctions d'imagerie ou thérapeutique et son caractère mésoporeux en fait également un excellent candidat pour la libération contrôlée de médicaments.

2.2.4. Les quantums dots

Les quantums dots[43, 44] (QDs) sont des nanocristaux de semi-conducteurs dont la taille varie de 2 à 10 nm. Leur propriété de fluorescence repose sur un effet de confinement quantique dû au nombre réduit d'atomes dans le cristal. Cette propriété n'est donc pas observée sur le même composé à l'échelle macroscopique. Les quantums dots les plus étudiés en biologie présentent les formules suivantes : CdSe/CdS, CdSe/ZnS, ZnSe/ZnS et CdTe/DdS. Leur taille peut être parfaitement contrôlée grâce aux paramètres de synthèse tels que le temps de croissance des cristaux et la concentration en précurseurs. Comme illustré dans la figure 12, les longueurs d'onde d'émission peuvent être modulées grâce à la variation de taille des particules. De plus, les QDs présentent des intensités de luminescence et des absorbances élevées, et sont insensibles au photoblanchiment.

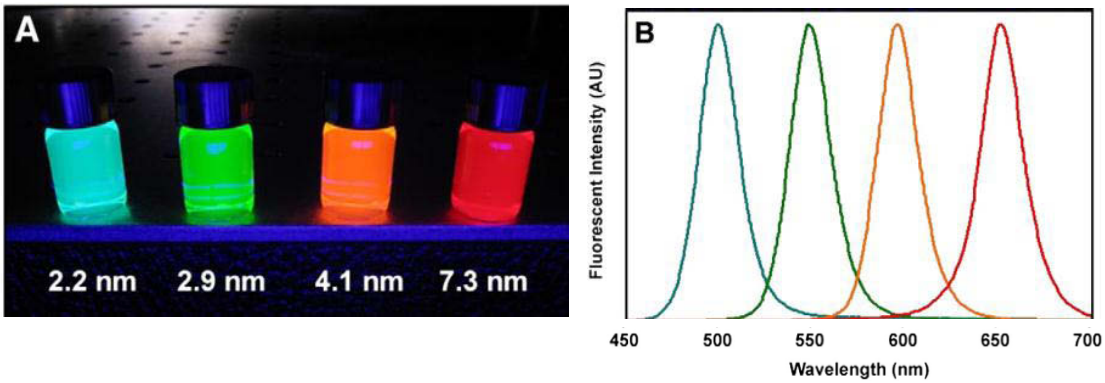


Figure 12 : Influence de la taille sur les propriétés optiques de CdS (A) Image de fluorescence des quantums dots sous excitation UVB selon leur taille (B) Spectre de fluorescence des quantums dots[46] - La taille des quantums dots augmente de gauche à droite, modulant l'émission du bleu au rouge.

Les principaux inconvénients de ces composés sont une toxicité élevée dûe aux métaux qui les forment ainsi qu'un effet de scintillement (« photoblinking ») de leur luminescence. De plus, leur durée de vie de fluorescence est faible, ne permettant ainsi que des observations à temps courts.

2.3. Un large choix de synthèse

Le fort potentiel des nanoparticules précédentes a permis d'établir une large variété de synthèses qui sont listées le tableau 1[47].

On distingue ainsi deux types d'approche : le *top-down* (approche descendante) et le *bottom-up* (approche ascendante). La première approche consiste en une miniaturisation des technologies actuelles. Elle utilise des matériaux massifs qui sont taillés afin de fabriquer des composants de plus en plus petits et pouvant atteindre jusqu'à 100 nm. La seconde approche utilise les propriétés d'auto-assemblage de molécules ou d'atomes en nanostructures. Cette technique semble la plus prometteuse puisqu'elle permet d'atteindre des tailles encore plus infimes, support de nouvelles nanotechnologies.

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différentes techniques de synthèse de nanoparticules[47]

Voie de synthèse	Milieu de synthèse	Technique de synthèse	Principe de synthèse	Méthode employée	Exemple de nanoparticules obtenues
Bottom-up (création de nanoparticules en partant du niveau moléculaire)	Phase gazeuse	Synthèse en phase gazeuse	Nucléation homogène obtenue à partir d'une vapeur saturée suivie d'une croissance des nanoparticules par condensation et collisions entre les nucléus	Pyrolyse par flamme	Silice évaporée, TiO_2
				Réacteurs à flux haute température	Ag, Ga, Al, PbS, Pb, Si, Ge
				Vaporisation et pyrolyse obtenues par un laser	Silice, Fer
				Plasma couplé aux microondes	Métalliques, oxydes métalliques
				Pulvérisation	Métalliques
				Ablation laser	Carbone
		Dépôt de vapeur	Formation d'une vapeur suivie d'une réduction et d'une oxydation qui permettent de déposer la vapeur formée par îlots sur une surface	Pyrolyse	TiO_2, ZnO, SiC, nanotubes de carbone
	Phase liquide	Synthèse colloïdale (ou synthèse par voie humide)	Basée sur le procédé de précipitation en solution. Le contrôle des paramètres (T, P) permet d'obtenir des précipités insolubles. Le contrôle de la nucléation et de leur cinétique de croissance permet d'obtenir des particules de taille et de forme variées	En gros volume (bulk volume)	Métalliques, oxydes métalliques, nanoparticules organiques
				Systèmes confinés (Micelles, micelles inverses et microémulsion bicontinue)	
				Méthode aux ultrasons (ou sonochimie)	
				Synthèse polyol	Oxydes organiques
		Méthode de l'autoassemblage moléculaire	Le contrôle de la taille et de la forme des nanoparticules se fait par le choix du bloc copolymère et par le choix du solvant et des conditions d'autoassemblage	Processus spontané de création de nanoparticules	Nanoparticules polymériques (obtenues à partir de blocs copolymères constitués de molécules amphiphiles)
	Interface solide-liquide	Nucléation à l'interface solide-liquide d'un système binaire	Construction de nanoparticules sur une surface solide à partir de sites de nucléation hétérogènes	Utilisation d'un support solide pour la nucléation et la croissance des nanoparticules sans affecter leur nature	Nanoparticules métalliques (Au, Ag, Al, Cu)
Top-down (Méthode de réduction mécanique)	Solide	Approche traditionnelle pour obtenir des nanoparticules : synthèse d'un alliage massif qui est ensuite réduit en morceaux	Broyage d'un alliage massif de composition chimique donnée (*grinding, milling and alloying*)	Broyage effectué en présence de stabilisateurs de colloïdes pour éviter leur aggrégation lors du procesus de broyage	Fabrication de nanoparticules à partir de minéraux (argile, charbon, métaux)

3. Principe général des nanoparticules multifonctionnelles

3.1. Les trois générations de nanoparticules

On distingue trois générations de nanoparticules mettant en avant leurs évolutions :

- *La première génération :* Celle-ci correspond à des nanoparticules sphériques ou capsulaires. Outre leurs propriétés intrinsèques utilisées pour le théranostic, ces particules présentent un fort intérêt de par leur capacité à éviter l'élimination et l'excrétion par le système rénal. En effet, le rein est le principal organe d'élimination de l'organisme et fonctionne grâce à un principe de filtration au travers de pores de quelques nanomètres. Ainsi, lorsque des agents d'intérêt de faible poids moléculaire sont encapsulés au sein de vecteurs colloïdaux d'une dizaine de nanomètres, l'élimination par voie rénale devient possible. La taille est ici importante puisque les particules doivent être suffisamment petites pour qu'elles ne restent pas bloquées dans les vaisseaux sanguins.

Cependant, si la taille des nanoparticules leur permet d'éviter de nombreux pièges « géométriques » de l'organisme, elles sont considérées comme des corps étrangers et sont ainsi phagocytées par les défenses immunitaires : les macrophages. Afin de pouvoir atteindre la zone d'intérêt, il convient alors d'éviter la phagocytose en trompant les défenses immunitaires : on parle de furtivité.

- *La seconde génération :* Comme mentionné pour la première génération, les mécanismes naturels de métabolisation et d'élimination limitent l'activité thérapeutique et/ou diagnostic des agents injectés. D'une part, l'élimination de la substance d'intérêt de la circulation sanguine va engendrer sa diminution voire sa disparition avant d'atteindre la zone ciblée. D'autre part, l'accumulation de cette même substance dans les organes d'élimination ou de séquestration (rein, foie, rate…) peut également entrainer des effets secondaires toxiques au niveau des tissus.

C'est pourquoi il a été nécessaire de développer de nouvelles stratégies afin d'augmenter la durée de vie des nanoparticules dans la circulation sanguine. Le but ici est de modifier chimiquement la surface des nano-objets (enrobage de PEG, polymères…). Cette couche hydrophile va alors servir d'agent de furtivité permettant d'augmenter le temps de séjour des nanoparticules dans le compartiement sanguin et ainsi leur permettre d'atteindre des tissus cibles pour un diagnostic ou la libération d'agents thérapeutiques.

- *La troisième génération :* Les colloïdes furtifs restent dans la circulation sanguine plus longtemps que les autres nanoparticules et finissent par être éliminés du compartiment sanguin. Il est donc primordial de favoriser l'accumulation des nanoparticules dans des tissus cibles. Pour cela, la surface de ces nano-objets doit être fonctionnalisée par des ligands biologiques qui seront reconnus par les cellules constituant le tissu d'intérêt. Ces ligands peuvent être des anticorps, des peptides, des saccharides ou d'autres molécules comme l'acide folique.

L'ajout de ligands à la surface favorise généralement leur capture par les macrophages. C'est pourquoi il est important d'associer les agents de ciblage aux agents de furtivité afin de contrebalancer cet effet.

La formation d'une barrière stérique risque toutefois de masquer les ligands et rendre alors caduque la fonction ciblante. Par conséquent, les agents de ciblage sont éloignés du cœur de la nanoparticule par un bras espaceur (par exemple une chaîne polyoxyéthylène) de manière à ce qu'ils se retrouvent à la surface de la couche de furtivité. L'avantage de ces bras espaceurs est une plus grande liberté de mouvement des fonctions de ciblage permettant ainsi une meilleure complexation avec la cible.
La troisième génération, dite ciblante, se caractérise donc par la présence d'une barrière stérique associée à l'ajout d'agents de ciblage liés à la surface par un bras espaceur.

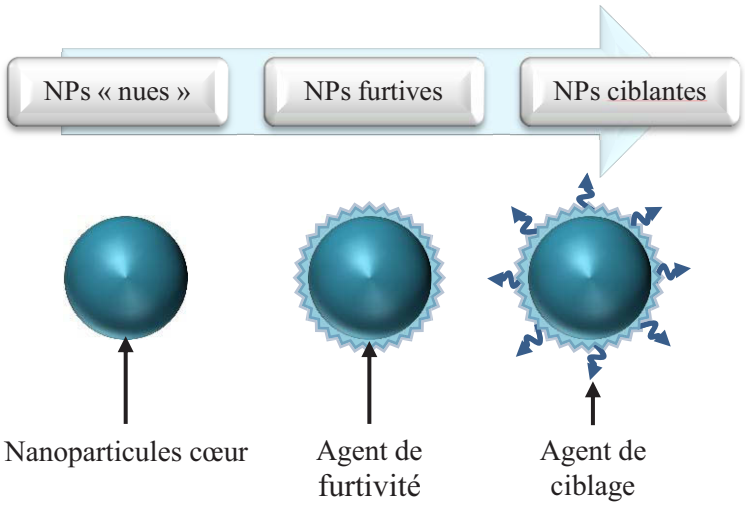


Figure 13 : Illustration de l'évolution des nanoparticules

3.2. Nanoparticules multifonctionnelles : Principe général

Grâce aux avancées de la nanomédecine, le concept de particules multifonctionnelles, considérées comme idéales, représente un agent injectable combinant diagnostic et thérapie. Cette représentation a été mise en évidence par Mauro Ferrari[48] (figure 14).

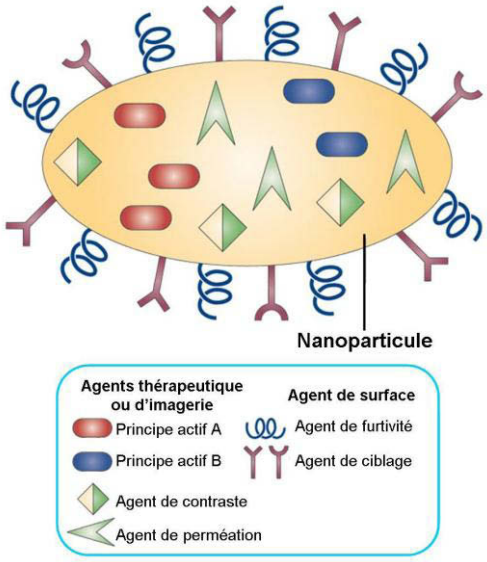


Figure 14 : Nanoparticule multifonctionnelle[48]

La nanoparticule constitue alors une plateforme d'assemblage sur laquelle viennent s'ajouter des agents de furtivité, des agents de ciblage, des agents de perméation, des agents de contraste et des agents thérapeutiques. Il est ainsi possible d'obtenir un grand nombre de nanoparticules aux propriétés modulables.

3.3. Stratégies de ciblage

3.3.1. Ciblage tumoral passif

Les tumeurs cancéreuses présentent des différences notables comparées aux tissus sains. En effet, la vascularisation est désorganisée, les vaisseaux sanguins qui irriguent les tumeurs se caractérisent par une distribution en diamètre et une répartition spatiale hétérogène. De plus, ils sont poreux et perméables. Le flux sanguin est aussi différent de celui des vaisseaux sains. Ces propriétés structurales, ajoutées au faible drainage lymphatique caractéristique de nombreuses tumeurs, favorisent une accumulation préférentielle des nanoparticules dans la zone tumorale. Ce phénomène, appelé effet EPR[49] (Enhanced Permeability and Retention effect), rend les nanoparticules très intéressantes. En effet, ce phénomène induit un ciblage passif des tumeurs solides de manière à concentrer les agents à visé théranostic au sein de la tumeur (figure 15). Les agents peuvent ainsi s'accumuler dans une tumeur à des concentrations cinq à dix fois plus importantes que dans des tissus sains[50].

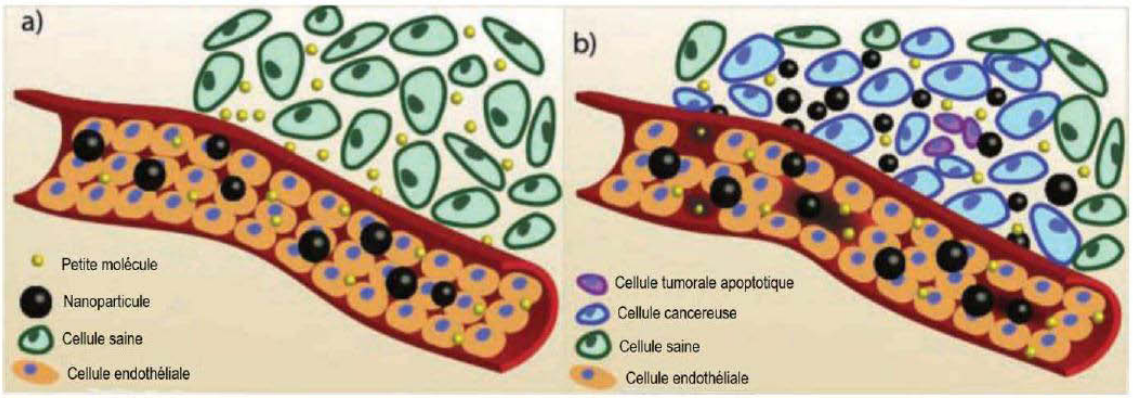


Figure 15 : Illustration de l'effet EPR (a) Dans un tissu sain, seules les petites molécules peuvent diffuser à travers la paroi des vaisseaux sanguins (b) Dans une tumeur, les macromolécules et nanoparticules peuvent diffuser à travers les tissus grâce aux fuites dans les vaisseaux sanguins[50]

Dans le cas de délivrance de médicaments, le microenvironnement des tumeurs (pH et potentiel redox) joue également le rôle de ciblage passif. En effet, certaines molécules actives, sensibles aux pH ou au potentiel redox, se convertissent en médicaments actifs quand ils entrent en contact avec l'environnement de la tumeur cible[14].

Cependant, ce ciblage peut s'avérer insuffisant pour avoir un effet de concentration assez important au niveau des tumeurs, puisque le degré de vascularisation des tumeurs varie selon le type et le stade de développement. Il est alors primordial d'induire un ciblage actif *via* l'utilisation de vecteurs spécifiques des cellules cibles.

3.3.2. Ciblage tumoral actif

Afin de reconnaitre des récepteurs spécifiques des cellules cancéreuses, des molécules spécifiques sont greffées à la surface des nanoparticules. Ces vecteurs permettent de transporter les particules dans une zone d'intérêt, permettant ainsi le diagnostic ou la délivrance de biomolécules à visée thérapeutique, et facilitent leur pénétration dans les cellules, tissus et organes cibles. La combinaison du ciblage actif et passif permet de réduire fortement l'interaction des médicaments transportés avec les tissus sains et d'améliorer le pouvoir thérapeutique tout en diminuant les doses administrées.

Ce ciblage repose sur des interactions entre le ligand fixé en surface de la nanoparticule et le récepteur. Ce dernier est un marqueur spécifique situé à la surface des cellules tumorales, conduisant souvent à l'internalisation de la nanoparticule. Pour que cette interaction soit suffisante, il est impératif que le marqueur spécifique des cellules cibles soit largement surexprimé par rapport aux cellules saines.

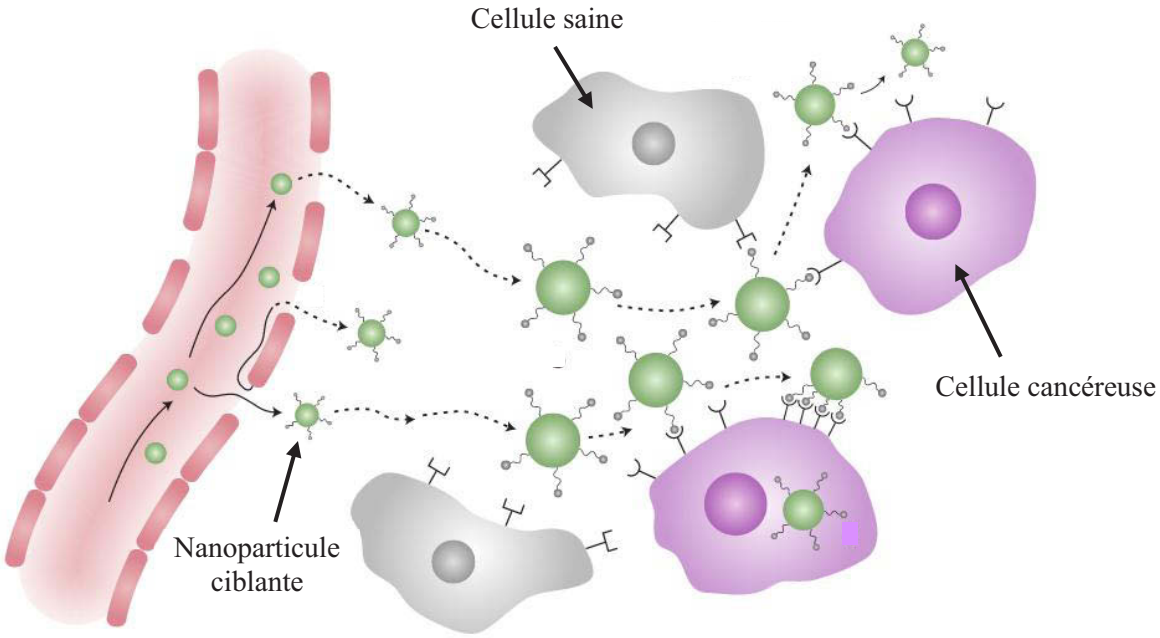


Figure 16 : Illustration du ciblage actif : les nanoparticules quittent le compartiment sanguin par les fuites des vaisseaux puis diffusent dans les tissus. Elles ont la capacité de se lier aux récepteurs cibles tout en ignorant les cellules saines. L'interaction entre vecteur et récepteur peut alors conduire à l'internalisation de la nanoparticule.[51]

4. Intérêt des nanoparticules pour l'imagerie : cas du cancer de la prostate

4.1. Le cancer de la prostate

Cancer le plus fréquent chez l'homme, avec plus de 62 000 nouveaux cas par an, il représente la deuxième cause de mortalité par cancer chez l'homme avec plus de 9 000 décès annuels. Ce cancer touche essentiellement l'homme de plus de 50 ans et sa fréquence augmente avec l'âge. L'allongement de l'espérance de vie explique alors l'augmentation de son incidence et accentue ainsi le besoin de nouvelles techniques de détection et de thérapie permettant alors une prise en charge précoce et plus adaptée des patients.

Le cancer de la prostate se développe à partir d'une cellule normale, qui se transforme et se multiplie de façon anarchique formant une masse appelée tumeur. La tumeur est d'abord limitée à la prostate, puis grossit et s'étend au-delà de la capsule prostatique, enveloppe qui sépare la prostate des tissus voisins. Dans 90% des cas, les cancers de la prostate sont des adénocarcinomes, c'est-à-dire qu'ils prennent naissance dans les cellules glandulaires de la prostate.

4.2. Diagnostic

Le premier moyen de détection du cancer de la prostate est l'examen clinique. Celui-ci repose sur la palpation de la prostate lors d'un toucher rectal, permettant d'évaluer le volume de la glande, sa consistance et d'éventuelles anomalies. Une échographie est également réalisée pour compléter l'examen. Toutefois, le cancer de la prostate peut être mis en évidence en raison d'un taux anormalement élevé de PSA (Prostate Specific Antigen) dans le sérum du patient, dont le taux augmente de manière significative lors d'un cancer. Enfin, l'unique moyen de confirmer le diagnostic final est de procéder à une biopsie, à savoir de prélever et analyser plusieurs fragments de tissu sur les deux lobes de la prostate. Cependant, cet acte est invasif et sa fiabilité reste limitée de par l'erreur d'échantillonnage. De plus, ces méthodes révèlent souvent la tumeur maligne à un stade avancé, après que celle-ci ait formé des métastases.

Les nanoparticules multifonctionnelles sont ici prometteuses pour la détection spécifique et avancée du cancer. Comme nous avons pu le voir précédemment, il est important de venir concentrer les nano-objets au niveau d'un organe ou d'un tissu, ceci étant possible uniquement par un ciblage des cellules tumorales.

4.3. Le ciblage des cellules tumorales prostatiques

Comme énoncé précédemment, dans le cas du cancer de la prostate, une protéine membranaire, la PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen), est surexprimée de façon significative par les cellules tumorales prostatiques. Cette protéine, présente en surface des cellules, représente alors une cible de choix puisque son expression est 1000 fois plus importante que pour des tissus sains[52].

Par ailleurs, la PSMA favorise l'internalisation, à savoir que cette capacité d'endocytose est fortement renforcée par la formation de complexes ligand-PSMA[53].

De par sa surexpression, sa localisation membranaire facilement accessible et sa capacité d'internalisation, la PSMA est une cible à privilégier pour le théranostic du cancer de la prostate.

4.3.1. La PSMA

Cette protéine, également appelée GCPII (Glutamate carboxypeptidase II), est une protéine membranaire d'environ 100 000 Dalton et est constituée de 750 acides aminés. La plus grande partie de cette protéine est extracellulaire (des acides aminés 44 à 750).

Son appellation GCPII provient de l'activité enzymatique que la PSMA manifeste lorsqu'elle se trouve sous forme dimérique. En effet, cette métalloprotéine à zinc possède deux activités enzymatiques. La première est l'hydrolyse du NAAG (N-acétyl aspartylglutamate), la seconde est l'hydrolyse du folate poly-γ-glutamate. Ces deux activités aboutissent au clivage du glutamate terminal (figure 17).

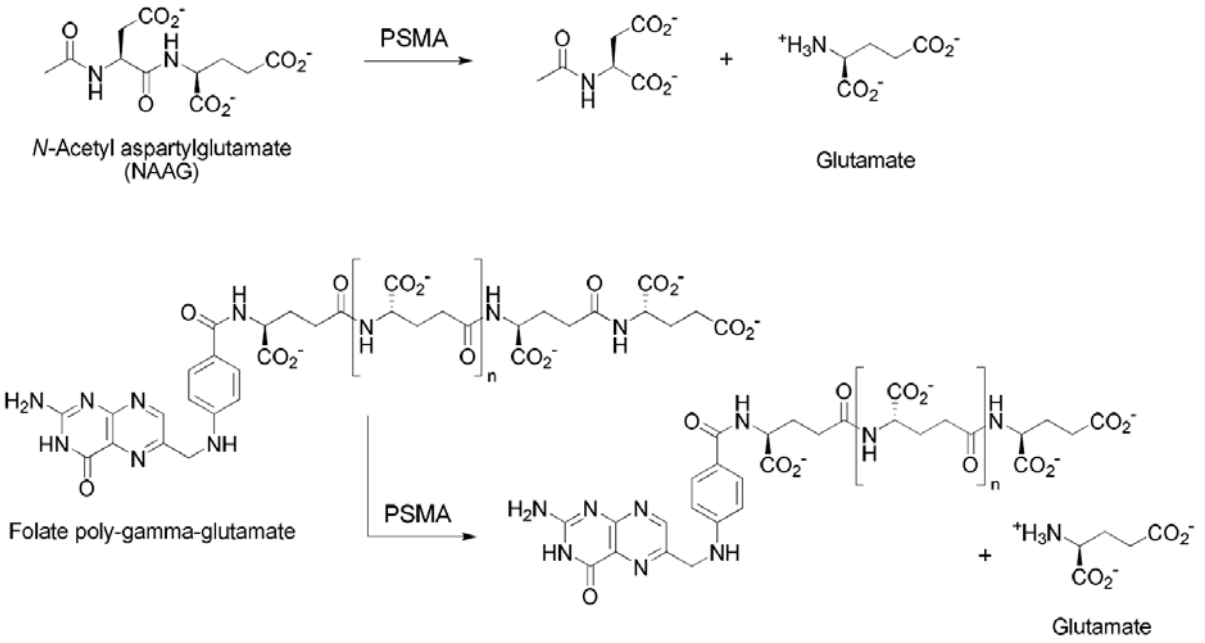


Figure 17 : Activités enzymatique de la PSMA[8]

4.3.2. Ciblage de la PSMA

Afin de réaliser un ciblage actif de la PSMA, il est nécessaire d'avoir des ligands ayant une forte affinité pour cette protéine. Deux stratégies sont actuellement utilisées :

- *L'utilisation d'anticorps* : ces protéines possèdent une forte affinité pour un antigène spécifique, avec lequel elles forment un complexe. Ces anticorps anti-PSMA ont largement été étudiés pour déterminer sa localisation dans différents tissus et pour quantifier sa surexpression[54].

- *L'utilisation d'analogues du substrat naturel de la protéine ciblée* : Ces analogues du NAAG ont été synthétisés pour le ciblage spécifique de la PSMA. Ces analogues interagissent avec le site actif de la protéine sans subir l'hydrolyse, ceci étant possible par le remplacement de la liaison amide par un lien urée. Ces molécules sont dites inhibitrices car elles occupent le site actif de la protéine sans en être substrat, bloquant ainsi son activité enzymatique.

Parmi les vecteurs étudiés pour un ciblage de la PSMA, le DCL (N-[N-[(S)-1,3-dicarboxypropyl]carbamoyl]-(S)-lysine) a prouvé son efficacité[55] et représente ainsi un analogue de choix.

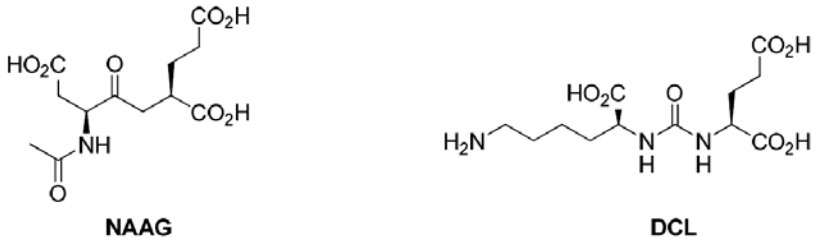


Figure 18 : Structure du NAAG et du DCL, vecteur de référence

5. Conclusion

Les études réalisées ces dernières années ont montré le réel potentiel des nanoparticules pour le théranostic. En effet, ces plateformes multifonctionnelles permettent des diagnostics toujours plus fins et précoces, ainsi qu'une délivrance d'agents thérapeutiques dans des zones d'intérêt conduisant ainsi à des traitements adaptés à chaque cancer.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à des nanoparticules à luminescence anti-Stokes pour le théranostic du cancer de la prostate. Le but est ainsi de composer des nano-objets complexes par ajouts successifs d'agents d'intérêt, à savoir un cœur aux propriétés optiques souhaitées, une coquille biocompatible jouant le rôle d'agent de furtivité ainsi que de vecteur ciblant les cellules tumorales prostatique.

Le chapitre prochain sera donc consacré à la conception de ces nanoparticules, ses propriétés optiques, et toute l'ingénierie concernant les synthèses et les enrobages hydrophiles possibles.

CHAPITRE II.
Nanoparticules pour l'Upconversion

SOMMAIRE

1. Imagerie par fluorescence : enjeux du biomédical 39

1.1. Interactions tissu-lumière – Contraintes liées aux milieux biologiques 39

1.1.1. Phénomènes d'absorption et de diffusion 39

1.1.2. Autofluorescence des tissus 40

1.2. Matériaux luminescents : avantages et inconvénients 42

1.3. Conclusion 43

2. Les matériaux pour l'upconversion 44

2.1. Luminescence des ions de terres rares 44

2.1.1. Configuration électronique des ions de terres rares 44

2.1.2. Luminescence des ions de terres rares 46

2.2. Luminescence par upconversion - Mécanismes 47

2.3. Design des nanoparticules pour l'upconversion 50

2.3.1. Choix des ions dopants 50

2.3.2. Choix de la matrice hôte 52

3. Description du projet 53

3.1. Présentation de la matrice de fluorure 54

3.1.1. Structure cristalline de $NaYF_4$ 54

3.1.2. Synthèse et morphologie 55

3.2. Activation par des ions de terres rares 58

3.3. Amélioration des propriétés optiques 60

3.4. Application pour le biomédical : hydrophilisation des nanoparticules 61

3.5. Conclusion 65

1. Imagerie par fluorescence : enjeux du biomédical

L'imagerie par fluorescence est une technique très sensible mais qui a encore l'inconvénient d'avoir une faible résolution spatiale et une profondeur de détection limitée. Ce type d'imagerie reste cependant une méthode rapide et peu coûteuse pour imager des molécules ou des cellules sur le petit animal. Son faible temps d'acquisition en fait donc une technique adaptée aux méthodes de « screening ».

L'enjeu est ici d'utiliser cette technique tout en améliorant ses limitations et plus particulièrement sa faible profondeur de détection. Comme nous allons le voir dans cette partie, la luminescence par conversion anti-Stokes (ou luminescence par upconversion) représente une solution innovante pour des applications biomédicales.

1.1. Interactions tissu-lumière – Contraintes liées aux milieux biologiques

1.1.1. Phénomènes d'absorption et de diffusion

Lorsqu'une source lumineuse interagit avec un tissu biologique, deux phénomènes apparaissent : l'absorption et la diffusion. Cette interaction est fortement dépendante de la longueur d'onde et, selon cette dernière, l'onde lumineuse se propagera plus ou moins profondément à l'intérieur du tissu.

Dans un tissu, l'absorption est due à la présence de molécules organiques. Elles atténuent l'onde électromagnétique qui se propage dans le milieu en absorbant une partie de son énergie et en la transformant sous forme de chaleur. Les trois principaux absorbants dans les tissus sont l'eau, l'hémoglobine (oxygénée et désoxygénée) et la mélanine.

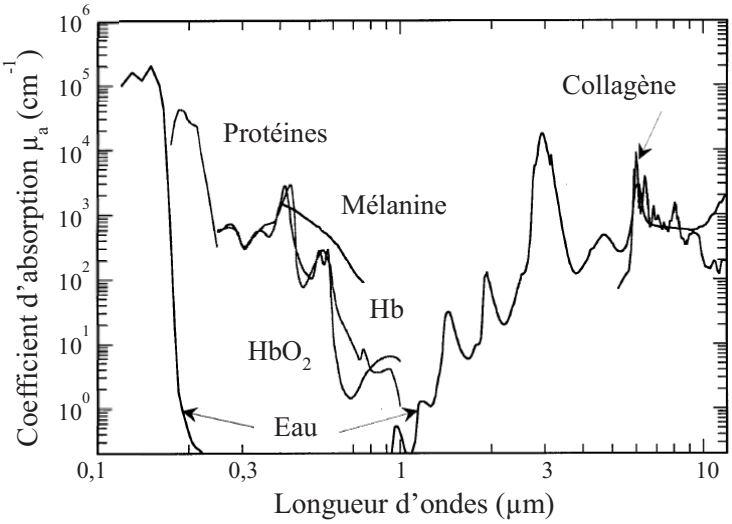


Figure 19 : Spectre d'absorption des principales espèces biologiques des tissus (Hb et HbO_2 correspondent respectivement à l'hémoglobine désoxygénée et oxygénée)[56]

La figure 19 montre les différentes régions spectrales d'absorption : l'absorption dans le domaine de l'infrarouge (au-delà de 1 µm) est principalement attribuée à l'eau alors que l'hémoglobine et la mélanine absorbent plus dans le domaine visible. On peut noter ainsi que le rouge et le proche infrarouge (0,6 à 1,2 µm) sont peu absorbés. Ce domaine de longueurs d'onde, appelé fenêtre thérapeutique, est ainsi utilisé pour réaliser de l'imagerie en profondeur sans endommagement majeur des tissus.

De plus, la peau n'étant pas un milieu optique idéal, la lumière est soumise fortement à un phénomène de diffusion optique qui conduit à des modifications de trajectoires liés aux réflexions, réfractions et diffractions présentes dans tout milieu hétérogène tel que les tissus. Dans la fenêtre thérapeutique, où l'absorption de la peau est relativement faible, la diffusion est le mécanisme optique dominant. Ce phénomène conduit à une plus forte pénétration de la lumière en profondeur et par conséquent à des volumes illuminés plus importants.

1.1.2. Autofluorescence des tissus

L'autofluorescence des tissus, qui est à l'origine d'une diminution importante du contraste de l'image, provient de la présence d'un grand nombre de fluorophores endogènes présents dans un milieu biologique. De plus, l'excitation d'un composé fluorescent exogène peut également provoquer l'excitation de ces composés endogènes. La discrimination entre le signal d'intérêt et le signal du bruit de fond devient alors difficile. Les spectres d'excitation et d'émission des principaux fluorophores des tissus biologiques sont présentés sur la figure 20.

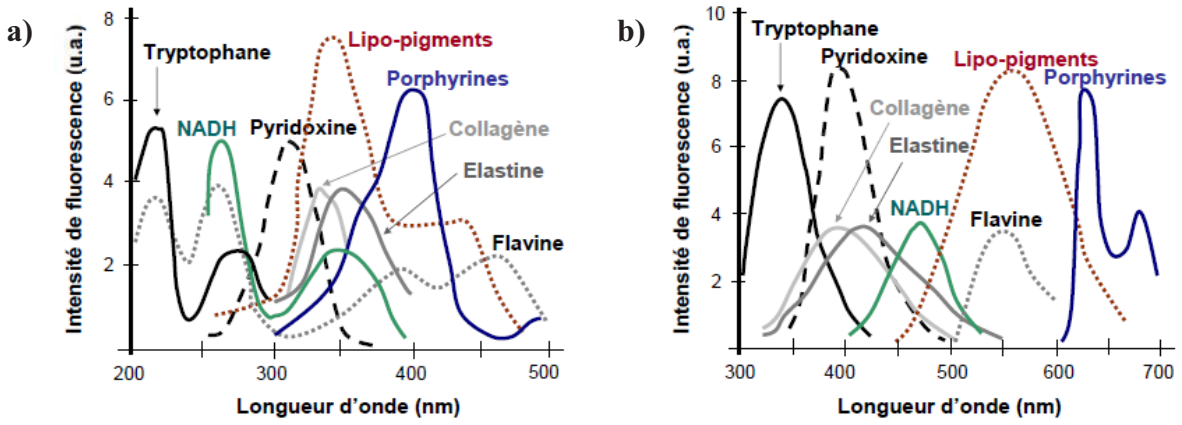


Figure 20 : Spectres (a) d'excitation et (b) d'émission des principaux fluorophores endogènes des tissus biologiques[57, 58]

Cependant, l'excitation de ces composés n'est pas équivalente sur l'ensemble du spectre. Ainsi il a été démontré que les longueurs d'onde élevées (rouge et proche infrarouge) produiront moins d'autofluorescence que les courtes longueurs d'onde.

La figure 21 illustre ici un exemple de l'autofluorescence des tissus selon les longueurs d'onde d'excitation. En effet, des travaux de Frangioni et al[59] indiquent une autofluorescence verte de la peau et des viscères (particulièrement la vésicule biliaire, l'intestin grêle et la vessie) qui est étonnamment élevée lors d'une excitation dans le bleu. L'autofluorescence de la vésicule biliaire et de la vessie est largement réduite lorsqu'on utilise un jeu de filtres vert/rouge (excitation par lumière verte) mais l'autofluorescence intestinale reste significative. Enfin, l'utilisation d'un jeu de filtres proche de l'infrarouge élimine totalement l'autofluorescence des tissus.

Par conséquent, l'autofluorescence des tissus empêche l'utilisation de la lumière visible pour la plupart des applications en imagerie *in vivo* et une excitation dans l'infrarouge résout ce problème en s'affranchissant de ce bruit de fond.

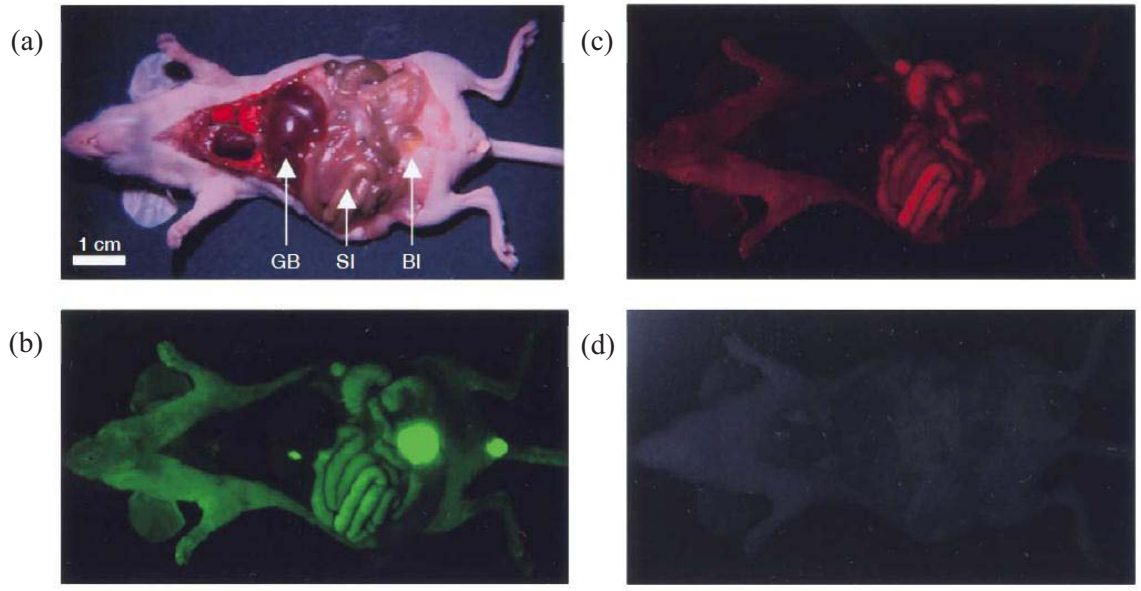


Figure 21 : Autofluorescence des tissus d'une souris sous excitation d'une lumière blanche(a), avec un filtre bleu/vert(b), avec un filtre vert/rouge(c) et avec un filtre proche infrarouge (d)[59]

Le choix des longueurs d'onde d'excitation et d'émission a donc une importance cruciale pour réaliser de l'imagerie *in vivo*. Les trois paramètres limitant l'imagerie par fluorescence, à savoir la diffusion, l'absorption et l'autofluorescence des tissus, conduisent à la même conclusion : il est important de travailler dans la fenêtre thérapeutique comprise entre 0,6 et 1,2 µm tout en étant le plus proche du domaine de l'infrarouge.

1.2. Matériaux luminescents : avantages et inconvénients

L'effervescence des techniques d'imagerie par luminescence a permis le développement de différents types de luminophores. En effet, depuis le début du siècle, la recherche en imagerie médicale a connu un nouvel essor en s'orientant vers l'imagerie moléculaire, dont l'objectif est de visualiser, directement dans le vivant, des processus biologiques en action au niveau des cellules.

A l'heure actuelle, l'imagerie par fluorescence est une méthode puissante utilisée chez le petit animal en raison de sa sensibilité, de la rapidité d'acquisition et du temps de traitement du signal, permettant une imagerie en temps réel.

Les différents composés utilisés pour cela sont reportés brièvement ci-après et une comparaison est faite dans le tableau 2 :

- Les fluorophores conventionnels, tels que les chromophores organiques, les protéines bioluminescentes et les protéines fluorescentes[60], ont été les premiers à avoir été étudiés pour les applications en clinique, préclinique ou en recherche fondamentale. Leurs applications concernent principalement l'imagerie sur cellules ou sur tissus. Toutefois, ceux-ci présentent des inconvénients tels qu'une mauvaise stabilité, une autofluorescence élevée et une dégradation importante en milieu biologique.

- Les fluorophores précédemment cités ont été encapsulés au sein de nanoparticules, permettant ainsi de les rendre plus stables vis-à-vis de l'environnement, et d'augmenter considérablement leur signal. Comme vu dans le premier chapitre, les nanoparticules sont principalement constituées de silice[61] mais certains polymères jouent le rôle d'encapsulant. Les méthodes de synthèses élaborées permettent de faire varier la taille des nanoparticules de 2 à 500 nm et les nano-objets finaux produisent une lumière de forte intensité en raison du grand nombre de fluorophores présents au sein de chaque nanoparticule. La photostabilité est assurée par l'enrobage de silice ou de polymères qui empêchent la pénétration de l'oxygène et ainsi réduisent le blanchiment. Cependant, ces nanoparticules contenant des fluorophores organiques trouvent leur limitation dans le domaine du visible. En effet, dans ce domaine de longueurs d'onde, la profondeur de pénétration reste relativement élevée et une autofluorescence des tissus est observée. Toutefois, il existe des fluorophores organiques, dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission se situent dans le domaine du proche infrarouge, tels que les indocyanines[59].

- Les nanocristaux de semi-conducteurs ou quantums dots - QDs - (cf chapitre 1) ont montré leur fort potentiel de par leur photo- et thermo-stabilité. De plus, le développement de ces QDs a permis de générer des nanoparticules ayant la capacité d'émettre de la lumière sous des longueurs d'onde d'excitation allant ainsi de l'UV au proche infrarouge. Ils sont très résistants au photoblanchiment et peuvent être utilisés pour le suivi *in vivo* pendant des périodes longues. Cependant leur toxicité représente le plus gros inconvénient.

C'est pourquoi les QDs nécessitent un enrobage par un polymère hydrophile permettant de réduire le relargage d'éléments toxiques. Par ailleurs, des QDs sans métaux toxiques sont actuellement en cours de développement.

- Les nanoparticules à fluorescence anti-Stokes, appelées nanoparticules pour l'upconversion (UCNPs) sont généralement des composés inorganiques cœur/coquille dopés par des ions de terres rares qui ont la capacité d'émettre à des énergies plus importantes que celles de l'excitation. Ce type de nanomatériaux pourra donc être excité dans l'infrarouge et réémettre dans le proche infrarouge, le visible ou l'ultraviolet. Leur principal avantage est donc de pouvoir être excité dans le domaine de longueur d'onde où l'autofluorescence des tissus est faible, la pénétration maximale et la photodégradation minime. Les avantages associés sont une finesse des pics d'émission, un important décalage anti-Stokes et une bonne stabilité chimique et physique, faisant de ces nanoparticules pour l'upconversion des candidats idéaux pour l'imagerie médicale.

Tableau 2 : Comparaison des nanoparticules luminescentes et des fluorophores organiques pour l'imagerie[62]

	Fluorophores organiques	Nanoparticules dopés avec des fluorophores organiques	Quantums dots	Nanoparticules pour l'upconversion
Taille	-	2-500 nm	2-10 nm	50-200nm
Autofluorescence	Elevée	Elevée	Elevée	Faible
Profondeur de pénétration	Faible	Moyenne/élevée	Moyenne/élevée	Elevée
Photodégradation	Moyenne	Moyenne/faible	Moyenne/faible	Faible
Photostabilité	Faible	Faible/moyenne	Elevée	Elevée
Longueur d'onde d'excitation	UV/Visible/NIR	UV/Visible/NIR	UV/Visible/NIR	NIR
Cytotoxicité	Moyenne	Moyenne	Elevée	Faible

1.3. Conclusion

Comme nous avons pu le voir dans cette partie, l'imagerie par fluorescence possède des contraintes indéniables poussant la recherche à se développer. Afin de remédier aux aléas responsables de l'atténuation du signal, il est indispensable de travailler dans le domaine des longueurs d'onde infrarouge. D'une part, ces longueurs d'onde sont comprises dans la fenêtre thérapeutique permettant de s'affranchir de la dégradation des tissus. D'autre part, il a été démontré que l'autofluorescence des tissus était minimisée à ces longueurs d'onde.

Les nanoparticules pour l'upconversion ont retenu notre attention puisqu'elles remplissent les conditions pré-requises. Ces nanoparticules et leurs propriétés optiques seront présentées dans la suite de ce chapitre.

2. Les matériaux pour l'upconversion

Les nanoparticules pour l'upconversion (UCNPs) sont constituées d'une matrice généralement inorganique dopée par des ions de terres rares. Dans cette partie, les propriétés de luminescence des ions de terres rares seront dans un premier temps décrites, puis les mécanismes d'upconversion seront détaillés afin de développer dans une dernière partie l'ingénierie que permettent ces nanoparticules.

2.1. Luminescence des ions de terres rares

2.1.1. Configuration électronique des ions de terres rares

Les ions de terres rares correspondent aux 15 éléments du groupe des lanthanides (Ln) auxquels s'ajoutent le Scandium et l'Yttrium, puisqu'ils présentent des propriétés chimiques voisines.

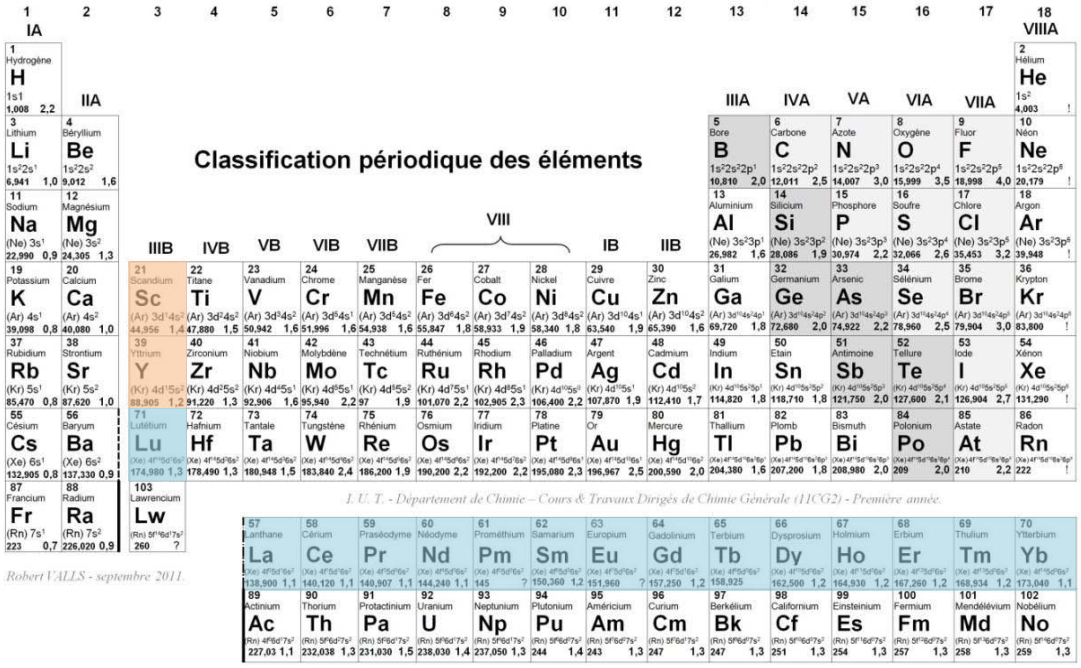


Figure 22 : Tableau périodique des éléments (bleu : lanthanides ; orange : scandium et yttrium)

La structure électronique de ces éléments correspond à [Xe]$6s^2$ $4f^n$ (où $0 < n < 14$) et résulte d'un remplissage des couches internes 4*f*. Lorsque le nombre d'électrons augmente, le rayon atomique des lanthanides diminue. Ce phénomène est appelé contraction des lanthanides et s'explique par le fait que l'orbitale 4*f* est plus profonde que les orbitales 5*s* et 5*p*, les orbitales 4*f* devenant ainsi plus stable que les 5*d*. Il y a donc une augmentation apparente de la charge nucléaire qui induit une contraction des électrons des couches 5*s* et 5*p* et ainsi une diminution du rayon (tableau 3).

