

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences Chimiques

UMR 7199

THÈSE présentée par :

Mickaël CLAUDEL

soutenue le : 15 novembre 2018

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie

**Carbon dots : synthèse pour des études
toxicologiques et développement
d'outils théranostiques**

THÈSE dirigée par :

Dr. LEBEAU Luc

Directeur de Recherches, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. RICHARD Cyrille

Pr. ROUX Stéphane

Directeur de Recherches, Université Paris Descartes

Professeur, Université de Besançon

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. KLYMCHENKO Andrey

Directeur de Recherches, Université de Strasbourg

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences Chimiques

UMR 7199

THÈSE présentée par :

Mickaël CLAUDEL

soutenue le : 15 novembre 2018

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie

**Carbon dots : synthèse pour des études
toxicologiques et développement
d'outils théranostiques**

THÈSE dirigée par :

Dr. LEBEAU Luc

Directeur de Recherches, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. RICHARD Cyrille

Pr. ROUX Stéphane

Directeur de Recherches, Université Paris Descartes

Professeur, Université de Besançon

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. KLYMCHENKO Andrey

Directeur de Recherches, Université de Strasbourg

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives à la Faculté de Pharmacie d'Illkirch, au sein de l'équipe V-SAT (Vecteurs : Synthèse, Applications & Toxicologie) sous la direction du Dr. Luc Lebeau. Ce manuscrit est le fruit de trois longues années de travail qui m'ont permis d'avoir un aperçu de ce que représentait l'exigence de la recherche. Cet avant-propos est l'occasion de remercier toutes les personnes qui m'ont suivi, soutenu et encouragé.

Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de thèse, le Dr. Luc Lebeau, pour m'avoir accueilli dans son équipe dès le stage de Master 2, et de m'avoir ainsi permis d'entrer dans le monde de la recherche. Je le remercie également pour m'avoir guidé tout au long de ces années, et pour avoir contribué à la qualité des raisonnements et interprétations de ce travail. Un grand merci aussi pour ses nombreux conseils, son encadrement et pour sa patience tout au long de la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie vivement le Dr. Jean-Serge Remy, Directeur de l'UMR 7199, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Aux Docteurs et Professeurs Cyrille Richard, Stéphane Roux et Andrey Klymchenko, merci de m'avoir fait l'honneur de participer à l'évaluation de ce travail en tant qu'examineurs ou rapporteurs.

J'adresse également ma profonde reconnaissance au Professeur Françoise Pons pour sa collaboration à ce projet. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour sa disponibilité, ses conseils précieux, ainsi que pour le temps qu'elle m'a consacré et pour son aide tout au long de ce projet. Elle a contribué à rendre la biologie et la toxicologie plus attrayante et accessible.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Jiahui Fan pour sa grande contribution au projet. Les nombreux résultats et avancées acquis au cours de ces trois années de thèse n'auraient pas été aussi importants sans une personne capable de tester la grande majorité de mes particules en biologie (mesures de leur cytotoxicité et de leurs niveaux de transfection). Ses résultats ont

été d'une importance capitale dans l'évaluation des caractéristiques de mes CDs et m'ont permis d'orienter mon travail tout au long de cette thèse.

Mickaël, merci pour ton aide dans la synthèse de certaines de mes molécules/particules et pour tes conseils au quotidien.

Carole, je te remercie pour tes conseils scientifiques et ton expertise en toxicologie.

Anne, je retiendrai ta gentillesse et ta disponibilité quel que soit le problème, en particulier concernant le microscope.

Boris, je souhaite également te remercier pour ta bonne humeur, ta culture et ton ouverture d'esprit. Je te prédis une carrière brillante, tu le mérites.

Léo, tu es arrivé à la fin de ma thèse et les moments passés ensembles ont été rares. Néanmoins, je pense que certains ont été mythiques. Je te souhaite toute la réussite dont tu auras besoin.

Thomas, un petit bout d'homme comme il est rare d'en rencontrer. Tu es au top et toujours de bonne humeur. Nos soirées passées avec Maud ont vraiment été mémorables, remplies de franches rigolades et de bêtises en tout genre. Bon courage pour la suite de ta thèse avec ta salade de fruits.

Enfin, merci à toi Maud. Depuis que je t'ai rencontré, j'ai tout de suite été très proche de toi malgré les circonstances hein ☺ Je ne me l'explique toujours pas d'ailleurs. Tu as supporté mon sale caractère et ma mauvaise humeur quasi quotidienne. Tu m'as toujours soutenu et donné confiance dans les moments les plus difficiles. Tu as également su être à l'écoute et me rassurer pendant mes remises en question perpétuelles. Pour toutes ces choses essentielles pour moi et pour tous les moments passés à tes côtés, je te remercie.

Je remercie de tout cœur mes parents et ma famille, de m'avoir toujours soutenu et encouragé tout au long de mes études.

Table des matières

Introduction générale	1
Chapitre 1. Les nanoparticules	5
1.1. Quelques définitions génériques	7
1.2. Les nanoparticules environnementales	9
1.3. Les nanoparticules manufacturées	9
1.3.1. Les nanoparticules inorganiques	10
1.3.1.1. Les nanoparticules métalliques	10
1.3.1.2. Les quantum dots	12
1.3.2. Les réseaux métallo-organiques (MOFs)	14
1.3.3. Les nanoparticules organiques	15
1.3.3.1. Les nanoparticules polymériques	15
1.3.3.2. Les dendrimères	16
1.3.3.3. Les nanoparticules auto-organisées	17
1.3.4. Les nanoparticules carbonées	19
1.3.4.1. Les fullerènes	19
1.3.4.2. Les nanotubes de carbone	20
1.3.4.3. Le graphène	21
1.3.4.4. Les nanodiamants	22
1.3.4.5. Les carbon dots	23
1.4. Les nanoparticules, outils théranostiques	24
1.4.1. Les nanoparticules, des outils thérapeutiques évolutifs	24
1.4.2. Les nanoparticules, des agents thérapeutiques actifs	25
1.4.3. Nanoparticules et thérapie génique	26
1.4.4. Nanoparticules et imagerie, vers des outils de diagnostic plus performants	27
1.4.5. Agents théranostiques et nanoparticules	28
1.5. La toxicité des nanoparticules	29
Chapitre 2. Les carbon dots	31
2.1. Structure et nomenclature des carbon dots	33
2.2. Méthodes de synthèse	34
2.2.1. Approches "top-down"	34
2.2.2. Approches "bottom-up"	36
2.3. Techniques de caractérisation des carbon dots	38
2.3.1. Techniques de microscopie et de diffraction	38
2.3.2. Techniques spectroscopiques	39
2.4. Propriétés physico-chimiques des carbon dots	40
2.4.1. Propriétés optiques	40
2.4.2. Biocompatibilité et cytotoxicité	46
2.5. Applications des carbon dots	46
2.5.1. Les CDs en optoélectronique	47
2.5.2. Les CDs, photo-catalyseurs de réactions chimiques	49
2.5.3. Les CDs, détecteurs d'espèces chimiques	51
2.5.4. Les CDs dans le domaine biomédical	54
2.5.4.1. Les CDs en imagerie médicale	54
2.5.4.2. Les CDs, agents théranostiques	58

Chapitre 3. Synthèse de carbon dots pour des études modèles de la toxicité des nanoparticules	61
3.1. Contexte et objectifs	63
3.2. Optimisation de la purification des CDs	64
3.3. Optimisation des conditions de caractérisation des CDs	67
3.4. Échantillonnage des CDs	69
3.4.1. CDs synthétisés selon la voie “ <i>de novo</i> ”	70
3.4.1.1. Influence des conditions d’activation	71
3.4.1.2. Influence de la source de carbone	72
3.4.1.3. Influence de l’agent de passivation.....	74
3.4.1.4. Influence du caractère titrable ou non-titrable de l’agent de passivation	76
3.4.1.5. Incorporation de motifs PEGylés.....	77
3.4.1.6. Synthèse de CDs anioniques	79
3.4.2. Modification de CDs par post-fonctionnalisation.....	80
3.4.2.1. Variation de l’agent de fonctionnalisation.....	80
3.4.2.2. Comparaison des propriétés physico-chimiques des CDs obtenus selon les deux voies de synthèse envisagées.....	82
3.5. Évaluation des propriétés toxicologiques des éléments de la “particulothèque” et relations de structure-activité	84
Chapitre 4. Développement de carbon dots pour la délivrance de gènes	89
4.1. Contexte et objectifs	91
4.2. Optimisation de la synthèse des carbon dots pour la vectorisation d’acide nucléique ...	92
4.2.1. Influence du mode d’activation pour un mélange acide citrique/bPEI25k	93
4.2.2. Influence de la stœchiométrie des réactifs (acide citrique/bPEI25k)	95
4.2.3. Influence de l’amine utilisée comme agent de passivation.....	97
4.2.4. Influence de la stœchiométrie des réactifs (acide citrique/bPEI600).....	100
4.2.5. Influence du mode d’activation pour un mélange acide citrique/bPEI600	101
4.2.6. Influence du temps d’irradiation	104
4.2.7. Influence de la quantité de réactifs de départ	106
4.3. Caractérisations physico-chimiques des dotoplexes	108
Chapitre 5. Développement d’agents théranostiques à base de carbon dots	111
5.1. Contexte et objectifs	113
5.2. Élaboration de systèmes à base de CDs pour des applications en thérapie combinée..	114
5.2.1. Développement de plateformes synthétiques à base de CDs selon le modèle “protocell”	115
5.2.2. Développement de plateformes synthétiques à base de CDs selon le modèle covalent.....	119
5.2.3. Encapsulation de PTX dans les constructions	123
5.3. Élaboration de plateformes théranostiques à base de carbon dots.....	126
5.3.1. Optimisation des CDs pour l’imagerie par fluorescence <i>in vivo</i>	127
5.3.2. Développement de CDs pour de l’IRM	130
Conclusion générale et perspectives.....	135
Partie expérimentale	139
Références bibliographiques	157

Liste des figures

Figure 1. Comparaison de la taille des nanoparticules avec celles des principales structures chimiques et biologiques.....	8
Figure 2. Représentation schématique d'un quantum dot à base de CdSe/ZnS recouvert par de la tri-n-octylphosphine.....	13
Figure 3. Représentation schématique illustrant la théorie des bandes pour des matériaux isolants, semi-conducteurs et conducteurs.....	13
Figure 4. Représentation schématique d'un dendrimère.....	16
Figure 5. Représentation schématique de molécules amphiphiles monomériques et auto-assemblées en milieu aqueux.....	17
Figure 6. Représentation schématique d'un liposome.....	18
Figure 7. Représentation schématique d'une micelle.....	18
Figure 8. Représentation du fullerène C ₆₀	20
Figure 9. Représentation d'un nanotube de carbone mono-feuillet.....	20
Figure 10. Représentation du graphène.....	21
Figure 11. Représentation de l'oxyde de graphène.....	22
Figure 12. Représentation d'un nanodiamant.....	23
Figure 13. Synthèse de CDs par pyrolyse sous irradiation micro-onde.....	37
Figure 14. Clichés de microscopies électroniques de CDs. (A) microscopie électronique à balayage, (B) microscopie électronique en transmission à basse résolution, (C) microscopie électronique en transmission à haute résolution.....	38
Figure 15. Spectres d'absorption et d'émission de CDs par excitation à des longueurs d'onde de plus en plus élevées (intervalles de 20 nm en partant de 400 nm).....	40
Figure 16. (A) Images de quatre CDs de taille comprise entre 1,2 et 3,8 nm à la lumière du jour (à gauche) et sous lampe UV (à droite). (B) Spectres de PL correspondants : les courbes rouge, noire, verte et bleue correspondent aux émissions des CDs bleu, vert, jaune et rouge respectivement. (C) Relation entre la taille des CDs et leurs propriétés de PL. (D) Relation entre la taille des CDs et le gap énergétique HOMO-LUMO.....	41
Figure 17. Représentation schématique du mécanisme de fluorescence pour les O-CDs, N-CDs et N,S-CDs.....	42
Figure 18. Représentation schématique des différents mécanismes de PL des CDs. (A) Effet de confinement quantique. (B) PL résultant de la présence de sites spécifiques en surface capables de piéger l'énergie excitonique. (C) PL issue de la superposition de plusieurs fluorophores ou groupements fonctionnels.....	44
Figure 19. Mécanismes de transfert d'électrons photo-induits dans lesquels la nanoparticule joue le rôle d'accepteur (à gauche) ou de donneur d'électrons (à droite).....	46
Figure 20. Représentations schématiques du transfert électronique de la RhB vers le CD (A) et du rôle d'intermédiaire du CD permettant la suppression de la recombinaison des excitons (B).....	47
Figure 21. Spectres de luminescence d'une DEL bleue recouverte ou non de CDs (à gauche). Photographie d'une DEL recouverte de CDs en appliquant (au centre, en bas) ou non (au centre, en haut) une tension. Représentation des coordonnées chromatiques d'une DEL bleue illuminée recouverte ou non de CDs (à droite).....	49
Figure 22. Représentation schématique des différents mécanismes photo-catalytiques proposés pour la dégradation de molécules organiques.....	50
Figure 23. Représentation schématique du mécanisme de production de H ₂ et O ₂ à partir d'un nanocomposite CD/C ₃ N ₄	51
Figure 24. Détection d'ions Cu ²⁺ par émission duale de fluorescence mettant en jeu un complexe hybride CD/QDs.....	52
Figure 25. Représentation schématique de la synthèse de CDs à partir d'acide phénylboronique, le mécanisme de détection du glucose et les spectres de fluorescence des CDs pour différentes concentrations en glucose.....	54
Figure 26. Images de microscopie confocale de cellules incubées par des CDs. (A) À la lumière du jour. (B) Sous excitation lumineuse (460-480 nm).....	55
Figure 27. Coefficients d'absorption de différents tissus organiques en fonction de la longueur d'onde.....	56
Figure 28. Représentation schématique des propriétés théranostiques intrinsèques des CDs. Sous irradiation laser, les CDs sont capables d'émettre de la fluorescence pour de l'imagerie in vivo mais également de convertir cette énergie dans la production d'espèces chimiques réactives et/ou en chaleur.....	60
Figure 29. Élimination du PEI par dialyse. Des PEI ramifiés de différents poids moléculaires (25 kDa et 600 Da) et des membranes avec différents "cut-off" ont été utilisées. La quantité de PEI résiduel dans le sac de dialyse a été déterminé par dosage RMN d'échantillons prélevés au cours du temps.....	65

Figure 30. Résultats de mesures de DLS réalisées sur un échantillon de nanoparticules de 20 nm dans lequel on a introduit une quantité croissante de particules de 100 nm	68
Figure 31. Mesures de la taille (à gauche) et du potentiel zêta (à droite) d'un échantillon de CDs en fonction de la concentration.	68
Figure 32. Voies de synthèses étudiées pour la préparation des nanoparticules carbonées. Les carbon dots ont été synthétisés "de novo", en une étape (voie de gauche) ou ont été élaborés à partir d'une nanoparticule générique qui a ensuite fait l'objet d'une étape de post-fonctionnalisation (voie de droite).	70
Figure 33. Sélection de quelques éléments représentatifs de la chimiothèque de carbon dots constituée au cours de ce travail et utilisés ultérieurement pour des études toxicologiques.	70
Figure 34. Représentation schématique d'une mesure de potentiel zêta réalisée sur deux nanoparticules présentant une densité de charges positives en surface différente (A : faible et B : forte).	75
Figure 35. Efficacité de transfection de CDs synthétisés à partir d'un mélange acide citrique/bPEI25k (2/1, en poids) en fonction des conditions d'activation. A : Réaction solvothermale sous haute pression ($P > P_{atm}$, 180 °C) ; B : Réaction solvothermale à pression atmosphérique (P_{atm} , 100 °C) ; C : Irradiation sous micro-ondes en condition solvothermale ; D : Pyrolyse au four à micro-onde domestique (P_{atm}).	94
Figure 36. Efficacité de transfection de CDs synthétisés par pyrolyse au four à micro-onde domestique en faisant varier le rapport en poids entre l'acide citrique et le bPEI25k.	96
Figure 37. Efficacité de transfection de CDs synthétisés par pyrolyse au four à micro-onde domestique à partir d'acide citrique en faisant varier l'agent de passivation pour des rapports en poids de 2/1 et de 1/4. A : CDs produits en utilisant le bPEI25k en tant qu'agent de passivation. B : CDs produits en utilisant le bPEI600 en tant qu'agent de passivation.	98
Figure 38. Efficacité de transfection de CDs synthétisés par pyrolyse au four à micro-onde domestique en faisant varier le rapport en poids entre l'acide citrique et le bPEI600.	101
Figure 39. Efficacité de transfection de CDs synthétisés à partir d'un mélange acide citrique/bPEI600 (1/4, en poids) en fonction des conditions d'activation. A : Irradiation sous micro-ondes en condition solvothermale ; B : Pyrolyse à haute température à sec (P_{atm}) ; C : Pyrolyse au four à micro-onde domestique (P_{atm}) ; D : Réaction solvothermale ($P > P_{atm}$, 180°C).	102
Figure 40. Clichés de microscopie électronique de CDs synthétisés à partir d'un mélange acide citrique/bPEI600 (1/4, en poids) en faisant varier les conditions d'activation : a) CD1 , b) CD2 , c) CD3 , d) CD4 . Barre d'échelle : 100 nm.	103
Figure 41. Efficacité de transfection de CDs synthétisés à partir d'un mélange acide citrique/bPEI600 (1/4, en poids) en faisant varier le temps d'irradiation pour une puissance du four à micro-onde fixe (620 W). A : 90 s ; B : 105 s ; C : 120 s ; D : 170 s.	105
Figure 42. Efficacité de transfection de CDs obtenus en faisant varier la quantité en réactifs de départ. Les particules de cette série ont toutes été synthétisées à partir d'un mélange d'acide citrique et de bPEI600 (1/4, en poids). A : 0,125/0,5 g ; B : 0,25/1 g ; C : 0,5/2 g.	107
Figure 43. Influence du rapport en poids CD/ADN sur le potentiel zêta des dotoplexes. Toutes les mesures ont été réalisées pour des concentrations en dotoplexes de 70 µg/mL.	109
Figure 44. Électrophorèse sur gel d'agarose réalisée avec les dotoplexes CD3 /ADN préparés avec différents rapports en poids. Le contrôle (C) correspond à de l'ADN "nu".	109
Figure 45. Stratégies mises en jeu dans la synthèse de nanoparticules à base de CDs pour des utilisations en thérapies combinées. Voie A : NPs développées à partir d'interactions faibles. Voie B : NPs développées à partir de liaisons covalentes.	115
Figure 46. Représentation schématique de la stratégie "protocell". La surface des dotoplexes préparés avec un excès d'acide nucléique est recouverte par une bicouche lipidique qui permet le dopage d'une drogue anti-tumorale, via une insertion hydrophobe.	116
Figure 47. Comparaison de l'efficacité de transfection entre le dotoplexe (en vert) et la "protocell" (en bleu) pour différents rapports N/P. Le film lipidique enrobant la particule est composé d'un mélange 2/1 en poids de DOPE et de PP981. Le bPEI25k (en violet) est un contrôle positif (bPEI25k/ADN, 2/1 en poids).	117
Figure 48. Représentation schématique d'une structure de dotoplexes formés à partir d'agrégats de CDs positifs entre lesquels s'insèrent des acides nucléiques négatifs. A : Agrégats de nanoparticules formés à partir de rapports en poids CD/ADN faibles (< 1) autorisant une interaction avec un film lipidique cationique ; B : Agrégats de nanoparticules formés à partir de rapports en poids CD/ADN élevés (> 2) pour lesquels la répulsion électrostatique empêche l'interaction avec le film lipidique cationique.	117
Figure 49. Représentation schématique de la deuxième stratégie développée dans le cadre de l'élaboration de CDs pour des applications en thérapie combinée. La surface cationique des carbon dots est modifiée chimiquement, par un motif alkyl-PEG pour permettre le "chargement" de l'actif anti-tumoral.	119

Figure 50. Voies de synthèse des greffons utilisés pour la fonctionnalisation des carbon dots.....	120
Figure 51. Comparaison de l'efficacité de transfection de CD3 et de ses versions PEGylées. Sur ce graphe, sont représentés l'expression de luciférase (en bleu foncé et violet pour les CDs acylés avec les composés 5 et 4 , respectivement) et la viabilité cellulaire (en marron et jaune pour les CDs acylés avec les composés 5 et 4 , respectivement).	121
Figure 52. Efficacité de transfection et toxicité des CDs PEGylés préparés par la voie "de novo", et comparaison avec le bPEI25k et les CDs non PEGylés CD3	122
Figure 53. Test au MTT réalisé sur un CD (CD56), fonctionnalisé par un motif alkyl-PEG, pour lequel différentes proportions en paclitaxel (PTX) ont été incorporées (0,2 et 1 %).	124
Figure 54. (A) Déviation de l'aimantation M après application d'une onde électromagnétique du domaine des radiofréquences. (B) Relaxation de l'aimantation selon l'axe Oz (relaxation longitudinale) et dans le plan xy (relaxation transversale). (C) Image pondérée en T1 du cerveau avant (en haut) et après (en bas) administration d'un agent de contraste	131
Figure 55. Efficacité de transfection et toxicité des CDs gadoliniés.....	133

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des facteurs susceptibles d'influencer la toxicité des nanomatériaux.....	29
Tableau 2. Classification des CDs selon leur morphologie et leur structure.....	34
Tableau 3. Influence du mode d'activation sur les propriétés physico-chimiques de CDs préparés à partir d'un mélange d'acide citrique et de bPEI600 dans un rapport 1/4 en poids.	72
Tableau 4. Influence de la nature de la source carbonée sur les propriétés physico-chimiques des CDs.	73
Tableau 5. Influence de l'agent de passivation (nombre de motifs éthylèneimine décroissant) sur les propriétés physico-chimiques des CDs.	74
Tableau 6. Influence du caractère titrable ou non-titrable de l'agent de passivation sur les propriétés physico-chimiques des CDs.....	76
Tableau 7. Influence de molécules PEGylées de différentes tailles (PEG ₅₅₀ et PEG ₅₀₀₀) sur les propriétés physico-chimiques des CDs.	78
Tableau 8. Variation de l'agent de fonctionnalisation et comparaison des caractéristiques physico-chimiques des particules obtenues avec les CDs natifs.	81
Tableau 9. Comparaison des propriétés physico-chimiques des CDs obtenus selon les deux voies de synthèse envisagées : par post-fonctionnalisation (PF) de CD20 et " <i>de novo</i> ".	83
Tableau 10. Influence de la variation des conditions d'activation lors de la synthèse de CDs à partir d'un mélange acide citrique/bPEI25k (2/1, en poids) sur les propriétés de tailles et de charges des CDs.	93
Tableau 11. Influence de la variation du rapport en poids entre l'acide citrique et le bPEI25k sur les propriétés physico-chimiques des CDs synthétisés par pyrolyse au four à micro-onde domestique.....	96
Tableau 12. Influence de la variation de l'agent de passivation pour des rapports en poids de 2/1 et de 1/4 sur les propriétés physico-chimiques des CDs synthétisés à partir d'acide citrique (AC) par pyrolyse au four à micro-onde domestique.	98
Tableau 13. Influence de la variation du rapport en poids entre l'acide citrique et le bPEI600 sur les propriétés physico-chimiques de CDs synthétisés par pyrolyse au four à micro-onde domestique.	100
Tableau 14. Influence des conditions d'activation d'un mélange acide citrique/bPEI600 (1/4, en poids) sur les propriétés de tailles et de charges des CDs obtenus.....	102
Tableau 15. Influence de la variation du temps d'irradiation pour une puissance du four à micro-onde fixe (620 W) sur les propriétés de tailles et de charges des CDs.	105
Tableau 16. Caractéristiques des CDs obtenus dans notre étude de "scale-up".	107
Tableau 17. Influence des différents greffons introduits à la surface du CD sur les propriétés physico-chimiques des particules.	120
Tableau 18. Influence de l'ajout de différentes quantités de mPEG ₂₀₀₀ dans un mélange acide citrique/bPEI600 (1/4, en poids) sur les propriétés physico-chimiques des CDs obtenus.	122
Tableau 19. Influence de différents additifs organiques sur les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission des CDs ainsi que sur leur efficacité de transfection.	129
Tableau 20. Propriétés physico-chimiques des CDs gadoliniés.....	132

Liste des abréviations

Ac. citr.	Acide citrique
Ac. tartr.	Acide tartrique
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag.	Agrégats
bPEI25k	Polyéthylèneimine branché de poids moléculaire 25 kDa
bPEI2k	Polyéthylèneimine branché de poids moléculaire 2 kDa
bPEI600	Polyéthylèneimine branché de poids moléculaire 600 Da
BQ	Benzoquinone
CD	<i>Carbon dot</i>
Choline chl.	Chlorure de choline
CMC	Concentration micellaire critique
CNDs	<i>Carbon nano dots</i>
CQDs	<i>Carbon quantum dots</i>
Cy5	Cyanine 5
DEL	Diodes électroluminescentes
DETA	Diéthylènetriamine
DOPE	1,2-Dioléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphatidyléthanolamine
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
DMEA	<i>N,N</i> -Diméthyléthanolamine
DMEDA	<i>N,N</i> -Diméthyléthylènediamine
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DSCs	<i>Dye solar cells</i>
DTPA	Acide diéthylènetriamine pentaacétique
EA	Éthanolamine
EDC	1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EPR	<i>Enhanced permeability and retention (effect)</i>
FA	Formamide
FDA	<i>Food & Drug Administration</i>
GQDs	<i>Graphene quantum dots</i>
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
IC	Concentration inhibitrice
ICG	<i>Indocyanine green</i>
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LDH	Lactate déshydrogénase
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
MOFs	<i>Metal organic frameworks</i>
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
NQ	Naphtoquinone
OLEDs	Diodes électroluminescentes organiques
OSCs	<i>Organic solar cells</i>
P3HT	Poly(3-hexylthiophène)
PACA	Poly(alkylcyanoacrylate)

PBDA	dianhydride de l'acide 1,7-dibromo-3,4,9,10-pérylène-tétra-carboxylique
pCMV	<i>Plasmid Cytomegalovirus</i>
PEA	Phosphoéthanolamine
PEG	Poly(éthylène glycol)
PEHA	Pentaéthylènehexamine
PGA	Poly(acide glycolique)
PL	Photoluminescence
PLA	Poly(acide lactique)
PLGA	Poly(lactide-co-glycolide)
PMA	12-Myristate 13-acétate de phorbol
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle
PPEI-EI	Poly(propionyléthylèneimine-co-éthylèneimine)
PTX	Paclitaxel
RhB	Rhodamine B
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
siARN	<i>Small interfering</i> acide ribonucléique
Sulfo-NHS	<i>N-Hydroxysulfosuccinimide</i>
SVF	Sérum de veau fœtal
TEM	Microscopie électronique à transmission
TETA	Triéthylènetétramine
TTDDA	4,7,10-Trioxa-1,13-tridécanediamine
UV	Ultra-violet

Introduction générale

De tout temps, les nanoparticules ont été présentes dans notre environnement. Les activités terrigènes, les activités volcaniques, les feux de forêt, *etc.* ont en effet largement contribué à l'enrichissement de notre atmosphère en nanoparticules de tout genre. L'avènement de la civilisation moderne et la quête perpétuelle de l'Homme à développer de nouvelles technologies en dépit des conséquences que cela pourrait entraîner sur notre environnement et notre santé a conduit à la production d'une énorme quantité de nanoparticules dans notre atmosphère. La révolution industrielle du 18^{ème} siècle a d'ailleurs marqué un tournant dans ce sens. Dès lors, les nanoparticules sont devenues omniprésentes dans notre vie quotidienne et des chercheurs se sont petit à petit penchés sur leur étude dans le but de pouvoir les utiliser à des fins pratiques. Ainsi, de plus en plus de nanoparticules ont été développées pour des applications toujours plus variées (produits de soins et d'hygiène, textile, équipements sportifs, produits ménagers et de jardinage, équipements automobiles, peintures, alimentation...). Le formidable potentiel des nanoparticules dans les technologies de pointe laisse entrevoir de nombreuses nouvelles perspectives, notamment en biomédecine. Initialement considérées comme un matériau miracle, les nanoparticules posent néanmoins des questions d'ordre sanitaire et de santé publique et il est nécessaire de connaître les risques d'exposition et les dangers potentiels qu'elles peuvent faire peser sur notre santé. Il est également nécessaire de produire des nanoparticules "*safe-by-design*", afin de tirer le meilleur parti de leur potentiel sans risquer de déclencher un scandale sanitaire à retardement, comme cela a pu être le cas, par exemple, avec l'amiante.

Dans ce contexte, les travaux décrits dans ce manuscrit s'articulent autour de deux thématiques distinctes. La première concerne la toxicité des nanoparticules et est en lien avec des questions de société très actuelles. Une partie de mon travail a ainsi été centrée sur la mise au point d'outils pour étudier la toxicité intrinsèque des nanoparticules. Pour cela, nous avons développé un système d'étude modèle fondé sur une famille de nanoparticules particulières, les carbon dots. La seconde thématique abordée concerne la délivrance de principes actifs aux moyens de vecteurs nanoparticulaires, également construits à partir de carbon dots, et le développement d'outils théranostiques, c'est-à-dire permettant, à la fois, la délivrance d'un principe actif thérapeutique et son suivi par imagerie.

Le manuscrit est organisé en cinq chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à la description générale des nanoparticules. Les différentes terminologies employées dans le monde nano sont introduites, suivies d'une brève

description des nanoparticules environnementales, puis des nanoparticules manufacturées, en mettant l'accent sur l'utilisation de ces dernières comme outils thérapeutiques, avant de finir sur les aspects toxicologiques liés aux nanoparticules.

- Le deuxième chapitre présente une famille particulière de nanoparticules, les carbon dots, de manière plus détaillée. Leurs propriétés physico-chimiques, les différentes méthodes de production et leurs applications sont passées en revue et discutées.
- Le troisième chapitre décrit les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse pour développer des outils permettant d'aborder l'étude de la toxicité des nanoparticules. Ces travaux sont essentiellement centrés sur la préparation d'une large série de carbon dots permettant un échantillonnage représentatif des propriétés que peuvent présenter les nanoparticules.
- Le quatrième chapitre est dédié à la conception de vecteurs de transfert de gènes à partir des résultats présentés dans le chapitre précédent. Nous présentons les efforts que nous avons développés pour optimiser les propriétés de carbon dots destinés à complexer et délivrer de l'acide nucléique dans les cellules.
- Le dernier chapitre, enfin, décrit les différentes stratégies que nous avons mises en œuvre pour développer des agents théranostiques à base de carbon dots et pour des applications dans le domaine du cancer.

À la fin du manuscrit, le lecteur trouvera une partie décrivant les différentes approches expérimentales utilisées ainsi que toutes les sources bibliographiques mentionnées dans le texte.

Chapitre 1. Les nanoparticules

Depuis une trentaine d'années, les nanomatériaux connaissent un essor considérable et sont à l'origine de l'explosion des nanotechnologies. En effet, la taille nanométrique des objets et leur morphologie confèrent à ces derniers des propriétés inhabituelles et particulièrement intéressantes. Les applications, de plus en plus nombreuses chaque jour, devraient permettre aux nanomatériaux de jouer un rôle très important dans l'économie du XXI^{ème} siècle. Ils sont déjà présents dans des secteurs industriels variés tels que l'électronique, le bâtiment, l'énergie, l'environnement, le sport, l'automobile, etc. et entrent dans la composition de nombreux produits utilisés dans la vie courante comme, par exemple, l'alimentation, les crèmes solaires, les cosmétiques ou encore les textiles. Cependant, l'impact des nanomatériaux sur la santé et l'environnement reste encore largement méconnu et c'est dans ce contexte que de nombreuses études liées à l'évaluation des risques sont aujourd'hui réalisées.¹ Néanmoins, la richesse qu'offre l'exploitation des nanotechnologies et l'engouement des scientifiques pour en développer de nouvelles applications laissent entrevoir une amélioration considérable de nos conditions de vie, notamment dans le domaine de la santé, tant au niveau thérapeutique que du diagnostic.

1.1. Quelques définitions génériques

Le terme de *nanosciences* se réfère à toutes les connaissances (théories, modèles, savoir-faire) mobilisées pour comprendre les phénomènes et propriétés nouvelles apparaissant à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire impliquant des objets dont au moins une dimension est à l'échelle nanométrique (< 100 nm).

Les *nanotechnologies* regroupent toutes les techniques de fabrication, les instruments et les applications des nanosciences mises en œuvre pour la fabrication de produits dérivés comme, par exemple, les téléphones portables, les ordinateurs, les cellules photovoltaïques ou encore les nouveaux médicaments.

Un *nanomatériau* est défini, selon les recommandations de la Commission Européenne (2011/696/UE), comme étant un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé, contenant des particules libres, sous forme d'agrégats ou d'agglomérats, dont au moins 50 %, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions comprise(s) entre 1 et 100 nm.²

Un *nano-objet* est un objet dont une dimension au moins est comprise entre 1 et 100 nm. On distingue ainsi :

- Les nano-objets à une dimension : films ou couches minces (argile, graphène...);
- Les nano-objets à deux dimensions : nanofilaments, nanotubes (carbone, silicium, oxyde de zinc...);
- Les nano-objets à trois dimensions : nanoparticules sphériques ou autres formes 3D (fullerènes, nanodiamants...).

En fonction de leurs propriétés de surface, les nano-objets ont tendance à se regrouper pour former des ensembles de tailles plus importantes appelés *agrégats* et *agglomérats* :

- Un *agrégat* est un ensemble de particules fortement liées ou fusionnées ;
- Un *agglomérat* est un amas de particules qui adhèrent ensemble du fait de liaisons physiques faibles. Dans ce cas, la surface externe globale correspond à la somme des surfaces de ses constituants individuels.

Enfin, une *nanoparticule* est définie par la norme ISO TS/27687 comme étant un nano-objet dont les trois dimensions sont à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire comprises entre 1 et 100 nm.³

Du fait de leur très petite taille, les nanoparticules possèdent une grande surface spécifique, ce qui leur permet notamment de pouvoir interagir efficacement avec des molécules chimiques et des biomolécules. En effet, comme le montre la figure 1, les nanoparticules possèdent des dimensions similaires à celles des biomolécules (protéines, ADN...), et leurs propriétés géométriques et physico-chimiques particulières leur permettent de franchir les différentes barrières biologiques.^{4,5} Ainsi, les nanoparticules peuvent être de potentiels vecteurs de principes actifs (vecteurs intentionnels mais aussi accidentels) et l'étude de leur toxicité et de leur impact sur la santé constitue un enjeu majeur.

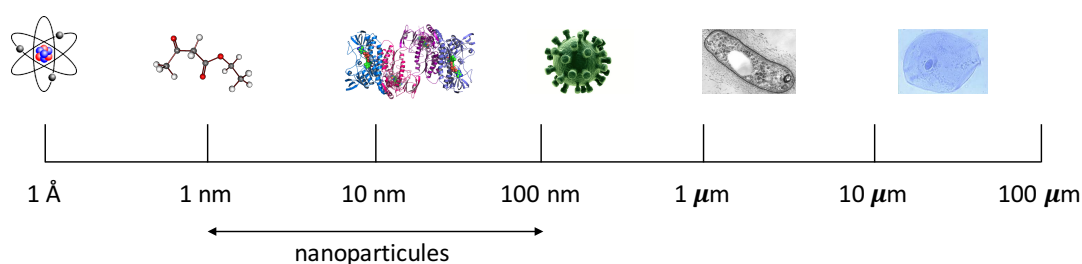


Figure 1. Comparaison de la taille des nanoparticules avec celles des principales structures chimiques et biologiques.

1.2. Les nanoparticules environnementales

Les nanoparticules existent depuis toujours dans l'environnement. D'origine naturelle ou anthropique, elles constituent une grande partie de l'aérosol atmosphérique.

Les nanoparticules naturelles regroupent principalement toutes les particules issues des activités terrigènes (érosion), des activités volcaniques, des feux de forêt, des activités marines (aérosol de sel), *etc.* Les nanoparticules anthropiques (appelées usuellement particules ultrafines), en revanche, sont le résultat des activités industrielles humaines (combustion, génération d'aérosols). Elles sont issues plus particulièrement des secteurs de l'automobile (gaz d'échappement), de l'agriculture et de l'activité domestique qui prend une part de plus en plus importante dans la génération de nanoparticules dans l'atmosphère (chauffage au bois et aux combustibles fossiles, consommation de tabac, utilisation de cuisinières à gaz, *etc.*).

Ainsi, la concentration en particules fines dans l'air varie grandement en fonction de la région du globe (Asie du Sud-Est, Amérique du Nord, Europe, Afrique) et du niveau de vie des populations. Selon un rapport de la Banque Mondiale, la pollution environnementale de l'air est aujourd'hui responsable d'un décès sur dix dans le monde, et constitue ainsi le quatrième facteur de mortalité.⁶ Elle est associée à certaines maladies cardiovasculaires, respiratoires, neurologiques mais aussi à plusieurs types de cancers. Étant donné que la plupart des sources de pollution de l'air échappent totalement au contrôle des individus, il devient de plus en plus nécessaire et urgent que les dirigeants des pays et des grandes métropoles prennent des mesures afin de réduire au maximum ces émissions. Cependant, des enjeux économiques et géopolitiques, souvent considérables, tendent à freiner ces actions.

1.3. Les nanoparticules manufacturées

Contrairement aux nanoparticules environnementales, les nanoparticules manufacturées sont conçues de manière intentionnelle par l'Homme dans le but de modifier les propriétés intrinsèques d'un matériau (résistance mécanique, thermique, conductivité électrique, propriétés de surface...) ou de remplir une fonction particulière (catalyse chimique, stockage de l'énergie, vectorisation de médicaments, bio-imagerie...). Le passage de la matière à l'échelle nanométrique fait apparaître des propriétés inattendues et souvent totalement différentes de celles des mêmes matériaux à l'échelle macro- ou microscopique. Ainsi, le

carbone contenu dans une mine de crayon se casse facilement, tandis que sous forme de nanotubes, il est plus résistant que l'acier. L'Homme s'est également inspiré de la faune et de la flore afin de recréer leurs propriétés exceptionnelles à des fins pratiques. Ainsi, l'effet Lotus inspiré de la plante portant le même nom, confère à une surface des propriétés autonettoyantes et de super-hydrophobie.⁷ En effet, le recouvrement d'un matériau par des nano-textures hydrophobes (cires) permet une non-adhésion des gouttelettes d'eau à la surface. Ces dernières gardent alors leurs formes sphériques et roulent en emportant les poussières et saletés. À l'inverse, le fort pouvoir d'adhésion d'un lézard appelé gecko a été étudié afin de permettre à des matériaux de s'accrocher sur tout type de surface (lisse, humide ou sèche).⁸ Cette incroyable propriété du gecko provient de l'anatomie extraordinaire de ses pattes. En effet, ces dernières s'organisent en fines lamelles microscopiques, recouvertes de diverses protéines, et capables d'interagir avec n'importe quel type de surface par l'intermédiaire de forces de van der Waals. De faible intensité et de courte portée, elles permettent cependant la production d'une force d'attraction importante lorsqu'elles sont concentrées sur une surface réduite. De nombreuses recherches ont ainsi été menées sur des polymères et des nanotubes de carbone dans le but de recréer ce type d'adhésion, notamment pour des applications dans le domaine militaire, dans l'aéronautique ou encore la robotique.

Il existe donc une très grande variété de nanoparticules manufacturées qui, selon leur nature et leur composition chimique, présentent des propriétés intrinsèques offrant de nouvelles perspectives dans des applications toujours plus nombreuses. Les nanoparticules manufacturées peuvent être classées en trois catégories : les nanoparticules inorganiques, les nanoparticules organiques et les nanoparticules carbonées.

1.3.1. Les nanoparticules inorganiques

Les nanoparticules inorganiques sont les plus largement étudiées depuis le début du développement des nanosciences et il en existe de très nombreuses. Nous ne présenterons ici que les plus courantes.

1.3.1.1. Les nanoparticules métalliques

Une grande partie des métaux possèdent des propriétés spécifiques à l'échelle nanométrique.^{9,10}

L'or, par exemple, est jaune et totalement inerte à l'échelle micrométrique. Il est caractérisé par sa forte résistance à l'oxydation, ce qui en fait un métal qui ne se dégrade pas avec le temps. À l'échelle nanométrique, il possède des propriétés optiques particulièrement intéressantes. En effet, les nanoparticules d'or changent de couleur en fonction de leur taille et de leur forme.¹¹ Elles sont également de très bons catalyseurs de réactions chimiques¹²⁻¹⁴ et présentent une chimie de surface particulièrement bien adaptée à l'attachement de molécules soufrées. Les propriétés optiques de l'or et sa forte biocompatibilité permettent également aux nanoparticules qui en sont faites de trouver de nombreuses applications dans le domaine de la santé, par exemple en tant que détecteur de cellules cancéreuses ou en tant que vecteur d'agents thérapeutiques.^{15,16}

L'argent présente également des propriétés particulières à l'échelle nanométrique. Les nanoparticules d'argent sont principalement utilisées dans l'industrie alimentaire, dans les textiles ou les cosmétiques, notamment pour leur activité anti-bactérienne^{17,18} et antifongique.^{19,20} Elles interviennent également dans le traitement des eaux, dans la catalyse de réactions chimiques et en médecine.²¹⁻²³

Le fer est également très utilisé en médecine, plus particulièrement sous forme de nanoparticules d'oxydes de fer (Fe_3O_4 , Fe_2O_3).²⁴ Leurs propriétés magnétiques très intéressantes en font, d'une part, de très bons agents de contraste pour l'imagerie médicale²⁵ (IRM) et, d'autre part, d'excellents actifs thérapeutiques (hyperthermie magnétique).^{26,27}

Les nanoparticules de silice (SiO_2), et les nanoparticules de titane que nous verrons plus loin, représentent parmi les plus gros tonnages de nanoparticules produites à l'échelle industrielle. Les nanoparticules de silice sont présentes dans une large gamme de produits et d'applications, notamment dans les peintures, les cosmétiques, l'alimentaire, ainsi qu'en biomédecine, dans le domaine de la bio-imagerie et de la thérapeutique notamment.²⁸⁻³⁰ En effet, ces nanoparticules peuvent présenter différentes formes structurales (silice cristalline, amorphe ou mésoporeuse) et les conditions de synthèse utilisées à l'heure actuelle permettent un contrôle efficace de leur taille, de leur forme, de leur porosité ainsi que de leur chimie de surface, offrant la possibilité à ces nanoparticules d'interagir, de manière covalente ou non, avec de nombreuses biomolécules et/ou actifs thérapeutiques. D'autre part, leur bonne stabilité chimique ainsi que leur forte biocompatibilité intrinsèque en font un matériau de choix en tant que nano-vecteurs de molécules anticancéreuses ou d'acides nucléiques

thérapeutiques, mais également dans le diagnostic médical avec la possibilité d'incorporer, au sein de ces nanostructures, des sondes fluorescentes ou des agents de contraste variés.

Enfin, le dioxyde de titane (TiO_2), à l'échelle nanométrique, est présent dans de très nombreux produits de consommation courante du fait de ses propriétés d'absorption des rayons UV et de son caractère de colorant blanc. Ainsi, on le trouve dans les cosmétiques (crèmes solaires, dentifrices), en tant qu'additif alimentaire (colorant E171), dans les peintures ou encore dans les textiles. Les nanoparticules de dioxyde de titane sont également très utilisées en tant que catalyseur de réactions photochimiques ou dans la fabrication de cellules photovoltaïques en raison, notamment, du caractère semi-conducteur de cet oxyde métallique. Par ailleurs, de très nombreuses études ont vanté les qualités de ce matériau dans des applications en médecine.³¹ En effet, sa forte biocompatibilité et son inertie chimique lui ont valu d'intervenir dans la conception de nouveaux biomatériaux (trachées artificielles, implants osseux...) et ainsi d'améliorer notre qualité de vie. Cependant, de plus en plus d'études toxicologiques chez l'animal et sur cultures cellulaires ont démontré des effets secondaires indésirables suite à une exposition prolongée à des nanoparticules de TiO_2 .^{32,33}

D'autres nanoparticules métalliques sont développées, bien qu'à moindre échelle, comme les nanoparticules de zinc, de manganèse, de cuivre, de cobalt, etc. Elles ne seront pas présentées ici.

1.3.1.2. Les quantum dots

Les quantum dots sont des particules cristallines de semi-conducteur ou de métal (provenant généralement des groupes II-VI et III-V du tableau périodique), de forme sphérique et de dimension nanométrique (1-10 nm), possédant des propriétés structurales, électroniques et optiques exceptionnelles et étroitement dépendantes de leur important rapport surface sur volume et du phénomène dit de « confinement quantique ». La figure 2 montre une représentation simplifiée de la structure d'un quantum dot avec un cœur inorganique en matériau semi-conducteur (CdSe/ZnS) recouvert de molécules organiques (tri-*n*-octylphosphine) assurant la stabilité colloïdale de la particule et empêchant les phénomènes d'agrégation. Par ailleurs, le cœur peut être recouvert par une ou plusieurs couches d'autres matériaux semi-conducteurs le protégeant et lui permettant de conserver ses propriétés photo-physiques.

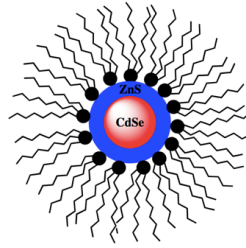


Figure 2. Représentation schématique d'un quantum dot à base de CdSe/ZnS recouvert par de la tri-*n*-octylphosphine.