Pour les ions, la configuration électronique la plus stable est obtenue par la perte des électrons $6s^2$ puis 5*d*, conduisant aux tri-cations Ln^{3+} de configuration électronique $[Xe]4f^n$ (où $0 < n < 14$). Ce degré d'oxydation (III) est partagé par tous les lanthanides et constitue la forme majoritaire des formes ioniques de ces éléments. Il existe cependant d'autres degrés d'oxydation stables pour certains ions de terres rares, tels que le Cérium (IV) possédant la configuration électronique stable du xénon (perte de l'électron *f*) ou l'Europium (II) et le Terbium (IV) qui sont stabilisés par les orbitales 4*f* à moitié remplies.

Le caractère écranté des orbitales *4f* est ainsi responsable des propriétés optiques particulières de ces ions. On distingue ainsi les transitions intraconfigurationnelles $4f^n \leftrightarrow 4f^n$ et interconfigurationnelles $4f^n \leftrightarrow 4f^{n-1}5d$.

Tableau 3 : Configuration électronique des ions de terres rares, leurs ions et leurs rayons ioniques[63]

Numéro atomique	Symbole	Nom	Configuration électronique de Ln	Configuration électronique de Ln^{3+}	Rayon ionique de Ln^{3+}(pm)
57	La	Lanthane	$[Xe]6s^2\ 5d^1$	[Xe]	103,2
58	Ce	Cérium	$[Xe]6s^2\ 4f^1\ 5d^1$	$[Xe]4f^1$	101,0
59	Pr	Praséodyme	$[Xe]6s^2\ 4f^3$	$[Xe]4f^2$	99,0
60	Nd	Néodyme	$[Xe]6s^2\ 4f^4$	$[Xe]4f^3$	98,3
61	Pm	Prométhium	$[Xe]6s^2\ 4f^5$	$[Xe]4f^4$	97,0
62	Sm	Samarium	$[Xe]6s^2\ 4f^6$	$[Xe]4f^5$	95,8
63	Eu	Europium	$[Xe]6s^2\ 4f^7$	$[Xe]4f^6$	94,7
64	Gd	Gadolinium	$[Xe]6s^2\ 4f^7\ 5d^1$	$[Xe]4f^7$	93,8
65	Tb	Terbium	$[Xe]6s^2\ 4f^9$	$[Xe]4f^8$	92,3
66	Dy	Dysprosium	$[Xe]6s^2\ 4f^{10}$	$[Xe]4f^9$	91,2
67	Ho	Holmium	$[Xe]6s^2\ 4f^{11}$	$[Xe]4f^{10}$	90,1
68	Er	Erbium	$[Xe]6s^2\ 4f^{12}$	$[Xe]4f^{11}$	89,0
69	Tm	Thulium	$[Xe]6s^2\ 4f^{13}$	$[Xe]4f^{12}$	88,0
70	Yb	Ytterbium	$[Xe]6s^2\ 4f^{14}$	$[Xe]4f^{13}$	86,8
71	Lu	Lutécium	$[Xe]6s^2\ 4f^{14}\ 5d^1$	$[Xe]4f^{14}$	86,1

2.1.2. Luminescence des ions de terres rares

Sous l'effet d'une excitation lumineuse de longueur d'onde adaptée, les ions Ln^{3+} émettent des photons. Chaque ion possède une émission caractéristique permettant ainsi de couvrir une large gamme spectrale allant de l'ultraviolet à l'infrarouge. Certains ions lanthanides émettent dans le visible : Eu^{3+} dans le rouge, Tb^{3+} dans le vert, Sm^{3+} dans l'orange et Dy^{3+} dans le jaune. D'autres émettent dans le proche infrarouge : Nd^{3+}, Ho^{3+}, Er^{3+} et Yb^{3+}. Ces luminescences sont caractérisées par un temps de vie des états excités long (µs-ms) et des bandes d'absorption et d'émission étroites, dites de raies.

Ces propriétés ont largement été étudiées et sont dues à la nature unique des orbitales 4*f* des lanthanides[64]. En effet, la luminescence des ions Ln^{3+} implique des transitions *f-f*. Ces transitions sont interdites par la règle de sélection de Laporte qui n'autorise pas les transitions électroniques entre deux états de même parité. En effet les transitions *f-f*, comme les transitions *d-d* dans les métaux de transitions, sont interdites puisqu'elles impliquent un mouvement des électrons dans la même orbitale. Les transitions permises impliquent un changement de parité, comme dans le cas des transitions *f-d*.

La fluorescence des ions lanthanides présente certaines caractéristiques qui en font un atout pour leur utilisation. Tout d'abord, ils ont un large décalage de Stokes, c'est-à-dire qu'il existe des bandes d'absorption qui sont bien séparées des bandes d'émission. De plus les bandes d'émission sont très étroites, ce qui est expliqué par le fait que la luminescence des lanthanides présente un comportement atomique puisqu'elle provient de l'orbitale 4*f*, protégée par les orbitales remplies 5*s* et 6*p*, qui est profonde dans l'atome.

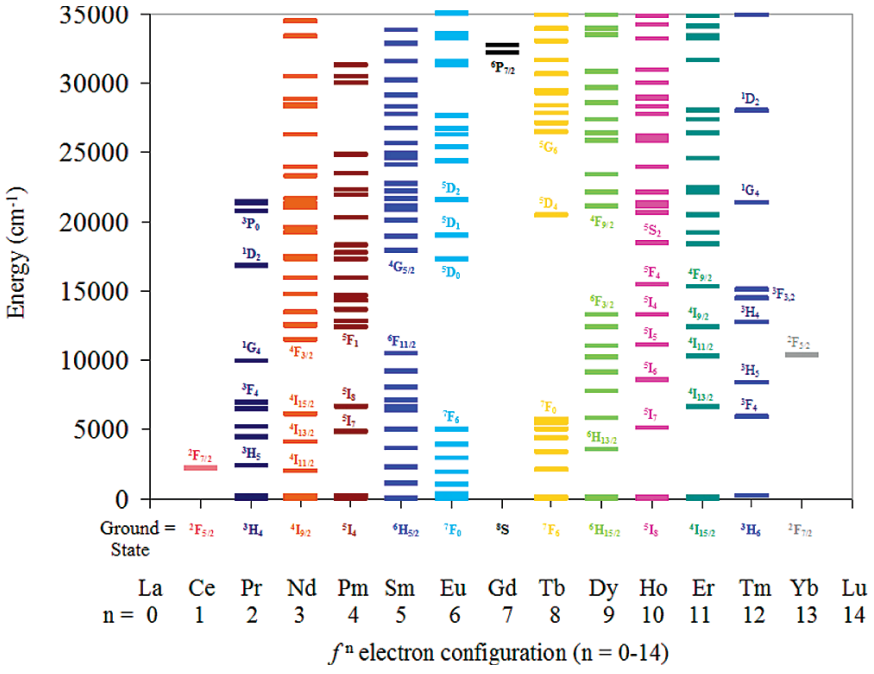


Figure 23 : Diagramme d'énergie des ions lanthanides dans la matrice $LaCl_3$[65]

La configuration électronique des lanthanides a été déterminée dans les années 60, puis complétée dans les années 80 (figure 23)[65]. Cette configuration engendre de nombreux termes issus des éclatements des niveaux électroniques provoqués par la répulsion inter-électronique, le couplage spin-orbite et par le champ cristallin. Les ions La^{3+} et Lu^{3+}, comportant les sous-couches 4*f* respectivement vides et pleines, ne possèdent pas de niveaux excités *f* et ne sont donc pas concernés par cette luminescence particulière due aux transitions *f-f*.

2.2. Luminescence par upconversion - Mécanismes

L'upconversion, ou conversion ascendante ou anti-Stokes, est un phénomène optique non linéaire caractérisé par la conversion de photons de faibles énergies (par exemple source infrarouge) en une radiation de plus haute énergie (par exemple proche infrarouge, visible ou ultraviolet). Ce concept, introduit dans les années 1960[66], est très attractif de par ses possibilités d'applications dans les domaines de la photochimie, la photonique, la physique et l'imagerie médicale.

Comparativement au phénomène de fluorescence par «down-conversion», ou fluorescence Stokes, le point central de ce phénomène optique repose sur l'absorption successive de photons permettant de convertir un rayonnement de longueur d'onde élevée en émissions de plus basse longueur d'onde, donc plus énergétique.

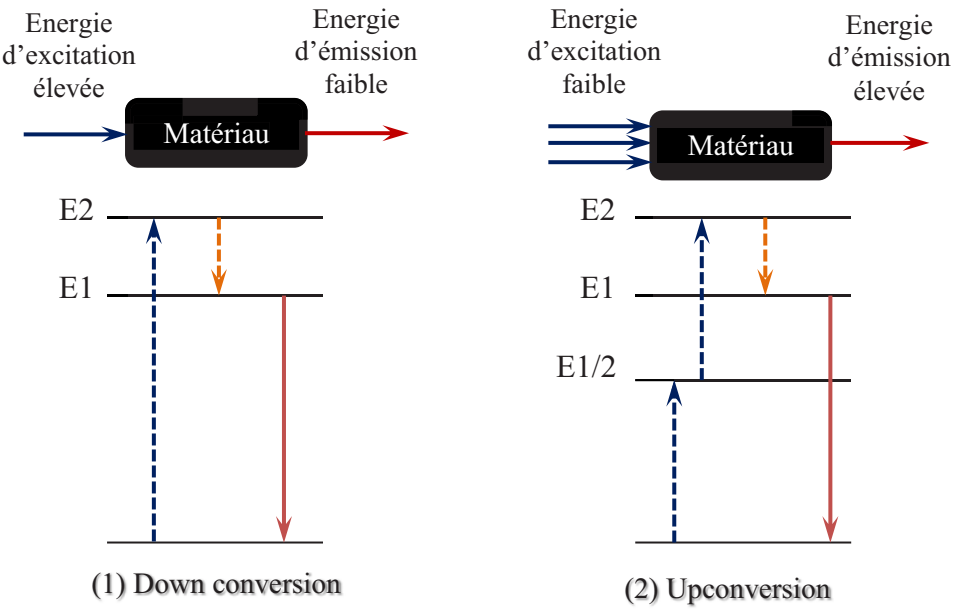


Figure 24 : Comparaison schématique des mécanismes (1) de Down conversion et (2) d'Upconversion

Les mécanismes d'upconversion peuvent être classés en deux catégories : la première met en jeu un seul ion et l'émission est obtenue par le mécanisme de l'absorption dans l'état excité (ESA). La deuxième fait intervenir deux ions et l'émission est produite par le mécanisme de transfert d'énergie (transfert d'énergie ou addition de photons par transfert d'énergie et avalanche de photons). L'énergie des photons émis dans tous ces mécanismes repose sur l'absorption successive d'au moins deux photons. De plus, aucun de ces mécanismes n'intervient seul mais peut être prédominant par rapport à l'autre.

- Absorption dans l'état excité (ESA)

Ce mécanisme, également connu sous le nom d'absorption séquentiel biphotonique, est un modèle proposé par Bloembergen en 1959[67]. Ce processus implique l'absorption de photons *via* un seul ion, ce phénomène étant le seul généralement observé pour des matériaux avec une faible concentration en ions dopants. La figure 25 présente le schéma général de ce processus d'upconversion et met en évidence l'absorption successive des deux photons. Le premier photon peuple un niveau intermédiaire de longue durée de vie qui va jouer le rôle de réservoir, puis un second photon va permettre d'atteindre le niveau d'énergie émetteur, provoquant l'émission d'un rayonnement de plus faible longueur d'onde.

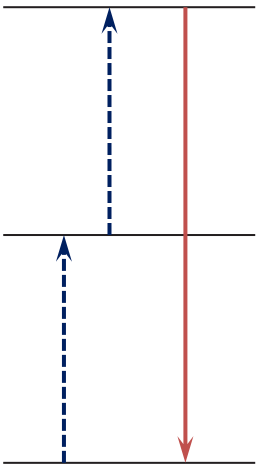
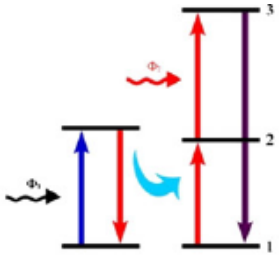
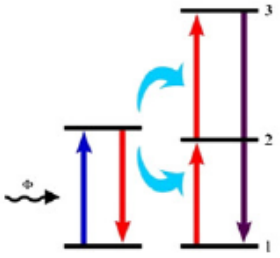
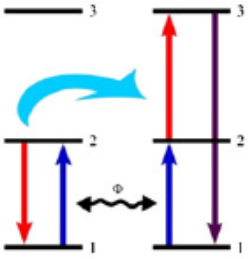
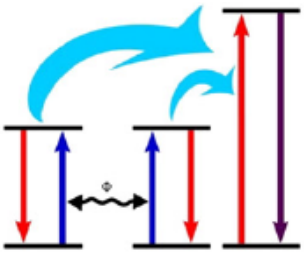
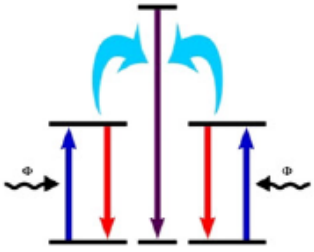


Figure 25 : Mécanisme de l'absorption successive

- Transferts d'énergie (ETU)

Les émissions par upconversion *via* les transferts d'énergie (ETU) ont été étudiées dans les années 1960. Auzel[68] a été le premier à proposer un schéma pour ce type de mécanisme. Contrairement au mécanisme d'absorption dans l'état excité, le processus de transfert d'énergie nécessite l'absorption successive de deux photons permettant le transfert d'énergie d'un ion excité (dit sensibilisateur ou donneur) vers un ion voisin (dit activateur ou accepteur). Ce phénomène est observé dans des matériaux possédant des concentrations en ions dopants élevées voire stœchiométriques. Les différents types de mécanisme de transferts d'énergie correspondent aux différents processus répertoriés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Les différents types de processus de transferts d'énergie[69]

	Schéma	Remarques
ETU suivi d'un ETA		L'énergie est transférée de l'ion donneur à l'état excité vers un ion accepteur à son état 1, promouvant ce dernier vers l'état 2. Enfin, l'ion accepteur passe dans son état 3 grâce à une absorption à l'état excité (ESA).
ETU successifs		L'ion accepteur dans son état 1 est promu à son état 2 *via* un transfert d'énergie. Puis cet ion passe dans son état 3 *via* un second transfert d'énergie. Seul l'ion donneur peut absorber les photons de la lumière incidente.
Relaxation croisée		Les ions donneur et accepteur sont les mêmes. Les photons sont absorbés par ces deux ions, les amenant dans leur état 2. Un transfert d'énergie permet enfin à l'ion accepteur de passer à l'état 3 alors que l'ion donneur repasse dans un état de plus faible énergie.
Sensibilisation coopérative		L'énergie accumulée par deux ions donneurs dans leurs états excités est transférée à un ion accepteur, lui permettant de passer à un état excité plus élevé.
Luminescence coopérative		L'émission comprend le transfert de deux photons provenant de deux ions excités, qui agissent à la fois comme donneur et accepteur.

- L'avalanche de photons

Ce processus, également connu sous le nom d'avalanche d'absorption, ou « looping », est l'un des mécanismes d'upconversion les plus efficaces (à condition qu'il soit amorcé) qui a été mis en avant par Chivian en 1979[70]. Ce phénomène débute par l'absorption d'un photon par un ion à partir de son état fondamental. Cette absorption n'est cependant pas en résonnance avec le premier niveau excité et est donc très faible. Par la suite, il y a absorption d'un deuxième photon par le même ion à partir du premier niveau excité vers un deuxième état excité. Puis, il se produit un transfert d'énergie dû à la relaxation non radiative croisée entre l'ion excité au deuxième niveau et un autre ion se trouvant au niveau d'énergie fondamental. Les deux ions se retrouvent donc au premier niveau d'énergie excité. A partir de cet état, les deux ions peuvent facilement être excités au deuxième niveau d'énergie et réémettre en retournant au niveau fondamental.

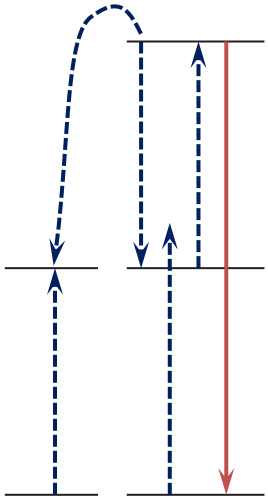


Figure 26 : Mécanisme du processus de l'avalanche de photons

2.3. Design des nanoparticules pour l'upconversion

2.3.1. Choix des ions dopants

Comme nous avons pu le voir dans la partie précédente, il est important de choisir une combinaison d'ions dopants permettant les transitions requises pour les émissions par upconversion. En effet, particulièrement dans le cas de transferts d'énergie entre deux ions, certains ions de terres rares ont des caractéristiques, telles que la différence d'énergies entre leurs niveaux électroniques et la probabilité d'absorption d'un photon à une certaine longueur d'onde, leur conférant les rôles de donneurs et d'accepteurs d'énergie.

Les ions accepteurs d'énergie sont ceux qui vont recevoir l'énergie des ions donneurs et ainsi être excités à un niveau d'énergie supérieur avant de relaxer. Tout d'abord, ces ions doivent posséder des niveaux d'énergie résonants puisque la différence d'énergie entre les niveaux excités et celle entre l'état fondamental et le premier niveau excité doit être suffisamment proche pour faciliter les transferts d'énergie et les absorptions de photons.

De plus, le taux de relaxation non-radiative diminue exponentiellement en augmentant la différence d'énergie entre le niveau fondamental et le premier niveau excité. En considérant ces deux prérogatives pour les ions accepteurs d'énergie, les ions les plus efficaces sont l'Erbium (Er^{3+}) et le Thulium (Tm^{3+}). A titre d'exemple, l'ion Er^{3+} a une différence d'énergie d'environ 10 350 cm^{-1} entre les niveaux $^4I_{11/2}$ et $^4I_{15/2}$ alors qu'entre les niveaux $^4F_{7/2}$ et $^4I_{11/2}$ elle est d'environ 10 370 cm^{-1}[171]. Ainsi les niveaux énergétiques $^4I_{15/2}$, $^4I_{11/2}$ et $^4F_{7/2}$ peuvent être utilisés pour générer un rayonnement par upconversion lors d'une excitation à 970 nm (10 309 cm^{-1}).

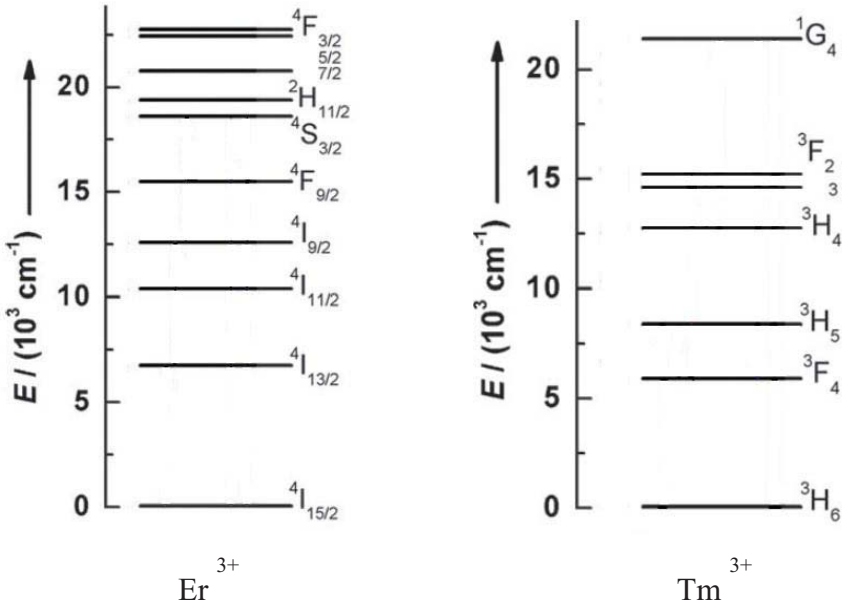


Figure 27 : Diagramme d'énergie simplifié de l'ion erbium (Er^{3+}) et de l'ion Thulium (Tm^{3+})[71]

Dans le cas de matériaux dopés avec un seul ion de terre rare, les deux paramètres majeurs jouant sur les mécanismes d'upconversion sont la distance entre les ions accepteurs voisins et la section efficace d'absorption des ions. Cependant, pour ce type de dopage, les concentrations en ions dopants doivent rester relativement faibles puisqu'une forte concentration engendre des interactions entre les ions (de type dipolaire ou multipolaire électrique) qui ont pour conséquence une extinction par concentration, ou quenching des émissions de lumière. L'efficacité globale de ces matériaux mono-dopés est relativement faible.

Pour augmenter les rendements de luminescence par upconversion, un ion donneur est utilisé en tant que co-dopant afin d'utiliser les mécanismes de transferts d'énergie entre les ions donneurs et accepteurs. Une des caractéristiques qui fait d'un ion de terre rare un bon ion donneur d'énergie consiste en une forte probabilité d'absorption (dans le domaine du proche infrarouge dans notre cas). Un des meilleurs ions donneurs d'énergie est l'Ytterbium (Yb^{3+}) puisqu'il possède une section efficace d'absorption plus élevée que les autres lanthanides autour de sa bande d'absorption (~ 980 nm). De plus, la transition entre le niveau d'énergie fondamental et le premier niveau d'énergie excité ($^2F_{7/2} \rightarrow {}^2F_{5/2}$) coïncide avec plusieurs niveaux d'énergie des principaux ions accepteurs d'énergie comme l'Erbium, le Thulium ou l'Holmium. Cette propriété permet ainsi d'assurer une bonne efficacité de transfert d'énergie entre l'ion Yb^{3+} et les ions accepteurs.

2.3.2.Choix de la matrice hôte

Le choix de la matrice hôte pour les ions de terres rares est primordial puisque de nombreuses caractéristiques sont exigées. Les principaux prérequis sont : une matrice transparente dans la gamme des fréquences utilisées, un matériau optiquement stable et une énergie de phonons faible.

Du fait que tous les ions de terres rares possèdent un rayon ionique proche et des propriétés chimiques similaires, les composés inorganiques sont idéaux en tant que matrices dopées pour réaliser de la luminescence par upconversion. Les ions alcalins, comme Ca^{2+}, Sr^{2+} et Ba^{2+}, et certains métaux de transitions, tels que Zr^{4+} et Ti^{4+}, possèdent également des rayons ioniques proches de ceux des lanthanides. C'est pourquoi les composés inorganiques comportant ces ions sont largement utilisés comme matrice hôte. Cependant, le dopage par des lanthanides de ces composés est accompagné par la formation de défauts de structure tels que la présence d'anions interstitiels et de lacunes cationiques afin de maintenir la neutralité de charge. Des composants semiconducteurs tels que ZnS ont également été proposés comme matrice hôte. Cependant, la localisation de ces ions à la surface de ces matériaux est encore discutable, ceci étant dû à une incompatibilité de rayon ionique entre le Zn de la matrice hôte et les ions dopants ou à une incorporation inhomogène des ions dans la matrice[72].

Une faible énergie de phonons est un paramètre important permettant de minimiser les pertes d'énergie par relaxations non radiatives. Les halogénures lourds tels que les chlorures, les iodures et les bromures présentent cette caractéristique (énergie de phonons inférieure à 300 cm^{-1}) mais une faible stabilité chimique. Les oxydes, quant à eux, présentent une bonne stabilité mais ont cependant une énergie de phonon élevée (généralement supérieure à 500 cm^{-1}).

En comparaison des matrices hôtes vues précédemment, les fluorures sont considérés comme un excellent compromis puisqu'ils présentent une bonne stabilité chimique ainsi qu'une faible énergie de phonons (~ 500 cm^{-1}). Ces matrices ont largement été étudiées[73] et $NaYF_4$ s'est avérée être la matrice la plus intéressante pour les mécanismes d'upconversion. Ce matériau est devenu une référence dans les applications biologiques, de par ses rendements de luminescence importants, la diversité des synthèses et l'ingénierie de mise en forme qu'offre cette matrice.

De nombreuses études ont été réalisées et ont permis l'incorporation d'ions dopants dans ces matrices permettant d'obtenir de la luminescence par upconversion et ainsi de moduler la luminescence observée. Le tableau suivant reporte quelques exemples de matrices dopées avec des ions de terres rares, émettant dans le visible par upconversion[74].

Tableau 5 : Quelques compositions de matrices inorganiques pour l'upconversion[74]

Matrice hôte	Ion donneur	Ion accepteur	Emissions
Y_2O_2S	Ytterbium	Erbium	Vert
Y_2O_2S	Ytterbium	Thulium	Bleu
Gd_2O_2S	Ytterbium	Erbium	Rouge
La_2O_2S	Ytterbium	Holmium	Vert
YOF	Ytterbium	Thulium	Bleu
Y_3OCl_7	Ytterbium	Terbium	Vert
YF_3	Ytterbium	Erbium	Rouge
GdF_3	Ytterbium	Erbium	Vert
LaF_3	Ytterbium	Holmium	Vert
$NaYF_3$	Ytterbium	Thulium	Bleu
$BaYF_5$	Ytterbium	Thulium	Bleu
BaY_2F_8	Ytterbium	Terbium	Vert
$YGaO_3$	Ytterbium	Erbium	Rouge
$Y_3Ga_5O_{12}$	Ytterbium	Erbium	Vert
YSi_2O_5	Ytterbium	Holmium	Vert
YSi_3O_7	Ytterbium	Thulium	Bleu

3. Description du projet

Au vue des avantages qu'offrent les nanoparticules de fluorures, notre projet s'est accès sur la matrice $NaYF_4$, dans sa forme hexagonale, codopée avec des ions de terres rares. Ce composé fluoré a été choisi puisqu'il a démontré les meilleurs rendements d'upconversion. De plus, au vue des nombreuses études réalisées et du large choix de synthèse qu'il offre, ce composé présente des avantages indéniables. Enfin, de nombreuses voies d'hydrophilisation, indispensable pour des applications *in vivo*, ont pu être étudiées permettant de sélectionner les enrobages hydrophiles les plus prometteurs.

3.1. Présentation de la matrice de fluorure

3.1.1. Structure cristalline de $NaYF_4$

Le tétrafluorure $NaYF_4$ est issu du système $NaF\text{-}YF_3$ qui fut établi en 1963 par Thoma[75] (figure 28). Cette étude a permis de montrer qu'il existe un équilibre entre trois phases cristallines : une phase hexagonale ($1{,}5NaF.1{,}5YF_3$), une phase cubique dont la composition est variable et une phase orthorhombique $5NaF.9YF_3$.

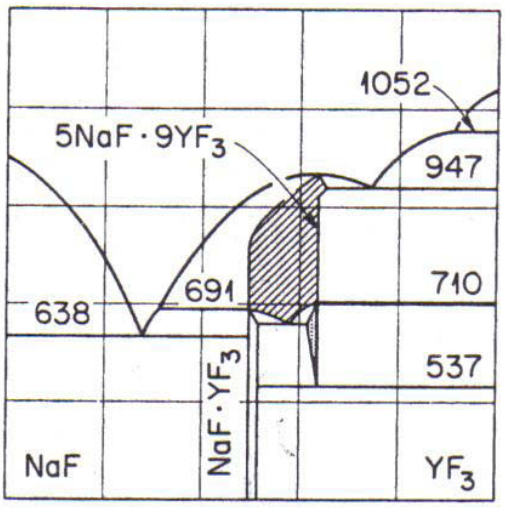


Figure 28 : Diagramme de phase du système $NaF\text{-}YF_3$[76]

La phase cubique α-$NaYF_4$ possède une structure de type fluorine (CaF_2) dont le groupe d'espace est noté $Fm\bar{3}m$ et son paramètre de maille a = 5,4473 Å. Dans cette structure, les cations occupent un seul type de site cristallographique de symétrie ponctuelle O_h. Ainsi les sites du réseau cubique face centrée sont occupés par les ions Na^+ et Ln^{3+}, distribués de manière aléatoire.

La phase hexagonale β-$NaYF_4$ possède quant à elle les paramètres de maille a = 5,975 Å et c = 3,533 Å, dans le groupe d'espace $P\bar{6}$. Dans cette structure, les cations Na^+ et Ln^{3+} se répartissent sur trois sites cristallographiques à savoir (0, 0, 0), 1f (2/3, 1/2, 1/2) de symétrie ponctuelle C_{3h} et 2h et (1/3, 2/3, $\bar{z}$) de symétrie C_3.

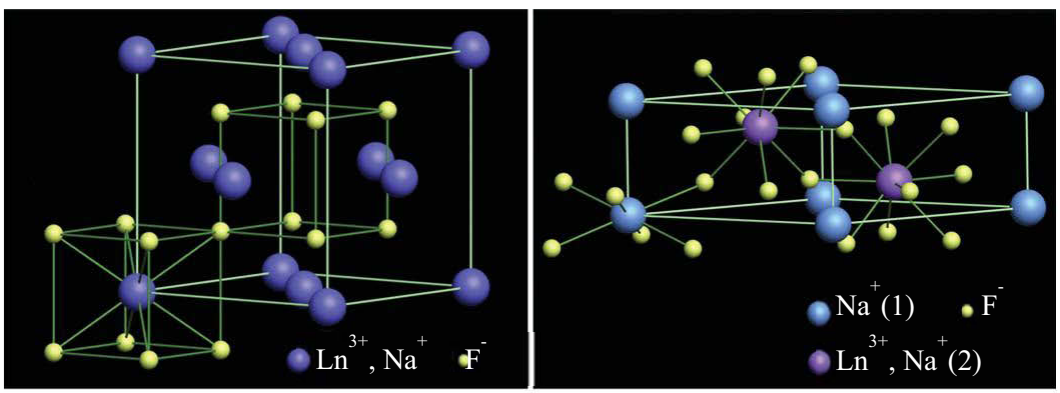


Figure 29 : Représentation des structures cubique et hexagonale de $NaYF_4$[77]

De nombreuses études ont permis de montrer que la forme hexagonale permet d'obtenir les meilleurs rendements d'upconversion comparés à la forme cubique[78, 79]. Cette propriété optique, dépendante de la phase cristalline, peut être directement attribuée aux différents champs cristallins des ions lanthanides dans des matrices de symétrie différente. Des matrices hôte de faible symétrie exercent un champ cristallin contenant des composantes plus inégales autour des ions dopants que dans leur homologue de symétrie élevée. Ces composantes améliorent le couplage électronique entre les niveaux d'énergies 4*f* et les configurations électroniques supérieures, et par conséquent augmentent les probabilités de transitions *f-f* des ions dopants[71]. De plus, la présence d'au moins deux sites à forte occupation (~100% et ~50%) induit des élargissements des raies d'excitation de la fluorescence, propice à l'accroissement de l'absorption de l'énergie incidente.

3.1.2.Synthèse et morphologie

Les matériaux pour l'upconversion ont été synthétisés depuis des décennies. En effet, depuis que la matrice $NaYF_4$ a montré les rendements d'upconversion les plus élevés, les différentes voies de synthèses se sont multipliées afin d'obtenir cette matrice sous forme de nanoparticules et donc d'étendre ses potentialités d'applications. Ces différentes possibilités de synthèses conduisent à des particules dont les paramètres cristallin, morphologique et de surface peuvent être modulés comme le présente brièvement ce qui suit.

- *Synthèse par voie solide*

Les premières synthèses par voie solide ont permis d'obtenir la matrice souhaitée en une étape par réaction entre les fluorures simples (NaF et YF_3) à haute température (600 - 750°C)[80]. Cette synthèse peut être réalisée sous atmosphère inerte ou réactive (gaz fluoré). En outre, cette voie de préparation présente un certain nombre d'inconvénients puisqu'elle implique des températures de calcination élevées ainsi qu'une potentielle utilisation d'un système de fluoration. De plus, les poudres obtenues présentent des tailles de grains non uniformes, non compatibles avec de applications en biologie, ainsi que des défauts de stœchiométrie.

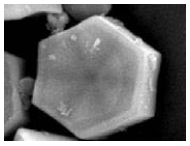
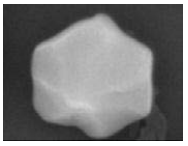
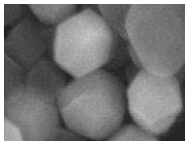
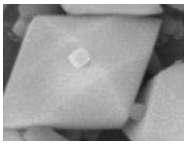
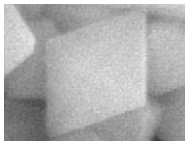
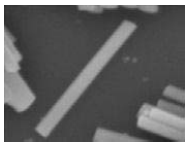
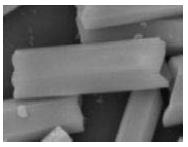
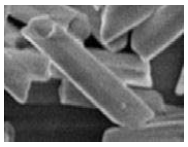
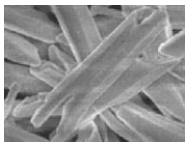
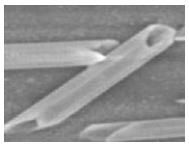
- *Synthèse par voie hydrothermale/solvothermale*

Cette voie de synthèse utilise un solvant sous pression, à des températures supérieures à son point critique, afin d'accroitre la solubilité des solides et accélérer les réactions entre eux. Cette synthèse nécessite l'utilisation d'autoclave permettant d'obtenir un environnement scellé, sous pression et à température contrôlée. Un des avantages de cette technique est de pouvoir obtenir des nanoparticules bien cristallisées à des températures moins élevées que certaines voies de synthèses.

Une étude de Wang et al[81] a permis de mettre en avant les effets des paramètres de synthèses (temps et températures de réaction, concentration en ions dopants et ratio entre les précurseurs nitré) sur la forme, la taille et la pureté de la phase cristalline des nanoparticules obtenues. En outre, comme le montre l'étude de Ma et al[82], des compositions précises en surfactant et en réactifs de complexation, associées à des conditions de synthèses particulières, permettent également de moduler les caractéristiques des nanoparticules.

De plus, *via* cette voie de synthèse, une étude de Mao et al[83] a montré que l'ajout d'ions alcalins tels que le lithium ou le potassium permettait de moduler la morphologie et la taille des nanoparticules (tableau 6).

Tableau 6 : Clichés MET présentant les morphologies obtenues lors de l'incorporation d'ions alcalins dans la matrice $NaYF_4$[83]

x	0,15	0,30	0,50	0,70	0,85
$Li_xNa_{1-x}YF_4$					
$K_xNa_{1-x}YF_4$					

- *Synthèse par coprécipitation*

Cette voie de synthèse représente une des approches les plus simples en termes de synthèse (conditions réactionnelles douces, protocoles simples et temps de réactions courts). Cependant, ces avantages sont largement devancés par une forte diminution de la qualité des nanoparticules après synthèse, nécessitant souvent un recuit supplémentaire afin d'obtenir de bonnes propriétés optiques. A titre d'exemple, Yi et al[84] ont pu démontrer ce point dans une synthèse où un complexe de lanthane-EDTA est ajouté à une solution aqueuse de NaF, produisant une nucléation immédiate. Suite à la croissance qui a lieu pendant 1 heure, la phase cubique est obtenue, cette phase étant connue pour être la moins efficace en terme d'upconversion. Les nanoparticules doivent donc subir un recuit à 400°C sous atmosphère H_2/N_2 afin d'assurer la transition entre la phase cubique et la phase hexagonale. De plus, après recuit, les nanoparticules ont tendance à s'agglomérer en particules de tailles supérieures, ce qui limite leurs applications.

- *Synthèse par décomposition thermique (thermolyse)*

Cette voie de synthèse implique la décomposition à haute température de précurseurs de lanthanides dans un mélange constitué d'un solvant non polaire et d'un solvant à haut point d'ébullition. Un ligand est généralement utilisé afin de contrôler la nucléation puis de stabiliser la croissance des nanoparticules en solution. Afin de contrôler la morphologie, la taille et la phase cristalline, différents paramètres sont à prendre en compte : la température, la pression, le solvant utilisé, la composition des précurseurs, la vitesse de montée en température, la vitesse de refroidissement, le temps de réaction et la concentration en réactifs[85]. Un choix judicieux de ces paramètres permet ainsi d'obtenir des nanoparticules de phase cristalline souhaitée, de morphologie contrôlée et de distribution de tailles monomodale. Cependant, ce nombre important de variables peut rendre les synthèses peu reproductibles.

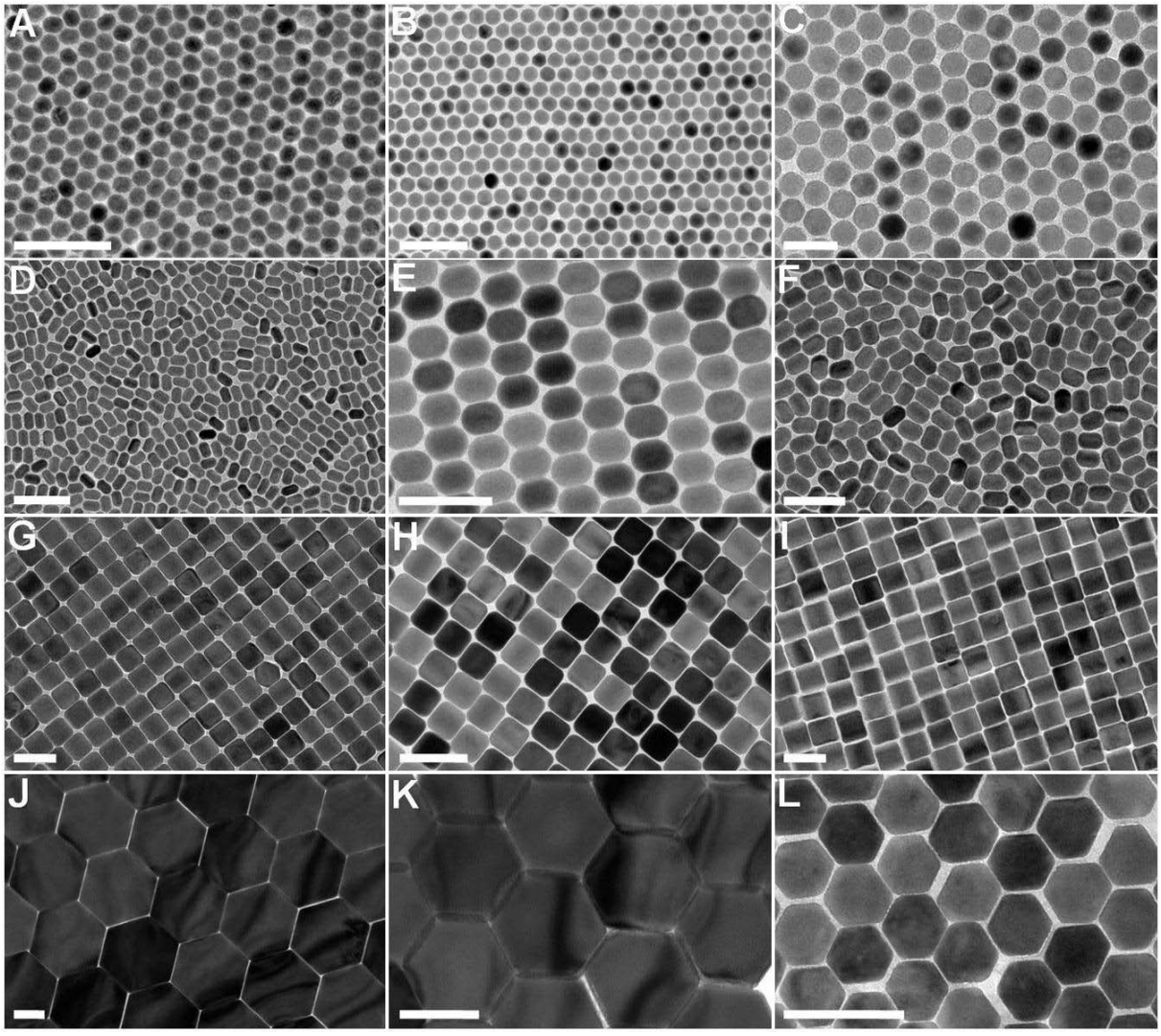


Figure 30 : Clichés MET de nanoparticules synthétisées par décomposition thermique (A, D, G, J) $NaYF_4$: Yb/Er ; (B, E, H, K) $NaYF_4$: Yb/Tm ; (F, I) $NaYF_4$: Yb/Ho ; (C, L) $NaYF_4$: Yb/Ce/Ho – Echelle : 100 nm[86]

A titre d'exemple, de nombreuses études ont permis de synthétiser des nanoparticules de $NaYF_4$ *via* une décomposition thermique de trifluoroacétates de sodium et de lanthanides dissous dans un mélange d'acide oléique et d'octadécène[86]. Comme le présentent les clichés réalisés au MET de la figure 30, il est possible d'obtenir des nanoparticules sphériques (figure 30A), des nano-bâtonnets (figure 30D), des nanoprismes hexagonaux (figure 30G) et des nanoplaques hexagonales (figure 30J) en ajustant les temps de réactions et/ou le ratio entre les précurseurs fluorés. Les autres morphologies et tailles obtenues ont pu ici être ajustées par la composition en ions de terres rares.

Mai et al[87, 88] ont montré que l'émission par upconversion était sensible au processus de croissance, c'est-à-dire aux mécanismes de nucléation et de transition de phase. Leur étude a permis de démontrer que, grâce à une synthèse par décomposition thermique, les nanoparticules se forment par une unique voie de nucléation retardée dans une phase en solution. En outre, des nanoparticules β-$NaYF_4$: Yb, Er de taille monomodale peuvent être obtenues à partir de monomères α-$NaYF_4$: Yb, Er en limitant ou en améliorant le processus de maturation d'Ostwald dans lequel la transition de la phase cubique vers la phase hexagonale se produit à un temps retardé.

Cependant la pyrolyse de trifluoroacétates engendre des espèces fluorées très toxiques conduisant ainsi au développement de synthèses *via* d'autres précurseurs. Zhengquan et al[89] ont alors étudié les synthèses à partir de chlorures de lanthanides. En faisant varier différents paramètres tels que le ratio molaire des réactifs chlorés ou la proportion des solvants utilisés, différents formes de nanoparticules ont pu être préparées. Cette étude a largement été reprise[90-94] puisque cette synthèse utilisant un mélange d'acide oléique et d'octadécène, dans des proportions bien définies, permet d'obtenir des nanoparticules sphériques de haute cristallinité. Ce mélange de solvant a largement été utilisé pour les différentes voies de synthèses puisque l'octadécène est un solvant à haut point d'ébullition (315°C), utilisé en tant que solvant de non-coordination, permettant de réaliser des synthèses à haute température. L'acide oléique joue, quant à lui, le rôle de solvant de coordination en venant se fixer à la surface des nanoparticules et ainsi empêcher leurs agglomérations.

3.2. Activation par des ions de terres rares

La quantité d'ions dopants introduits dans la matrice de fluorure a été largement étudiée afin d'optimiser le signal de fluorescence par upconversion.

Dans le cas d'une matrice dopée avec un seul ion, le signal augmente avec le pourcentage d'ions incorporé jusqu'à une certaine limite, à la suite de laquelle il diminue. Ce phénomène est appelé extinction de la luminescence par concentration[95], ou quenching. A des concentrations trop élevées, les ions se retrouvent prés les uns des autres et il peut y avoir des transferts d'énergie entre les différents centres luminescents conduisant à une diminution de l'intensité. Ce phénomène se produit par une désactivation non radiative à partir de l'état excité par un transfert résonnant entre deux ions identiques.

De même, les pourcentages des ions co-dopants dans la matrice $NaYF_4$ dopée ont fait l'objet de nombreuses études. En effet, il est possible d'étendre le panel d'émissions de ces composés en ajustant les concentrations en ions comme l'a montré une étude de Wang et al[96]. On observe sur la figure 31 qu'il est possible d'obtenir des suspensions dont la couleur finale peut varier du blanc/bleu au rose uniquement par variation des pourcentages de dopage en ions de terres rares.

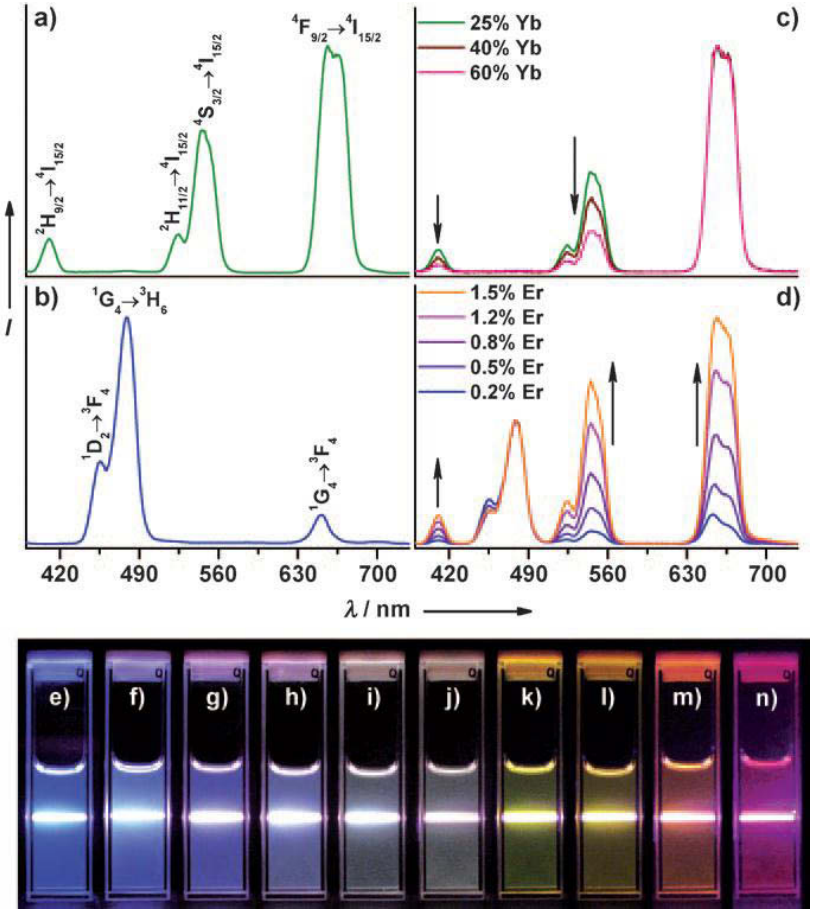


Figure 31 : Spectres d'émission sous excitation à 980 nm de a) $NaYF_4$:Yb, Er (18 et 2% mol), b) $NaYF_4$:Yb, Tm (20 et 0.2% mol), c) $NaYF_4$:Yb, Er (25-60 et 2% mol) d) $NaYF_4$:Yb, Tm, Er (20, 0.2 et 0.2-1.5% mol) - Photos des solutions colloïdales correspondant à e) $NaYF_4$:Yb, Tm (20 et 0.2% mol), f-j) $NaYF_4$:Yb, Tm, Er (20, 0.2 et 0.2-1.5% mol) et k-n) $NaYF_4$:Yb, Er (18-60 et 2% mol)[96]

Dans le cadre des composés synthétisés lors de ce projet, les concentrations optimales proviennent de la littérature et permettent d'obtenir les propriétés optiques les plus intéressantes.

Pour la conversion de l'infrarouge vers le visible, rendue possible par un codopage par les ions Ytterbium et Erbium, la composition molaire optimale est de 2 % en Er^{3+} et de 18% en Yb^{3+} [97-100]. Dans le cas de la conversion de l'infrarouge vers le proche infrarouge, les concentrations optimales ont été déterminées à 20% Yb^{3+} et 2% Tm^{3+} [101, 102]. Enfin, afin de permettre la conversion de l'infrarouge vers l'ultraviolet, les concentrations optimales définies sont de 20%Yb^{3+}, 20% Gd^{3+} et 0,5% Tm^{3+} [103].

3.3. Amélioration des propriétés optiques

Les caractéristiques de surface des nanoparticules sont à prendre en compte dans l'étude de l'efficacité des mécanismes d'upconversion puisqu'elles exposent les ions dopants présents en surface à des pertes d'énergie non radiatives. Ces dernières sont causées par les défauts de surface, les contraintes du réseau ainsi que par la présence de ligands organiques ou de molécules du solvant. Ces processus sont par ailleurs largement accentués dans le cas de nanoparticules en raison du rapport surface/volume qui est élevé à l'échelle nanométrique.

La désactivation des processus d'upconversion liée à la surface peut se produire de deux façons[104] :

- Les ions dopants présents en surface peuvent être désactivés directement par un centre poison ou de « quenching » proche.
- L'énergie contenue dans les ions dopants présents au centre de la particule peut migrer de façon aléatoire et parcourir une distance importante vers les ions dopants présents en surface ou vers un centre poison ou de « quenching »voisin.

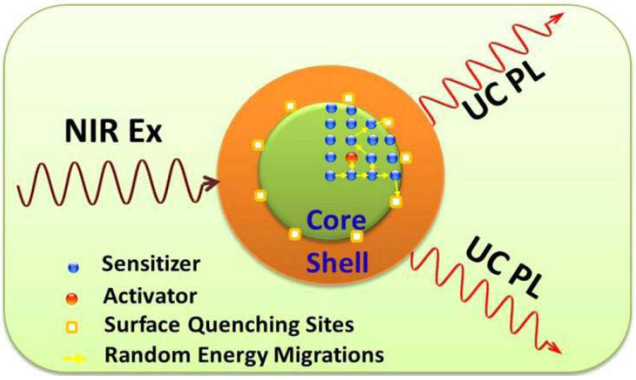


Figure 32 : Schéma d'une structure cœur/coquille illustrant la migration d'énergie aléatoire entre les ions de cœur[104]

Par conséquent, la suppression de ces mécanismes de « quenching » liés à la surface est d'une importance particulière afin d'obtenir les meilleurs rendements d'upconversion. Le moyen le plus efficace est de recouvrir la surface avec une coquille inorganique jouant le rôle d'agent de passivation de la surface.

La structure cœur/coquille peut être hétérogène c'est-à-dire que les deux composantes seront deux matrices de natures différentes. Malgré une concordance des réseaux cristallins faible, cette technique présente l'avantage de pouvoir incorporer une ou plusieurs modalités d'imagerie en un seul nano-objet. A titre d'exemple, l'enrobage par une coquille de $NaGdF_4$ va permettre d'intégrer l'imagerie par résonnance magnétique (IRM) dû à la présence de l'ion paramagnétique Gd^{3+} [105-107].

Cependant, une structure homogène est plus favorable puisque le cœur et la coquille présentent une importante concordance des mailles cristallines. Ce type de structure est simple mais très efficace puisqu'il garantit la croissance épitaxiale et crée ainsi une interface homogène entre les deux composantes. Ce type d'enrobage a été largement repris[108-110] et montre une réelle amélioration des propriétés de luminescence dû à la suppression des sites de quenching présents en surface ainsi que de l'isolation spatiale du noyau des molécules environnantes (ligands, solvant…).

Enfin, un troisième type de coquille inorganique a été étudié : il s'agit d'une matrice homogène ou hétérogène dans laquelle est incorporé une faible quantité d'ions dopants[111-113]. La coquille a ici deux rôles puisqu'elle protège le cœur des désactivations liées aux ions de surface et elle apporte également d'autres propriétés de luminescence. Cette ingénierie des nanoparticules cœur/coquille peut alors être déclinée afin de réaliser un grand nombre de coquilles et ainsi cumuler les modalités d'imagerie[114].

3.4. Application pour le biomédical : hydrophilisation des nanoparticules

Pour des applications en biologie, les nanoparticules doivent être modifiées en surface afin d'augmenter leur stabilité en solution et par la suite permettre une fonctionnalisation en surface. Le besoin de ce procédé d'hydrophilisation découle de l'utilisation de surfactant hydrophobe lors de la synthèse des nanoparticules luminescentes. En effet, dans le cas de la synthèse par décomposition thermique, les nanoparticules présentent en surface une fine couche d'acide oléique qui les rend hydrophobes.

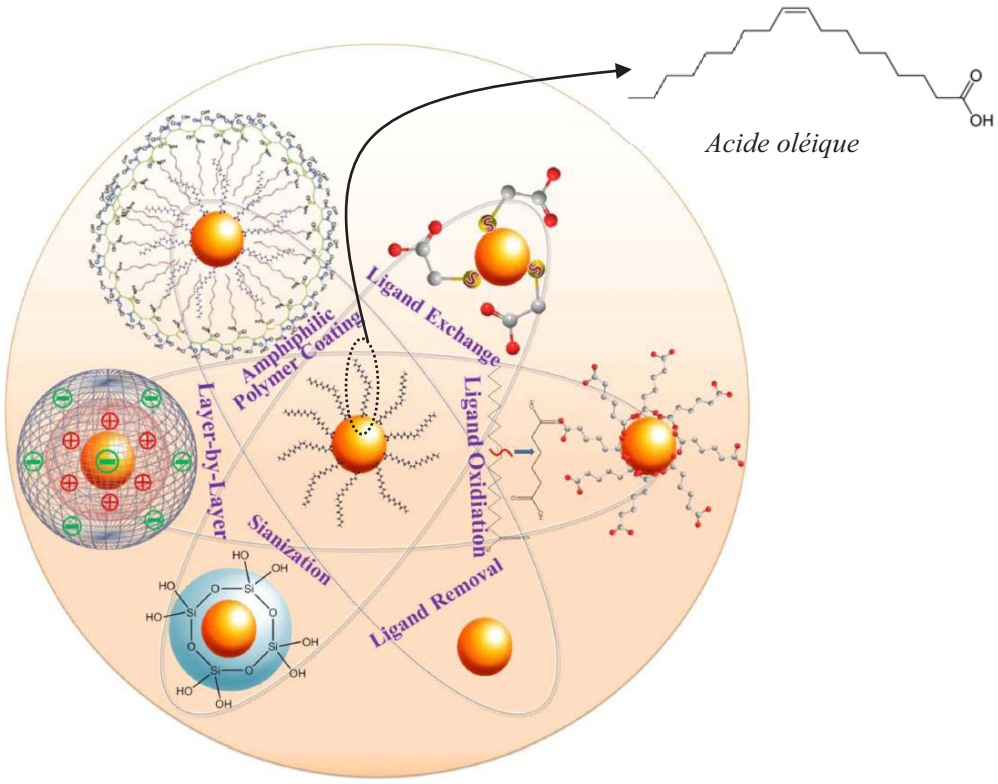


Figure 33 : Illustration des différentes stratégies d'hydrophilisation[104]

Une étude préalable des différentes voies d'hydrophilisation a été faite pour les nanoparticules cœur/coquille $NaYF_4:Ln^{3+}@NaYF_4$. Plusieurs stratégies existent et sont reprises dans la figure 33 et le tableau 7.

- *Elimination de ligand*

L'élimination d'acide oléique présent en surface peut être obtenue soit par un traitement acide[115], soit par un traitement avec un excès d'alcool[116]. En effet, lorsque les nanoparticules se retrouvent dans un environnement acide (pH ~ 2-4) sous ultra-sons, les groupements carboxylates du ligand vont progressivement se protoner et produire l'acide oléique. La faible quantité de ligand libéré en solution peut alors être éliminée par extraction. Les nanoparticules purifiées peuvent ainsi former une solution stable et transparente.

- *Oxydation des ligands de surface*

Ce procédé est basé sur l'oxydation sélective des doubles liaisons de carbone présentes en surface (R-CH=CH-R'). Cette méthode est limitée aux nanoparticules dont les ligands de surface contiennent au moins une liaison insaturée, tel que l'acide oléique. Ce dernier peut être oxydé en acide azélaïque hydrophile ($HOOC(CH_2)_7COOH$), permettant ainsi une dispersion des nanoparticules dans une solution aqueuse. Cette réaction peut être réalisée en utilisant les réactifs de Lemieux-von Rudloff[117] ou de l'ozone[118]. L'intérêt de cette technique est la formation d'acide azélaïque offrant ainsi un groupement acide en surface, intéressant pour une conjugaison future avec une biomolécule ou un vecteur. Cependant cette voie présente un faible rendement ne permettant pas d'avoir une hydrophilisation totale des particules.

- *Ensemble « couche par couche »*

Cette technique implique l'absorption successive d'ions de charges opposées à la surface[119, 120]. En effet, l'attraction électrostatique des espèces de charges opposées est l'une des interactions les plus fortes et les plus stables. Une modification spécifique couche par couche peut s'avérer utile pour des applications en biologie. L'avantage de cette technique est qu'elle permet la préparation de colloïdes dont la coquille possède une épaisseur et une composition variée. De plus, ce procédé permet de contrôler le signe et l'amplitude de la charge de surface.

- *Enrobage par un polymère amphiphile*

Cette approche fait intervenir l'interaction de Van der Waals entre la partie hydrophobe du polymère amphiphile et le ligand hydrophobe présent en surface de la nanoparticule. La tête hydrophile du polymère se retrouve ainsi en surface et conduit à une bonne dispersion en solution aqueuse. Un grand nombre de polymères ont été testés tels que le PMAO[108] (poly(maleic anhydride-alt-1-octadécène)) ou l'AO-PAA-PEG[121] (octylamine-poly-(acrylic acid)-poly(ethylene glycol)).

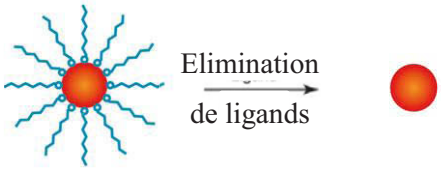
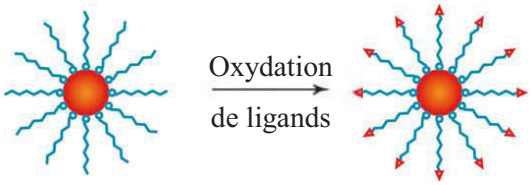
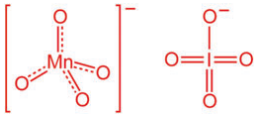
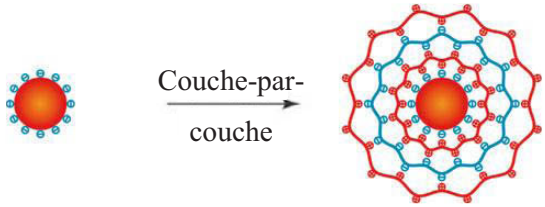
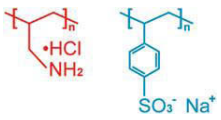
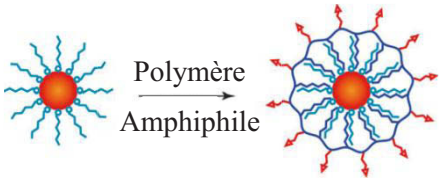
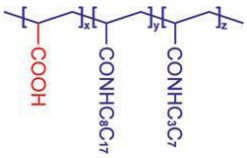
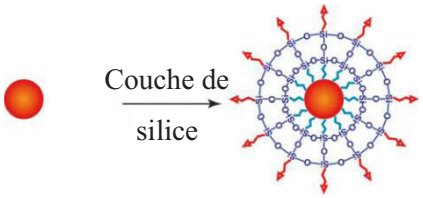
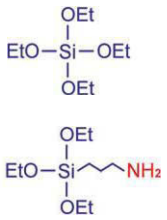
- *Enrobage par une coquille de silice*

La silice est largement répertoriée pour sa stabilité chimique, sa biocompatibilité et sa transparence optique. Lorsque ce composé inorganique est utilisé comme coquille, les différents procédés de synthèse permettent de modifier les groupements fonctionnels présents en surface et ainsi faciliter les accroches avec des vecteurs ou des molécules biologiques. Il existe deux voies de synthèse permettant la formation de silice en surface des nanoparticules grâce aux précurseurs silanes tels que le TEOS (orthosilicate de tétraéthyle). Le premier procédé est la méthode de Stöber qui est utilisé dans le cas de nanoparticules hydrophile. Le second procédé, nécessaire dans le cas de nano-objets hydrophobes, utilise également la chimie du sol-gel nécessitant des micelles inverses. Les réactions chimiques se produisent dans une cavité hydrophile nano-confinée créée par un surfactant (par exemple l'Igepal CO-520). Cette technique, largement utilisée dans le cas de nanoparticules recouvertes d'acide oléique[93, 122], permet de contrôler l'épaisseur de la couche de silice formée en modifiant la quantité des réactifs ou le temps de réaction. Enfin, un autre avantage de cette méthode est qu'il est possible d'obtenir une coquille de silice mésoporeuse offrant de nombreux sites de fixation pour des molécules ou des médicaments[123].

- *Echange de ligands*

Cette voie d'hydrophilisation est la plus courante pour modifier la surface des nanoparticules, en remplaçant le ligand hydrophobe par un ligand hydrophile sans influence sur les propriétés chimiques et optiques des particules. Dans le cas de synthèse utilisant l'acide oléique, les nanoparticules présentent ce dernier en surface, avec un hydrocarbure à longue chaine et un groupe carbonyle qui se coordonne avec les ions de lanthanides présents en surface. Afin d'assurer l'échange de ligand, les molécules hydrophiles doivent principalement posséder une forte affinité avec les ions lanthanides. Une large variété de ligands ont été répertoriés tels que le PAA[124] (acide polyacrylique) ou le PEG-phosphate[125] (polyéthylène glycol). On peut également noter ici que la plupart des ligands couramment utilisés possèdent des groupements fonctionnels permettant une biofonctionnalisation ou une vectorisation.

Tableau 7 : Récapitulatif des procédés d'hydrophilisation[71]

Schéma	Réactifs principaux	Principe
	HCl	Traitement acide ou en présence d'alcool permettant une élimination des ligands de synthèse
		Oxydation de la liaison double grâce à un réactif de Lemieux-von Rudloff
		Adsorption électrostatique d'ions de charge opposés à la surface
		Adsorption d'un copolymère amphiphile à la surface grâce à l'attraction hydrophobe entre le ligand et la chaîne d'hydrocarbure du polymère
		Croissance d'une enveloppe de silice amorphe en surface
		Déplacement des ligands de synthèse par des molécules polymères bifonctionnels

3.5. Conclusion

Dans le cadre de cette thèse, nous avons décidé de travailler avec des nanoparticules de $NaYF_4$ dopées avec une composition en terres rares optimale pour obtenir les conversions souhaitées. Cette synthèse est réalisée par décomposition thermique, permettant ainsi d'obtenir des nanoparticules sphériques, de phase cristalline hexagonale, dont la taille sera proche de 20 nm. De plus, un enrobage par une coquille inorganique de la même matrice de fluorures non dopée est fait afin de protéger du quenching de la luminescence dû au milieu environnant (ligands de surface ou solvant). Enfin, l'étape d'hydrophilisation des nanoparticules est réalisée grâce à deux procédés : l'enrobage par une coquille de silice et l'échange de ligands. Cette dernière voie d'hydrophilisation conduit alors à deux types de ligands différents (chapitre IV).

CHAPITRE III.
Synthèse et caractérisation de nanoparticules pour l'Upconversion

SOMMAIRE

1. Synthèse et caractérisation de $NaYF_4:Ln^{3+}$ 71

1.1. $NaYF_4$ dopé Yb^{3+}/Er^{3+} et Yb^{3+}/Tm^{3+} 71

1.1.1. Principe et méthode 71

1.1.2. Caractérisations structurales et morphologiques 72

1.2. $NaYF_4$ dopé Yb^{3+}, Tm^{3+} et Gd^{3+} 74

1.3. Etude des propriétés optiques 75

1.3.1. Spectre d'excitation anti-Stokes de la matrice $NaYF_4$:Yb^{3+}, Er^{3+} 76

1.3.2. Conversion Infrarouge → Visible 76

1.3.3. Conversion Infrarouge → Proche Infrarouge 78

1.3.4. Conversion Infrarouge → Ultraviolet 80

2. Enrobage par une coquille de $NaYF_4$ non dopée 81

2.1. Protocole 82

2.2. Caractérisations structurales et morphologiques 82

2.3. Propriétés optiques 84

3. Conclusion 86

Les deux premiers chapitres ont permis de répertorier et de mettre en avant l'intérêt majeur des UCNPs pour des applications en imagerie médicale. Les caractéristiques cristallines, morphologiques et optiques étant ainsi définies précédemment, ce chapitre détaillera la synthèse de la matrice $NaYF_4$ dopée avec des ions de terres rares ainsi que l'amélioration des propriétés optiques des composés synthétisés. Les caractéristiques des techniques expérimentales utilisées seront présentées dans l'annexe A de ce mémoire.

1. Synthèse et caractérisation de $NaYF_4:Ln^{3+}$

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre II, la synthèse de nanoparticules destinées à des applications médicales impose le contrôle de nombreuses caractéristiques telles que la structure cristalline, le facteur de forme, la dimension et la distribution de taille. Les procédés de synthèses par voie liquide, permettant le contrôle des différentes étapes de germination et de croissance des cristallites, sont alors parfaitement adaptés pour l'élaboration de ces nanoparticules assurant ainsi une homogénéité des lots de nanoparticules obtenues.

1.1. $NaYF_4$ dopé Yb^{3+}/Er^{3+} et Yb^{3+}/Tm^{3+}

1.1.1. Principe et méthode

La synthèse des nanoparticules a été réalisée *via* une décomposition thermique (ou thermolyse) de précurseurs de type chlorures. Cette synthèse[91] parfaitement maitrisée a permis de mettre en évidence le choix et le rôle des solvants. En effet, le milieu de synthèse est composé d'acide oléique (utilisé comme surfactant) et d'octadécène (utilisé comme solvant à haut point d'ébullition). La proportion de ces solvants a préalablement été optiminée afin d'obtenir des nanoparticules sphériques de taille contrôlée[89].

Dans le cas de la synthèse de $NaYF_4$:18%Yb, 2%Er : YCl_3 (0,8 mmol), $YbCl_3$ (0,18 mmol) et $ErCl_3$ (0,02 mmol) sont dissous dans un mélange comprenant 6 mL d'acide oléique et 15 mL d'octadécène (3/5 v/v). La solution est portée à 160°C pendant 1 heure afin d'obtenir un mélange homogène puis la solution est refroidie à température ambiante. Une seconde solution, contenant 2,5 mmol de NaOH et 4 mmol de NH_4F préalablement dissous dans 10 mL de méthanol, est ajoutée lentement au mélange précèdent. Le tout est agité pendant 30 minutes, puis chauffé à 100°C pendant 10 minutes. Enfin la température est fixée à 320°C pendant 1 heure sous flux d'argon. La solution est ensuite refroidie à température ambiante et les nanocristaux sont précipités avec de l'éthanol. Le mélange est alors lavé avec un mélange cyclohexane/éthanol (1/1 v/v) trois fois. La poudre obtenue est soit remise en suspension dans un solvant non polaire tel que le cyclohexane, soit séchée à l'étuve à 80°C afin d'étudier ses propriétés physico-chimiques.

Dans le cas de nanoparticules de $NaYF_4$: 20%Yb, 2%Tm, le ratio molaire des chlorures de terres rares (YCl_3, $YbCl_3$ et $TmCl_3$) est de 0,78 : 0,20 : 0,02. Le protocole reste identique au précèdent.

Les quantités de matière utilisées sont répertoriées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 8 : Récapitulatif des quantités de matières de la synthèse des UCNPs

$NaYF_4$:18%Yb, 2%Er			$NaYF_4$:20%Yb, 2%Tm		
YCl_3	0,8	1 éq.	YCl_3	0,78	1 éq.
$YbCl_3$	0,18		$YbCl_3$	0,20	
$ErCl_3$	0,02		$TmCl_3$	0,02	
NaOH	2,5	2,5 éq	NaOH	2,5	2,5 éq
NH_4F	4	4 éq	NH_4F	4	4 éq

1.1.2. Caractérisations structurales et morphologiques

Les propriétés physico-chimiques détaillées ci-dessous feront référence à un échantillon dopé Yb^{3+}/Er^{3+}. Les mêmes caractéristiques ont été obtenues pour la synthèse de nanoparticules non dopées ou dopées Yb^{3+}/Tm^{3+}.

Dans un premier temps, l'analyse par diffraction des rayons X sur poudre a permis de mettre en évidence la formation de la phase hexagonale de notre composé (JCPDS : 28-1192). Le diffractogramme souligne une cristallinité élevée des nanoparticules.

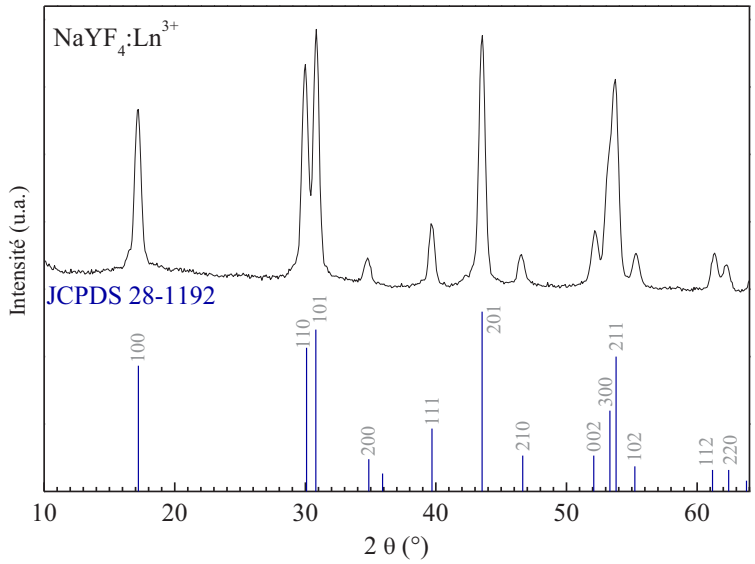


Figure 34 : Diffractogramme sur poudre des nanoparticules $NaYF_4$: Yb^{3+}, Er^{3+}/Tm^{3+}

La morphologie des particules obtenues a été observée par microscopie à transmission comme le montre la figure 35. Les nanoparticules sont sphériques et de distribution de tailles monomodale. Sur l'ensemble des synthèses réalisées au cours de ce travail, les diamètres moyens observés sont compris entre 20 et 25 nm avec un écart type de 2 nm. Cette étroite distribution a été observée pour tous les échantillons. Cependant, il peut être noté que de rares petits nucléi ont pu être observés (<5nm).

Le caractère monomodal de ces nano-objets n'a pas pu être confirmé par une analyse par diffusion dynamique de la lumière (connu sous le nom de DLS – *Dynamic Light Scattering*). Ceci est dû à une mauvaise stabilité des nanoparticules en suspension dans le solvant non polaire, ne permettant pas une analyse fiable de la mesure de la taille des nanoparticules en solution.

D'autre part, des clichés de microscopie haute résolution ont été réalisés sur ces nanoparticules et sont présentés en figure 35c et 35d. On peut clairement distinguer les plans cristallins distants de 0,52 nm et 0,29 nm, représentant respectivement la distance entre les plans (100) et (110) de la phase hexagonale de notre composé.

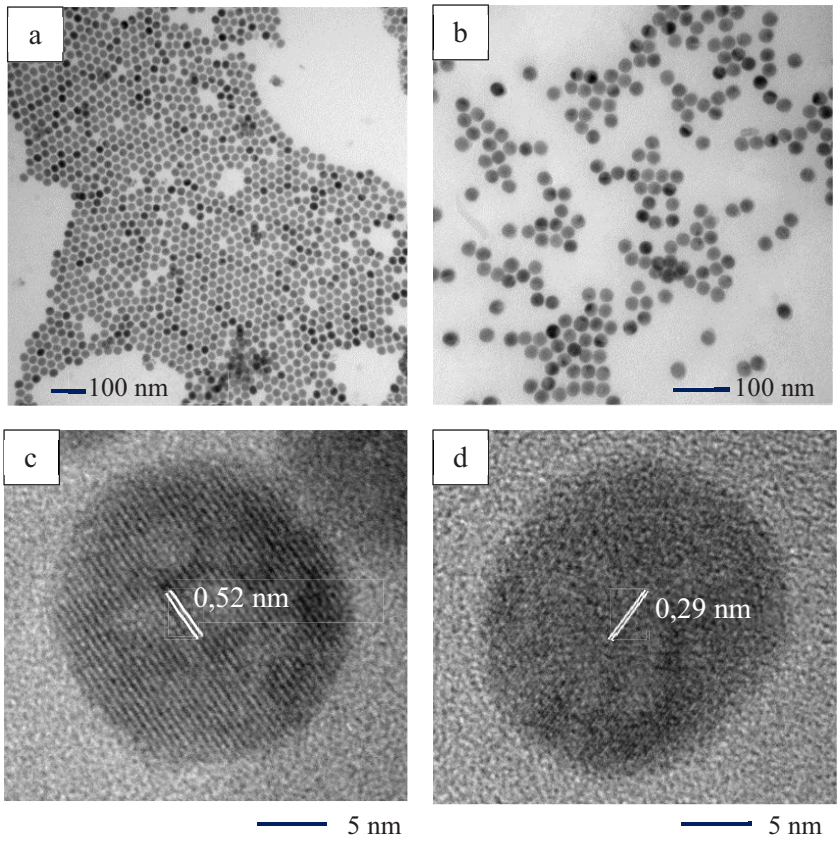


Figure 35 : Clichés réalisés par microscopie électronique en transmission de $NaYF_4$: Yb^{3+}, Er^{3+}/Tm^{3+} en suspension dans du cyclohexane - (a) et (b) MET - (c) et (d) MET haute résolution

La présence d'acide oléique résiduel en surface des nanoparticules a également été mise en évidence. D'une part, l'analyse par spectroscopie infrarouge a permis de révéler la présence des groupements caractéristiques de ces molécules en surface des UCNPs (figure 36). En effet, nous pouvons retrouver deux bandes fines à 2921 et 2852 cm^{-1} attribuées respectivement aux vibrations asymétrique et symétrique des groupements méthyl appartenant à la chaine alkyle de l'acide oléique. Le pic à 3004 cm^{-1} correspond quant à lui à la vibration de la liaison =C-H. Par ailleurs, la bande fine à 1710 cm^{-1} provient de la vibration des liaisons C=O confirmant la présence d'acide oléique en surface des nanoparticules.

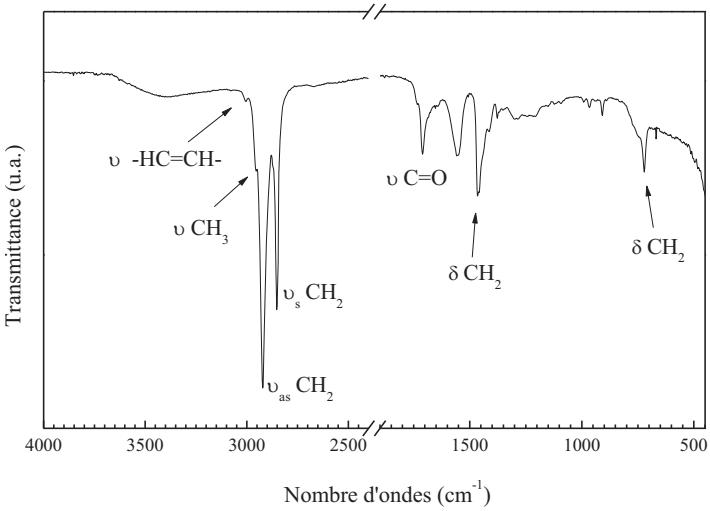


Figure 36 : Spectre infrarouge des nanoparticules sous forme de poudre

D'autre part, une analyse thermogravimétrique a permis de quantifier l'acide oléique résiduel. Celui-ci a été estimé entre 8 et 10 % massique selon les échantillons. La variation de ce paramètre n'est cependant pas contrôlable puisque l'élimination de l'acide oléique se fait lors du lavage des nanoparticules avec le mélange cyclohexane/éthanol.

1.2. $NaYF_4$ dopé Yb^{3+}, Tm^{3+} et Gd^{3+}

Le protocole reste inchangé pour ce composé, c'est-à-dire que la synthèse est réalisée à partir de chlorures dans un mélange d'acide oléique et d'octadécène. Le ratio molaire des chlorures de terres rares (YCl_3, $YbCl_3$, $GdCl_3$ et $TmCl_3$) est de 0,595 : 0,20 : 0,20 : 0,005. Les propriétés structurales et morphologiques sont cependant modifiées en raison du taux de dopage élevé de la matrice.

Tout d'abord, la taille des nanoparticules est inférieure puisque le diamètre moyen est de 12 ± 2 nm (figure 37). D'autre part, des nanoparticules de forme allongées de 30 nm de longueur en faible nombre sont également observées.

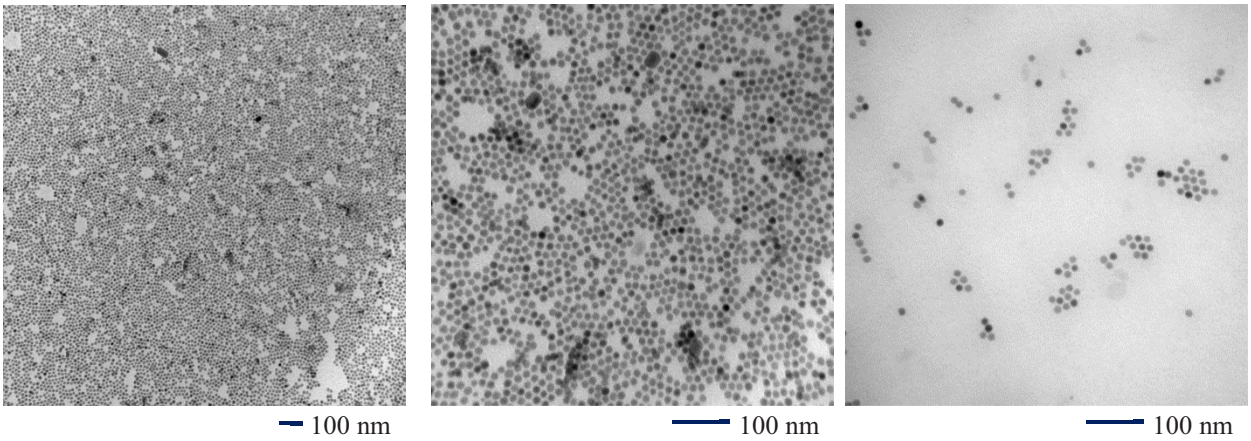


Figure 37 : Clichés MET des nanoparticules $NaYF_4$: Yb^{3+}, Gd^{3+}, Tm^{3+}

Les nanoparticules cristallisent toujours avec la phase hexagonale comme l'illustre le diffractogramme de la figure 38. En outre, aucune phase secondaire n'a été observée ce qui indique que les ions Gadolinium ont été correctement insérés dans la matrice β-$NaYF_4$. La largeur des pics reflète bien ici la faible taille des particules obtenues. En effet, la loi de Debye et Scherrer nous a permis de déterminer la taille des cristallites. La valeur calculée est de 11nm, ce qui correspond bien aux diamètres observés en microscopie.

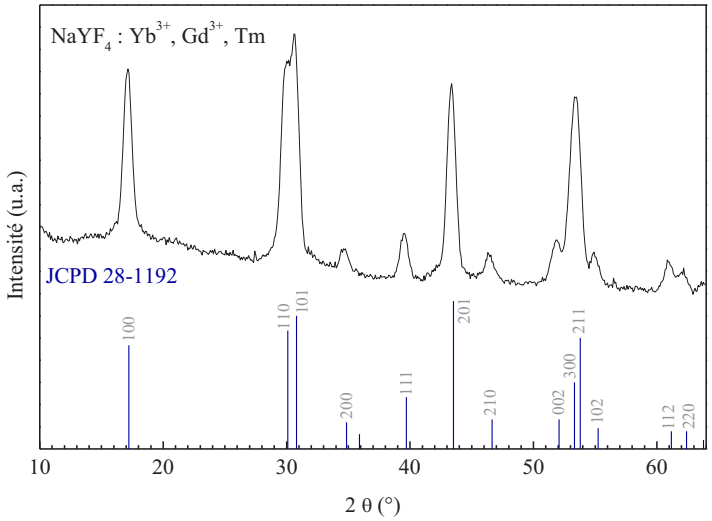


Figure 38 : Diffractogramme sur poudre des nanoparticules $NaYF_4$: Yb^{3+}, Gd^{3+}, Tm^{3+}

De même que pour les nanoparticules précédentes, la synthèse induit la présence d'acide oléique en surface, conférant un caractère hydrophobe aux nanoparticules. Nous avons abouti aux mêmes conclusions en utilisant les techniques de caractérisation identiques (spectroscopie infrarouge et thermogravimétrie).

1.3. Etude des propriétés optiques

Dans cette partie, nous présenterons les résultats obtenus au cours de l'étude des propriétés optiques des UCNPs dans le domaine du visible-NIR. Le tableau ci-dessous rappelle les différentes compositions des nanoparticules utilisées en fonction du type de conversion visée.

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des conversions ciblées en fonction des ions de dopage utilisés

Type de nanoparticules	Conversion ciblée
$NaYF_4$: 18%Yb, 2%Er	Infrarouge → visible
$NaYF_4$: 20%Yb, 2%Tm	Infrarouge → proche infrarouge
$NaYF_4$: 20%Yb, 20%Gd, 0.5%Tm	Infrarouge → ultraviolet

1.3.1.Spectre d'excitation anti-Stokes de la matrice $NaYF_4$:Yb^{3+}, Er^{3+}

Le spectre d'excitation a été réalisé sur une poudre de $NaYF_4$: 18%Yb^{3+}, 2%Er^{3+}. Ce spectre, présenté en figure 39, a été enregistré entre 920 et 1060 nm en utilisant un laser accordable à colorant et en monitorant la longueur d'onde d'émission à 541 nm, correspondant à la transition $^4S_{3/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ de l'ion Erbium. Ce spectre est constitué d'une seule bande centrée à 978 nm et attribuée à la transition $^2F_{7/2} \rightarrow {}^2F_{5/2}$ de l'ion Ytterbium. Dans la suite de ces analyses, les mesures ont été réalisées *via* une excitation sur poudre avec une diode laser émettant à 980 nm, permettant ainsi d'avoir l'émission la plus intense possible.

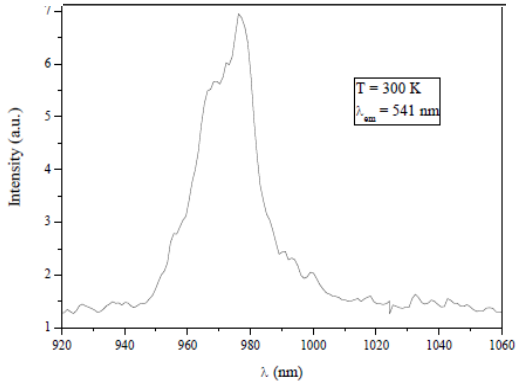


Figure 39 : Spectre d'excitation anti-Stokes de la matrice $NaYF_4$: 18%Yb^{3+}, 2%Er^{3+}

1.3.2.Conversion Infrarouge → Visible

Le spectre d'émission du composé $NaYF_4$: 18%Yb, 2%Er présente quatre groupes de bandes d'émission dans le visible centrées sur les longueurs d'onde suivantes : 406 nm (violet), 520 nm (vert), 535 nm (vert) et 650 nm (rouge). Ces différentes contributions correspondent respectivement aux transitions $^2H_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$, $^2H_{11/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$, $^4S_{3/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ et $^4F_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ de l'ion Erbium. Les transitions les plus intenses étant situées dans le domaine de longueurs d'onde du vert, le matériau aura une fluorescence caractérisée visuellement par une couleur verte intense (photographie de la figure 40).

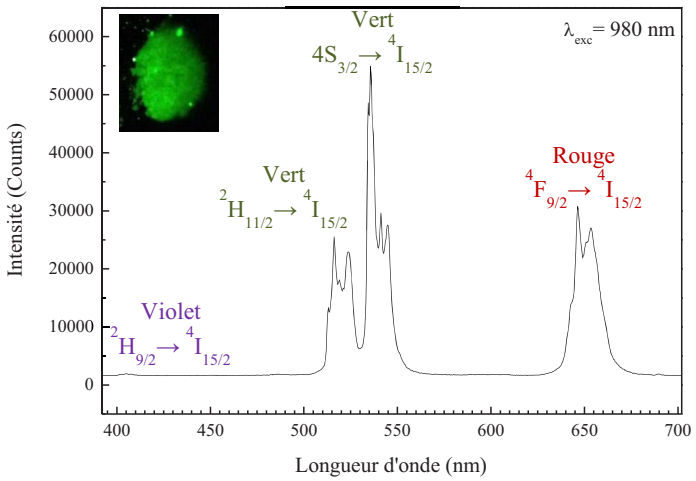


Figure 40 : Spectre d'émission de la fluorescence de $NaYF_4$: 18%Yb, 2%Er sous excitation à 980 nm

Par ailleurs, il est possible de déterminer le nombre de photons impliqués dans le processus d'upconversion grâce à la relation $I_{up} \propto I_{laser}^{n}$, où I_{up} est l'intensité d'émission par upconversion, I_{laser}^{n} la puissance du laser et n le nombre de photons requis. Les intensités d'émissions dans le visible des transitions $^2H_{11/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ et $^4F_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ des ions Erbium ont donc été enregistrées pour différentes puissance du laser d'excitation à 980 nm. Le courbes log-log de ces paramètres sont représentées en figure 41. Elles indiquent que, pour les deux émissions étudiées, l'intensité d'émission varie comme le carré de l'intensité d'excitation. Enfin, la pente des droites tracées est d'environ 2 ce qui implique un processus à deux photons.

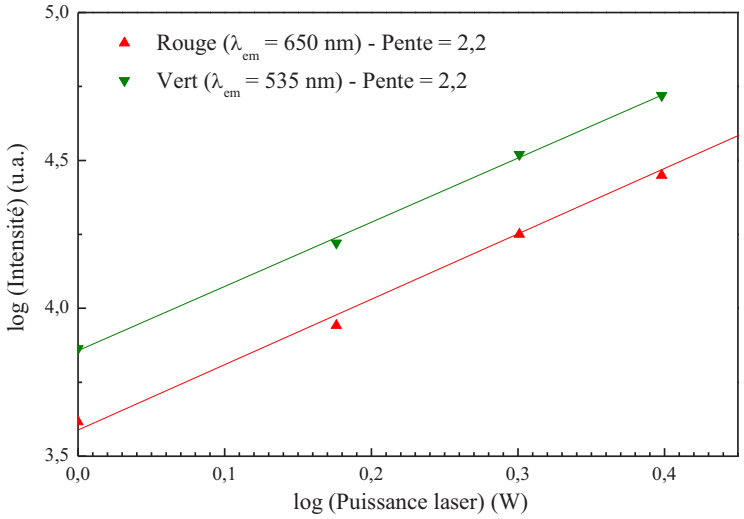


Figure 41 : Courbe log-log des intensités de fluorescence des émissions du composé $NaYF_4$: 18%Yb, 2%Er sous excitation à 980 nm

Le diagramme de niveaux d'énergie, présenté en figure 42, indique les mécanismes possibles d'upconversion.

Un ion Yb^{3+} dans son état fondamental $^2F_{7/2}$ absorbe un photon et atteint son état excité $^2F_{5/2}$, puis redescend à son état fondamental tout en transférant son énergie à un ion Er^{3+} voisin. Cette énergie va ainsi permettre de promouvoir l'ion Er^{3+} dans son état excité $^4I_{11/2}$ (transfert d'énergie). Puis un second photon, ou un transfert d'énergie de l'ion Yb^{3+}, vient peupler le niveau $^4F_{7/2}$ de l'ion Er^{3+}. Ce dernier va ensuite relaxer de manière non-radiative jusqu'aux niveaux $^2H_{11/2}$ et $^4S_{3/2}$ permettant ainsi les émissions dans le vert *via* les transitions $^2H_{11/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ et $^4S_{3/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$, à 520 et 535 nm. En parallèle, l'ion Er^{3+} peut également relaxer et peupler le niveau $^4F_{9/2}$, conduisant ainsi à l'émission rouge $^4F_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$. De même, l'ion Er^{3+} dans son état $^4I_{11/2}$ peut relaxer de manière non radiative jusqu'à l'état $^4I_{13/2}$, puis peupler le niveau $^4F_{9/2}$ *via* un transfert d'énergie à partir de l'ion excité Yb^{3+}, conduisant également à l'émission dans le rouge.

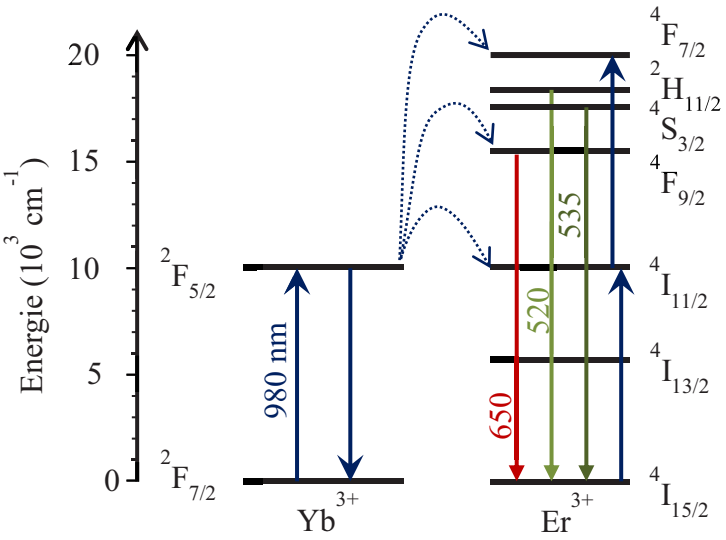


Figure 42 : Diagramme des niveaux d'énergie des ions Yb^{3+} et Er^{3+}dans une matrice $NaYF_4$

1.3.3.Conversion Infrarouge → Proche Infrarouge

Le spectre d'émission du composé $NaYF_4$: 20%Yb, 2%Tm, présenté sur la figure 43, est constitué de 4 bandes d'émission. D'une part, la contribution la plus intense observée pour ce composé est centrée dans le proche infrarouge à 800 nm et est attribuée à la transition $^3H_4 \rightarrow {}^3H_6$ de l'ion Thulium. D'autre part, trois émissions, moins intenses, sont observés dans le domaine du visible, à savoir une dans le bleu (470 nm) et deux dans le rouge (638 et 687 nm), correspondant respectivement aux transitions $^1G_4 \rightarrow {}^3H_6$, $^1G_4 \rightarrow {}^3F_4$ et $^3F_3 \rightarrow {}^3H_6$ des ions Thulium. Enfin, la bande d'émission centrée à 800 nm est environ vingt fois plus intense que celles dans le visible, comme le montre le zoom sur le domaine de longueur d'onde entre 400 et 720 nm.

Toutefois, l'émission intense à 800 nm sera pertinente pour une application en imagerie à florescence *in vivo*.

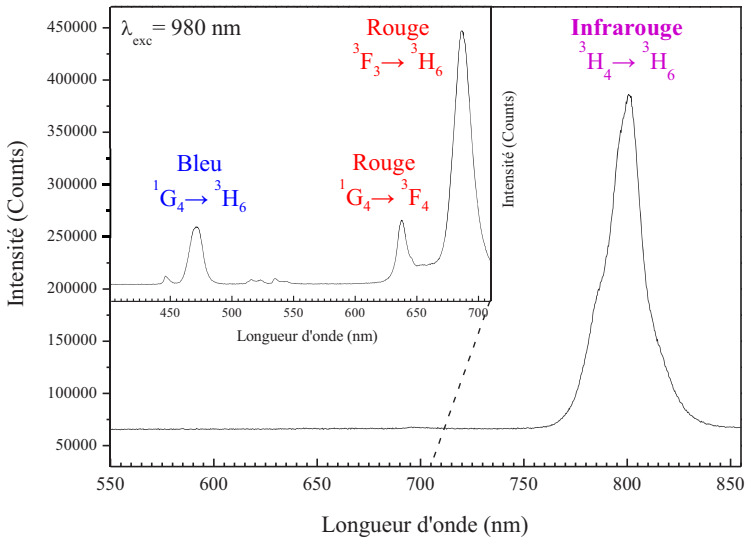


Figure 43 : Spectre d'émission de la fluorescence de $NaYF_4$: 20%Yb, 2%Tm sous excitation à 980 nm

De même, nous avons pu déterminer le nombre de photons mis en jeu dans le processus d'upconversion : il est d'environ deux pour chacune des transitions, comme l'indique les courbes log-log tracées dans la figure 44.

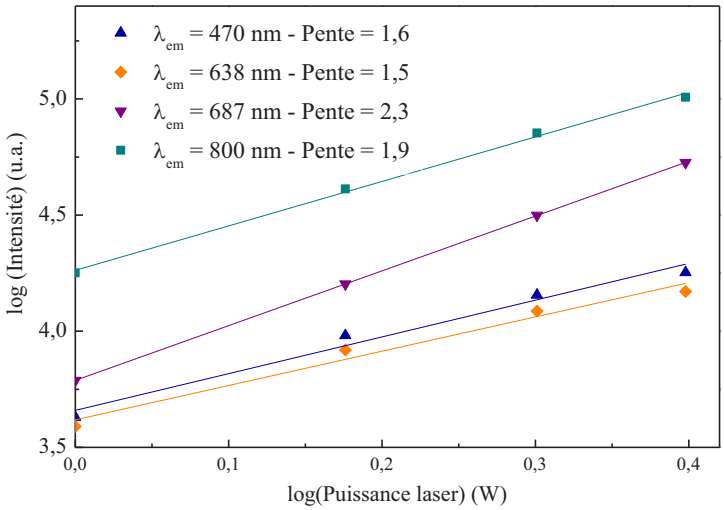


Figure 44 : Courbe log-log des intensités de luminescence des émissions du composé $NaYF_4$: 20%Yb, 2%Tm sous excitation à 980 nm

La figure 45 décrit les mécanismes de population et d'émission des niveaux électroniques des ions Yb^{3+} et Tm^{3+} dans la matrice $NaYF_4$ codopée Yb/Tm. Sous excitation à 980 nm, les ions Yb^{3+} jouent le rôle de sensibilisateurs puisqu'ils absorbent les photons infrarouges et transfèrent leur énergie aux ions Tm^{3+} (ions accepteurs). Ces transferts vont ainsi permettre de peupler les niveaux $^3H_5$, $^3F_2$ et $^1G_4$ des ions Tm^{3+}. Les relaxations radiatives à partir de ces trois niveaux d'énergie vont alors permettre d'observer les émissions à 470 nm ($^1G_4 \rightarrow {}^3H_6$), 638 nm ($^1G_4 \rightarrow {}^3F_4$), 687 nm ($^3F_3 \rightarrow {}^3H_6$) et 800 nm ($^3H_4 \rightarrow {}^3H_6$).

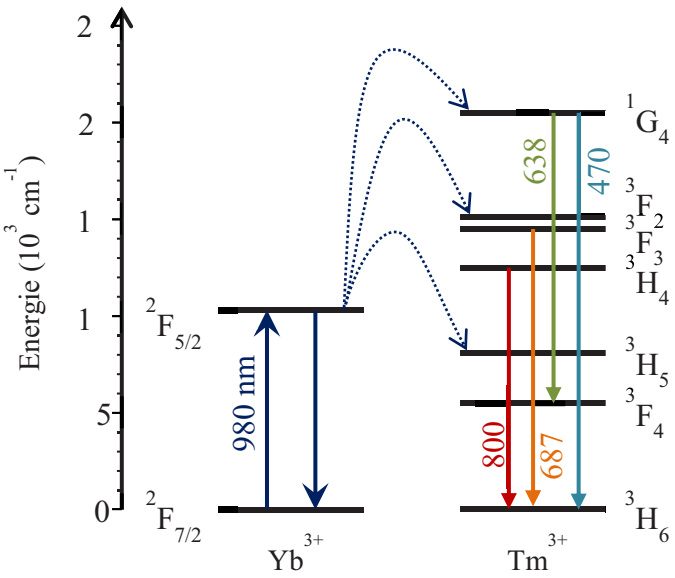


Figure 45 : Diagramme des niveaux d'énergie des ions Yb^{3+} et Tm^{3+} dans une matrice $NaYF_4$

1.3.4.Conversion Infrarouge → Ultraviolet

Les spectres d'émission présentés dans cette partie ont été enregistrés uniquement dans le domaine spectral de l'ultra-violet entre 250 et 420 nm. En effet, le composé $NaYF_4$: 20%Yb, 20%Gd, 0,5%Tm présente également des bandes d'émissions dans le visible et dans le proche infrarouge identiques à celles décrites en 1.3.1[103]. Cette étude ne sera pas présentée dans ce manuscrit puisque nous nous intéressons uniquement à la conversion infrarouge → UV. En effet, l'intérêt de cette conversion dans le domaine de l'UV est d'envisager un aspect thérapeutique des UCNPs : la production de chaleur localisée au voisinage d'une tumeur permettrait d'effectuer un traitement local, peu invasif.