Les quantum dots sont des semi-conducteurs ce qui signifie qu'ils présentent des caractéristiques électriques et électroniques particulières, à mi-chemin entre un isolant et un métal conducteur. Le comportement électrique d'un solide est décrit par la théorie des bandes (figure 3). Selon cette théorie, un électron ne peut être présent que dans certains intervalles d'énergie, appelées « bandes permises », lesquelles sont séparées par des « bandes interdites ». La dernière bande riche en électrons, appelée bande de valence, et la bande d'énergie permise suivante, appelée bande de conduction, jouent un rôle prépondérant dans la circulation des électrons dans le solide. Pour les matériaux isolants, la barrière énergétique séparant la bande de valence de la bande de conduction est trop élevée (9 eV) pour que des électrons puissent passer de l'une à l'autre. En revanche, dans le cas des semi-conducteurs, ce gap énergétique est beaucoup plus faible (1-3 eV). Il devient alors possible de transférer un électron de la bande de valence vers la bande de conduction en fournissant de l'énergie sous forme de chaleur ou de lumière. Enfin, dans le cas des conducteurs, la bande de valence et la bande de conduction se chevauchent permettant la libre circulation des électrons dans tout le solide.

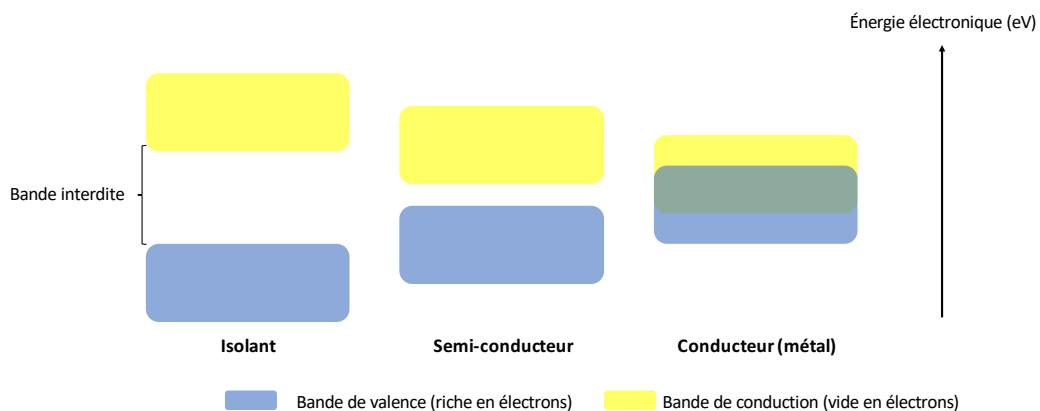


Figure 3. Représentation schématique illustrant la théorie des bandes pour des matériaux isolants, semi-conducteurs et conducteurs.

Les propriétés optiques des quantum dots sont étroitement liées à leur structure électronique. En effet, par excitation lumineuse, l'absorption d'un photon d'une énergie supérieure au gap énergétique séparant la bande de valence de la bande de conduction permet le transfert d'un électron d'une bande à une autre. Il en résulte la création d'un exciton, c'est-à-dire une paire électron-trou. L'électron étant dans un état excité (bande de conduction) peut retourner à son état fondamental (bande de valence) en émettant un photon générant ainsi de la fluorescence (recombinaison radiative des excitons). L'éventuel excès d'énergie du photon d'excitation (dissipation sous forme de chaleur), des défauts dans la structure du cristal ou des impuretés vont en revanche permettre une recombinaison non-radiative des excitons diminuant ainsi le rendement quantique de fluorescence (nombre de photons émis vs. nombre de photons absorbés). Pour des nanocristaux dont le diamètre est inférieur au rayon de Bohr (quelques nanomètres), les niveaux énergétiques sont quantifiés et directement liés à la taille de la particule et à sa composition.³⁴ On a alors ce que l'on appelle un « effet de confinement quantique ».

Du fait de leurs propriétés optoélectroniques étonnantes, de leur stabilité chimique, de leur résistance au photoblanchiment (intensité de fluorescence constante au cours du temps) et de leurs longs temps de demi-vie de fluorescence (plusieurs centaines de nanosecondes à quelques microsecondes), les quantum dots peuvent être utilisés dans de nombreuses applications en biologie et notamment en tant que marqueurs fluorescents.^{35,36} Ils peuvent ainsi être d'excellents substituts aux fluorophores organiques traditionnels que sont les fluorescéines, les rhodamines ou encore les cyanines. Cependant, leur toxicité apparente due à la libération d'ions métalliques reste un problème majeur à leur utilisation en imagerie biomédicale.³⁷ Les quantum dots sont néanmoins utilisés dans de nombreuses autres applications comme, par exemple, dans la réalisation d'écrans plats (LED), de dispositifs d'éclairage, de panneaux photovoltaïques, de batteries ou encore de lasers.³⁸

1.3.2. Les réseaux métallo-organiques (MOFs)

Les réseaux métallo-organiques, ou Metal-Organic Frameworks (MOFs), sont issus de la réaction entre des espèces inorganiques (ions ou clusters métalliques) jouant le rôle de nœud, et des espèces organiques jouant le rôle de lien, pour former des réseaux bi- et tridimensionnels poreux et cristallins. En fonction des espèces mises en jeu et du fort caractère modulaire des

MOFs, une très grande variété de structures à l'échelle nanométrique peut être obtenue avec des tailles de pores (5-30 Å) et des surfaces spécifiques (plusieurs milliers de m²/g) leur permettant d'avoir de nombreuses applications dans le stockage de gaz et dans la catalyse chimique.³⁹⁻⁴¹ Récemment, des MOFs ont été utilisés dans la détection d'ADN, d'ARN, d'activité enzymatique et de petites biomolécules (acides aminés, neurotransmetteurs, *etc.*).⁴² Leur forte biocompatibilité et leur toxicité réduite en ont même fait des structures capables d'encapsuler et de délivrer de nombreux agents thérapeutiques au sein de cellules cancéreuses, et l'incorporation d'agents de contraste permet de les suivre par imagerie.⁴³

1.3.3. Les nanoparticules organiques

À côté des nanoparticules inorganiques et des réseaux métallo-organiques, de nombreuses nanoparticules organiques ont été décrites parmi lesquelles nous retrouvons les nanoparticules à base de polymères et de dendrimères, mais également celles issues de l'auto-organisation d'espèces moléculaires (liposomes, micelles).

1.3.3.1. Les nanoparticules polymériques

Au cours des dernières décennies, les nanoparticules polymériques ont attiré l'attention de nombreux groupes de chercheurs en raison de leur facilité de synthèse et de leur très grande diversité de composition, d'architecture et de réactivité leur permettant des applications dans des domaines variés. D'abord utilisées comme composants principaux des peintures, vernis et autres produits adhésifs, elles trouvent maintenant des applications en électronique et en mécanique,⁴⁴ dans l'environnement⁴⁵ et dans le domaine biomédical.⁴⁶

Les nanoparticules formées à partir de polymères conducteurs à longues chaînes π -conjuguées, tels que le polypyrrole, la polyaniline, le polyacétylène ou le polythiophène, possèdent des propriétés optiques et électroniques spécifiques leur permettant de trouver de nombreuses applications dans la catalyse de réactions chimiques, le stockage (batteries rechargeables) et la conversion de l'énergie (cellules photovoltaïques).^{44,45,47}

D'autres, formées à partir de polymères biodégradables, biocompatibles et faiblement toxiques ont un intérêt certain pour des applications dans le domaine biomédical, notamment pour la délivrance d'actifs thérapeutiques.⁴⁸ Ces nanoparticules peuvent être formées à partir de polymères naturels (polysaccharides, polypeptides) ou synthétiques (polyesters ou

polyamides tels que le PLA : poly(acide lactique), le PGA : poly(acide glycolique), le PACA : poly(alkylcyanoacrylate), le PLGA : poly(lactide-co-glycolide), etc.).

Selon la nature et la structure des polymères ainsi que leur mode de formulation, différentes morphologies de nanoparticules peuvent être obtenues : des nanogels (formés d'un réseau de polymères réticulés), des nanosphères (composées d'un cœur matriciel de polymère), des nanocapsules (composées d'une coque polymère rigide et renfermant un cœur huileux ou aqueux), des micelles polymériques (qui sont des agrégats de copolymères amphiphiles possédant un bloc hydrophobe et un bloc hydrophile) et des polymersomes (des vésicules de copolymères à bloc).

1.3.3.2. Les dendrimères

Les dendrimères constituent une classe spécifique de structures polymériques avec des dimensions nanométriques. Ces macromolécules sont formées à partir de monomères qui s'associent les uns avec les autres, par paliers successifs et selon un processus arborescent, autour d'un cœur central polyfonctionnel (figure 4). Ils peuvent être préparés par deux méthodes : l'une utilisant une approche divergente qui assemble la molécule du noyau jusqu'à la périphérie ; et l'autre utilisant une approche convergente qui assemble la molécule de l'extérieur vers le noyau. Les dendrimères sont particulièrement intéressants dans le sens où leurs propriétés physico-chimiques (taille, charge, structure, solubilité) peuvent être contrôlées efficacement en fonction des réactifs mis en jeu et de leur degré de ramification afin d'obtenir des entités monodisperses de structure bien définie. Leurs applications s'étendent à des domaines très variés tels que la catalyse de réactions chimiques, l'optoélectronique et la nanomédecine.⁴⁹

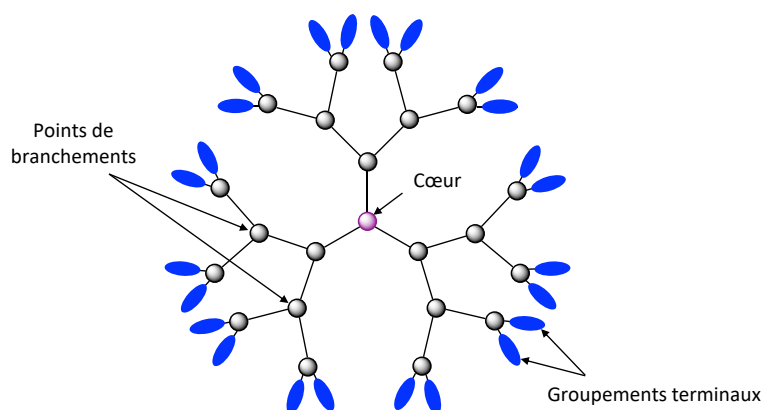


Figure 4. Représentation schématique d'un dendrimère.

1.3.3.3. Les nanoparticules auto-organisées

De manière générale, les composés amphiphiles (contenant une partie hydrophile et une partie hydrophobe) présentent tous des propriétés d'auto-assemblage. La forme et les propriétés des édifices supramoléculaires qui résultent de l'association de ces molécules entre elles dépendent de la géométrie de ces dernières. Ainsi, les tensioactifs dont la surface spécifique de la partie hydrophile et de la partie hydrophobe est équivalente formeront préférentiellement des vésicules de type liposomes (que nous verrons plus loin) ou polymersomes, selon que ce sont des lipides ou des polymères, respectivement ; tandis que les tensioactifs dont la surface spécifique de la partie hydrophile est très différente de celle de la partie hydrophobe auront plutôt tendance à former des micelles. Par ailleurs, tout composé amphiphile est caractérisé par sa concentration micellaire critique (CMC), c'est-à-dire la concentration à partir de laquelle il s'auto-organise en solution (figure 5). En effet, lorsque la concentration en tensioactif dans une solution aqueuse augmente, l'énergie libre du système augmente également en raison des interactions défavorables entre les molécules d'eau et la partie hydrophobe de l'amphiphile. Au-delà de la CMC, les molécules en solution s'auto-organisent de façon à diminuer l'entropie du système.

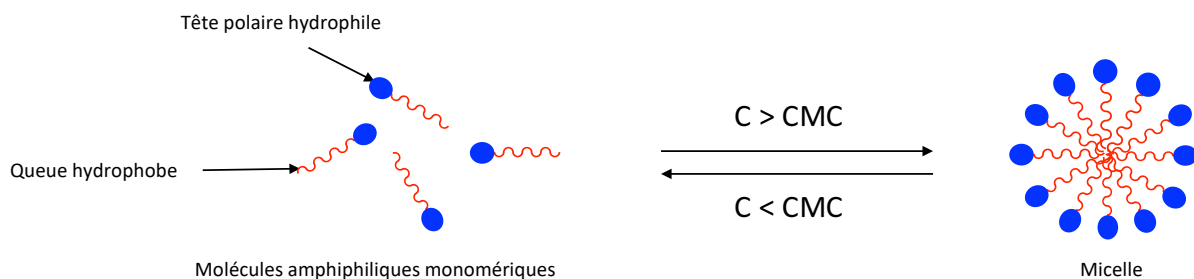


Figure 5. Représentation schématique de molécules amphiphiles monomériques et auto-assemblées en milieu aqueux.

Parmi les nanoparticules issues de l'auto-organisation de molécules en solution, les liposomes sont certainement celles qui ont été les plus étudiées et les plus utilisées. Ce sont des vésicules artificielles dont la membrane est constituée d'une ou de plusieurs bicouches de lipides amphiphiles qui s'auto-assemblent spontanément en milieu aqueux (figure 6). Ils présentent ainsi une zone hydrophobe propre à accueillir des molécules hydrophobes et un cœur hydrophile permettant l'encapsulation de molécules hydrophiles. Les liposomes peuvent

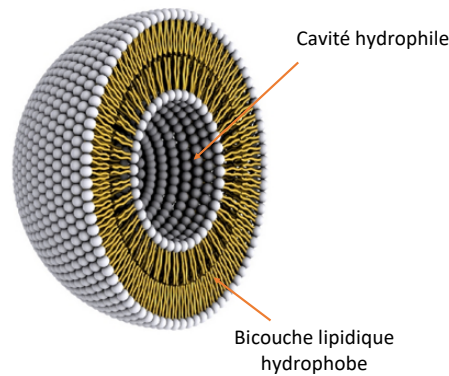


Figure 6. Représentation schématique d'un liposome.

être formés à partir de toute une variété de lipides amphiphiles d'origine naturelle ou synthétique, permettant de faire varier la perméabilité de la membrane, sa charge de surface et sa fluidité. Par ailleurs, ils présentent une taille pouvant varier de la dizaine de nanomètres à plusieurs micromètres en fonction, notamment, de la technique utilisée pour leur fabrication.⁵⁰ La principale caractéristique des liposomes est leur capacité de fusionner avec les membranes des cellules. Les liposomes étant bien souvent fabriqués à partir des mêmes lipides que ceux présents dans les membranes biologiques, ils sont biodégradables et peu toxiques, et sont ainsi largement utilisés en cosmétologie et en pharmacologie, pour le transport de marqueurs ou de principes actifs (hydrophiles et/ou hydrophobes) jusqu'à leurs cibles thérapeutiques.⁵¹

Tout comme les liposomes, les micelles sont des particules sphériques issues de l'auto-assemblage de molécules amphiphiles, dont la tête polaire hydrophile est au contact de l'eau tandis que les parties hydrophobes sont regroupées et dirigées vers l'intérieur (figure 7). Du fait de l'absence de cavité hydrophile, les micelles présentent une taille comprise entre 5 et 100 nm et sont essentiellement utilisées dans le but d'encapsuler et de véhiculer des molécules hydrophobes.⁵² Néanmoins, l'enveloppe hydrophile recouvrant la particule permet,

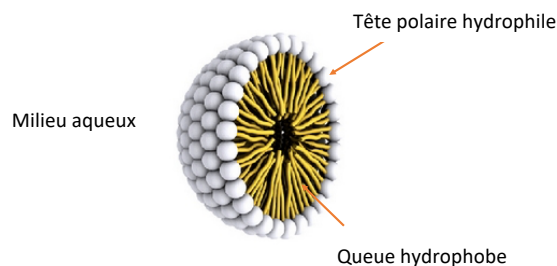


Figure 7. Représentation schématique d'une micelle.

en fonction de sa nature et de sa charge, d'interagir avec des molécules hydrosolubles, soit par l'intermédiaire de liaisons faibles (interactions électrostatiques avec des acides nucléiques par exemple), soit par liaisons covalentes. Cette enveloppe permet également d'assurer une certaine stabilité à l'ensemble en diminuant notamment les phénomènes d'agrégation.

1.3.4. Les nanoparticules carbonées

Après avoir passé en revue la majeure partie des nanoparticules inorganiques et organiques, nous allons maintenant nous focaliser sur les nanoparticules à base de carbone.

Le carbone est l'élément de base sur Terre. Il est présent sous deux formes naturelles : le graphite, constitué par un empilement de plans hexagonaux de carbone hybridé sp^2 , et le diamant, présentant une structure cristalline plus complexe à base d'atomes de carbone d'hybridation sp^3 .

Les nanoparticules à base de carbone regroupent les fullerènes, les nanotubes de carbone, le graphène, les nanodiamants et les carbon dots. Ces nanostructures présentent des propriétés physico-chimiques exceptionnelles leur permettant de trouver de nombreuses applications dans les domaines de l'électronique, de l'optique, de l'énergie et de la biologie.^{53,54}

1.3.4.1. Les fullerènes

Les fullerènes sont des structures creuses fermées, uniquement composées d'atomes de carbone, et pouvant prendre différentes formes géométriques (sphère, ellipsoïde, nanotube, anneau). Ils sont constitués de cycles carbonés hexagonaux mais aussi de cycles pentagonaux, offrant la possibilité de structures fermées. Ces structures ont été découvertes en 1985 par Harold Kroto, Robert Curl et Richard Smalley, lors de la vaporisation de graphite sous un rayonnement laser dans une atmosphère d'hélium et identifiées par spectrométrie de masse.⁵⁵ Cette découverte a valu le prix Nobel de chimie à leurs auteurs en 1996.

Dans leur forme la plus stable, les fullerènes sont constitués de 60 atomes de carbone (C_{60}), arrangés en 20 hexagones et 12 pentagones, et formant une structure icosaédrique de 1,1 nm de diamètre (figure 8). Bien qu'insoluble dans l'eau ($< 10^{-9}$ mg.mL⁻¹), le C_{60} peut être modifié par l'établissement de liaisons covalentes (présence de carbones sp^2) ou non-covalentes (interactions π - π), ce qui permet d'augmenter sa solubilité dans l'eau ainsi que sa biocompatibilité,⁵⁶⁻⁵⁹ et de lui conférer, par exemple, une action thérapeutique par

fonctionnalisation avec des molécules anticancéreuses⁶⁰ ou par interaction avec des acides nucléiques thérapeutiques.⁶¹ Par ailleurs, étant creux, les fullerènes sont capables, en fonction de leur taille, d'encapsuler différents atomes (Li, Na, K, Rb, Cs) ou ions spécifiques, comme le gadolinium (Gd^{3+}),⁶² utilisé comme agent de contraste en IRM, et le technétium 99m (^{99m}Tc), utilisé en médecine nucléaire.⁶³

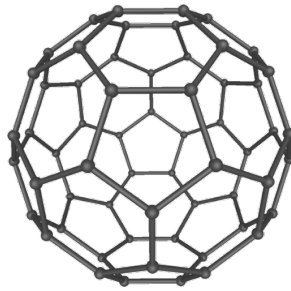


Figure 8. Représentation du fullerène C_{60} .

1.3.4.2. Les nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone, observés pour la première fois en 1991,⁶⁴ possèdent une structure qui peut être représentée sous la forme d'un ou de plusieurs feuillets de graphène (que nous verrons plus loin) enroulés sur eux-mêmes ou les uns autour des autres et décrivant une géométrie tubulaire (figure 9). Ces feuillets, d'un diamètre de l'ordre de quelques nanomètres pour une longueur de plusieurs centaines de nanomètres, peuvent être fermés ou non à leurs extrémités par des demi-sphères semblables à des fullerènes.

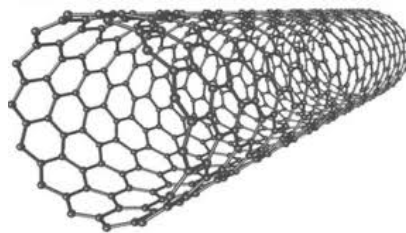


Figure 9. Représentation d'un nanotube de carbone mono-feuillet.

Selon leur chiralité et leur diamètre, certains nanotubes présentent des propriétés purement métalliques alors que d'autres, en revanche, sont des semi-conducteurs. Du fait de la seule présence d'atomes de carbones d'hybridation sp^2 et de l'absence totale de défauts

structuraux, la circulation des électrons dans les nanotubes de configuration « chaise » se fait de manière libre et sans aucun phénomène de diffusion offrant des propriétés électroniques de conductance tout-à-fait fascinantes. Les nanotubes chiraux et zigzag ont la particularité d'avoir des propriétés semi-conductrices conférant à l'ensemble des propriétés optiques toutes particulières et pouvant être appliquées à l'imagerie médicale et à la thérapie, notamment.⁶⁵ Par ailleurs, l'abondance de systèmes π à leur surface permet aux nanotubes de carbone d'être fonctionnalisés de manière covalente par différents groupements chimiques et d'interagir avec des molécules aromatiques thérapeutiques ou des biomolécules par interaction π - π . Ceci permet en outre d'améliorer leur solubilité dans l'eau et leur biocompatibilité, et autorise ainsi des utilisations en tant que vecteurs pour des agents thérapeutiques.^{66,67} Enfin, les propriétés mécaniques des nanotubes sont exceptionnelles. Ces derniers sont en effet 10 fois plus résistants que l'acier et 100 fois plus légers.

1.3.4.3. Le graphène

Le graphène est constitué d'une seule couche d'atomes de carbone hexagonaux d'hybridation sp^2 liés de manière covalente dans un réseau bidimensionnel de type « nid d'abeille » (figure 10). Bien qu'étant la composante de base des différentes nanostructures carbonées telles que les fullerènes, les nanotubes de carbone et le graphite, le graphène n'a pu être synthétisé et isolé qu'en 2004 par André Geim et Konstantin Novoselov,⁶⁸ tous deux récompensés par un prix Nobel de physique en 2010. Grâce à ses propriétés structurales uniques, le graphène possède des propriétés physico-chimiques extraordinaires. En effet, le vaste réseau sp^2 conjugué permet une délocalisation des électrons sur toute la surface, lui conférant des propriétés électroniques,⁶⁹ thermiques et mécaniques remarquables, et offrant de nouvelles possibilités dans les domaines de l'optoélectronique, du stockage de l'énergie et du photovoltaïque. En revanche, pour des applications dans le domaine biomédical et compte tenu de son caractère hydrophobe, il convient de modifier la structure et la composition du

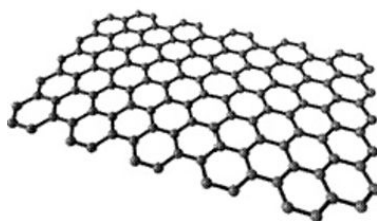


Figure 10. Représentation du graphène.

graphène. Comme le montre la figure 11, sous sa forme oxydée, le graphène présente de nombreux groupements chimiques oxygénés lui conférant une meilleure solubilité dans l'eau et une certaine biocompatibilité et exacerbant, par la même occasion, ses propriétés intrinsèques de fluorescence grâce à l'incorporation de défauts dans la structure parfaite de « nid d'abeille ». Compte tenu de sa très grande surface spécifique et de sa structure plane, de nombreuses molécules ou biomolécules peuvent être fonctionnalisées et/ou adsorbées sur ses deux faces et sur les bords du feuillet, lui permettant ainsi de charger et de délivrer de très grandes quantités d'actifs thérapeutiques ou de sondes biologiques jusqu'à leur cible.^{70,71}

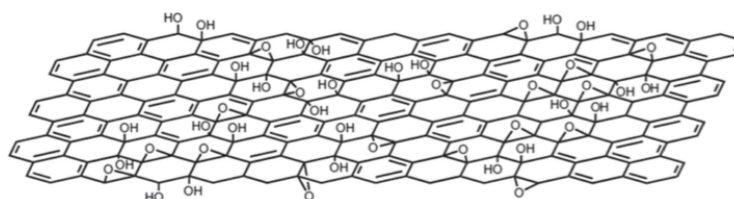


Figure 11. Représentation de l'oxyde de graphène.

1.3.4.4. Les nanodiamants

Les nanodiamants ont été obtenus pour la première fois en 1962 en URSS en mettant à feu, dans une enceinte fermée et appauvrie en oxygène, deux explosifs militaires : du trinitrotoluène (TNT) et de l'hexogène (RDX ou cyclotriméthylènetrinitramine). Ces nanoparticules ont une taille de l'ordre de 2 à 10 nm. Contrairement aux nanostructures carbonées que nous venons de passer en revue (fullerènes, nanotubes de carbone, et graphène), les nanodiamants sont majoritairement formés à partir d'atomes de carbone hybridés sp^3 et offrent la possibilité de visualiser non pas uniquement des particules de géométries sphériques mais aussi des particules de géométries polyédriques (figure 12). L'autre différence majeure de ces nanoparticules carbonées avec celles vues précédemment réside dans l'existence d'atomes d'azote et d'oxygène majoritairement présents en surface des nanoparticules et associés à des atomes de carbone d'hybridation sp^2 , ce qui permet la fonctionnalisation par de nombreuses molécules d'intérêt.⁷² Une autre caractéristique des nanodiamants se situe dans la conservation des propriétés intrinsèques du diamant à l'échelle macroscopique (solidité, biocompatibilité, conductivité thermique, stabilité chimique et propriétés optoélectroniques), ce qui permet d'envisager de nombreuses applications dans des domaines aussi variés que l'électronique, la mécanique, la catalyse, le stockage de l'énergie et l'optique, sans oublier la médecine. En effet, les nanodiamants

combinent les avantages des quantum dots (taille nanométrique, résistance au photoblanchiment, émission de fluorescence sur toute la gamme du visible) tout en étant biocompatibles, non-toxiques et avec de nombreux groupements chimiques en surface leur permettant ainsi de présenter un énorme potentiel dans des applications thérapeutiques et en imagerie médicale.⁷³ Cependant, les méthodes de production des nanodiamants restent, à ce jour, un frein important au développement de ces applications.

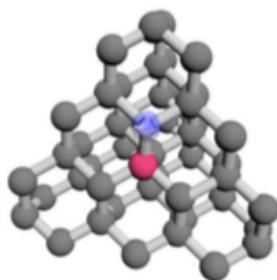


Figure 12. Représentation d'un nanodiamant.

1.3.4.5. Les carbon dots

La dernière classe de nanomatériaux carbonés que nous allons brièvement décrire ici (le chapitre 2 y sera entièrement consacré) concerne les carbon dots, le matériau qui a focalisé toute notre attention cours de cette thèse. Depuis leur découverte accidentelle en 2004,⁷⁴ les carbon dots sont rapidement devenus incontournables dans le domaine des nanosciences en raison de leurs propriétés physico-chimiques particulièrement intéressantes (stabilité chimique, solubilité en milieu aqueux, biocompatibilité, photoluminescence, résistance au photoblanchiment, toxicité faible). Contrairement aux autres nanomatériaux carbonés vus précédemment, les carbon dots présentent plusieurs avantages dans leur conception même. D'une part, leur synthèse peut être réalisée à partir d'une très grande variété de produits courants et peu coûteux et, d'autre part, elle peut faire intervenir toute une palette de méthodes très différentes (approches "top-down" et "bottom-up").^{75,76} En outre, la structure quasi-sphérique de ces nanoparticules et la présence de nombreux groupements chimiques à leur surface rendent relativement facile le greffage de molécules ou biomolécules. Ainsi, les carbon dots se sont rapidement imposés dans de nombreux domaines : en optoélectronique, en catalyse, en chimie analytique (détection d'ions ou de molécules diverses) et en médecine, notamment en imagerie, mais également en tant que nano-vecteurs pour des biomolécules ou des agents thérapeutiques.^{77,78}

1.4. Les nanoparticules, outils théranostiques

De nos jours, la délivrance spécifique d'une molécule thérapeutique dans une cellule, un tissu ou un organe malade représente un enjeu majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines.⁷⁹ Lors de l'introduction d'un médicament dans l'organisme, le principe actif (molécule thérapeutique, protéine, acide nucléique, *etc.*) rencontre de nombreuses barrières naturelles (membranes cellulaires, enzymes de dégradation, système immunitaire) qui tendent à limiter son efficacité, allant même jusqu'à générer des troubles physiologiques et des effets toxiques importants. Pour pallier ces difficultés, une nouvelle approche consiste à associer le principe actif à un nano-vecteur dont le rôle va être d'encapsuler et de véhiculer ce dernier jusqu'à sa cible thérapeutique tout en contrôlant sa libération. Avec le développement de la recherche autour des nanotechnologies, les avancées dans ce domaine se sont multipliées et, au cours des années, les systèmes de vectorisation n'ont cessé de progresser pour aller vers des vecteurs nanoparticulaires de plus en plus complexes et "intelligents".

1.4.1. Les nanoparticules, des outils thérapeutiques évolutifs

Les premiers nano-vecteurs à être utilisés pour l'administration de médicaments sont des vecteurs n'ayant subi aucune modification chimique à leur surface. Il en existe un certain nombre : les liposomes, les nanoparticules polymériques, les micelles... Ces nano-vecteurs de première génération ont été développés principalement pour une administration par voie intraveineuse. En effet, lors de leur administration, ces derniers sont reconnus comme "corps étrangers" par le système immunitaire de l'organisme. S'ensuit alors une adsorption de protéines plasmatiques (les opsonines) à la surface des nano-vecteurs permettant leur phagocytose par les cellules de Kupffer (macrophages du foie).⁸⁰ Bien que cela puisse être considéré comme un inconvénient, on peut aussi en tirer avantage lorsque l'organe cible est le foie et cette particularité a été mise à profit dans le but de traiter différentes pathologies comme les métastases hépatiques ou l'hépatocarcinome résistant.^{81,82}

Afin d'étendre l'activité thérapeutique vers d'autres organes, une seconde génération de vecteurs a été développée qui introduit la notion de "furtivité". Les nano-vecteurs sont recouverts d'une couche polymérique hydrophile et flexible (en général du polyéthylène glycol, PEG) générant de l'encombrement stérique et permettant ainsi d'éviter ou de limiter

le processus d'opsonisation.⁸⁰ La durée de résidence vasculaire de ces constructions est nettement prolongée ce qui va leur permettre d'atteindre d'autres cibles, notamment des tumeurs. Des études histologiques montrent que, dans un tissu sain, les jonctions intercellulaires sont serrées, empêchant ainsi les nano-vecteurs d'y pénétrer. En revanche, au niveau des tissus cancéreux, une réaction inflammatoire est observée induisant une augmentation de la perméabilité vasculaire.⁸³ C'est ce que l'on appelle l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention effect). Les nano-vecteurs de deuxième génération diffusent ainsi plus ou moins sélectivement dans les tissus tumoraux et on parle alors de ciblage "passif".

Pour améliorer la délivrance du principe actif à l'intérieur de cellules spécifiques, divers ligands (acide folique, biotine, anticorps, peptides, oligosaccharides...) peuvent être greffés chimiquement à la surface des nanoparticules PEGylées qui vont ainsi être capables de reconnaître sélectivement des antigènes ou des récepteurs surexprimés à la surface des cellules cibles. Ces nano-vecteurs, dits de troisième génération, sont capables de cibler spécifiquement des cellules tumorales, d'y être internalisés, majoritairement par endocytose, et d'y délivrer leur contenu. L'utilisation de ces nano-vecteurs en thérapie anti-cancéreuse est extrêmement prometteuse étant donné qu'elle permet, d'une part, d'améliorer l'efficacité thérapeutique du traitement en augmentant de manière considérable la concentration du principe actif au sein de la tumeur et, d'autre part, de diminuer significativement les effets secondaires indésirables liés à la toxicité des anticancéreux vis-à-vis des organes et des tissus sains. Il faut cependant noter qu'à ce jour, aucun médicament basé sur un vecteur de troisième génération n'a encore obtenu d'autorisation de mise sur le marché.

1.4.2. Les nanoparticules, des agents thérapeutiques actifs

Outre la délivrance de principes actifs chimiques ou biologiques dans les cellules et tissus ciblés, certaines nanoparticules (essentiellement des nanoparticules inorganiques) possèdent également des propriétés thérapeutiques intrinsèques pouvant être activées sous l'effet de stimuli externes (lumière, champ magnétique). En effet, certaines d'entre elles libèrent de la chaleur lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique (cas des nanoparticules d'oxyde de fer) ou électromagnétique (cas des nanoparticules d'or ou des nanotubes de carbone, notamment), provoquant la mort cellulaire par hyperthermie.⁸⁴ D'autres en revanche produisent des espèces réactives très toxiques pour la cellule (oxygène

singulet, radicaux libres) à la suite de l'absorption d'un rayonnement lumineux. C'est le cas, par exemple, des nanoparticules métalliques (or, argent) et des quantum dots.⁸⁵ Ainsi, l'utilisation et le développement de ces nanoparticules laissent entrevoir de nouvelles perspectives dans le traitement de certaines maladies.

1.4.3. Nanoparticules et thérapie génique

Depuis une vingtaine d'années, la thérapie génique a connu un essor considérable. En effet, la délivrance d'un acide nucléique thérapeutique de type ADN ou siARN au sein d'une cellule peut conduire à l'expression ou à la répression d'un gène, respectivement. La thérapie génique constitue donc une importante source d'espoir dans le traitement de nombreuses maladies innées ou acquises (maladies auto-immunes, maladie de Parkinson, différents types de cancers...). Cependant, la nature anionique de l'acide nucléique, son instabilité en présence d'enzymes de dégradation (nucléases), et la charge globale négative présente au niveau de la membrane plasmique de la cellule sont autant d'obstacles à l'internalisation cellulaire d'un matériel génétique thérapeutique. Ceci a conduit les chercheurs à élaborer divers types de vecteurs afin de lever cet obstacle et promouvoir la transfection du matériel génétique, c'est-à-dire l'acheminement de ce dernier vers sa cible intracellulaire.

Les vecteurs développés sont de deux types : les vecteurs viraux et les vecteurs non-viraux. Les vecteurs viraux sont, à ce jour, les plus efficaces et ceci est le fruit de millions d'années d'évolution et de sélection naturelle. Cependant, leur introduction dans l'organisme peut conduire à des effets indésirables importants avec, notamment, des risques de réponse immunitaire induite et de mutagénèse.⁸⁶⁻⁸⁸ La taille maximale des acides nucléiques pouvant être vectorisés est de surcroît limitée, en particulier avec les virus adéno-associés (< 5 Kpb). Enfin, la production de ces vecteurs est complexe et, par voie de conséquence, très onéreuse. En Europe, la première thérapie génique a été autorisée par l'Agence Européenne du Médicament en 2012. Ce nouveau traitement (Glybera[®], développé par la société UniQure) permet de restaurer l'activité d'une enzyme essentielle au métabolisme des graisses, la lipoprotéine lipase, et utilise un virus modifié pour vectoriser des copies du gène défaillant. Le prix de revient de ce traitement est évalué à 1,25 millions d'euros par patient.⁸⁹ Un autre produit de thérapie génique (Kymriah[®], mis au point par Novartis), approuvé en 2017 aux États-Unis par la *Food & Drug Administration* (FDA), est utilisé sur des enfants et de jeunes

adultes atteints de leucémie. Ce traitement permet de générer à la surface des lymphocytes T des patients une protéine spécifique capable de reconnaître et de détruire les cellules cancéreuses par traitement *ex-vivo* des cellules immunitaires, et utilise également un virus modifié pour délivrer le gène d'intérêt. Le prix d'un tel traitement est évalué à 475000 dollars par patient.⁹⁰ Les limitations inhérentes à l'utilisation des vecteurs viraux ont conduit les chercheurs à user d'ingénierie pour développer de nouveaux moyens d'administration d'acides nucléiques exogènes dans les cellules et tissus par le biais de vecteurs non-viraux ou synthétiques. Ceux-ci regroupent aujourd'hui une multitude de vecteurs (poly)cationiques lipidiques ou polymériques, des dendrimères, des polypeptides ou des nanoparticules solides (quantum dots, nanoparticules d'or, de silice, nanotubes de carbone...) qui ont été synthétisés dans le but de complexer les acides nucléiques par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques et former des particules discrètes de taille nanométrique.⁹¹ Ces vecteurs présentent l'avantage d'être faciles d'utilisation, peu coûteux et sûrs (pas de risques de réponses immunitaires induites), sans être limités par la quantité de matériel génétique à encapsuler. Cependant, ils ne sont pas, à l'heure actuelle, aussi efficaces que les vecteurs viraux et aucun d'entre eux n'a encore obtenu d'autorisation pour des essais cliniques. De nombreux efforts sont donc encore nécessaires pour développer ce type de vecteurs et améliorer, notamment, leur internalisation cellulaire, optimiser leur échappement endosomal et la migration de l'acide nucléique dans le cytoplasme (vers le noyau ou vers le complexe RISC, RNA-induced silencing complex), leur internalisation dans le noyau et, parallèlement à ces différents processus, optimiser la dissociation de l'acide nucléique et du vecteur.⁹²⁻⁹⁴

1.4.4. Nanoparticules et imagerie, vers des outils de diagnostic plus performants

Pour traiter de manière efficace une maladie et établir un diagnostic précis, de nombreuses techniques d'imagerie ont été développées afin de compléter l'examen clinique, réalisé par le médecin, par une observation précise au niveau de la cellule, du tissu ou de l'organe associés à ces pathologies. Ces techniques, toutes basées sur l'utilisation de rayons électromagnétiques (rayons gamma, rayons X, positons, ondes radio...), sont non-invasives mais nécessitent tout de même l'injection de traceurs ou d'agents de contraste dans l'organisme afin de mettre en évidence les détails du tissu étudié.

Depuis une dizaine d'années, l'imagerie moléculaire, par l'examen des différentes activités biologiques au niveau cellulaire et subcellulaire, s'est fortement développée pour devenir un outil puissant dans la recherche et le diagnostic médical. Néanmoins, toutes les techniques d'imagerie utilisées à l'heure actuelle présentent des avantages mais aussi des inconvénients. Par exemple, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet d'avoir une très bonne résolution spatiale et une pénétration tissulaire importante mais souffre d'une sensibilité relativement faible. En revanche, l'imagerie optique de fluorescence, notamment, offre une résolution à l'échelle subcellulaire et une sensibilité importante mais montre une faible résolution spatiale et une pénétration tissulaire limitée. L'idée de disposer d'une plateforme multimodale qui permet de combiner les avantages de différentes techniques a rapidement vu le jour et de nombreux travaux vont dans ce sens aujourd'hui. En raison de leur grande surface spécifique et de leur forte capacité d'encapsulation ou de complexation, les nanoparticules sont naturellement devenues des candidats déclarés pour le développement de ce type d'outils d'imagerie. Elles peuvent aisément coupler (par fonctionnalisation ou dopage) plusieurs agents de contraste différents tout en conservant des propriétés physico-chimiques (taille, solubilité aqueuse, biocompatibilité) compatibles avec le milieu vivant.⁹⁵

1.4.5. Agents théranostiques et nanoparticules

Les différentes fonctionnalités des nanoparticules présentées ci-dessus peuvent également être réunies au sein d'une même construction pour offrir ainsi la possibilité d'imager des structures anatomiques et/ou pathologiques tout en permettant la délivrance simultanée de substances actives (médicaments) au sein de cibles thérapeutiques. De nombreuses recherches sont actuellement à l'étude dans le but de coupler, au sein d'un même système, différents agents de contraste pour le diagnostic médical (sondes fluorescentes, radio-isotopes, complexes métalliques...) et des actifs thérapeutiques (molécules anticancéreuses, acides nucléiques). Le développement et la formulation de ces nanoparticules théranostiques constitue ainsi un aspect novateur et très prometteur dans le domaine de la nanomédecine pour la prise en charge de nombreuses maladies et ouvre la voie pour la délivrance personnalisée de médicaments à ciblage moléculaire.

1.5. La toxicité des nanoparticules

Avec l'essor des nanotechnologies, de plus en plus de nanoparticules manufacturées ont été développées pour des applications dans le secteur industriel ou de la santé. L'augmentation de l'exposition de la population à ces nanoparticules suscite néanmoins de nombreuses inquiétudes dans les agences de santé publique.

À ce jour, le manque de données épidémiologiques ne permet pas de mener une évaluation complète des risques potentiels liés aux nanomatériaux manufacturés contenus dans tous les produits de consommation courante. Cependant, les effets des particules ultrafines provenant de la pollution humaine ou industrielle ont largement été étudiés et laissent suspecter

Tableau 1. Liste des facteurs susceptibles d'influencer la toxicité des nanomatériaux.⁹⁶

Composition chimique	La composition chimique des nanomatériaux et notamment la présence de métaux lourds, responsables de la formation d'espèces réactives de l'oxygène, influe sur les différents processus biologiques et peuvent causer des dommages aux cellules. ⁹⁷
Taille/Surface	La taille détermine la profondeur d'atteinte des nanomatériaux dans l'organisme. Plus les particules sont petites, plus leur pénétration dans les cellules, leur passage à travers les barrières biologiques (membrane plasmique) et leur migration vers les autres organes peuvent être facilitées. ^{98,99} Une diminution de la taille s'accompagne d'une augmentation de la surface spécifique des nanomatériaux, conduisant ainsi à une réactivité chimique et/ou biologique exacerbée.
Charge	Les charges superficielles portées par les nanoparticules ont un fort impact sur l'interaction de ces dernières avec les fluides biologiques et les cellules (internalisation accrue et plus forte toxicité). ¹⁰⁰
Forme	La forme des nanomatériaux semble avoir une importance sur la cinétique d'internalisation des nanoparticules par les cellules. Des nanoparticules sphériques sont internalisées plus rapidement et en plus grande quantité que des nanotubes de diamètre équivalent. ¹⁰¹ D'autre part, une forme fibreuse ou filamenteuse des nano-objets semble accroître leur toxicité par rapport à des particules sphériques de même composition. ¹⁰²
Concentration	L'augmentation du nombre des particules améliore la pénétration et la persistance des nanomatériaux dans les tissus de l'organisme. ⁹⁹
Degré d'agrégation et/ou d'agglomération	Les interactions faibles entre les particules (forces de van der Waals, interactions électrostatiques...) ont tendance à provoquer l'agrégation ou l'agglomération des nanomatériaux, modifiant ainsi leurs propriétés hydrodynamiques, ce qui influence probablement leur déposition dans les voies aériennes et leur pénétration dans les cellules.

la survenue d'effets inflammatoires, respiratoires, cardiovasculaires ou neurologiques chez l'Homme.¹⁰³ Ainsi, au cours des dernières années, de nombreuses études expérimentales ont été réalisées *in vitro* sur différents modèles cellulaires humains d'origine pulmonaire ou *in vivo* chez l'animal afin d'étudier le devenir et l'impact des nanoparticules manufacturées dans le tractus respiratoire, principale voie d'exposition des nanoparticules. Les différents résultats obtenus ont démontré qu'il n'était pas possible d'émettre une hypothèse générale sur la toxicité des nanomatériaux. En effet, chaque nanomatériau possède un profil toxicologique spécifique dépendant de ses propriétés physico-chimiques intrinsèques (tableau 1).

Au vu des premières observations et résultats, il est donc clair que les connaissances concernant les effets biologiques des nanoparticules sur l'organisme doivent encore être approfondies afin de pouvoir éventuellement mettre en place des réglementations adaptées et, le cas échéant, prendre des mesures garantissant une bonne sécurité sanitaire.

Chapitre 2. Les carbon dots

Les carbon dots (CDs) ont été observés pour la première fois en 2004 par Xu *et al.* lors de la purification par électrophorèse de nanotubes de carbone synthétisés par décharge électrique.⁷⁴ Contrairement aux autres nanomatériaux carbonés, les CDs peuvent être synthétisés à partir de réactifs bon marché et sans instrumentation sophistiquée. Ils présentent néanmoins des caractéristiques physico-chimiques tout-à-fait intéressantes que nous détaillerons dans ce chapitre et qui sont à l'origine de leur utilisation dans un grand nombre d'applications.

2.1. Structure et nomenclature des carbon dots

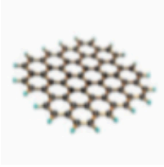


Depuis leur découverte, de très nombreux CDs ont été synthétisés et ce, pour des applications de plus en plus diverses et variées. Il est donc nécessaire d'établir une nomenclature cohérente afin de reconnaître, identifier et classer les différentes particules produites.¹⁰⁴

Selon leur morphologie et leur structure, les CDs peuvent ainsi être classés en trois catégories (tableau 2) :

- Les graphene quantum dots (GQDs) sont constitués d'un disque de graphène (2-20 nm de diamètre) contenant uniquement des atomes de carbone d'hybridation sp^2 et présentent à leur surface différents groupements fonctionnels (acides carboxyliques, alcools, *etc.*). Une carbonisation plus poussée conduirait à la formation d'oxydes de graphène, constitués de feuilles de graphène beaucoup plus grandes (quelques centaines de nm) ;
- Les carbon quantum dots (CQDs), dont la structure est faite d'un empilement de disques de graphène, présentent divers groupements fonctionnels à leur surface. Cet empilement confère à ces nano-objets une structure cristalline quasi-sphérique faite d'un mélange d'atomes de carbone d'hybridation sp^2 et sp^3 ;
- Les carbon nano dots (CNDs) présentent en revanche une structure amorphe quasi-sphérique principalement constituée d'atomes de carbone hybridés sp^3 .