Quatre pics d'émissions principaux sont observés dans le domaine de l'ultraviolet (figure 46). Les contributions à 306 et 312 nm correspondent respectivement aux transitions $^6P_{5/2} \rightarrow {}^8S_{7/2}$ et $^6P_{7/2} \rightarrow {}^8S_{7/2}$ de l'ion Gd^{3+}. Les autres transitions à 343 et 360 nm proviennent quant à elles de l'ion Tm^{3+} (transitions $^1I_{7/2} \rightarrow {}^3F_4$ et $^1D_2 \rightarrow {}^3H_6$ respectivement). L'émission à 312 nm provenant de l'ion Gd^{3+} est environ six fois moins intense que celle à 360 nm due à l'ion Tm^{3+}.

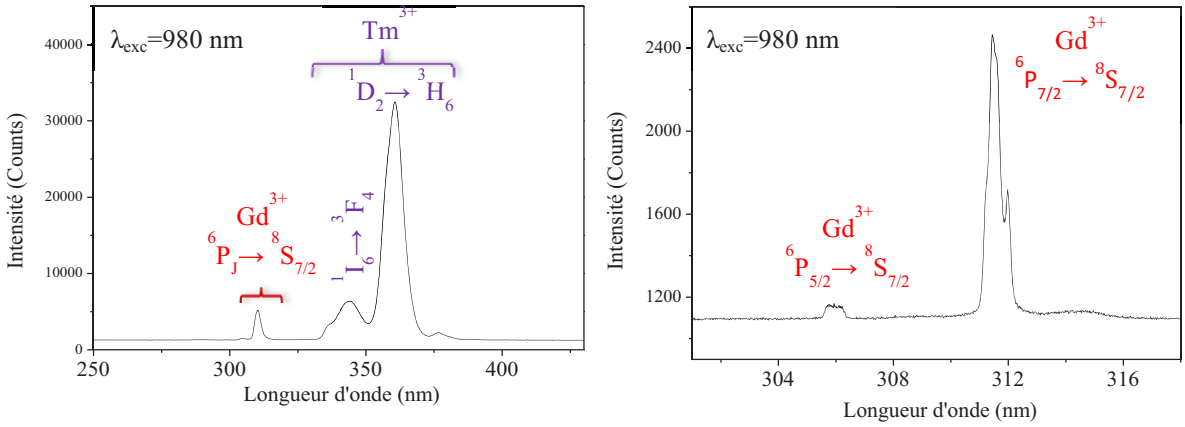


Figure 46 : Spectres d'émission de la fluorescence de $NaYF_4$: 20%Yb, 20%Gd, 0,5%Tm sous excitation à 980 nm

Comme vu précédemment, les émissions par upconversion provenant de l'ion Tm^{3+} sensibilisé par les ions Yb^{3+} peuvent se produire selon un processus de transfert d'énergie multi-photonique afin de peupler les états excités $^3F_4$, $^1G_4$, $^1D_2$ et $^3P_0$ de l'ion Tm^{3+}.

Pour les émissions provenant de l'ion Gd^{3+}, du fait du large gap d'énergie entre l'état fondamental et le premier état excité, les états ^6I_J, $^6P_{5/2}$ et $^6P_{7/2}$ ne peuvent être excités par l'absorption directe de photons à 980 nm. C'est pourquoi le peuplement de ces niveaux d'énergie doit s'effectuer par transfert d'énergie issue des ions Tm^{3+}. En effet, le transfert d'énergie ($^3P_{2,1} \rightarrow {}^3H_6$ [Tm^{3+}] : $^8S_{7/2} \rightarrow {}^6I_J$ [Gd^{3+}]) entre les ions Thulium et Gadolinium est quasi résonnant. Ensuite, les émissions non radiatives $^6I_J \rightarrow {}^6P_J$, prédominante à cette concentration en Gd^{3+}, donnent lieu au peuplement des états excités $^6P_{5/2}$ et $^6P_{7/2}$.

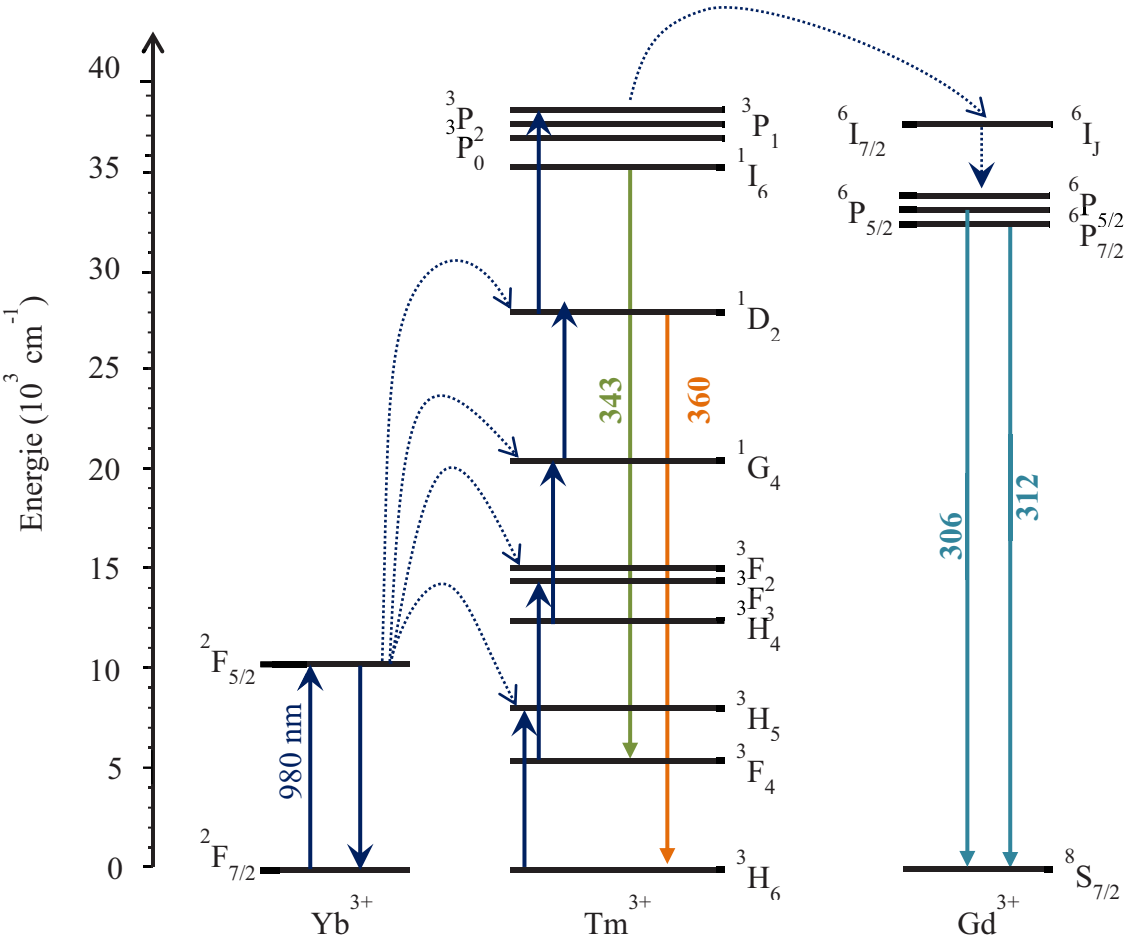


Figure 47 : Diagramme des niveaux d'énergie des ions Yb^{3+}, Gd^{3+} et Tm^{3+} dans une matrice $NaYF_4$

2. Enrobage par une coquille de $NaYF_4$ non dopée

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre 2, l'intérêt d'une coquille de $NaYF_4$ non dopée a largement été prouvé. En effet, le cœur de fluorure possède une luminescence moindre dû à l'extinction de la fluorescence issue des ions de surface par la présence des ligands avoisinants ou le solvant. La synthèse de ces nanoparticules cœur/coquille inorganique/inorganique est décrite dans cette partie.

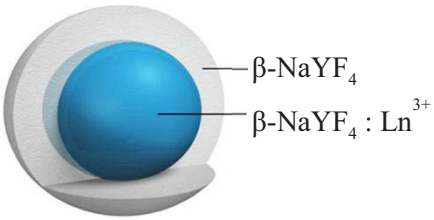


Figure 48 : Schéma représentant les nanoparticules de type cœur/coquille

2.1. Protocole

Le protocole décrit ci-dessous s'est inspiré de la synthèse des cœurs de $NaYF_4$: Yb^{3+}, Er^{3+} ou Tm^{3+} et a été repris de la littérature[108].

Afin de réaliser un enrobage des cœurs de fluorure luminescents : 1 mmol de YCl_3 (1 éq.) est dissous dans un mélange contenant 6 mL d'acide oléique et 15 mL d'octadécène. La solution est portée à 160°C pendant 40 minutes sous agitation mécanique. La température est ensuite ramenée à 80° C sous un flux constant d'argon, puis 15 mL d'une solution contenant 90 mg de nanoparticules dopées (dispersées dans du cyclohexane) est ajoutée au mélange. La solution est chauffée afin de permettre l'évaporation du cyclohexane puis ramenée à température ambiante. Une solution de 10 mL de méthanol contenant 2,5 mmol de NaOH (2,5 éq.) et 4 mmol de NH_4F (4 éq.) est ajoutée goutte à goutte au mélange réactionnel. La solution alors trouble est agitée pendant 15 minutes à température ambiante. La température est ensuite augmentée afin d'évaporer le méthanol. Lorsque la température atteint 110°C, le mélange est chauffé rapidement à 300°C sous flux d'argon et est maintenu à cette température pendant 1h30. Après refroidissement à température ambiante, les nanoparticules cœur/coquille sont séparées du mélange réactionnel par précipitation dans de l'éthanol absolu. Les nanoparticules sont ensuite récupérées par centrifugation puis lavées 3 fois avec un mélange éthanol/cyclohexane (1/1 v/v). La poudre obtenue est soit remise en suspension dans un solvant non polaire tel que le cyclohexane, soit séchée à l'étuve à 80°C afin d'étudier ses propriétés physico-chimiques.

Des modifications des quantités de matières ont été effectuées afin d'étudier l'épaisseur de la coquille de $NaYF_4$ non dopée (tableau 10).

Tableau 10 : Quantités de matière utilisées pour la synthèse de l'enrobage de la coquille (mmol)

Echantillons	YCl_3	NaOH	NH_4F
(1)	1	2,5	4
(2)	0,5	1,25	2
(3)	0,25	0,625	1

2.2. Caractérisations structurales et morphologiques

Dans un premier temps, l'analyse par diffraction des rayons X sur poudre a confirmé la formation de la forme hexagonale β du composé souhaité (JCPDS : 28-1192), pour tous les enrobages effectués, quelles que soient la composition du cœur ou les quantités de matière utilisées pour la synthèse de la coquille. De plus, une diminution de la largeur à mi-hauteur des pics de diffraction par rapport à ceux du diffractogramme du cœur (figure 34) confirme la croissance de la coquille en surface (figure 49).

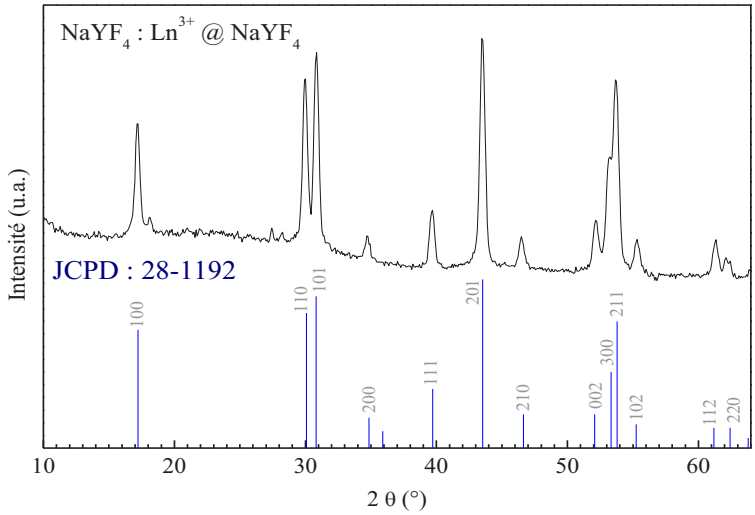


Figure 49 : Diffractogramme sur poudre des nanoparticules cœur/coquille de $NaYF_4 : Yb^{3+}, Er^{3+}@ NaYF_4$

L'analyse par microscopie électronique à transmission (figure 50) a permis de mettre en évidence la morphologie des nanoparticules cœur-coquille obtenues ainsi que l'effet des quantités de matière introduites lors de l'enrobage.

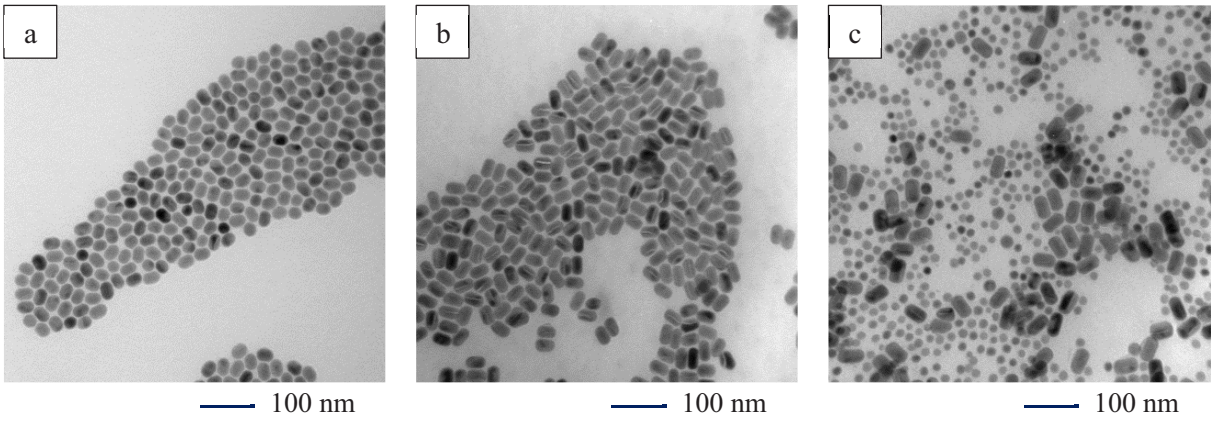


Figure 50 : Clichés en Microscopie électronique à transmission des nanoparticules cœur/coquille de $NaYF_4 : Ln^{3+}@NaYF_4$ – Les clichés (a), (b) et (c) correspondent aux échantillons (1), (2) et (3)

Tout d'abord, une croissance de la coquille dans une direction préférentielle est observée. Dans le cas de l'échantillon (1), c'est-à-dire pour de faibles quantités de matière, certaines nanoparticules ont conservé leur sphéricité mais la majorité présente une forme ovale. Lorsque les quantités de matière sont doublées (échantillon (2)), la croissance s'accentue dans le sens de la longueur de la nanoparticule. Enfin, lorsque les quantités de départ sont quadruplées, comme l'illustre l'échantillon (3), il y a une augmentation de la taille des particules par rapport au cas précèdent ainsi que la formation de nucléi de $NaYF_4$ non dopée, provenant de la nucléation séparée de la matrice lors de la synthèse de la coquille. Les tailles des nanoparticules finales sont comparées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Récapitulatif des tailles de nanoparticules mesurées dans le cas de l'enrobage par une coquille de fluorure non dopée en surface (l'écart type est de 2 nm pour toutes les valeurs)

Echantillon	(1)	(2)	(3)
Diamètre initial du cœur (nm)	21	20	23
Largeur de la particule finale (nm)	22	22	25
Longueur de la particule finale (nm)	31	35	44
Présence de nucléi	non	non	oui

Ce tableau récapitulatif des mesures de taille confirme bien une très faible croissance de la coquille dans la largeur (0.5 à 1 nm d'augmentation d'épaisseur) et une croissance nettement significative dans la longueur (5 nm, 7.5 nm et 10 nm respectivement pour les échantillons (1), (2) et (3)).

Une étude de Peng et al[126] a permis de montrer que la croissance de la coquille anisotrope se fait préférentiellement selon l'axe c. Le processus d'évolution de la forme proposé à la figure 51 illustre que le désaccord de maille entre le noyau et la coquille pourrait conduire à une formation incomplète de la coquille sous certaines conditions, conduisant à des NPs oblong.



Figure 51 : Illustration du processus de croissance de la coquille $NaYF_4$

Enfin, de même que lors de la synthèse des cœurs de fluorures, l'acide oléique résiduel va induire l'hydrophobicité des nanoparticules. Cette propriété a également été confirmée par spectroscopie infrarouge.

2.3. Propriétés optiques

Afin d'évaluer l'intérêt de cette coquille non dopée, les spectres d'émission des composés cœur et cœur/coquille ont été enregistrés sur poudre sous excitation à 980 nm, dans les mêmes conditions. Dans les deux cas, après enrobage des cœurs de fluorures dopés, la position des pics d'émission ne présente pas de déplacement remarquable, indiquant que l'environnement structural des ions de dopage reste inchangé au sein de la matrice.

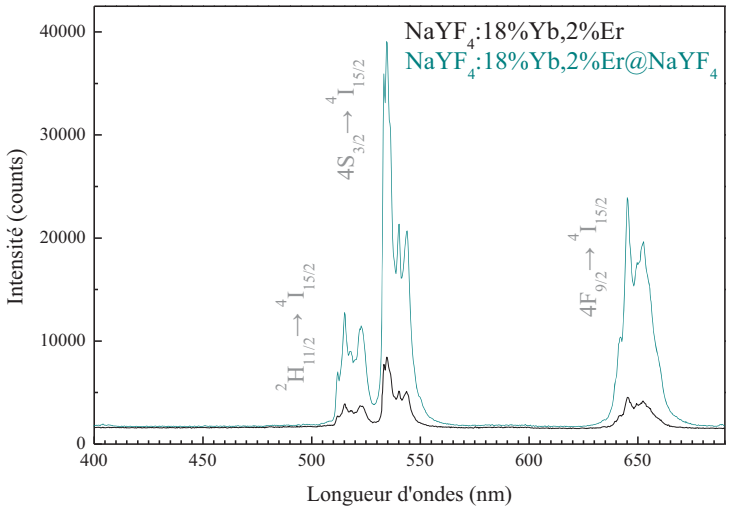


Figure 52 : Spectres d'émission de la fluorescence de $NaYF_4$: 18%Yb, 2%Er et $NaYF_4$: 18%Yb, 2%Er@ $NaYF_4$ sous excitation à 980 nm

Le spectre de luminescence des composés $NaYF_4$: Yb, Er et $NaYF_4$: Yb, Er@$NaYF_4$ est présenté dans la figure 52 et montre une augmentation par un facteur 4 à 5 pour les émissions dans le vert et le rouge respectivement. La faible modification du rapport d'intensité entre le vert et le rouge semble indiquer que le rapport de concentration Yb/Er a été légèrement modifié. Cette différence des facteurs d'accroissement peut s'expliquer par un effet de quenching provoqué par les défauts de surface qui serait plus atténué dans le domaine de longueur d'onde du rouge lors de l'ajout d'une coquille.

La figure 53 présente les spectres d'émission focalisés sur la bande à 800 nm émise par les composés $NaYF_4$: Yb, Tm et $NaYF_4$: Yb, Tm@$NaYF_4$. L'intensité d'émission est ici multipliée par un facteur 8 après l'ajout de la coquille non dopée.

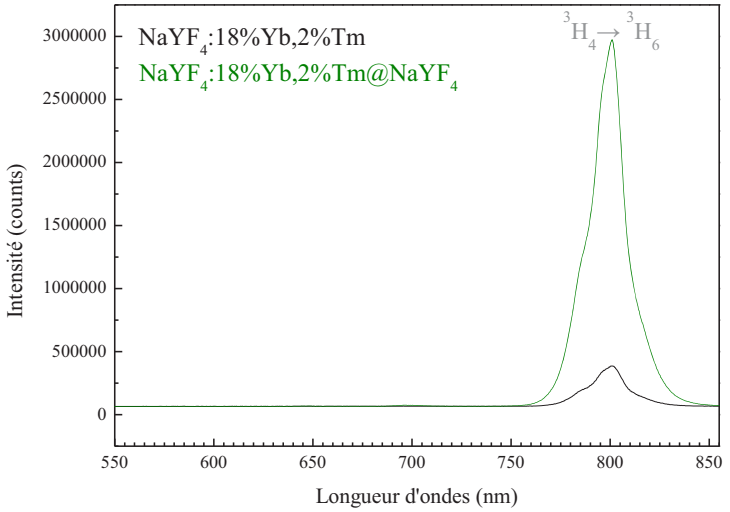


Figure 53 : Spectre d'émission de la fluorescence de $NaYF_4$: 20%Yb, 2%Tm et $NaYF_4$: 20%Yb, 2%Tm@ $NaYF_4$ sous excitation à 980 nm

3. Conclusion

Au travers de cette thèse, les synthèses ont été réalisées afin d'obtenir des lots de nanoparticules dont les propriétés structurales, morphologiques et optiques devaient être parfaitement contrôlées. Pour cela un premier travail sur la synthèse des cœurs de fluorures a été réalisé mettant en avant les limitations des synthèses utilisées dans la littérature. *Via* la synthèse par thermolyse, nous avons pu obtenir des nanoparticules sphériques, possédant une cristallinité élevée et de distribution de tailles monomodale. Ce protocole a permis d'obtenir des échantillons dont les caractéristiques sont reproductibles. Les propriétés optiques ont par ailleurs été étudiées et interprétées.

En outre, l'enrobage des nanoparticules par une coquille de la même matrice non dopée a mis en avant un point crucial pour la suite des synthèses. En effet, la présence de molécules environnantes ou la dispersion dans un solvant engendre une importante extinction de la luminescence qui peut être limité *via* la coquille de $NaYF_4$. Cette caractéristique a largement été démontrée et nous a permis de définir la structure cœur/coquille des nanoparticules qui seront utilisées par la suite de ce projet.

Les nanoparticules retenues sont donc constituées d'un cœur de fluorure dopé avec des concentrations molaires précises en lanthanides (les concentrations étant définies selon la conversion souhaitée), ainsi que d'une coquille de la même matrice non dopée.

Comme il a été précisé pendant ce chapitre, les nanoparticules obtenues sont hydrophobes, dû à la présence d'acide oléique résiduel en surface. Afin d'être utilisé pour des applications *in vitro* et *in vivo*, il est alors nécessaire d'enrober les nano-objets par une coquille hydrophile. Cette partie est présentée dans le chapitre 4.

CHAPITRE IV.
Hydrophilisation des nanoparticules

SOMMAIRE

1. Enrobage par une coquille de silice 93

1.1. Principe et méthode 93

1.2. Protocole 94

1.3. Caractérisations structurale et morphologique 94

1.4. Propriétés optiques 97

1.5. Conclusion 97

2. Echange de ligands : PEG-phosphate 98

2.1. Principe et méthode 98

2.2. Protocoles 99

2.3. Caractérisation des UCNPs PEGylées 99

2.3.1. Spectroscopie Infrarouge 100

2.3.2. Analyse XPS 102

2.4. Conclusion 104

3. Echange de ligands : les dendrons 104

3.1. Principe et méthode 105

3.2. Protocole 106

3.3. Caractérisation du greffage des dendrons 107

3.4. Conclusion 109

4. Conclusion – Comparatif des différentes voies d'hydrophilisation 109

Suite à la synthèse par décomposition thermique, les UCNPs possèdent en surface une couche d'acide oléique, responsable de l'hydrophobie et donc incompatible avec des applications pour le médical. Il est donc nécessaire de créer une couche hydrophile en surface des nano-objets afin d'assurer une biocompatibilité et une stabilité colloïdale dans l'eau ou en milieu physiologique. Pour cela, deux stratégies d'hydrophilisation ont été développées dans cette thèse. La première consiste en la croissance d'une coquille de silice amorphe en surface. La seconde stratégie utilise la méthode d'échange de ligands entre les molécules d'acide oléique et une molécule hydrophile possédant une forte affinité avec les UCNPs. Pour cela nous avons testé deux types de molécules : les PEG-phosphates et les dendrimères.

1. Enrobage par une coquille de silice

1.1. Principe et méthode

L'enrobage par une coquille de silice a été réalisé par un procédé de microémulsion inverse, qui repose sur l'hydrolyse et la condensation du TEOS autour de NPs dispersées dans un milieu contenant un surfactant. Au niveau microscopique, une microémulsion inverse est constituée de gouttelettes d'eau de taille nanométrique qui peuvent être utilisées en tant que milieux réactionnels confinés dans un solvant apolaire. Ce procédé est donc assimilé à un procédé sol-gel confiné où la silice se forme par la polymérisation du TEOS en présence d'ammoniaque.

L'épaisseur de la coquille de silice peut être contrôlée en ajustant le système de microémulsion, c'est-à-dire en modifiant les quantités des précurseurs et/ou le ratio entre le surfactant et l'ammoniaque. En effet, ce dernier va définir la taille de la micelle ce qui favorisera la présence d'une seule UCNP au sein d'une micelle[127].

Le mécanisme de l'enrobage des NPs par une coquille de silice *via* une microémulsion inverse a été étudié dans le cas de nanocristaux de semi-conducteurs ou quantum dots[128, 129] et dans le cas de NPs magnétiques Fe_2O_3[130]. Le parallèle peut être fait entre ces NPs et nos UCNPs, recouvertes d'une couche d'acide oléique, conduisant au mécanisme de croissance décrit ci-après.

Dans un premier temps, l'ajout d'un surfactant dans du cyclohexane conduit à la formation de micelles dû à ses groupements hydrophiles. Dans notre cas, nous utilisons l'Igepal CO-520 qui est un surfactant amphiphile possédant une tête polaire et une queue apolaire (formule 54). Lorsque les UCNPs sont ajoutées dans la solution, il se produit un échange de ligands entre l'acide oléique et l'Igepal CO-520. L'ammoniaque est ensuite ajouté et remplit les micelles restantes de tensioactifs. La taille des micelles s'agrandit alors et forme un système de microémulsion inverse. L'addition de TEOS dans le système provoque son hydrolyse à l'interface huile/eau ainsi que l'échange de ligands ultérieur avec l'Igepal qui est chimiquement adsorbé en surface des UCNPs. Ce processus transfère les NPs vers la phase aqueuse et le TEOS subit une condensation, conduisant ainsi à la formation de la coquille de silice. Ce mécanisme proposé est schématisé dans la figure 55.

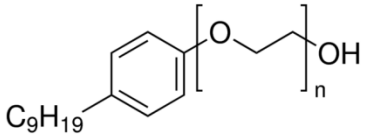


Figure 54 : Formule de l'Igepal CO-520 - $(C_2H_4O)_n$. $C_{14}H_{22}O$, n~5

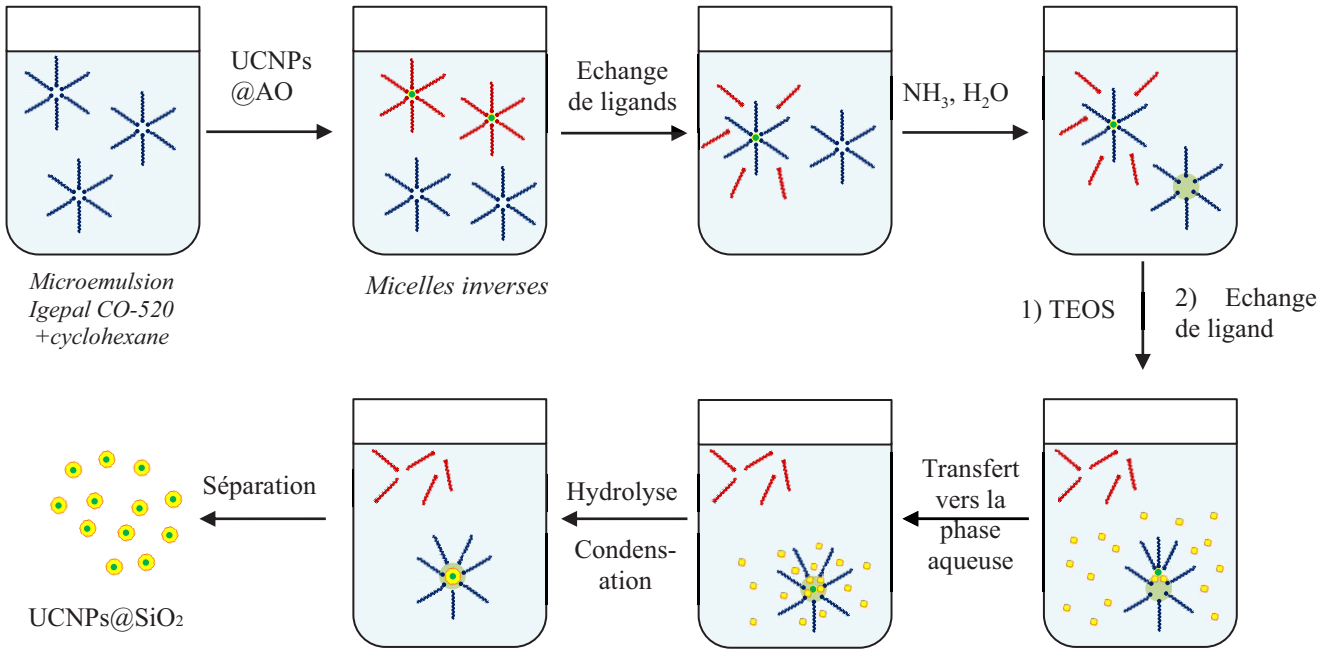


Figure 55 : Mécanisme proposé de l'enrobage des UCNPs par une coquille de silice *via* une microémulsion inverse

1.2. Protocole

Le protocole utilisé a été repris du travail de Xing et al[94]. Dans un premier temps, 1 mL d'Igepal CO-520 est dispersé dans 20 mL de cyclohexane, puis 0,15 mmol de UCNPs sont ajoutées à la solution. Après que le mélange ait été agité pendant 3 heures, 1,5 mL d'ammoniaque (30%) sont ajoutés, ainsi que 0,1mL de TEOS (Orthosilicate de tétraéthyle) goutte-à-goutte, c'est-à-dire 0,0045 mmol. La solution obtenue est agitée pendant 24 heures à température ambiante. Les UCNPs sont ensuite précipitées par l'ajout de méthanol (10 mL) puis lavées deux fois avec de l'éthanol. Le produit est alors dispersé dans de l'eau ou séché dans une étuve afin de réaliser la caractérisation sur poudre.

1.3. Caractérisations structurale et morphologique

L'enrobage des UCNPs a tout d'abord été étudié par DRX comme le montre le diffractogramme ci-après. La structure cœur/coquille de $NaYF_4$: Yb^{3+}, Er^{3+}/Tm^{3+}@SiO_2 présente les pics de diffraction du cœur (phase hexagonale β du composé) et une bande large centrée à 23°. Cette dernière correspond à la présence de silice amorphe dans l'échantillon.

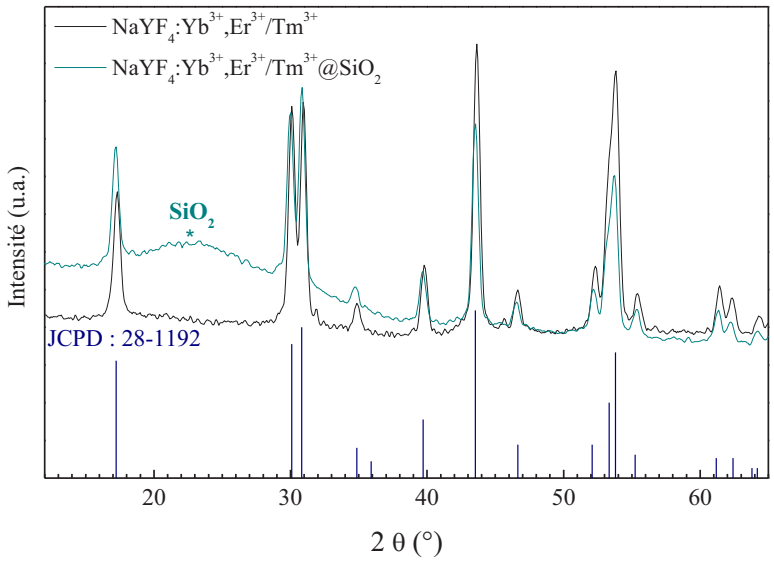


Figure 56 : Diffractogramme sur poudre des UCNPs cœur $NaYF_4$: Yb^{3+}, Er^{3+}/Tm^{3+} et cœur/coquille $NaYF_4$: Yb^{3+}, Er^{3+}/Tm^{3+}@SiO_2

L'enrobage par la coquille de silice a également été caractérisé par spectroscopie IR. Après enrobage des UCNPs@AO, le spectre infrarouge ne présente plus de fonctions correspondant à l'acide oléique. En effet, l'étude spectroscopique IR de surface des cœurs après synthèse présentent les bandes caractéristiques de l'acide oléique (figure 57). Après enrobage avec le TEOS, les bandes caractéristiques de la silice apparaissent tandis que celles de l'acide oléique disparaissent. Tout d'abord, la bande large à 1076 cm^{-1} et le pic situé à 796 cm^{-1} sont attribués respectivement aux vibrations asymétrique et symétrique des liaisons Si-O-Si. D'autre part, les pics à 966 cm^{-1} et 458 cm^{-1} sont caractéristiques respectivement des fonctions Si-OH (vibration symétrique) et Si-O (déformation). Cette étude confirme bien la présence de silice dans l'échantillon.

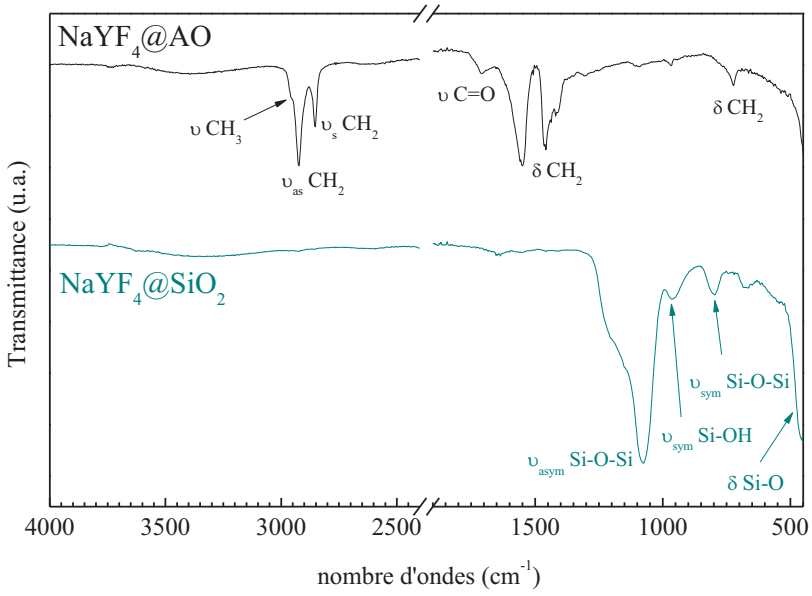


Figure 57 : Spectre infrarouge des UCNPs@AO et UCNPs@SiO_2

La microscopie électronique en transmission a également permis de mettre en évidence la formation de la coquille de silice. En effet, cette coquille, qui présente une différence de contraste importante avec le cœur de fluorure, est identifiable sur les clichés MET de la figure 58.

Dans les échantillons obtenus, plusieurs populations ont été dénombrées. D'une part, certaines UCNPs sont enrobées individuellement par une coquille dont l'épaisseur moyenne varie entre 6 et 10 nm (±1 nm) selon les échantillons. Ces particules ont une forte tendance à s'agréger comme le montrent les clichés (a) et (b), mais l'enrobage est concordant avec la bibliographie existante sur les enrobages de silice[94]. D'autre part, certaines coquilles de silice encapsulent plusieurs UCNPs, comme l'illustre le cliché (c). Enfin, les clichés (d) et (e) soulignent le fait que l'enrobage n'est pas réalisé sur la totalité des UCNPs.

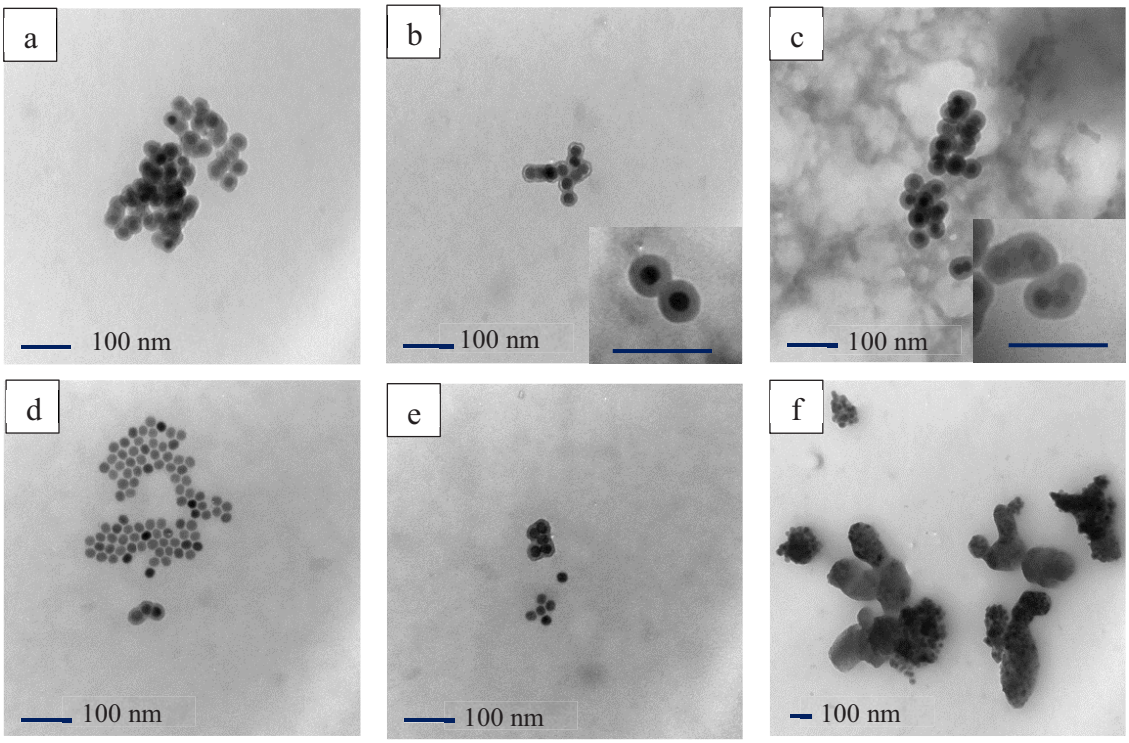


Figure 58 : Clichés MET des NPs cœur/coquille $NaYF_4:Yb^{3+}$, $Er^{3+}/Tm^{3+}@SiO_2$ en suspension dans de l'eau

Les résultats obtenus en MET mettent en avant les limites de ce procédé d'enrobage. Le mécanisme de formation de micelles n'est pas assez important pour permettre l'enrobage de toutes les UCNPs. En effet, certaines ne sont pas enrobées et d'autres sont contenues à plusieurs dans une même coquille. Pour améliorer ce procédé, différents essais ont été réalisés afin d'ajuster au mieux les quantités de surfactant et de précurseurs, le but étant également d'éviter une croissance trop importante de la coquille. A titre d'exemple une augmentation de la quantité d'Igepal n'améliore pas l'enrobage. Par ailleurs, la purification des échantillons s'est avérée très difficile avec une élimination limitée du surfactant après enrobage. Le cliché (f) met en évidence des paquets d'UCNPs piégées dans le surfactant.

C'est pourquoi cette méthode a été rapidement abandonnée au profit d'enrobage plus efficace. Cependant, l'étude en photoluminescence a été réalisée afin de vérifier le comportement optique des UCNPs après enrobage par une coquille de silice.

1.4. Propriétés optiques

L'étude de la luminescence par upconversion a été réalisée sur un échantillon codopé par les ions Yb^{3+} et Er^{3+} avant et après enrobage par une coquille de silice.

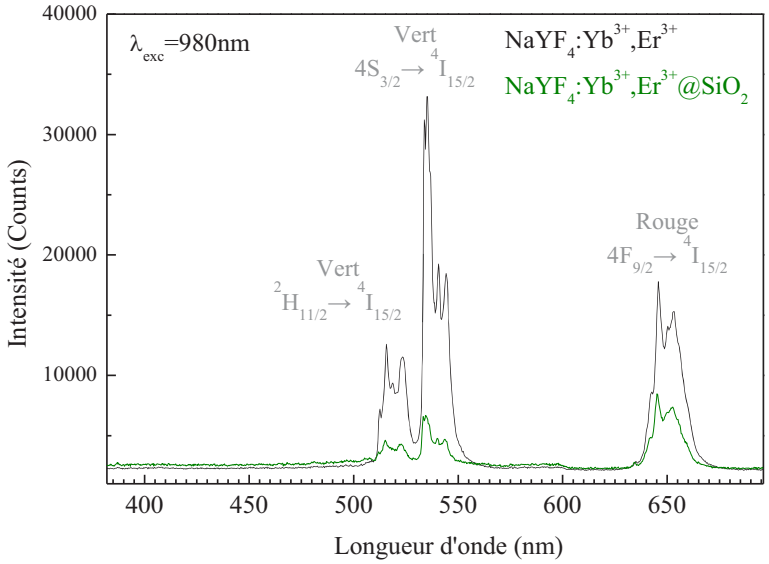


Figure 59 : Spectre d'émission de la fluorescence des UCNPs $NaYF_4:Yb^{3+}/Er^{3+}$ et $NaYF_4:Yb^{3+}/Er^{3+}@SiO_2$ sous excitation à 980 nm

Le spectre, présenté figure 59, montre une forte diminution des intensités de fluorescence après enrobage avec la coquille de silice. En effet, les pics d'émission présents dans le domaine du vert subissent une diminution par un facteur 5 et 7 pour les contributions à 525 et 543 nm respectivement. De même, le pic d'émission situé à 655 nm décroit de plus de la moitié. Ces résultats confirment bien que l'environnement du cœur de fluorure est crucial concernant les rendements de photoluminescence. En effet, comme nous avons pu le voir dans le chapitre II, la présence de la coquille de silice (groupements OH) va induire une forte extinction de la fluorescence des ions de terres rares présents en surface. L'intérêt d'une coquille de la même matrice non dopée est ici judicieux.

1.5. Conclusion

Suite à différents tests d'enrobages par la méthode d'émulsion inverse, ce procédé a présenté un bon nombre de limitations, à savoir principalement un enrobage partiel des UCNPs conduisant ainsi à une dispersion très faible dans un milieu aqueux. Lors d'une dispersion dans l'eau, nous avions observé une agrégation rapide des UCNPs conduisant à une forte sédimentation.

De plus, la présence de plusieurs UCNPs dans une seule coquille de silice conduit à des lots de particules non uniformes et non reproductibles, ce qui est problématique pour des applications médicales. Enfin la forte chute des rendements d'upconversion représente un inconvénient indéniable pour des applications en imagerie.

Cette voie d'hydrophilisation a ainsi été mise de côté au profit d'enrobage par échange de ligand.

2. Echange de ligands : PEG-phosphate

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre bibliographique II, l'hydrophilisation par échange de ligands permet d'obtenir des NPs faciles à disperser dans un milieu aqueux. En effet, cette technique repose sur la substitution de molécules d'acide oléique hydrophobes par des ligands hydrophiles ayant une plus forte affinité avec les UCNPs.

2.1. Principe et méthode

Afin de rendre les NPs hydrophiles par cette technique, différentes molécules ont été testées et les ligands dérivés du PEG [poly(éthylène glycol)] se sont avérés être très efficaces. En effet, l'utilisation de PEG en tant que ligand de stabilisation est bien référencée : il présente plusieurs avantages puisqu'il permet la dispersion des NPs dans un solvant aqueux et fournit une bonne stabilité. De plus, le PEG est connu pour être non toxique, non immunogène, ce qui lui confère une bonne biocompatibilité[131]. Ce procédé de PEGylation a été réalisé avec des ligands de PEG-phosphate sur différentes molécules luminescentes telles que des NPs LaF_3[132], Y_2O_3[133, 134] ou encore $NaYF_4$[125].

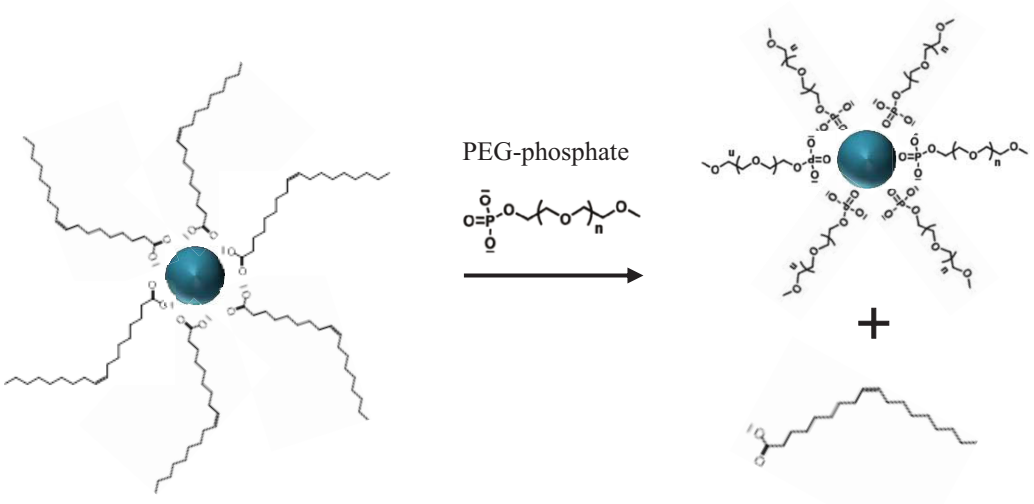
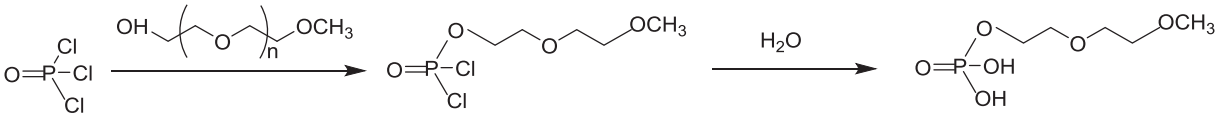


Figure 60 : Schéma représentant le procédé d'échange de ligands entre l'acide oléique et le PEG-phosphate

2.2. Protocoles

Synthèse du ligand PEG-phosphate



Équation 1 : Synthèse du PEG-phosphate

Préalablement, 18,5 mmol (1 éq.) de poly(ethylene glycol) methyl ether (mPEG M=750) sont séchés sous vide à 70°C pendant une nuit. Le mPEG est ensuite dissous dans 60 mL de THF anhydre, puis ajouté goutte-à-goutte à une solution de 10 mL de THF contenant 18,5 mmol de $POCl_3$ (1 éq.). La solution est portée à 55°C sous flux d'argon afin d'éliminer l'acide chlorhydrique formé. La solution est maintenue à cette température pendant 6 heures puis refroidie à température ambiante. Ensuite, 5 mL d'eau glacée sont ajoutés goutte-à-goutte au mélange réactionnel et la solution est agitée pendant 1 heure. Le THF est éliminé par évaporation rotative grâce à une augmentation de la température graduelle de 25 à 70 °C. Le produit final est laissé sous vide poussé pendant 12 heures à 70°C.

^{1}H RMN : δ (400 MHz, $CDCl_3$) : 3,37(s, 3H, -OC**H**$_3$); 3,75-3,5 (m, 52H, (-C**H**$_2$OC**H**$_2$-)$_n$); 4,2 (s, 2H, P-(OC**H**$_2$-)) - *^{13}C RMN* : δ (100 MHz, $CDCl_3$) : 59 (s, R-O**C**H_3) ; 70,5 (m, (-CH_2-O-**C**H_2-)$_n$) - *^{31}P RMN* : δ (400 MHz, $CDCl_3$) : 1,4 (s, O_3**P**O-R)

Echange de ligands

Dans un flacon sont introduits : 100 mg de UCNPs, 1 g de PEG-phosphate et 5 mL d'éthanol absolu. Le flacon est fermé et la solution est portée lentement à 70°C dans un bain d'huile. Le mélange est maintenu à cette température pendant une nuit (5 heures minimum). La solution est refroidie à température ambiante puis les UCNPs sont précipitées par l'ajout d'hexane. Les particules sont séparées par centrifugation puis le solvant restant est éliminé par évaporation rotative. Les UCNPs sont alors redispersées dans de l'eau. L'excès de PEG-phosphate est éliminé par dialyse avec une membrane 50 kDa puis les UCNPs sont lyophilisées afin d'éliminer toute trace de solvant organique.

2.3. Caractérisation des UCNPs PEGylées

Après le procédé d'échange de ligands, les UCNPs se dispersent facilement dans un milieu aqueux. Les caractéristiques physico-chimiques des composés cœur/coquille ont été étudiées afin d'évaluer l'accroche des ligands sur les UCNPs. Ces dernières ont été réalisées sur les UCNPs sous forme de poudre après lyophilisation.

2.3.1.Spectroscopie Infrarouge

La spectroscopie infrarouge du PEG-phosphate libre (figure 61) présente les groupements caractéristiques de cette molécule, à savoir les pics à 2863, 1465 et 1344 cm^{-1}, respectivement attribués aux vibrations et déformations des liaisons C-H de la chaine PEG. Les liaisons C-O-C sont quant à elles caractérisées par un pic intense à 1095 cm^{-1}. La fonction phosphate est caractérisée par une bande à 1200 cm^{-1}, attribuée au groupement P=O, et deux bandes à 1060 et 987 cm^{-1} correspondant aux liaisons P-OH. Enfin, la liaison C-O-P présente sa bande vibrationnelle à 1140 cm^{-1}.

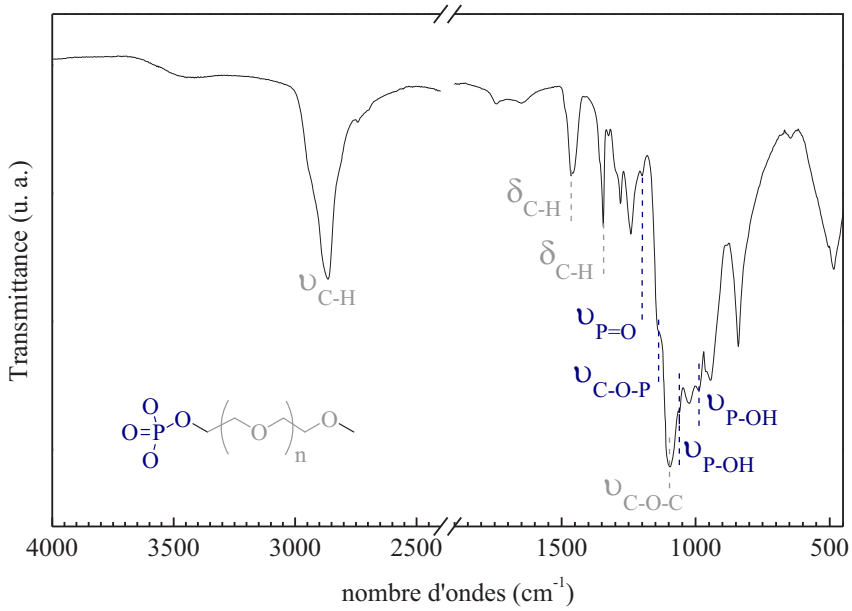


Figure 61 : Spectre infrarouge du PEG-phosphate libre

Afin d'évaluer l'accroche des ligands en surface des UCNPs, nous nous sommes concentrés sur les pics caractéristiques de la fonction phosphate c'est-à-dire entre 1500 et 400 cm^{-1} (figure 62). En effet, la densité électronique autour du phosphore a une influence sur la position des bandes : une forte liaison P-O conduit à un décalage de la bande correspondante vers les fréquences plus élevées. Il est ainsi possible d'observer des variations de position de bandes ou la disparition de certaines selon l'efficacité du greffage de ligands.

Tout d'abord, l'intensité de la bande P=O diminue fortement sur le spectre des UCNPs@PEG-phosphate. De plus, un décalage de la bande caractéristique de P-OH à 987 cm^{-1} est observé vers les bas nombres d'ondes. Cependant la bande à 1060 cm^{-1} ne semble pas subir de modifications. Ces observations confirment bien la PEGylation des UCNPs *via* le groupement phosphate.

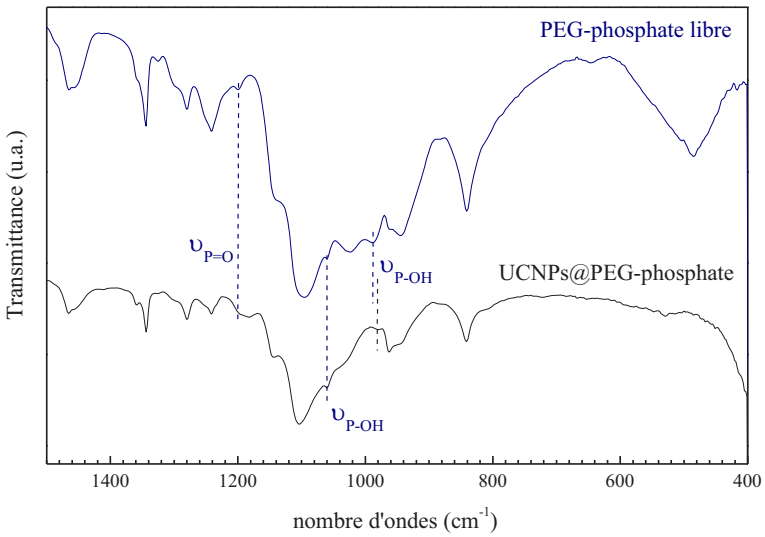


Figure 62 : Spectre infrarouge du PEG-phosphate libre comparé au spectre des UCNPs@PEG-phosphate

Différentes quantités de PEG-phosphate ont été testées lors de l'enrobage afin de vérifier ces résultats (figure 63). Lorsque les quantités de PEG-phosphate sont diminuées, les observations faites précédemment sont accentuées. En effet, lorsque les quantités sont divisées par 2, la bande P=O diminue fortement jusqu'à disparaitre dans le cas où les quantités de PEG-phosphate initiales sont divisées par 4. De même le déplacement de la bande P-OH à 987 cm^{-1} augmente d'autant plus que la quantité de PEG-phosphate introduite diminue. Il est notable ici qu'il existe une quantité minimum de ligand nécessaire à venir fixer en surface des UCNPs afin d'obtenir des NPs stables en solution. De plus, il est nécessaire d'avoir toujours un excès de ligand même après purification, permettant d'établir un équilibre des UCNPs en suspension.

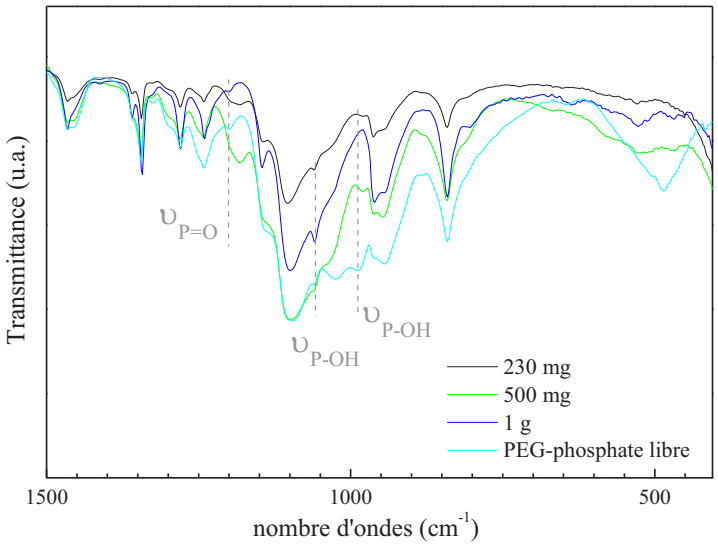


Figure 63 : Spectre infrarouge du PEG-phosphate libre comparé aux spectres des UCNPs@PEG-phosphate avec des quantités de PEG-phosphate variables

2.3.2. Analyse XPS

Des analyses XPS ont été réalisées sur les UCNPs@AO, le PEG-phosphate seul et les UCNPs@PEG-phosphate. Les échantillons ont été analysés sous forme de poudre.

Ces analyses ont été réalisées par Guillaume Monier et Christine Robert-Goumet de l'Institut Pascal – UBP Start (UMR 6602, UBP-CNRS).

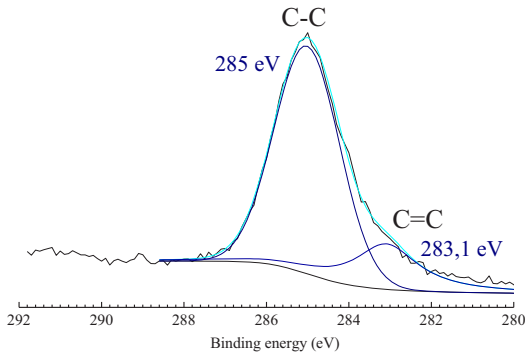
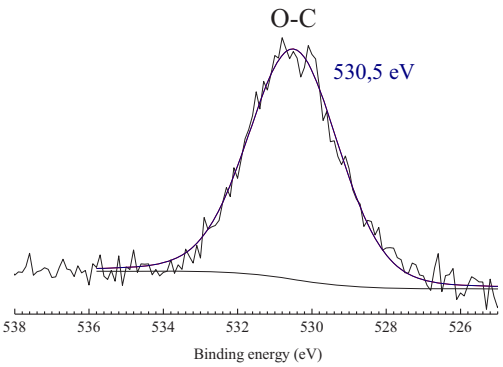
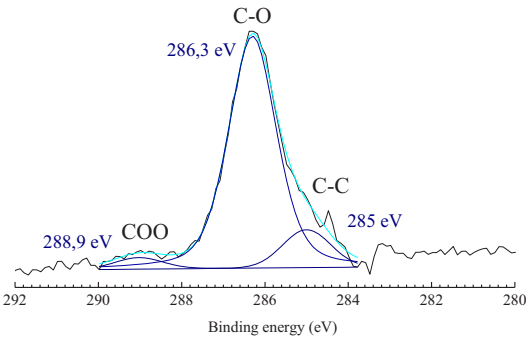
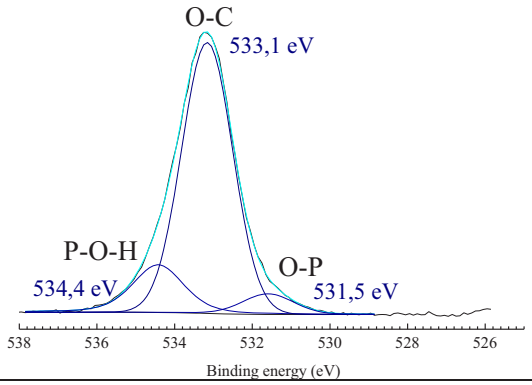
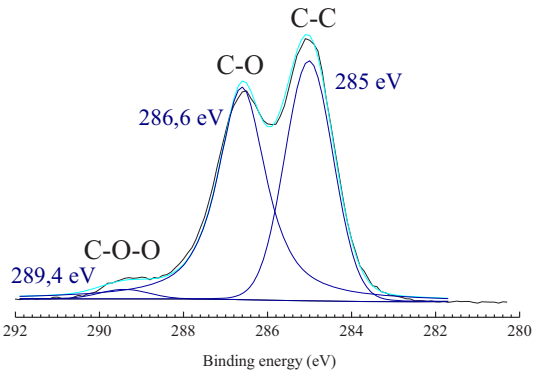
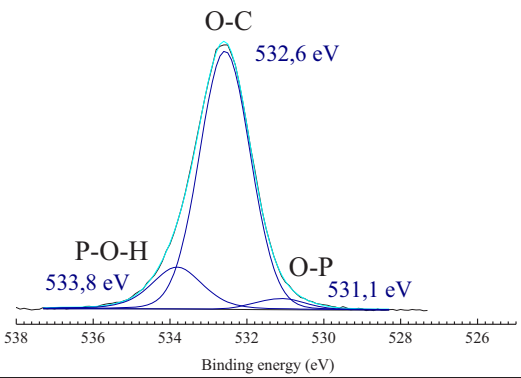
	C1s	O1s
UCNPs@AO		
PEG-phosphate		
UCNPs@PEG-phosphate		

Figure 64 : Spectres XPS des pics de cœurs C1s et O1s pour les UCNPs@AO, le PEG-phosphate et les UCNPs@PEG-phosphate

Dans le cas des UCNPs@AO, le spectre C1s présente 2 contributions localisées à 285 eV et 283,1 eV qui correspondent respectivement aux liaisons C-C et C=C de l'acide oléique. Cependant, la liaison carboxylate n'a pas été observée ici.

Les spectres C1s du PEG-phosphate est constitué de deux pics caractéristiques des liaisons de la chaine PEG : le pic à 285 eV de la liaison C-C et le pic à 286,3 eV de la liaison C-O. Le pic à 288,9 eV, négligeable en intensité, peut être attribué à la liaison C-O-O et semble provenir de carbonates adsorbés. Ces pics sont également observés sur les UCNPs@PEG-phosphate.

Le spectre O1s montre, dans le cas des UCNPs@AO, une composante à 530,5 eV qui est caractéristique de la liaison C-O. La largeur à mi-hauteur élevée de ce pic suggère la contribution d'oxydes de carbone liée aux conditions de mesures.

Le PEG-phosphate présente trois pics sur son spectre O1s : un pic à 533,1 eV caractéristique des liaisons O-C de la chaîne PEG et deux pics à 534,4 eV et 531,5 eV attribués respectivement aux liaisons P-O-H et O-P de la fonction phosphate.

Ces trois pics sont également présents sur le spectre O1s des UCNPs@PEG-phosphate avec un déplacement des pics vers les basses énergies. Ceci indique un changement de l'environnement chimique des liaisons O-C et O-P et suggère le greffage des ligands PEGylés en surface des UCNPs.

De plus, la contribution des atomes d'yttrium et de fluor dans le cas des UCNPs@AO et UCNPs@PEG-phosphate apparaissent à 159 et 684 eV respectivement, correspondant principalement aux atomes d'Yttrium et Fluor du cœur de fluorure. Cependant, l'interprétation de ces pics n'a pas pu être aboutie puisque l'influence de l'épaisseur de la couche organique en surface modifie fortement les intensités des pics. En effet, l'intensité de ces pics est nettement moins importante dans le cas des UCNPs recouverte d'acide oléique que dans le cas d'enrobage avec le PEG-phosphate.

Enfin, les spectres P2p des PEG-phosphate et UCNPs@PEG-phosphate sont tracés sur la figure 65. Ces spectres présentent un pic correspondant aux liaisons P-O de la fonction phosphate. Après fonctionnalisation, un décalage du pic vers les énergies plus faibles est observé. Ce décalage est caractéristique de l'accroche des liaisons P-O sur les UCNPs, c'est-à-dire de la formation de liaisons P-O-Y. En effet, le déplacement chimique est en accord avec un environnement en atomes d'oxygène moins négatif que pour le ligand seul. Les atomes d'oxygènes ne sont plus uniquement liés au phosphore. L'environnement de ce dernier étant moins électronégatif, l'énergie nécessaire pour arracher un électron des niveaux du cœur 2p du phosphore est moins importante. L'énergie de liaison est donc moins importante.

Les déplacements chimiques du pic P2p ainsi que ceux des liaisons O après échange de ligands confirment ici le greffage des ligands sur nos UCNPs.

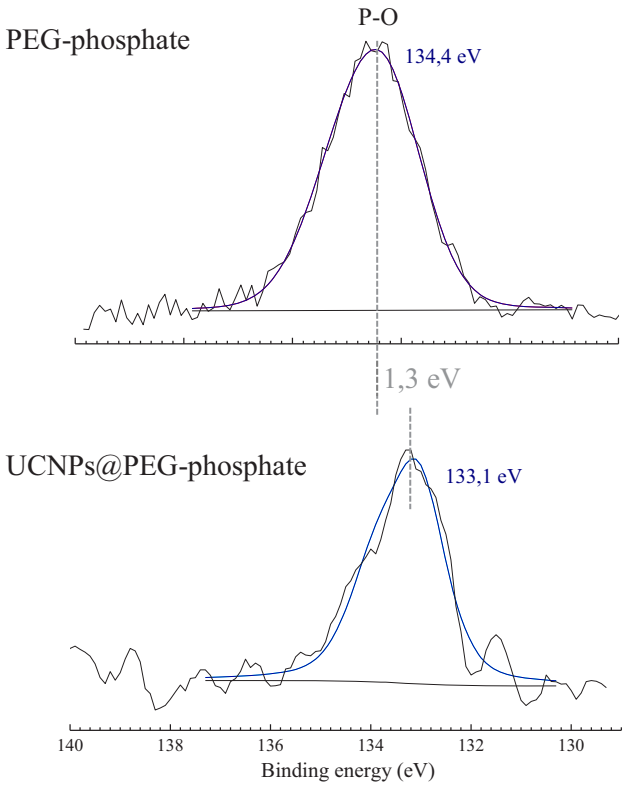


Figure 65 : Spectres XPS des pics de cœur P2p pour le PEG-phosphate et les UCNPs@PEG-phosphate

2.4. Conclusion

L'hydrophilisation des UCNPs synthétisées par décomposition thermique a été réalisée ici par un échange de ligands avec une molécule de PEG-phosphate. Les analyses IR et XPS ont permis de montrer un greffage efficace de ces molécules PEGylées *via* le groupement phosphate. En outre, une étude de la photoluminescence des UCNPs@PEG-phosphate a été réalisée et montre que les nano-objets conservent leurs propriétés optiques. Cependant cette technique de synthèse conduit à des UCNPs dont la suspension n'est pas stable dans le temps puisqu'elles s'agrègent en moins d'une heure. Enfin, la présence d'un groupement méthoxy en bout de chaine, dont la réactivité est nulle, est défavorable au greffage d'un vecteur.

Nous nous sommes donc orientés vers un échange de ligands utilisant le même type de greffage mais avec des molécules plus stables et fonctionnalisées en bout de chaîne.

3. Echange de ligands : les dendrons

Différentes molécules PEG peuvent être utilisées pour l'échange de ligands tel que les dendrimères. Ce sont des macromolécules, constituées de monomères, qui s'associent selon un processus arborescent autour d'un cœur central plurifonctionnel. Ces structures sont obtenues par des réactions successives jusqu'à l'obtention d'une nouvelle branche à la fin de chaque cycle de synthèse.

Les dendrimères ou dendrons sont largement utilisés dans le domaine biomédical grâce aux avantages qu'offre la structure arborescente de ces molécules[135] :

- Les propriétés pharmacocinétiques et la biodistribution peuvent être contrôlées en ajustant la taille du dendrimère et sa conformation. Ces paramètres sont facilement ajustables grâce à la variation précise de la génération du dendrimère ou sa longueur ou le nombre de chaînes périphériques.

- Les propriétés biologiques peuvent être attribuées à une seule entité moléculaire et non à une distribution statistique de matériaux polymères. Ceci facilite alors la reproductibilité des données pharmacocinétiques.

- Les chaînes périphériques ou le cœur peuvent être fonctionnalisées avec des médicaments, des chromophores ou d'autres ligands organiques permettant ainsi d'apporter une fonctionnalité supplémentaire au dendron.

- La dégradation peut être contrôlée grâce à un choix judicieux de la chimie des dendrimères.

De par ses propriétés décrites ci-dessus, les dendrimères ont été exploités dans les domaines de la catalyse et du biomédical. En effet, les dendrons ont permis la fonctionnalisation de NPs d'or[136], de quantums dots[137] ou encore de NPs d'oxydes de fer[138-140]. Cependant, l'hydrophilisation des UCNPs n'a pas encore été décrite dans la littérature par ces molécules.

Nous nous sommes donc intéressés à cette méthode dans le cadre d'une collaboration avec Sylvie Bégin-Colin et Delphine Felder-Flesch de l'Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg (IPCMS – UMR 7504). En effet ce laboratoire a développé des NPs d'oxyde de fer dont la fonctionnalisation est effectuée par des dendrimères. Dans ces études, les groupements de cœur sont des phosphonates ce qui pouvait s'appliquer aux UCNPs. De même, la synthèse par décomposition thermique de ces NPs magnétiques engendre une couche d'acide oléique en surface et les protocoles d'hydrophilisation semblaient alors transposables. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, le greffage de molécules PEGylées par des groupements phosphorés a été validé. Il était donc intéressant de réutiliser ce type de coordination (Ln-O-P) avec des dendrons.

3.1. Principe et méthode

Les dendrons utilisés ont été synthétisés au sein du département des Matériaux Inorganiques de l'IPCMS dans l'équipe du Dr. Delphine Felder-Flesch. Les molécules dendritiques présentent deux groupements acide phosphonique comme groupement d'ancrage et trois chaînes PEG dont l'une est fonctionnalisée par un groupement acide carboxylique (figure 66).

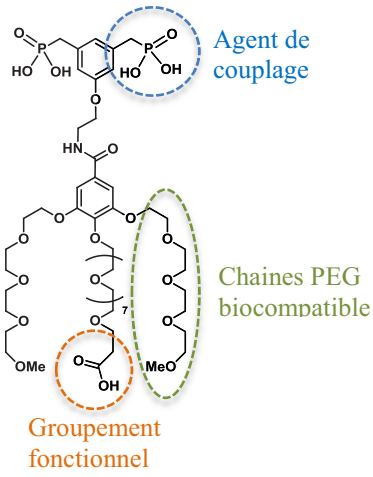


Figure 66 : Schéma de la molécule dendron utilisé pour l'échange de ligands

La fonctionnalisation a été réalisée par échange direct de ligands c'est-à-dire que les UCNPs et la molécule à greffer sont mélangées dans un solvant organique. Le groupement d'ancrage du nouveau ligand possédant une affinité plus forte avec la surface à fonctionnaliser, celui-ci remplacera l'ancien ligand. Les NPs sont ensuite transférées dans de l'eau après fonctionnalisation.

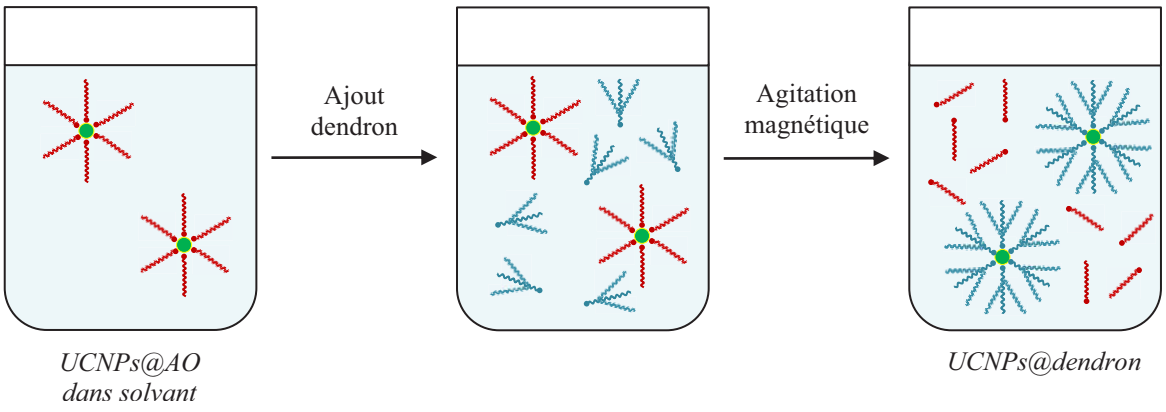


Figure 67 : Représentation de la fonctionnalisation par greffage direct des UCNPs recouvertes de surfactant (acide oléique)

3.2. Protocole

Le protocole utilisé est adaptée des enrobages réalisés sur des NPs d'oxydes de fer, au sein de l'IPCMS par Aurélie Walter[141].

Dans un flacon, 10 mL d'une suspension de UCNPs@AO dans du THF (tétrahydrofurane) à 1 mg/mL sont mélangés avec 1 mg de dendrons soit un rapport de 1mg dendron/10mg UCNPs. La solution est agitée pendant 48 heures à température ambiante. Les UCNPs sont ensuite précipitées par ajout d'hexane puis récupérées par centrifugation. Les UCNPs sont ensuite redispersées dans de l'eau puis purifiées par ultrafiltration ou par dialyse (membrane 50 kDa).

3.3. Caractérisation du greffage des dendrons

Tout d'abord, les UCNPs@dendrons se dispersent bien dans l'eau malgré la présence de petits agrégats qui précipitent rapidement. Une étude par DLS a été effectuée afin de déterminer le diamètre moyen en solution des UCNPs hydrophilisées.

Après fonctionnalisation par échange de ligands, les suspensions obtenues présentent une distribution monomodale avec un diamètre hydrodynamique moyen de 24 nm. Celui-ci est comparable à celui déterminé au MET pour les UCNPS@AO qui était de 22 nm. La très faible augmentation du diamètre hydrodynamique moyen est due à la longueur des dendrons qui est supérieure à celle de l'acide oléique (AO : 1 à 2 nm – dendrons : 2 à 3 nm).

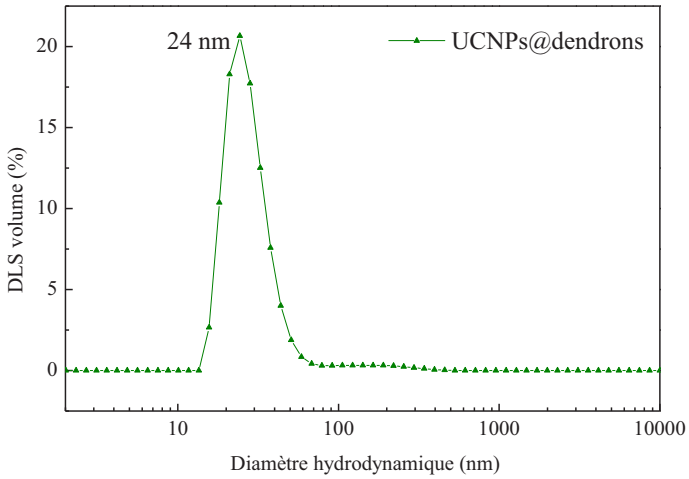


Figure 68 : Distribution en volume du diamètre hydrodynamique des UCNPs@dendron

Des tests d'hydrophilisation de UCNPs cœur-coquille de type $NaYF_4$:Ln^{3+}@$NaYF_4$ ont été réalisés et les clichés MET obtenus sont présentés ci-dessous. Après greffage des dendrons, les UCNPs présentent des distances plus importantes entre elles dû à la longueur des dendrons qui est plus importante que celle de l'acide oléique. En effet, l'écart entre les UCNPs augmente de 1,9 à 3 nm.

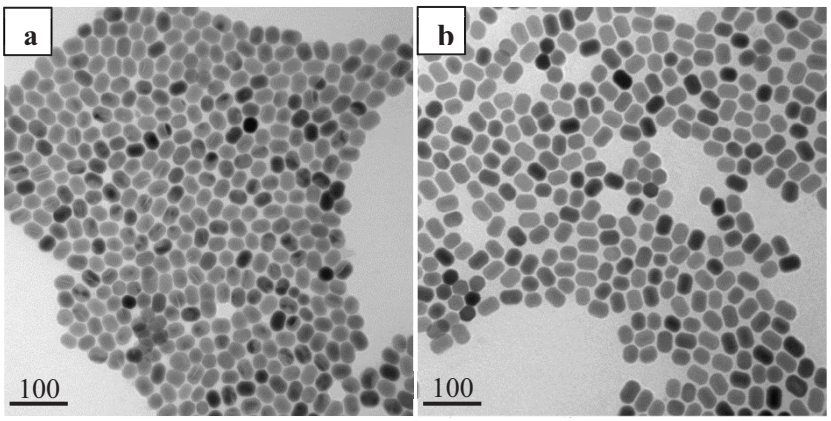


Figure 69 : Clichés MET (a) $NaYF_4$: Yb^{3+}, Tm^{3+}@$NaYF_4$@AO dispersés dans du cyclohexane (b) $NaYF_4$: Yb^{3+}, Tm^{3+}@$NaYF_4$@dendron dispersés dans de l'eau

Afin de confirmer le greffage des dendrons sur les UCNPs, un spectre infrarouge a été enregistré sur le dendron seul puis sur les UCNPs@dendron. La figure 70 présente les bandes caractéristiques du dendron seul qui sont répertoriés dans le tableau 12.

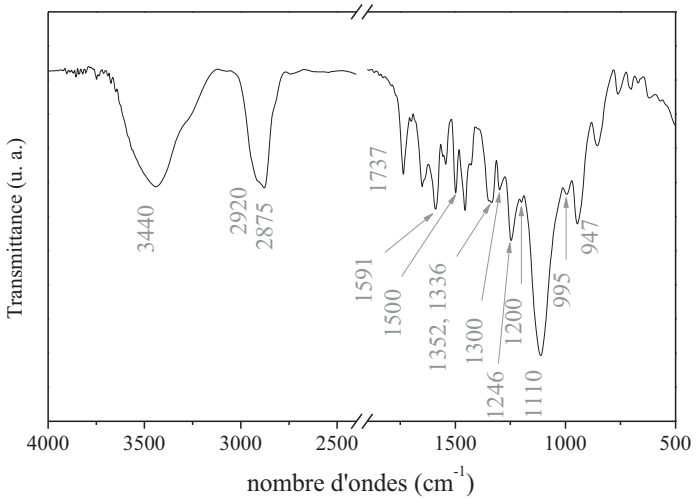


Figure 70 : Spectre infrarouge du dendron libre

Tableau 12 : Indexation des principales bandes d'absorption du dendron

Nombres d'ondes (cm^{-1})	Liaison
3440	OH (acide)
2920,2875	C-H (CH_2 et CH_3)
1737	C=O (acide carboxylique)
1591	C=C (aromatique)
1500	N-CO
1350	C-H (CH_3)
1336	C-O-C
1246	Aromatique-O-C
1200	P=O
1110	C-O-C (PEG) + C-C-C (aromatique)
995	P-OH
947	C-H (aromatique)

Comme nous l'avons vu lors de l'accroche des PEG-phosphates en surface des UCNPs, la position des bandes attribuées aux liaisons phosphorées est fortement dépendante de l'environnement du phosphore. C'est pourquoi nous avons porté notre attention sur les pics caractéristiques de la fonction phosphonate situés autour de 1000 cm^{-1} (figure 71).

Tout d'abord, la bande attribuée aux liaisons P=O diminue fortement sur le spectre des UCNPs après enrobage. De même, la bande à 995 cm^{-1} disparait. Ces deux observations suggèrent l'accroche des dendrons sur nos UCNPs *via* le groupement phosphonate.

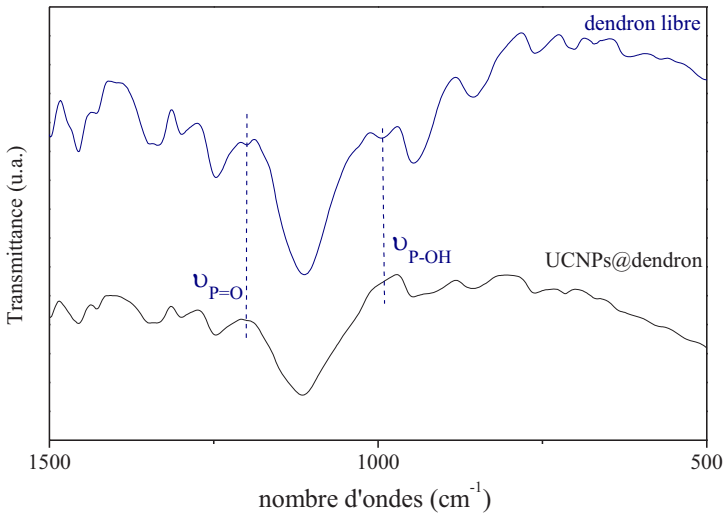


Figure 71 : Spectre infrarouge des dendrons libres comparé au spectre des UCNPs@dendron

3.4. Conclusion

L'hydrophilisation des UCNPs a été réalisée par échange de ligands avec des molécules dendritiques. La dispersion dans l'eau est bonne et l'accroche de ces macromolécules a pu être confirmée par IR. De plus, les propriétés optiques ont été évaluées et aucun effet sur les mécanismes d'upconversion n'a été observé.

Cette technique est prometteuse même si elle demande encore une amélioration afin d'obtenir des suspensions plus stables dans le temps. Par ailleurs, la présence d'une fonction acide en bout de chaîne ouvre la voie à une potentielle vectorisation de nos UCNPs par le greffage d'une biomolécule.

4. Conclusion – Comparatif des différentes voies d'hydrophilisation

Les UCNPs ont été fonctionnalisées par trois techniques différentes à savoir l'enrobage par une coquille de silice et par échange de ligands avec des PEG-phosphates et des dendrons.

Le premier enrobage par la silice a prouvé son intérêt dans son étude bibliographique. En effet la silice est parfaitement connue et les enrobages par émulsion inverse présentaient des avantages indéniables tant au niveau de la synthèse que des propriétés physico-chimiques. Cependant, les tests d'enrobage de nos UCNPs ont montré un grand nombre d'inconvénients tel qu'une inhomogénéité des enrobages. L'enrobage des UCNPs est partiel et certaines sont contenues dans une même coquille. Ce procédé conduit donc à des UCNPs difficilement dispersables dans de l'eau.

Le second enrobage par échange de ligands a été réalisé avec du PEG-phosphate. Cette technique permet d'accrocher en surface des UCNPs des ligands PEGylés grâce aux groupements phosphates. Le pontage UCNPs-O-P a ainsi pu être confirmé par analyses IR et XPS. La dispersion dans un solvant aqueux est bonne mais la stabilité colloïdale est assez faible. En effet, les UCNPs sédimentent vite sous forme d'agrégats. De plus, la chaine PEG ne présente pas de groupements fonctionnels permettant une accroche de vecteurs nécessaire à la suite du projet.

Le troisième enrobage a été effectué par échange de ligand avec des dendrimères qui ont été synthétisés au sein de l'IPCMS de Strasbourg. Cette voie d'hydrophilisation a permis d'obtenir des UCNPs dont la dispersion se fait aisément dans l'eau. Cependant, lorsque les concentrations en solutions sont augmentées, les UCNPs ont tendance à s'agréger. Il aurait été intéressant d'approfondir le protocole d'enrobage afin d'optimiser le nombre de dendrons présents en surface des UCNPs. Enfin la présence du groupement acide sur une des trois chaînes PEG pourrait permettre de venir accrocher des vecteurs.

Dans la suite de ce projet nous nous sommes intéressés aux tests biologiques *in vitro* et *in vivo* des UCNPs hydrophiles. Pour cela nous avons choisi de travailler avec les UCNPs@PEG-phosphate et les UCNPs@dendron.

CHAPITRE V.
Résultats biologiques et imagerie

SOMMAIRE

1. Etude *in vitro* – cytotoxicité et biodistribution 117

1.1. Etude de la cytotoxicité des UCNPs hydrophiles sur les cellules LNCaP 117

1.2. Etude de la biodistribution..... 119

1.2.1. Microscopie électronique en transmission 119

1.2.2. Microscopie confocale biphotonique..... 120

1.2.3. Microscopie hyperspectrale CytoViva 120

1.2.4. Conclusion..... 122

2. Imagerie 122

2.1. Etude de validation du système 123

2.1.1. Injections sous cutanées 124

2.1.2. Injection intramusculaire 124

2.1.3. Conclusion..... 125

2.2. Etude *in vivo* des UCNPs@dendron sur souris saines..... 126

2.2.1. Etude de l'élimination des UCNPs@dendrons..... 126

2.2.2. Etude de biodistribution des UCNPs@dendron 128

2.2.3. Conclusion..... 132

2.3. Etude des UCNPs@dendron sur souris présentant une tumeur..... 132

2.3.1. Validité de l'imagerie intratumorale..... 132

2.3.2. Etude de biodistribution des UCNPs@dendron 133

2.4. Etude préliminaire des UCNPs@PEG-phosphate sur souris saines..... 134

2.5. Conclusion de l'étude *in vivo* 135

3. Etudes *in vitro* et *in vivo* – Conclusion et perspectives..... 136

Le développement d'UCNPs pour des visées médicales telles que l'imagerie ou la thérapie requiert des études biologiques afin de confirmer les propriétés physico-chimiques des nano-objets. En effet, les interactions avec les cellules et les tissus doivent être parfaitement connues et maitrisées. Ces études abordent ainsi des problématiques concrètes liées à une possible utilisation biomédicale.

Ce chapitre, d'ordre interdisciplinaire, est donc consacré aux différentes études nécessaires à la bonne compréhension des interactions entre les NPs et le vivant tels que :

- L'étude de la cytotoxicité *in vitro*
- L'évaluation *in vitro* des effets d'internalisation des UCNPs
- Les études de biodistribution et de toxicité sur le petit animal
- Le comportement des UCNPs dans le cas de souris saine et dans le cas de souris porteuses de tumeur

D'une part, les études *in vitro* ont été réalisées au sein du laboratoire GReD (Génétique, Reproduction et Développement, UMR 6293) par l'équipe de Laurent Morel (Cédric Hesling et Felicia Leccia). D'autre part, les tests d'imagerie sur souris ont été développés dans le laboratoire IMTV (Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée, INSERM, UMR 990) avec l'équipe de Jean-Michel Chezal et plus particulièrement avec Elisabeth Miot-Noirault et Elodie Jouberton.

1. Etude *in vitro* – cytotoxicité et biodistribution

Ces tests de biodistribution et de toxicité *in vitro* ont été réalisés afin de mettre en évidence l'impact des NPs dans un milieu biologique. Cet objectif a été atteint grâce à l'utilisation de différentes techniques : la cytométrie en flux, la microscopie électronique à transmission, la microscopie confocale et la microscopie hyperspectrale.

Ces études *in vitro* ont été effectuées sur des cellules LNCaP qui sont des lignées cellulaires de cancers prostatiques. En effet, les cellules LNCaP expriment le récepteur PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen), protéine qui est surexprimée dans le cas du cancer de la prostate.

Les UCNPs étudiées ici ont la composition suivante : $NaYF_4:Yb^{3+},Er^{3+}/Tm^{3+}$@PEG-phosphate et $NaYF_4:Yb^{3+},Er^{3+}/Tm^{3+}$@dendrons. Au vue du faible taux de dopage des ions Erbium et Thulium, les tests seront réalisés sur les deux types de dopages de manière indifférenciée.

1.1. Etude de la cytotoxicité des UCNPs hydrophiles sur les cellules LNCaP

La cytotoxicité des nanoparticules *in vitro* a été évaluée par cytométrie en flux. Cette technique permet de mesurer plusieurs caractéristiques physiques sur une suspension de particules individuelles, et particulièrement des cellules. Les propriétés mesurées sont la taille relative de la particule, sa granularité, sa complexité interne ou n'importe quel composant ou fonction qui puisse être détecté par un composé fluorescent.

Les cellules en suspension passent une à une devant un ou plusieurs faisceaux laser puis des détecteurs captent des signaux émis par chaque cellule tels que :

- La lumière diffusée aux petits angles (Forward Scatter, FSC) qui renseigne sur la taille des particules

- La lumière diffusée à 90° (Side Scatter, SSC) qui renseigne sur la forme, la structure interne et la granularité des particules

- Les signaux de fluorescence à savoir leur autofluorescence et la fluorescence émise par un anticorps couplé à un fluorochrome et qui se lie spécifiquement à la cellule.

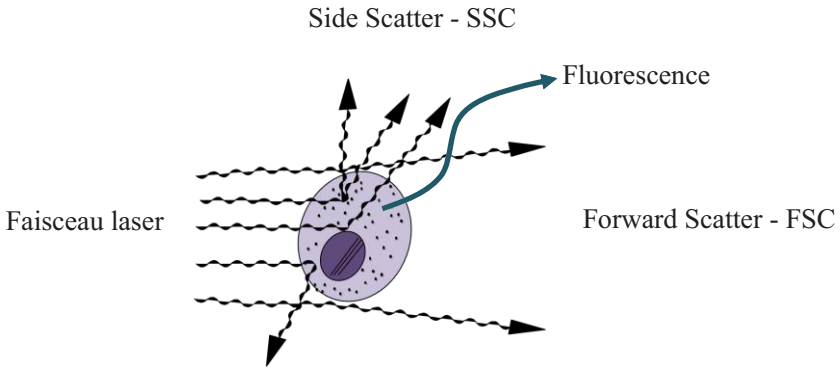


Figure 72 : Propriétés de diffusion de la lumière par une cellule

Dans le cadre de notre étude, le fluorophore utilisé est le colorant vital de l'ADN (Sytox-blue) qui ne pénètre pas les membranes intactes. L'évaluation de la cytotoxicité des nanoparticules a été réalisée par l'analyse simultanée de ce colorant avec l'enregistrement des paramètres physiques des cellules (taille et granularité) qui se modifient suite à la mort cellulaire (apoptose et/ou nécrose). Ces paramètres ont été enregistrés sur des cellules LNCaP exposées aux UCNPs pendant 24h, 48h et 72h.

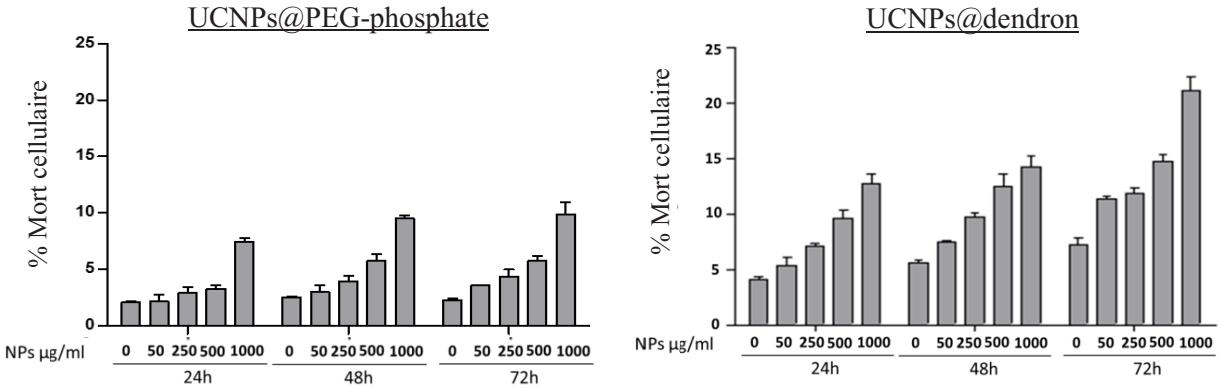


Figure 73 : Evaluation de la cytotoxicité des UCNPs dans les cellules LNCaP par cytométrie en flux
Expériences réalisées en triplicate (P<0.0001)

Les pourcentages de mort cellulaire montrent que les UCNPs@PEG présentent une toxicité faible, quel que soit le temps d'exposition, sauf pour des concentrations très élevées (1 mg/mL). La cytotoxicité augmente lorsque les UCNPs sont enrobées par des dendrons. Dans ce cas, les cellules présentent un pourcentage de mort cellulaire entre 5 et 15 % pour des concentrations variant entre 50 et 500 µg/mL. De même que précédemment, ce pourcentage augmente avec la concentration en UCNPs et avec le temps d'exposition. Cependant, en comparant les pourcentages de cellules apoptotiques avec ceux des cultures témoins, la cytotoxicité reste faible voire quasi nulle pour les deux types d'échantillons étudiés.

1.2. Etude de la biodistribution

Afin d'évaluer la distribution des UCNPs dans une culture cellulaire, ces dernières ont été observées au microscope électronique à transmission, au microscope confocale, ainsi qu'au microscope hyperspectral.

1.2.1. Microscopie électronique en transmission

Pour cela les cellules ont été mises en contact avec les UCNPs pendant 8 heures. Ces cultures cellulaires ont été fixées dans une résine, puis une coupe au microtome est réalisée afin de permettre l'observation au MET (figure 74).

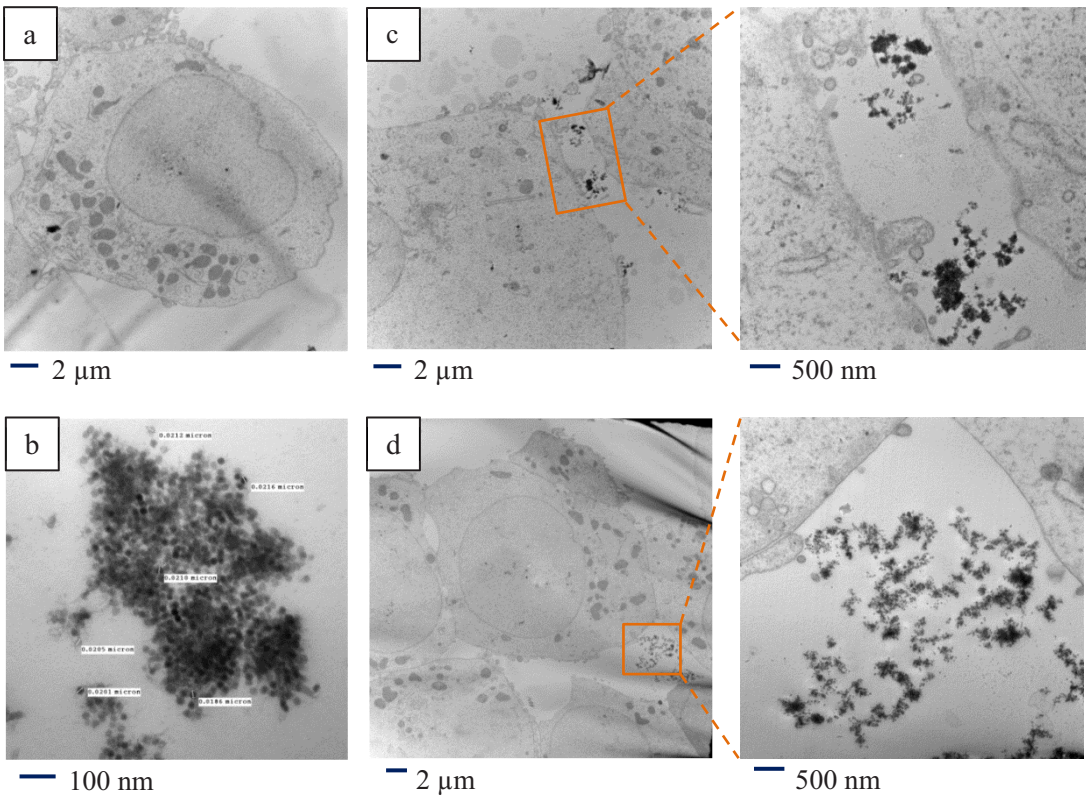


Figure 74 : Clichés MET (a) coupe cellulaire de LNCaP seules (b) UCNPs (c) coupes cellulaires de LNCaP après exposition à des suspensions de UCNPs@PEG-phosphate (d) coupes cellulaires de LNCaP après exposition à des suspensions de UCNPs@dendron

Sur l'ensemble des cellules observées, les UCNPs ne sont pas internalisées, comme le montrent les clichés MET (c) et (d) de la figure 74. En effet, quel que soit l'enrobage des UCNPs, celles-ci sont localisées à l'extérieur des cellules au contact de la membrane plasmique. Les UCNPs peuvent également se situer entre les cellules. De plus, les nano-objets n'induisent pas l'apoptose des cellules, ce qui confirme les résultats de cytotoxicité obtenus précédemment.

Ces résultats sont cohérents avec les tests de cytotoxicité. En effet, les enrobages hydrophiles induisent une toxicité quasi nulle et aucune internalisation aspécifique n'a été observée. Ces observations sont bien en adéquation avec des UCNPs hydrophiles non vectorisées.