Les différentes formes de carbon dots sont obtenues en utilisant divers procédés de fabrication et en variant les conditions expérimentales.

Tableau 2. Classification des CDs selon leur morphologie et leur structure.

Graphene quantum dots (GQDs)	Carbon quantum dots (CQDs)	Carbon nano dots (CNDs)
		
Disque de graphène (2-20 nm)	Particule cristalline et sphérique (< 10 nm)	Particule amorphe et quasi-sphérique (< 10 nm)

2.2. Méthodes de synthèse

De nombreuses méthodes ont été utilisées dans la synthèse des CDs, certaines utilisant une approche “top-down” (ascendante) et d’autres, une approche “bottom-up” (descendante).^{75,76} Les méthodes “top-down” regroupent principalement la décharge par arc électrique, l’ablation laser ou encore l’oxydation électrochimique. Dans ces méthodes, les CDs sont formés à partir d’une plus grande structure carbonée comme, par exemple, les nanotubes de carbone, le graphite, les fullerènes ou les oxydes de graphène. Les méthodes “bottom-up”, en revanche, utilisent des précurseurs moléculaires. Ceux-ci peuvent être purs (glucose, acide citrique...) ou contenus dans de la matière organique plus ou moins brute (sucre de canne, jus de fruits, marc de café, déchets alimentaires...), et sont pyrolysés par réactions solvothermales, par combustion à haute température, ou encore sous irradiation micro-onde. Une fois synthétisés, les CDs peuvent être soumis à différents procédés de purification (centrifugation, dialyse, filtration, chromatographie, électrophorèse...) dans le but d’obtenir des particules plus ou moins pures et monodisperses. Dans ce qui suit sont présentées les principales méthodes de fabrication des CDs décrites à ce jour.

2.2.1. Approches “top-down”

- *Décharge d’arc électrique*

La décharge d’arc électrique est une technique physique qui a été initialement mise en place pour la synthèse des fullerènes, puis qui a été appliquée à la synthèse sélective de nanotubes de carbone. Cette technique consiste à faire passer un fort courant électrique à

travers deux électrodes de graphite espacées de quelques millimètres et plongées dans une atmosphère inerte (He, Ar). Durant le passage du courant, un arc électrique s'établit entre l'anode et la cathode, permettant aux particules de carbone évaporées de l'anode de se condenser au niveau de la cathode. En fonction de la nature des électrodes, de l'intensité de l'arc électrique, de la pression et de la composition du gaz utilisé, différents types de matériaux peuvent être formés, dont les CDs. En effet, ces derniers ont été découverts accidentellement par Xu *et al.* qui utilisaient cette technique pour fabriquer des nanotubes de carbone. Ce n'est que lors de la purification du matériau produit, par électrophorèse sur gel d'agarose, qu'ils se sont aperçus qu'ils avaient également formé un nouveau nanomatériau carboné présentant des propriétés de fluorescence, les CDs.⁷⁴

- *Ablation laser*

L'ablation laser est une autre technique physique utilisée dans la synthèse de nanoparticules selon laquelle un faisceau laser de forte puissance est dirigé sur un matériau chauffé à très haute température que l'on appelle cible. Une éjection de matière de taille nanométrique est provoquée au point d'impact du faisceau et celle-ci peut être collectée sur un substrat placé en vis-à-vis. La cible et le substrat sont placés dans une enceinte sous atmosphère contrôlée (vide poussé ou sous une pression de gaz réactif ou inerte). La nature et la qualité des particules formées dépendent de nombreux paramètres comme l'énergie du laser, la nature et la température du substrat, la composition et la pression du gaz résiduel dans l'enceinte... Sun *et al.* ont été les premiers à synthétiser des CDs par ablation laser de graphite sous un flux d'argon et en présence de vapeur d'eau. Leurs analyses ont révélé que la chimie de surface des CDs formés avait une grande influence sur les propriétés de photoluminescence de ces derniers. En effet, les CDs initialement formés n'étaient pas fluorescents, même après purification et traitement acide. Ce n'est qu'après les avoir « passivés » que de la fluorescence a pu être détectée. Cette notion de passivation de la surface des CDs sera détaillée plus loin dans ce chapitre lorsque nous évoquerons les différents facteurs influençant les propriétés de photoluminescence de ces nanoparticules.

- *Oxydation électrochimique*

L'oxydation électrochimique est une technique bon marché qui permet d'obtenir des CDs purs, de tailles variables, avec de bons rendements et une bonne reproductibilité. Elle fait

intervenir une cellule électrochimique classique composée de trois électrodes : une électrode de travail recouverte de nanotubes de carbone ou de graphite, une contre-électrode et une électrode de référence, toutes plongées dans une solution électrolytique. Un courant électrique est alors appliqué entre les électrodes provoquant la désintégration progressive de l'électrode de travail (par rupture des liaisons C-C et la génération de radicaux oxygénés) et la formation de CDs. Zhou *et al.* ont été les premiers à synthétiser des CDs par cette technique, en utilisant des nanotubes comme source de carbone.¹⁰⁵

- *Autres méthodes*

L'oxydation chimique peut également être utilisée dans la synthèse de CDs. En effet, en milieu acide fort (HNO_3 , H_2SO_4), de nombreux groupements fonctionnels oxygénés et azotés peuvent être introduits à la surface de matériaux carbonés (suies, graphène...) qui améliorent leur solubilité dans l'eau et permettent l'introduction de défauts dans la structure carbonée, conduisant ainsi à la formation de nanoparticules et à la génération de propriétés de fluorescence.^{106,107}

De la même manière, les réactions solvothermales peuvent permettre le dopage ou l'incorporation de groupements fonctionnels dans une structure carbonée de type graphène ou oxyde de graphène, en utilisant des solvants riches en oxygène ou en azote (H_2O , DMF...).¹⁰⁸

2.2.2. Approches "bottom-up"

- *Réactions solvothermales*

Les réactions solvothermales sont faciles à mettre en œuvre, efficaces et bon marché. La forte réactivité des molécules mises en jeu, le contrôle simple de la température de la solution et la faible consommation énergétique du procédé en font une méthode de choix pour des réactions de polymérisation et de carbonisation. De ce fait, les réactions solvothermales sont tout-à-fait adaptées à la synthèse de CDs. Zhang *et al.* ont été les premiers à utiliser cette méthode pour synthétiser des CDs à partir d'acide L-ascorbique utilisé comme source de carbone.¹⁰⁹ Ils ont également pu mettre en évidence qu'aucun traitement post-fonctionnel (traitement acide, modification chimique de la surface) n'était nécessaire pour conférer aux CDs une solubilité en milieu aqueux et des propriétés de fluorescence.

- *Combustion à haute température*

La combustion à haute température de petites molécules organiques est une autre technique très utilisée dans la synthèse de CDs. Elle présente en effet de nombreux avantages comme la facilité de mise en œuvre, l'absence de solvant, le faible coût, la possibilité d'une production à grande échelle, une grande diversité de précurseurs organiques possibles et un temps de réaction court. La réaction de combustion se déroule en plusieurs étapes faisant intervenir des réactions de déshydratation, de polymérisation et de carbonisation. Lai *et al.*, par exemple, ont obtenu des CDs par combustion de glycérol à 230 °C sous 1 atm pendant 30 min en présence d'oxygène.¹¹⁰

- *Pyrolyse sous irradiation micro-onde*

Enfin, la pyrolyse sous irradiation micro-onde est très appréciée et de plus en plus utilisée dans la synthèse organique et dans la synthèse de CDs en particulier, étant donné qu'elle permet de réduire considérablement les temps de réaction (généralement quelques minutes) et d'améliorer les rendements. En effet, l'énergie apportée par les micro-ondes est spécifiquement captée par les oscillateurs OH et NH présents dans les molécules organiques, leur conférant une réactivité immédiate. À l'inverse, lors d'un chauffage conventionnel, par conduction ou convection, l'énergie fournie est d'abord transmise aux molécules de solvant, lesquelles vont ensuite la transférer aux molécules d'intérêt pour qu'elles réagissent entre elles. D'autre part, contrairement aux techniques classiques de chauffage, le chauffage par micro-ondes implique une interaction entre une onde électromagnétique et la matière. Il en résulte ainsi une répartition de la température bien plus homogène que par un chauffage « classique » qui crée un gradient de température très important. Zhu *et al.* ont été les premiers à synthétiser des CDs par irradiation dans un four à micro-onde domestique (2 à 10 minutes à 500 W) d'un mélange de PEG₂₀₀ et de glucose dans l'eau.¹¹¹ Ces auteurs ont observé une coloration progressive de la solution avec la formation de CDs au cours de la réaction (figure 13).

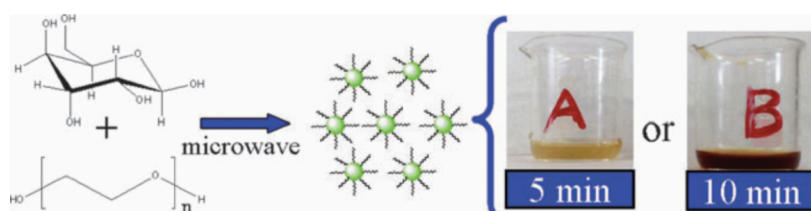


Figure 13. Synthèse de CDs par pyrolyse sous irradiation micro-onde.

2.3. Techniques de caractérisation des carbon dots

Au regard des très nombreuses méthodes développées pour la synthèse de ces nanoparticules carbonées et la recherche d'applications potentielles toujours plus variées, il devient primordial d'utiliser des techniques de caractérisation des nanoparticules de plus en plus performantes afin, notamment, de mieux comprendre l'influence de différents facteurs (composition chimique, taille, forme, structure...) sur les propriétés physico-chimiques et biologiques des CDs. Dans ce qui suit, nous allons passer en revue les différentes techniques utilisées à l'heure actuelle pour la caractérisation des CDs.¹¹²

2.3.1. Techniques de microscopie et de diffraction

De nombreuses techniques d'imagerie et de microscopie ont été développées pour la détermination de la taille, de la forme et de la structure des nanoparticules. Parmi toutes les techniques utilisées, la microscopie est la seule méthode qui permette d'observer et de mesurer directement des nanoparticules individuelles. Les techniques de microscopie qui sont utilisées pour la caractérisation de CDs regroupent la microscopie électronique à balayage (SEM), la microscopie électronique en transmission à basse et haute résolution (TEM, HRTEM) et la microscopie de force atomique (AFM). D'autres techniques, en revanche, utilisent la diffraction d'ondes électromagnétiques, et de rayons X en particulier (XRD), dans le but d'obtenir des informations structurales sur les nanoparticules.

Les microscopies SEM et TEM permettent de récolter des informations sur la taille, la forme et l'état d'agrégation des particules en produisant des images en deux dimensions. La

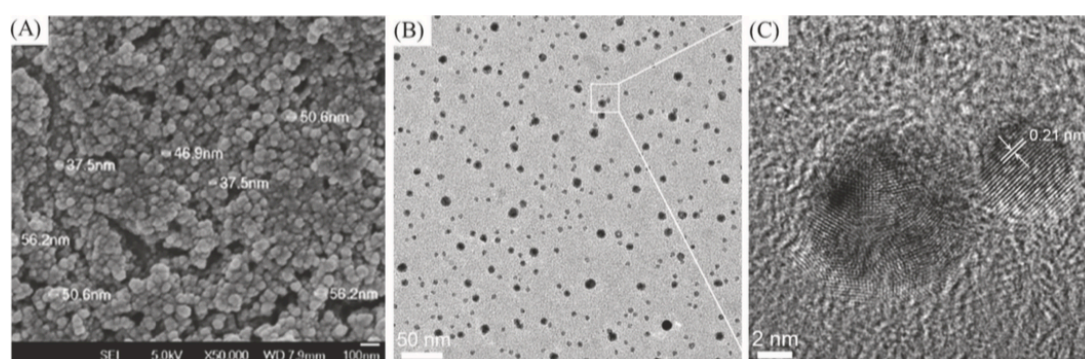


Figure 14. Clichés de microscopies électroniques de CDs. (A) microscopie électronique à balayage,¹¹³ (B) microscopie électronique en transmission à basse résolution,¹¹⁴ (C) microscopie électronique en transmission à haute résolution.¹¹⁴

HRTEM donne une information supplémentaire concernant la structure cristalline ou amorphe de la particule (figure 14). La microscopie de force atomique, quant à elle, permet d'obtenir des informations sur la taille mais également sur la morphologie en surface des CDs en fournissant des images en trois dimensions. Enfin, la diffraction des rayons X fournit des renseignements à la fois sur la structure cristalline des CDs et sur leur pureté.

2.3.2. Techniques spectroscopiques

Contrairement aux techniques de microscopie et de diffraction vues précédemment, les techniques spectroscopiques ne permettent pas de récolter d'informations sur des particules individuelles mais sur un ensemble de particules. Elles regroupent notamment les techniques de diffusion dynamique de la lumière (DLS), les spectroscopies UV-visible et de photoluminescence, la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie Raman, la spectroscopie photoélectronique induite par rayons X (XPS) et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).

La DLS est une technique très utilisée pour déterminer le rayon hydrodynamique d'une particule à partir de sa vitesse de diffusion dans un liquide (par utilisation de la loi de Stokes-Einstein). D'autres techniques utilisent l'interaction entre la lumière et la matière dans le but d'obtenir différentes informations sur les particules et sur les CDs en particulier. C'est le cas notamment des spectroscopies UV-visible et de photoluminescence qui interviennent dans la mesure des propriétés optiques des CDs (détermination du rendement quantique, du temps de demi-vie de fluorescence, de la résistance au photoblanchiment...). La spectroscopie infrarouge est, quant à elle, utilisée pour l'identification des groupements chimiques présents à la surface des particules, tandis que la spectroscopie Raman permet de mesurer le degré de graphitisation des CDs et renseigne donc sur la structure interne des particules. La XPS est une technique d'analyse chimique permettant de récolter des informations sur les propriétés de surface, la composition et l'état électronique des éléments constituant la particule. Enfin, la RMN peut aussi être très utile dans l'obtention d'informations structurales et l'identification de fonctionnalités présentes en surface des CDs.

Les techniques de DLS permettent également d'accéder au potentiel zêta (ζ) d'une nanoparticule, ce qui est particulièrement important pour la caractérisation des CDs. En effet, la détermination de la charge en surface des nanoparticules permet de prédire la stabilité colloïdale d'une suspension. Si les particules en suspension possèdent une valeur absolue de potentiel zêta suffisamment élevée ($> 15-20$ mV), elles tendent à se repousser mutuellement, par le biais d'interactions électrostatiques, ce qui limite les phénomènes d'agrégation ou d'agglomération.

2.4. Propriétés physico-chimiques des carbon dots

Depuis leur découverte, les CDs sont rapidement devenus incontournables dans le domaine des nanosciences et ce, grâce à leurs propriétés physico-chimiques particulièrement intéressantes. Leur taille nanométrique (< 10 nm) confère à ces particules sphériques ou quasi-sphériques un rapport surface sur volume important leur permettant ainsi d'interagir efficacement avec les molécules environnantes. Principalement constituées de carbone, d'hydrogène et d'oxygène, ces nanoparticules présentent à leurs surfaces de nombreux groupements chimiques (acides carboxyliques, alcools, cétones...) les rendant solubles dans l'eau, biocompatibles et faiblement toxiques. Les CDs présentent également des propriétés de photoluminescence intrinsèques qui peuvent être exacerbées, soit par l'incorporation de différents hétéroatomes tels que de l'azote, du soufre ou du phosphore, soit par passivation de leur surface. Enfin, ces nanoparticules sont particulièrement stables chimiquement et offrent, en général, une bonne résistance au photoblanchiment.

Dans ce qui suit, nous passerons en détail chacune de ces caractéristiques qui font que ces nanoparticules carbonées de taille nanométrique sont si exceptionnelles et attirent la réflexion de plus en plus de laboratoires de recherche dans le monde.

2.4.1. Propriétés optiques

- *Absorbance UV-visible*

Les CDs possèdent une forte absorption dans l'UV (260-320 nm) du fait de la présence des transitions $\pi-\pi^*$ des liaisons C=C (figure 15). Pour certaines de ces nanoparticules, le spectre d'absorption peut également présenter un épaulement ou une seconde bande d'absorption vers 270-390 nm qui peut être attribuée aux transitions $n-\pi^*$ des liaisons C=O. Par ailleurs, des études ont permis de montrer que la longueur d'onde d'absorption des CDs peut être déplacée vers le rouge après modification de leur surface.¹¹⁵

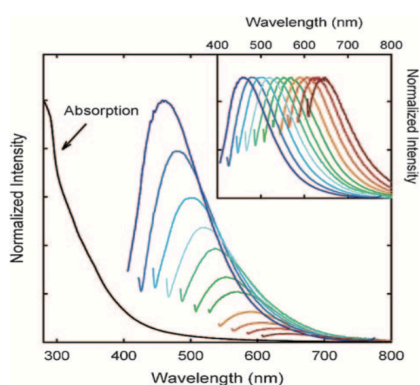


Figure 15. Spectres d'absorption et d'émission de CDs par excitation à des longueurs d'onde de plus en plus élevées (intervalles de 20 nm en partant de 400 nm).¹¹⁶

- Photoluminescence (PL)

Parmi les nombreuses propriétés que possèdent les CDs, la PL est sans aucun doute celle qui a focalisé le plus d'intérêt. Son origine n'est pas encore parfaitement comprise et fait largement débat dans la littérature (*vide infra*).^{104,117,118} Il semble que les mécanismes à l'origine de la PL des CDs soient variés et de nombreux efforts ont été consentis dans le but de mieux les comprendre. Il a ainsi été démontré que plusieurs facteurs peuvent influencer sur les propriétés de PL des CDs. Une distribution non-homogène de la taille des CDs dans un échantillon peut induire une dépendance de la longueur d'onde et de l'intensité d'émission par rapport à la longueur d'onde d'excitation. Li *et al.* ont, par exemple, montré l'influence de la taille sur la longueur d'onde d'émission de CDs synthétisés par oxydation électrochimique en milieu basique de feuilles de graphite (figure 16). Ils ont observé une diminution du gap énergétique (HOMO-LUMO) avec l'augmentation du diamètre de la particule, d'où un décalage de la longueur d'onde d'émission vers le rouge.¹¹⁹

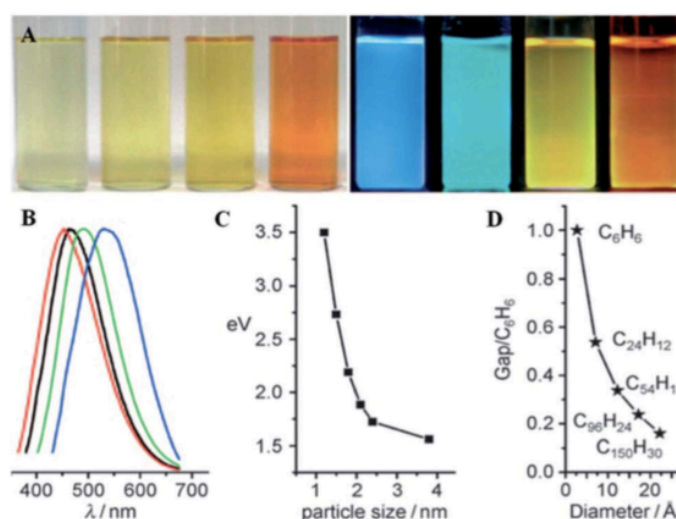


Figure 16. (A) Images de quatre CDs de taille comprise entre 1,2 et 3,8 nm à la lumière du jour (à gauche) et sous lampe UV (à droite). (B) Spectres de PL correspondants : les courbes rouge, noire, verte et bleue correspondent aux émissions des CDs bleu, vert, jaune et rouge respectivement. (C) Relation entre la taille des CDs et leurs propriétés de PL. (D) Relation entre la taille des CDs et le gap énergétique HOMO-LUMO.¹¹⁹

D'autres auteurs ont étudié l'influence de l'agent de passivation introduit à la surface des CDs, soit directement au cours de la formation de la particule, soit par post-fonctionnalisation. En effet, les défauts présents à la surface des CDs agissent comme des piègeurs d'excitons (paires électron-trou), ce qui réduit considérablement la recombinaison

radiative et diminue ainsi l'efficacité de fluorescence et le rendement quantique des particules. Il est donc nécessaire dans certains cas d'enrober celles-ci avec un agent de passivation (molécules organiques, inorganiques, polymères) qui va permettre de stabiliser ces sites en surface afin de conserver et exacerber les propriétés photo-physiques du CD. Liu *et al.* ont démontré que pour obtenir des CDs fluorescents, il était nécessaire d'ajouter un agent de passivation (TTDDA) dans le processus de synthèse.¹²⁰ De la même manière, ce n'est qu'après avoir recouvert la surface de leurs CDs par du PEG ou du PPEI-EI que Sun *et al.* ont pu observer une émission de fluorescence.¹¹⁶

Plus récemment, il a été démontré que le dopage de CDs avec différents hétéroatomes tels que l'azote, le phosphore, le soufre, le bore, *etc.* permet de modifier les propriétés optiques des particules en modulant leur structure électronique. En effet, ces hétéroatomes augmentent la densité électronique autour des atomes de carbone voisins et offrent une nouvelle voie de recombinaison radiative, permettant ainsi d'augmenter de façon significative l'efficacité de fluorescence. Le dopage à l'azote (N-CDs) est très certainement celui qui a été le plus étudié. Zhu *et al.* ont ainsi pu mesurer des rendements quantiques pouvant aller jusqu'à 80 % pour des CDs obtenus par pyrolyse d'acide citrique et d'éthylènediamine.¹²¹ Dong *et al.* ont quant à eux synthétisé des CDs co-dopés à l'azote et au soufre (N,S-CDs) à partir d'acide citrique et de L-cystéine.¹²² Ils ont pu mettre en évidence l'effet synergique de ces deux atomes sur les propriétés de fluorescence de leurs CDs (figure 17).

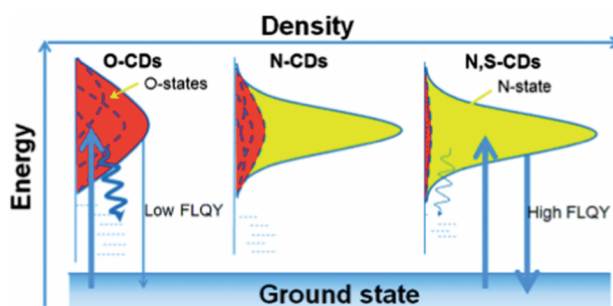


Figure 17. Représentation schématique du mécanisme de fluorescence pour les O-CDs, N-CDs et N,S-CDs.¹²²

Le pH a également été décrit comme ayant un impact sur les propriétés de PL des CDs. Par exemple, Zhao *et al.* ont démontré que l'intensité de fluorescence de CDs préparés par oxydation électrochimique de graphite diminue significativement lorsque le pH de la solution

est supérieur ou inférieur à une valeur optimale.¹²³ En effet, la protonation ou la déprotonation de groupements titrables à la surface des CDs peut changer la distribution électronique autour de la particule et, par voie de conséquence, la nature des niveaux énergétiques ainsi que le type de transitions électroniques impliquées.¹²⁴

Enfin, certains CDs voient leur longueur d'onde d'émission varier en fonction de la polarité du solvant (effet solvatochrome). Dans un solvant polaire, les atomes d'azote et d'oxygène situés à la surface des CDs vont former des liaisons hydrogène avec les molécules de solvant, conduisant ainsi à une stabilisation de l'état excité et à une émission de fluorescence décalée vers le rouge.¹²⁵

Comme on l'a déjà mentionné à plusieurs reprises, les CDs sont capables de résister efficacement au photoblanchiment. Contrairement aux fluorophores organiques et inorganiques couramment utilisés, l'intensité de fluorescence des CDs reste constante après plusieurs heures d'irradiation.¹²³ Cependant, la récente classification des CDs en fonction de leur structure a permis de remettre partiellement en cause cette affirmation et d'apporter quelques nuances. Ainsi, Liu *et al.* ont démontré que les CNDs de structure amorphe étaient beaucoup moins stables à la lumière que les CQDs de structure cristalline.¹²⁶ Il semblerait donc que, selon leur structure, les CDs ne possèdent pas les mêmes propriétés de photostabilité.

- *Origines de la PL*

Il est très difficile de définir de manière précise les mécanismes qui gouvernent la PL des CDs. Ceci est dû, en partie, au nombre important de méthodes différentes mises en œuvre pour la préparation de ces nanoparticules et à la grande variété des précurseurs utilisés. Cependant, même si la question fait toujours l'objet d'un important débat, plusieurs hypothèses ont été proposées.

Une première hypothèse, que nous avons déjà évoqué concernant les quantum dots (chapitre 1), est que l'origine de la PL des CDs proviendrait d'un effet de confinement quantique. Typiquement, lorsqu'un photon est absorbé par une particule présentant des propriétés semi-conductrices, un électron de la bande de valence est promu vers la bande de conduction, générant ainsi un exciton (paire électron-trou). L'électron excité peut retourner à son état fondamental en générant un photon (figure 18A). Les niveaux énergétiques étant quantifiés dans le cas de particules de taille nanométrique, la recombinaison des excitons et l'émission de fluorescence qui en résultent dépendent à la fois de la nature et de la composition

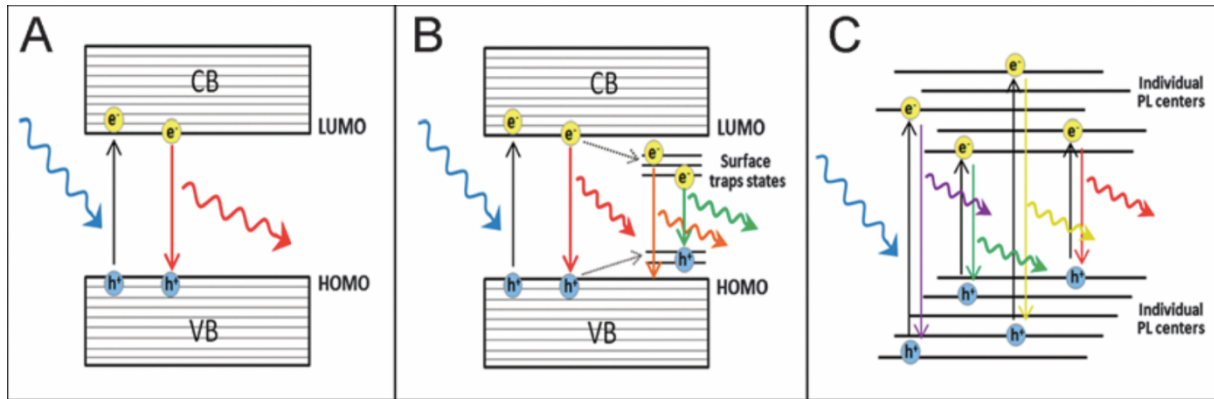


Figure 18. Représentation schématique des différents mécanismes de PL des CD. (A) Effet de confinement quantique. (B) PL résultant de la présence de sites spécifiques en surface capables de piéger l'énergie excitonique. (C) PL issue de la superposition de plusieurs fluorophores ou groupements fonctionnels.¹⁰⁴

de la particule, mais également de sa taille. Ainsi, les CD dont les propriétés de PL sont uniquement dues à un effet de confinement quantique présentent une longueur d'onde d'émission indépendante de la longueur d'onde d'excitation. Par la suite, une deuxième théorie a été proposée avec la création de niveaux profonds au sein même de la bande interdite (bande séparant la bande de valence et la bande de conduction). Ces niveaux proviennent de sites en surface (défauts dans la structure, impuretés, groupements fonctionnels ou molécules adsorbées) capables de piéger l'énergie excitonique (figure 18B). Ainsi, les recombinaisons correspondantes conduisent à des énergies plus faibles et donc plus probables avec des déplacements de longueurs d'onde vers le rouge et une dépendance à la longueur d'onde d'excitation. Enfin, un dernier mécanisme résulte de la superposition d'émetteurs individuels (fluorophores ou groupements fonctionnels) généralement localisés à la surface des nanoparticules. Les CD dont les propriétés de PL sont gouvernées par ce mécanisme présentent en général une bande d'émission très large ainsi qu'une forte dépendance de la longueur d'onde d'émission à la longueur d'onde d'excitation (figure 18C).

Il est donc *a priori* possible d'établir une corrélation entre la structure des CD et le mécanisme selon lequel leurs propriétés de PL s'expriment. Une structure cristalline (GQDs, CQDs) favorisera davantage les mécanismes représentés sur les figures 18A et 18B, tandis qu'une structure amorphe (CNDs) s'orientera préférentiellement vers celui indiqué sur la figure 18C. On comprend ainsi aisément que le passage de l'une à l'autre forme de CD par

simple modification des conditions de synthèse (température, temps de réaction...) peut s'accompagner de propriétés de photoluminescence différentes.^{127,128}

- *PL par conversion ascendante (up-conversion)*

En plus de l'émission de PL conventionnelle, des études récentes ont montré que certains CDs pouvaient émettre de la luminescence par conversion ascendante de photon. Ce mécanisme diffère d'une émission de PL classique par le fait que la longueur d'onde d'émission est plus faible que la longueur d'onde d'excitation (déplacement anti-Stokes) et intervient lorsqu'une molécule, ou dans le cas présent une particule, absorbe deux photons ou plus dans des longueurs d'ondes proches de l'infrarouge. Cao *et al.* ont été les premiers à observer ce phénomène avec les CDs.¹²⁹ Ils ont ainsi pu mettre en évidence que des CDs produits par ablation laser présentaient une émission de fluorescence dans le visible (458 nm) après avoir subi une excitation à deux photons dans le proche infrarouge (800 nm). Nous verrons plus loin que cette propriété est particulièrement intéressante pour des applications en imagerie médicale. En effet, une absorption de photons d'énergie plus faible réduit considérablement le risque d'endommager les cellules et améliore significativement la pénétration tissulaire.

- *Transfert d'électrons photo-induits*

Comme nous l'avons déjà expliqué auparavant, lors de l'absorption d'un photon par une particule présentant des propriétés semi-conductrices, un électron de la bande de valence est promu vers la bande de conduction. La désexcitation résultante peut conduire à une recombinaison radiative avec émission d'un photon (cas de la fluorescence) ou non-radiative. Le transfert d'électron photo-induit est un processus non-radiatif impliquant une réaction d'oxydo-réduction. Ainsi, en présence d'espèces oxydo-réductrices, les CDs peuvent jouer le rôle d'accepteurs ou de donneurs d'électrons, conduisant ainsi à une annihilation de leurs propriétés de PL (figure 19). Cette caractéristique des CDs a été mise à profit dans la détection d'ions ou de molécules, dans des réactions de catalyse et dans la conversion de l'énergie lumineuse en électricité (cellules photovoltaïques).

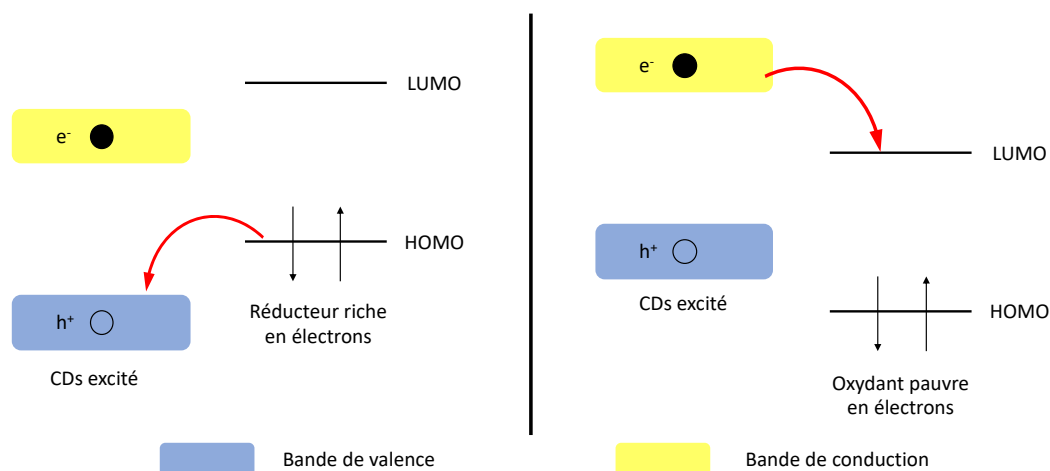


Figure 19. Mécanismes de transfert d'électrons photo-induits dans lesquels la nanoparticule joue le rôle d'accepteur (à gauche) ou de donneur d'électrons (à droite).

2.4.2. Biocompatibilité et cytotoxicité

En raison de la nature des précurseurs organiques généralement utilisés pour leur synthèse, les CDs sont principalement constitués d'atomes de carbone, d'oxygène et d'hydrogène ce qui leur permet d'être solubles dans l'eau, biocompatibles et faiblement toxiques. En effet, de nombreuses études ont été menées sur différentes lignées cellulaires cancéreuses afin d'évaluer la cytotoxicité des CDs *in vitro*.^{123,130} Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence que, dans la majorité des cas, la viabilité cellulaire ne diminue pas de manière significative au cours du temps et ce, même pour des concentrations élevées en CDs. Par ailleurs, des études *in vivo* ont également été réalisées dans le but d'évaluer le potentiel de ces nanoparticules carbonées dans des applications biomédicales.^{106,131} Aucun effet toxique indésirable, aucune réponse immunitaire ou lésion des organes des animaux traités n'a été observé aux doses administrées.

Toutes ces observations vont dans le même sens et semblent indiquer que les CDs présentent une toxicité négligeable et une bonne biocompatibilité, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, laissant entrevoir de nombreuses applications possibles en biologie et en médecine.

2.5. Applications des carbon dots

Au regard des propriétés physico-chimiques décrites ci-dessus, il n'est pas surprenant de constater que les CDs attirent l'attention de plus en plus de groupes de recherche à travers

le monde. En effet, ces particules carbonées de taille nanométrique sont présentes dans des applications toujours plus nombreuses. Dans cette partie du manuscrit, nous décrivons les principaux domaines d'utilisations des CDs en nous appuyant sur quelques exemples et en portant une attention toute particulière au domaine médical.

2.5.1. Les CDs en optoélectronique

Sous irradiation lumineuse, les CDs sont des semi-conducteurs capables d'émettre de la lumière et de jouer le rôle d'accepteur ou de donneur d'électrons. Ces propriétés sont particulièrement intéressantes pour des utilisations en optoélectronique.^{132,133} En effet, les CDs peuvent permettre de convertir un signal optique en un signal électrique (cellules solaires) et inversement (diodes électroluminescentes).

De nombreuses études ont porté sur l'utilisation des CDs dans les cellules solaires en raison de leurs propriétés physico-chimiques particulières (grande surface spécifique, bonne solubilité dans les solvants polaires, nombreux groupements chimiques présents en surface, stabilité chimique, forte absorption optique pouvant s'étendre de l'UV jusqu'au proche infrarouge), de leur faible coût de production et de leur toxicité négligeable. Les CDs ont par exemple été utilisés comme agent de substitution des complexes de métaux lourds (complexes au ruthénium notamment) en tant que photo-sensibilisateurs dans les cellules solaires (DSCs).¹³⁴ Cependant, la faible affinité des CDs pour la surface de dioxyde de titane assurant la conduction électronique favorise la recombinaison des excitons, limitant de ce fait l'efficacité de conversion photo-électrique. De nombreux groupes ont alors développé de nouveaux systèmes dans lesquels les CDs sont combinés à des photo-sensibilisateurs organiques. Par exemple, Ma *et al.* ont développé une cellule solaire inspirée de la photosynthèse dans laquelle les CDs servent de pont entre la rhodamine B (RhB) et le dioxyde de titane. Cette ingéniosité a ainsi permis d'exacerber les propriétés d'absorbance de la rhodamine mais également de supprimer la recombinaison des excitons, ce qui améliore de manière significative la conversion photo-électrique (figure 20).¹³⁵

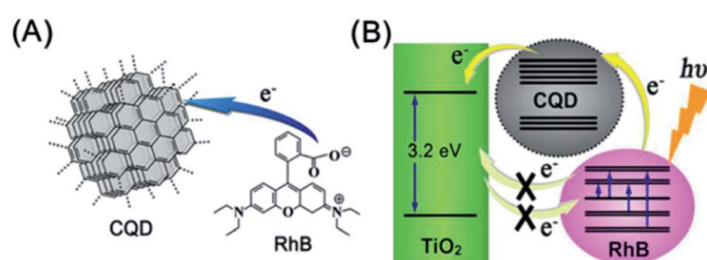


Figure 20. Représentations schématiques du transfert électronique de la RhB vers le CD (A) et du rôle d'intermédiaire du CD permettant la suppression de la recombinaison des excitons (B).¹³⁵

Dans les cellules solaires organiques (OSCs), des CDs ont été principalement utilisés pour leur rôle d'accepteur d'électrons, en substitution des fullerènes plus difficiles à synthétiser et plus coûteux. La structure en bandes successives de ce type de cellules permet d'augmenter considérablement le taux de dissociation des excitons grâce au mécanisme de transfert de charge photo-induit à l'interface donneur/accepteur. Li *et al.* ont ainsi fabriqué une cellule solaire organique à partir de CDs (accepteur d'électrons) et d'un polymère couramment utilisé dans ces dispositifs, le P3HT (donneur d'électrons).¹³⁶ Les énergies relatives HOMO-LUMO des transporteurs de charges utilisés permettent une meilleure dissociation des excitons et le haut degré de graphitisation des CDs améliore leur diffusion à travers la couche active. En dépit du fait que l'efficacité de conversion photo-électrique de ces cellules reste encore faible (de l'ordre de 1 %) par rapport aux cellules conventionnelles (8-9 %), l'utilisation de CDs dans ces dispositifs constitue une alternative prometteuse au C₆₀.

D'autres études ont permis de mettre à profit les propriétés optoélectroniques des CDs dans la conception de diodes électroluminescentes (DELs) bon marché et plus respectueuses de l'environnement. Ces nanoparticules carbonées constituent en effet une alternative de choix aux métaux et semi-conducteurs traditionnellement utilisés dans ce domaine du fait de leur stabilité chimique, de leur rendement quantique élevé, de leur résistance au photoblanchiment, de leur faible coût de production et de leur toxicité réduite. Par ailleurs, le large spectre d'émission des CDs leur permet également d'intervenir dans la conception de DELs blanches, particulièrement importantes pour des applications dans les technologies de développement durable grâce à une réduction de la consommation électrique, une plus grande durée de vie et une meilleure compacité.

Ainsi, certaines études ont été basées sur l'utilisation des propriétés de PL des CDs dans le but de convertir la couleur des DELs en utilisant les nanoparticules comme luminophores. Tang *et al.* ont par exemple démontré qu'un recouvrement de CDs synthétisés à partir de glucose et émettant dans le jaune (510 nm) sur une DEL bleue produit de la lumière blanche (figure 21).¹³⁷ Cependant, l'un des problèmes rencontrés avec ce type de système est une inhibition de la fluorescence des CDs au cours du temps, induite par des phénomènes d'agrégation. Il est en effet nécessaire d'utiliser des films solides de luminophores afin de produire des DELs blanches non-dégradables. Certains groupes de recherche, dont celui de Rhee, ont ainsi incorporé des CDs dans une matrice polymérique de PMMA qui permet non seulement d'avoir un support mécanique mais aussi de disperser efficacement les CDs.¹³⁸

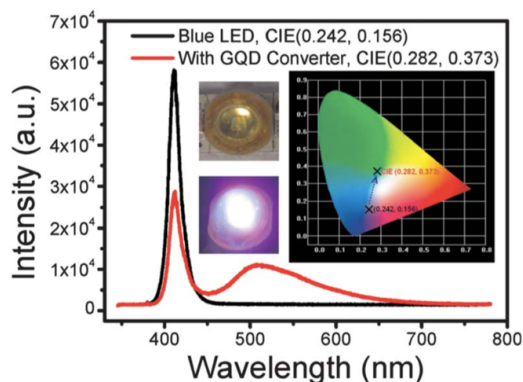


Figure 21. Spectres de luminescence d'une DEL bleue recouverte ou non de CDs (à gauche). Photographie d'une DEL recouverte de CDs en appliquant (au centre, en bas) ou non (au centre, en haut) une tension. Représentation des coordonnées chromatiques d'une DEL bleue illuminée recouverte ou non de CDs (à droite).¹³⁷

D'autres études ont davantage porté sur l'utilisation des propriétés d'électroluminescence intrinsèques des CDs. Les systèmes développés sont basés sur la structure en multicouches des diodes électroluminescentes organiques (OLEDs). Une couche émissive de CDs est prise en sandwich entre une couche organique permettant le transport des trous et une couche organique ou inorganique dont le rôle est de véhiculer les électrons. Les transporteurs de charges, électrons et trous issus de la cathode et de l'anode, sont alors respectivement injectés dans les bandes de conduction et de valence des CDs. La recombinaison résultante permet de générer une radiation lumineuse. Par ailleurs, il a été démontré que la nature et l'épaisseur des couches organiques et/ou inorganiques constituant le système ainsi que la densité de courant injectée ont une influence sur la couleur émise et peuvent ainsi permettre d'obtenir des DELs blanches.¹³⁹

2.5.2. Les CDs, photo-catalyseurs de réactions chimiques

Nous venons de voir que les CDs sont des espèces capables d'intervenir dans la conversion de l'énergie solaire en électricité. De nombreuses études ont par ailleurs révélé que ces nanoparticules permettent également de catalyser des réactions chimiques sous excitation lumineuse.⁷⁶ En effet, le caractère semi-conducteur des CDs leur permet d'accepter ou de donner des électrons et ainsi, de prendre part à de nombreuses réactions d'oxydo-réductions. En outre, ces nanoparticules carbonées présentent des propriétés optiques particulièrement bien adaptées à l'absorption de l'énergie solaire. Contrairement aux photo-catalyseurs à base de métaux lourds semi-conducteurs (TiO₂, ZnO, CdS...) couramment utilisés qui présentent une

bande interdite large et qui ne peuvent donc bénéficier que de la région UV du rayonnement solaire (seulement 4 % de l'énergie totale), les CDs sont capables d'étendre cette région spectrale dans la région visible et même jusqu'au proche infrarouge et ce, notamment, grâce à leur propriété de PL par voie ascendante. Un dopage de ces nanostructures de semi-conducteur par des CDs peut donc permettre d'améliorer l'efficacité de photo-catalyse mais également de renforcer la stabilité de l'édifice, d'abaisser son coût et sa toxicité.

Une des applications de la photo-catalyse est la dépollution des milieux avec la dégradation des molécules organiques présentes dans l'air ou dans l'eau. En effet, l'absorption de photons permet la production d'espèces oxydantes ou réductrices (HO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$) à la surface du semi-conducteur, conduisant ainsi à la rupture de liaisons chimiques. Dans ce contexte, Yu *et al.* ont développé un nanocomposite de ZnO dont le dopage par des CDs permet d'améliorer significativement la dégradation d'effluents toxiques contenant du benzène et du méthanol.¹⁴⁰ Ils ont ainsi proposé différents mécanismes permettant d'expliquer le rôle crucial des CDs dans l'exacerbation des propriétés photo-catalytiques du nanocomposite (figure 22). Dans un premier temps, les CDs permettent la dissociation des excitons en piégeant les électrons photo-induits qui proviennent des particules de ZnO excitées par la lumière visible. Des radicaux oxygénés de type $\text{O}_2^{\bullet-}$ sont alors produits à la surface des CDs par réduction des molécules de O_2 adsorbées, tandis qu'à la surface des particules de ZnO, le trou résiduel permet l'oxydation de HO^- en HO^\bullet (figure 22a). Par ailleurs, les propriétés de PL par voie ascendante des CDs permettent l'absorption de la lumière émise à des longueurs d'onde proches de l'infrarouge et sa conversion en une lumière de plus courte longueur d'onde, avec génération d'excitons au niveau des particules de ZnO (figure 22b). Enfin, au cours du processus de dégradation photo-catalytique du benzène, les interactions π - π entre la structure conjuguée des CDs et le benzène favorisent l'adsorption de cette molécule à la surface du nanocomposite.

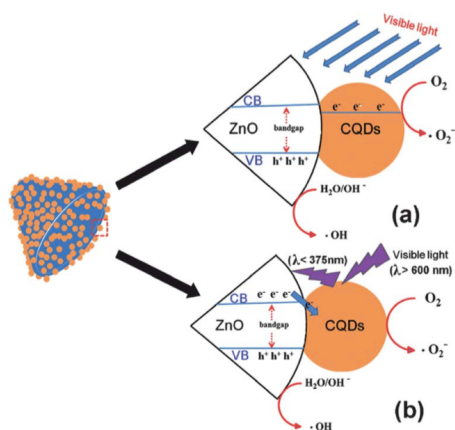


Figure 22. Représentation schématique des différents mécanismes photo-catalytiques proposés pour la dégradation de molécules organiques.¹⁴⁰

Dans le contexte énergétique actuel, favorable au développement de nouvelles sources d'énergies renouvelables, la photo-catalyse peut jouer un rôle majeur avec la production de H_2 et O_2 à partir de l'eau. Cependant, les photo-catalyseurs actuels souffrent d'une faible efficacité et d'une stabilité limitée. Liu *et al.* ont développé un nanocomposite à base de CDs et de nitrure de carbone (CD/C_3N_4) qui permet une décomposition de l'eau simple et efficace, sous irradiation lumineuse (figure 23).¹⁴¹ Leur système met en jeu deux étapes à deux électrons dans lesquelles le C_3N_4 permet, dans un premier temps, la conversion de l'eau en H_2 et H_2O_2 à la surface du nanocomposite par photo-catalyse et, dans un deuxième temps, les CDs interviennent dans la décomposition du peroxyde d'hydrogène en O_2 .