1.2.2. Microscopie confocale biphotonique

La microscopie biphotonique est une technique qui combine les techniques avancées d'optique du microscope confocal avec une excitation à deux photons, pour imager des échantillons en haute résolution avec des fluorescences très spécifiques. L'excitation en microscopie multiphotonique provient uniquement du point focal permettant d'obtenir une section optique d'échantillons épais afin de pouvoir faire une reconstruction tridimensionnelle. Du fait de l'excitation hautement localisée, le blanchiment des fluorophores ainsi que l'endommagement de l'échantillon sont réduits ce qui augmente la viabilité de l'échantillon et donc la durée de l'expérience. De plus, comme nous avons pu le voir dans le chapitre II, l'utilisation d'une source d'excitation infrarouge permet une meilleure pénétration dans le tissus et réduit la diffusion de la lumière, observée pour de courtes longueurs d'onde.

Des essais ont été effectués sur des UCNPs seules inclues dans une résine puis sur cultures cellulaires LNCaP, préalablement traitées avec des concentrations croissantes en UCNPs@PEG. Dans un premier temps nous avons pu imager les UCNPs seules uniquement sous forme d'agrégats. En effet lorsque les UCNPs en solution sont sonifiées et donc parfaitement dispersées, l'intensité d'émission d'une UCNP prise individuellement n'est pas suffisante pour être imagée. Cette technique n'a pas permis d'obtenir des images concluantes lorsque les UCNPs étaient en contact avec des cellules. En effet, la faible concentration des nano-objets dans le milieu, combinée avec une forte dispersion, conduit à des images non exploitables. La limite de détection correspond à des agrégats de 1µm. Cette technique a donc été abandonnée.

1.2.3. Microscopie hyperspectrale CytoViva

Cette technologie permet d'obtenir une analyse spectrale quantitative de matériaux à l'échelle nanométrique, que les échantillons soient d'origine biologique ou inorganique et qu'ils soient isolés ou intégrés dans un autre milieu (cellules, tissus, matrice...).

L'imagerie hyperspectrale permet de reconnaître dans le pixel les « signatures spectrales » qu'il contient caractéristiques des différents constituants, c'est-à-dire de les identifier. La position en longueur d'onde des pics d'absorption spécifiques dépend de leur composition chimique. Leur amplitude va, quant à elle, donner des indications sur la quantité (ou la concentration) des constituants présents. Enfin, la forme générale du spectre (ou continuum) dépend des propriétés physiques de la surface (granulométrie, rugosité, humidité...). On peut ainsi identifier les différents matériaux présents (minéraux, végétaux, constituants chimiques, *etc.*), et également en déterminer les concentrations et les caractéristiques physiques, ajoutant ainsi une dimension quantitative à la cartographie de paramètres d'intérêt dans des domaines d'application très divers.

Afin de comprendre l'interaction de nos nano-objets dans un milieu cellulaire, nous avons étudié par microscopie hyperspectrale une culture cellulaire traitée avec des UCNPs@PEG-phosphate. Les résultats obtenus sont présentés en figure 75.

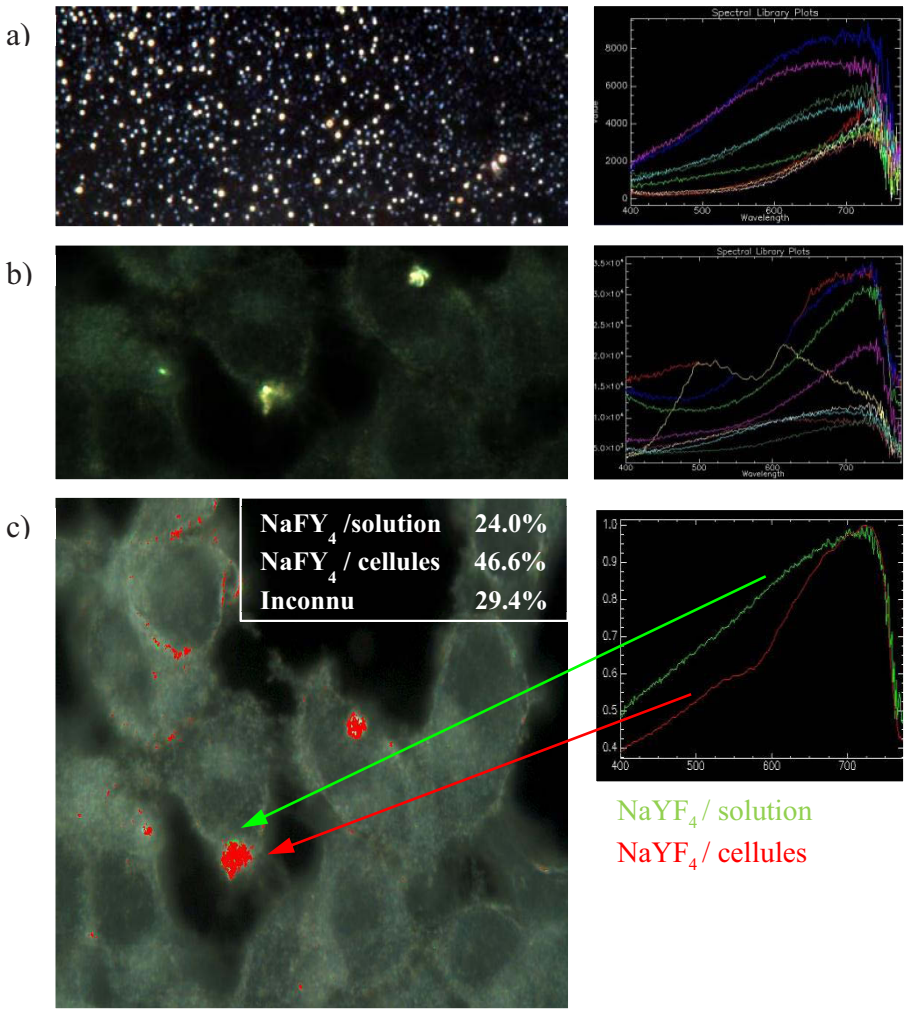


Figure 75 : Analyse en microscopie hyperspectrale de l'interaction entre les UCNPs@PEG et les cellules tumorales de prostate LNCaP (a) cliché des UCNPs en solution associées à leur « librairie spectrale » (b) cliché des cellules exposées aux UCNPs associées à leur « librairie spectrale » (c) Cartographie superposée des cellules exposées et des UCNPs en solution

Dans un premier temps, la signature spectrale des UCNPs@PEG-phosphate en solution est effectuée (figure 75a), puis, dans un second temps, celle de la culture cellulaire traitée avec ces UCNPs (figure 75b). Enfin, la comparaison des différentes signatures spectrales a permis de déterminer où se situent les nano-objets (figure 75c).

Cette technique d'imagerie a montré que les UCNPs@PEG-phosphate sont majoritairement localisées au contact de la cellule au niveau de la membrane plasmique, confirmant les résultats obtenus au MET. Cependant, cette analyse reste soumise à discussion puisque les analyses ont été réalisées sur un seul échantillon.

1.2.4. Conclusion

Les tests de distribution cellulaire et de cytotoxicité ont conduit aux mêmes conclusions. Tout d'abord, les UCNPs hydrophiles n'induisent pas ou peu de toxicité dans une culture cellulaire. Dans l'ensemble le pourcentage de mort cellulaire augmente avec la concentration en UCNPs et le temps d'exposition. Le traitement des cellules avec les UCNPs cause une forte augmentation de la population apoptotique, par rapport aux cultures de contrôle, uniquement à la concentration de 1000 µg/mL. D'autre part, les UCNPs@dendron semblent plus toxiques que les UCNPs@PEG-phosphate. L'étude de la biodistribution, réalisée par MET et microscopie hyperspectrale, a permis de confirmer la faible apoptose des cellules en contact avec les UCNPs. En outre, les UCNPs, quel que soit leur enrobage, se situent à l'extérieur des cellules, au contact de la membrane plasmique. Les UCNPs se conduisent de manière aspécifique au vu de l'absence d'un vecteur de reconnaissance à la PSMA.

2. Imagerie

Les études *in vivo* ont été réalisées à l'aide d'un équipement IVIS SPECTRUM® (Perkin Elmer). C'est un système d'imagerie sur petit animal qui analyse la source et l'intensité de la lumière émise par des molécules bioluminescentes ou fluorescentes exprimées *in vivo*. Cet équipement permet ainsi de visualiser et de quantifier la fluorescence et la bioluminescence dans le corps entier d'un petit animal, dans un seul organe ou dans quelques cellules spécifiques.

Afin d'être adapté aux conditions de luminescence de nos UCNPs, à savoir une excitation à 980 nm, nous avons dans un premier temps modifié l'appareillage *via* l'installation d'un laser à l'intérieur de l'enceinte de mesure et d'un système de filtres nécessitant une optimisation (filtres pour l'excitation et l'émission). Cette partie est présentée en annexe B.

Il est important de noter que ce système d'excitation laser installé dans cet appareil est actuellement le seul dispositif fonctionnant en France.

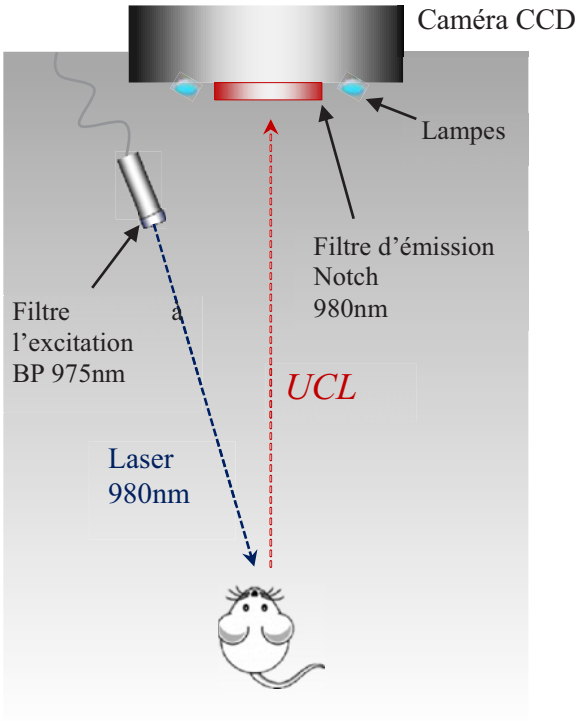


Figure 76 : Schéma de l'installation à l'intérieur de l'enceinte de l'IVIS SPECTRUM ®

Les UCNPs utilisées lors de ces analyses *in vivo* sont les suivantes :

- $NaYF_4$: 20%Yb^{3+}, 2%Tm^{3+} @ $NaYF_4$ @ PEG-phosphate (notées UCNPs@PEG-phosphate)
- $NaYF_4$: 20%Yb^{3+}, 2%Tm^{3+} @ $NaYF_4$ @ dendron (notées UCNPs@dendron)

Ces UCNPs ont la capacité d'émettre dans le proche infrarouge, à 800 nm, lorsqu'elles sont excitées avec une source à 980 nm, permettant ainsi d'être imagées dans la « fenêtre thérapeutique ». En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre II, dans ce domaine de longueur d'onde situé entre 0,6 et 1,2 µm, l'endommagement des tissus est minimisée et l'autofluorescence des tissus quasi-nulle.

Dans un premier temps, nous avons effectué des études de faisabilité d'imagerie des UCNPs afin de valider le concept de NPs à luminescence anti-Stokes pour l'imagerie sur petit animal. Dans un second temps, l'étude de biodistribution a été réalisée sur des souris nude (NMRI-NUDE Foxn1nu/ Foxn1nu) et black (C57BL/6JRj).

2.1. Etude de validation du système

Cette étude a été réalisée *via* des injections sous cutanées et en intramusculaire sur des souris nude sacrifiées. Le but est ici de valider la technique d'imagerie et également de définir ses limites telles que les concentrations minimales détectables, les quantités à injecter, la puissance laser optimale ou encore l'atténuation par les tissus.

2.1.1.Injections sous cutanées

Dans un premier temps, nous avons réalisé des injections sous-cutanées au niveau dorsal des souris avec des UCNPs@PEG-phosphate et UCNPs@dendron, comme le montrent les images présentées sur la figure 77.

Pour les deux types d'enrobage, il est possible d'imager les foyers de UCNPs dispersées dans du PBS à de faibles concentrations (jusqu'à 0,05 mg/mL) avec une puissance de laser de 50 mW/cm². En outre, l'appareil présente une bonne résolution puisque des nanoparticules présentes à des distances très proches se distinguent aisément.

Cependant, il n'est pas possible de quantifier les concentrations de nanoparticules présentes. En effet, l'équipement IVIS SPECTRUM® n'est pas optimal pour réaliser de la quantification en 2D. Des tests d'imagerie en 3D seraient plus cohérents pour quantifier les UCNPs.

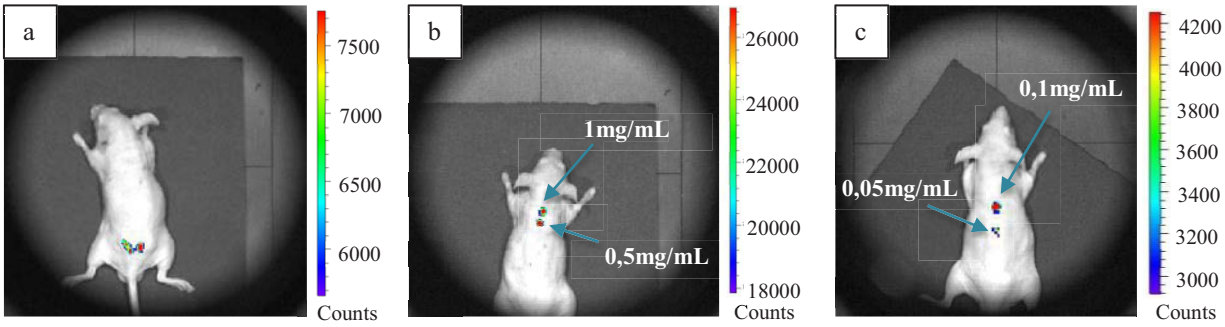


Figure 77 : (a) Imagerie *in vivo* chez une souris nude après injections sous cutanées (2×30µL) de UCNPs@PEG-phosphate en solution à 1 mg/mL. (b) Imagerie *in vivo* chez une souris nude après injection sous cutanée (20µL) de UCNPs@dendron en solution à 1 mg/mL et 0.5 mg/mL (c) Imagerie *in vivo* chez une souris nude après injection sous cutanée (20µL) de UCNPs@dendron en solution à 0,1 mg/mL et 0,05 mg/mL - Puissance laser : 50 mW/cm²

2.1.2.Injection intramusculaire

Une injection en intramusculaire a été réalisée afin de tester l'atténuation du signal des UCNPs par les tissus. Les images, présentées sur la figure 78, montrent qu'il est possible d'imager les UCNPs situées dans le muscle de la patte (vues dorsale et ventrale) malgré l'atténuation liée aux tissus.

Il est également important de noter que l'on peut discriminer le signal provenant de l'injection intramusculaire et un signal provenant d'une injection sous-cutanée réalisée en parallèle. Le signal de l'injection sous cutanée est, bien évidemment, plus important que celui de l'injection intramusculaire, ce qui met en évidence l'atténuation due aux tissus.

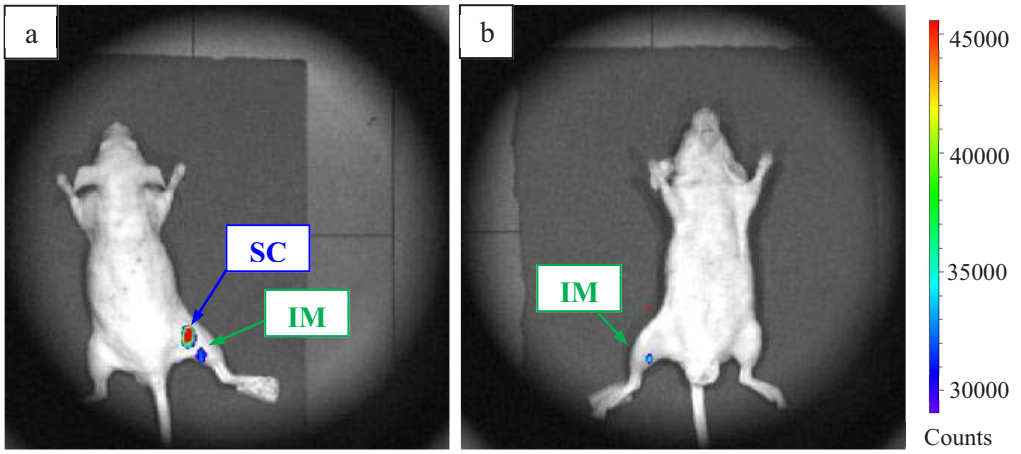


Figure 78 : Imagerie *in vivo* chez une souris nude après injection sous cutanée (20µL) et intramusculaire (50 µL) de UCNPs@dendron en solution à 1 mg/mL. Puissance laser : 70 mW/cm² (a) Vue dorsale (b) Vue ventrale

2.1.3.Conclusion

Ces premiers essais d'imagerie ont permis de confirmer la capacité qu'ont les UCNPs à être imagées *in vivo* chez le petit animal.

Tout d'abord, il est possible d'imager des foyers de UCNPs dont la concentration locale est faible (jusqu'à 1,5 µg dans le cas d'injection sous cutanée de 30µL d'une solution à 0,05µg/mL). Ces mesures ont par ailleurs été réalisées avec des puissances de laser faibles (entre 50 et 70 mW/cm²) et le temps d'acquisition est inférieur à 0,5 seconde, ce qui est la limite de l'appareil. Ce dernier point met en avant une haute sensibilité des UCNPs et la puissance de la technique développée. De plus, quel que soit leur enrobage, les UCNPs peuvent être imagées. Enfin, les images face antérieure et face postérieure de l'injection intramusculaire nous permettent de confirmer que l'atténuation des tissus n'empêche pas la visualisation des UCNPs.

Ces premiers essais ont cependant mis en évidence plusieurs inconvénients.

- Dans un premier temps, le positionnement de la souris doit se faire manuellement afin d'installer le point d'intérêt de la souris au niveau du laser qui, lui, est fixe. Par ailleurs, le laser n'est pas homogène en puissance sur toute sa surface, ce qui implique que la région irradiée par le laser ne doit pas être trop large (jusqu'à 2 cm de diamètre). Le positionnement de la souris est donc crucial afin d'obtenir les images les plus représentatives. Il est également important de noter que la surface irradiée n'est pas plane, ce qui induit des différences d'irradiation suivant l'angle que forme le laser avec la souris (les UCNPs n'étant pas toujours en surface).

- Dans un second temps, l'inhomogénéité du laser sur la surface irradiée ne va permettre de réaliser que du qualitatif. En effet, lorsque deux acquisitions consécutives sont effectuées, l'intensité du signal émis par les UCNPs n'est pas toujours le même. Ceci a été particulièrement noté lors du test avec différentes concentrations. Pour cela, nous avons réalisé des injections sous cutanées le long de la colonne vertébrale de la souris avec des solutions dont les concentrations en UCNPs étaient de 0, 5, 10 et 20 mg/mL. Pour une même puissance de laser, l'intensité du signal de l'injection à 5 mg/mL était supérieure à celle de l'injection à 20mg/mL. Cette étude reprend bien ici les principaux inconvénients cités : un positionnement de la souris arbitraire et une surface irradiée non homogène.

- Dans un troisième temps, il est important de noter que les suspensions ne sont pas abouties et que les UCNPs, quel que soit leur enrobage, ont une forte tendance à s'agréger. Si un agrégat se forme, son signal domine largement le signal de UCNPs mieux dispersées. Cet agrégat va ainsi saturer l'image ce qui explique également le problème de quantification. Une solution serait de diminuer le temps d'acquisition, permettant ainsi de collecter les signaux qui peuvent être masqués. Cependant, dans notre étude, le temps d'acquisition est inférieur à 0,5 secondes, ce qui est la limite de l'appareil.

- Dans un dernier temps, la puissance laser a été étudiée. Si la puissance du laser est trop faible, les mécanismes d'upconversion ne sont pas assez intenses pour obtenir un signal détectable. Par ailleurs, une puissance de laser trop importante va induire un échauffement au niveau de la peau de l'animal. Ce paramètre est également à mettre en parallèle avec la concentration en UCNPs. Après cette étude, nous avons établi un compromis entre la concentration en UCNPs à injecter et une puissance de laser convenable : les concentrations des solutions injectées seront comprises entre 1 et 2 mg/mL et le laser aura une puissance comprise entre 50 et 70 mW/cm².

Suite aux tests permettant de confirmer la capacité des nanoparticules à émettre et à être imager *in vivo* chez le petit animal, les études d'élimination et de biodistribution ont été réalisées *in vivo*.

2.2. Etude *in vivo* des UCNPs@dendron sur souris saines

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur les UCNPs@dendron car celles-ci possèdent la meilleure stabilité et ont également été retenues pour une future vectorisation par un ligand spécifique de la PSMA.

2.2.1. Etude de l'élimination des UCNPs@dendron

Afin de définir un plan d'expérience pour l'étude de la biodistribution, nous nous sommes tout d'abord intéressés au processus d'élimination des UCNPs@dendron. Pour cela, nous avons réalisé des injections en intraveineuse de 100µL d'une solution de UCNPs à 2 mg/mL sur 3 souris nude.

Après injection, nous avons effectué des acquisitions à différents temps jusqu'à ne plus détecter de UCNPs *in vivo*. Afin d'estimer le système d'élimination, nous avons réalisé les images en ciblant le laser sur les différents organes d'intérêt de la souris : le foie, les poumons, le tube digestif, la vessie et les reins.

En premier lieu, 10 minutes après l'injection, des signaux sont observés uniquement dans le foie et les poumons. Ce type d'élimination semble cohérent avec la taille de nos UCNPs et la stabilité colloïdale de nos solutions. En effet des UCNPs agrégées auront tendance à aller s'accumuler dans les poumons et le foie.

Les autres organes ne semblent pas contenir de UCNPs. Il faut cependant prendre en compte l'atténuation des tissus qui pourrait fausser cette tendance. Ensuite, des images ont été enregistrées sur les mêmes organes à différents temps : 1h, 3h, 24h, 48h et 72h. Comme le présente la figure 79, le signal des UCNPs *in vivo* diminue avec le temps dans les deux organes d'accumulation. Les UCNPs@dendron sont donc éliminées dans le temps.

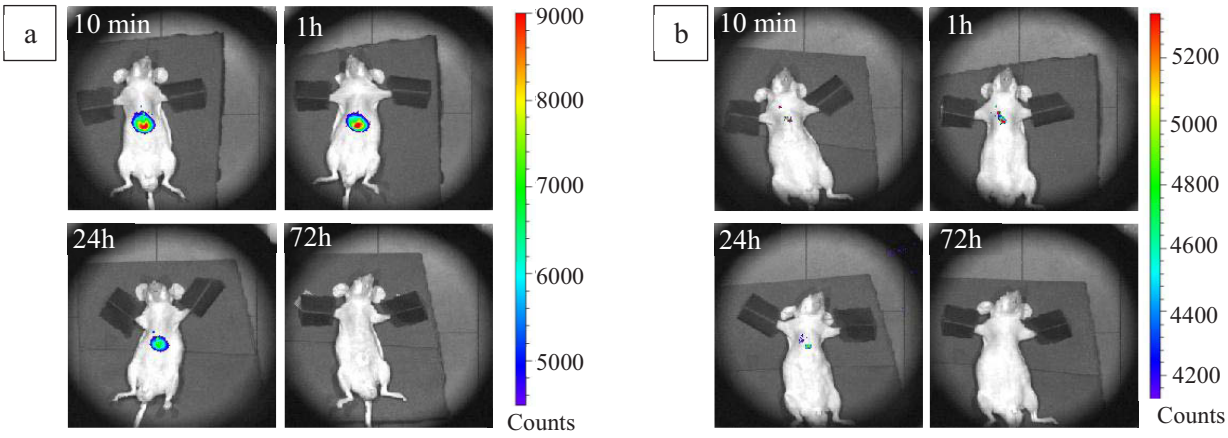


Figure 79 : Suivi *in vivo* de l'élimination des UCNPs@dendron (a) images centrées sur le foie (b) images centrées sur les poumons - Puissance laser : 70 mW/cm²

Les signaux émis par les UCNPs localisées dans le foie sont largement plus importants que ceux dans les poumons. Ceci peut être dû à la quantité de UCNPs supérieure dans le foie que dans les poumons ou au phénomène d'atténuation des tissus. En effet, le foie présente une plus grande surface et est moins soumis au phénomène d'atténuation puisqu'il est placé directement sous la peau de l'abdomen. Au contraire, les poumons sont plus internes, ce qui va induire un phénomène d'atténuation dû à la cage thoracique et donc une perte du signal. Enfin, le mouvement de respiration de la souris peut engendrer des modifications du signal des UCNPs dans les poumons.

Ces remarques confirment ici que les UCNPs peuvent être visualisées dans les organes d'accumulation mais qu'il est impossible de confirmer la présence ou non de UCNPs quand les quantités présentes deviennent trop faibles.

Les images de la figure 79 montrent une diminution du signal des UCNPs au cours du temps. Après 72 heures, toutes les UCNPs semblent être éliminées du corps de la souris. Afin de confirmer l'absence des UCNPs dans les organes de la souris, celles-ci ont été sacrifiées et chaque organe indépendamment imagé. Ceci nous a permis de montrer que les UCNPs sont présentes dans les poumons et le foie pour les 3 souris de l'étude ainsi que dans la rate pour une des trois souris. Ce dernier organe n'avait pas été identifié *in vivo*. Ceci peut s'expliqur par une quantité faible des UCNPs dans l'organe et à l'atténuation. De ce fait, le temps de suivi des souris pour l'étude de biodistribution sera supérieur à 72 heures.

2.2.2. Etude de biodistribution des UCNPs@dendron

Grâce à l'étude précédente, nous avons choisi d'étudier la biodistribution des UCNPs@dendron sur un temps plus long, à savoir 7 jours.

Les paramètres de cette étude sont les suivants :

- Souris black
- Volume injecté : 100µL
- Concentration : 2 mg/mL
- 3 souris par temps (reproductibilité des résultats)
- Temps : 15min, 1h, 3h, 24h, 72h, 5 jours et 7 jours
- Acquisition *in vivo* sur souris sacrifiée
- Imagerie sur organes après dissection des souris
- Suivi du poids pour chaque souris

La première remarque faite est que les souris ne présentent pas de réactions lors des injections et aucune n'a souffert de perte de poids significative. Par ailleurs, sur les 21 souris utilisées, aucune souris n'est morte avant sacrifice. Les UCNPs ne présentent donc pas d'effets secondaires rapportés *in vivo* jusqu'à 7 jours après les injections, indiquant que les UCNPS ne semblent pas présenter de toxicité.

L'étude s'est donc déroulée ainsi : à chaque temps d'étude, les souris sont imagées vivantes afin d'évaluer la présence des UCNPs, puis, dans un second temps, les souris sont sacrifiées afin de procéder à la dissection, enfin l'imagerie des organes seuls est réalisée.

Les acquisitions réalisées *in vivo* ont confirmé les résultats de l'étude préliminaire. En effet, sur souris entière, il est possible d'obtenir un signal lié aux UCNPs uniquement pour le foie et les poumons. De plus, à partir de 72 heures, les quantités de UCNPs accumulées dans les organes diminuent et ne peuvent donc plus être imagées *in vivo*. Ce phénomène est notamment accentué par l'atténuation des tissus pour les organes profonds.

Les acquisitions des organes seuls, après sacrifice des souris, ont conduit à une compréhension plus précise de la biodistribution et de l'élimination des UCNPs. Un exemple des acquisitions réalisées est présenté sur la figure 80.

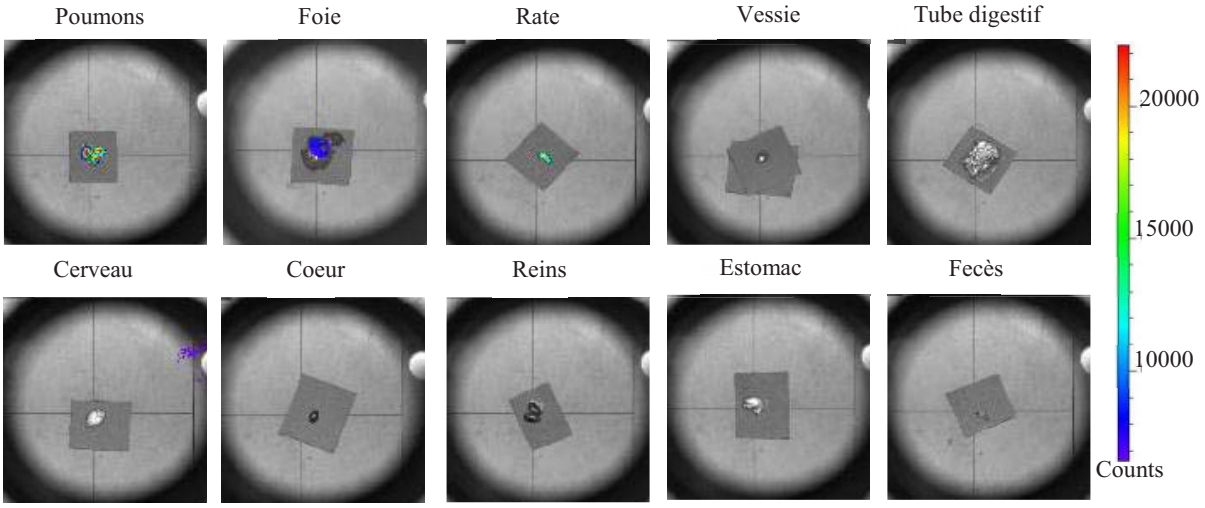


Figure 80 : Exemple d'acquisition sur les organes - Puissance laser : 70 mW/cm²

Le tableau 13 récapitule la présence des UCNPs dans les organes étudiés au cours du temps.

Les organes d'accumulation après injections, dans la quasi-totalité des souris étudiées, sont le foie, les poumons et la rate. Nous avons également observé deux souris présentant des UCNPs dans l'estomac et deux souris dont le signal provenait des reins.

Tout d'abord, l'accumulation dans les poumons est due à l'agrégation des UCNPs. Comme le montre la figure 81, l'intensité du signal ne semble pas diminuer au cours du temps. En effet, aucune élimination n'est possible dans les poumons. Cependant, la présence de NPs au sein des poumons n'a pas conduit à des problèmes respiratoires et n'a pas induit d'effets secondaires rapportés.

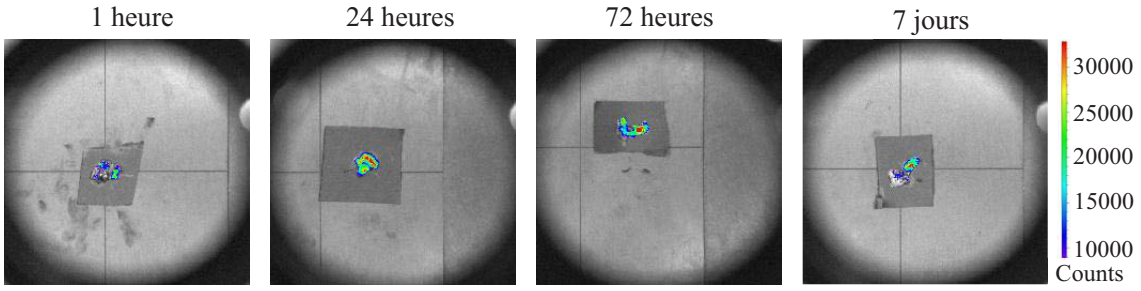


Figure 81 : Imagerie *ex vivo* des poumons à différents temps - Puissance laser : 70 mW/cm²

Ensuite, les signaux présents provenant du foie et de la rate diminuent en intensité, ce qui montre une élimination lente. Comme le montre les figures 82 et 83, nous pouvons visualiser la diminution d'intensité des UCNPs présentes dans le foie et la rate.

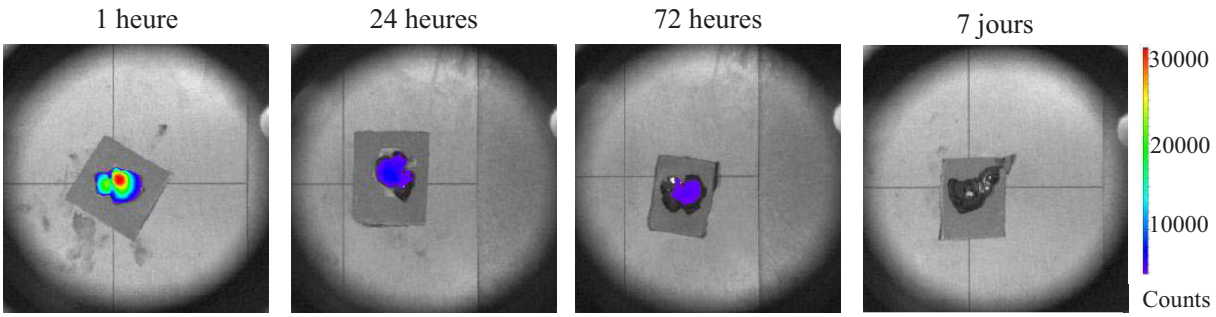


Figure 82 : Imagerie *ex vivo* du foie à différents temps - Puissance laser : 70 mW/cm²

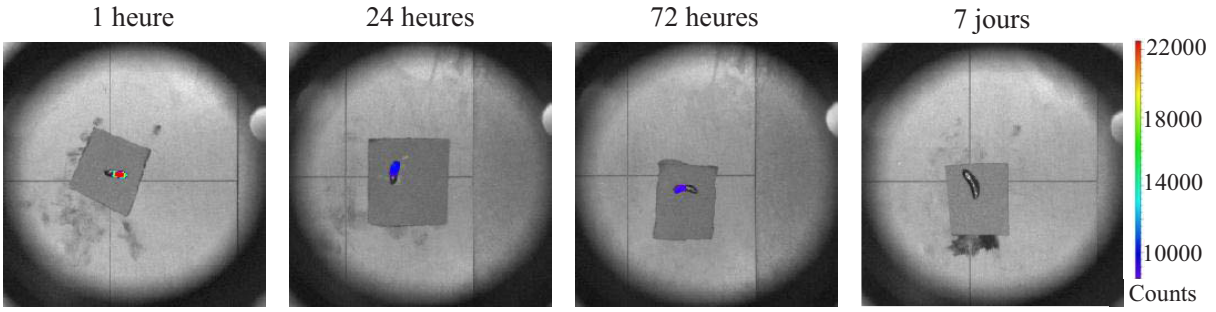


Figure 83 : Imagerie *ex vivo* de la rate à différents temps - Puissance laser : 70 mW/cm²

En outre, après 5 jours, l'intensité du laser a dû être augmenté afin d'obtenir un signal dans ces deux organes. La comparaison des images réalisées à 70 et 120 mW/cm² est présentée sur la figure 84.

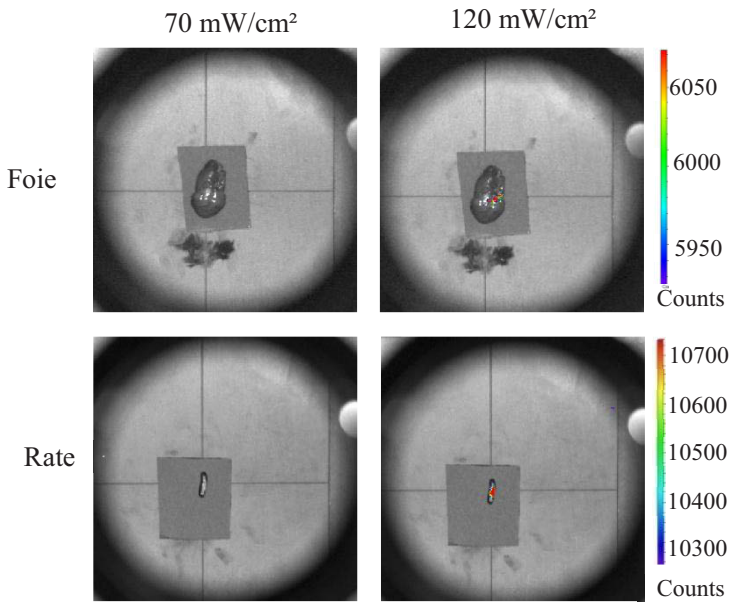


Figure 84 : Imagerie *ex vivo* du foie et de la rate à 7 jours pour des puissances laser de 70 et 120 mW/cm²

Tableau 13 : Tableau récapitulatif de la présence (+) ou de l'absence (-) de UCNPs@dendron au sein des organes au cours du temps. Puissance laser : 70 mW/cm² *(*Puissance laser : 120mW/cm²)*

		coeur	poumon	foie	tube digestif	rate	reins	cerveau	fecès	vessie	estomac	Bilan
15 min	souris 1	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	poumon, foie, rate, ±estomac
	souris 2	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+ *	
	souris 3	-	+	+		+	-	-	-	-	-	
1h	souris 1	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	poumon, foie, rate, reins
	souris 2	-	+	+	-	+	+ *	-	-	-	-	
	souris 3	-	+	+	-	+	+ *	-	-	-	-	
3h	souris 1	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	poumon, foie, rate, ±estomac
	souris 2	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	
	souris 3	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	
24h	souris 1	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	poumon, foie, rate
	souris 2	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	
	souris 3	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	
72h	souris 1	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	poumon, foie, ±rate
	souris 2	-	+	+	-	+ *	-	-	-	-	-	
	souris 3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
J5	souris 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±poumon, ±foie
	souris 2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	souris 3	-	+	+ *	-	+ *	-	-	-	-	-	
J7	souris 1	-	+	+ *	-	+ *	-	-	-	-	-	poumon, foie, rate
	souris 2	-	+	+ *	-	+	-	-	-	-	-	
	souris 3	-	+	+ *	-	+ *	-	-	-	-	-	

Cependant, nous ne pouvons pas statuer sur le mode d'élimination. En effet, le rejet des UCNPs par les organes semblent se faire par petites quantité. Si les UCNPs rejetées ne s'accumulent pas dans un organe en particulier et si les concentrations sont trop faibles, aucun signal ne pourra être détecté.

Au vue de la présence d'UCNPs dans l'estomac et dans le rein, nous pouvons supposer que l'élimination se fait par voie digestive et rénale.

2.2.3. Conclusion

Grâce à cette étude de biodistribution des UCNPs@dendron, nous avons pû définir différents points :

- Aucune toxicité n'a été rapportée lors de l'injection de UCNPs@dendron dans des souris nude et black.
- Les organes d'accumulation après injections sont les poumons, le foie et la rate.
- Les signaux correspondant aux UCNPs présentes dans ces organes diminuent au cours du temps, montrant bien une élimination assez rapide.
- Les voies d'élimination n'ont pas pu être définies mais semblent être digestive et rénale.

Suite à une étude sur des souris saines, nous avons testé nos UCNPs@dendron sur des souris présentant une tumeur afin de tester si la néovascularisation de celle-ci pouvait induire des changements de comportement des UCNPs *in vivo*.

2.3. Etude des UCNPs@dendron sur souris présentant une tumeur

Lors de cette étude *in vivo*, aucune souris présentant des tumeurs prostatiques n'était disponible. Nous avons donc travaillé avec des souris ayant une tumeur de mélanome. Nous sommes donc partis sur l'idée d'étudier le comportement des UCNPs lors de la présence d'une tumeur. En effet, la vascularisation accentuée dans une tumeur peut induire une différence de comportement de la biodistribution des UCNPs et donc provoquer un ciblage non-spécifique de ces dernières. D'autre part, la tumeur de mélanome est une tumeur orthotopique qui présente une importante pigmentation et représente donc une tumeur intéressante pour valider nos UCNPs.

2.3.1. Validité de l'imagerie intratumorale

Dans un premier temps, nous avons injecté une solution de UCNPs@dendron directement en intratumorale afin de valider l'imagerie des UCNPs à l'intérieur d'une tumeur. Pour cela, 100 µL d'une solution de UCNPs@dendron à 2mg/mL ont été injectés en intratumoral sur souris anesthésiée. Puis, nous avons réalisé des acquisitions au niveau de la tumeur à différents temps afin de suivre l'élimination des UCNPs au niveau de la tumeur (figure 85).

Tout d'abord, le signal correspondant à l'injection intratumorale est parfaitement défini, ce qui valide l'utilisation de nos UCNPs. En effet, il est notable qu'une tumeur de mélanome présente une pigmentation importante qui aurait pu atténuer le signal.

Par la suite, nous avons suivi le signal de ces UCNPs au cours du temps. Nous avons pu voir que celui-ci semble constant pendant la première heure puis il décroit (figure 85). En outre, le signal encore présent à 24h semble provenir du point d'injection.

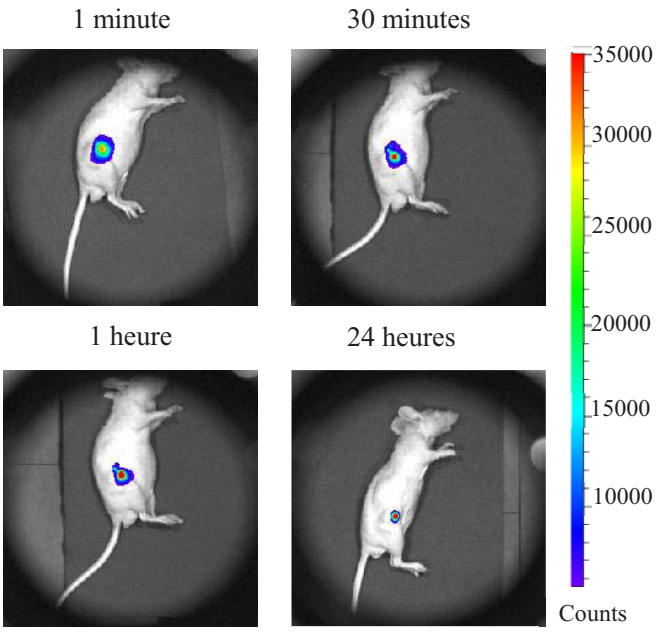


Figure 85 : Suivi intratumoral d'une injection de 100µL d'une solution de UCNPs@dendron à 2 mg/mL - Puissance laser : 70 mW/cm²

Enfin, nous avons également réalisé des acquisitions au même temps sur les organes d'intérêt (foie, poumon et tube digestif) afin d'évaluer si les UCNPs pouvaient y être accumulées malgré l'injection intratumorale. Aucun signal n'a été détecté même sur les organes prélevés après sacrifice de la souris.

2.3.2. Etude de biodistribution des UCNPs@dendron

L'étude précédente a permis de montrer qu'il est possible d'imager nos UCNPs contenues dans une tumeur très pigmentée même en faible quantité. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude de la biodistribution des UCNPs@dendron dans une souris présentant une tumeur, ici le mélanome.

Pour cela, nous avons injecté en intraveineuse 100 µL d'une solution de UCNPs@dendron à 2 mg/mL sur 5 souris nude présentant une tumeur de mélanome au niveau du flanc droit. Les deux premières souris ont été imagées *in vivo* à 15 minutes et 1 heure puis sacrifiées. Les trois autres souris ont été imagées à 1heure et 24 heures puis sacrifiées également. Enfin, nous avons imagé les organes d'intérêt (foie, poumons, rate, tumeur).

Au temps 15 minutes et 1 heure, nous observons toujours un signal *in vivo* dans le foie et dans les poumons (figure 86), comme nous l'avons vu dans les souris saines. En outre, aucun signal n'a été observé dans la tumeur. Enfin, l'acquisition des organes a confirmé ces observations puisque les UCNPs sont localisées dans le foie, les poumons et la rate (figure 87).

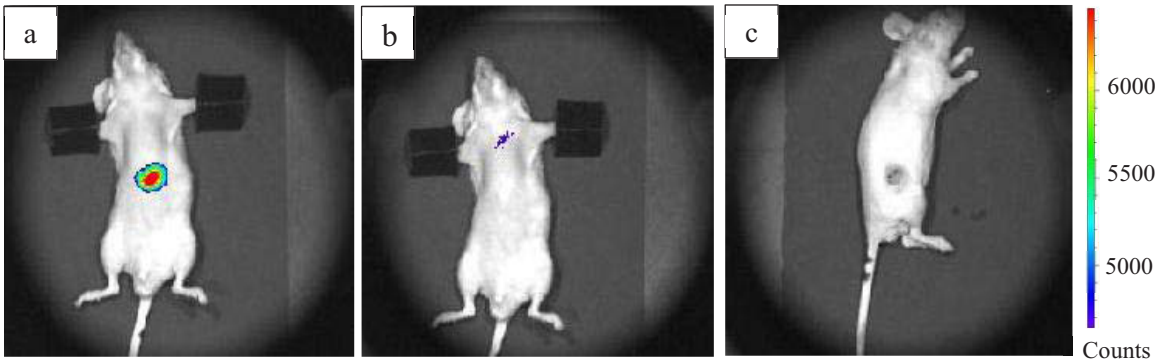


Figure 86 : Imagerie *in vivo* de l'élimination des UCNPs@dendron (a) images dans une souris possédant une tumeur (a) centré sur le foie (b) centré sur les poumons (c) centré sur la tumeur - Puissance laser : 70 mW/cm²

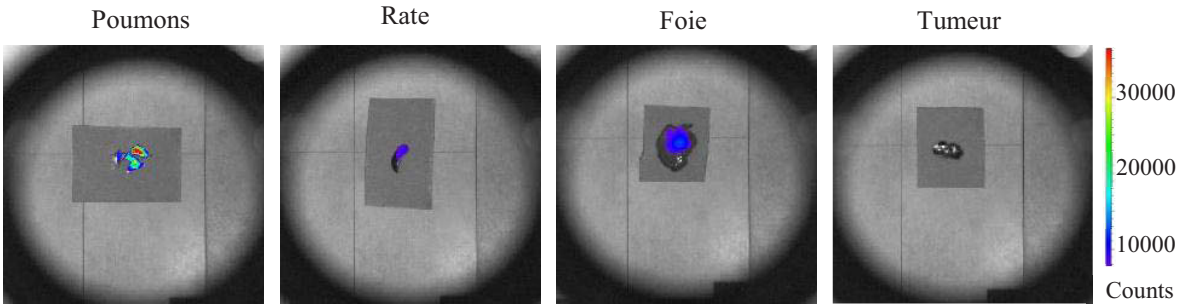


Figure 87 : Suivi de l'élimination des UCNPs@dendron dans le poumon, la rate, le foie et la tumeur - Puissance laser : 70 mW/cm²

A 24 heures, les acquisitions *in vivo* ont uniquement permis d'observer les UCNPs dans le foie. Après sacrifice des souris, les UCNPs ont été également été identifiées dans les poumons et la rate.

Ces observations sont concordantes avec l'étude de la biodistribution des UCNPs@dendron dans une souris saine. Nous pouvons donc conclure que la présence d'une tumeur ne va pas induire un ciblage aspécifique de nos UCNPs vers la tumeur. Ces résultats sont encourageants pour la suite du projet. En effet, l'étude de la biodistribution des UCNPs vectorisées, et donc spécifiques à des cellules tumorales, permettrait de confirmer la qualité de la vectorisation.

2.4. Etude préliminaire des UCNPs@PEG-phosphate sur souris saines

Suite à l'étude approfondie de la biodistribution et de l'élimination des UCNPs@dendron, nous avons réalisé une étude succincte des UCNPs@PEG-phosphate afin de compléter la compréhension *in vivo* sur les 2 types d'enrobages étudiés.

Les paramètres de cette étude sont les suivants :

- Souris nude
- Volume injecté : 100 µL
- Concentration : 2 mg/mL
- 3 souris
- Temps d'acquisition *in vivo*: 15 min et 3 jours
- Sacrifice à 3 jours
- Acquisition sur organes après dissection des souris

Lors de l'acquisition *in vivo* après 15 minutes, nous avons pu détecter des UCNPs dans le foie et les poumons, pour les 3 souris. Après 3 jours, aucune UCNPs n'est détectée, comme le montre la figure 88.