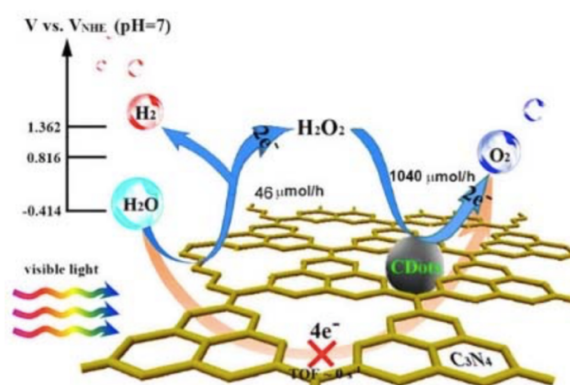


Figure 23. Représentation schématique du mécanisme de production de H_2 et O_2 à partir d'un nanocomposite CD/C_3N_4 .¹⁴¹

Les exemples que nous avons vus jusqu'à présent font tous intervenir une coopération synergique entre les CDs et une nanostructure inorganique ou organique dans le but d'atteindre une activité photo-catalytique. Néanmoins, il a été démontré qu'une telle association n'est pas forcément nécessaire. Li *et al.* ont produit des CDs dont les propriétés de transfert d'électrons photo-induits et de PL par voie ascendante ont permis d'oxyder sélectivement l'alcool benzylique en benzaldéhyde sous irradiation lumineuse dans le proche infrarouge et en présence de H_2O_2 .¹⁴²

2.5.3. Les CDs, détecteurs d'espèces chimiques

Les CDs sont des particules sphériques ou quasi-sphériques de taille nanométrique. Ils possèdent donc un rapport surface sur volume important qui leur permet d'interagir efficacement avec les espèces chimiques environnantes. Cette interaction peut conduire, dans

certains cas, à une modulation des propriétés physico-chimiques de la nanoparticule et, en particulier, de ses propriétés optiques. Les CDs sont donc d'excellents candidats pour la détection spécifique d'un grand nombre d'espèces chimiques (ions métalliques, anions, molécules organiques...).¹⁴³

De nombreuses études ont été menées sur le développement de CDs dans le but de détecter et de quantifier les ions métalliques (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cr^{6+} , Ag^+ , *etc.*) particulièrement toxiques pour l'Homme à de fortes doses. Par exemple, Zhang *et al.* ont démontré que la complexation d'ions Fe^{3+} à la surface de CDs induit une diminution de l'intensité de fluorescence lorsque la concentration en ions ferriques augmente.¹⁴⁴ Ce phénomène peut être attribué à un transfert d'électrons de la bande de conduction du CD vers l'orbitale *d* de Fe^{3+} . D'autre part, Yuan *et al.* sont parvenus à détecter des ions Hg^{2+} en solution en faisant intervenir un complexe de cuivre lié de manière covalente à la surface des CDs.¹⁴⁵ La substitution de l'ion Cu^{2+} par l'ion Hg^{2+} dans ce système permet en effet de retrouver un signal de fluorescence en bloquant le transfert d'électrons photo-induit vers l'ion métallique et, par voie de conséquence, la recombinaison non-radiative des excitons. Un dernier exemple met en jeu un complexe hybride CD/QDs pour la détection ratiométrique d'ions Cu^{2+} .¹⁴⁶ Dans ce système, seuls les CDs sont sensibles aux ions Cu^{2+} , du fait de polyamines présentes à leur surface et capables de complexer ces ions. Des mécanismes de transfert d'électrons entre les CDs et les ions Cu^{2+} permettent des recombinaisons non-radiatives et une diminution de l'intensité de fluorescence à 485 nm. En revanche, l'intensité de fluorescence émise par les QDs à 644 nm reste constante. Sous irradiation lumineuse, la couleur de la solution passe donc du bleu au rose après ajout d'ions Cu^{2+} (figure 24).

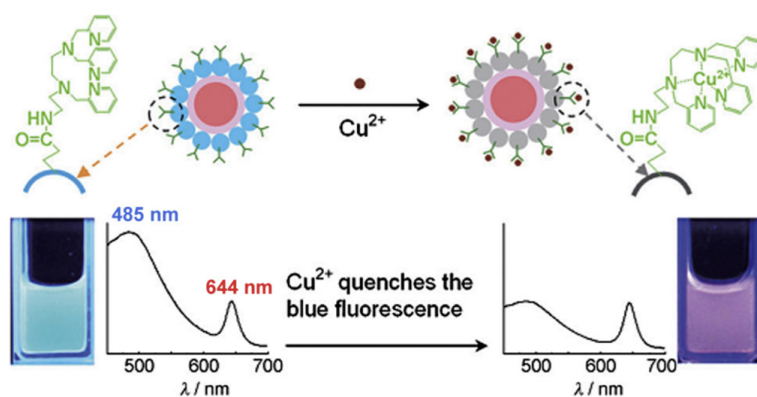


Figure 24. Détection d'ions Cu^{2+} par émission duale de fluorescence mettant en jeu un complexe hybride CD/QDs.

En plus de la détection et de la quantification des ions métalliques par les CDs, de nombreuses études ont également porté sur la détection des anions en solution (PO_4^{3-} , S^{2-} , CN^- , ClO^- , *etc.*). Il a déjà été évoqué que certains ions métalliques, au contact de la surface carbonée des CDs, atténuent de manière considérable l'intensité de fluorescence de ces particules. Ainsi, la présence d'anions en solution peut permettre un rétablissement progressif de l'intensité initiale de fluorescence des CDs grâce à une forte affinité de ces anions pour les cations métalliques qui sont ainsi déplacés. Cette méthode a, par exemple, été mise à profit par Zhao *et al.* dans le but de détecter des groupements phosphates.¹⁴⁷ En présence d'ions Eu^{3+} , les CDs s'agrègent par coordination de ces ions métalliques par les groupements carboxylates présents à la surface des nanoparticules carbonées, ce qui conduit à une diminution de l'intensité de fluorescence. Lors de l'addition de phosphates en solution, une dispersion progressive des particules est observée qui est due à la plus forte affinité des ions Eu^{3+} pour les phosphates et qui s'accompagne d'un rétablissement de l'intensité initiale de fluorescence.

Enfin, de très nombreux groupes de recherche se sont penchés sur le développement de CDs pour la détection d'une très grande variété de molécules et de biomolécules dont certaines d'entre elles interviennent dans des mécanismes essentiels à la vie des organismes vivants. Il est donc d'un intérêt certain de pouvoir les détecter et les quantifier le plus précisément possible. De la même manière que dans l'exemple vu précédemment, Lv *et al.* se sont basés sur les fortes interactions entre les ions métalliques et certaines molécules dans le but de rétablir l'intensité initiale de fluorescence des CDs.¹⁴⁸ Ainsi, en présence de glutathion, les ions Cu^{2+} situés à la surface des CDs vont former préférentiellement des interactions avec les atomes de soufre de l'analyte, ce qui va permettre la restauration du signal de fluorescence des nanoparticules. D'autre part, Shi *et al.* se sont inspirés de la forte affinité entre l'acide borique et le glucose dans le but de concevoir un système capable de reconnaître sélectivement ce sucre.¹⁴⁹ En effet, les CDs synthétisés à partir d'acide phénylboronique s'agrègent lorsque la concentration en glucose augmente, ce qui conduit à une diminution progressive de l'intensité de fluorescence (figure 25). Des mécanismes similaires interviennent dans la détection de nombreuses biomolécules (hémoglobine, ADN, *etc.*) par les CDs.^{150,151}

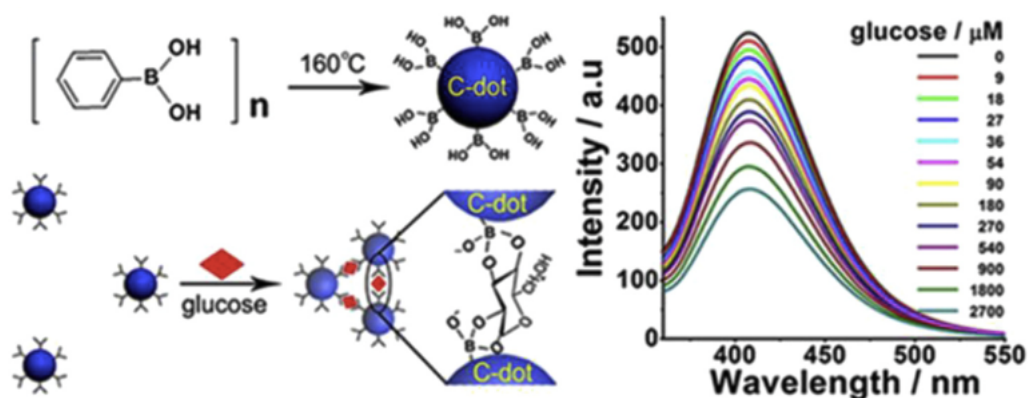


Figure 25. Représentation schématique de la synthèse de CDs à partir d'acide phénylboronique, le mécanisme de détection du glucose et les spectres de fluorescence des CDs pour différentes concentrations en glucose.¹⁴⁹

2.5.4. Les CDs dans le domaine biomédical

Comme on l'a déjà mentionné à plusieurs reprises, les CDs sont des particules sphériques de taille nanométrique, solubles dans l'eau, biocompatibles et faiblement toxiques, dont les propriétés de photoluminescence intrinsèques laissent entrevoir de nombreuses applications dans le domaine biomédical et notamment en imagerie. L'abondance de groupements chimiques à la surface de ces nanoparticules carbonées en fait des plateformes facilement modifiables par synthèse pour des applications de vectorisation de biomolécules et/ou d'agents thérapeutiques vers des cibles spécifiques. Enfin, certains CDs peuvent posséder une activité thérapeutique intrinsèque sous irradiation lumineuse. Ces différentes applications potentielles dans le domaine biomédical sont discutées ci-après.

2.5.4.1. Les CDs en imagerie médicale

Dans le domaine de l'imagerie en biologie, les nanocristaux de matériaux semi-conducteurs ou quantum dots (cf. chapitre 1) occupent une place de choix du fait de leurs propriétés intrinsèques de photoluminescence (spectres d'excitation larges, spectres d'émission étroits et couvrant toute la gamme spectrale, intensité lumineuse importante, stabilité chimique, grands déplacements de Stokes, résistance au photoblanchiment) bien supérieures à celles des fluorophores organiques couramment utilisés. Cependant, la libération de cations de métaux lourds dans un organisme vivant s'avère extrêmement problématique en termes de toxicité et ne peut être que partiellement maîtrisée par une

modification de la surface de ces particules. En effet, ces modifications sont souvent instables dans le temps et toute alternative à l'utilisation de métaux lourds pour fabriquer des quantum dots revêt un intérêt évident. Dans ce contexte, la récente découverte des CDs qui combinent à la fois les propriétés de photoluminescence des semi-conducteurs, une bonne biocompatibilité et une faible toxicité, a attiré l'attention d'un grand nombre de chercheurs dans le but d'étudier et d'exploiter le potentiel qu'ils peuvent offrir en imagerie.

L'observation des CDs par imagerie de fluorescence dans des cellules en culture permet, d'une part, de suivre l'internalisation des nanoparticules et, d'autre part, de les localiser dans les différents compartiments cellulaires. Bien que le mécanisme exact d'internalisation cellulaire des CDs ne soit pas encore parfaitement élucidé, il est admis que ces nanoparticules pénètrent dans les cellules principalement par endocytose. De nombreuses études ont ainsi permis de situer les CDs principalement au niveau de la membrane plasmique et dans le cytoplasme de la cellule (figure 26).¹⁵²⁻¹⁵⁴ Néanmoins, Yang *et al.* ont conçu un système dans lequel les CDs sont conjugués à un peptide qui facilite la pénétration à travers les pores nucléaires.¹⁵⁵ De la même manière, il a été démontré que la fonctionnalisation des CDs par des ligands spécifiques (acide folique, transferrine, *etc.*) permet d'induire une reconnaissance sélective par des récepteurs surexprimés à la surface des cellules cancéreuses, témoignant ainsi du fort potentiel de ces nanoparticules dans le diagnostic médical.^{156,157}

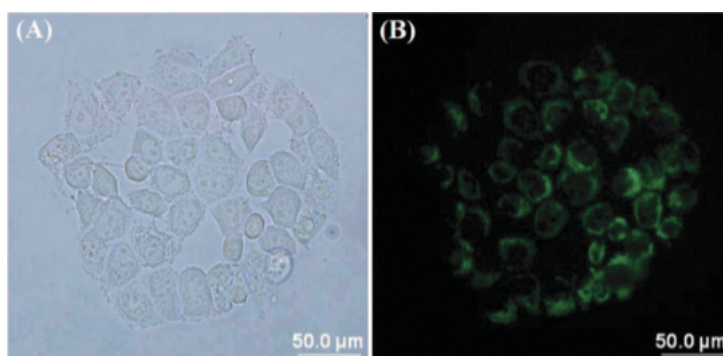


Figure 26. Images de microscopie confocale de cellules incubées par des CDs. (A) À la lumière du jour. (B) Sous excitation lumineuse (460-480 nm).¹⁵³

Du fait de son incroyable sensibilité, l'imagerie par fluorescence est particulièrement efficace à l'échelle moléculaire ou cellulaire. Elle nécessite cependant quelques ajustements pour une utilisation optimale sur des organismes vivants. En effet, l'imagerie par fluorescence

in vivo impose des contraintes à l'utilisateur du fait de la présence sur le trajet optique de nombreux éléments biologiques, responsables de l'absorption et de la diffusion du rayonnement lumineux (d'excitation et d'émission). De ce fait, une perte importante d'intensité du signal de fluorescence est observée. Un autre problème majeur rencontré dans ce type d'imagerie est l'auto-fluorescence (ou fluorescence naturelle) émise par de nombreuses structures biologiques présentes dans les fluides et les tissus, et qui engendre une diminution importante du contraste de l'image. Pour pallier ces difficultés, la stratégie communément utilisée consiste à se placer dans une fenêtre spectrale située principalement dans le proche infra-rouge (650-900 nm). En effet, à de telles longueurs d'ondes, l'absorption du rayonnement par les tissus vivants est relativement faible (figure 27). Par ailleurs, lorsque les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission augmentent, la lumière est nettement moins diffusée ce qui permet une plus grande sensibilité et une pénétration tissulaire qui peut aller jusqu'à plusieurs centimètres. Dans cette fenêtre spectrale, on échappe également à l'auto-fluorescence qui se manifeste principalement dans la gamme allant de 300 à 600 nm. Enfin, les longueurs d'ondes situées dans le proche infra-rouge sont peu énergétiques et présentent donc moins de risques pour les cellules et tissus biologiques.

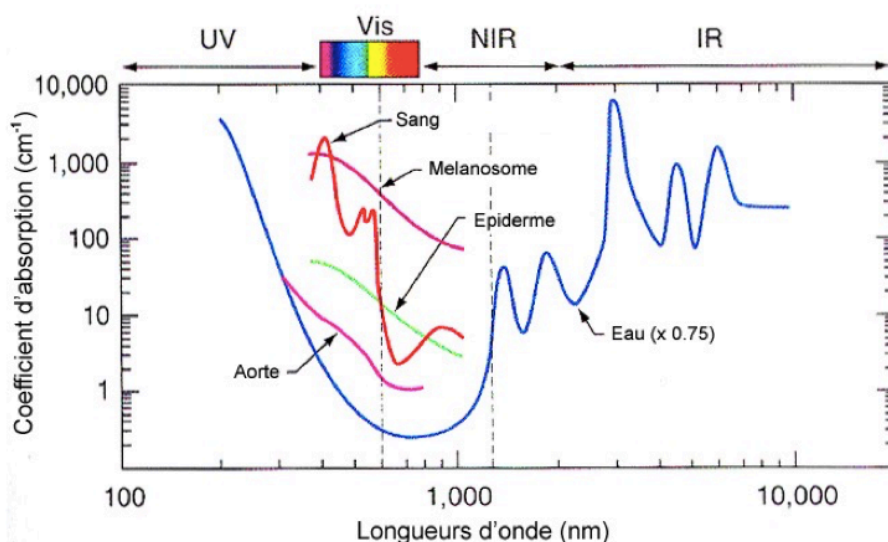


Figure 27. Coefficients d'absorption de différents tissus organiques en fonction de la longueur d'onde.¹⁵⁸

La très grande majorité des CD produits à ce jour présentent des longueurs d'ondes d'absorption et d'émission dans la région de l'UV ou du visible. De nombreux efforts ont donc été menés dans le but de décaler ces longueurs d'ondes vers le proche infra-rouge. Ainsi, Hu *et al.* ont été les premiers à proposer une méthode permettant de moduler l'émission de PL

des CDs sur toute la gamme du visible (400-710 nm) en faisant varier les conditions réactionnelles dans lesquelles ils sont préparés.¹⁵⁹ Cependant, l'efficacité de fluorescence des nanoparticules obtenues est relativement faible (rendements quantiques de l'ordre de 6 %). Plus récemment, Ding *et al.* ont développé des CDs synthétisés à partir d'acide citrique et d'éthylènediamine dans le formamide, présentant un rendement quantique de 53 % et dont les propriétés de PL ($\lambda_{\text{ém.}} = 627 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{exc.}} = 564 \text{ nm}$) se rapprochent de la fenêtre spectrale optimale pour les applications en imagerie médicale.¹⁶⁰ Enfin, un dernier exemple porte sur des CDs dont la synthèse a été réalisée à partir de glutathion et de formamide, et qui présentent des caractéristiques de PL remarquables.¹⁶¹ En effet, ces nanoparticules sont capables d'émettre de la fluorescence dans le proche infra-rouge ($\lambda_{\text{ém.}} = 683 \text{ nm}$) par absorption bi-photonique, ce qui réduit de moitié l'énergie du photon incident et permet ainsi de déplacer la longueur d'onde d'excitation ($\lambda_{\text{exc.}} = 850 \text{ nm}$).

Bien que les CDs aient été initialement développés pour leurs propriétés optiques intrinsèques dans le but de constituer une alternative viable aux quantum dots, il est important de souligner que la tendance actuelle évolue vers le développement d'agents multimodaux qui combinent les avantages de différentes techniques d'imagerie. Ainsi, des CDs photoluminescents ont récemment été modifiés pour offrir également du contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM), avec l'intention de proposer des outils qui présentent à la fois une grande sensibilité, une très bonne résolution spatiale et une pénétration tissulaire importante. Une telle plateforme a été développée pour la première fois par Bourlinos *et al.*, par décomposition thermique d'un sel organique en présence d'un complexe de gadolinium (III).¹⁶² Les CDs obtenus ont montré des propriétés de PL intéressantes sous irradiation lumineuse, un temps de relaxation T1 important et comparable à celui du Gadovist® (un agent de contraste commercial pour l'IRM), une bonne solubilité dans l'eau et une faible toxicité. Par ailleurs, une autre étude a permis de mettre en évidence qu'une substitution du gadolinium par de l'oxyde de fer dans la préparation des CDs permet également une utilisation de ces constructions comme agent de contraste en IRM.¹⁶³

Il est également possible de combiner les propriétés de PL des CDs avec d'autres techniques d'imagerie. C'est le cas par exemple de l'imagerie photo-acoustique qui est basée sur la génération d'ultrasons par une particule soumise à une irradiation laser. Wu *et al.* se sont ainsi basés sur la capacité de leurs CDs à absorber la lumière dans le proche infra-rouge dans le but de concevoir une image photo-acoustique de ganglions lymphatiques *in vivo*.¹⁶⁴

2.5.4.2. Les CDs, agents théranostiques

L'utilisation des CDs en médecine ne se limite pas uniquement à des applications en imagerie pour le diagnostic médical. Ces nanoparticules peuvent également être utilisées en tant que vecteurs de principes actifs et ainsi permettre la libération contrôlée d'agents thérapeutiques au sein de cibles spécifiques. La présence de très nombreux groupements chimiques à la surface des CDs permet en effet une interaction simple et efficace avec une grande variété de molécules et biomolécules à visée thérapeutique. D'autre part, le rapport surface sur volume important des CDs leur offre la possibilité de charger de grandes quantités de principes actifs, d'accroître leur concentration au niveau des sites d'intérêts et de réduire considérablement les effets secondaires indésirables liés à leur toxicité intrinsèque, améliorant de ce fait l'efficacité thérapeutique du traitement.

Ainsi, de nombreuses équipes se sont penchées sur l'étude du potentiel que peuvent présenter les CDs pour véhiculer et délivrer de grandes quantités de molécules anticancéreuses au sein de cibles spécifiques. L'association drogue-CD peut se faire de manière covalente, en faisant le plus souvent intervenir des liaisons peptidiques, ou de manière non-covalente par l'intermédiaire de liaisons π - π , d'interactions électrostatiques ou de liaisons hydrogènes. Ainsi, Zheng *et al.* ont développé une plateforme théranostique à partir de CDs et d'oxaliplatine en utilisant un couplage chimique (EDC/NHS).¹⁶⁵ Les résultats obtenus ont démontré que ce système intègre à la fois les propriétés optiques des CDs et les performances thérapeutiques de l'oxaliplatine. Par ailleurs, pour une efficacité thérapeutique optimale, il est parfois nécessaire de fonctionnaliser les CDs avec des ligands spécifiques dans le but d'atteindre différents compartiments cellulaires. En effet, de nombreuses molécules anticancéreuses ne possèdent une activité thérapeutique efficace qu'au sein de certains organites. Dans ce contexte, Yang *et al.* ont couplé leurs CDs à un segment peptidique qui permet de franchir la membrane nucléaire dans le but de délivrer de manière efficace la doxorubicine, un agent intercalant de l'ADN, dans le noyau.¹⁶⁶ Les résultats obtenus ont confirmé, d'une part, que l'activité anticancéreuse de la plateforme théranostique est bien supérieure à celle de la doxorubicine non-conjuguée et, d'autre part, que les CDs dopés sont principalement localisés dans le noyau. De la même manière, une fonctionnalisation des CDs par des ligands spécifiques des cellules cancéreuses (acide folique, transferrine) permet une discrimination efficace par rapport aux cellules saines et une efficacité thérapeutique

renforcée. Les propriétés optiques intrinsèques des nanoparticules produites sont, en outre, conservées et permettent un suivi par imagerie de fluorescence.^{167,168}

Un autre aspect de la vectorisation des principes actifs où les propriétés des CDs présentent un intérêt particulier se rapporte à la thérapie génique. En effet, la découverte de ces derniers a permis le développement d'une nouvelle classe de vecteurs non-viraux pour la délivrance de gènes. Liu *et al.* ont ainsi été les premiers à développer de tels vecteurs.¹⁶⁹ Ils ont notamment mis en évidence le rôle crucial du polyéthylèneimine (PEI) dans leur construction qui permet, à la fois, de passiver la surface des CDs et ainsi d'augmenter considérablement l'intensité de fluorescence de ces particules, de complexer l'ADN par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques entre les amines, chargées positivement, situées à la surface de la particule et les groupements phosphates, chargés négativement, de l'acide nucléique et, enfin, de libérer l'information génétique dans la cellule par échappement endosomal de l'acide nucléique grâce au phénomène d'éponge à protons.¹⁷⁰ Les travaux réalisés montrent un suivi efficace de l'internalisation cellulaire des complexes CD/ADN par fluorescence, une efficacité de transfection *in vitro* comparable à celle d'un agent de transfection standard (bPEI25k) et une toxicité réduite. De nombreuses autres études ont alors porté sur le potentiel de ces nanoparticules carbonées dans la vectorisation d'ADN mais aussi de siARN, *in vitro* sur différentes cultures cellulaires et *in vivo* chez la souris et le rat, notamment.^{171,172}

Au regard des dernières avancées dans le développement de plateformes théranostiques à base de CDs et du fort potentiel de ces nanoparticules en chimiothérapie et en thérapie génique, l'idée de concevoir de nouveaux systèmes permettant la co-délivrance d'acides nucléiques et de molécules anticancéreuses émerge progressivement. À ce jour, Wang *et al.* sont les seuls à avoir développé des CDs amphiphiles qui permettent la vectorisation d'ADN, de siARN et de doxorubicine.¹⁷³ Ces travaux avant-gardistes laissent entrevoir de nouvelles perspectives dans l'utilisation des CDs pour des applications en combinaison.

Enfin, en parallèle des plateformes théranostiques vues jusqu'à présent et dans lesquelles les CDs assurent le transport de principes actifs vers des cibles spécifiques, d'autres peuvent également présenter une activité thérapeutique intrinsèque. En effet, certains CDs sont capables de convertir l'énergie lumineuse en chaleur (activité photo-thermique) et/ou en production de radicaux libres et d'espèces oxygénées cytotoxiques (activité photo-

dynamique), induisant ainsi la mort cellulaire par ablation photo-induite (figure 28). Ces nanoparticules théranostiques de nouvelle génération permettent ainsi de réduire significativement la complexité des différents systèmes vus précédemment qui nécessitent généralement de nombreuses étapes de synthèse et de purification. Dans ce contexte, Ge *et al.* sont parvenus à développer des CDs présentant des propriétés théranostiques intrinsèques tout-à-fait fascinantes.¹⁷⁴ En effet, les nanoparticules carbonées obtenues sont capables d'absorber la lumière sur toute la gamme du visible (400-700 nm) et d'émettre de la fluorescence dans le proche infra-rouge ce qui est, comme nous l'avons vu plus haut, essentiel pour de l'imagerie *in vivo*. Par ailleurs, ces CDs sont également capables de générer de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) et de la chaleur sous irradiation laser à 635 nm.

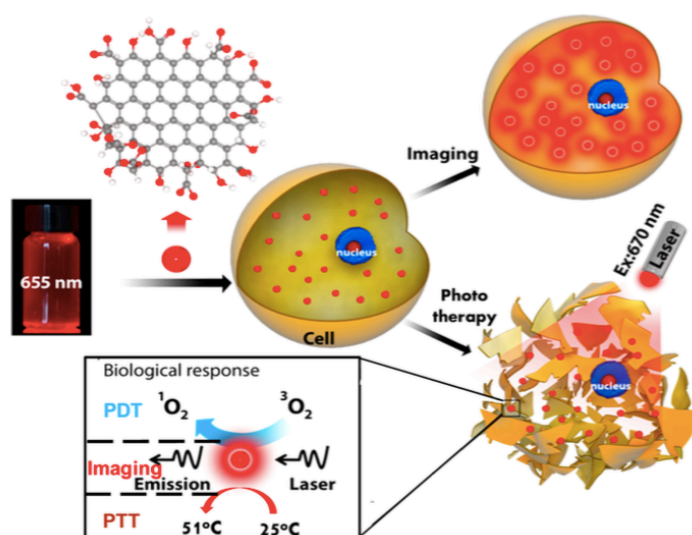


Figure 28. Représentation schématique des propriétés théranostiques intrinsèques des CDs. Sous irradiation laser, les CDs sont capables d'émettre de la fluorescence pour de l'imagerie *in vivo* mais également de convertir cette énergie dans la production d'espèces chimiques réactives et/ou en chaleur.¹⁷⁵

Ainsi, compte tenu de leurs propriétés extraordinaires et de leurs applications toujours plus nombreuses, les CDs attirent une attention grandissante des groupes de recherches à travers le monde et font l'objet d'études de plus en plus poussées. Cet incroyable engouement qu'ils suscitent se traduit par une évolution exponentielle du nombre de publications depuis leur découverte fortuite en 2004 (50 publications en 2010, près de 400 en 2014 et plus de 5000 à ce jour).

Chapitre 3. Synthèse de carbon dots pour des études modèles de la toxicité des nanoparticules

3.1. Contexte et objectifs

L'émergence et la part de plus en plus importante des nanotechnologies dans notre environnement et notre quotidien suscitent de nombreuses interrogations et inquiétudes concernant les effets toxiques à plus ou moins long terme que les nanoparticules pourraient avoir sur notre santé. De nombreuses études ont ainsi démontré qu'en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques, elles peuvent déclencher ou aggraver un certain nombre de pathologies respiratoires.⁹⁶ Ceci est directement lié au mode d'exposition, les nanoparticules en suspension dans l'air étant principalement absorbées par inhalation. Il est ainsi primordial d'établir un cadre réglementaire strict d'utilisation de ces nanoparticules et, donc, de connaître les risques et les dangers potentiels qu'elles peuvent faire peser sur la santé. L'étude de ces risques s'avère d'autant plus nécessaire que ces nanoparticules sont produites en recherchant des propriétés nouvelles et spécifiques et sont, le plus souvent, incomplètement caractérisées.

Dans ce contexte, notre objectif a été de développer un système modèle de nanoparticules nous permettant un contrôle précis de différents paramètres structuraux tels que la taille, la charge et la chimie de surface, et de les échantillonner sur une gamme suffisamment large pour permettre la mise en œuvre d'une étude toxicologique robuste et identifier les déterminants structuraux qui sont véritablement à l'origine de la toxicité des nanoparticules. La taille, la charge et la chimie de surface sont en effet des caractéristiques qui peuvent *a priori* déterminer la réactivité de surface des nanoparticules, c'est-à-dire leur capacité à interagir avec leur environnement immédiat. Elles sont donc susceptibles de conditionner l'interaction des nanoparticules avec les milieux biologiques, et notamment avec les protéines du milieu qui s'adsorbent rapidement pour former la "protein-corona"^{176,177} et les surfaces cellulaires, au point de modifier leur devenir (adressage, élimination...) dans l'organisme ou à l'échelle de la cellule, mais également leur toxicité. Par ailleurs, à notre connaissance, aucune étude détaillée parue dans la littérature n'a fait état d'une possible relation entre la structure et l'activité toxicologique des carbon dots. Les particules que j'ai pu générer au cours de ce travail ont été caractérisées finement et certaines ont été sélectionnées afin de constituer un échantillonnage large et représentatif. Celui-ci a fait l'objet d'une évaluation des caractéristiques toxicologiques (tests MTT et LDH) et de la

biocompatibilité (mesure de différents paramètres liés à l'inflammation) de chacun des éléments, *in vitro*, sur différentes lignées cellulaires humaines, et *in vivo*, chez la souris.

3.2. Optimisation de la purification des CDs

Avant de nous lancer dans la description des différents CDs composant cette librairie et de leurs propriétés physico-chimiques diverses, nous allons nous focaliser quelques instants sur une étape particulièrement importante du processus de préparation des nanoparticules, leur purification. En effet, dans la très grande majorité des publications concernant les carbon dots, très peu d'informations sont fournies sur les modalités de purification, la pureté des échantillons obtenus ou encore sur les quantités de matériels produits (rendements). Ainsi, dans le cadre de cette thèse, un gros travail a été réalisé dans ce sens afin d'obtenir des particules d'une grande pureté. Cela est particulièrement essentiel pour nos travaux étant donné que les particules synthétisées feront toutes l'objet d'études toxicologiques ou de transfection (que nous détaillerons dans le chapitre suivant), et que toute contamination de l'échantillon pourrait conduire à une mauvaise interprétation des données récoltées.

Dans cette optique, différentes méthodes de purification des carbon dots ont donc été testées, telles que la chromatographie sur gel de silice, la chromatographie par échange d'ions, la chromatographie d'exclusion stérique et la dialyse. Il s'est avéré que cette dernière méthode, la plus utilisée dans la littérature pour la purification des carbon dots, permet de fournir les résultats les plus concluants et d'obtenir des suspensions de particules dans lesquelles la quasi-totalité des réactifs de départ n'ayant pas réagi sont éliminés. En effet, la dialyse est une méthode de purification basée sur la diffusion des molécules à travers une membrane polymérique perméable ou semi-perméable, selon un gradient de concentration. En fonction de la limite d'exclusion ou "cut-off" de cette membrane, certaines molécules (les plus petites) pourront la traverser et ainsi être éliminées du sac de dialyse, tandis que d'autres (les plus grosses) resteront piégées à l'intérieur. Il est important de noter que le "cut-off" de la membrane est donnée par le fournisseur, à titre indicatif, pour des protéines globulaires. Aussi, toute correspondance avec des nano-objets de nature différente peut être hasardeuse. Quoiqu'il en soit, les particules carbonées dont la taille est supérieure au "cut-off" membranaire seront retenues à l'intérieur du sac de dialyse, alors que les différents fragments moléculaires résiduels n'ayant pas réagi et les plus petites particules seront exclus.

Afin de maîtriser au mieux la purification des nanoparticules par dialyse, nous avons dans un premier temps caractérisé la cinétique des dialyses des différents réactifs mis en jeu dans la fabrication des carbon dots (acide citrique, PEI, PEG...), en fonction du “cut-off” de la membrane et du milieu de dialyse. Les données récoltées ont ainsi permis d’optimiser notre méthode de purification pour chaque particule en éliminant le maximum de molécules résiduelles en un minimum de temps. Ceci nous a également permis d’améliorer le rendement de nos préparations, en optimisant la perte des plus petites nanoparticules. Les résultats acquis au cours de ces études ont montré que les petites molécules organiques, *i.e.* hors molécules polymériques (PEI ou PEG), sont efficacement éliminées du sac de dialyse au bout de 24 heures en utilisant un “cut-off” membranaire de 100-500 Da. En revanche, comme le montre la figure 29, la dialyse du bPEI600 (polyéthylèneimine branché de poids moléculaire 600 Da) sur une membrane de 1000 Da est beaucoup plus efficace que sur une membrane de 100-500 Da (4-5 % de PEI résiduel contre 13-14 %, respectivement). Par ailleurs, la dialyse s’est révélée plus difficile à mettre en œuvre pour l’élimination du bPEI25k puisque moins de 70 % du polymère est éliminé après 24 heures de dialyse sur une membrane présentant un “cut-off” de 3500 Da. Des temps de dialyse plus longs et/ou des “cut-off” membranaires plus importants sont donc nécessaires pour éliminer efficacement ce polymère de haut poids moléculaire. L’utilisation d’une membrane avec un “cut-off” plus élevé pose cependant le problème de la rétention efficace des nanoparticules dans le sac de dialyse, un “cut-off” de 40 kDa correspondant théoriquement à une taille de pores de l’ordre de 5 nm, conduirait à la

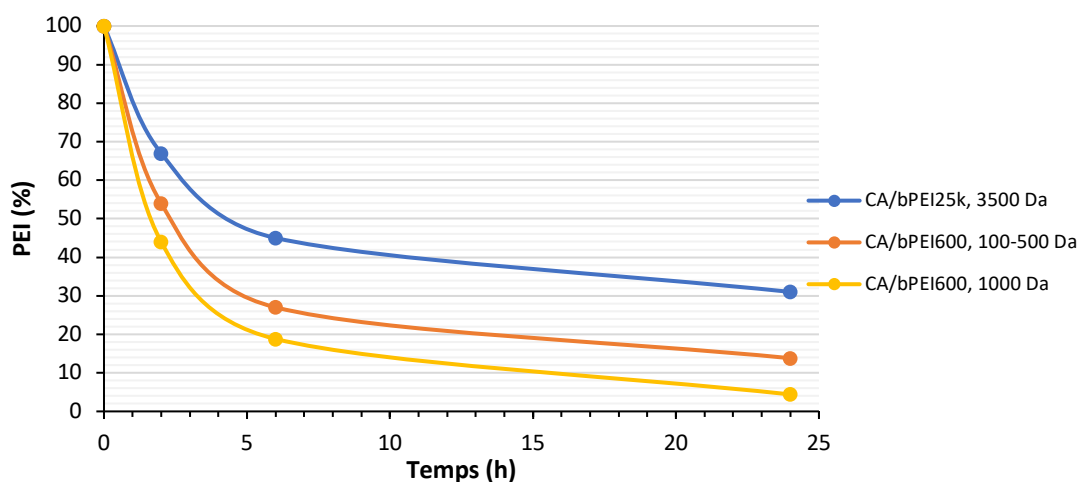


Figure 29. Élimination du PEI par dialyse. Des PEI ramifiés de différents poids moléculaires (25 kDa et 600 Da) et des membranes avec différents “cut-off” ont été utilisées. La quantité de PEI résiduel dans le sac de dialyse a été déterminé par dosage RMN d’échantillons prélevés au cours du temps.

perte des nanoparticules les plus petites. D'autre part, les courbes de décroissance du PEI résiduel ci-dessus ont pu être obtenues à partir de l'analyse de spectres de RMN de prélèvements réalisés à différents temps, provenant d'un même échantillon et en ne changeant pas les eaux de dialyse, si bien que les données collectées fournissent des informations sur la vitesse d'élimination du PEI au cours du temps. Ainsi, dans les premières heures de dialyse, le différentiel de concentration entre l'intérieur et l'extérieur du sac de dialyse est important, ce qui induit une élimination rapide du PEI et se traduit par une forte pente de la courbe. Au cours du temps, ce gradient de concentration diminue, d'où un écrasement de la courbe. Les résultats obtenus au cours de ces expériences donnent donc une indication sur les quantités maximales de PEI résiduel dans le sac de dialyse. Des remplacements fréquents du milieu contre lequel est effectué la dialyse permettront de réduire davantage la quantité de molécules résiduelles dans l'échantillon. Les cinétiques de dialyse de différents poly(éthylène glycol) (PEG₅₅₀, PEG₂₀₀₀ et PEG₅₀₀₀) ont également été mesurées et ont permis de mettre en lumière que cette méthode de purification n'est efficace que pour le PEG le plus court de cette série (PEG₅₅₀), pour lequel près de 90 % du matériel est éliminé au bout de 24 heures sur une membrane présentant un "cut-off" de 1000 Da. Pour les PEG plus longs (PEG₂₀₀₀ et PEG₅₀₀₀), des pertes importantes de matériel ont été constatées en faisant le bilan des masses en fin de dialyse (quantité de matériel recueillie à l'intérieur et à l'extérieur du sac) et ce, même en utilisant des "cut-off" membranaires pouvant aller jusqu'à 14 kDa. Cela suggère qu'une grande partie de ces molécules polymériques s'adsorbent sur la membrane au cours de la dialyse, obstruant peut-être les pores de cette dernière et empêchant de ce fait que d'autres molécules sortent du sac.

Enfin, il est important de prendre du recul par rapport à ces résultats, obtenus avec les réactifs utilisés pour la synthèse des CDs. En effet, au cours de la réaction de pyrolyse impliquant ces molécules, des réactions de polymérisation et/ou de fragmentation ont lieu et, donc, les impuretés à éliminer et leurs cinétiques de dialyse peuvent être différentes de celles des réactifs de départ.

En définitive et au regard des résultats acquis au cours de ces études préliminaires, un protocole standard de purification de nos nanoparticules carbonées a été établi. Ainsi, pour tous les CDs produits au cours de cette thèse, la durée de dialyse (24 heures) ainsi que le rythme du changement du milieu de dialyse (à 1, 3 et 7 heures) ont été rigoureusement respectés. Seul le "cut-off" de la membrane utilisée a pu varier, en fonction des réactifs mis

en jeu. En effet, lorsque les CDs ont été produits à partir de petites molécules organiques, un “cut-off” de 100-500 Da a été utilisé, tandis que pour des CDs préparés à partir de molécules polymériques de type bPEI600 ou PEG₅₅₀, un “cut-off” de 1000 Da a été sélectionné. Enfin, pour des particules produites à partir de PEG plus longs (PEG₂₀₀₀ et PEG₅₀₀₀), la purification par dialyse n’a pas permis d’éliminer de manière satisfaisante les résidus et une extraction liquide-liquide (CH₂Cl₂/HCl 0,1N) a été privilégiée.

3.3. Optimisation des conditions de caractérisation des CDs

Dans le but de fournir au mieux une représentation fiable et précise des différentes caractéristiques physico-chimiques de chacun des CDs composant notre librairie de nanoparticules, une optimisation et une standardisation des conditions de caractérisation de ces particules ont été nécessaires. Ainsi, le protocole de mesure, la concentration de l’échantillon ou encore le pH du milieu dans lequel sont effectuées ces mesures sont autant de paramètres expérimentaux sur lesquels notre attention s’est portée pour la détermination de la taille et de la charge des CDs par DLS.

En premier lieu, de nombreuses mesures de tailles ont été réalisées sur différents échantillons et ont permis de mettre en évidence d’une diminution significative du nombre d’agrégats lorsque les mesures de tailles sont réalisées après une mesure de potentiel zêta. Ce phénomène peut s’expliquer par le fait qu’au cours de la détermination de la mobilité électrophorétique d’une particule, des forces de cisaillement sont exercées permettant ainsi aux nano-objets de se désagréger, le cas échéant. Par ailleurs, il est bien documenté que la présence d’une faible quantité de “grosses” particules (100 nm) dans un échantillon suffit à masquer totalement les particules les plus petites (20 nm) (figure 30).¹⁷⁸ Ceci provient du fait que, selon l’approximation de Rayleigh, l’intensité de la lumière diffusée par une particule est proportionnelle à son diamètre élevé à la puissance 6. En conséquence, un protocole de mesure a été mis en place dans lequel plusieurs mesures de taille et de potentiel zêta sont réalisées alternativement sur les échantillons. En général, au bout de trois cycles de mesures, la mesure de la taille des échantillons atteint un palier et reste stable.

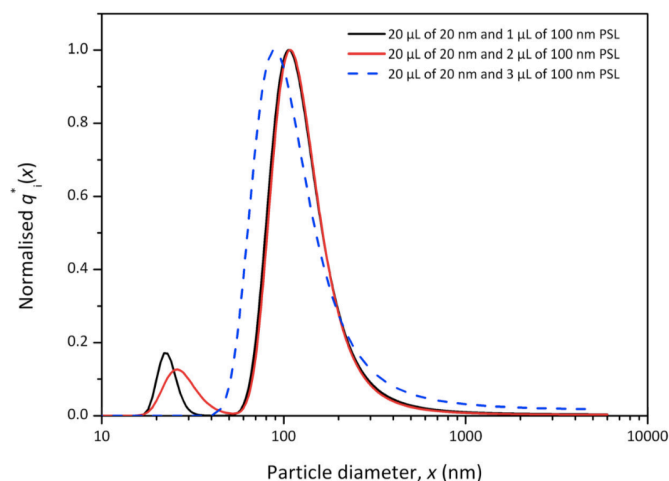


Figure 30. Résultats de mesures de DLS réalisées sur un échantillon de nanoparticules de 20 nm dans lequel on a introduit une quantité croissante de particules de 100 nm.¹⁷⁸

Dans le but de déterminer les conditions optimales de mesures et assurer, par la même occasion, une meilleure reproductibilité de nos résultats, nous avons étudié l'influence de la concentration de nos échantillons sur les mesures par DLS. Les résultats obtenus ont ainsi démontré une forte dépendance de la taille et du potentiel zêta des particules. En effet, comme le montre la figure 31, une dilution de l'échantillon conduit, de manière surprenante, à une augmentation exponentielle de la taille ainsi qu'à une diminution significative du potentiel zêta des particules. Cet effet a déjà été rapporté dans la littérature et a été imputé à la présence de « poussières » dans l'échantillon qui altèrent d'autant plus la mesure que celui-ci est dilué.¹⁷⁹ Compte tenu de ces observations, nous avons décidé d'effectuer toutes nos mesures en DLS sur des échantillons à une concentration fixe de 1,0 mg/mL, ce qui nous a semblé être un compromis acceptable pour acquérir des données fiables sur les carbon dots en termes de taille et de potentiel zêta.

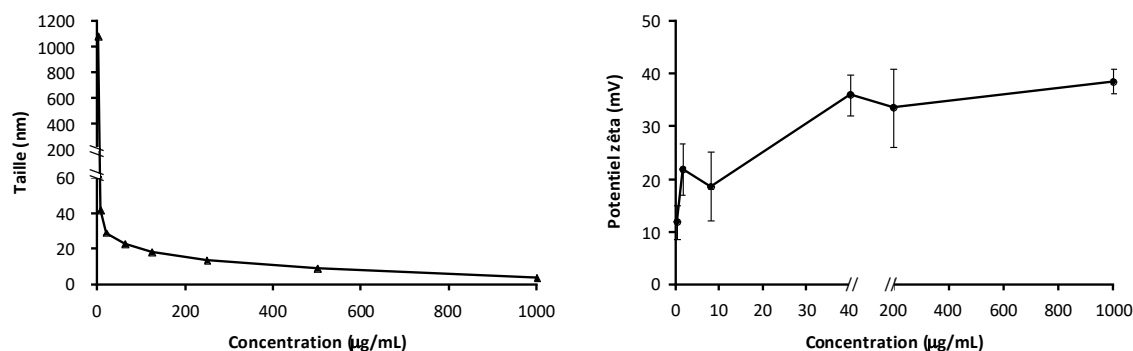


Figure 31. Mesures de la taille (à gauche) et du potentiel zêta (à droite) d'un échantillon de CDs en fonction de la concentration.

Enfin, pour une meilleure caractérisation des propriétés physico-chimiques des CDs en milieu biologique, toutes les mesures de taille et de potentiel zêta ont été réalisées à pH physiologique (pH 7,4). En effet, il est important de le souligner ici, en raison du fait que la très grande majorité des publications portant sur les CDs ne donnent aucune indication sur le pH auquel les mesures ont été réalisées. Or, ce paramètre influe grandement sur la stabilité colloïdale des particules en solution, si bien qu'en fonction du pH et de la chimie de surface de la particule, ses caractéristiques de tailles et de charges peuvent varier considérablement, surtout lorsque la surface de la nanoparticule présente des groupements ionisables, comme des amines ou des acides carboxyliques. Ainsi, la quasi-totalité des particules avec lesquelles nous avons travaillé tout au long de cette thèse sont en réalité des petits agrégats de particules, qui présentent donc des tailles supérieures à celles qui sont le plus souvent rapportées dans la littérature (< 10 nm). En milieu plus acide (pH 3-4), les CDs cationiques sont plus fortement chargés et, donc, jouissent d'une meilleure stabilité colloïdale. Ceci a régulièrement été constaté avec nos particules qui, dans ces conditions, présentent des diamètres hydrodynamiques qui sont mesurés entre 5 et 10 nm.