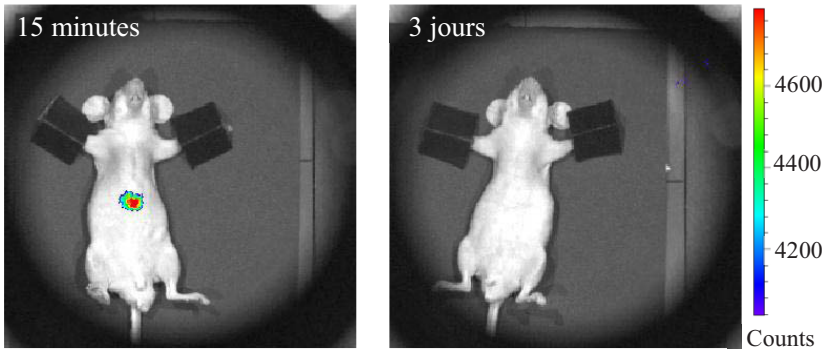


Figure 88 : Suivi *in vivo* de l'élimination des UCNPs@PEG-phosphate - images centrées sur le foie à 15 minutes et 3 jours - Puissance laser : 70 mW/cm²

Suite au sacrifice des souris après 3 jours, les organes ont été imagés et aucun ne présente de signal provenant des UCNPs. Les UCNPs@PEG-phosphate ont donc une élimination plus rapide que leurs homologues dendronisées. Le mode d'élimination n'a malheureusement pas pu être déterminé.

2.5. Conclusion de l'étude *in vivo*

L'étude *in vivo* des UCNPs@dendron et UCNPs@PEG-phosphate a été réalisée grâce à l'équipement IVIS SPECTRUM® modifié.

Tout d'abord, nous avons pu montrer que les UCNPs peuvent être détectées quel que soit leur enrobage et ainsi valider l'hypothèse selon laquelle les UCNPs sont des particules de choix pour réaliser de l'imagerie par fluorescence. Cette première étude de faisabilité nous a permis de voir que de très faibles quantités de UCNPs peuvent être imagées. Cependant la position de ce foyer de UCNPs est importante. En effet, même si les conditions de luminescence se situent dans la fenêtre de faible absorption des tissus, l'émission des UCNPs à 800nm va être soumise au phénomène d'atténuation dû aux tissus.

La seconde étude a permis de montrer, dans un premier temps, que les UCNPs@dendron n'induisaient pas d'effets secondaires rapportés après 7 jours. Dans un second temps, nous avons pu voir que la technique développée ici permet uniquement d'avoir une détection dans les organes faiblement soumis à l'atténuation et lorsque la concentration y est importante. En effet, lorsque l'accumulation des UCNPs est trop faible, aucun signal n'est détecté. L'étude des organes pris individuellement a cependant permis de confirmer la biodistribution de nos UCNPs. L'étude de distribution *in vivo* des UCNPs@dendron a montré une accumulation dans les poumons, le foie et la rate. Au vue de la stabilité des UCNPs, qui est à améliorer, la présence dans les poumons n'est pas surprenante puisque la présence d'agrégats conduit à une accumulation dans cet organe. Cependant, la présence des UCNPs n'a pas induit d'effets indésirables. La présence dans le foie a déjà été référencée pour des UCNPs de composition, enrobage et taille variables[124, 142]. L'accumulation dans ces organes peut être due à une faible dendronisation des particules. En effet, à titre de comparaison, l'étude de NPs d'oxyde de fer dendronisées, dont le diamètre hydrodynamique est inférieur à 50 nm, montre une bonne biodistribution, aucun système réticulo-endothélial (RES) ou d'accumulation dans les poumons[143]. Cependant, pour le foie et la rate, une diminution notable du signal est observée ce qui montre que les UCNPs@dendron sont éliminées. Cette élimination semble s'effectuer par voie rénale et digestive.

Ensuite, un modèle tumoral a permis de montrer que les UCNPs peuvent être imagées dans une tumeur pigmentée. De plus, la présence d'une tumeur n'induit pas de changements de biodistribution des UCNPs@dendron. Ce point est positif puisque la néovascularisation de la tumeur n'a pas conduit à un ciblage aspécifique des UCNPs.

Enfin, l'étude rapide des UCNPs@PEG-phosphate chez le petit animal a montré que les nano-objets s'accumulaient également dans les poumons, le foie et la rate. Cependant au bout de 3 jours, aucun signal n'a été détecté, ce qui indique une élimination plus rapide.

3. Etudes *in vitro* et *in vivo* – Conclusion et perspectives

Ce chapitre a permis de montrer que les UCNPs n'induisent pas de toxicité *in vitro* et *in vivo*. Par ailleurs, pour les deux enrobages présentés, les UCNPs se situent à l'extérieur des cellules, au contact de la membrane plasmique. Les UCNPs se comportent de manière aspécifique au vu de l'absence d'un vecteur de reconnaissance de la PSMA.

La validation du système IVIS SPECTRUM® a permis de réaliser la biodistribution des UCNPs dans le petit animal. L'optimisation du montage expérimental est cependant à développer, puisque l'inhomogénéité du laser conduit à des résultats peu reproductibles.

Il aurait par ailleurs été intéressant de réaliser de la microscopie électronique à transmission sur les organes prélevés afin de comprendre comment se comportaient les UCNPs et où se situe leur accumulation.

La poursuite de ce projet peut s'orienter vers deux points principaux. Dans un premier temps, l'hydrophilisation doit être plus maitrisée afin d'avoir des suspensions stables dans le temps. La biodistribution pourrait alors être confirmée. Dans un second temps, la vectorisation des UCNPs@dendron par des vecteurs spécifiques de la PSMA est l'enjeu de ce travail.

Suite à la vectorisation des nano-objets, nous pourrons réaliser l'étude *in vitro* sur des lignées cellulaires prostatiques afin d'évaluer la capacité des NPs à pénétrer les cellules. Cette première étude pourrait ainsi confirmer l'accroche des vecteurs en surface. De plus, l'étude *in vivo* sur souris tumorales prostatiques permettrait de tester l'efficacité de la vectorisation et les potentiels changements de biodistribution des nano-objets au sein de souris présentant une tumeur.

CHAPITRE VI.
Etude de la matrice $NaLuF_4$

SOMMAIRE

1. Avantages de la matrice $NaLuF_4$ 143

2. Synthèse 143

3. Résultats 144

3.1. Caractérisations structurales et morphologiques 144

3.2. Propriétés optiques 147

4. Imagerie par tomographie par rayon X 149

4.1. Principe de la technique 149

4.2. Premiers essais d'imagerie par tomographie CT 149

5. Conclusion 151

Lors de l'étude bibliographique de ce projet, nous nous sommes principalement intéressés à la matrice $NaYF_4$. Cependant une autre matrice, possédant des caractéristiques optiques similaires, a été étudiée : la matrice $NaLuF_4$. Dans ce chapitre, la synthèse et les caractérisations structurales et morphologiques de ces UCNPs seront présentées ainsi que leur fort potentiel pour l'imagerie multimodale. En effet, la présence de l'ion Lutécium offre la possibilité de combiner l'imagerie par fluorescence avec de l'imagerie par tomographie[144].

1. Avantages de la matrice $NaLuF_4$

La matrice $NaLuF_4$ a été étudiée puisqu'elle présente également une faible énergie de phonons et une transparence optique dans un large domaine de longueurs d'onde. De plus, des études précédentes ont démontré que $NaLuF_4$ possède des intensités de luminescence par upconversion supérieure à son homologue $NaYF_4$ lors d'une activation par des ions de terres rare[145-148].

Plusieurs explications ont été proposées pour cela. Tout d'abord, le rayon ionique de Lu^{3+} (0,85 Å) est plus proche de celui des ions de substitution Yb^{3+} (0,86 Å) que les ions Y^{3+} (0,89 Å)[149]. La matrice à base de Lu^{3+} devrait donc être plus stable lorsqu'elle est dopée avec une forte concentration en Yb^{3+}. Par ailleurs, la bande de valence pourrait également jouer un rôle en contribuant plus fortement à la levée de parité grâce à un « mélange » des états 4*f* avec les états 5*d* plus important du fait d'un champ cristallin plus intense.

Ce composé présente les mêmes structures cristallines que $NaYF_4$ et possède donc les mêmes caractéristiques liées à la fluorescence anti-Stokes. Tout d'abord, la phase hexagonale présente des rendements d'upconversion plus important que la phase cubique. De plus, les concentrations en ions dopants restent identiques : 18%Yb^{3+}, 2%Er^{3+} dans le cas de la conversion IR → visible et 20%Yb^{3+},2%Tm^{3+} dans le cas de la conversion IR → NIR.

Enfin, le Lutécium possède le nombre atomique le plus élevé, et une densité importante, par rapport aux autres éléments de terres rares, ce qui lui permet d'afficher une forte absorbance des rayons X pour l'imagerie tomographique[144]. C'est pourquoi les UCNPs à base de lutécium peuvent être des matériaux intéressants en tant qu'agents d'imagerie multimodaux.

2. Synthèse

De même que pour $NaYF_4$, différentes voies de synthèse sont envisageables et ont déjà été reportées dans la littérature : la voie hydrothermale[148, 150], la coprécipitation[151, 152] et la décomposition thermique[90, 146] par exemple.

Nous avons choisi de travailler avec cette dernière, permettant ainsi de faire un parallèle avec la synthèse de $NaYF_4$ réalisée dans le chapitre III.

Dans le cas de la synthèse de $NaLuF_4$:18%Yb, 2%Er : 0,8 mmol $LuCl_3$ (0,8 éq.), 0,18 mmol $YbCl_3$ (0,18 éq.)et 0,02 mmol $ErCl_3$ (0,02 éq.) sont dissous dans un mélange comprenant 6 mL d'acide oléique et 15 mL d'octadécène (3/5 v/v). La solution est portée à 160°C pendant 1 heure afin d'obtenir un mélange homogène puis la solution est refroidie à température ambiante. Une seconde solution, contenant 2,5 mmol de NaOH (2,5 éq.) et 4 mmol de NH_4F (4 éq.) préalablement dissous dans 10 mL de méthanol, est ajoutée lentement au mélange précèdent. Le tout est agité pendant 30 minutes, puis chauffé à 100°C pendant 10 minutes. Enfin la température est fixée à 320°C pendant 1 heure sous flux d'argon. La solution est ensuite refroidie à température ambiante et les nanocristaux sont précipités avec de l'éthanol. Le mélange est alors lavé avec un mélange cyclohexane/éthanol (1/1 v/v) trois fois. La poudre obtenue est soit remise en suspension dans un solvant non polaire tel que le cyclohexane, soit séchée à l'étuve à 80°C afin d'étudier ses propriétés physico-chimiques.

Dans le cas de nanoparticules de $NaLuF_4$:20%Yb, 2%Tm, le ratio molaire des chlorures de terres rares ($LuCl_3$, $YbCl_3$ et $TmCl_3$) est de 0,78 : 0,20 : 0,02. Le protocole reste identique au précèdent.

3. Résultats

3.1. Caractérisations structurales et morphologiques

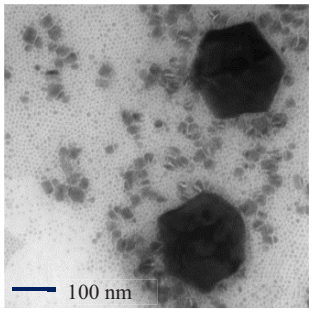
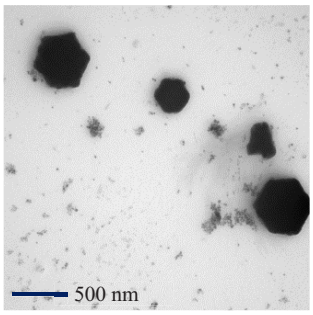
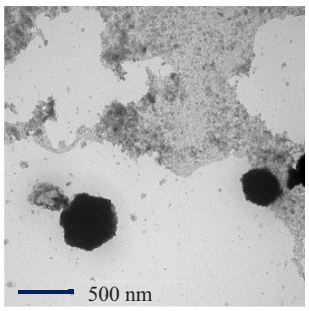
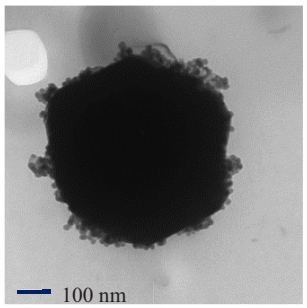
Contrairement à $NaYF_4$ dont la synthèse conduisait à la formation d'UCNPs sphériques de 20 nm de diamètre et de phase cristalline hexagonale, la formation de NPs de $NaLuF_4$ s'est avérée problématique. En effet, la synthèse décrite ci-dessus n'a pas permis d'obtenir ces caractéristiques. Nous avons donc choisi de faire varier la température et le temps de chauffe afin de moduler les caractéristiques structurales et morphologiques. Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-après.

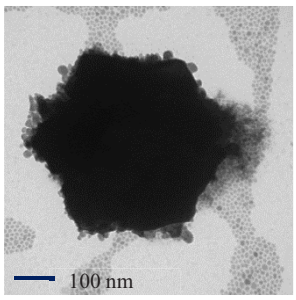
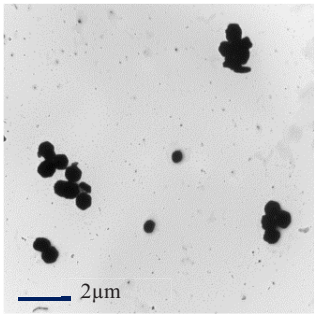
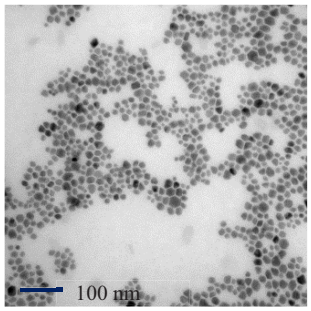
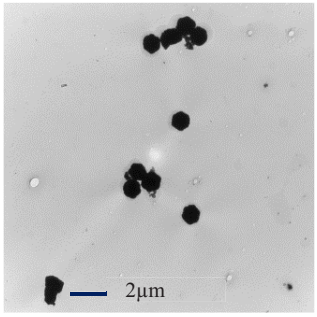
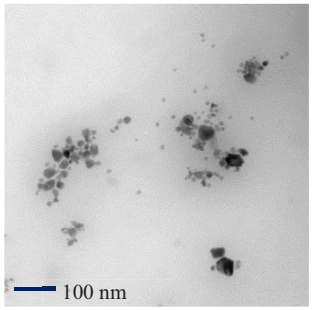
Les différents essais de synthèse ont permis de mettre en avant les points suivants :

- Le contrôle de la phase cristalline finale est délicat puisque pour une même température et un même temps de chauffe, le produit final peut être soit dans sa forme hexagonale β soit être un mélange des deux phases α + β (phase α JCPDS 27-0725; phase β JCPDS 27-0726). De plus, une augmentation de la température, habituellement favorable à la formation de la phase hexagonale, n'a pas permis de contrôler ce paramètre.

- La morphologie des UCNPs finales est ici anarchique puisqu'aucun lien ne peut être fait entre les paramètres de synthèses et les formes des UCNPs obtenues. Les clichés reportés dans le tableau sont représentatifs des différents essais réalisés et mettent en évidence la versatilité de morphologies et de tailles des UCNPs obtenues.

Tableau 14 : Récapitulatif des synthèses de $NaLuF_4$ réalisées par décomposition thermique

Température (°C)	Temps	Phase cristalline	Clichés MET	Caractéristiques morphologiques
300	1h	α + β		3 populations : <10nm ~ 20 nm 100 à 300 nm
		β		3 populations : <10nm ~ 20 nm > 300 nm
	1h30	α + β		2 populations : 10-15 nm > 300 nm
	2h	β		2 populations : ~ 20 nm > 600 nm

305	1h	α + β		3 populations : ~ 20 nm ~ 100 nm ~ 500 nm
		β		2 populations : <10nm ~ 1 µm
310	1h	α + β		1 population : ~ 10-20 nm
	1h30	β		1 population : ~ 1µm
320	1h	β		2 populations : <10nm ~ 20-30 nm

Concernant la cristallinité des UCNPs, une étude de Wang et al[90] a montré la différence de formation des phases cubique et hexagonale entre les deux composés fluorés dans le cas de décomposition thermique. Les températures de formations des phases β métastases se situent entre 305 et 400°C pour $NaLuF_4$ et entre 300 et 600°C pour $NaYF_4$. En d'autres termes, la phase β du composé $NaLuF_4$ est plus instable que dans le cas de $NaYF_4$ et ne peut donc être obtenue que dans une gamme de température plus étroite.

La différence entre les rayons ioniques de Lu^{3+} et Y^{3+} peut donc expliquer les différences de cristallinité, mais également les variations de taille et de morphologie pour les mêmes conditions de synthèses des UCNPs[90].

La synthèse de $NaLuF_4$ a ainsi été arrêtée par manque de temps mais les études optiques ont été réalisées afin de montrer le réel potentiel de cette matrice.

3.2. Propriétés optiques

Afin d'évaluer les différences des propriétés de fluorescence par upconversion, nous avons enregistré les spectres d'émission *via* une excitation avec un laser à 980 nm des composés $NaYF_4$ et $NaLuF_4$ avec les deux types de dopages (Yb^{3+}/Er^{3+} et Yb^{3+}/Tm^{3+}). La comparaison a été réalisée entre les échantillons de $NaYF_4$ de 20 nm de diamètre avec les échantillons de $NaLuF_4$ composés uniquement de NPs de tailles comprises entre 10 et 20 nm.

La première constatation faite est que, quelle que soit la phase cristalline de la matrice $NaLuF_4$, les intensités de luminescence obtenues sont supérieures à celles de β-$NaYF_4$. En effet, nous avons pu comparer les échantillons possédant la phase hexagonale et ceux composés d'un mélange des phases cubique et hexagonale. Comme nous avons pu le voir et l'expliquer dans la partie 3.1.1 du chapitre II, la phase hexagonale possède des rendements de luminescence par upconversion supérieurs à ceux de la phase cubique.

La figure 89 compare les spectres d'émission des composés $NaLnF_4$: 18%Yb^{3+}, 2%Er^{3+} (Ln = Y et Lu). Les deux spectres présentent trois pics d'émission dominant à 520 nm, 539 nm et 652 nm. Ces différentes contributions correspondent respectivement aux transitions $^2H_{11/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$, $^4S_{3/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ et $^4F_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ de l'ion Erbium. Les mécanismes proposés sont les mêmes que dans la partie 1.3.2 du chapitre III.

Cependant les intensités des pics de fluorescence par upconversion sont considérablement augmentées dans le cas de la matrice $NaLuF_4$. En effet, les intensités des pics d'émissions présentent des augmentations par un facteur 6, 8 et 9 pour les transitions à 520, 539 et 652 nm, respectivement.

Le pic de faible intensité à 406 nm, correspondant à la transition $^2H_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$, est plus marqué que dans la matrice $NaYF_4$. Cette transition peut ne pas être observée en raison de la faible efficacité des processus d'upconversion à trois photons. L'observation de l'émission à 406 nm peut être considérée comme une autre preuve de l'efficacité des mécanismes d'upconversion dans la matrice au lutécium.

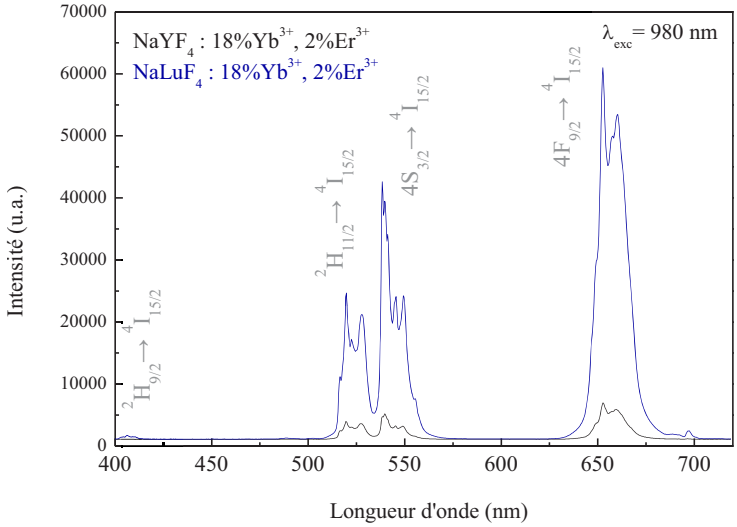


Figure 89 : Spectres d'émission de la fluorescence de $NaYF_4$: 18%Yb, 2%Er et $NaLuF_4$: 18%Yb, 2%Er sous excitation à 980 nm

La figure 90 présente les spectres d'émission des composés $NaLnF_4$: 20%Yb^{3+}, 2%Tm^{3+} (Ln = Y et Lu). Le pic à 800 nm, attribué à la transition $^3H_4 \rightarrow {}^3H_6$ de l'ion Thulium, indique une augmentation de la fluorescence par un facteur 2,3 avec la matrice $NaLuF_4$. Il est important de noter qu'ici la phase cristalline du composé $NaLuF_4$ est un mélange des phases α et β. Nous pouvons donc supposer que si la synthèse de $NaLuF_4$ avait permis d'obtenir la phase pure hexagonale, les intensités de luminescence seraient encore plus importantes comparées à celles du composé $NaYF_4$.

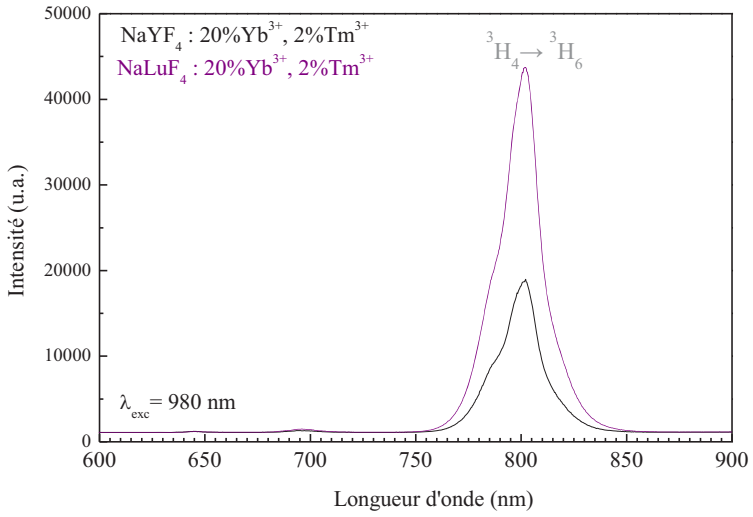


Figure 90 : Spectre d'émission de la fluorescence de $NaYF_4$: 20%Yb, 2%Tm et $NaLuF_4$: 20%Yb, 2%Tm sous excitation à 980 nm

Malgré des synthèses non maîtrisées et des UCNPs non reproductibles en termes de phase cristalline, de taille et de morphologie, l'étude du composé $NaLuF_4$ codopé avec les ions Yb^{3+}/Er^{3+} et $Yb^{3+/}Tm^{3+}$ a permis de montrer son réel potentiel pour des applications en luminescence par upconversion. En effet, les propriétés optiques sont largement améliorées lors d'une excitation dans l'infrarouge, par rapport à $NaYF_4$.

4. Imagerie par tomographie par rayon X

4.1. Principe de la technique

La tomographie assistée par ordinateur (CT) est une technique permettant l'acquisition d'informations et la reconstruction de sections planes d'objets ou d'organes grâce à l'utilisation de rayons X. En effet, il existe une différence de contraste entre l'os, les tissus mous et l'air se trouvant dans ces structures.

Le principe de cette technique consiste à placer le sujet entre une source de rayons X et un détecteur de rayons X. Au cours de l'exposition, chaque constituant du corps absorbe plus ou moins le rayonnement X. La différence d'intensité absorbée qui existe entre les différents tissus constitue le contraste. Celui-ci est d'autant plus fort que le numéro atomique (Z) est élevé. Le contraste est naturellement produit par le Calcium (Z=20) contenu dans les os. Cependant, des agents de contraste sont utilisés afin d'augmenter artificiellement le contraste permettant de visualiser une structure anatomique (un organe) ou pathologique (une tumeur) naturellement pas ou peu contrastée. Les agents de contraste les plus couramment utilisé sont l'Iode (Z=53) et le Baryum (Z=56).

La tomographie CT est un type d'imagerie structurelle rapide permettant une bonne résolution des structures et offrant un fort pouvoir contrastant. Par ailleurs, cette technique d'imagerie permet d'obtenir des images en 3D.

L'imagerie par tomographie peut donc être utilisée pour imager les UCNPs contenant du Lutécium (Z=71).

4.2. Premiers essais d'imagerie par tomographie CT

Cette étude a été réalisée avec un imageur Explore CT120 (GE Healthcare).

Les paramètres d'acquisition sont les suivants : une tension du tube X de 100 kV, un courant du tube de 50 mA, un temps d'acquisition de 20 ms et une résolution spatiale de 50 µm.

Dans un premier temps, des essais sur la poudre de $NaLuF_4$: Yb^{3+}, Er^{3+} ont été réalisés et l'acquisition CT est présentée à la figure 91. Le signal obtenu est intéressant et montre ici la capacité de ces UCNPs à être détectées par tomographie par rayons X.

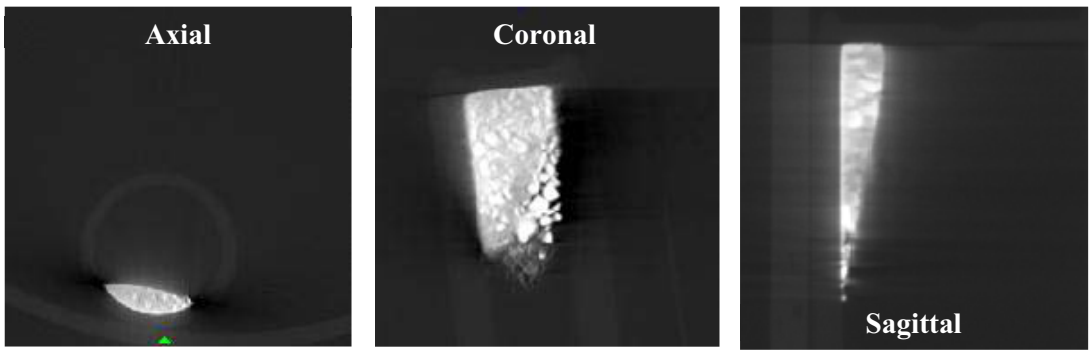


Figure 91 : Coupes axial, coronal et sagittal de la poudre de $NaLuF_4$: Yb^{3+}, Er^{3+} contenue dans un tube

Afin de confirmer la capacité de ces UCNPs, nous avons effectué une comparaison avec l'ioméron, composé à base d'iode, qui est un agent de contraste couramment utilisé pour cette technique d'imagerie.

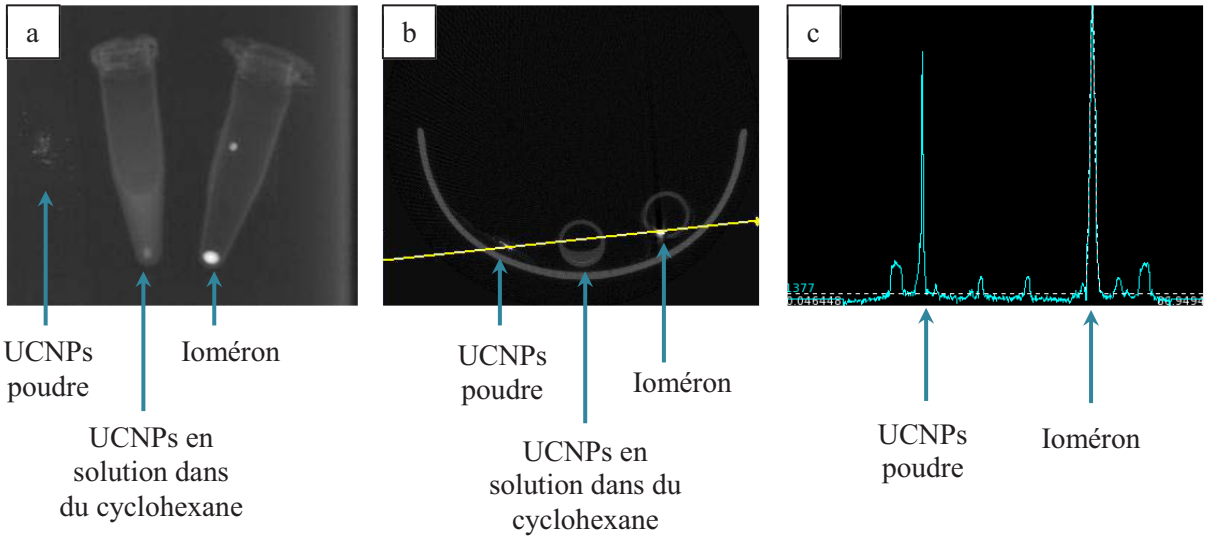


Figure 92 : Acquisition CT des UCNPs sous forme de poudre et en solution dans du cyclohexane comparé à l'Ioméron (a) Repérage (b) et (c) profil du signal

L'image (a) de la figure 92 permet de montrer qu'il est possible d'obtenir un signal pour les UCNPs comparable à celui de l'Ioméron. Cependant, nous pouvons noter que les UCNPs en solution dans le cyclohexane ont une forte tendance à s'agréger d'où un faible signal dans le fond de l'eppendorf. L'image (b) illustre comment est créé le profil du signal (présent sur la figure 92c). En effet, pour un profil défini, il est possible d'obtenir l'intensité du signal pour les 3 composés. Il est intéressant de montrer que le signal des UCNPs sous forme de poudre est équivalent à celui de l'Ioméron. Cependant les UCNPs en solution ne présentent pas de signal. La limite de cette technique semble donc être une trop faible concentration en solution des nano-objets pour obtenir un signal assez important pour réaliser de l'imagerie.

Nous avons également imagé des UCNPs, sous forme de poudre, qui ont été déposées sur la patte de la souris en faible quantité. Comme le montre les coupes présentées sur la figure 93a, les UCNPs sont facilement repérables et se distinguent aisément des tissus mous. Cette remarque est confirmée par le profil du signal (figure 93b). En effet, comparés aux tissus mous de la souris, les nano-objets présentent un signal élevé.

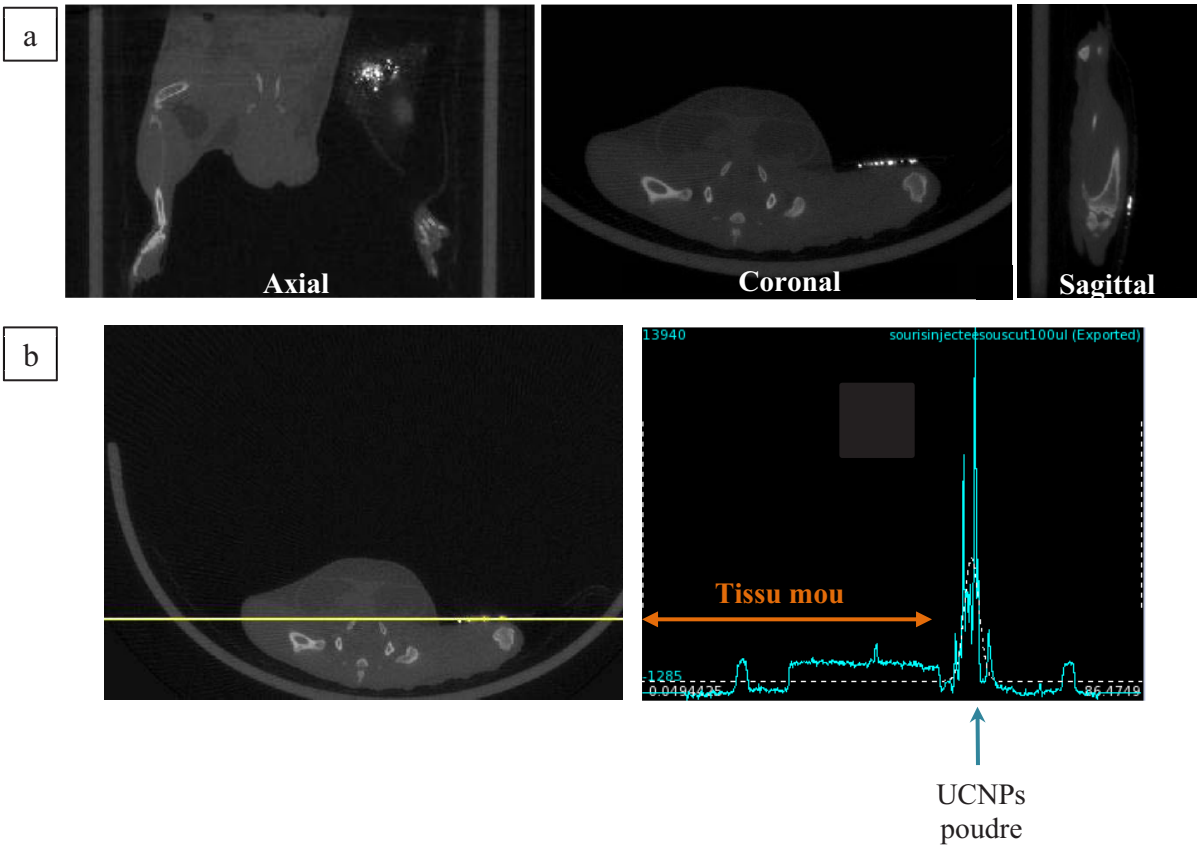


Figure 93 : (a) Coupes axial, coronal et sagittal de la poudre de $NaLuF_4$: Yb^{3+}, Er^{3+} déposée sur la patte d'une souris nude (b) profil du signal de la poudre de $NaLuF_4$: Yb^{3+}, Er^{3+} déposée sur la patte d'une souris nude

5. Conclusion

Ce dernier chapitre a permis de présenter les premiers travaux réalisés sur la matrice $NaLuF_4$. En effet, malgré des difficultés lors de la synthèse, il est important de retenir que ces UCNPs possèdent des propriétés de luminescence par upconversion largement supérieures à celles de $NaYF_4$. Comme nous avons pu le voir, les intensités de luminescence sont supérieures d'un facteur entre 2 et 9. Il devient alors intéressant de développer l'ingénierie de ces NPs *via* l'enrobage avec une coquille non dopée par exemple afin de supprimer le quenching de la fluorescence issue des ions présents en surface.

Grâce à ses propriétés optiques remarquables, il a été démontré qu'il est possible d'imager une souris entière avec une pénétration de 2 cm grâce à la matrice $NaLuF_4$[148] ce qui permettrait d'améliorer considérablement la technique d'imagerie par fluorescence.

Enfin, l'intérêt principal de ce composé est la possibilité de réaliser de l'imagerie par tomographie de rayons X. Les UCNPs à base de $NaLuF_4$ représenteraient donc des agents d'imagerie multimodaux très intéressants. Dans le cadre de ces essais préliminaires, nous avons montré la capacité de ces nano-objets, qui se distinguent facilement des tissus mous et dont le signal est équivalent à celui de l'Ioméron, classiquement utilisé. Ces UCNPs ont donc un pouvoir contrastant très élevé. Cependant, une étude plus approfondie sur les NPs hydrophilisées est à prévoir afin d'évaluer les concentrations minimales à injecter pour avoir un signal significatif.

Cette matrice illustre ici toute l'ingénierie qu'offrent les UCNPs. En effet, $NaLuF_4$ peut être utilisé sous forme de cœur, comme nous l'avons vu, mais également sous forme de coquille[114]. En outre, d'autres études ont permis de démontrer l'intérêt de l'incorporation de Gadolinium dans le système cœur/coquille pour l'upconversion. En effet, le Gadolinium peut être utilisé pour réaliser de l'imagerie par résonnance magnétique[114, 153, 154]. Les NPs pour le médical deviennent ainsi des agents d'imagerie multimodaux, dont toutes les propriétés peuvent être modulées.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif premier de ce projet de thèse était de développer des matériaux luminescents performants et innovants dans la filière des traceurs fluorescents spécifiquement dédiés au cancer de la prostate. Le projet s'est articulé autour de quatre aspects principaux à savoir la conception et l'optimisation de nanoparticules à luminescence par upconversion (ou anti-Stokes), l'hydrophilisation de ces nano-objets, l'étude de cytotoxicité et de biodistribution *in vitro* et enfin l'étude *in vivo* grâce à l'implémentation de l'imagerie sur le petit animal.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au développement de NPs pour l'upconversion qui permettent de convertir efficacement des photons d'excitation infrarouge en des photons d'énergies plus élevées. Ce processus de fluorescence non linéaire va ainsi permettre de convertir, selon la composition des nanoparticules, un rayonnement infrarouge en émission dans l'ultraviolet, le visible ou le proche infrarouge. Ces propriétés optiques particulières vont ainsi pouvoir être utilisées dans le domaine du médical et plus particulièrement pour la détection, voire la thérapie. En effet, le travail dans le domaine proche de l'infrarouge autorise un diagnostic en profondeur et non invasif pour de l'imagerie *in vivo* puisque la fenêtre thérapeutique se situe entre 0,6 et 1,2 µm, où l'autofluorescence des tissus est minime. Par ailleurs, l'aspect thérapie a été envisagé *via* la conversion infrarouge → ultraviolet aux abords de tumeurs, permettant ainsi d'espérer une destruction ciblée des cellules cancéreuses. Parmi les matériaux pour l'upconversion répertoriés dans la littérature, nous nous sommes intéressés à la synthèse de la matrice $NaYF_4$ dopée par des ions de terres rares.

La synthèse par décomposition thermique a permis d'obtenir des NPs sphériques, bien cristallisées et de distribution de taille monomodale. L'étude des propriétés optiques a démontré les importantes capacités d'upconversion de cette matrice. Les différents dopages par des ions de terres rares ont permis d'obtenir les conversions infrarouge → proche infrarouge ($NaYF_4$: 20%Yb^{3+}, 2%Tm^{3+}), infrarouge → visible ($NaYF_4$: 18%Yb^{3+}, 2%Er^{3+}) et infrarouge → ultraviolet ($NaYF_4$: 20%Yb^{3+}, 2%Gd^{3+}, 0,5%Tm^{3+}).

D'autre part, l'enrobage du cœur de fluorures, dopé par les ions de terres rares, par une coquille de la même matrice non dopée a été réalisé afin d'améliorer les propriétés optiques de nos UCNPs. Pour cela, l'enrobage a été réalisé par décomposition thermique et a donné des NPs ablongs, bien cristallisées et de distribution de taille monomodale. La comparaison des propriétés de luminescence avec le cœur de fluorure non enrobé a montré une importante augmentation des intensités d'émission de fluorescence (augmentation par un facteur 4 à 8 selon les transitions étudiées).

Ces UCNPs de type cœur/coquille ont ainsi été retenues comme étant des NPs abouties et ont été utilisées pour l'imagerie avec $NaYF_4$: 20%Yb^{3+}, 2%Tm^{3+}@ $NaYF_4$ comme composition de référence.

Suite à la synthèse des UCNPs, nous nous sommes ensuite intéressés à l'hydrophilisation des nano-objets. En effet, cette partie est cruciale afin de rendre les UCNPs biocompatibles et surtout obtenir des solutions stables dans un sérum physiologique. Grâce à l'étude bibliographique, nous nous sommes orientés vers deux voies d'hydrophilisation.

La première voie consiste en l'enrobage des UCNPs avec une coquille de silice grâce à une émulsion inverse. En effet, la silice est largement connue tant pour les voies de synthèses permettant de l'obtenir que pour ses propriétés physico-chimiques. La synthèse réalisée a permis de former la coquille de SiO_2 avec cependant de nombreuses limitations telles qu'un enrobage partiel des UCNPs. Cette hydrophilisation n'a ainsi pas permis de conduire à des dispersions stables en milieux aqueux.

La seconde voie utilise l'échange de ligands afin de substituer les molécules d'acide oléique présentes en surface par des ligands hydrophiles. Nous avons testé dans notre cas deux ligands différents : les PEG-phosphate et les dendrons. L'accroche des PEG-phosphate a été effectuée *via* les groupements phosphates des ligands, comme nous avons pu le confirmer en IR et en XPS. Cependant, les UCNPs obtenues ne sont pas stables en solution. Enfin la présence du groupement méthoxy, dont la réactivité est nulle, est problématique dans l'objectif de venir vectoriser les nano-objets. Nous nous sommes donc intéressés à d'autres ligands de type PEG, les dendrons, qui sont des macromolécules largement utilisées dans le biomédical. Nous avons pu confirmer l'accroche des dendrons *via* le groupement phosphonate uniquement par IR mais les solutions aqueuses obtenues semblent stables. L'intérêt ici est également la présence d'une fonction acide en bout de chaine, favorable à des greffages ultérieurs de vecteurs en surface.

Grâce à cette partie d'hydrophilisation, nous avons pu valider deux lots de nanoparticules pour la suite des études biologiques : $NaYF_4$: $20\%Yb^{3+}$, $2\%Tm^{3+}$@$NaYF_4$@PEG-phosphate et $NaYF_4$: $20\%Yb^{3+}$, $2\%Tm^{3+}$@ $NaYF_4$@dendron. Ces voies d'hydrophilisation sont cependant à améliorer afin d'obtenir des suspensions stables dans le temps.

L'étude de cytotoxicité a ensuite été réalisée sur des cellules LNCaP, lignées exprimant l'antigène surexprimé dans le cas du cancer de la prostate. Ces tests ont permis de montrer la faible toxicité des deux types de UCNPs. Les expositions *in vitro* des nano-objets dans les cultures cellulaires ont permis d'évaluer une apoptose importante des cellules à partir de concentrations de 1000 µg/mL. A titre comparatif, les UCNPs@PEG-phosphate sont moins toxiques que les UCNPs@dendron.

La biodistribution des nanoparticules *in vitro* a été évaluée et montrent que les UCNPs, quel que soit l'enrobage, sont localisées au contact de la membrane plasmique, à l'extérieur des cellules. Les UCNPs n'ont pas de ciblage spécifique, ce qui est cohérent pour des UCNPs hydrophiles et non vectorisées.

Les études *in vivo* ont été réalisées avec un équipement IVIS SPECTRUM® que nous avons modifié préalablement. En effet, cet appareil, destiné à réaliser de l'imagerie par fluorescence ou bioluminescence sur le petit animal, n'était pas adapté à l'excitation de nos UCNPs. Pour cela, nous avons implémenté dans le système un laser émettant à 980 nm. En outre, un système de filtres à l'excitation (passe-bande) et à l'émission (Notch) a permis d'optimiser l'installation afin d'éviter un maximum le bruit de fond du laser.

Grâce à cette installation, nous avons pu valider notre concept et également déterminer les limites de la technique. Tout d'abord il est possible d'imager de faibles quantités de UCNPs injectées en sous-cutané sous de faibles puissances laser (jusqu'à 1,5µg avec une puissance de 51 mW/cm²). De plus, nous avons pu évaluer l'atténuation des tissus grâce à une injection en intramusculaire. Cependant, l'atténuation des tissus n'empêche pas la visualisation des UCNPs. Concernant les limitations de l'appareil, la surface couverte par le laser et son inhomogénéité en terme de puissance sont les deux points les plus limitants. En effet, la surface irradiée n'est pas plus large que 2 cm et impose un positionnement manuel de la souris dans le système ce qui induit une zone d'intérêt irradiée de faible taille.

L'analyse de la biodistribution et de l'élimination des UCNPs@dendron a ensuite été effectuée. Cette partie de l'étude a permis de montrer dans un premier temps les capacités de l'appareil. Il est alors possible d'imager *in vivo* les organes peu soumis au phénomène d'atténuation des tissus et où la concentration en UCNPs est importante, tels que le foie et les poumons. Nous avons ainsi pu évaluer *in vivo* les organes d'accumulation et les durées d'élimination. Cependant, après sacrifice des souris et imagerie des organes *ex vivo*, nous avons visualisé les UCNPs dans d'autres organes tels que la rate, l'estomac et les reins. Cette étude des organes pris séparément a permis de mieux évaluer la biodistribution et les modes d'élimination. En effet, après injection, les UCNPs@dendron s'accumulent dans les poumons, le foie et la rate. La quantité présente dans les poumons ne va pas diminuer mais aucun effet secondaire n'a été reporté. Le foie et la rate voient, quant à eux, leur quantité de UCNPs diminuer au cours du temps. Les voies d'élimination semblent être digestive et rénale.

Par ailleurs, nous avons testé la biodistribution des UCNPs@dendron dans des souris présentant des tumeurs de mélanome. Ces essais ont permis de montrer que les nano-objets peuvent être facilement imagés dans des tumeurs pigmentées. De plus, la néovascularisation des tumeurs n'a pas induit de changements de comportements des UCNPs *in vivo* puisque la distribution est la même que pour des souris saines. En effet, les UCNPs se sont accumulées dans les poumons, le foie et la rate. Les UCNPs@dendron ne présentent donc pas de spécificité dans le cas de tumeur.

Enfin, nous avons étudié la biodistribution des UCNPs@PEG-phosphate dans les mêmes conditions. Celles-ci présentent la même biodistribution mais l'élimination se fait beaucoup plus rapidement (plus de UCNPs après 72 heures).

Enfin, dans le cadre d'une étude parallèle, nous nous sommes intéressés à une seconde matrice de fluorure pour des applications en upconversion : la matrice $NaLuF_4$. En effet, l'étude bibliographique a montré que cette matrice possède des intensités de luminescence supérieures à son homologue $NaYF_4$ pour les même taux de dopage en ions de terres rares.

La synthèse de $NaLuF_4$ a été réalisée par décomposition thermique grâce à la synthèse utilisée précédemment pour $NaYF_4$. Malheureusement, cette voie de synthèse n'a pas permis d'obtenir des NPs sphériques, de taille et de morphologie contrôlées. Malgré des essais de changement des paramètres de synthèse (température, temps…), nous n'avons pas pu obtenir les caractéristiques structurales et morphologiques pour poursuivre avec ce composé. Cependant, l'étude des propriétés optiques a bien permis de confirmer l'intérêt de cette matrice pour la fluorescence par upconversion, puisque les intensités d'émissions obtenus augmentent d'un facteur 2 à 9 selon les transitions observées.

Toutefois, la présence de Lutécium au sein de la matrice nous a permis de réaliser des premiers essais par imagerie tomographique par rayons X, puisque le Lutécium présente une forte absorbance des rayons X. les premiers essais ont permis d'imager les UCNPs de $NaLuF_4$ et ont donc mis en avant le potentiel d'imagerie multimodal pour un même nano-objet. Cette partie est cependant à développer mais ouvre la voie à des UCNPs multimodales permettant ainsi de réaliser un diagnostic grâce à deux techniques d'imagerie.

Ce travail de thèse est encore à développer grâce à l'amélioration des propriétés optiques et chimiques des UCNPs présentées ici.

Tout d'abord, l'aboutissement de la synthèse des NPs de $NaLuF_4$ permettrait à la fois d'améliorer les propriétés optiques des UCNPs et également d'envisager de coupler l'imagerie par fluorescence avec la tomographie par rayons X. Nous pouvons également imager des structures de type cœur/coquille $NaLuF_4 : 20\%Yb^{3+}$, $2\%Tm^{3+}$@ $NaLuF_4$ (ou $NaYF_4$) afin d'obtenir les meilleurs rendements de luminescence.

En outre, l'hydrophilisation sera le point crucial à faire évoluer afin d'obtenir des suspensions plus stables. Cette partie pourra ainsi reprendre les procédés d'enrobage par les dendrons en faisant varier différents paramètres d'enrobages par exemple.

Concernant l'imagerie, le développement de l'appareil IVIS SPECTRUM est encore à améliorer comme nous avons pu le voir dans le chapitre V. Cette partie permettrait ainsi de mettre en valeur le concept des UCNPs pour le diagnostic.

Enfin, le projet n'a malheureusement pas permis d'aboutir à la vectorisation des nano-objets les plus prometteurs à savoir $NaYF_4$: 20%Yb^{3+}, 2%Tm^{3+}@ $NaYF_4$@dendron. Ce sujet n'a ainsi pas pu valider le potentiel des UCNPs dans le cas du diagnostic du cancer de la prostate. Cette partie, encore en cours d'étude permettrait de venir fixer le DCL sur les dendrons par un couplage peptidique. Les UCNPs alors vectorisées seront testées *in vitro* sur les cellules LNCaP et *in vivo* sur des souris porteuses de tumeurs prostatiques. Nous pourrions ainsi, dans un premier temps, comprendre les mécanismes de localisation et de fixation des UCNPs sur des cellules exprimant la PSMA et, dans un second temps, mettre en évidence de potentiels effets de concentration dans les tumeurs. L'accumulation des nano-objets vectorisés dans cette zone d'intérêt viendrait ainsi confirmer la qualité de la vectorisation.

Toutefois, l'utilisation des UCNPs pour réaliser de la thérapie n'a pas pu être développée lors de ces travaux. En effet, grâce à l'utilisation de la conversion d'un rayonnement infrarouge et ultraviolet, il est envisageable de détruire les cellules proches des UCNPs.

L'ajout de ce traitement curatif pourrait ainsi confirmer le potentiel des UCNPs pour le théranostic.

REFERENCES

1. Moghimi, S.M.*, et al.*, *Nanomedicine: current status and future prospects.* The FASEB Journal, 2005. **19**(3): p. 311-330.
2. Misra, R.*, et al.*, *Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy.* Drug Discovery Today, 2010. **15**(19–20): p. 842-850.
3. Nam, J.*, et al.*, *Surface engineering of inorganic nanoparticles for imaging and therapy.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2012.
4. *Definition of a nanomaterial.* Journal officiel de la commission de l'Union Européenne, 2011.
5. Buzea, C.*, et al.*, *Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity.* Biointerphases, 2007. **2**(4): p. MR17-MR71.
6. McNeil, S.E., *Nanotechnology for the biologist.* Journal of Leukocyte Biology, 2005. **78**(3): p. 585-594.
7. Ghosh Chaudhuri, R.*, et al.*, *Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications.* Chemical Reviews, 2012. **112**(4): p. 2373-2433.
8. Adumeau, P., *Nano-sondes hybrides luminescentes pour la détection du cancer de la prostate*, in *Thèse de doctorat*. 2014.
9. Gratton, S.E.A.*, et al.*, *The effect of particle design on cellular internalization pathways.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(33): p. 11613-11618.
10. Chithrani, B.D.*, et al.*, *Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells.* Nano Letters, 2006. **6**(4): p. 662-668.
11. Huang, X.*, et al.*, *The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function.* Biomaterials, 2010. **31**(3): p. 438-448.
12. Albanese, A.*, et al.*, *The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems.* Annual Review of Biomedical Engineering, 2012. **14**(1): p. 1-16.
13. Debbage, P.*, et al.*, *Molecular imaging with nanoparticles: giant roles for dwarf actors.* Histochemistry and Cell Biology, 2008. **130**(5): p. 845-875.
14. Sinha, R.*, et al.*, *Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery.* Molecular Cancer Therapeutics, 2006. **5**(8): p. 1909-1917.
15. Cho, K.*, et al.*, *Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer.* Clinical Cancer Research, 2008. **14**(5): p. 1310-1316.
16. Janib, S.M.*, et al.*, *Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2010. **62**(11): p. 1052-1063.
17. Ahmed, N.*, et al.*, *Theranostic applications of nanoparticles in cancer.* Drug Discovery Today, 2012. **17**(17–18): p. 928-934.
18. Lammers, T.*, et al.*, *Theranostic Nanomedicine.* Accounts of Chemical Research, 2011. **44**(10): p. 1029-1038.
19. Xie, J.*, et al.*, *Nanoparticle-based theranostic agents.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2010. **62**(11): p. 1064-1079.
20. Liu, G.*, et al.*, *Applications and Potential Toxicity of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles.* Small, 2013. **9**(9-10): p. 1533-1545.
21. Cole, A.J.*, et al.*, *Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles.* Trends in Biotechnology, 2011. **29**(7): p. 323-332.
22. De Leeuw, J.*, et al.*, *Liposomes in dermatology today.* Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2009. **23**(5): p. 505-516.

23. Fenske, D.B.*, et al.*, *Liposomal Nanomedicines: An Emerging Field.* Toxicologic Pathology, 2008. **36**(1): p. 21-29.

24. Wang, X.*, et al.*, *Application of Nanotechnology in Cancer Therapy and Imaging.* CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2008. **58**(2): p. 97-110.

25. Torchilin, V.P., *Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives.* Pharmaceutical Research, 2007. **24**(1): p. 1-16.

26. Koo, O.M.*, et al.*, *Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review.* Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2005. **1**(3): p. 193-212.

27. Kumari, A.*, et al.*, *Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. **75**(1): p. 1-18.

28. Müller, R.H.*, et al.*, *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000. **50**(1): p. 161-177.

29. Abdel-Mottaleb, M.M.A.*, et al.*, *In vitro drug release mechanism from lipid nanocapsules (LNC).* International Journal of Pharmaceutics, 2010. **390**(2): p. 208-213.

30. Liu, Z.*, et al.*, *Nano-Carbons as Theranostics.* Theranostics, 2012. **2**(3): p. 235-237.

31. Shi, J.*, et al.*, *A fullerene-based multi-functional nanoplatform for cancer theranostic applications.* Biomaterials, 2014. **35**(22): p. 5771-5784.

32. Chen, Z.*, et al.*, *Applications of Functionalized Fullerenes in Tumor Theranostics.* Theranostics, 2012. **2**(3): p. 238-250.

33. Dellinger, A.*, et al.*, *Application of fullerenes in nanomedicine: an update.* Nanomedicine, 2013. **8**(7): p. 1191-1208.

34. Shen, H.*, et al.*, *Biomedical Applications of Graphene.* Theranostics, 2012. **2**(3): p. 283-294.

35. Yang, S.-T.*, et al.*, *Pharmacokinetics, Metabolism and Toxicity of Carbon Nanotubes for Biomedical Purposes.* Theranostics, 2012. **2**(3): p. 271-282.

36. Hampel, S.*, et al.*, *Carbon nanotubes filled with a chemotherapeutic agent: a nanocarrier mediates inhibition of tumor cell growth.* Nanomedicine, 2008. **3**(2): p. 175-182.

37. Magrez, A.*, et al.*, *Cellular Toxicity of Carbon-Based Nanomaterials.* Nano Letters, 2006. **6**(6): p. 1121-1125.

38. Lam, C.-w.*, et al.*, *A Review of Carbon Nanotube Toxicity and Assessment of Potential Occupational and Environmental Health Risks.* Critical Reviews in Toxicology, 2006. **36**(3): p. 189-217.

39. Panessa-Warren, B.J.*, et al.*, *Biological cellular response to carbon nanoparticle toxicity.* Journal of Physics: Condensed Matter, 2006. **18**(33): p. S2185.

40. Murphy, C.J.*, et al.*, *Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging.* Accounts of Chemical Research, 2008. **41**(12): p. 1721-1730.

41. Mukherjee, S.*, et al.*, *Potential Theranostics Application of Bio-Synthesized Silver Nanoparticles (4-in-1 System).* Theranostics, 2014. **4**(3): p. 316-335.

42. Goel, S.*, et al.*, *Synthesis and Biomedical Applications of Copper Sulfide Nanoparticles: From Sensors to Theranostics.* Small, 2014. **10**(4): p. 631-645.

43. Yoo, D.*, et al.*, *Theranostic Magnetic Nanoparticles.* Accounts of Chemical Research, 2011. **44**(10): p. 863-874.

44. Ho, Y.-P.*, et al.*, *Quantum dot-based theranostics.* Nanoscale, 2010. **2**(1): p. 60-68.

45. Gao, X.*, et al.*, *In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots.* Nat Biotech, 2004. **22**(8): p. 969-976.

46. Smith, A.M.*, et al.*, *Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2008. **60**(11): p. 1226-1240.

47. Seve, A., *Optimisation de nanoparticules multifonctionnelles pour une amélioration de l'efficacité photodynamique, de la sélectivité tumorale et de la détection par IRM.* Thèse de doctorat, 2013.

48. Ferrari, M., *Cancer nanotechnology: opportunities and challenges.* Nature Reviews Cancer, 2005. **5**(3): p. 161-171.

49. Matsumura, Y.*, et al.*, *Involvement of the Kinin-generating Cascade in Enhanced Vascular Permeability in Tumor Tissue.* Japanese Journal of Cancer Research, 1988. **79**(12): p. 1327-1334.

50. Barreto, J.A.*, et al.*, *Nanomaterials: Applications in Cancer Imaging and Therapy.* Advanced Materials, 2011. **23**(12): p. H18-H40.

51. Irvine, D.J., *Drug delivery: One nanoparticle, one kill.* Nat Mater, 2011. **10**(5): p. 342-343.

52. Ghosh, A.*, et al.*, *Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer.* Journal of Cellular Biochemistry, 2004. **91**(3): p. 528-539.

53. Liu, H.*, et al.*, *Constitutive and Antibody-induced Internalization of Prostate-specific Membrane Antigen.* Cancer Research, 1998. **58**(18): p. 4055-4060.

54. Chang, S.S.*, et al.*, *Five Different Anti-Prostate-specific Membrane Antigen (PSMA) Antibodies Confirm PSMA Expression in Tumor-associated Neovasculature.* Cancer Research, 1999. **59**(13): p. 3192-3198.

55. Sanna, V.*, et al.*, *Targeted Biocompatible Nanoparticles for the Delivery of (−)-Epigallocatechin 3-Gallate to Prostate Cancer Cells.* Journal of Medicinal Chemistry, 2011. **54**(5): p. 1321-1332.

56. Vogel, A.*, et al.*, *Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues.* Chemical Reviews, 2003. **103**(2): p. 577-644.

57. Montcuquet, A.-S., *Imagerie spectrale pour l'étude de structures profondes par tomographie optique diffusive de fluorescence.* Thèse de doctorat, 2011.

58. Wagnieres, G.A.*, et al.*, *In Vivo Fluorescence Spectroscopy and Imaging for Oncological Applications.* Photochemistry and Photobiology, 1998. **68**(5): p. 603-632.

59. Frangioni, J.V., *In vivo near-infrared fluorescence imaging.* Current Opinion in Chemical Biology, 2003. **7**(5): p. 626-634.

60. Chudakov, D.M.*, et al.*, *Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues.* Physiological Reviews, 2010. **90**(3): p. 1103-1163.

61. Burns, A.*, et al.*, *Fluorescent core-shell silica nanoparticles: towards "Lab on a Particle" architectures for nanobiotechnology.* Chemical Society Reviews, 2006. **35**(11): p. 1028-1042.

62. Jiang, S.*, et al.*, *Optical imaging-guided cancer therapy with fluorescent nanoparticles*. Vol. 7. 2010. 3-18.

63. Cotton, S., *Lanthanide and actinide chemistry.* 2006.

64. Bünzli, J.-C.G.*, et al.*, *Lanthanide-Containing Molecular and Supramolecular Polymetallic Functional Assemblies.* Chemical Reviews, 2002. **102**(6): p. 1897-1928.

65. Moore, E.G.*, et al.*, *From Antenna to Assay: Lessons Learned in Lanthanide Luminescence.* Accounts of Chemical Research, 2009. **42**(4): p. 542-552.

66. Auzel, F., *Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids.* Chemical Reviews, 2004. **104**(1): p. 139-174.

67. Bloembergen, N., *Solid State Infrared Quantum Counters.* Physical Review Letters, 1959. **2**(3): p. 84-85.

68. Auzel, F., *Materials and devices using double-pumped-phosphors with energy transfer.* Proceedings of the IEEE, 1973. **61**(6): p. 758-786.

69. Wang, M.*, et al.*, *Upconversion nanoparticles: synthesis, surface modification and biological applications.* Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2011. **7**(6): p. 710-729.

70. Chivian, J.S.*, et al.*, *The photon avalanche: A new phenomenon in Pr^{3+}- based infrared quantum counters.* Applied Physics Letters, 1979. **35**(2): p. 124-125.

71. Wang, F.*, et al.*, *Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals.* Chemical Society Reviews, 2009. **38**(4): p. 976-989.

72. Bol, A.A.*, et al.*, *On the Incorporation of Trivalent Rare Earth Ions in II−VI Semiconductor Nanocrystals.* Chemistry of Materials, 2002. **14**(3): p. 1121-1126.

73. Fedorov, P.P.*, et al.*, *Nanofluorides.* Journal of Fluorine Chemistry, 2011. **132**(12): p. 1012-1039.

74. Zijlmans, H.J.M.A.A.*, et al.*, *Detection of Cell and Tissue Surface Antigens Using Up-Converting Phosphors: A New Reporter Technology.* Analytical Biochemistry, 1999. **267**(1): p. 30-36.

75. Thoma, R.E.*, et al.*, *Phase Equilibria in the System Sodium Fluoride-Yttrium Fluoride.* Inorganic Chemistry, 1963. **2**(5): p. 1005-1012.

76. Thoma, R.E.*, et al.*, *The Sodium Fluoride-Lanthanide Trifluoride Systems.* Inorganic Chemistry, 1966. **5**(7): p. 1222-1229.

77. Wang, F.*, et al.*, *Simultaneous phase and size control of upconversion nanocrystals through lanthanide doping.* nature, 2010. **463**: p. 1061-1065.

78. Krämer, *Hexagonal Sodium Yttrium Fluoride Based Green and Blue Emitting Upconversion Phosphors.* Chem. Mater. , 2004. **16**: p. 1244-1251.

79. Liu, C.*, et al.*, *Monodisperse, size-tunable and highly efficient β-$NaYF_4$:Yb,Er(Tm) up-conversion luminescent nanospheres: controllable synthesis and their surface modifications.* Journal of Materials Chemistry, 2009. **19**(21): p. 3546-3553.

80. Martin, N.*, et al.*, *Optical spectra and analysis of Pr^{3+} in β-$NaYF_4$.* Journal of Alloys and Compounds, 1998. **275–277**: p. 304-306.

81. Wang, L.*, et al.*, *Controlled Synthesis and Luminescence of Lanthanide Doped $NaYF_4$ Nanocrystals.* Chemistry of Materials, 2007. **19**(4): p. 727-734.

82. Ma, D.*, et al.*, *One-dimensional hexagonal-phase $NaYF_4$: Controlled synthesis, self-assembly, and morphology-dependent up-conversion luminescence properties.* CrystEngComm, 2010. **12**(5): p. 1650-1658.

83. Mao, C.*, et al.*, *Simultaneous Morphology Control and Upconversion Fluorescence Enhancement of $NaYF_4$:Yb,Er Crystals through Alkali Ions Doping.* Chemical Engineering Journal, 2013(0).

84. Yi, G.*, et al.*, *Synthesis, Characterization, and Biological Application of Size-Controlled Nanocrystalline $NaYF_4$:Yb,Er Infrared-to-Visible Up-Conversion Phosphors.* Nano Letters, 2004. **4**(11): p. 2191-2196.

85. Jingning, S.*, et al.*, *A single-step synthesis and the kinetic mechanism for monodisperse and hexagonal-phase $NaYF_4$:Yb, Er upconversion nanophosphors.* Nanotechnology, 2009. **20**(27): p. 275603.

86. Ye, X.*, et al.*, *Morphologically controlled synthesis of colloidal upconversion nanophosphors and their shape-directed self-assembly.* 2010.

87. Mai, H.-X.*, et al.*, *Size- and Phase-Controlled Synthesis of Monodisperse $NaYF_4$:Yb,Er Nanocrystals from a Unique Delayed Nucleation Pathway Monitored with Upconversion Spectroscopy.* J. Phys. Chem. , 2007. **111**: p. 13730-13739.

88. Mai, H.-X.*, et al.*, *High-Quality Sodium Rare-Earth Fluoride Nanocrystals: Controlled Synthesis and Optical Properties.* Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(19): p. 6426-6436.

89. Zhengquan, L.*, et al.*, *An efficient and user-friendly method for the synthesis of hexagonal-phase $NaYF_4$:Yb, Er/Tm nanocrystals with controllable shape and upconversion fluorescence.* Nanotechnology, 2008. **19**(34): p. 345606.

90. Wang, J.*, et al.*, *Phase transition, size control and color tuning of $NaREF_4:Yb^{3+}$, Er^{3+} (RE = Y, Lu) nanocrystals.* Nanoscale, 2013. **5**(8): p. 3412-3420.

91. Li, Z.*, et al.*, *Multicolor Core/Shell-Structured Upconversion Fluorescent Nanoparticles.* Advanced Materials, 2008. **20**(24): p. 4765-4769.

92. Dai, Y.*, et al.*, *Doxorubicin conjugated $NaYF4:Yb^{3+}/Tm^{3+}$ nanoparticles for therapy and sensing of drug delivery by luminescence resonance energy transfer.* Biomaterials, 2012. **33**(33): p. 8704-8713.

93. Abdul Jalil, R.*, et al.*, *Biocompatibility of silica coated $NaYF_4$ upconversion fluorescent nanocrystals.* Biomaterials, 2008. **29**(30): p. 4122-4128.

94. Xing, H.*, et al.*, *Multifunctional nanoprobes for upconversion fluorescence, MR and CT trimodal imaging.* Biomaterials, 2012. **33**(4): p. 1079-1089.

95. Solé, J.G., *An Introduction to the Optical Spectroscopy of Inorganic Solids.* 2005: p. 188.

96. Wang, C., *Upconversion Multicolor Fine-Tuning: Visible to Near-Infrared Emission from Lanthanide-Doped $NaYF_4$ Nanoparticles.* J. AM. CHEM. SOC. , 2008. **130**: p. 5642–5643.

97. Suyver, J.F.*, et al.*, *Upconversion spectroscopy and properties of $NaYF_4$ doped with Er^{3+}, Tm^{3+} and/or Yb^{3+}.* Journal of Luminescence, 2006. **117**(1): p. 1-12.

98. Cao, B.S.*, et al.*, *Upconversion properties of Er^{3+}–Yb^{3+} : $NaYF_4$ phosphors with a wide range of Yb^{3+} concentration.* Journal of Luminescence, 2013. **135**(0): p. 128-132.

99. Gao, D.*, et al.*, *Yb^{3+}/Er^{3+} codoped β-$NaYF_4$ microrods: Synthesis and tuning of multicolor upconversion.* Journal of Alloys and Compounds, 2013. **554**(0): p. 395-399.

100. Liu, Y.*, et al.*, *Synthesis of biocompatible uniform $NaYF_4:Yb^{3+},Er^{3+}$ nanocrystals and their characteristic photoluminescence.* Journal of Luminescence, 2012. **132**(11): p. 3042-3047.

101. Cao, B.S.*, et al.*, *Investigation of near-infrared-to-ultraviolet upconversion luminescence of Tm^{3+} doped $NaYF_4$ phosphors by Yb^{3+} codoping.* Materials Chemistry and Physics, 2013. **142**(1): p. 333-338.

102. Huang, W.*, et al.*, *Uniform $NaYF_4$:Yb, Tm hexagonal submicroplates: Controlled synthesis and enhanced UV and blue upconversion luminescence.* Materials Research Bulletin, 2013. **48**(2): p. 300-304.

103. Zhang, Y.Y.*, et al.*, *Sensitized deep-ultraviolet up-conversion emissions of Gd^{3+} via Tm^{3+} and Yb^{3+} in hexagonal $NaYF_4$ nanorods.* Applied Physics B, 2009. **98**(2-3): p. 243-247.

104. Chen, G.*, et al.*, *Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics.* Chemical Reviews (Washington, DC, United States), 2014. **114**(10): p. 5161-5214.

105. Gao, S.-H.*, et al.*, *Synthesis of $NaYF_4:Yb^{3+},Er^{3+}@NaGdF^4@TaO_x$ Multimodal Nanoprobe for Bioimaging Applications.* Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013. **41**(6): p. 811-816.

106. Dong, C.*, et al.*, *Cation Exchange: A Facile Method To Make $NaYF_4$:Yb,Tm-$NaGdF_4$ Core–Shell Nanoparticles with a Thin, Tunable, and Uniform Shell.* Chemistry of Materials, 2012. **24**(7): p. 1297-1305.

107. Hai, G.*, et al.*, *Seed-mediated synthesis of $NaYF_4$:Yb, Er / $NaGdF_4$ nanocrystals with improved upconversion fluorescence and MR relaxivity.* Nanotechnology, 2010. **21**(12): p. 125602.

108. Jiang, G.*, et al.*, *An Effective Polymer Cross-Linking Strategy To Obtain Stable Dispersions of Upconverting $NaYF_4$Nanoparticles in Buffers and Biological Growth Media for Biolabeling Applications.* Langmuir, 2012. **28**(6): p. 3239-3247.

109. Wang, Y.*, et al.*, *Upconversion Luminescence of β-NaYF4: Yb^{3+}, Er^{3+}@β-$NaYF_4$ Core/Shell Nanoparticles: Excitation Power Density and Surface Dependence.* The Journal of Physical Chemistry C, 2009. **113**(17): p. 7164-7169.

110. Yi, G.-S.*, et al.*, *Water-Soluble $NaYF_4$:Yb,Er(Tm)/$NaYF_4$/Polymer Core/Shell/Shell Nanoparticles with Significant Enhancement of Upconversion Fluorescence.* Chemistry of Materials, 2007. **19**(3): p. 341-343.

111. Chen, M.*, et al.*, *Facile one-pot synthesis of hydrophilic $NaYF_4$:Yb,Er@$NaYF_4$:Yb active-core/active-shell nanoparticles with enhanced upconversion luminescence.* Materials Letters, 2013(0).

112. Chen, X.*, et al.*, *Preparation and photodynamic therapy application of $NaYF_4$:Yb, Tm-$NaYF_4$:Yb, Er multifunctional upconverting nanoparticles.* New Journal of Chemistry, 2013. **37**(6): p. 1782-1788.

113. Boyer, J.-C.*, et al.*, *Two-Way Photoswitching Using One Type of Near-Infrared Light, Upconverting Nanoparticles, and Changing Only the Light Intensity.* Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(44): p. 15766-15772.

114. Shen, J.-W.*, et al.*, *Incorporation of Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging Function into $NaYF_4$:Yb/Tm Upconversion Nanoparticles for in Vivo Trimodal Bioimaging.* Analytical Chemistry, 2013. **85**(24): p. 12166-12172.

115. Bogdan, N.*, et al.*, *Synthesis of Ligand-Free Colloidally Stable Water Dispersible Brightly Luminescent Lanthanide-Doped Upconverting Nanoparticles.* Nano Letters, 2011. **11**(2): p. 835-840.

116. Kumar, R.*, et al.*, *Combined Optical and MR Bioimaging Using Rare Earth Ion Doped $NaYF_4$ Nanocrystals.* Advanced Functional Materials, 2009. **19**(6): p. 853-859.

117. Chen Z.*, et al.*, *Versatile Synthesis Strategy for Carboxylic Acid-functionalized Upconverting Nanophosphors as Biological Labels.* J. AM. CHEM. SOC., 2008. **130**: p. 3023-3029.

118. Hu, H.*, et al.*, *Facile Epoxidation Strategy for Producing Amphiphilic Up-Converting Rare-Earth Nanophosphors as Biological Labels.* Chemistry of Materials, 2008. **20**(22): p. 7003-7009.

119. Sukhorukov, G.B.*, et al.*, *Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles.* Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1998. **137**(1–3): p. 253-266.

120. Wang, L., *et al.*, *Fluorescence Resonant Energy Transfer Biosensor Based on Upconversion-Luminescent Nanoparticles.* Angewandte Chemie International Edition, 2005. **44**(37): p. 6054-6057.

121. Cheng, L., *et al.*, *Highly-sensitive multiplexed in vivo imaging using pegylated upconversion nanoparticles.* Nano Research, 2010. **3**(10): p. 722-732.

122. Johnson, N.J.J., *et al.*, *Facile ligand-exchange with polyvinylpyrrolidone and subsequent silica coating of hydrophobic upconverting β-$NaYF_4$:Yb^{3+}/Er^{3+} nanoparticles.* Nanoscale, 2010. **2**(5): p. 771.

123. Liu, P., *et al.*, *Synthesis and up-conversion photoluminescence properties of NaYF4:Yb^{3+}, Er^{3+}@sSiO_2@mSiO_2 nanoparticles.* Optical Materials, 2013(0).

124. Xiong, L., *et al.*, *Long-term in vivo biodistribution imaging and toxicity of polyacrylic acid-coated upconversion nanophosphors.* Biomaterials, 2010. **31**(27): p. 7078-7085.

125. Boyer, J.-C., *et al.*, *Surface Modification of Upconverting $NaYF_4$ Nanoparticles with PEG−Phosphate Ligands for NIR (800 nm) Biolabeling within the Biological Window.* Langmuir, 2010. **26**(2): p. 1157-1164.

126. Peng, H.-Y., *et al.*, *Sequential growth of sandwiched $NaYF_4$:Yb/Er@$NaYF_4$:Yb@$NaNdF_4$:Yb core–shell–shell nanoparticles for photodynamic therapy.* Applied Surface Science, 2015.

127. Ming, Z., *et al.*, *Synthesis and characterization of monodisperse ultra-thin silica-coated magnetic nanoparticles.* Nanotechnology, 2008. **19**(8): p. 085601.

128. Koole, R., *et al.*, *On the Incorporation Mechanism of Hydrophobic Quantum Dots in Silica Spheres by a Reverse Microemulsion Method.* Chemistry of Materials, 2008. **20**(7): p. 2503-2512.

129. Selvan, S.T., *et al.*, *Robust, Non-Cytotoxic, Silica-Coated CdSe Quantum Dots with Efficient Photoluminescence.* Advanced Materials, 2005. **17**(13): p. 1620-1625.

130. Ding, H.L., *et al.*, *Fe_3O_4@SiO_2 Core/Shell Nanoparticles: The Silica Coating Regulations with a Single Core for Different Core Sizes and Shell Thicknesses.* Chemistry of Materials, 2012. **24**(23): p. 4572-4580.

131. Golander, C.G.H., J. N.; Lim, K.; Claesson, P.; Andrade, J. D., *Polyethylene Glycol Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications.* 1992.

132. Diamente, P., *et al.*, *Water-Soluble Ln^{3+}-Doped LaF_3 Nanoparticles: Retention of Strong Luminescence and Potential as Biolabels.* Journal of Fluorescence, 2005. **15**(4): p. 543-551.

133. Traina, C.A., *et al.*, *A Modular Monolayer Coating Enables Cell Targeting by Luminescent Yttria Nanoparticles.* Bioconjugate Chemistry, 2009. **20**(3): p. 437-439.

134. Traina, C.A., *et al.*, *Surface Modification of Y_2O_3 Nanoparticles.* Langmuir, 2007. **23**(18): p. 9158-9161.

135. Lee, C.C., *et al.*, *Designing dendrimers for biological applications.* Nat Biotech, 2005. **23**(12): p. 1517-1526.

136. Love, C.S., *et al.*, *Dendron-stabilised gold nanoparticles: generation dependence of core size and thermal stability.* Journal of Materials Chemistry, 2004. **14**(5): p. 919-923.

137. Huang, B., *et al.*, *Dendronization of gold and CdSe/cdS (core–shell) quantum dots with tomalia type, thiol core, functionalized poly(amidoamine) (PAMAM) dendrons.* Journal of Luminescence, 2005. **111**(4): p. 215-223.

138. Gillich, T., *et al.*, *PEG-Stabilized Core–Shell Nanoparticles: Impact of Linear versus Dendritic Polymer Shell Architecture on Colloidal Properties and the Reversibility of Temperature-Induced Aggregation.* ACS Nano, 2013. **7**(1): p. 316-329.

139. Basly, B.*, et al.*, *Dendronized iron oxide nanoparticles as contrast agents for MRI.* Chemical Communications, 2010. **46**(6): p. 985-987.

140. Basly, B.*, et al.*, *Effect of the nanoparticle synthesis method on dendronized iron oxides as MRI contrast agents.* Dalton Transactions, 2013. **42**(6): p. 2146-2157.

141. Walter, A., *Elaboration de nano-objets magnétiques dendronisés à visée theranostic.* 2014.

142. Liu, C.*, et al.*, *Magnetic/Upconversion Fluorescent NaGdF4:Yb,Er Nanoparticle-Based Dual-Modal Molecular Probes for Imaging Tiny Tumors in Vivo.* ACS Nano, 2013. **7**(8): p. 7227-7240.

143. Walter, A.*, et al.*, *Validation of a dendron concept to tune colloidal stability, MRI relaxivity and bioelimination of functional nanoparticles.* Journal of Materials Chemistry B, 2015. **3**(8): p. 1484-1494.

144. Sun, Y., *Upconversion Nanophosphors $NaLuf_4$:Yb,Tm for Lymphatic Imaging In Vivo by Real-Time Upconversion Luminescence Imaging under Ambient Light and High-Resolution X-ray CT.* Theranostics, 2012. **3**(5): p. 346-353.

145. Shi, F.*, et al.*, *Facile synthesis of β-$NaLuF_4$: Yb/Tm hexagonal nanoplates with intense ultraviolet upconversion luminescence.* CrystEngComm, 2011. **13**(11): p. 3782-3787.

146. Liu, Q.*, et al.*, *Sub-10 nm Hexagonal Lanthanide-Doped $NaLuF_4$ Upconversion Nanocrystals for Sensitive Bioimaging in Vivo.* Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(43): p. 17122-17125.

147. Yang, T.*, et al.*, *Cubic sub-20 nm $NaLuF_4$-based upconversion nanophosphors for high-contrast bioimaging in different animal species.* Biomaterials, 2012. **33**(14): p. 3733-3742.

148. He, E.*, et al.*, *Investigation of upconversion and downconversion fluorescence emissions from β-$NaLn1F_4$:Yb^{3+}, $Ln2^{3+}$ (Ln1 = Y, Lu; Ln2 = Er, Ho, Tm, Eu) hexagonal disk system.* Materials Research Bulletin, 2013. **48**(9): p. 3505-3512.

149. Niu, N.*, et al.*, *Tunable multicolor and bright white emission of one-dimensional $NaLuF_4$:Yb^{3+},Ln^{3+} (Ln = Er, Tm, Ho, Er/Tm, Tm/Ho) microstructures.* Journal of Materials Chemistry, 2012. **22**(21): p. 10889-10899.

150. Li, C.*, et al.*, *Shape-Controllable Synthesis and Upconversion Properties of Lutetium Fluoride (Doped with Yb^{3+}/Er^{3+}) Microcrystals by Hydrothermal Process.* The Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(35): p. 13395-13404.

151. Fedorov, P.P.*, et al.*, *Coprecipitation from aqueous solutions to prepare binary fluorides.* Russian Journal of Inorganic Chemistry, 2011. **56**(10): p. 1525-1531.

152. Kuznetsov, S.V.*, et al.*, *Phase formation in LaF_3–$NaGdF_4$, $NaGdF_4$–$NaLuF_4$, and $NaLuF_4$–$NaYF_4$ systems: Synthesis of powders by co-precipitation from aqueous solutions.* Journal of Fluorine Chemistry, 2014. **161**: p. 95-101.

153. Shen, J.-W.*, et al.*, *Sub-20 nm sandwich-structured $NaGdF_4$:Yb/Tm@$NaLuF_4$:Yb/Tm@$NaYF_4$ nanocrystals for in vivo upconversion luminescence/computed tomography imaging.* RSC Advances, 2014. **4**(10): p. 5088-5091.

154. Xia, A.*, et al.*, *Gd^{3+} complex-modified $NaLuF_4$-based upconversion nanophosphors for trimodality imaging of NIR-to-NIR upconversion luminescence, X-Ray computed tomography and magnetic resonance.* Biomaterials, 2012. **33**(21): p. 5394-5405.

ANNEXES

ANNEXE A : TECHNIQUES EXPERIMENTALES DES CARACTERISATIONS

Les diffractogrammes X sur poudres ont été enregistrés à température ambiante sur un diffractomètre Philips XPert Pro, avec une anode au cuivre (λ=1.5418Å) en configuration Bragg-Brentano. L'acquisition est effectuée entre 10° et 70° en 2θ.

Les clichés MET ont été réalisés au sein du CICS de Clermont Ferrand (Centre Imagerie Cellulaire Santé). L'équipement utilisé est un microscope Hitachi H-7650 120kV avec une accélération de 80kV, combiné avec une caméra Hamamatsu AMT HR 1K×1K CCD placé dans une position latérale. Les nanoparticules sont mises en suspension dans un solvant puis déposées sur des grilles de cuivre. Après évaporation du solvant, les grilles sont imagées.

Les clichés MET haute résolution ont été réalisés grâce à un microscope Philips CM20 possédant une tension d'accélération de 200 kV. De même, les nanoparticules sont mises en suspension puis déposées sur une grille de cuivre.

Le spectromètre utilisé pour les analyses IR est un spectromètre à transformée de Fourier NICOLET 5700 dans le domaine 400-4000 cm^{-1}. Les enregistrements des spectres ont été réalisés avec une résolution spectrale de 4 cm^{-1} et un nombre d'accumulations de balayage de 32.

Les spectres d'émission par upconversion ont été enregistrés en utilisant comme source d'excitation une diode laser CNI FC-980-4W possédant un pic à 980 nm avec une puissance de faisceau réglable (0-4W). Les photons émis sont ensuite collectés à l'aide d'un monochromateur TRIAX 550 Jobin-Yvon / Horriba équipé d'une caméra CCD refroidie à l'azote liquide (Jobin-Yvon série Symphony LN2). Une puissance de faisceau d'énergie focalisé de moins de 100 mW est suffisante pour enregistrer les spectres d'émission des échantillons.

Les spectres RMN ont été enregistrés en mode de transformée de Fourier avec un spectromètre Bruker Avance 400 (^{1}H à 400 MHz, ^{13}C à 100 MHz et ^{31}P à 400 MHz) à 298K.

Les analyses par spectroscopie électronique ont été réalisées dans un bâti ultravide équipé avec un système XPS (OMICRON DAR 400 dual anode Al–Mg X-ray, source et analyseur hémisphérique d'électrons OMICRON EA125) permettant également de réaliser des analyses spectroscopiques AES (Auger Electron Spectroscopy) et SAM (Scanning Auger Microscopy). Les analyses ont été effectuées à température ambiante, avec des conditions régulées d'émission des rayons X (E = 1253,6 eV) de 16 mA et 15 kV (240W) et avec une neutralisation de charges de surface réalisée grâce à un canon à électrons (1µA, 1keV). L'analyseur hémisphérique, placé face à l'échantillon est à 55° par rapport à la source X, a été utilisé en mode d'énergie de passage constante (20eV).

Les mesures de taille des nanoparticules par DLS (Dynamic Light Scattering) ont été déterminées à l'aide d'un zétamètre Zetasizer de Malvern à température ambiante.

Les analyses de cytotoxicité ont été effectuées avec le cytomètre acoustique Attune (Life Technologies) qui est équipé comme suit :

- Laser d'excitation: Violet/Bleu à 405 nm (50 mW) et 488 nm (20 mW).
- Filtre à l'émission : BL1 530/30 (515-545), BL2 574/26 (561-588), BL3 640LP (>640),VL1 450/40 (430-470), VL2 522/31 (507-537), VL3 603/48 (579-627).

Afin de détecter la fluorescence bleue du Sytox, l'excitation à 405 nm est utilisée ainsi que le filtre VL1.

ANNEXE B : PRESENTATION ET MISE AU POINT DE L'EQUIPEMENT IVIS SPECTRUM®

1. Présentation de l'équipement IVIS SPECTRUM

Le système IVIS SPECTRUM (PerkinElmer) permet l'acquisition d'images *in vivo* chez le petit animal. Il permet à la fois l'acquisition d'images en bioluminescence (production de lumière par une enzyme tel que la luciférase) et en fluorescence. De plus, il permet de visualiser en 3 dimensions la provenance du signal de bioluminescence et de fluorescence à l'aide d'algorithmes spécifiques. Cette technique permet une imagerie non invasive, et un suivi en temps réel de l'activité cellulaire et génétique dans un organisme vivant.

L'appareil est composé d'une caméra CCD (26×26 mm²) montée au-dessus d'une chambre d'imagerie étanche à la lumière, une unité de refroidissement thermoélectrique, une source de lumière de fluorescence, une source de rayon X et son détecteur, un système informatique permettant de contrôler l'acquisition et l'analyse des données grâce à un logiciel Living Image®. La figure 94 représente schématiquement l'enceinte de l'appareil.

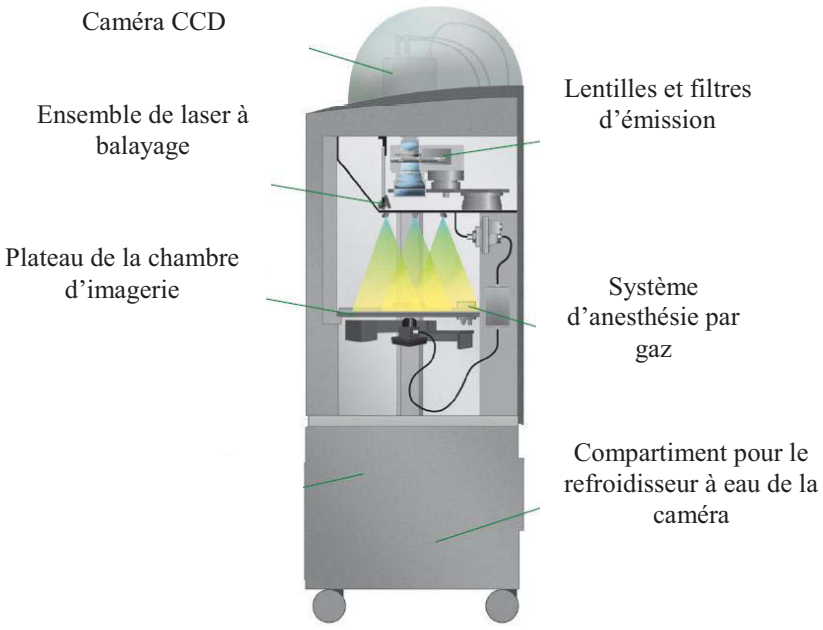


Figure 94 : Schéma de l'appareil IVIS SPECTRUM®

Le système de fluorescence est constitué d'une lampe blanche d'excitation de 150 watts, d'une fibre optique, d'une roue à filtres d'excitation puis d'un système de redistribution de la lumière incidente à l'intérieure de la boîte noire.

L'appareil est équipé de 10 filtres d'excitation de bande passante de 35 nm (de 430 à 745 nm) et de 18 filtres d'émissions espacés de 20 nm (de 500 à 840 nm). Ceux-ci permettent de séparer le signal de plusieurs sources fluorescentes ou de bioluminescences présentes dans un même signal. L'ensemble des filtres motorisés permet d'imager sans changements manuels des filtres.

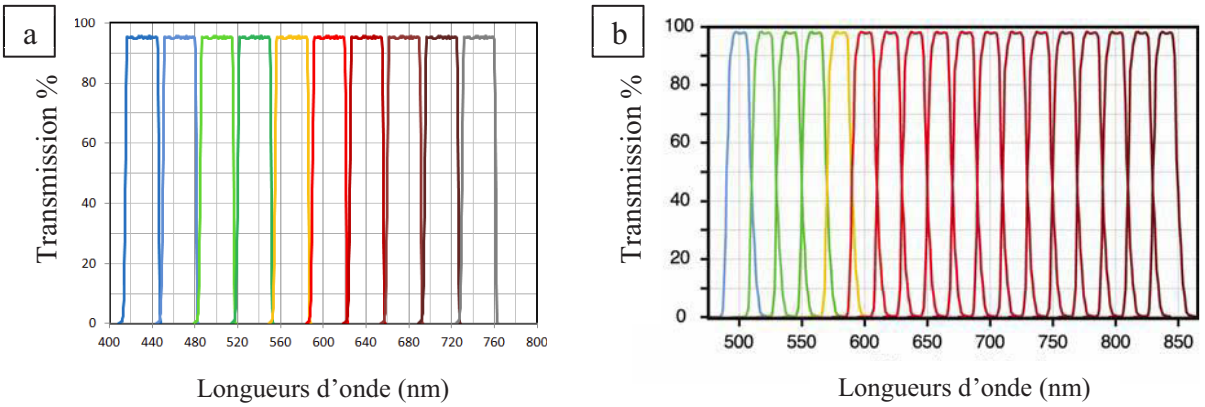


Figure 95 : (a) Spectres des filtres d'excitation (b) Spectres des filtres d'émission

Le rayonnement résiduel incident infrarouge qui vient exciter le petit animal est de faible puissance (µW/cm²). Cette puissance n'a pas été suffisante pour réaliser de l'imagerie grâce à nos UCNPs. Nous avons donc installé une diode laser à l'intérieur de l'enceinte, comme l'explique la partie suivante.

2. Modification de l'équipement

Comme vu précédemment, la puissance fournie par la lampe blanche n'est pas suffisante pour exciter nos UCNPs. L'installation d'une source d'excitation émettant dans l'infrarouge a été réalisée par Perkin Elmer.

Cette source d'excitation externe est une diode laser CNI FC-980-5W qui émet à 980 nm avec une puissance de faisceau réglable (0-5W). Un expanseur de faisceau laser a été ajouté au bout de la fibre afin d'élargir le rayonnement excitateur et d'irradier une plus grande surface. La taille de la surface est ainsi dépendante de la puissance de la diode laser.

La fibre a été insérée *via* un orifice puis fixé avec un plastique thermoglass, permettant d'assurer l'étanchéité de l'installation. A l'intérieur de l'enceinte, la fibre et son expanseur ont été entourés d'un plastique noir de manière à ne pas avoir de réflexions de la lumière qui viendrait perturber les mesures. Le tout est fixé dans l'enceinte par des clips de fixation qui permettent ainsi de venir maintenir le laser en position pour les acquisitions et également de le ranger pour ne pas déranger les autres utilisateurs (figure 96). Enfin le boitier de commande de l'alimentation et du contrôle de la puissance du laser se situe à l'extérieur de l'enceinte.



Figure 96 : Photo de l'installation de la diode laser dans l'enceinte de l'IVIS Spectrum®

3. Mise au point de l'équipement

Les premiers essais réalisés avec ce système externe ont permis de mettre en évidence plusieurs difficultés. Tout d'abord, la diode laser doit être placée le plus perpendiculairement possible par rapport au plateau. En effet, lorsque celui-ci est incliné, l'inhomogénéité du laser sur la surface irradiée est observée.

De plus, la diode laser présente un bruit de fond non négligeable. En effet, malgré la présence du filtre à l'émission de l'appareil, centré à 800 nm, le laser fourni un bruit qui se superpose au signal, notamment à forte puissance. En effet, lorsque la puissance du laser est augmentée, le rapport signal/bruit du laser diminue. Il apparait ainsi une émission qui s'étend largement au-dessus de 800nm. Cette faible émission, combinée à la forte sensibilité de l'appareil conduit alors à un signal. Nous avons donc installé un système de filtres à l'intérieur de l'appareil afin de corriger cet inconvénient.

Pour cela, deux filtres ont été installé :

- Un filtre passe bande centré à 975 nm placé à la sortie de l'expanseur
- Un filtre Notch placé à l'entrée de la caméra

Les deux spectres de ces filtres sont présentés sur la figure 97.

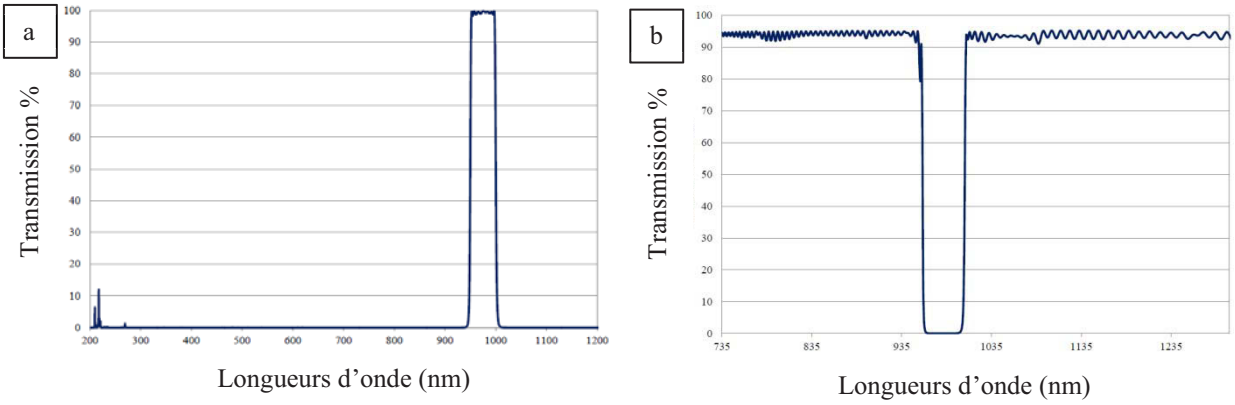


Figure 97 : (a) spectre du filtre basse bande 975 nm (b) spectre du filtre Notch

Comme nous pouvons le voir, le filtre passe bande va permettre de sélectionner la longueur d'onde d'intérêt, à savoir 980 nm. De plus, le filtre Notch, placé au niveau de la caméra CCD, va réfléchir les rayonnements de la source laser.

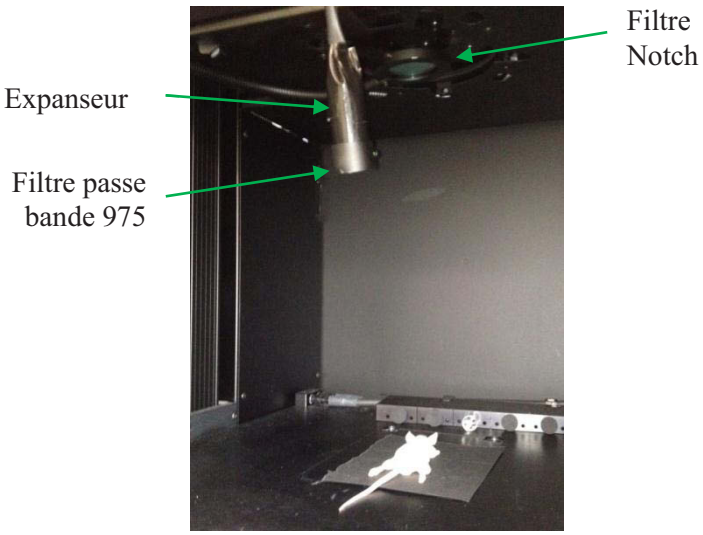


Figure 98 : photo de l'installation des filtres à l'excitation (passe bande) et à l'émission (Notch)

Cette installation a ensuite été utilisée afin de réaliser l'imagerie sur le petit animal.

Enfin, des mesures de puissance du faisceau laser ont été effectuées à l'aide d'un mesureur de puissance à photocathode thermique de 2 cm de diamètre. Ces mesures ont permis d'établir une correspondance entre l'intensité du laser par unité de surface et la puissance émise (tableau 15).

Tableau 15 : Mesure de la puissance du laser

Intensité laser (V)	Puissance mesurée (W)	Densité (mW/cm²)
0.5	0.02	4.1
1	0.15	30
1.5	0.25	51
2	0.35	71
2.5	0.42	86
3	0.6	120
3.5	0.85	170
4	1	200

Résumé

L'objectif de ces travaux de thèse repose sur la conception de nanoparticules pour l'upconversion (UCNPs) visant à réaliser de l'imagerie médicale par fluorescence. L'intérêt de ces nano-objets s'appuie sur l'excitation et l'émission conjointe dans le domaine du proche infrarouge, permettant de travailler dans la fenêtre thérapeutique des tissus.

Une première partie présente l'élaboration des nanoparticules sphériques de $NaYF_4$, dont le taux de dopage a permis de mettre en avant les conversions possibles grâce aux phénomènes optiques d'upconversion (IR → NIR, IR → visible et IR → UV). De plus, l'étude d'hydrophilisation, primordiale pour des applications médicales, a montré un fort intérêt pour l'enrobage par échange de ligands et plus particulièrement par des molécules dendritiques. Dès lors que les nano-objets ont été validés et stabilisés dans un milieu aqueux, ces derniers ont été testés *in vitro* et ont permis de montrer une cytotoxicité faible. La dernière partie a permis d'adapter l'équipement *IVIS SPECTRUM*® à nos conditions optimales d'utilisation des UCNPs. Cette installation a validé la preuve de concept de nos UCNPs *in vivo*, permettant ainsi d'être imagées chez le petit animal. Ce dispositif, encore unique en Europe ouvre ainsi la voie pour des études plus approfondies de l'utilisation des UCNPs pour la détection de tissus spécifiques, tels que les tissus tumoraux.

Mots clés : *nanoparticules, fluorescence, upconversion, hydrophilisation, toxicité, biodistribution*

Abstract

The aim of this PhD work deals with the design of upconverting nanoparticles (UCNPs) to perform medical imaging by fluorescence. The interest of these nano-objects is based on both excitation and emission in the near infrared range, allowing the work in the therapeutic window of tissue.

The first part presents the development of spherical nanoparticles of $NaYF_4$, which the doping concentration has highlighted the transitions permits through upconversion phenomena (IR → NIR, IR → visible and IR → UV). In addition, the hydrophilization part, necessary for medical application, has shown a strong interest in the coating by ligand exchange and particularly by dendritic molecules. Since the nanoparticles have been validated and stabilized in aqueous medium, they were tested *in vitro* and have shown low cytotoxicity. The last part was to adapt the IVIS SPECTRUM® equipment to our optimal conditions of use of UCNPs. This installation has validated the proof of concept of our UCNPs *in vivo*, which is to image in small animals. This device, also unique in Europe, opens the way for further use of UCNPs studies for the detection of specific tissues such as tumor tissues.

Keywords : *nanoparticles, fluorescence, upconversion, hydrophilization, toxicity, biodistribution*