3.4. Échantillonnage des CDs

Pour générer des carbon dots avec une grande diversité de propriétés, nous avons utilisé des approches "bottom-up" permettant de construire les nanoparticules à partir de précurseurs moléculaires. Nous avons employé des sources de carbone variées (acide citrique, citrates divers, glucose...) ainsi que divers additifs et/ou agents de passivation (oligoamines, poly(éthylène glycol), acides minéraux...) pour moduler les propriétés des nanoparticules (taille, charge, chimie de surface, fluorescence...). Nous avons également mis en œuvre différentes modalités de réaction (réactions solvothermales à pression atmosphérique et sous haute pression, pyrolyse sous irradiation micro-onde à pression atmosphérique et sous haute pression en conditions solvothermales, pyrolyse à pression atmosphérique sous chauffage "conventionnel"). Pour augmenter encore la diversité structurale des nanoparticules produites, certains des carbon dots ainsi préparés ont fait l'objet de post-fonctionnalisations spécifiques, notamment pour en moduler la charge et la chimie de surface (figure 32). Cette démarche nous a ainsi permis de produire une grande variété de nanoparticules avec des propriétés échantillonnées conformément à nos objectifs (figure 33).

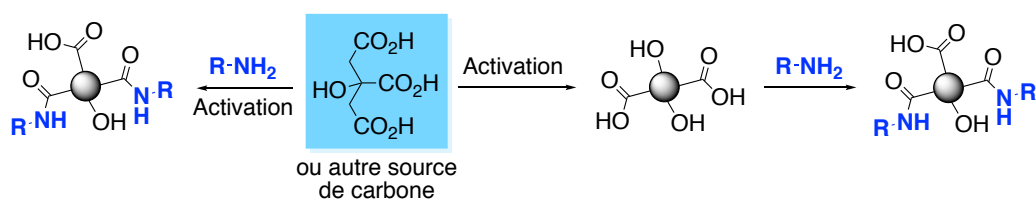


Figure 32. Voies de synthèses étudiées pour la préparation des nanoparticules carbonées. Les carbon dots ont été synthétisés “de novo”, en une étape (voie de gauche) ou ont été élaborés à partir d’une nanoparticule générique qui a ensuite fait l’objet d’une étape de post-fonctionnalisation (voie de droite).

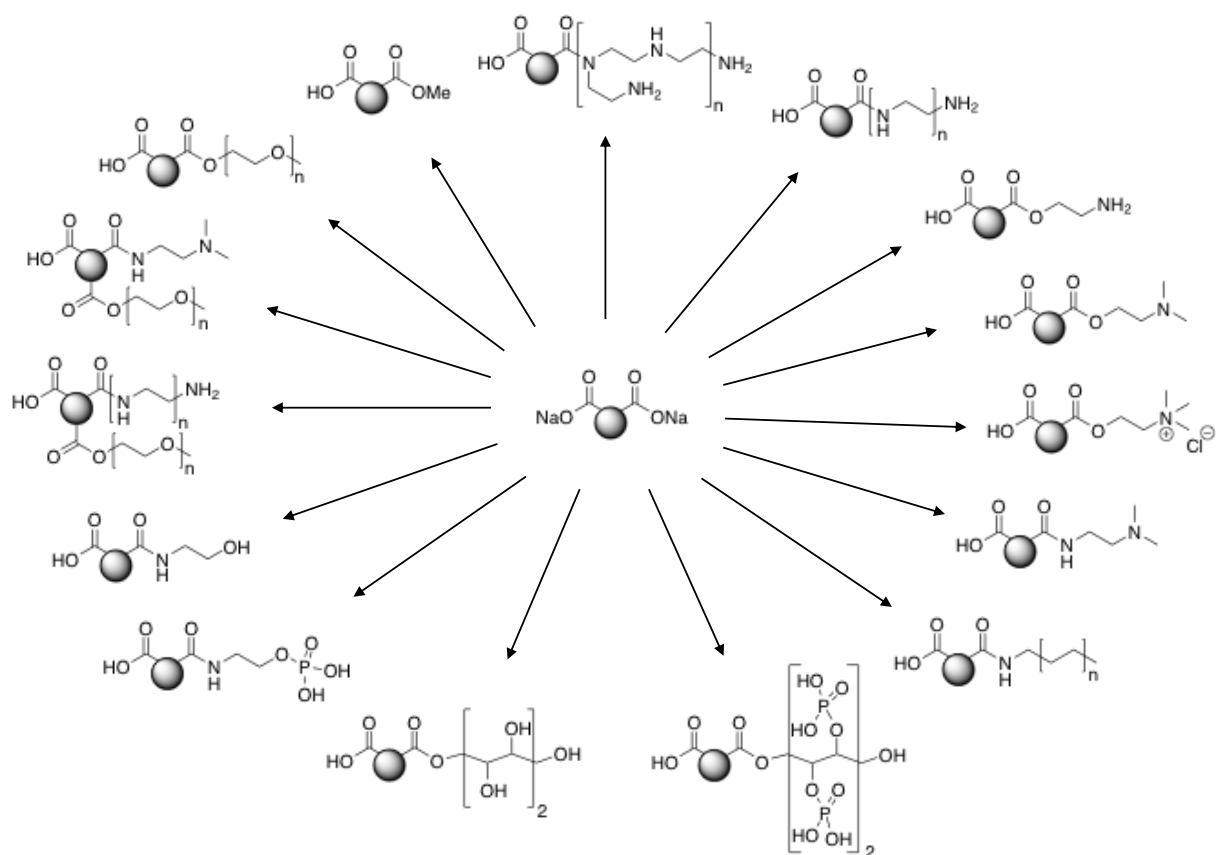


Figure 33. Sélection de quelques éléments représentatifs de la chimiothèque de carbon dots constituée au cours de ce travail et utilisés ultérieurement pour des études toxicologiques.

3.4.1. CDs synthétisés selon la voie “de novo”

Une première approche, dite “de novo”, a permis de concevoir des particules carbonées de taille nanométrique, aux propriétés physico-chimiques modulables, en une seule étape (figure 32, voie de gauche). Elle implique la pyrolyse d’une source carbonée, en l’occurrence l’acide citrique, en présence de différents composés aminés jouant le rôle

d'agent de passivation. D'après la littérature, les agents de passivation sont notamment utilisés afin de moduler les propriétés photo-physiques des CDs obtenus. Dans le cadre de notre étude, l'utilisation de différents agents de passivation vise principalement à produire des particules qui présentent une chimie de surface variée : amines primaires, secondaires ou tertiaires (espèces cationiques titrables), ammoniums quaternaires (espèces cationiques non-titrables), alcools (groupements hydrophiles neutres), carboxylates (espèces anioniques titrables), phosphates (espèces anioniques non-titrables, tout du moins dans une gamme de pH physiologiquement pertinente), des groupements alkyles (hydrophobes) ou encore des chaînes poly(éthylène glycol) ("furtives"). De nombreuses études ont donc été réalisées afin de rendre compte de l'influence de différents paramètres structuraux sur les propriétés physico-chimiques des CDs.

3.4.1.1. Influence des conditions d'activation

Une première étude a porté sur l'influence des différentes conditions d'activation utilisées dans la synthèse des CDs (réactions solvothermales à pression atmosphérique et sous haute pression, pyrolyse au four à micro-onde domestique, irradiation sous micro-ondes en conditions solvothermales et sous haute pression, pyrolyse à haute température à pression atmosphérique) sur les propriétés des nano-objets fabriqués. Les données récoltées sont présentées dans le tableau 3. Elles montrent que les différentes particules synthétisées à partir d'un mélange d'acide citrique et de bPEI600 (dans un rapport 1/4 en poids), présentent des tailles et des potentiels zêta similaires et ce, quel que soit le mode d'activation utilisé. Par ailleurs, de nombreuses études dans la littérature ont fait état de l'importance considérable de l'incorporation de différents hétéroatomes, et d'atomes d'azote en particulier, au sein de la structure carbonée pour améliorer les propriétés de photoluminescence de ces particules.¹⁸⁰⁻¹⁸² Or, dans le cadre de cette étude, il semblerait qu'un autre facteur soit responsable des variations observées dans les propriétés photo-physiques des CDs synthétisés (notamment leur intensité de fluorescence) puisque la teneur en azote varie relativement peu dans cette série de nanoparticules. Cela laisse donc supposer que, en fonction du mode d'activation, la structure interne de la particule et/ou la disposition des atomes d'azote au sein de cette dernière est différente. Des études ont en effet montré que, en fonction de la nature des groupements azotés (pyridiniques, pyrroliques, graphitiques, amide, nitro...) et de

Tableau 3. Influence du mode d'activation sur les propriétés physico-chimiques de CDs préparés à partir d'un mélange d'acide citrique et de bPEI600 dans un rapport 1/4 en poids.

N°	Conditions d'activation	Taille* (nm)	Potentiel zêta* (mV)	Intensité de fluorescence** (u. a.)	N (%)	C (%)	H (%)
CD1	A	29,4 ± 3,3	+26,7 ± 1,0	0	13,8	26,6	7,4
CD2	B	15,3 ± 1,0	+26,8 ± 2,6	0,39	14,1	29,4	7,3
CD3	C	20,6 ± 3,6	+33,3 ± 1,8	0,51	14,8	29,9	7,2
CD4	D	20,7 ± 2,2	+32,0 ± 3,7	1,26	-	-	-

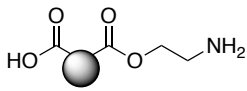
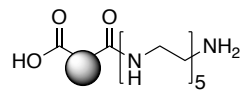
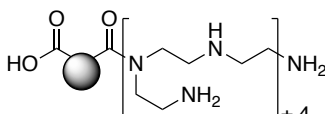
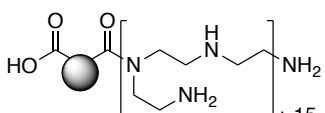
A : irradiation sous micro-ondes en conditions solvothermales et sous haute pression ; B : pyrolyse à haute température et à pression atmosphérique ; C : pyrolyse au four à micro-onde domestique ; D : réactions solvothermales sous haute pression. * Mesuré à pH 7,4. ** Déterminée par rapport à un échantillon de référence à une longueur d'onde correspondant au maximum d'excitation.

leurs proportions au sein de la structure du CD, des variations considérables sur les propriétés photo-physiques des nano-objets sont observées, notamment en ce qui concerne le rendement quantique de fluorescence.¹⁸³⁻¹⁸⁵ Cependant, à ce jour, nous n'avons pas eu l'occasion d'accéder à des outils nous permettant de confirmer ou d'infirmer ces différentes hypothèses. Ainsi, la microscopie électronique à haute résolution (HRTEM) et la spectroscopie Raman pourraient nous donner une idée plus précise sur la structure interne des particules et leur degré de cristallinité, tandis que la spectroscopie photo-électronique induite par les rayons X (XPS) pourrait nous apporter des informations complémentaires sur l'état électronique des différents éléments constituant la particule.

3.4.1.2. Influence de la source de carbone

Une autre étude a été davantage focalisée sur l'impact que pouvait avoir la nature de la source de carbone sur les propriétés physico-chimiques des particules obtenues (tableau 4). Dans le cadre de cette thèse, la très grande majorité des CDs ont été produits en utilisant l'acide citrique comme principale source carbonée, en raison notamment de sa facilité d'accès, de son faible coût et de sa capacité à former efficacement des nanoparticules. Par ailleurs, une grande partie des CDs synthétisés dans la littérature, selon une approche "bottom-up", fait intervenir ce composé dans le procédé de fabrication. Néanmoins, il nous a

Tableau 4. Influence de la nature de la source carbonée sur les propriétés physico-chimiques des CDs.

N°	Source de carbone	Agent de passivation	Taille* (nm)	Potentiel zêta* (mV)	Structure schématique
CD5 ^(1,3)	Acide citrique	EA	Agrégats	+11,4 ± 0,4	
CD6 ^(1,3)	Citrate de triéthyle		Agrégats	+14,0 ± 0,5	
CD7 ^(1,4)	Acide citrique	PEHA	36,4 ± 12,0	+18,6 ± 0,9	
CD8 ^(1,4)	Glucose		13,3 ± 1,9	+18,4 ± 1,2	
CD3 ^(2,4)	Acide citrique	bPEI600	20,6 ± 3,6	+33,3 ± 1,8	
CD9 ^(2,4)	Acide tartrique		9,2 ± 1,2	+31,3 ± 2,5	
CD10 ^(1,4)	Acide citrique	bPEI2k	15,4 ± 1,1	+31,4 ± 3,0	
CD11 ^(1,5)	bPEI2k		10,5 ± 2,8	+29,7 ± 2,8	

⁽¹⁾ CDs synthétisés par pyrolyse à haute température et à pression atmosphérique. ⁽²⁾ CDs synthétisés par pyrolyse au four à micro-onde domestique. ⁽³⁾ CDs produits à partir d'un rapport source de carbone/composé aminé (1/1, en poids). ⁽⁴⁾ CDs produits à partir d'un rapport source de carbone/composé aminé (1/4, en poids). ⁽⁵⁾ CDs produits à partir d'un seul réactif, étant à la fois source de carbone et composé aminé. * Mesuré à pH 7,4. EA : éthanolamine ; PEHA : pentaéthylènehexamine.

semblé intéressant d'étudier et de comparer, dans les mêmes conditions de synthèse, les propriétés des différents nano-objets obtenus en substituant l'acide citrique par d'autres sources de carbone (citrate de triéthyle, glucose, acide tartrique et bPEI2k) également souvent citées dans la littérature rapportant la fabrication de CDs. Les résultats acquis au cours de ces différentes expériences ont démontré que, pour un composé aminé donné, la charge en surface de la particule ne varie pas significativement en fonction de la nature de la source de carbone. Toutefois, nous avons pu observer que les particules carbonées synthétisées à partir d'acide citrique présentent systématiquement des tailles plus importantes que celles produites à partir des autres sources de carbone que nous avons testées, excepté dans le cas des particules obtenues avec l'éthanolamine comme agent de passivation (**CD5** et **CD6**). Cela pourrait s'expliquer par le fait que, au cours de la réaction de pyrolyse, l'acide citrique se déshydrate et se décarboxyle plus facilement, permettant de ce fait une polymérisation et une carbonisation plus efficace, et donc, une croissance plus rapide de la taille des particules.

Dans le cas de **CD5** et **CD6**, la faible charge en surface (potentiel zêta inférieur à 15 mV) ne permet pas une répulsion électrostatique suffisamment forte entre les particules qui tendent, de ce fait, à former des agrégats.

3.4.1.3. Influence de l'agent de passivation

Dans cette partie de notre étude, une série de CDs ont été synthétisés à partir d'acide citrique et d'agents de passivation présentant un nombre décroissant de motifs éthylèneimine (bPEI25k, bPEI2k, bPEI600, PEHA et DETA) dans le but d'étudier l'influence de celui-ci sur les caractéristiques des particules produites (tableau 5). L'introduction de ces différents composés aminés dans la fabrication des CDs (**CD12**, **CD10**, **CD2**, **CD7** et **CD13**) visait notamment à faire varier la densité de charges cationiques autour des particules ainsi que leurs propriétés de photoluminescence. Pour **CD12**, **CD10**, **CD2** et **CD7**, les mesures de taille et de potentiel zêta, obtenues par DLS, ont permis de mettre en évidence que plus le composé

Tableau 5. Influence de l'agent de passivation (nombre de motifs éthylèneimine décroissant) sur les propriétés physico-chimiques des CDs.

N°	Agent de passivation	Taille* (nm)	Potentiel zêta* (mV)	Intensité de fluorescence** (u. a.)	Structure schématique
CD12	bPEI25k	13,0 ± 0,7	+37,1 ± 3,4	0,24	
CD10	bPEI2k	15,4 ± 1,1	+31,4 ± 3,0	0,3	
CD2	bPEI600	15,3 ± 1,0	+26,8 ± 2,6	0,39	
CD7	PEHA	36,4 ± 12,0	+18,6 ± 0,9	0,85	
CD13	DETA	68,0 ± 1,2	+31,6 ± 1,1	0,71	

Tous les CDs de cette série ont été produits par pyrolyse à haute température à pression atmosphérique d'un mélange d'acide citrique et de composé aminé (1/4, en poids). * Mesuré à pH 7,4. ** Déterminée par rapport à un échantillon de référence à une longueur d'onde correspondant au maximum d'excitation. PEHA : pentaéthylènehexamine ; DETA : diéthylènetriamine.

aminé présente un nombre de motifs éthylèneimine important, plus la charge en surface des CDs augmente et plus le nombre d'agrégats observés diminue. Ceci peut s'expliquer par un accroissement des répulsions électrostatiques qui s'exercent entre les particules lorsque leur charge augmente, ce qui leur assure une meilleure stabilité colloïdale en solution. Cependant, **CD13**, dont la synthèse a été réalisée à partir de l'oligoamine la plus courte de la série (diéthylènetriamine, DETA), possède un potentiel zêta particulièrement élevé ainsi qu'une taille importante. Cette "anomalie" pourrait suggérer que les mécanismes de nucléation mis en jeu dans la synthèse des CDs varient en fonction de la nature ou de la taille de l'agent de passivation. Une autre hypothèse pourrait être que les potentiels zêta mesurés ne traduisent pas de manière effective la densité des charges cationiques présentes à la surface de la particule. Autrement dit, une augmentation du nombre de charges positives autour de la particule ne conduirait pas forcément à un potentiel zêta plus élevé, qui pourrait aussi dépendre de la distribution des charges dans l'espace (figure 34). Enfin, une dernière hypothèse pourrait être que la densité des amines à la surface de ces particules est différente en fonction de la taille (du nombre de motifs éthylèneimine) de l'agent de passivation, l'état d'ionisation d'un groupement titrable (*i.e.* amine) étant fortement dépendant de sa concentration lorsqu'il est confiné à une interface. Ce confinement peut en effet conduire à des variations importantes dans le pK_a apparent de ces fonctions chimiques et induire, de ce fait, un état de protonation différent.^{186–189}

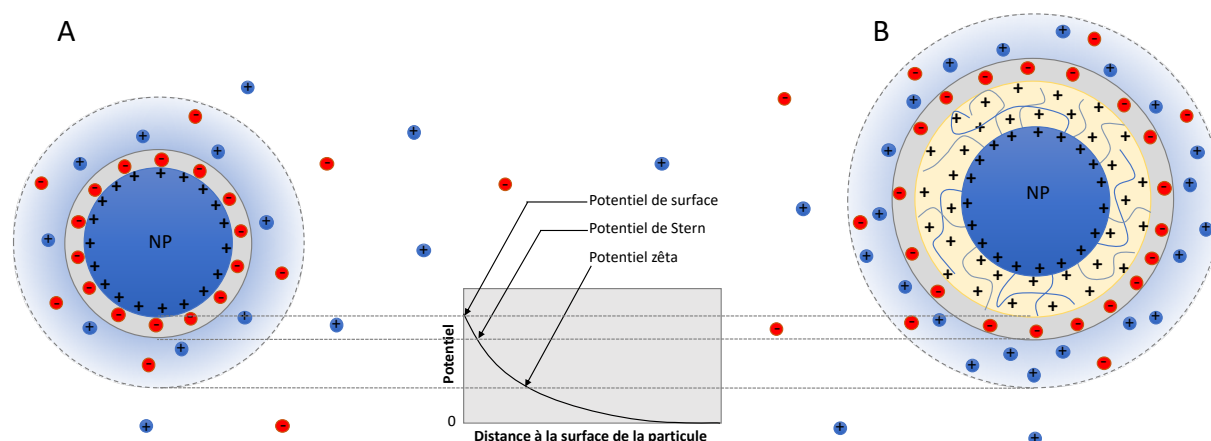


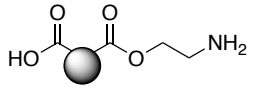
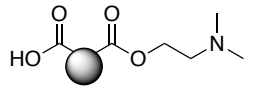
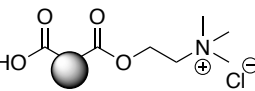
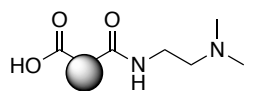
Figure 34. Représentation schématique d'une mesure de potentiel zêta réalisée sur deux nanoparticules présentant une densité de charges positives en surface différente (A : faible et B : forte).

Pour finir, les propriétés photo-physiques des CDs de cette série montrent également une tendance selon laquelle l'intensité de fluorescence émise par les CDs est d'autant plus élevée que l'agent de passivation mis en œuvre dans la synthèse possède un nombre de motifs éthylèneimine faible. Une fois encore, **CD13** ne suit pas totalement la tendance générale et, bien que sa fluorescence soit forte, elle l'est moins que celle de **CD7**. Des différences au niveau des mécanismes de polymérisation et de carbonisation des réactifs pourraient être invoquées pour expliquer ce résultat, une variation de la disposition des atomes d'azote dans le cœur et à la surface de la particule pouvant être à l'origine d'une modulation de ses propriétés photo-physiques.

3.4.1.4. Influence du caractère titrable ou non-titrable de l'agent de passivation

L'influence du caractère titrable ou non-titrable de l'agent de passivation sur les propriétés physico-chimiques des CDs a également été étudié (tableau 6). Ainsi, les nanoparticules **CD5**, **CD14** et **CD15** ont été synthétisées à partir d'éthanolamine, de *N,N*-diméthyléthanolamine et de chlorure de choline, respectivement. **CD5** et **CD14** sont censés être des nanoparticules cationiques titrables, alors que **CD15** doit *a priori* être cationique et non-titrable. Les analyses obtenues ont permis de mettre en lumière que les nano-objets fabriqués

Tableau 6. Influence du caractère titrable ou non-titrable de l'agent de passivation sur les propriétés physico-chimiques des CDs.

N°	Agent de passivation	Taille* (nm)	Potentiel zêta pH 7,4 (mV)	Potentiel zêta pH 3,0 (mV)	Structure schématique
CD5	EA	Agrégats	+11,4 ± 0,4	+27,8 ± 0,9	
CD14	DMEA	Agrégats	+2,9 ± 0,1	+32,1 ± 2,0	
CD15	Choline chl.	Agrégats	+8,9 ± 0,1	+33,5 ± 0,1	
CD16	DMEDA	43,9 ± 2,4	+21,3 ± 1,9	+35,6 ± 2,2	

Tous les CDs de cette série ont été produits par pyrolyse à haute température et à pression atmosphérique d'un mélange d'acide citrique et de composé aminé (3 éq.). * Mesuré à pH 7,4. EA : éthanolamine ; DMEA : *N,N*-diméthyléthanolamine ; DMEDA : *N,N*-diméthyléthylènediamine.

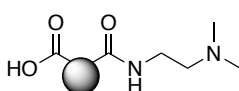
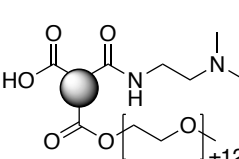
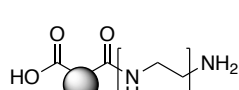
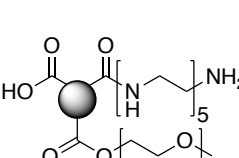
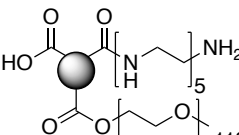
dans les conditions de synthèse utilisées présentent tous un potentiel zêta légèrement positif à pH physiologique, d'où une faible stabilité colloïdale et la présence de nombreux agrégats. Cette modeste charge positive révèle un léger excès d'amines (apportées par l'agent de passivation) par rapport aux carboxylates (résiduels de l'acide citrique), à la surface de la particule. Le fait que le potentiel zêta de **CD15** passe de +33,5 mV à pH 3,0 à +8,9 mV à pH 7,4, montre par ailleurs que la densité des groupements carboxylates à la surface des CDs est importante (par rapport à celle des amines). D'autre part, l'utilisation d'ammoniums quaternaires en tant qu'agent de passivation ne devrait *a priori* avoir d'effet que si le pK_a des amines primaires ou secondaires présentes en surface est inférieur à 7,4. Compte tenu de la valeur du pK_a des alkylamines en solution ($pK_a \approx 9-10$), cela ne peut se concevoir que si celles-ci sont présentes en forte concentration à la surface de la particule. Dans un tel cas, on sait en effet que la valeur du pK_a peut chuter de 2 à 3 unités, la protonation d'une amine étant plus difficile lorsqu'elle se trouve à proximité immédiate d'autres amines déjà ionisées.¹⁸⁹ Le caractère titrable ou non-titrable de l'agent de passivation ne devrait donc pas, pour des taux d'incorporation faibles, avoir un impact important sur les caractéristiques de taille et de charge des particules. Ceci est effectivement en accord avec nos observations puisque les trois nanoparticules présentent une charge nette faible (avec un potentiel zêta inférieur à +15 mV) et, de ce fait, agrègent toutes. **CD16** qui a été préparé à partir de *N,N*-diméthyléthylènediamine implique la formation de liaisons amides plus stables que les liaisons esters présentes dans **CD14**. Si les potentiels zêta mesurés à pH 3,0 sont similaires (+35,6 et +32,1 mV, respectivement), il n'en va pas du tout de même à pH 7,4 (+21,3 vs. +2,9 mV). Le fait qu'à pH 7,4 **CD16** reste fortement cationique révèle que la quantité de carboxylates résiduels à sa surface est plus faible que dans le cas de **CD14**. Une conséquence directe est la meilleure stabilité colloïdale de **CD16** qui, malgré tout agrège, mais forme des agrégats plus petits. Ainsi, nous pouvons à nouveau conclure sur le fait que, en fonction de l'agent de passivation utilisé, les processus de polymérisation et de carbonisation peuvent être altérés, ce qui rend très difficile la rationalisation des résultats.

3.4.1.5. Incorporation de motifs PEGylés

Une autre étude a eu pour objet d'incorporer des molécules polymériques, de type polyéthylène glycol (PEG), dans différentes constructions afin d'examiner leur influence sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules produites. Les données rassemblées

dans le tableau 7 ont permis de mettre en évidence que l'ajout de PEG de différentes tailles (mPEG₅₅₀ et mPEG₅₀₀₀) dans les mélanges réactionnels induit, conformément à nos attentes, des modifications importantes dans les caractéristiques des particules obtenues. Ainsi, alors que le potentiel zêta des CDs n'apparaît pas impacté de manière très importante par la présence ou non de molécules PEGylées dans les constructions, il n'en va pas de même pour leur taille qui se retrouve fortement modifiée. En effet, nous avons évoqué plus haut que la stabilité colloïdale de particules en solution, c'est-à-dire leur capacité à s'agréger (ou à se désagréger), était dépendante des forces de répulsions électrostatiques qui pouvaient exister entre deux particules portant une charge de même signe, une valeur de 15-20 mV (en valeur absolue) étant généralement considérée comme suffisante pour conférer une bonne stabilité colloïdale aux particules en solution. Or, dans la série de CDs considérés dans cette étude, toutes les particules présentent des potentiels zêta équivalents et suffisamment élevés pour

Tableau 7. Influence de molécules PEGylées de différentes tailles (PEG₅₅₀ et PEG₅₀₀₀) sur les propriétés physico-chimiques des CDs.

N°	Agent de passivation	Taille* (nm)	Potentiel zêta* (mV)	Intensité de fluorescence** (u.a.)	N (%)	C (%)	H (%)	Structure schématique
CD16	DMEDA	43,9 ± 2,4	+21,3 ± 1,9	0,67	12,5	34,8	6,9	
CD17	DMEDA/mPEG ₅₅₀	17,7 ± 0,9	+26,9 ± 1,6	0,14	2,4	49,0	8,5	
CD7	PEHA	36,4 ± 12,0	+18,6 ± 0,9	0,85	12,3	26,7	7,3	
CD18	PEHA/mPEG ₅₅₀	29,1 ± 1,1	+27,2 ± 1,3	0,08	6,9	43,2	8,0	
CD19	PEHA/mPEG ₅₀₀₀	21,1 ± 2,7	+21,1 ± 0,4	0,03	0,7	49,0	8,7	

* Mesuré à pH 7,4. ** Déterminée par rapport à un échantillon de référence à la longueur d'onde correspondant au maximum d'excitation. DMEDA : *N,N*-diméthyléthylènediamine ; PEHA : pentaéthylènehexamine.

garantir une bonne dispersion des particules. Il semblerait donc qu'une force de répulsion supplémentaire soit responsable de la diminution de la taille des agrégats observés dans le cas de particules dont la synthèse a fait intervenir des molécules PEGylées (**CD17**, **CD18** et **CD19**). Ceci est parfaitement cohérent avec les propriétés d'exclusion stérique qui sont associées aux PEG, et qui sont d'autant plus marquées que les PEG sont longs (**CD19**, fabriqué à partir de mPEG₅₀₀₀, est plus petit que **CD18**, synthétisé à partir de mPEG₅₅₀ dans les mêmes conditions). Par ailleurs, les résultats obtenus démontrent également l'influence considérable de l'incorporation de molécules PEGylées sur les propriétés photo-physiques des CDs. En effet, les intensités de fluorescence mesurées sont beaucoup plus faibles pour les particules PEGylées (**CD17**, **CD18** et **CD19**) que pour les autres (**CD16** et **CD7**). Ces résultats amènent plusieurs interrogations :

-Est-ce que la présence de PEG dans le mélange réactionnel initial engendre une incorporation moins importante d'atomes d'azote dans le cœur de la particule durant le processus de nucléation et pourrait ainsi être à l'origine d'une dégradation des propriétés de fluorescence ?

-Est-ce que les motifs PEG présents à la surface de la particule pourraient être à l'origine d'un phénomène de "quenching" de fluorescence ?

Nous n'avons pour le moment pas de réponse précise à apporter à ces questions.

3.4.1.6. Synthèse de CDs anioniques

Une dernière série de CDs a été conçue selon l'approche "de novo" et regroupe toutes les particules chargées négativement. Certaines d'entre elles ont été préparées par pyrolyse de citrate d'ammonium en présence de dihydrogénophosphate de potassium afin de présenter une surface principalement recouverte par des groupements carboxylates et, donc, un caractère anionique titrable (**CD20**). D'autres ont été obtenues par pyrolyse du mannitol pour présenter majoritairement à leur surface des fonctions hydroxyles, neutres (**CD21**). Des particules anioniques PEGylées ont également été conçues par pyrolyse d'un mélange d'acide citrique et de mPEG₅₅₀ (**CD22**), tout comme des CDs à caractère essentiellement hydrophobe, par pyrolyse d'acide citrique et d'hexylamine (**CD23**).

Certains des CDs ainsi préparés ont, par ailleurs, été d'une importance capitale pour la suite de notre travail, puisqu'ils ont permis l'émergence de nouvelles plateformes synthétiques sur lesquelles nous avons été amenés à greffer différents groupements

chimiques fonctionnels. Cette autre approche synthétique dite de “post-fonctionnalisation” est discutée dans le paragraphe suivant.

3.4.2. Modification de CDs par post-fonctionnalisation

Une seconde approche, complémentaire à la voie “*de novo*”, a été développée et a permis de modifier *a posteriori* la surface des nanoparticules dans le but de moduler leurs propriétés, notamment en termes de charge et de chimie de surface (figure 32, voie de droite). Ces réactions de post-fonctionnalisation ont été réalisées avec des CDs carboxylés ou hydrolylés natifs issus de la voie “*de novo*” (**CD20** ou **CD21**), en mettant en œuvre une chimie de couplage simple et robuste avec divers alcools et amines, passant par la formation de chlorures d’acides intermédiaires, ou par une activation par un carbodiimide hydrosoluble de type EDC. Ces amines et alcools ont été sélectionnés de façon à obtenir différents états de surface des particules (hydrophile, hydrophobe, cationique, anionique, et “furtive”).

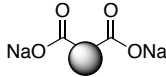
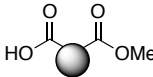
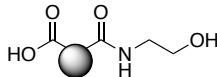
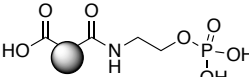
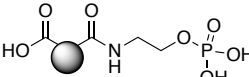
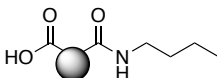
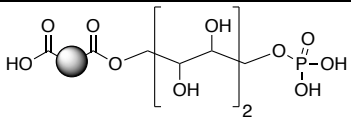
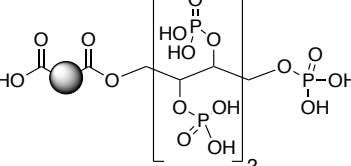
Un travail d’optimisation des conditions réactionnelles a été réalisé en amont afin de pouvoir fonctionnaliser, de manière efficace, les particules natives. En effet, les réactions chimiques ayant lieu dans l’espace confiné que constitue la surface des nanoparticules (proximité des fonctions réactives, encombrement stérique important), elles sont plus délicates à mettre en œuvre qu’en solution. Elles nécessitent des conditions expérimentales plus dures (temps de réaction plus longs, températures plus élevées, stœchiométrie des réactifs plus importante, etc.) et, surtout, elles sont réalisées “en aveugle”, sans aucun contrôle possible au cours de leur déroulement. L’efficacité des différentes réactions de post-fonctionnalisation mises en œuvre sur les particules natives a principalement été évaluée par la mesure du potentiel zêta des particules produites ainsi que par l’analyse de leurs spectres de RMN.

3.4.2.1. Variation de l’agent de fonctionnalisation

Dans une première étude, nous avons fait varier l’agent de fonctionnalisation afin de comparer les caractéristiques physico-chimiques des particules obtenues avec celles des CDs natifs correspondants (**CD20** et **CD21**) (tableau 8). Nous avons pu confirmer que la fonctionnalisation de **CD20** par des molécules neutres comme l’alcool méthylique (**CD24**) ou l’éthanolamine (**CD25**) conduit, dans chacun des cas, à une augmentation du potentiel zêta de

la particule. Ce phénomène trouve son explication dans le fait que les groupements carboxylates, porteurs de charges négatives et présents à la surface de **CD20**, ont fait l'objet d'un "capping" ce qui, de fait, diminue la densité des charges négatives à la surface des particules. À l'inverse, la fonctionnalisation de **CD20** par la phosphoéthanolamine, porteur de deux charges négatives, permet d'abaisser le potentiel zêta et, par voie de conséquence, d'améliorer la stabilité colloïdale de l'échantillon et de diminuer la taille des agrégats (**CD26**). De la même manière, la phosphorylation directe de groupements hydroxyles présents à la surface de **CD25** et **CD21** permet d'induire des charges négatives additionnelles (**CD27** et **CD28**, respectivement).

Tableau 8. Variation de l'agent de fonctionnalisation et comparaison des caractéristiques physico-chimiques des particules obtenues avec les CDs natifs.

N°	Agent de fonctionnalisation	Taille* (nm)	Potentiel zêta* (mV)	Intensité de fluorescence** (u. a.)	N (%)	C (%)	H (%)	Structure schématique
CD20	-	63,2 ± 4,9	-19,4 ± 1,8	0,55	4,3	23,9	3,8	
CD24	MeOH	39,1 ± 8,5	-16,3 ± 2,2	0,4	2,7	20,0	3,0	
CD25	EA	Agrégats	-10,9 ± 0,8	0,35	10,4	31,7	6,7	
CD26	PEA	36,5 ± 3,1	-23,9 ± 1,6	0,03	4,1	9,5	3,9	
CD27	EA puis POCl3/NaHCO3	30,8 ± 3,2	-25,0 ± 1,7	0,25	-	-	-	
CD29	n-BuNH2	-	-	-	-	-	-	
CD21	Mannitol	45,2 ± 3,5	-16,8 ± 0,6	0	0	45,7	6,3	
CD28	POCl3/NaHCO3	21,7 ± 0,9	-34,0 ± 3,9	0	0	7,1	2,2	

* Mesuré à pH 7,4. ** Déterminée par rapport à un échantillon de référence à une longueur d'onde correspondant au maximum d'excitation. EA : éthanolamine ; PEA : phosphoéthanolamine.

Les données récoltées dans le tableau 8 concernant les propriétés de photoluminescence des CDs ne nous ont pas permis d'identifier une quelconque corrélation entre les intensités de fluorescence mesurées et la nature de l'agent de fonctionnalisation greffé à la surface de la particule. Des données complémentaires particulièrement intéressantes acquises dans le cadre de cette étude nous ont permis, en revanche, de mieux comprendre les phénomènes régissant les propriétés photo-physiques des nano-objets fabriqués. Ainsi, outre le fait que jusqu'à présent, aucune corrélation n'a pu être établie entre les intensités de fluorescence mesurées et la teneur en azote des CDs, les dernières données indiquent que, avec les conditions de synthèse utilisées, une émission de fluorescence ne peut être observée que dans le cas de particules pour lesquelles la teneur en azote n'est pas nulle (cf. **CD21** et **CD28**).

Une dernière particule dans cette série a été produite par fonctionnalisation de **CD20** par la butylamine pour fournir **CD29**. Le caractère fortement hydrophobe de ces CDs a cependant rendu impossible toute analyse de taille, de charge ou de fluorescence dans les conditions habituelles, c'est-à-dire en milieu aqueux.

3.4.2.2. Comparaison des propriétés physico-chimiques des CDs obtenus selon les deux voies de synthèse envisagées

Dans cette partie de notre étude, nous nous sommes attachés à comparer les propriétés physico-chimiques de CDs *a priori* similaires mais obtenus selon les deux différentes voies de synthèse (voie "de novo" et post-fonctionnalisation). Des résultats particulièrement intéressants ont été constatés et ont permis de confirmer certaines de nos observations antérieures (tableau 9).

Dans un premier temps, nous avons pu constater que, en fonction de la stratégie de synthèse utilisée, les CDs obtenus en utilisant l'éthanolamine comme agent de passivation, présentent des potentiels zêta de signes opposés (**CD25** vs. **CD5**). Bien qu'apparemment surprenant, on peut néanmoins facilement expliquer ce résultat. L'éthanolamine est un amino alcool qui peut être incorporé dans les nanoparticules par le biais d'une liaison ester ou amide. Les synthèses "de novo" étant réalisées en milieu acide, l'amine est protonée et non nucléophile et c'est l'alcool qui intervient dans les réactions avec l'acide citrique en donnant lieu à la formation d'un ester (**CD5**). La particule est ainsi décorée par des groupements ammoniums (la diméthyléthylamine étant protonée à pH physiologique) dont une partie

seulement est nécessaire pour neutraliser les carboxylates également présents à la surface. Il en résulte des particules qui présentent un potentiel zêta positif. Lors des réactions de post-fonctionnalisation qui sont, elles, réalisées à pH basique, c'est l'amine nucléophile qui réagit avec les acides activés présents à la surface des nanoparticules (**CD25**). Il en résulte une disparition de certaines charges négatives mais il n'y a aucune introduction de charge positive et le potentiel zêta des particules, bien qu'augmenté, reste négatif (à comparer avec **CD20**).

Tableau 9. Comparaison des propriétés physico-chimiques des CDs obtenus selon les deux voies de synthèse envisagées : par post-fonctionnalisation (PF) de **CD20** et "de novo".

N°	Voie de synthèse envisagée	Agent de passivation	Taille* (nm)	Potentiel zêta* (mV)	Intensité de fluorescence** (u. a.)	N (%)	C (%)	H (%)	Structure schématique
CD25	PF	EA	Agrégats	-10,9 ± 0,8	0,35	10,4	31,7	6,7	
CD5	de novo		Agrégats	+11,4 ± 0,4	0,42	11,1	43,4	5,7	
CD30	PF	DMEDA	79,2 ± 7,4	+13,7 ± 0,9	0,08	12,0	25,6	7,4	
CD16	de novo		43,9 ± 2,4	+21,3 ± 1,9	0,67	12,5	34,8	6,9	
CD31	PF	PEHA	20,8 ± 2,1	+23,9 ± 2,0	0,18	13,2	25,7	6,9	
CD7	de novo		36,4 ± 12,0	+18,6 ± 0,9	0,85	12,3	26,7	7,3	
CD32	PF	bPEI600	18,6 ± 4,7	+26,4 ± 1,3	0,31	-	-	-	
CD2	de novo		15,3 ± 1,0	+26,8 ± 2,6	0,39	14,1	29,4	7,3	
CD33	PF	bPEI2k	25,4 ± 0,6	+33,5 ± 1,6	0,45	-	-	-	
CD10	de novo		15,4 ± 1,1	+31,4 ± 3,0	0,3	-	-	-	
CD34	PF	mPEG550	67,2 ± 2,6	-20,2 ± 0,1	0,08	1,1	47,6	7,8	
CD22	de novo		80,6 ± 1,9	-17,6 ± 2,2	0	0	48,6	8,6	

* Mesuré à pH 7,4. ** Déterminée par rapport à un échantillon de référence à une longueur d'onde correspondant au maximum d'excitation.

Les résultats obtenus au cours de cette étude nous montrent également que toutes les particules synthétisées selon la voie “*de novo*”, exceptées celles faisant intervenir le bPEI2k, présentent des intensités d’émission de fluorescence supérieures à celles synthétisées par post-fonctionnalisation. Ceci pourrait rendre compte de l’incorporation d’atomes d’azote dans le cœur des particules au cours de ces synthèses alors que, par voie de post-fonctionnalisation l’apport d’azote est forcément localisé à la surface. Par ailleurs, les analyses élémentaires réalisées sur les différentes nanoparticules ont permis de mettre en évidence que, pour un agent de passivation donné et quelle que soit la voie de synthèse envisagée, la teneur en azote varie assez peu. Il s’agit donc là d’un nouvel élément nous permettant d’avancer que ce n’est pas la proportion d’azote dans la particule, mais plutôt la localisation de cet élément au sein de la structure carbonée, qui détermine les propriétés photo-physiques, et l’intensité de l’émission de fluorescence, en particulier. Pour finir, l’hypothèse évoquée dans l’étude précédente, selon laquelle, dans les conditions de synthèse utilisées, une émission de fluorescence ne peut avoir lieu que dans le cas de particules dopées à l’azote, se vérifie une nouvelle fois ici, avec une intensité de fluorescence nulle pour **CD22**.

3.5. Évaluation des propriétés toxicologiques des éléments de la “particulothèque” et relations de structure-activité

La génération d’une large collection de carbon dots présentant des caractéristiques de taille, charge et état de surface très variées nous a permis d’effectuer une sélection rationnelle et représentative de 34 particules dans le but d’en évaluer les propriétés toxicologiques. Cette évaluation a été réalisée *in vitro*, dans différentes lignées cellulaires pulmonaires humaines, et *in vivo* chez la souris. Ces études ayant été réalisées par Jiahui Fan au cours de sa thèse, nous ne décrivons ici que brièvement les résultats obtenus.

Une première étude a eu pour objectif d’évaluer l’effet des carbon dots sélectionnés sur la viabilité de cellules THP-1 activées par le 12-myristate 13-acétate de phorbol (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA), un modèle de macrophage humain. Dans ces expériences, les cellules ont été exposées pendant 24 h à des concentrations de particules comprises entre 0 et 200 µg/mL et leur viabilité a été évaluée par la mesure de leur activité mitochondriale (test au MTT). Les carbon dots ont montré une cytotoxicité variable. La détermination d’une concentration inhibitrice (IC) à laquelle un composé inhibe 20 % (IC₈₀) ou 50 % (IC₅₀) de la

viabilité cellulaire a permis de classer les carbon dots en trois groupes, selon leur toxicité. Un premier ensemble de nanoparticules de toxicité élevée (IC_{50} comprise entre 18 et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), regroupe les carbon dots cationiques obtenus à partir de bPEI25k (**CD12**) ou de bPEI600, dont la synthèse a été réalisée par pyrolyse au four à micro-onde domestique (**CD3**) ou par pyrolyse à haute température à sec (**CD2**). Un deuxième groupe de toxicité modérée (IC_{80} comprise entre 33 et 123 $\mu\text{g}/\text{mL}$) regroupe les nanoparticules cationiques obtenues à partir de DMEDA (**CD30** et **CD16**) et de PEHA (**CD31** et **CD7**), selon les deux voies de synthèse examinées (“*de novo*” et post-fonctionnalisation). Enfin, un dernier groupe rassemble les particules non-toxiques, c’est-à-dire pour lesquelles il n’a pas été possible de calculer d’IC (perte maximale de viabilité à la plus haute dose testée inférieure à 20 %). On y trouve tous les carbon dots négatifs, les particules cationiques PEGylées (**CD17**, **CD18** et **CD19**) ainsi que les particules cationiques obtenues à partir de bPEI600 et synthétisées en conditions solvothermales (**CD4**) ou par irradiation sous micro-ondes en conditions solvothermales (**CD1**). Une analyse plus poussée des données de l’ensemble de la collection de carbon dots a montré que la charge de surface joue un rôle dans leur toxicité, avec une absence d’effet toxique pour les particules négatives. Néanmoins, une charge de surface positive ne permet pas, à elle seule, d’anticiper la toxicité des carbon dots. Ainsi, d’autres facteurs comme la capacité à s’agréger en milieu biologique, la teneur en azote, la nature de la chaîne aminée et le mode d’activation semblent impacter la toxicité des carbon dots positifs. En outre, la PEGylation permet de diminuer la toxicité des carbon dots cationiques. Les données obtenues suggèrent donc un rôle de la charge, de la chimie de surface mais aussi du mode d’activation dans la toxicité de nos particules. En revanche, et contre toute attente, la taille des particules n’est pas apparue comme un facteur déterminant dans la toxicité des CDs que nous avons produits.

Dans un second temps, six carbon dots représentatifs de l’échantillonnage initial, *i.e.* choisis dans les trois groupes de toxicité identifiés lors des études sur les cellules THP-1 (**CD12**, **CD3**, **CD16**, **CD7**, **CD17** et **CD20**) ont fait l’objet d’une étude comparative et mécanistique approfondie sur différentes lignées pulmonaires humaines : THP-1 (macrophages), A549 et Calu-3 (cellules épithéliales alvéolaires et bronchiques, respectivement). Des niveaux de cytotoxicité variables ont été observés selon la lignée cellulaire testée. En effet, les cellules A549 et Calu-3 s’avèrent significativement moins sensibles que les cellules THP-1 et ce, quel que soit le type de carbon dots (fortement ou modérément toxiques) auquel elles sont exposées. Une étude de cytotoxicité en fonction du temps, réalisée avec les deux carbon dots

les plus toxiques (**CD12** et **CD3**) et sur deux lignées cellulaires (THP-1 et A549), a montré que la baisse de viabilité induite par les particules survient très rapidement, c'est-à-dire dès la première heure d'incubation des cellules avec les particules. La mesure d'index de toxicité plus fins tels que le stress oxydant, la perturbation mitochondriale et la production de cytokines inflammatoires réalisée sur la sélection des 6 carbon dots a, quant-à-elle, montré que seuls les carbon dots fortement cytotoxiques (**CD12** et **CD3**) induisent un stress oxydant, une perturbation mitochondriale et la production de cytokines inflammatoires (IL-8, IL-1 β). Ainsi, ces résultats sont venus conforter les premières données de structure-activité obtenues sur la lignée THP-1 avec le test au MTT. Elles ont par ailleurs montré que si la charge nette positive des particules n'est pas un facteur prédictif de leur toxicité, la densité de groupements aminés protonables (titrables) pourrait, quant-à-elle, être un élément déterminant.

À l'issue de ces travaux sur cellules, la même sélection de six carbon dots a fait l'objet d'une étude de toxicité respiratoire après administration aiguë et répétée chez la souris. Pour cela, des animaux ont reçu une ou plusieurs doses de carbon dots par instillation intranasale, puis ont notamment subi des lavages broncho-alvéolaires, permettant de recueillir les macrophages résidents et les cellules inflammatoires infiltrées, afin d'évaluer la survenue ou non d'une inflammation. Ces études ont donné des résultats en accord avec ce qui avait été montré *in vitro*, à savoir une activité inflammatoire des carbon dots dépendant de la dose administrée et de la chimie de surface des particules, puisque seuls les carbon dots fortement toxiques ont induit une inflammation pulmonaire, après administration unique ou répétée.

Compte tenu des propriétés de fluorescence des carbon dots synthétisés dans le cadre de ce travail, il a été possible de réaliser des expériences en imagerie *in vitro* et *ex-vivo* et de mener ainsi des études par microscopie confocale de fluorescence et par cytométrie en flux afin de mettre en relation les propriétés toxicologiques des carbon dots et leur internalisation cellulaire *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, les résultats obtenus ont montré que seuls les carbon dots internalisés sont toxiques (**CD12**, **CD3** et **CD16**) et ce, quelle que soit la technique utilisée pour mettre en évidence cette internalisation (microscopie ou cytométrie) et le type cellulaire étudié (THP-1 ou A549). *In vivo*, les études menées sur les cellules recueillies dans les lavages broncho-alvéolaires des souris exposées aux carbon dots ont mis en évidence que seuls les carbon dots internalisés (**CD3** et **CD16**) sont toxiques, et que cette internalisation se fait dans les macrophages pulmonaires. Une étude de devenir des carbon dots internalisés en fonction

du temps a été réalisée sur **CD3**. Cette étude a montré que plus de 30 % des macrophages présents dans le poumon 21 jours après instillation intranasale des particules contiennent encore des carbon dots, suggérant que leur élimination est lente.

En définitive, l'évaluation des propriétés toxicologiques d'éléments représentatifs de la "particulothèque" a permis de mettre en évidence que la charge, la chimie de surface, le mode d'activation et la capacité des particules à s'agréger en milieu biologique constituent des déterminants majeurs pour la toxicité des CDs produits. En revanche, de façon surprenante et inattendue, la taille intrinsèque des nanoparticules n'est pas apparue comme un facteur critique dans leur toxicité. Ainsi, bien que la majorité des auteurs revendiquent quasi systématiquement l'absence de toxicité pour les carbon dots, une étude toxicologique détaillée sur ces particules conduit à nuancer leurs conclusions. En fonction de certaines caractéristiques physico-chimiques, les CDs présentent en effet des propriétés toxicologiques différentes, si bien que des relations de structure-toxicité ont été établies. En outre, les résultats acquis dans le cadre de cette étude ont été d'autant plus importants que certaines des particules évaluées ont été utilisées dans la suite de notre travail pour des applications en transfert de gènes notamment, au sein desquelles la toxicité du nano-vecteur joue un rôle prépondérant (cf. chapitre 4).

Chapitre 4. Développement de carbon dots pour la délivrance de gènes

4.1. Contexte et objectifs

La récente découverte des carbon dots et de leurs propriétés physico-chimiques exceptionnelles a permis l'émergence d'une nouvelle classe de vecteurs non-viraux pour la délivrance d'acides nucléiques (ADN, siARN...) dans les cellules. Le faible coût des matières premières nécessaires (acide citrique, glucose...) ainsi que la simplicité des protocoles de fabrication (irradiation micro-onde, conditions solvothermales...) font de ces nanoparticules un matériau de choix pour la conception de vecteurs de transfert de gènes. Plusieurs études ont démontré que la passivation de la surface des CDs par des composés aminés permet, d'une part, d'exacerber les propriétés de photoluminescence des particules et, d'autre part, d'introduire une forte densité de charges cationiques à leur surface.^{169,190,191} Ces charges positives autour des particules vont ainsi permettre à celles-ci de complexer et de condenser l'acide nucléique par interaction électrostatique avec les groupements phosphates de ce dernier, chargés négativement. Au sein du laboratoire, des études antérieures avaient déjà démontré que les CDs produits par pyrolyse de l'acide citrique en présence de bPEI25k permettent la délivrance efficace d'acide nucléique dans les cellules, *in vitro* et *in vivo*.¹⁷¹

Dans le cadre de cette thèse, une grande partie du travail a consisté à optimiser les propriétés des nanoparticules carbonées en termes de transfection d'acide nucléique. Nos efforts ont porté sur la fabrication de nanoparticules fortement chargées positivement, en nous basant sur les résultats antérieurs acquis dans le laboratoire. Les particules que nous avons obtenues ont fait l'objet d'une évaluation systématique de leur capacité à vectoriser un ADN et à le délivrer à des cellules en culture. L'influence de différents paramètres de synthèse des nanoparticules a été étudiée méthodiquement (conditions d'activation, rapport stœchiométrique entre la source de carbone et le composé aminé ou encore l'agent de passivation). Après avoir sélectionné les conditions de synthèse les mieux adaptées, une étude de "scale-up" a été menée afin de préparer suffisamment de matériel pour pouvoir travailler à l'élaboration de plateformes théranostiques (chapitre 5).

4.2. Optimisation de la synthèse des carbon dots pour la vectorisation d'acide nucléique

Pour générer des carbon dots présentant des propriétés de transfection comparables ou supérieures à celles des standards actuels et ainsi permettre une délivrance efficace du matériel génétique dans les cellules, plusieurs approches ont été examinées. L'influence de différents paramètres réactionnels a permis de moduler les caractéristiques physico-chimiques des CDs et d'étudier leur impact sur les performances en transfection de ces derniers. Ainsi, plusieurs conditions d'activation ont été utilisées pour la synthèse de nos particules (réactions solvothermales à pression atmosphérique et sous haute pression, pyrolyse au four à micro-onde domestique, irradiation sous micro-ondes en conditions solvothermales et sous haute pression, pyrolyse à haute température à pression atmosphérique) en faisant varier la température, le temps d'activation ou la puissance du faisceau de micro-ondes. Le rapport stœchiométrique entre l'acide citrique, utilisé comme principale source de carbone, et le composé aminé a également été étudié. Nous avons en outre examiné l'influence de l'agent de passivation avec, notamment, des PEI de différentes tailles (bPEI25k, bPEI2k et bPEI600) mais également des polyamines plus courtes comme le PEHA ou le DMEDA. Les particules produites ont toutes fait l'objet d'une purification et d'une caractérisation de leurs propriétés physico-chimiques en accord avec les résultats présentés dans le chapitre précédent (paragraphe 3.2. et 3.3.).

Dans une deuxième partie du travail, plus spécifiquement réalisée par Jiahui Fan, la capacité des CDs produits à condenser un acide nucléique et promouvoir sa délivrance dans des cellules en culture a été déterminée en mesurant les niveaux d'expression d'un plasmide d'ADN codant pour la luciférase de *Gaussia princeps* et utilisé en tant que gène rapporteur. Cette luciférase est une protéine excrétée qui transforme son substrat, la coelentérazine, en donnant lieu à l'émission d'un photon (bioluminescence). Le niveau d'expression du plasmide et, donc, l'efficacité de transfection des particules, peuvent ainsi être aisément évalués en utilisant un luminomètre. D'autre part, afin d'évaluer la cytotoxicité induite par les complexes CD/ADN, des tests systématiques de viabilité cellulaire ont été réalisés par la mesure de l'activité mitochondriale (test au MTT). Dans toutes ces expériences, les "dotoplexes", complexes formés par l'association des carbon dots positifs et de l'acide nucléique négatif (avec différents rapports CD/ADN en poids), ont été incubés pendant une période de 24 h avec

des cellules A549 en culture. Pour comparaison, un agent de transfection standard couramment utilisé, le bPEI25k, a été systématiquement évalué en parallèle et a ainsi constitué notre contrôle positif dans chacune de nos expériences.

4.2.1. Influence du mode d'activation pour un mélange acide citrique/bPEI25k

Une première approche a consisté à produire des CDs dans les mêmes conditions expérimentales que celles mises en place au laboratoire dans des études antérieures, c'est-à-dire en utilisant un mélange d'acide citrique et de bPEI25k, dans un rapport 2/1 en poids.¹⁷¹ Nous avons cependant fait varier les conditions d'activation afin d'étudier l'effet de celles-ci sur les propriétés physico-chimiques des CDs, d'une part (tableau 10), et sur leur efficacité de transfection d'autre part (figure 35). Les résultats obtenus nous ont révélé que selon le mode d'activation utilisé, les particules obtenues présentent des caractéristiques significativement différentes. En effet, **CD35** et **CD36**, synthétisés en mettant en œuvre des conditions solvothermales sous haute pression et à pression atmosphérique, respectivement, présentent des potentiels zêta proches de zéro et, par voie de conséquence, ont une forte tendance à l'agrégation. La charge nette légèrement négative de ces particules montre que la quantité d'amines (donc d'ammoniums, compte tenu du pH auquel sont réalisées les mesures) à la périphérie de la particule est insuffisante pour neutraliser totalement les charges négatives apportées par les carboxylates présents autour de la particule donc, *a fortiori*, pour interagir

Tableau 10. Influence de la variation des conditions d'activation lors de la synthèse de CDs à partir d'un mélange acide citrique/bPEI25k (2/1, en poids) sur les propriétés de tailles et de charges des CDs.

N°	Conditions d'activation	Temps d'irradiation	Taille* (nm)	Potentiel zêta* (mV)
CD35	Réaction solvothermale (P > P _{atm} , 180 °C)	2 h	Agrégats	-4,6 ± 0,2
CD36	Réaction solvothermale (P _{atm} , 100 °C)	24 h	Agrégats	-2,3 ± 0,2
CD37	Irradiation sous micro-ondes en conditions solvothermales	2 h	10,7 ± 0,2	+27,2 ± 3,9
CD38	Pyrolyse au four à micro-ondes domestique (P _{atm})	2 min 50	100,1 ± 1,0	+23,6 ± 0,9

* Mesuré à pH 7,4.

avec l'ADN. Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'énergie apportée pendant la synthèse n'est pas suffisante pour permettre une incorporation efficace du PEI dans la particule au cours du processus de nucléation. La conséquence de cette charge résiduelle négative est que les particules produites ne sont pas capables de complexer l'acide nucléique et, donc, ne présentent aucune efficacité en transfection. En contrepartie, aucune toxicité associée n'est observée. En revanche, pour des CDs synthétisés par irradiation sous micro-ondes en conditions solvothermales (**CD37**) et par pyrolyse au four à micro-onde domestique (**CD38**), des potentiels zêta fortement positifs sont obtenus (+27,2 et +23,8 mV, respectivement) et de bons niveaux de transfection sont observés, avec une efficacité optimale pour un rapport en poids CD/ADN de 8. Au-delà de ce rapport optimal, l'efficacité de transfection décroît, ce qui se traduit par un graphique en "cloche". Cependant, bien qu'une efficacité de transfection raisonnable ait été atteinte par ces deux CDs, elle nécessite une quantité de vecteur quatre fois supérieure au bPEI25k pour éliciter une réponse en transfection qui est, du reste, trois à quatre fois plus faible qu'avec le vecteur de référence. Par ailleurs, les tests de viabilité cellulaire nous indiquent que **CD38** présente une toxicité plus faible que **CD37**, en particulier pour un rapport en poids CD/ADN de 16, avec 74 % d'activité mitochondriale préservée contre 13 % seulement pour **CD37**.

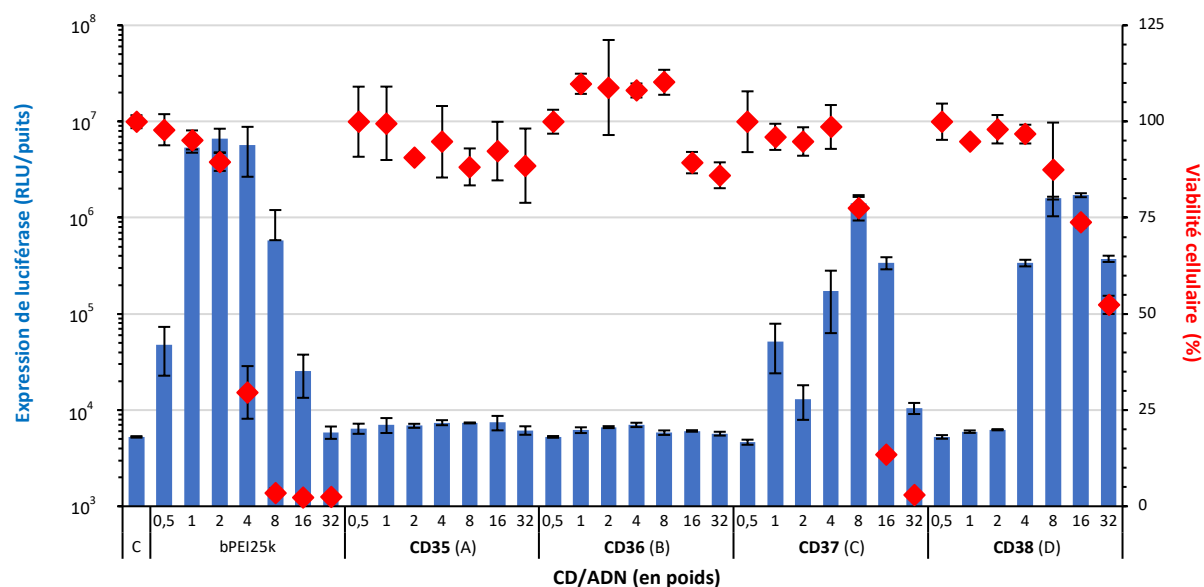


Figure 35. Efficacité de transfection de CDs synthétisés à partir d'un mélange acide citrique/bPEI25k (2/1, en poids) en fonction des conditions d'activation. A : Réaction solvothermale sous haute pression ($P > P_{atm}$, 180 °C) ; B : Réaction solvothermale à pression atmosphérique (P_{atm} , 100 °C) ; C : Irradiation sous micro-ondes en condition solvothermale ; D : Pyrolyse au four à micro-onde domestique (P_{atm}).

En conclusion, la pyrolyse au four à micro-onde domestique apparaît comme la meilleure condition d'activation des réactifs (acide citrique/bPEI25k, 2/1 en poids), parmi celles que nous avons testées, pour produire des particules permettant un bon niveau de transfection.

Toutefois, en dépit du fait que les résultats de transfection obtenus dans le cadre de cette étude sont relativement satisfaisants, il est important de noter que nous ne sommes jamais parvenus à atteindre les mêmes efficacités que celles obtenues antérieurement au laboratoire, à partir de CDs pourtant produits dans des conditions réactionnelles *a priori* identiques. Cet apparent manque de reproductibilité dans les résultats pourrait néanmoins être lié au four à micro-onde (ce n'est pas le même four domestique qui a été utilisé dans les deux études et, la focalisation des micro-ondes ainsi que la puissance restituée peuvent varier d'un modèle à l'autre) ou aux lots de bPEI25k utilisés, les lots de polymères pouvant être éminemment variables d'un batch à l'autre. N'ayant plus ni le four, ni le lot de PEI qui avaient été utilisés dans les travaux initiaux, nous n'avons pas pu tester ces hypothèses.

Après avoir constaté que la pyrolyse au four à micro-onde domestique nous permettait d'obtenir les CDs offrant les meilleurs résultats en termes de transfection d'ADN dans les cellules, nous nous sommes focalisés sur ce mode d'activation par la suite et avons fait varier d'autres paramètres réactionnels pour étudier leur influence sur la performance des CDs dans la délivrance de gènes.

4.2.2. Influence de la stœchiométrie des réactifs (acide citrique/bPEI25k)

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'influence de la variation du rapport en poids entre l'acide citrique et le bPEI25k lors de la préparation des CDs. Nous avons fait varier ce rapport entre 4/1 et 1/8, et irradié les mélanges dans notre four à micro-onde domestique. Les caractéristiques physico-chimiques des CDs obtenus sont résumées dans le tableau 11. On peut constater que seul **CD39**, dont la synthèse a été réalisée à partir d'un rapport 4/1 en poids, présente un potentiel zêta négatif à pH physiologique (-25,4 mV). Toutes les autres particules (**CD38**, **CD40**, **CD41** et **CD42**), produites à partir de mélanges plus riches en PEI, possèdent des charges de surface très positives et relativement équivalentes (+23,6 à +35,9 mV). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans les expériences de transfection correspondantes (figure 36). En effet, pour les CDs obtenus avec les réactifs dans

Tableau 11. Influence de la variation du rapport en poids entre l'acide citrique et le bPEI25k sur les propriétés physico-chimiques des CDs synthétisés par pyrolyse au four à micro-onde domestique.

N°	AC/bPEI25k	Taille* (nm)	Potentiel zêta* (mV)
CD39	4/1	86,2 ± 1,0	-25,4 ± 0,9
CD38	2/1	100,1 ± 1,0	+23,6 ± 0,9
CD40	1/2	10,3 ± 0,8	+33,1 ± 3,2
CD41	1/4	12,9 ± 0,7	+35,9 ± 1,6
CD42	1/8	6,9 ± 0,7	+32,0 ± 0,4

* Mesuré à pH 7,4.

un rapport 4/1 en poids, l'efficacité de transfection est nulle et aucune toxicité n'est observée, la charge négative de **CD39** ne lui permettant pas, à l'évidence, de complexer l'acide nucléique et, donc, de le vectoriser à l'intérieur des cellules. L'augmentation de la proportion de PEI dans le mélange réactionnel dont sont issus les CDs permet d'améliorer sensiblement l'efficacité de transfection de ces derniers. Un rapport de 1/4 en poids permet non seulement d'atteindre une efficacité de transfection bien supérieure à celle obtenue pour un rapport de 2/1 (augmentation d'un facteur 25) mais également de surpasser celle du bPEI25k (amélioration du taux de transfection d'un facteur 5). Par ailleurs, au-delà d'un rapport CD/ADN optimal (1/4

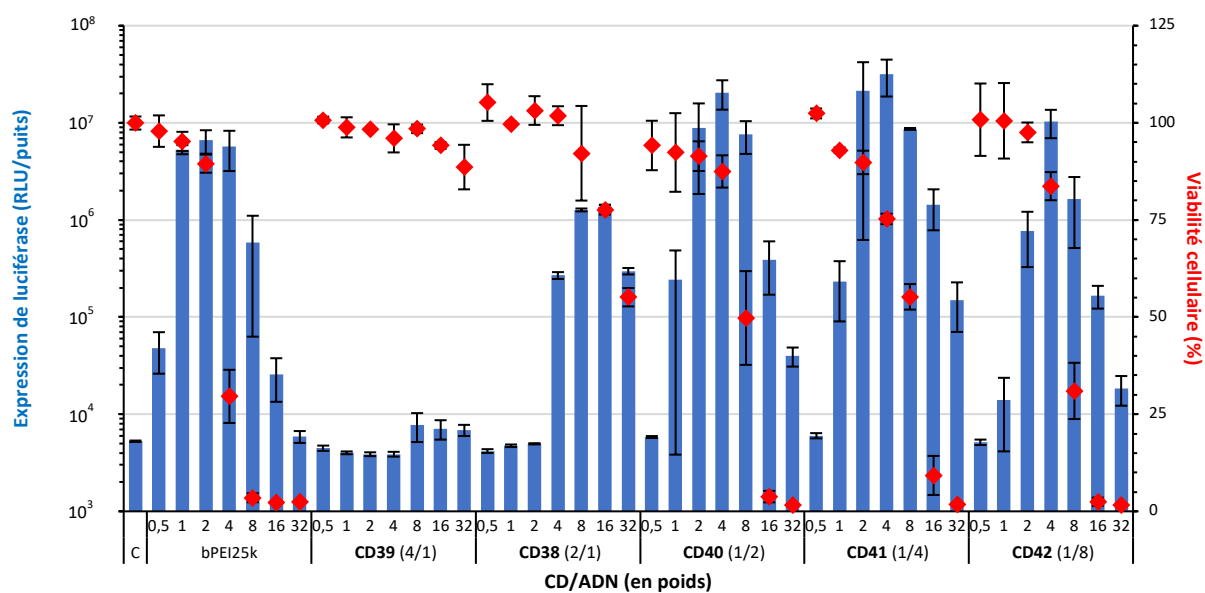


Figure 36. Efficacité de transfection de CDs synthétisés par pyrolyse au four à micro-onde domestique en faisant varier le rapport en poids entre l'acide citrique et le bPEI25k.

pour **CD40**, **CD41** et **CD42** ; 1/8 pour **CD38**), l'efficacité de transfection décroît. Ces expériences ont permis de montrer que, comparé à **CD38**, une quantité deux fois moins importante de **CD40** et **CD41** sont nécessaires pour éliciter une réponse en transfection 10 à 12 fois plus forte. Un résultat intermédiaire est atteint avec **CD42**. Autre remarque importante, la toxicité associée à chacun des CDs de la série est significativement plus faible que celle associée au bPEI25k, en particulier pour **CD41**. Un rapport CD/ADN de 4 permet effectivement d'améliorer la viabilité cellulaire de 45 %.

Ainsi, les CDs synthétisés à partir d'un mélange d'acide citrique et de bPEI25k dans un rapport en poids de 1/4 permettent d'obtenir de très bonnes efficacités de transfection.

4.2.3. Influence de l'amine utilisée comme agent de passivation

À la lumière des résultats acquis au cours des deux études précédentes, nous nous sommes naturellement interrogés sur l'influence que pouvait avoir une modification de l'agent de passivation sur les propriétés physico-chimiques des CDs et, notamment, sur leur efficacité en tant que vecteur de transfection. En effet, comme nous l'avons discuté dans le paragraphe 3.2., l'efficacité de la purification des CDs préparés à base de bPEI25k est très loin d'être optimale et une quantité non négligeable du polymère initial reste présente dans l'échantillon en fin de dialyse. La nécessité de trouver une alternative à cet agent de passivation est donc devenue importante pour nous afin de pouvoir mesurer l'activité de nos particules sans résidus de réactif de départ qui peuvent nuire à la bonne interprétation des résultats obtenus en transfection.

Nous avons ainsi utilisé des polyamines de plus faible poids moléculaire comme agents de passivation (bPEI600, PEHA et DMEDA) et les CDs obtenus, produits par pyrolyse au four à micro-onde domestique, ont été étudiés en parallèle avec ceux synthétisés à partir de bPEI25k dans les mêmes conditions. L'étude a porté sur deux séries de CDs présentant des rapports en poids acide citrique/(poly)amine de 2/1 et 1/4 (tableau 12 et figure 37). L'efficacité de transfection du bPEI600 a été mesurée à des fins de comparaison et on peut immédiatement relever que ce polymère, contrairement au bPEI25k de poids moléculaire plus élevé, ne permet pas la délivrance de matériel génétique dans les cellules. Cela est, selon toute vraisemblance, dû à la faible stabilité des complexes qu'il forme avec l'acide nucléique. Le bPEI600 est également non-toxique pour les cellules, ce qui n'est pas le cas pour les PEI de poids moléculaires plus élevés.¹⁹²

Tableau 12. Influence de la variation de l'agent de passivation pour des rapports en poids de 2/1 et de 1/4 sur les propriétés physico-chimiques des CDs synthétisés à partir d'acide citrique (AC) par pyrolyse au four à micro-onde domestique.

N°	AC/(poly)amine	Agent de passivation	Taille* (nm)	Potentiel zêta* (mV)
CD38	2/1	bPEI25k	100,1 ± 1,0	+23,6 ± 0,9
CD43		bPEI600	20,0 ± 0,3	+18,4 ± 0,6
CD44		PEHA	Agrégats	-13,3 ± 0,8
CD45		DMEDA	Agrégats	-11,0 ± 0,6
CD41	1/4	bPEI25k	12,9 ± 0,7	+35,9 ± 1,6
CD3		bPEI600	20,6 ± 3,6	+33,3 ± 1,8
CD46		PEHA	4,1 ± 0,5	+15,0 ± 2,3

* Mesuré à pH 7,4.

Les résultats obtenus en transfection nous indiquent que, pour des rapports en poids de 2/1, la substitution du bPEI25k par du bPEI600 dans la synthèse de CDs, engendre une amélioration significative de l'expression du transgène (augmentation d'un facteur 5). Cependant, cette réponse n'est atteinte que pour une quantité quatre fois plus importante de **CD43**, par rapport à **CD38**. Par ailleurs, l'efficacité optimale ne semble pas avoir été atteinte dans le cas de **CD43** puisque, pour les rapports CD/ADN allant de 0,5/1 à 32/1, les taux de transfection

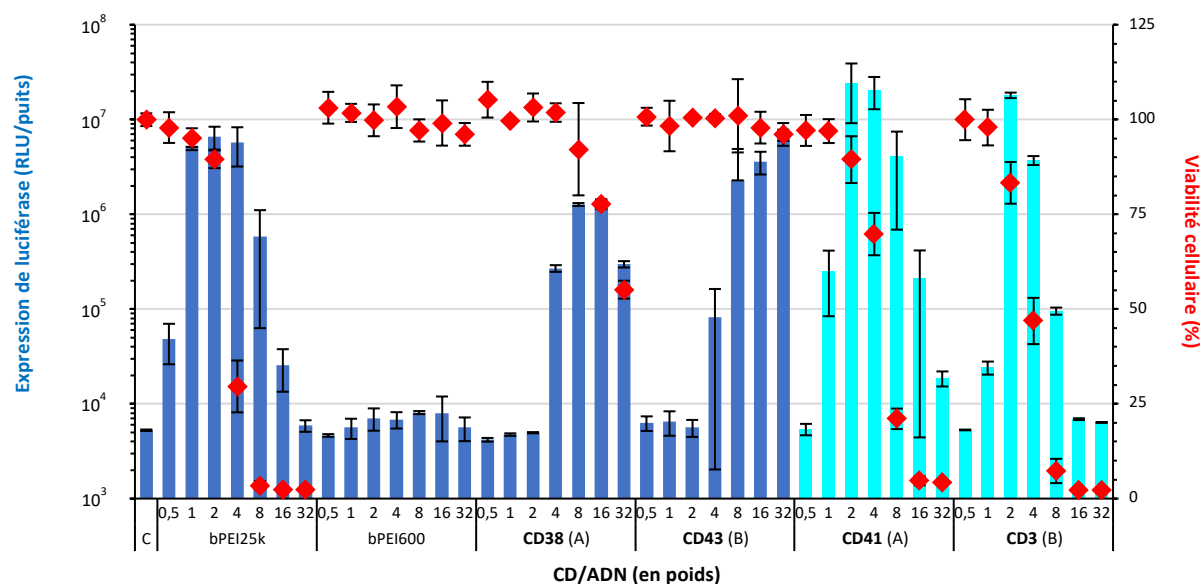


Figure 37. Efficacité de transfection de CDs synthétisés par pyrolyse au four à micro-onde domestique à partir d'acide citrique en faisant varier l'agent de passivation pour des rapports en poids de 2/1 et de 1/4. A : CDs produits en utilisant le bPEI25k en tant qu'agent de passivation. B : CDs produits en utilisant le bPEI600 en tant qu'agent de passivation.

croissent de façon quasi-continue et n'ont pas encore atteint de palier. En dépit du fait qu'une grande quantité de vecteur soit nécessaire pour obtenir une efficacité de transfection comparable à celle du bPEI25k, aucune toxicité associée n'est mesurée. Pour leur part, les amines plus courtes, comme le PEHA ou le DMEDA conduisent à la formation de particules négatives (**CD44** et **CD45**, respectivement) qui sont incapables de complexer l'acide nucléique et de le délivrer à des cellules (résultats non représentés). En revanche, pour des CDs préparés à partir d'acide citrique et de bPEI25k ou de bPEI600 dans un rapport en poids de 1/4, les taux de transfection atteints sont largement supérieurs à ceux obtenus précédemment avec des rapports en poids de 2/1. **CD41** induit ainsi un niveau de transfection 25 fois plus élevé que **CD38**, et **CD3** apparaît trois fois plus efficace que **CD43**. En outre, les rapports CD/ADN optimaux sont significativement réduits (2-4 pour **CD41** contre 8-16 pour **CD38**, et 2 pour **CD3** contre 32 pour **CD43**). Ces résultats confirment les données recueillies dans l'étude précédente et révèlent à leur tour une efficacité de transfection exacerbée lorsque la proportion en PEI dans le mélange réactionnel initial passe de 33 à 80 %.

Il est particulièrement satisfaisant d'observer que des particules synthétisées à partir de bPEI600 offrent de très bons résultats en termes de transfection alors que le polymère lui-même ne transfecte pas. Il est probable que la présentation de multiples chaînes de polyéthylèneimine à la surface des particules permet la formation de complexes avec l'ADN plus stables que ceux formés à partir du bPEI600.

D'autre part, si l'utilisation de PEHA dans la synthèse de CDs permet d'obtenir des particules chargées positivement pour des rapports en poids de 1/4 (**CD46**), celles-ci sont cependant incapables de délivrer un ADN à des cellules (résultats non représentés). Une hypothèse pouvant expliquer ce résultat, et déjà évoquée dans le chapitre précédent (cf. figure 34), pourrait être que le potentiel zêta mesuré ne retranscrit pas de manière effective la densité des charges cationiques présentes à la surface de la particule. Ainsi, des CDs synthétisés à partir de polymères cationiques (PEI) pourraient présenter un potentiel zêta relativement équivalent à celui de particules formées à partir d'amines plus courtes, mais le réseau polymérique "épais" entourant la particule favoriserait la condensation et la complexation de l'acide nucléique et améliorerait, de ce fait, l'efficacité de transfection.

Ainsi, les résultats présentés dans le cadre de cette étude permettent de conclure que l'utilisation de bPEI600, en tant qu'agent de passivation dans la synthèse des CDs, constitue la meilleure approche en raison d'une efficacité de transfection supérieure à celle du bPEI25k

et, aussi et surtout, en raison de la plus grande facilité d'élimination de ce polymère durant le processus de purification (cf. paragraphe 3.2.).

Dans les travaux suivants, nous avons donc sélectionné le bPEI600 en tant qu'agent de passivation et avons étudié d'autres paramètres réactionnels dans le but d'accroître les performances des CDs produits en termes d'efficacité de transfection.

4.2.4. Influence de la stœchiométrie des réactifs (acide citrique/bPEI600)

Une nouvelle étude a consisté à évaluer l'influence de la variation du rapport en poids entre l'acide citrique et le composé aminé, impliquant cette fois-ci, le bPEI600. Nous avons fait varier ce rapport entre 2/1 et 1/4, et les particules carbonées issues de cette série ont toutes été produites par pyrolyse au four à micro-onde domestique. Les résultats obtenus nous montrent que la variation de la proportion en PEI dans les mélanges réactionnels n'induit pas de modifications significatives dans les caractéristiques de taille des CDs générés (7 à 21 nm) (tableau 13). Les potentiels zêta indiquent, quant à eux, que les particules produites présentent toutes des charges de surface très positives (+18,4 à +36,1 mV). Bien qu'il ne semble pas y avoir de corrélation entre les caractéristiques de taille et de charge des particules avec la teneur en PEI du mélange réactionnel dont elles sont issues, les données de transfection présentées dans la figure 38 montrent que des CDs produits à partir des mélanges plus riches en PEI permettent d'atteindre des niveaux de transfection plus élevés. Un rapport en poids de 1/4 permet non seulement d'atteindre des taux de transfection bien supérieurs à ceux obtenus pour des rapports de 2/1, mais également de réduire significativement la quantité

Tableau 13. Influence de la variation du rapport en poids entre l'acide citrique et le bPEI600 sur les propriétés physico-chimiques de CDs synthétisés par pyrolyse au four à micro-onde domestique.

N°	AC/bPEI600	Taille* (nm)	Potentiel zêta* (mV)
CD43	2/1	20,0 ± 0,3	+18,4 ± 0,6
CD47	1/1	6,6 ± 1,6	+26,4 ± 1,3
CD48	1/2	10,2 ± 1,1	+36,1 ± 2,1
CD3	1/4	20,6 ± 3,6	+33,3 ± 1,8

* Mesuré à pH 7,4.

de vecteur nécessaire pour une efficacité optimale. Ainsi, comparé à **CD43**, une quantité 16 fois moins importante de **CD3** est nécessaire pour éliciter une réponse en transfection trois fois supérieure. Par ailleurs, une perte croissante de viabilité cellulaire est observée en parallèle avec l'augmentation de l'efficacité de transfection des particules.

Les CDs synthétisés à partir d'un rapport en poids acide citrique/bPEI600 de 1/4 permettent donc d'atteindre l'efficacité de transfection la plus élevée et nous avons ainsi choisi de nous baser sur ce mélange réactionnel pour la suite de nos investigations.

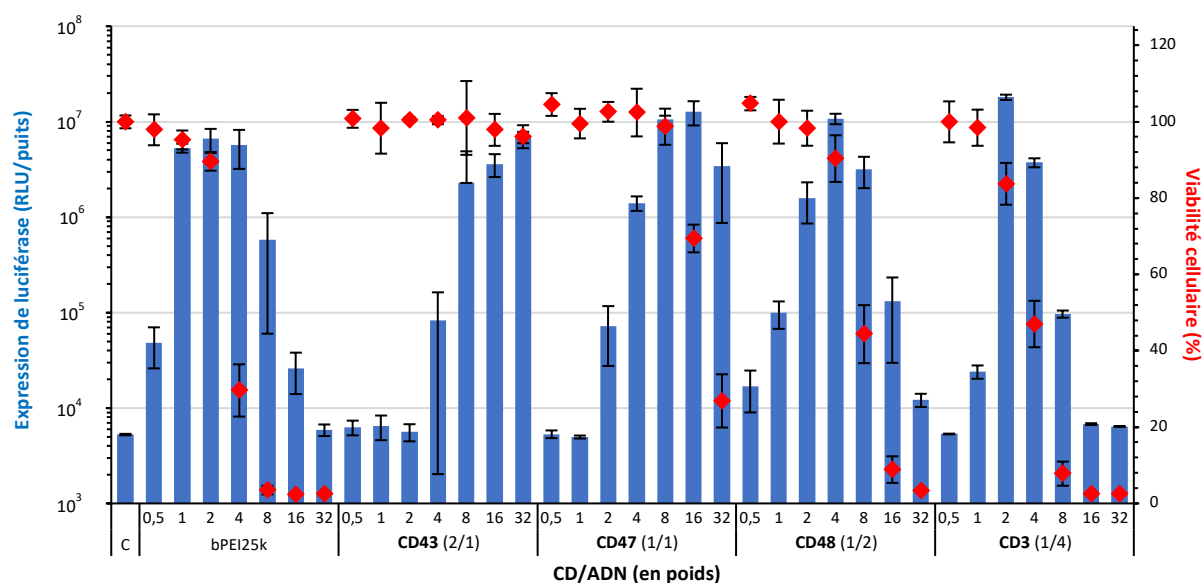


Figure 38. Efficacité de transfection de CDs synthétisés par pyrolyse au four à micro-onde domestique en faisant varier le rapport en poids entre l'acide citrique et le bPEI600.

4.2.5. Influence du mode d'activation pour un mélange acide citrique/bPEI600

En nous basant sur le mélange acide citrique/bPEI600 (1/4, en poids), qui a été identifié comme celui permettant d'obtenir des particules présentant la meilleure efficacité de transfection, nous avons ensuite étudié l'influence que pouvait avoir une variation du mode d'activation sur ce système particulier, tant au niveau des propriétés physico-chimiques des CDs obtenus (tableau 14) que de leur capacité à vectoriser un gène (figure 39). En effet, dans les étapes d'optimisation précédentes, les particules ont systématiquement été produites par pyrolyse au four à micro-onde domestique. D'autres sources d'activation ont donc cette fois été étudiées (irradiation sous micro-ondes en conditions solvothermales et sous haute pression,

Tableau 14. Influence des conditions d'activation d'un mélange acide citrique/bPEI600 (1/4, en poids) sur les propriétés de tailles et de charges des CDs obtenus.

N°	Conditions d'activation	Taille* (nm)	Potentiel zêta* (mV)	N (%)	C (%)	H (%)
CD1	Irradiation sous micro-ondes en conditions solvothermales	29,4 ± 3,3	+26,7 ± 1,0	13,8	26,6	7,4
CD2	Pyrolyse à haute température à sec	15,3 ± 1,0	+26,8 ± 2,6	14,1	29,4	7,3
CD3	Pyrolyse au four à micro-onde domestique (P _{atm})	20,6 ± 3,6	+33,3 ± 1,8	14,8	23,9	7,2
CD4	Réaction solvothermale (P > P _{atm} , 180 °C)	20,7 ± 2,2	+32,0 ± 3,7	-	-	-

* Mesuré à pH 7,4.

réactions solvothermales sous haute pression, pyrolyse à haute température à pression atmosphérique). Les résultats obtenus nous indiquent que les caractéristiques de taille, de charge et de composition atomique dans cette série de CDs sont relativement similaires et ce, quel que soit le mode d'activation utilisé pour la synthèse des particules. En revanche, un seul mode d'activation, la pyrolyse au four à micro-onde domestique, permet de produire des CDs dont l'efficacité de transfection est significative (**CD3**). Ces résultats viennent conforter ceux que nous avons obtenus précédemment avec le bPEI25k (cf. paragraphe 4.2.1.).

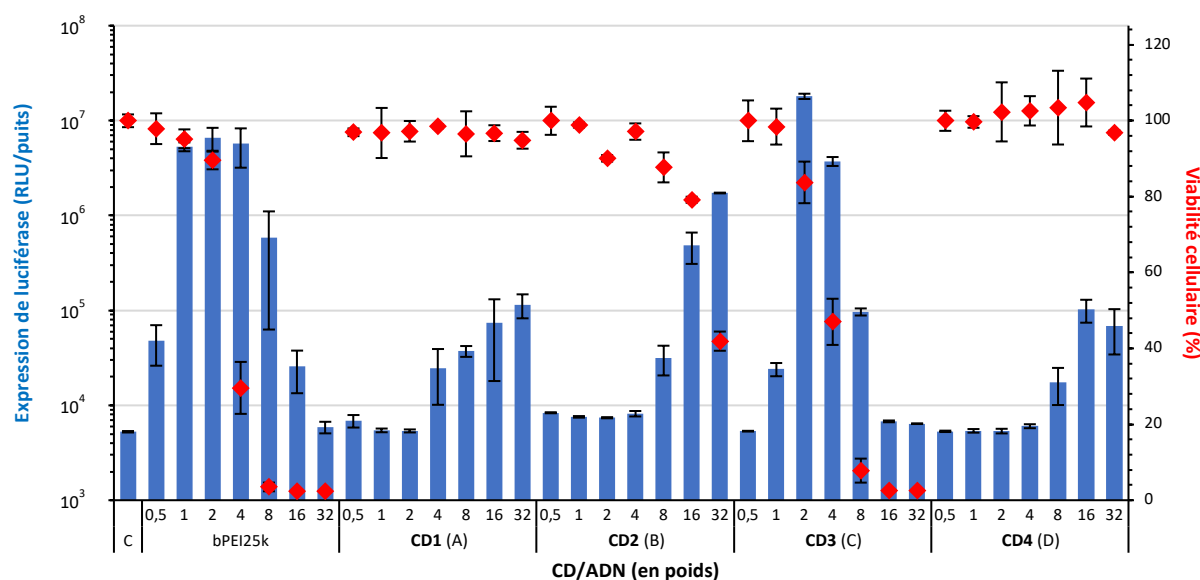


Figure 39. Efficacité de transfection de CDs synthétisés à partir d'un mélange acide citrique/bPEI600 (1/4, en poids) en fonction des conditions d'activation. A : Irradiation sous micro-ondes en condition solvothermale ; B : Pyrolyse à haute température à sec (P_{atm}) ; C : Pyrolyse au four à micro-onde domestique (P_{atm}) ; D : Réaction solvothermale (P > P_{atm}, 180°C).

Des analyses par spectroscopies RMN et infrarouge ont été réalisées sur cette série de particules dans le but de mieux les caractériser, notamment en termes de chimie de surface. Cependant, bien que les spectres obtenus soient effectivement légèrement différents d'une particule à l'autre, ils n'ont pas apporté d'informations suffisamment pertinentes pour permettre une interprétation plus fine des résultats obtenus. Des clichés de microscopie électronique (TEM) ont également été réalisés et aucune différence significative n'a pu être observée en termes de tailles ou de formes dans les nano-objets fabriqués (figure 40). Néanmoins, les résultats de l'analyse élémentaire de ces échantillons, combinés aux potentiels zêta mesurés, pourraient apporter un élément de réponse. En effet, selon le mode d'activation utilisé, on peut supposer que la sensibilité des réactifs (acide citrique et bPEI600) mis en jeu dans la synthèse des particules par rapport à l'énergie apportée par le système diffère et, par voie de conséquence, les mécanismes réactionnels aboutissant à la formation des CDs peuvent ne pas être les mêmes. Or, les analyses élémentaires révèlent que les échantillons étudiés présentent des teneurs en azote, carbone et hydrogène assez peu différentes. Il semblerait donc que ce soit plutôt la structure interne des CDs et/ou la disposition des atomes à l'intérieur et à la surface de ceux-ci qui varient en fonction du mode d'activation. Si l'on considère que le potentiel zêta pourrait ne pas intégralement retranscrire la densité des charges cationiques à la surface des particules, des CDs dont le taux d'amines en surface diffère pourraient présenter un potentiel zêta relativement équivalent. Or, c'est précisément ce dernier paramètre qui *a priori* détermine l'efficacité de condensation et de complexation de l'acide nucléique à la surface d'une particule et donc la capacité de cette dernière à vectoriser un gène. Il semblerait donc qu'une explication rationnelle puisse permettre de traduire l'influence du mode d'activation sur les différences observées en termes d'efficacité de transfection de particules obtenues pour un même mélange en réactifs initiaux et présentant des caractéristiques physico-chimiques très proches.

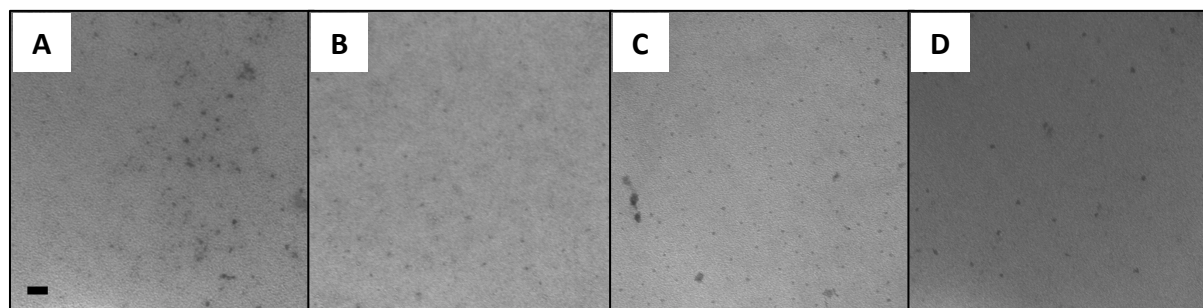


Figure 40. Clichés de microscopie électronique de CDs synthétisés à partir d'un mélange acide citrique/bPEI600 (1/4, en poids) en faisant varier les conditions d'activation : a) **CD1**, b) **CD2**, c) **CD3**, d) **CD4**. Barre d'échelle : 100 nm.

4.2.6. Influence du temps d'irradiation

Les études présentées jusqu'ici ont permis de sélectionner les conditions de synthèse (nature de l'agent de passivation, rapport stœchiométrique entre l'acide citrique et le composé aminé, mode d'activation) les mieux adaptées à la production de particules de grande pureté (sans résidu de réactif de départ) et permettant de délivrer efficacement du matériel génétique dans les cellules (efficacité de transfection supérieure à celle du bPEI25k). Nous nous sommes ensuite attachés à étudier l'influence du temps de réaction sous irradiation micro-onde du mélange réactionnel précédemment optimisé (acide citrique/bPEI600, 1/4 en poids).

Une première série d'expériences a été réalisée sur la base des résultats acquis au cours d'observations antérieures faites au laboratoire et selon lesquelles les meilleurs résultats de transfection étaient obtenus avec des CDs produits à partir d'acide citrique (0,50 g), d'amine (0,25 g), dans l'eau (5,0 mL), et avec un apport total d'énergie au système de 29,17 W.h, soit 105 kJ.¹⁷¹ En raison d'un changement de four qui a déjà été évoqué plus haut, nous avons été dans l'obligation de réadapter nos paramètres de synthèse. Pour un four à micro-onde réglé à 620 W, cette énergie est délivrée au mélange réactionnel en 170 secondes (**CD3**). D'autre part, il est important de noter ici que le processus de carbonisation, et donc la formation des CDs, intervient (majoritairement) lorsque tout le solvant est évaporé. En effet, à partir de ce moment-là, une rapide montée en température est constatée (jusqu'à ± 250 °C, température mesurée avec des « thermo-strips »), d'où l'importance d'un contrôle strict des quantités de réactifs et de solvants mises en jeu dans la synthèse des nanoparticules ainsi que de la puissance délivrée par le four. Un apport d'énergie trop faible conduit à une évaporation incomplète du solvant (la température reste proche de 100 °C) et ne permet pas d'atteindre une température suffisamment élevée pour que les CDs se forment. À l'inverse, une carbonisation trop poussée est accompagnée de la formation d'un solide noir très peu soluble en solution aqueuse (charbon), conduisant ainsi à une perte importante de matériel et, par voie de conséquence, à des rendements extrêmement faibles en fin de dialyse (< 5 %). Par ailleurs, une pyrolyse trop poussée aboutit également à une diminution significative des propriétés de fluorescence des particules. Aussi, nous nous sommes attachés à étudier l'influence de la quantité d'énergie apportée au système sur les caractéristiques des CDs pour des temps d'irradiation compris entre 90 et 170 secondes. Les résultats rassemblés dans le

Tableau 15. Influence de la variation du temps d'irradiation pour une puissance du four à micro-onde fixe (620 W) sur les propriétés de tailles et de charges des CDs.

N°	Temps d'irradiation (en s)	Taille* (nm)	Potentiel zêta* (mV)
CD49	90	7,5 ± 1,0	+42,8 ± 1,7
CD50	105	8,9 ± 1,3	+19,5 ± 0,5
CD51	120	11,7 ± 0,9	+37,6 ± 3,2
CD3	170	20,6 ± 3,6	+33,3 ± 1,8

Toutes les particules de cette série ont été synthétisées à partir d'un mélange acide citrique/bPEI600 présentant un rapport en poids de 1/4 et dissous dans 5 mL d'une solution aqueuse (HCl 0,1N). *Mesuré à pH 7,4.

Le tableau 15 ont ainsi permis de mettre en évidence une augmentation progressive de la taille des particules avec la durée d'irradiation (de 7,5 à 20,6 nm en passant le temps d'irradiation de 90 à 170 secondes). Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'un apport d'énergie modéré engendre une température moins élevée à l'intérieur de l'enceinte du four et une réactivité moindre des molécules irradiées. Les étapes de polymérisation, carbonisation et graphitisation seraient ainsi moins poussées, conduisant à la formation de particules plus petites. Par ailleurs, les mesures de potentiels zêta indiquent que toutes les particules de cette série présentent une charge de surface élevée (+19,5 à +42,8 mV). Il est également intéressant d'observer qu'une augmentation de la durée d'irradiation du mélange réactionnel permet d'améliorer les taux de transfection mais également de réduire considérablement les optimums d'efficacité (figure 41). Une quantité quatre fois moins importante de **CD3** permet,

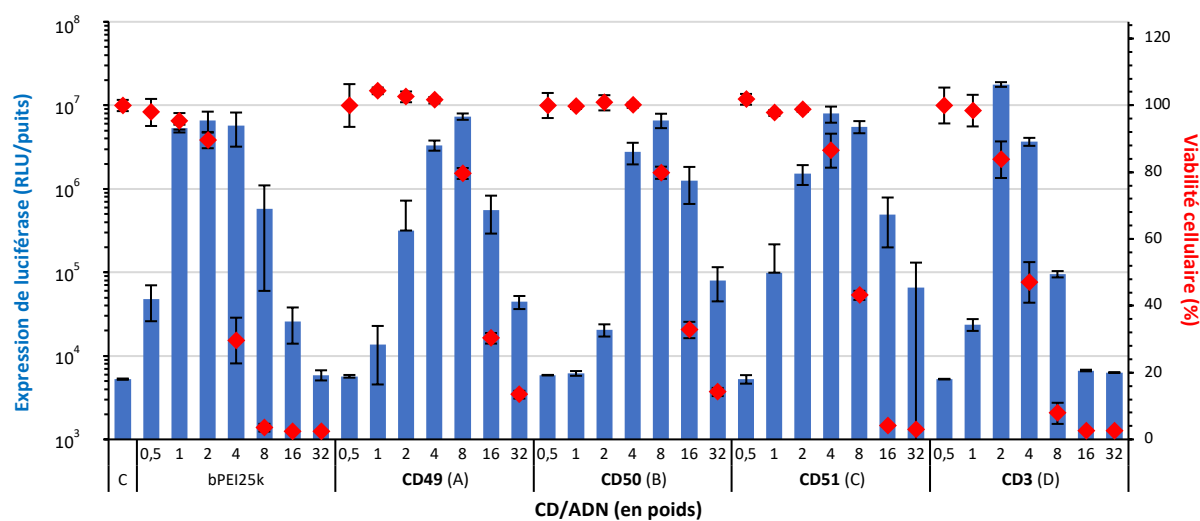


Figure 41. Efficacité de transfection de CDs synthétisés à partir d'un mélange acide citrique/bPEI600 (1/4, en poids) en faisant varier le temps d'irradiation pour une puissance du four à micro-onde fixe (620 W). A : 90 s ; B : 105 s ; C : 120 s ; D : 170 s.

en effet, d'éliciter une réponse en transfection 2,5 fois plus forte qu'avec **CD49**. Au-delà d'un rapport CD/ADN optimal (8/1 pour **CD49** et **CD50** ; 4/1 pour **CD51** ; 2/1 pour **CD3**), l'efficacité de transfection décroît. Une plus grande quantité d'énergie apportée au système par le four à micro-onde s'accompagne, comme nous l'avons évoqué plus haut, d'une augmentation du degré de graphitisation des particules et, très probablement, de variations structurales importantes (différences dans la disposition et la nature des atomes au sein de la structure) pouvant expliquer les résultats obtenus en termes d'efficacité de transfection des particules composant cette série.

Ainsi, pour un mélange acide citrique/bPEI600 (1/4, 0,625 g dans 5 mL HCl 0,1 N), un temps d'irradiation de 170 secondes pour une puissance du four à micro-onde de 620 W permet d'obtenir la meilleure efficacité en termes de transfert de gènes.

4.2.7. Influence de la quantité de réactifs de départ

L'étude fine des paramètres réactionnels réalisée tout au long de ce chapitre a permis d'optimiser la production de particules carbonées dont l'efficacité de transfection est trois fois supérieure à celle du bPEI25k, notre agent de transfection de référence. Cependant, ces optimisations ont uniquement été conduites sur de petites quantités de matériel, si bien que nous nous sommes attachés à les extrapoler afin de produire des CDs à plus grande échelle. Une étude de "scale-up" a donc été menée sur le mélange acide citrique/bPEI600 (1/4), en utilisant des quantités croissantes de réactifs de départ (0,125/0,5 g, 0,25/1 g et 0,5/2 g). Les conditions réactionnelles utilisées pour la synthèse des particules carbonées de cette série sont celles qui ont été précédemment optimisées (temps d'irradiation : 170 s ; puissance du four : 620 W ; solvant : HCl 0,1 N, 5 mL). Les CDs obtenus (**CD3**, **CD52** et **CD53**) ont fait l'objet des mêmes caractérisations que précédemment et les résultats n'ont pas révélé de variations significatives en termes de taille des particules produites (19,9 à 24,2 nm) et, les potentiels zêta rapportés indiquent que les CDs de cette série présentent tous des charges de surface très élevées (+22,9 à +37,0 mV) (tableau 16). En revanche, les résultats de transfection permettent de mettre en lumière qu'une augmentation de la quantité de réactifs dans le mélange initial se traduit par une diminution du taux de transfection et s'accompagne d'un décalage de l'efficacité optimale vers des rapports en poids CD/ADN plus élevés (figure 42). En effet, **CD53**, synthétisé à partir

Tableau 16. Caractéristiques des CDs obtenus dans notre étude de “scale-up”.

N°	Réactifs (g)		Taille* (nm)	Potentiel zêta* (mV)
	Acide citrique	bPEI600		
CD3	0,125	0,50	20,6 ± 3,6	+33,3 ± 1,8
CD52	0,25	1,00	19,9 ± 0,8	+22,9 ± 1,4
CD53	0,50	2,00	24,2 ± 1,7	+37,0 ± 2,1

* Mesuré à pH 7,4.

d’une concentration quatre fois plus importante en acide citrique et en bPEI600 que **CD3**, nécessite une quantité de matériel quatre fois supérieure pour induire une réponse en transfection près de 9 fois plus faible. Les variations observées traduisent probablement des différences dans la cinétique de carbonisation en fonction de la quantité de matériel présente dans le four. Ainsi, à puissance délivrée équivalente, l’efficacité des CDs en tant que vecteurs d’acide nucléique diminue lorsque la concentration en réactifs dans le mélange initial augmente. Ceci met en lumière la difficulté que présente le contrôle et l’extrapolation des conditions réactionnelles dans un four à micro-onde domestique. Cependant, tous nos efforts pour produire des CDs équivalents en utilisant un four à micro-onde spécifique dédié à la synthèse et permettant un meilleur contrôle des paramètres expérimentaux (température, pression, puissance fournie) se sont soldés par des échecs. En conséquence, nous avons fait le choix pour la suite de multiplier les expériences sur de petites quantités de réactifs (cf. **CD3**) puis de rassembler les différents batches, avant dialyse, pour s’assurer d’une homogénéité du matériel final.

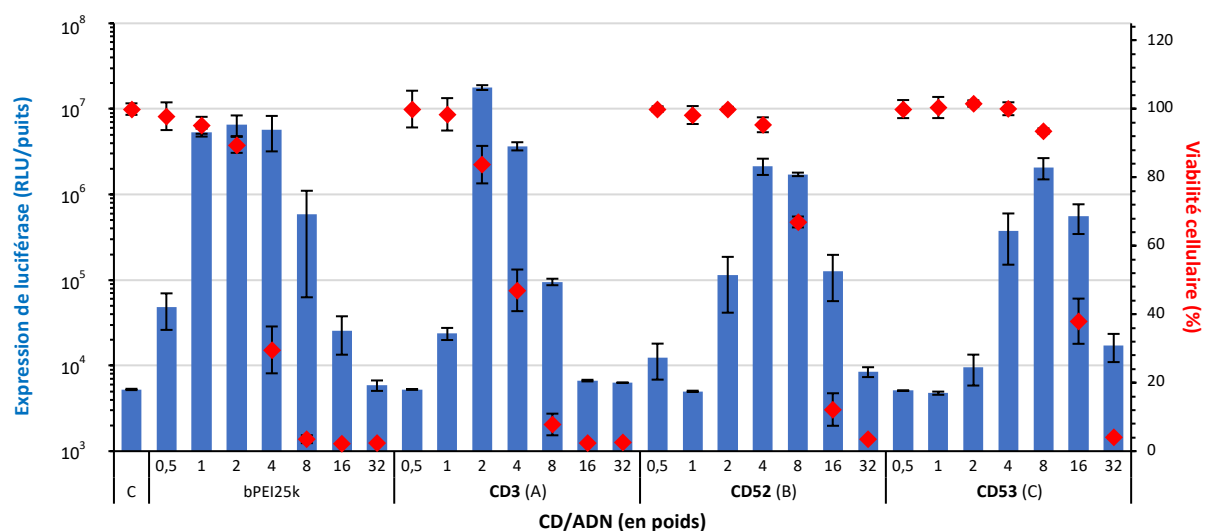


Figure 42. Efficacité de transfection de CDs obtenus en faisant varier la quantité en réactifs de départ. Les particules de cette série ont toutes été synthétisées à partir d’un mélange d’acide citrique et de bPEI600 (1/4, en poids). A : 0,125/0,5 g ; B : 0,25/1 g ; C : 0,5/2 g.

4.3. Caractérisations physico-chimiques des dotoplexes

Après avoir sélectionné les particules carbonées avec les meilleures propriétés de transfection que nous ayons pu obtenir (**CD3**), une étude des caractéristiques physico-chimiques des dotoplexes correspondants a été réalisée.

Différents complexes avec l'acide nucléique ont ainsi été fabriqués en faisant varier le rapport en poids CD/ADN et une évaluation de la taille, charge et capacité de complexation de l'acide nucléique a été menée pour chacun des dotoplexes obtenus. Il est à noter ici que la concentration en dotoplexes des solutions utilisées pour les mesures de tailles et de charges par DLS est bien inférieure à celle à laquelle les CDs "nus" ont été caractérisés (70 µg/mL contre 1 mg/mL, respectivement). Outre le fait que des mesures de taille et de charge sur des solutions de dotoplexes à 1 mg/mL engendreraient une consommation très importante d'ADN et, par voie de conséquence, des coûts élevés, elles ne seraient que peu pertinentes. En effet, comme nous l'avons discuté dans le paragraphe 3.3., la mesure par DLS de la taille et de la charge d'une nanoparticule dépend assez fortement de la concentration à laquelle est réalisée la mesure et ce qui nous intéresse ici est bien de caractériser les dotoplexes à la concentration à laquelle ils sont utilisés dans les expériences de transfection. Aussi, à des fins de comparaison, avons nous déterminé la taille et la charge de **CD3** en solution dans l'eau à 70 µg/mL (pH 7,4). Dans ces conditions, la taille mesurée est d'environ 100 nm, contre 20,6 nm mesuré en solution plus concentrée (1 mg/mL). Par contre, le potentiel zêta varie assez peu puisqu'il est de +32,0 mV, contre +33,3 mV à 1 mg/mL. De la même manière, les tailles associées à chacun des rapports en poids CD/ADN des dotoplexes se situent toutes autour de 100 nm, excepté pour ceux dont le potentiel zêta est proche de la neutralité ($0,4 < \text{CD/ADN} < 0,45$, *vide infra*) et qui agrègent fortement. La complexation d'un acide nucléique à la surface de **CD3** ne semble donc pas modifier de manière significative la taille de la particule. La détermination du potentiel zêta des dotoplexes par DLS révèle également que, à partir d'un rapport en poids **CD3**/ADN de 0,5, les nano-objets fabriqués deviennent fortement positifs, avec une valeur de ζ qui plafonne très rapidement vers +30 mV, similaire à celle mesurée pour les CDs "nus" (*i.e.* non complexés à de l'ADN) (figure 43).

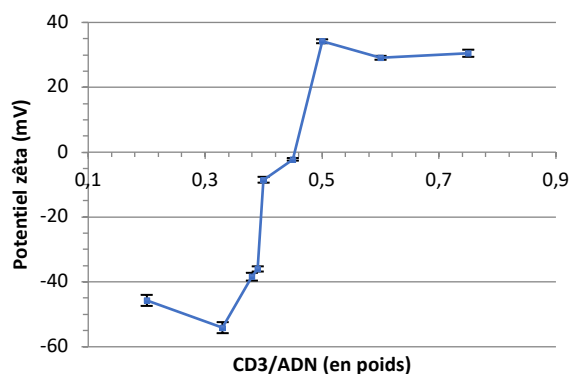


Figure 43. Influence du rapport en poids CD/ADN sur le potentiel zêta des dotoplexes. Toutes les mesures ont été réalisées pour des concentrations en dotoplexes de 70 µg/mL.

Une évaluation de la capacité de **CD3** à complexer et à condenser l'ADN a été réalisée en parallèle par électrophorèse sur gel d'agarose pour des rapports en poids CD/ADN compris entre 0,25 et 2 (figure 44). Les résultats montrent une condensation totale de l'acide nucléique pour un rapport **CD3**/ADN proche de 0,5 et confirment donc que, au-delà de ce ratio, les dotoplexes sont chargés positivement. Le fait que l'efficacité de transfection maximum nécessite un rapport en poids **CD3**/ADN de 2 (donc largement supérieur à 0,5) ne peut donc s'expliquer par la seule considération de la charge et de la taille des dotoplexes. L'explication pourrait résider dans le fait que, même si tout l'ADN est complexé par les CDs dès le rapport en poids de 0,5, des boucles de l'acide nucléique resteraient exposées aux endonucléases et pourraient subir des dégradations menant ultérieurement au relargage d'un ADN non fonctionnel dans la cellule. Nous reviendrons sur ce point dans le chapitre suivant, lorsque nous détaillerons l'élaboration de plateformes théranostiques selon le modèle dit de "protocell" (paragraphe 5.2.1.).

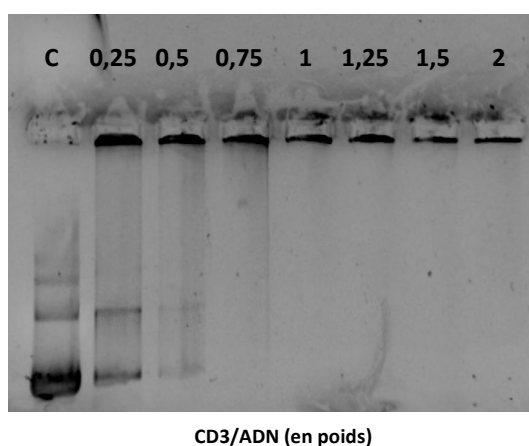


Figure 44. Électrophorèse sur gel d'agarose réalisée avec les dotoplexes **CD3**/ADN préparés avec différents rapports en poids. Le contrôle (C) correspond à de l'ADN "nu".

Chapitre 5. Développement d'agents théranostiques à base de carbon dots

5.1. Contexte et objectifs

Avec le foisonnement des recherches dans le domaine des nanotechnologies, diverses avancées ont été faites qui ont ouvert la voie à l'élaboration de systèmes nanoparticulaires multifonctionnels, de plus en plus complexes et "intelligents", capables de combiner à la fois des propriétés de thérapie et de diagnostic. À l'heure actuelle, ces agents dits théranostiques sont essentiellement élaborés à partir de vecteurs lipidiques ou polymériques, de nanoparticules métalliques ou de silice mésoporeuse, et permettent de véhiculer, au sein d'un site d'intérêt spécifique, un (ou plusieurs) actif(s) thérapeutique(s) ainsi qu'un agent de contraste permettant la mise en œuvre d'une modalité d'imagerie. Dans le cas des traitements anti-tumoraux, par exemple, cette association permet d'augmenter l'efficacité thérapeutique de l'agent anticancéreux (accumulation au niveau de la tumeur, réduction des effets secondaires indésirables liés à sa toxicité), de détecter et d'imager la tumeur, et de suivre son évolution avec précision.

Dans ce contexte, les carbon dots suscitent un intérêt croissant et leurs propriétés physico-chimiques intrinsèques (photoluminescence, stabilité chimique, biocompatibilité...) les rendent particulièrement bien adaptés à des applications dans le domaine. Dans le paragraphe 2.5.4.2., nous avons fait un état de la littérature concernant les différentes approches qui ont été utilisées jusqu'à présent pour la vectorisation, par des CDs, de molécules anticancéreuses, d'une part, et d'acides nucléiques thérapeutiques, d'autre part. Nous avons également mis en avant le fait que l'élaboration d'une plateforme synthétique qui serait capable de combiner la chimiothérapie et la thérapie génique permettrait d'induire une synergie dans l'efficacité du traitement. Cependant, à notre connaissance, Wang *et al.* sont les seuls à avoir conçus, à ce jour, un système à base de CDs amphiphiles qui permet la vectorisation simultanée d'ADN ou de siARN et d'une drogue anti-tumorale, en l'occurrence la doxorubicine.¹⁷³ D'autre part, comme nous l'avons également déjà évoqué, chacune des techniques d'imagerie médicale utilisées actuellement présente des avantages mais également des inconvénients. En effet, aucune technique ne permet d'associer, à elle seule, une grande sensibilité et une haute résolution. Aussi, le développement de nano-objets permettant de combiner les avantages de plusieurs modalités d'imagerie représente un immense intérêt pour un diagnostic plus précis et, par voie de conséquence, une thérapie plus efficace.

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que des CDs générés à partir d'un mélange acide citrique/bPEI600 (1/4) sont capables de vectoriser du matériel génétique *in vitro* avec une efficacité supérieure à celle d'un agent de transfection de référence, le bPEI25k. En nous basant sur ces résultats, nous avons pris comme objectif de concevoir des systèmes capables de permettre la co-délivrance d'un acide nucléique (ADN, siARN) et d'un actif thérapeutique hydrophobe (paclitaxel, PTX), tout en offrant les possibilités d'une imagerie bimodale *in vivo*, par fluorescence et par résonance magnétique (IRM). L'association des propriétés intrinsèques de photoluminescence des carbon dots à un potentiel en imagerie par résonance magnétique permet de concevoir une plateforme qui offre à la fois une grande sensibilité, une très bonne résolution spatiale et une pénétration tissulaire importante en termes d'imagerie.

5.2. Élaboration de systèmes à base de CDs pour des applications en thérapie combinée

Dans le but de concevoir des vecteurs fondés sur les carbon dots et capables de vectoriser simultanément une drogue anti-tumorale hydrophobe et un acide nucléique thérapeutique, deux stratégies ont été envisagées (figure 45). L'une fait référence à un modèle dit de "protocell" dans lequel la nanoparticule carbonée, complexée à un ADN (ou à un siARN) est recouverte *a posteriori* par une bicouche lipidique fonctionnalisée, de façon à conférer à l'ensemble une certaine furtivité et offrir une possibilité d'incorporation d'un actif hydrophobe (*i.e.* paclitaxel) (voie A). L'autre stratégie implique l'établissement d'une couche bifonctionnelle (conférant les propriétés de furtivité) autour de la particule, par le biais de l'établissement de liaisons covalentes entre un motif PEGylé et la particule (voie B). L'incorporation d'un intron hydrophobe dans cette seconde construction, entre le motif PEG et la particule, doit permettre de ménager l'accueil d'un actif hydrophobe pour les combothérapies et d'envisager sa co-délivrance avec un acide nucléique complexé par le cœur cationique de la particule.

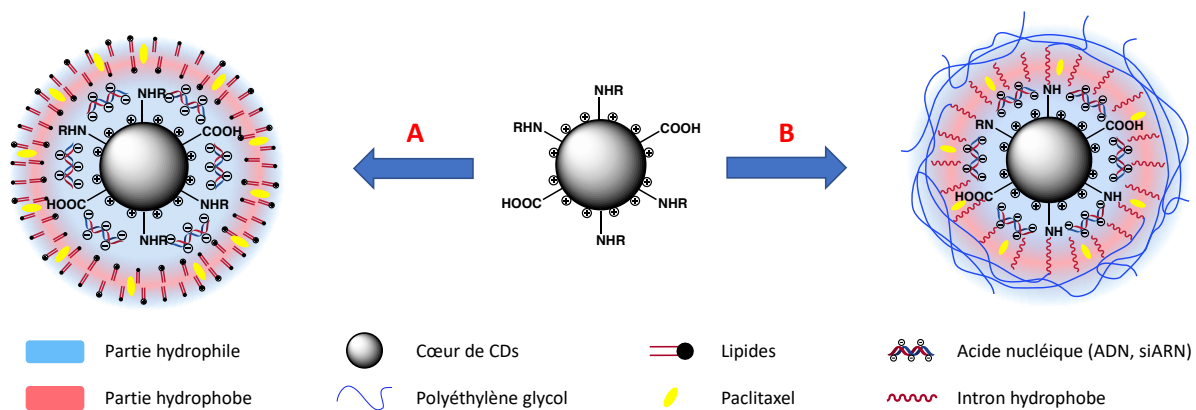


Figure 45. Stratégies mises en jeu dans la synthèse de nanoparticules à base de CDs pour des utilisations en thérapies combinées. Voie A : NPs développées à partir d'interactions faibles. Voie B : NPs développées à partir de liaisons covalentes.

5.2.1. Développement de plateformes synthétiques à base de CDs selon le modèle "protocell"

Cette approche est inspirée de la préparation de "protocells" à base de particules de silice mésoporeuse.¹⁹³ Les carbon dots cationiques, tels que développés et optimisés dans le chapitre précédent, ont été utilisés pour complexer le gène d'intérêt. Les dotoplexes sont préparés avec un excès d'acide nucléique de façon à présenter une charge nette négative. Ils sont ensuite recouverts par une bicouche lipidique selon un protocole classique d'hydratation de film lipidique mince (figure 46). Typiquement, un lipide cationique (pur ou en mélange, *vide infra*) en solution dans un solvant organique est placé dans un tube eppendorf et un film est formé sur les parois par évaporation lente du solvant. Ce film lipidique est ensuite repris par une solution aqueuse contenant les dotoplexes anioniques. Les phospholipides s'auto-assemblent alors spontanément de manière à exposer leur tête polaire vers le milieu aqueux et/ou la surface chargée négativement du complexe CD/ADN. Le mélange lipidique utilisé est composé d'un phospholipide fusogène, la DOPE, constituant majeur des membranes et facilitant l'internalisation cellulaire, et d'un lipide cationique récemment synthétisé au laboratoire (PP981) et dont l'efficacité de transfection a été démontrée.¹⁹⁴ Ces deux lipides ont en outre été choisis pour leur température de transition de phase principale (T_M) négative, liée à la présence de chaînes grasses insaturées ($C_{18:1}$). Ils ont ainsi la capacité de former des membranes fluides autour de la particule, ce qui permet l'insertion, le cas échéant, d'un actif hydrophobe.

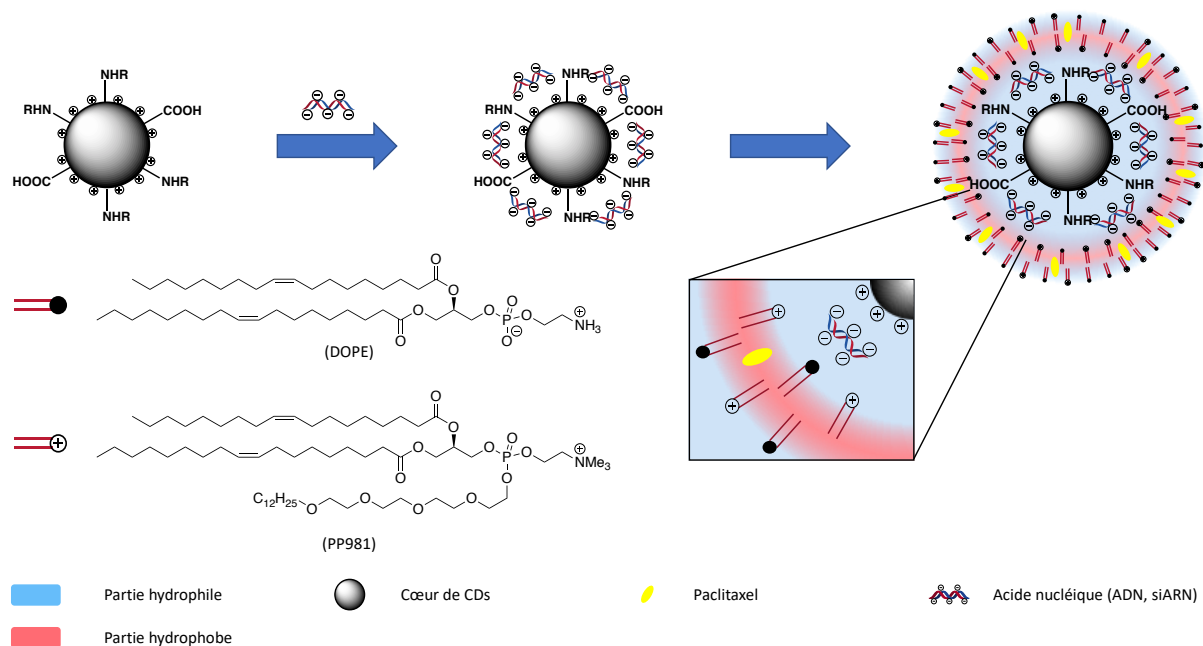


Figure 46. Représentation schématique de la stratégie "protocell". La surface des dotoplexes préparés avec un excès d'acide nucléique est recouverte par une bicouche lipidique qui permet le dopage d'une drogue anti-tumorale, *via* une insertion hydrophobe.

Des essais préliminaires de transfection avec ces constructions ont été réalisés. Nous avons ainsi comparé l'efficacité des dotoplexes formés à partir de **CD3** et de plasmide d'ADN (avec différents rapports en poids), avec celle des "protocells" correspondantes pour lesquels on a fait varier la composition du film lipidique afin de moduler la charge cationique des complexes résultants. Par convention, cette charge est décrite par un rapport N/P, où N représente la quantité molaire de lipide cationique et P, la quantité molaire de phosphates dans l'acide nucléique. Le film lipidique utilisé contient de la DOPE et le lipide cationique PP981, dans un rapport 2/1 en poids. Les résultats obtenus nous indiquent que le film lipidique améliore significativement l'efficacité de transfection des particules pour des rapports en poids CD/ADN inférieurs ou égaux à 1, mais la réduit pour les rapports supérieurs (figure 47). Pour rappel, les mesures de potentiels zêta réalisées sur les dotoplexes ont révélé que ces derniers deviennent fortement chargés positivement à partir d'un rapport CD/ADN de 0,5 (cf. paragraphe 4.3.). Logiquement, on devrait s'attendre à ce que les lipides cationiques n'interagissent pas avec les dotoplexes présentant un rapport CD/ADN supérieur à cette valeur ce qui, à l'évidence, n'est pas le cas. Ceci pourrait trouver une explication en considérant que la représentation d'une "protocell", telle qu'elle est proposée à la figure 46, est trop simpliste.

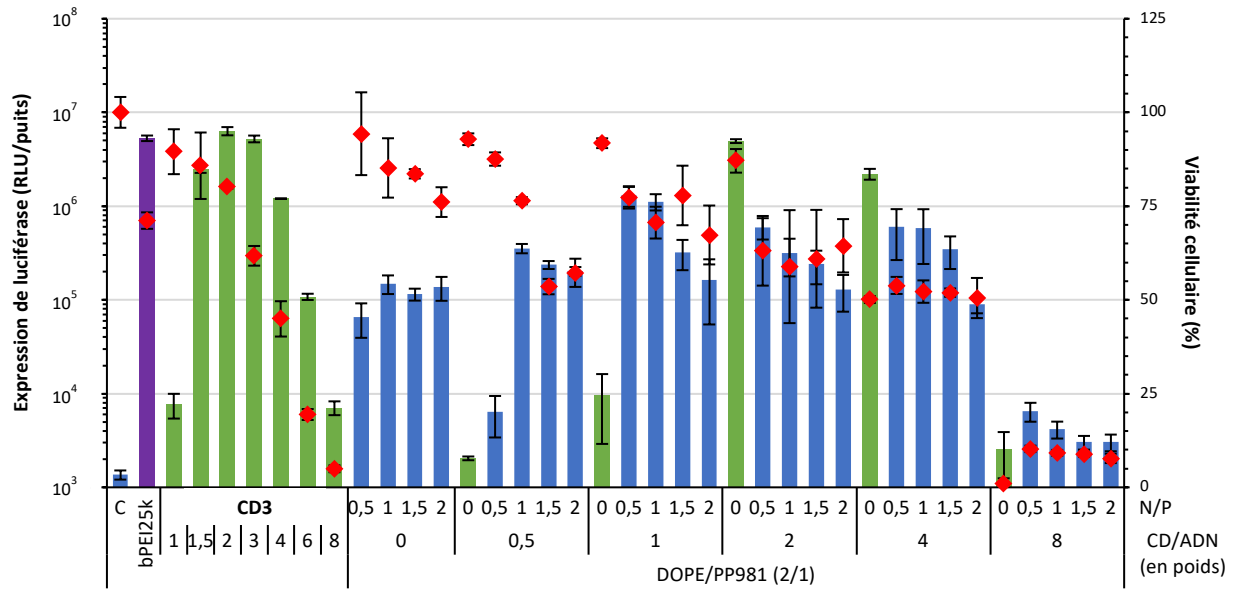


Figure 47. Comparaison de l'efficacité de transfection entre le dotopexe (en vert) et la "protocell" (en bleu) pour différents rapports N/P. Le film lipidique enrobant la particule est composé d'un mélange 2/1 en poids de DOPE et de PP981. Le bPEI25k (en violet) est un contrôle positif (bPEI25k/ADN, 2/1 en poids).

Il serait en effet plus raisonnable d'imaginer les dotopexes comme des agrégats de carbon dots positifs dans lesquels sont piégés les acides nucléiques (figure 48). On peut alors comprendre que, même pour des dotopexes globalement chargés positivement, des molécules d'acides nucléiques soient partiellement accessibles en surface, selon leur position au sein de la structure et du rapport en poids CD/ADN. Pour des rapports en poids CD/ADN

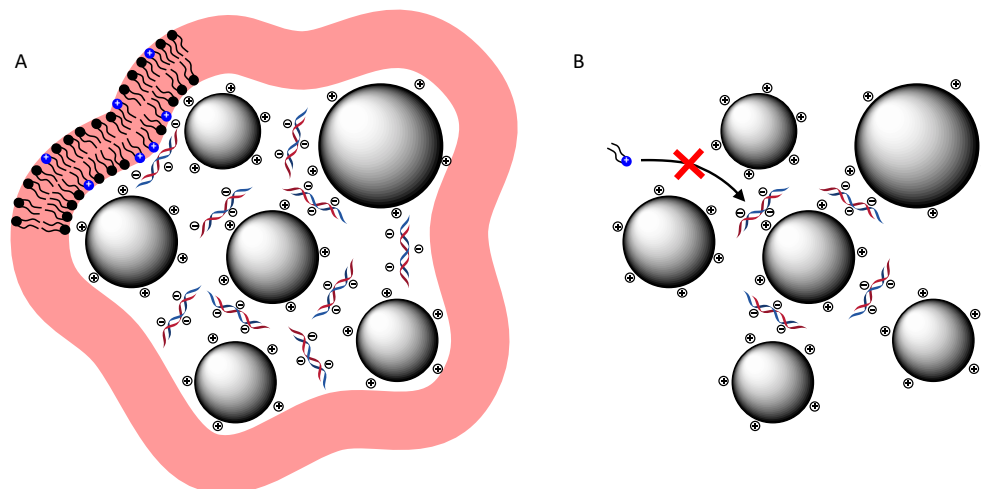


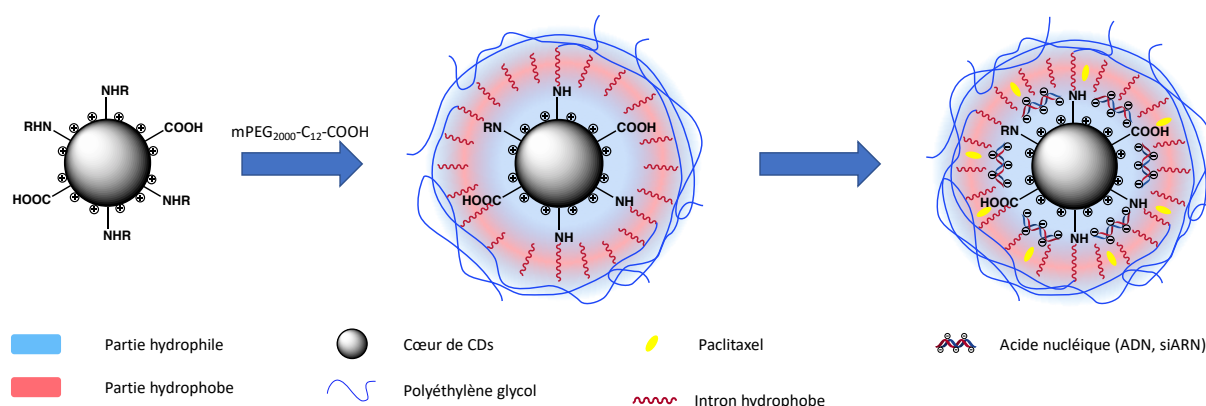
Figure 48. Représentation schématique d'une structure de dotopexes formés à partir d'agrégats de CDs positifs entre lesquels s'insèrent des acides nucléiques négatifs. A : Agrégats de nanoparticules formés à partir de rapports en poids CD/ADN faibles (< 1) autorisant une interaction avec un film lipidique cationique ; B : Agrégats de nanoparticules formés à partir de rapports en poids CD/ADN élevés (> 2) pour lesquels la répulsion électrostatique empêche l'interaction avec le film lipidique cationique.

faibles (inférieurs ou égaux à 1), il est donc probable que des molécules d'acides nucléiques soient exposées ou partiellement exposées en surface et soient donc capables d'interagir avec le film lipidique cationique (figure 48A), aboutissant à la formation d'un film autour de la particule. Celui-ci confère à cette dernière une protection vis-à-vis des enzymes de dégradation (nucléases) qui sont susceptibles de dégrader l'ADN et, par voie de conséquence, permet une augmentation du niveau de transfection puisque l'ADN est mieux préservé. À l'opposé, pour des rapports en poids CD/ADN élevés (supérieurs ou égaux à 2), la probabilité de voir des portions d'acide nucléique exposées en surface est plus faible. Les particules ainsi produites ne sont donc pas capables d'interagir efficacement avec le film lipidique cationique, une répulsion électrostatique s'établissant entre les lipides et les CDs (figure 48B). Dans ce cas, les lipides s'organisent en solution aqueuse pour former des liposomes, comme ils le feraient en l'absence des particules. Ces derniers pourraient éventuellement perturber l'activité d'endocytose de la cellule et être à l'origine de la perte d'efficacité de transfection observée. Par ailleurs, nous pouvons également constater que, pour un rapport en poids CD/ADN donné, au-delà d'une certaine quantité de lipide ajouté, on observe une diminution de l'efficacité de transfection du complexe. Une explication pourrait être qu'une fois que toutes les boucles d'ADN exposées sont masquées par le lipide, celui-ci en excès tend alors à former des liposomes qui vont interférer avec les mécanismes d'endocytose (*vide supra*). Compte tenu de ces résultats, il aurait peut-être été judicieux d'optimiser davantage la proportion en lipides dans les constructions et d'étudier des rapports N/P plus faibles pour des constructions de dotoplexes CD/ADN de rapport en poids 1/1, par exemple. Autre remarque importante, le film lipidique présent autour de la particule n'améliore pas, contrairement à nos attentes, la viabilité cellulaire de la "protocell". L'incorporation de lipides PEGylés au sein de la bicouche permettrait certainement de diminuer la toxicité de l'ensemble.

Les particules produites démontrent ainsi la validité de notre modèle *in vitro* et nos résultats ouvrent d'intéressantes perspectives d'optimisation en termes d'efficacité de transfection et de maintien de la viabilité cellulaire. Pour une utilisation *in vivo*, il conviendra néanmoins d'incorporer un lipide PEGylé dans les constructions afin de leur conférer la furtivité nécessaire. Ceci pourra être facilement réalisé en incorporant celui-ci dans le film lipidique utilisé pour l'enrobage des dotoplexes.

5.2.2. Développement de plateformes synthétiques à base de CDs selon le modèle covalent

La seconde stratégie que nous avons examinée implique une modification chimique des CDs (figure 49). Les amines présentes à la surface des nanoparticules ont ainsi été partiellement acylées par un acide gras fonctionnalisé en position terminale par un motif mPEG₂₀₀₀. La présence d'un segment dodécyl (C_{12:0}) au sein de cette construction, entre la surface cationique du carbon dot et la "couronne" de polymère hydrophile, doit permettre l'insertion d'une drogue hydrophobe pour des applications en thérapie combinée. La préparation de ces constructions basées sur la fonctionnalisation *a posteriori* de la surface des CDs passe par la fabrication de greffons à partir de poly(éthylène glycol) monométhyléther 2000 et acylation des nanoparticules (figure 50). À des fins de comparaison et pour étudier la capacité des constructions à accueillir un actif hydrophobe, des constructions plus simples, n'incluant pas d'intron hydrophobe, ont également été préparées. Différentes particules ont ainsi été obtenues (**CD54**, **CD55**, **CD56** et **CD57**) en faisant varier la proportion du réactif d'acylation **4** ou **5** (25 et 10 % en poids) par rapport à **CD3**. Les taux effectifs de greffage, mesurés par RMN, ainsi que les caractéristiques physico-chimiques des particules sont résumés dans le tableau 17. On peut constater que l'efficacité de la réaction de post-fonctionnalisation est fortement dépendante de la nature du réactif PEGylé. En effet, pour les particules acylées par l'acide **4** (**CD56** et **CD57**), les taux de greffage apparaissent 2 à 3 fois plus importants que lorsque l'acide **5** est utilisé (**CD54** et **CD55**). Une hypothèse pourrait être



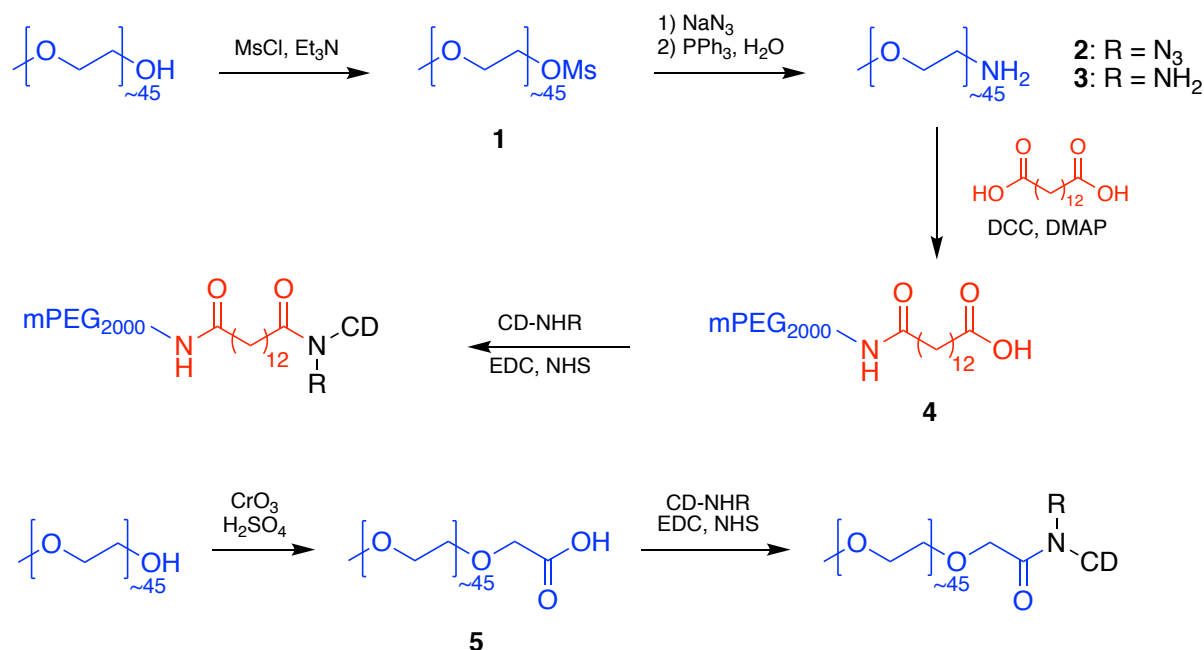


Figure 50. Voies de synthèse des greffons utilisés pour la fonctionnalisation des carbon dots.

que, lorsque le composé **4** réagit avec une nanoparticule, le caractère hydrophobe du motif dodécyl génère un environnement favorable à la concentration locale des réactifs d'acylation et, de ce fait, augmente la probabilité de réaction avec les amines à la surface de la particule. Par ailleurs, toutes les particules produites possèdent des potentiels zêta très positifs et relativement équivalents (de +25,6 à +32,8 mV), permettant *a priori* la complexation de l'acide nucléique et sa possible vectorisation à l'intérieur des cellules. Toutefois, il est maintenant bien établi que la PEGylation des nanoparticules peut limiter leur internalisation dans les cellules

Tableau 17. Influence des différents greffons introduits à la surface du CD sur les propriétés physico-chimiques des particules.

N°	% PEG (w/w)	Taux de greffage du PEG (RMN)	Taille* (nm)	Potentiel zêta* (mV)
CD3	-	-	20,6 ± 3,6	+33,3 ± 1,8
<i>Post-fonctionnalisation mPEG₂₀₀₀-COOH[‡]</i>				
CD54	25	9,6	21,4 ± 1,3	+25,6 ± 2,5
CD55	10	6,4	12,2 ± 0,4	+32,8 ± 1,7
<i>Post-fonctionnalisation mPEG₂₀₀₀-alkyl-COOH[‡]</i>				
CD56	25	31	11,8 ± 0,8	+30,4 ± 2,0
CD57	10	11	17,7 ± 3,2	+26,6 ± 2,1

* Mesuré à pH 7,4. ‡ CDs synthétisés par pyrolyse au four à micro-onde domestique, à partir d'un mélange d'acide citrique et de bPEI600 (1/4, en poids).

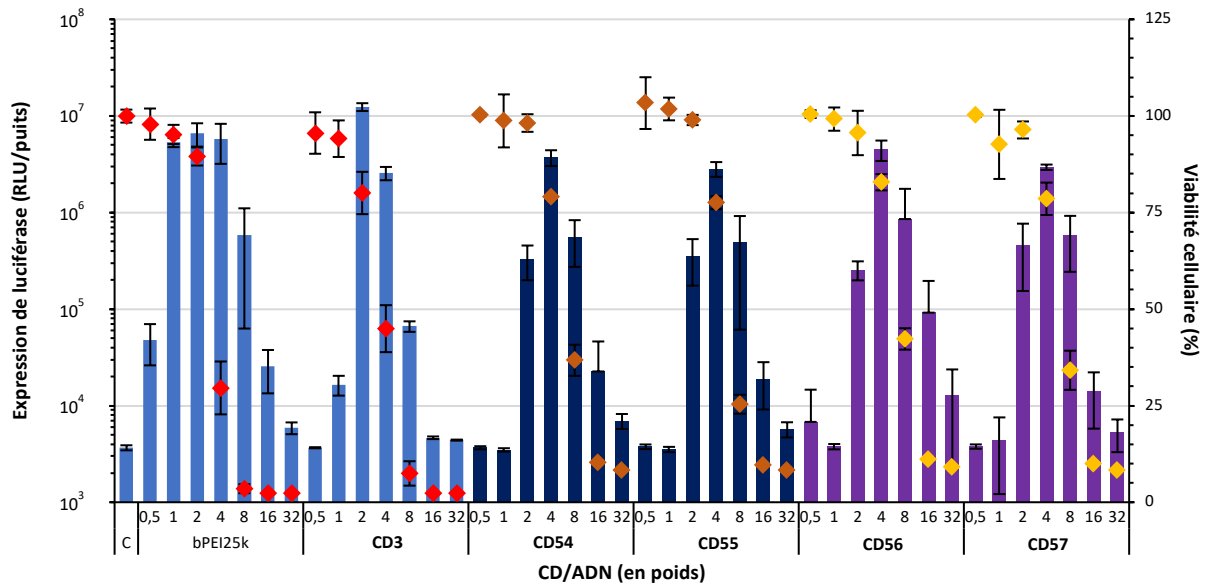


Figure 51. Comparaison de l'efficacité de transfection de **CD3** et de ses versions PEGylées. Sur ce graphe, sont représentés l'expression de luciférase (en bleu foncé et violet pour les CDs acylés avec les composés **5** et **4**, respectivement) et la viabilité cellulaire (en marron et jaune pour les CDs acylés avec les composés **5** et **4**, respectivement).

et leur sortie de l'endosome.¹⁹⁵ Dans notre cas, les résultats obtenus démontrent effectivement une diminution de l'efficacité de transfection d'un facteur trois à quatre pour les CDs que nous avons PEGylés (figure 51). En outre, comparé à **CD3**, le précurseur non PEGylé, une quantité deux fois plus importante de CDs PEGylés est nécessaire pour éliciter la réponse maximale. Les données collectées indiquent également que, quel que soit le réactif de PEGylation (avec ou sans intron hydrophobe) et quel que soit le taux de greffage des particules (de 6,4 à 31 %, en poids), les efficacités de transfection sont quasiment équivalentes et très comparables à celle du bPEI25k, ce qui démontre le fort potentiel de ces constructions PEGylées dans la délivrance de gènes. Une autre caractéristique de ces dernières réside dans leur faible toxicité associée. Celle-ci est, en effet, significativement réduite par rapport à **CD3**, puisque la viabilité passe de 45 % à 78-83 %, pour un rapport en poids CD/ADN de 4.

Pour comparaison, deux autres particules ont été générées en mettant en œuvre une voie de synthèse déjà rencontrée à plusieurs reprises tout au long de ce manuscrit, la voie "de novo". Pour ce faire, différentes quantités de poly(éthylène glycol) monométhyléther 2000 ($n \approx 45$) ont été ajoutée au mélange acide citrique/bPEI600 (1/4) avant irradiation micro-onde dans les conditions préalablement mises au point dans le chapitre précédent (temps d'irradiation : 170 s ; puissance du four à micro-onde : 620 W ; solvant : HCl 0,1 N, 5 mL). Les

résultats obtenus indiquent que, dans les conditions testées, les particules produites (**CD58** et **CD59**) présentent un taux d'incorporation de PEG plus faible (3,9 et 8,0 %, en poids) par rapport à celles issues d'une post-fonctionnalisation (tableau 18). À pH physiologique, **CD58** et **CD59** présentent un potentiel zêta fortement positif (+29,4 et +29,6 mV, respectivement), ce qui devrait leur permettre de complexer et vectoriser de l'ADN. C'est effectivement ce qui est observé puisque l'efficacité de transfection des particules produites est comparable ou supérieure à celle du bPEI25k (figure 52). Contrairement à ce que nous avons observé avec les CDs PEGylés par post-fonctionnalisation, ces expériences révèlent des différences significatives en termes d'efficacité optimale et de toxicité des CDs selon la quantité de PEG incorporé dans les nanoparticules. En effet, **CD58** qui présente un taux d'incorporation de PEG de

Tableau 18. Influence de l'ajout de différentes quantités de mPEG₂₀₀₀ dans un mélange acide citrique/bPEI600 (1/4, en poids) sur les propriétés physico-chimiques des CDs obtenus.

N°	PEG mis en jeu (% en poids)	Taux de d'incorporation de PEG (% en poids)	Taille* (nm)	Potentiel zêta* (mV)
CD3	-	-	20,6 ± 3,6	+33,3 ± 1,8
CD58	15	3,9	13,1 ± 0,5	+29,4 ± 0,4
CD59	45	8,0	30,3 ± 2,2	+29,6 ± 0,8

* Mesuré à pH 7,4.

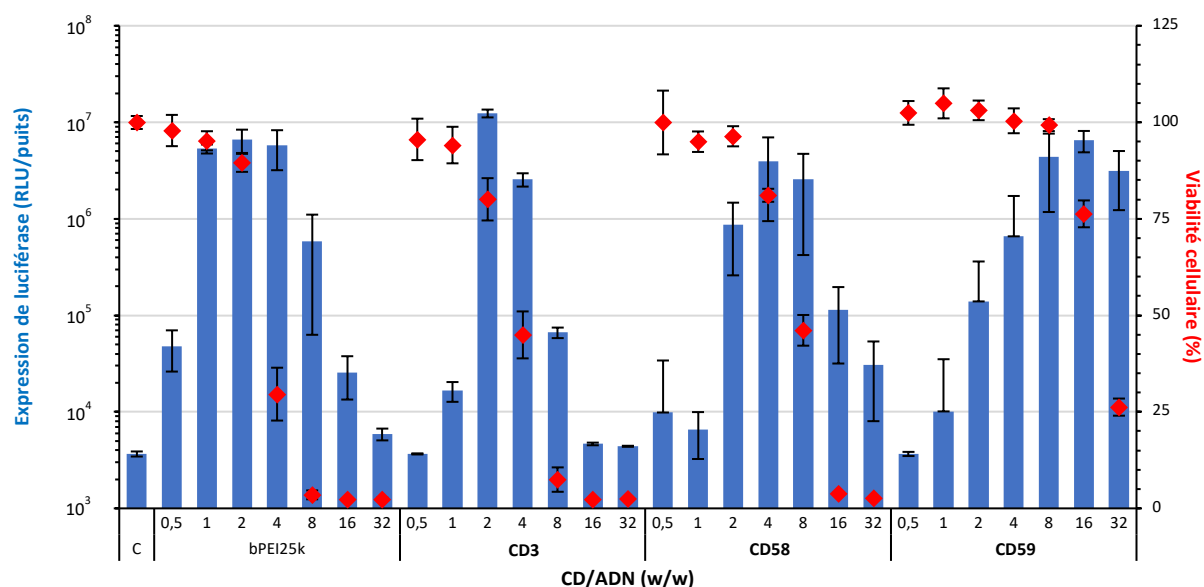


Figure 52. Efficacité de transfection et toxicité des CDs PEGylés préparés par la voie "de novo", et comparaison avec le bPEI25k et les CDs non PEGylés **CD3**.

3,9 % élicite une transfection maximale pour un rapport CD/ADN de 4, alors qu'il faut monter jusqu'à un rapport de 16 (soit quatre fois plus) avec **CD59** pour lequel un taux d'incorporation de PEG de 8,0 % a été mesuré. Par ailleurs, aucune toxicité significative n'est observée avec les dotoplexes **CD59**/ADN pour des rapports en poids inférieurs à 16, tandis que la viabilité cellulaire n'est déjà plus que de 46 % en présence des dotoplexes **CD58**/ADN pour un rapport en poids de 8/1.

Ainsi, de ces études sur les CDs présentant des motifs PEG, il ressort que, produits par post-fonctionnalisation ou "*de novo*", ils offrent des performances en termes de transfection qui sont assez similaires et comparables à celles du bPEI25k. De façon un peu surprenante cependant, le taux élevé de PEGylation mesuré pour **CD56** (31 %) ne semble pas altérer ses propriétés de transfection comme on aurait pu le craindre au vu de certains résultats rapportés dans la littérature. Ceci pourrait éventuellement être l'indication d'une certaine biodégradabilité des nanoparticules, les motifs PEG ornant celles-ci étant éliminés plus ou moins rapidement dans le milieu biologique. En termes de toxicité, on observe que la PEGylation induit également une meilleure tolérance de la part des cellules.

5.2.3. Encapsulation de PTX dans les constructions

Les études menées jusqu'à présent ont permis de faire valoir le fort potentiel des nanoparticules produites en termes de vectorisation d'un acide nucléique. Cependant, comme nous l'avons évoqué plus haut, notre but est l'élaboration de vecteurs permettant la délivrance simultanée d'un gène et d'une drogue anti-tumorale hydrophobe pour des applications en thérapie combinée. Dans le cadre de cette étude et pour tenter d'apporter une preuve de concept, nous avons choisi le PTX comme agent anti-tumoral. Cette molécule, extraite de l'écorce d'if, est en effet très utilisée dans le traitement de nombreux cancers (cancer du sein, de l'ovaire, du poumon...). Son mécanisme d'action est bien connu et consiste à bloquer la division cellulaire en inhibant la dépolymérisation des microtubules, conduisant ainsi à la mort cellulaire par apoptose. Dans les constructions **CD56** et **CD57**, la présence de chaînes aliphatiques (C₁₂) intercalées entre la surface des particules et les motifs PEG est supposée conduire à l'établissement d'une "couronne" hydrophobe autour du cœur cationique (cf. figure 49), favorable à l'accueil de composés hydrophobes comme le PTX. Afin

de tester cette hypothèse, nous avons donc cherché dans un premier temps à évaluer la cytotoxicité des nanoparticules dopées au PTX, en l'absence d'acide nucléique, la perte de viabilité cellulaire pouvant être directement corrélée à l'incorporation de PTX dans les cellules (figure 53). Dans ces expériences, des solutions éthanoliques (EtOH/H₂O 75/25, v/v) de **CD56** et de PTX ont été mélangées volume à volume, évaporées, puis resuspendues dans l'eau pure et incubées pendant 24 h avec des cellules A549 en culture, en plaques 96-puits. Les quantités de CDs déposées sur les cellules correspondent à celles utilisées dans les expériences de transfection (0,2 à 12,8 µg de CDs par puits). Les résultats obtenus montrent, conformément à nos attentes, une diminution significative de la viabilité cellulaire à mesure que la concentration en PTX dans les constructions augmente. De fortes différences sont observées en particulier pour des quantités de CDs inférieures à 3,2 µg/puits. Par exemple, pour 0,8 µg de **CD56**, aucune baisse significative de viabilité cellulaire n'est constatée en l'absence de PTX, alors qu'elle est réduite à 63 % quand les NPs sont dopées avec 0,2 % de PTX, et à 34 % lorsqu'elles sont dopées à 1 %.

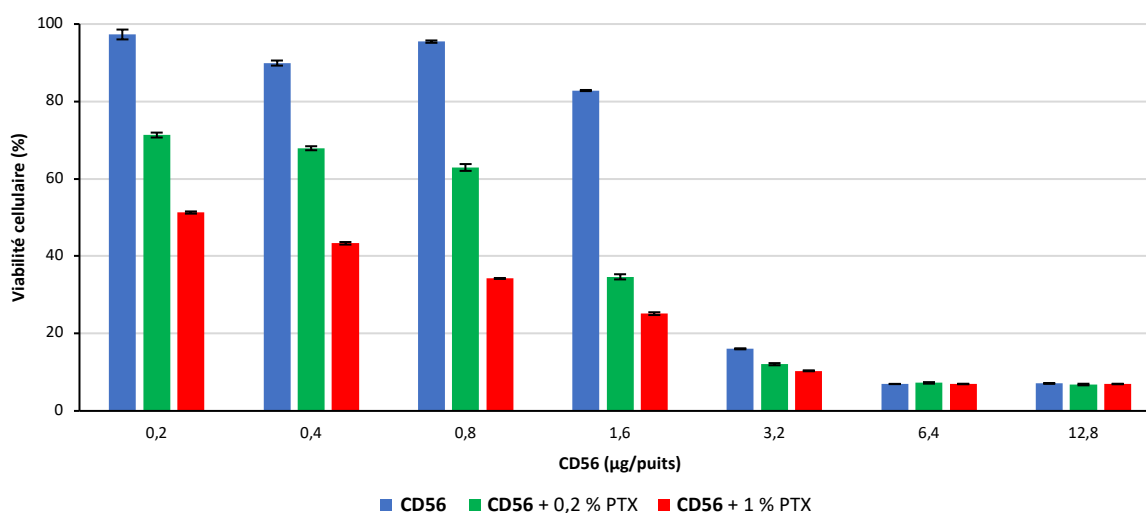


Figure 53. Test au MTT réalisé sur un CD (**CD56**), fonctionnalisé par un motif alkyl-PEG, pour lequel différentes proportions en paclitaxel (PTX) ont été incorporées (0,2 et 1 %).

Des études complémentaires devront être réalisées en faisant notamment varier plus finement la quantité de PTX dans les constructions et en évaluant la toxicité induite par ces nanoparticules sur d'autres lignées cellulaires. Dans le chapitre 3, nous avons effectivement constaté une sensibilité plus élevée de la lignée THP-1 aux CDs.

D'autre part, des expériences visant à déterminer la charge effective en PTX dans les constructions ont été menées. À l'heure actuelle, très peu d'études dans la littérature font état de CDs dopés au paclitaxel.^{196,197} En effet, les études sur la délivrance d'actifs thérapeutiques hydrophobes par ces particules carbonées de taille nanométrique impliquent essentiellement la doxorubicine.^{198,199} Ce composé anti-tumoral présente une bande d'absorption caractéristique à 485 nm permettant aisément d'évaluer son taux de chargement dans la nanostructure par simple dosage UV-visible. La bande d'absorption du PTX se situant dans l'UV proche ($\lambda_{\text{max}} = 230 \text{ nm}$), elle rend très délicat ce genre d'expériences, en raison du fait que les CDs présentent généralement une forte absorption dans cette région spectrale (cf. chapitre 2). Aussi, une première approche a été de déterminer la teneur en PTX dans nos constructions en faisant des tentatives d'extraction au chloroforme. Les CDs n'étant pas solubles dans ce solvant, il nous semblait possible d'extraire le PTX en phase organique et d'effectuer ensuite un dosage UV classique. Nous avons donc suspendu les CDs dans un mélange PBS/MeOH (70/30) et ajouté la quantité adéquate de PTX (0,2 et 1 % en poids), puis incubé le tout pendant une demi-heure à température ambiante avant d'évaporer le solvant. Les résidus ont ensuite été repris en milieu aqueux et extraits plusieurs fois au chloroforme. À chaque extraction, la phase organique a été séparée et analysée par spectrométrie UV-visible. Bien que cette stratégie semblait simple et rapide à mettre en œuvre,^{196,200} les résultats obtenus n'ont pas été concluants. En effet, la somme des absorbances mesurées à 230 nm sur l'ensemble des différentes fractions récoltées est apparue bien supérieure à la quantité de PTX initialement introduite dans les échantillons. Cela pourrait s'expliquer par les petites quantités de PTX mises en jeu (de l'ordre de 10-30 μg) et par la présence d'impuretés dans les solvants utilisés (chloroforme et méthanol pourtant de qualité "spectrophotométrique") ou de contaminations introduites pendant la phase d'extraction, qui absorbent significativement à des longueurs d'ondes inférieures à 250 nm. Une autre approche que nous avons essayé de mettre au point est basée sur une centrifugation sur membrane. Pour cela, nous avons utilisé des dispositifs Centricon™ qui permettent de séparer deux constituants d'un mélange, en l'occurrence les CDs et le PTX, en fonction de leur taille grâce à une membrane perméable présentant une limite d'exclusion de taille de 2000 Da. Au cours de la centrifugation, le PTX non-incorporé dans les particules est supposé diffuser à travers la membrane et un dosage UV-visible dans le filtrat devrait permettre d'en déterminer la concentration. Cette technique permet de réduire les manipulations et de limiter les risques d'introduction d'impuretés dans l'échantillon pouvant nuire à la qualité des résultats. Les

particules ont donc été dissoutes dans un mélange PBS/MeOH (70/30) et mises en présence de différentes quantités de PTX (de 0 à 100 % en poids par rapport aux CDs). Les différentes solutions ont alors été centrifugées à froid (4 °C) sur Centricon™. Les filtrats ainsi générés ont été récoltés et leur absorbance a été mesurée. Comme précédemment, les résultats obtenus n'ont pas été concluants et les problèmes rencontrés pourraient être dus à un problème d'agrégation de la drogue dans les conditions de l'expérience, limitant ainsi sa diffusion à travers la membrane, ou à un colmatage de la membrane par les CDs pendant la centrifugation.

Les différentes approches testées et mises en œuvre jusqu'à présent ne nous ont pas permis d'évaluer la teneur en PTX dans nos nanoparticules. Les faibles concentrations en PTX utilisées dans ces expériences (< 20 µg/mL), la présence d'impuretés dans les solvants et d'éventuelles contaminations introduites dans les échantillons au cours des processus de séparation engendrent effectivement des marges d'erreurs très importantes qui empêchent toute interprétation des résultats. D'autres méthodes devront donc être envisagées en se basant notamment sur des résultats acquis avec d'autres nanoparticules (nanoparticules polymériques, liposomes, micelles...) qui intègrent cette drogue anti-tumorale et dont la capacité de chargement est déterminée par dosage UV-HPLC.^{201,202} Une autre approche, bien évidemment, consisterait à faire notre preuve de concept en remplaçant le PTX par la doxorubicine. Faute de temps, cette partie du travail n'a pu être menée à terme. Dans tous les cas, des études complémentaires seront ensuite nécessaires afin de comparer l'influence du taux de greffage du fragment PEGylé à la surface de la particule (comparaison avec **CD57** par exemple) ou l'importance de l'intron hydrophobe dans la capacité d'encapsulation de la drogue (comparaison avec les particules fonctionnalisées en l'absence de la chaîne alkyle **CD54** et **CD55**). Pour des applications en thérapie combinée, la vectorisation simultanée d'un gène codant une protéine pro-apoptotique et d'un anti-tumoral hydrophobe par ces constructions permettra d'évaluer le potentiel synergique de cette combinaison et de déterminer l'efficacité que pourraient avoir ces particules dans des approches thérapeutiques.

5.3. Élaboration de plateformes théranostiques à base de carbon dots

Les différentes plateformes synthétiques présentées ci-dessus ont été conçues de manière à permettre la co-délivrance intracellulaire d'un acide nucléique thérapeutique et d'une drogue anti-tumorale hydrophobe. Toutefois, les travaux réalisés actuellement dans le

domaine de la nanomédecine tendent vers le développement de nanoparticules théranostiques. Comme nous l'avons déjà évoqué à plusieurs reprises tout au long de ce manuscrit, ces nanoparticules présentent à la fois une activité thérapeutique (à travers la vectorisation d'un principe actif) et un potentiel en imagerie (par incorporation d'agents de contraste capables d'imager des structures anatomiques et/ou pathologiques). L'élaboration et la conception de tels systèmes nanoparticulaires multifonctionnels devraient, à terme, aboutir à des traitements plus efficaces et à une médecine plus personnalisée. Dans le cadre de cette thèse, une partie de nos efforts ont donc été orientés dans ce sens et nous nous sommes attachés à étudier la possibilité de conférer à nos nanoparticules des propriétés permettant la mise en place d'une imagerie bimodale *in vivo*, par fluorescence et résonance magnétique (IRM).

5.3.1. Optimisation des CDs pour l'imagerie par fluorescence *in vivo*

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre 2, les propriétés intrinsèques de photoluminescence des CDs permettent l'utilisation de ces derniers en bio-imagerie. Cependant, la très grande majorité de ces nano-objets décrits à l'heure actuelle présentent des longueurs d'ondes d'absorption et d'émission dans la région de l'UV ou du visible, ce qui est difficilement compatible avec les contraintes de l'imagerie par fluorescence *in vivo*. En effet, à de telles longueurs d'ondes, l'absorption et la diffusion de la lumière par les tissus est importante, tout comme l'auto-fluorescence. Il est donc nécessaire de décaler ces longueurs d'ondes vers le proche infra-rouge (650-900 nm) dans le but de permettre une meilleure pénétration tissulaire de la lumière et une amélioration du contraste. Par ailleurs, à de telles longueurs d'ondes, l'intensité des radiations lumineuses est plus faible et donc la photo-toxicité générée pour les cellules et tissus en est d'autant plus réduite.

Comme on l'a vu précédemment (cf. paragraphe 2.5.4.1.), de nombreux efforts ont été développés pour produire des carbon dots avec des longueurs d'ondes d'absorption et d'émission décalées vers le proche infra-rouge. Pour notre part, nous sommes partis de **CD3**, pour lequel une optimisation des conditions réactionnelles, basée strictement sur les performances en transfection, avait été réalisée (cf. chapitre 4). Les propriétés de photoluminescence de **CD3** étant peu compatibles avec de l'imagerie *in vivo* par fluorescence ($\lambda_{exc.} = 428$ nm et $\lambda_{ém.} = 466$ nm), nous avons introduits divers additifs organiques dans nos

protocoles de synthèse et modifié ceux-ci de différentes façons afin de tester l'influence que cela pouvait avoir sur les propriétés photo-physiques des nanoparticules résultantes. Le tableau 19 résume, de manière succincte, les différentes approches que nous avons développées et les résultats obtenus en termes de propriétés photo-physiques des CDs et de capacité de ces derniers à délivrer du matériel génétique dans les cellules. En nous basant sur les données de la littérature, nous avons réalisé de multiples essais en faisant varier la nature et la concentration de l'additif dans le mélange réactionnel, le solvant ou le mode d'activation. L'ajout d'acide phosphorique dans le mélange réactionnel de base (acide citrique/bPEI600) a, par exemple, été utilisé dans la synthèse de **CD60** en raison de son caractère d'acide faible, dans le but de modifier les réactions de déshydrogénation qui ont lieu pendant la carbonisation des réactifs. La structure électronique de la particule et, par voie de conséquence, ses propriétés optiques devraient ainsi être altérées, comme cela a été montré avec d'autres systèmes (éthylène glycol-PEI).¹⁵⁹ Cependant, les résultats obtenus n'ont pas permis d'observer un quelconque déplacement des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission par rapport à celles de **CD3**. Un autre essai a été réalisé en incorporant du chlorure d'or (III) trihydraté ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) dans la nano-structure carbonée (**CD61**). Les propriétés optiques des nanoparticules d'or étant fortement dépendantes de leurs tailles, divers protocoles de synthèse ont été testés en faisant varier la proportion des réactifs, la durée d'irradiation du mélange ou la température, afin de modifier les propriétés physico-chimiques des nanoparticules obtenues. Cependant, les données recueillies n'ont montré aucune corrélation directe entre ces différents paramètres de synthèse et les propriétés photo-physiques des CDs, le déplacement des longueurs d'ondes ne dépassant pas 10-20 nm. Une autre approche s'est inspirée des travaux réalisés par Liu *et al.* qui ont décrit la synthèse de CDs à partir de triéthylènetétramine (TETA) et de benzoquinone à température ambiante dans l'eau.¹²⁶ Ils ont ainsi mis en évidence un « red-shift » des propriétés de photoluminescence (diminution du gap HOMO-LUMO) de leurs particules avec l'augmentation du degré d'oxydation à la surface de ces dernières. Les résultats obtenus selon cette approche ont permis, pour la première fois, d'atteindre des longueurs d'ondes d'émission supérieures à 500 nm (**CD62**). Par contre, le remplacement de la TETA par du bPEI600 a conduit à des nanoparticules qui ne sont que très faiblement fluorescentes, sans décalage notable des propriétés de PL vers le rouge. La suite de nos investigations nous a amenés à développer des CDs incorporant de petites molécules organiques azotées telles que l'urée ou le formamide

(**CD63** et **CD64**, respectivement). En effet, des études récentes ont démontré l'importance de ces motifs moléculaires dans les mécanismes de nucléation des particules et leur rôle dans la formation d'espèces azotées variées (graphitique, pyrrolique...) dans la structure interne, pouvant moduler les propriétés photo-physiques et déplacer les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission vers le rouge.^{160,203} En utilisant l'acide citrique en tant que source de carbone, nous avons effectivement pu obtenir un "red-shift" des propriétés de PL, avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 523 et 569 nm, respectivement. Enfin, une dernière approche a été étudiée passant par l'introduction de quantités variables d'un dérivé du pérylène (dianhydride de l'acide 1,7-dibromo-3,4,9,10-pérylène-tétra-carboxylique, PBDA) dans le mélange acide citrique/bPEI600. Dans des études antérieures, l'utilisation de ce précurseur dans la synthèse de particules carbonées a notamment permis de leur conférer des propriétés d'absorbance et d'émission sur toute la gamme du visible, en fonction de la quantité de réactifs mise en œuvre.²⁰⁴ Les particules obtenues (**CD65** et **CD66**) ont montré un important décalage des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission ($\lambda_{\text{exc}} = 585 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 592 \text{ nm}$). Cependant, ce "red-shift" des propriétés de fluorescence des CDs s'est, à chaque fois, accompagné d'une diminution considérable de l'efficacité de transfection.

Tableau 19. Influence de différents additifs organiques sur les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission des CDs ainsi que sur leur efficacité de transfection.

N°	Conditions réactionnelles	$\lambda_{\text{exc.}}$ (nm)	$\lambda_{\text{ém.}}$ (nm)	Intensité de fluorescence (u.a.)	Taille* (nm)	Potentiel zêta* (mV)	Efficacité de transfection (vs. cellules non traitées)
CD3	AC/bPEI600 ⁽¹⁾	428	466	0,51	20,6 ± 3,6	+33,3 ± 1,8	7662
CD60	AC/bPEI600/H ₃ PO ₄ ⁽²⁾	430	465	1,03	14,8 ± 2,9	+22,6 ± 1,0	419
CD61	AC/bPEI600/ HAuCl ₄ .3H ₂ O ⁽¹⁾	452	475	0,3	-	-	165
CD62	TETA/benzoquinone ⁽³⁾	453	518	0,19	27,1 ± 0,4	+31,4 ± 1,8	1
CD63	AC/urée ⁽¹⁾	505	539	0,79	Ag	-12,6 ± 0,4	-
CD64	AC/bPEI600 (dans le formamide) ⁽¹⁾	523	569	0,05	-	-	-
CD65	AC/bPEI600/PBDA (20 %) ⁽¹⁾	586	592	0,41	56,0 ± 1,6	+29,3 ± 1,9	5
CD66	AC/bPEI600/PBDA (1 %) ⁽¹⁾	585	592	0,15	-	-	423

⁽¹⁾ Pyrolyse au four à micro-onde domestique (620 W, 170 s) ; ⁽²⁾ Réactions solvothermales, 180 °C, 1 h ;

⁽³⁾ Réaction à température ambiante, 24 h. * Mesuré à pH 7,4.

L'incorporation d'additifs organiques semble donc significativement modifier les mécanismes de nucléation et de croissance des particules, ayant un effet sur leur structure interne et changeant profondément la disposition des atomes au sein de celle-ci. Néanmoins, une optimisation fine a permis, dans certains cas, de préserver partiellement l'activité des CDs parents (cf. **CD66** vs. **CD65**). Les résultats obtenus n'étant toutefois pas entièrement satisfaisants, une autre stratégie a été envisagée qui implique la fonctionnalisation *a posteriori* de CDs par différents fluorophores adaptés à l'imagerie de fluorescence *in vivo* (Cy5 et ICG) et qui devrait préserver les propriétés de transfection de la nanoparticule initiale. Faute de temps, ces travaux n'ont pas pu être menés à terme.

5.3.2. Développement de CDs pour de l'IRM

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est basée sur le phénomène de résonance magnétique nucléaire des protons présents dans les molécules d'eau (figure 54). En l'absence de champ magnétique externe, les moments magnétiques sont orientés de manière aléatoire dans l'échantillon et il en résulte une aimantation magnétique nulle à l'échelle macroscopique. L'application d'un champ magnétique crée une orientation dans l'espace pour tout atome baignant dans ce champ. Il apparaît donc deux groupes de noyaux qui, selon l'orientation de leur moment magnétique (parallèle ou antiparallèle au champ), présentent des états énergétiques correspondants à l'état fondamental (E_1) et excité (E_2), distants de ΔE . La répartition des moments magnétiques sur les deux niveaux d'énergie n'étant pas symétrique, il en résulte une aimantation totale (M) non nulle (M aligné sur l'axe Oz). L'application d'une onde électromagnétique dans le domaine des radiofréquences et d'énergie ΔE , dont la direction de propagation est perpendiculaire au champ extérieur, permet de modifier les états énergétiques : des noyaux présents dans l'état E_1 passent dans l'état E_2 . Une déviation de l'aimantation M d'un angle θ par rapport à l'axe Oz est alors constatée. Cette dernière, écartée de sa position d'équilibre, entre alors dans un mouvement de précession autour de l'axe Oz . Lors de la coupure de l'onde de radiofréquence, les spins nucléaires retournent progressivement à l'état d'équilibre (état fondamental) en restituant de l'énergie sous la forme d'un signal, dit de résonance magnétique nucléaire, et qui dépend de la concentration locale en protons et des relaxations longitudinale (T_1) et transverse (T_2). C'est ce signal qui est utilisé pour créer l'image IRM. Cependant, au cours d'un examen IRM,

certaines régions sont difficiles à visualiser. Pour pallier ce problème, on utilise des agents de contraste dont le rôle va être de réduire les relaxivités $1/T1$ et $1/T2$ en accélérant les temps de relaxation des molécules d'eau environnantes, et ainsi améliorer le contraste. Cette technique d'imagerie permet ainsi de fournir des images codées en niveaux de gris en fonction du temps de relaxation des protons de l'eau (figure 54). Un codage en T1 implique que plus le temps de relaxation est court, plus l'image est claire. On parle alors d'agents de contraste positifs (complexes du gadolinium, du manganèse...). Un codage en T2 implique que plus le temps de relaxation est court, plus l'image est sombre. On parle alors d'agents de contraste négatifs (nanoparticules d'oxyde de fer).

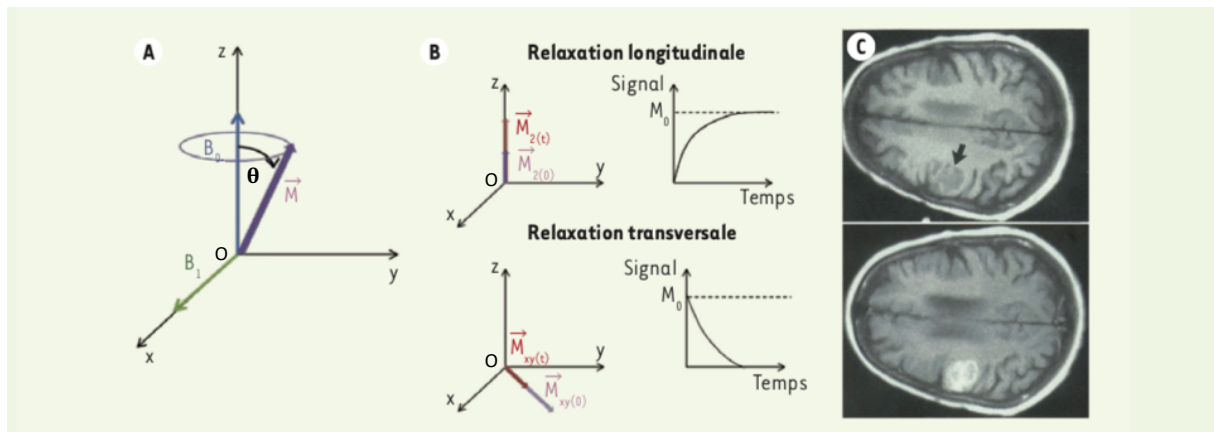


Figure 54. (A) Déviation de l'aimantation M après application d'une onde électromagnétique du domaine des radiofréquences. (B) Relaxation de l'aimantation selon l'axe Oz (relaxation longitudinale) et dans le plan xy (relaxation transversale). (C) Image pondérée en T1 du cerveau avant (en haut) et après (en bas) administration d'un agent de contraste.²⁰⁵

Dans ce contexte, notre objectif a donc été de conférer à nos CDs des propriétés d'agent de contraste pour des applications en imagerie par résonance magnétique. Pour cela, nous avons envisagé de doper les nanoparticules avec des ions gadolinium. En effet, l'ion Gd^{3+} est très utilisé dans ce genre d'applications pour ses propriétés paramagnétiques (spin $7/2$). Ce dopage peut être réalisé en utilisant les deux approches introduites dans le chapitre 3, la voie "de novo" ou de post-fonctionnalisation. La première permet l'introduction de l'ion métallique dans le cœur de la structure par pyrolyse de ce dernier en présence de la source de carbone et de l'agent de passivation (formation en une seule étape). La seconde, en revanche, privilégie la complexation *a posteriori* de l'ion métallique à la surface de la nanoparticule qui a été fonctionnalisée par des motifs chélatants (réaction en deux étapes). Cette dernière

approche rend en effet l'ion Gd^{3+} plus facilement accessible aux molécules d'eau environnantes et devrait ainsi permettre de réduire davantage les temps de relaxation des particules correspondantes. À l'inverse, elle rend plus facile le relargage du gadolinium dans la cellule et présente, *a priori*, une toxicité potentiellement plus importante. Sachant cela, notre choix s'est donc porté sur la voie "de novo" et les particules obtenues (**CD67**, **CD68**, **CD69** et **CD70**) ont toutes fait l'objet d'une purification par dialyse (24 h contre de l'eau), ce qui laisse supposer que tous les ions Gd^{3+} faiblement liés sont éliminés et que le gadolinium restant ne devrait pas être relargué une fois les particules en contact avec les cellules. Ces particules gadoliniées ont fait l'objet de diverses caractérisations (taille, charge, λ_{ex} , λ_{em} , teneur en Gd^{3+} , relaxivités $r1$ et $r2$) dont les résultats sont présentés dans le tableau 20. Les CDs produits possèdent tous une taille comprise entre 6,0 et 11,7 nm, un potentiel zêta fortement positif (de +22,2 à +42,0 mV) et une fluorescence intrinsèque. La teneur en ions Gd^{3+} dans les particules a été déterminée par spectroscopie d'émission atomique avec plasma couplé par induction (ICP-AES, inductively-coupled plasma atomic emission spectroscopy). Elle est apparue fortement variable en fonction des conditions de production des nanoparticules et va de 0,03 % en poids (**CD70**) à 1,39 % (**CD69**). Les propriétés de relaxivité qui en découlent ont été déterminées sur la plateforme ICube et nous avons eu la satisfaction de constater qu'elles sont tout-à-fait intéressantes, avec des valeurs de $r1$ jusqu'à 4 fois supérieures à celles des agents de contraste commerciaux tels que le Dotarem®, le Gadovist® ou le Magnevist® ($r1 \approx 4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$). **CD67** et **CD69**, qui présentent les valeurs de $r1$ les plus élevées, montrent ainsi une très bonne efficacité comme agent de contraste T1. Quant à **CD70**, il présente un profil intéressant à la fois en contraste T2 et T1. En ce qui concerne l'activité

Tableau 20. Propriétés physico-chimiques des CDs gadoliniés.

N°	Composition	Taille* (nm)	Potentiel zêta* (mV)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Teneur en Gd^{3+} (% en poids)	Relaxivité ($\text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$)	
							$r1$	$r2$
CD67	AC/bPEI600/DTPA/ $GdCl_3$ ⁽¹⁾	11,7 ± 0,2	+42,0 ± 1,0	453	471	0,43	16,8	24,6
CD68	AC/bPEI600/ $GdCl_3$ ⁽²⁾	7,5 ± 0,6	+27,5 ± 1,0	424	467	1,07	10,6	35,1
CD69	AC/bPEI600/ $GdCl_3$ ⁽³⁾	7,2 ± 0,8	+22,2 ± 0,6	421	468	1,39	13,6	32,8
CD70	NQ/bPEI600/ $GdCl_3$ ⁽⁴⁾	6,0 ± 0,4	+28,1 ± 0,8	523	535	0,03	6,1	64,8

⁽¹⁾ Pyrolyse au four à micro-onde domestique (620 W, 270 s). ⁽²⁾ Pyrolyse au four à micro-onde domestique (620 W, 170 s). ⁽³⁾ Chauffage à 140 °C. ⁽⁴⁾ Réaction à température ambiante (20 h), puis à 100 °C (6 h). * Mesuré à pH 7,4. DTPA : acide diéthylènetriamine pentaacétique. NQ : naphtoquinone.

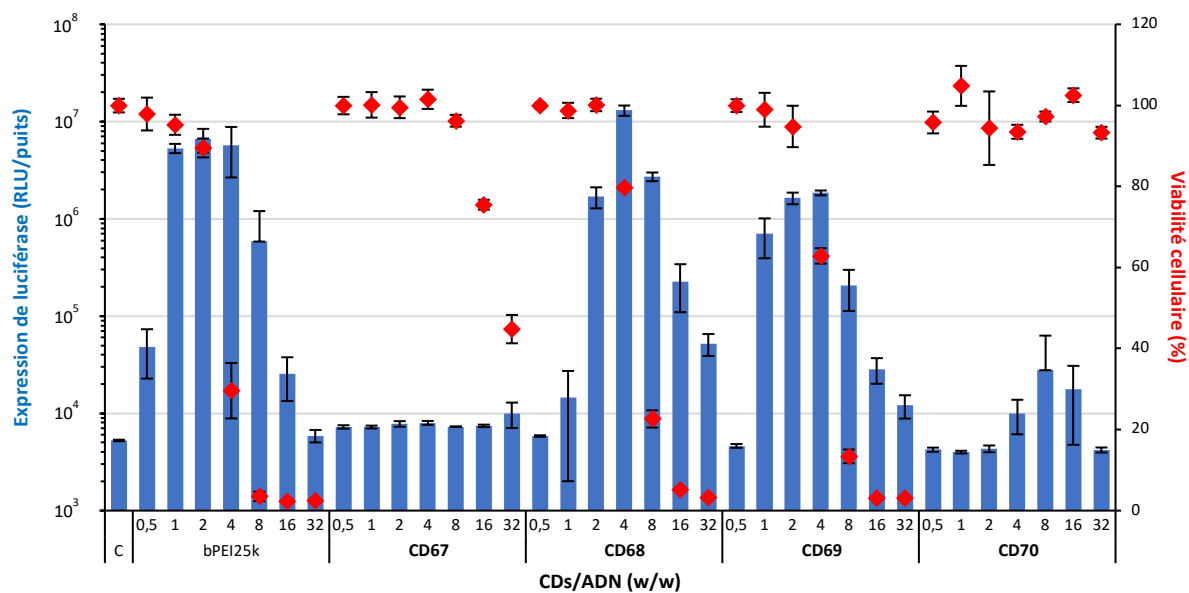


Figure 55. Efficacité de transfection et toxicité des CDs gadoliniés.

de ces NPs gadoliniées en transfection, on peut relever que ce ne sont pas les particules présentant les charges positives les plus élevées qui sont les plus efficaces (figure 55). En effet, la meilleure efficacité de transfection est obtenue avec **CD68** qui rivalise avec (et surpasse même) le bPEI25k. Vient ensuite **CD69**. Les dotoplexes préparés avec **CD67** et **CD70** ne donnent lieu, quant à eux, à aucune transfection. Par ailleurs, on peut noter que la présence de gadolinium dans les différentes particules ne semble pas modifier le profil de toxicité habituellement observé pour les CDs, ce qui nous conforte dans notre choix d'une stratégie "de novo" pour leur préparation.

En conclusion, nos résultats suggèrent clairement un fort potentiel de ces nanoparticules gadoliniées pour des applications théranostiques en transfert de gènes avec détection bimodale, en fluorescence et IRM.

Conclusion générale et perspectives

Au cours de la première partie de ce travail, une large collection de carbon dots présentant des caractéristiques de taille, charge et état de surface variées a été constituée pour mener des études toxicologiques modèles et identifier les déterminants majeurs de la toxicité des nanoparticules. Ceci a permis de faire émerger et d'identifier certaines relations de structure/activité/toxicité. Les données collectées ont permis, en particulier, de montrer un rôle de la charge, de la chimie de surface et des propriétés d'agrégation des nanoparticules sur leur toxicité. En revanche, contrairement à ce qu'on pouvait imaginer, la taille intrinsèque des nanoparticules produites n'est pas apparue comme un facteur déterminant dans leur toxicité.

Dans un second temps, nos efforts se sont concentrés sur l'optimisation de la synthèse de carbon dots pour des applications en transfert de gènes. Nous avons notamment pu mettre en évidence le rôle crucial du mode d'activation, de l'agent de passivation ainsi que du rapport stœchiométrique entre la source de carbone, en l'occurrence l'acide citrique, et l'agent de passivation, sur la capacité des CDs à délivrer efficacement du matériel génétique dans les cellules. Des particules produites à partir d'un mélange d'acide citrique et de bPEI600 (1/4), ont ainsi permis d'élucider une réponse en transfection trois fois supérieure à celle du bPEI25k, un agent de référence pour la transfection *in vitro*. Ces CDs ont été d'une importance capitale pour la suite de notre travail puisqu'ils ont servi de base à l'élaboration de nanostructures plus complexes, développées en vue d'applications en thérapies combinées. Pour cela, deux stratégies ont été envisagées. L'une impliquant des interactions faibles entre des dotoplexes anioniques et une bicouche lipidique cationique (modèle "protocell"), et l'autre basée sur l'établissement d'une couche bifonctionnelle autour de la particule cationique par le biais de liaisons covalentes. L'existence d'espaces hydrophobes au sein de ces deux constructions devrait permettre l'accueil de molécules hydrophobes, et des essais préliminaires ont été réalisés avec une drogue anti-tumorale, le paclitaxel. Un dosage de la quantité de principe actif effectivement chargé dans les nanostructures devra cependant encore être mis au point. Une évaluation *in vitro* des propriétés thérapeutiques des constructions pourra ensuite être réalisée en utilisant conjointement un gène pro-apoptotique (hTRAIL), ce qui permettra, par la même occasion, d'évaluer le potentiel synergique de l'association hTRAIL/PTX.

D'autre part, les études que nous avons développées pour élaborer des plateformes théranostiques à base de carbon dots ont donné des résultats très intéressants. Premièrement, l'ajout de différents additifs organiques au mélange acide citrique-bPEI600 lors de la synthèse des nanoparticules carbonées a permis un important décalage des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission jusqu'à 590 nm, laissant entrevoir de possibles applications en imagerie par fluorescence *in vivo*. Cependant, ce « red-shift » des longueurs d'ondes s'accompagne d'une diminution considérable des propriétés de transfection de la particule. La post-fonctionnalisation des CDs par des motifs Cy5 et ICG est actuellement en cours de réalisation et devrait permettre de proposer des vecteurs avec des longueurs d'ondes d'absorption et d'émission davantage déplacées vers le rouge, tout en préservant l'efficacité de transfection. Deuxièmement, l'incorporation de gadolinium (Gd^{3+}) dans le cœur des CDs a permis de conférer aux particules des propriétés d'agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Les CDs obtenus présentent en effet des relaxivités 1,5 à 4 fois supérieures à celles des agents de contraste commerciaux. Une optimisation de la charge en Gd^{3+} dans les constructions pourrait permettre d'améliorer encore la relaxivité de ces CDs. Par ailleurs, l'un des vecteurs gadoliniés préparés offre d'ores et déjà une efficacité de transfection deux fois supérieure à celle du bPEI25k. La validation finale de CDs en tant qu'agents théranostiques nécessitera de développer ces travaux préliminaires et d'évaluer le potentiel des nanoparticules en imagerie bimodale *in vivo*.

Partie expérimentale

Solvants et réactifs

Sauf indication contraire, tous les solvants et réactifs utilisés dans ce travail ont été obtenus chez Sigma-Aldrich, Merck ou Fisher, et ont été utilisés sans purification supplémentaire. Les expériences nécessitant des conditions réactionnelles anhydres ont été réalisées sous atmosphère contrôlée d'argon.

Matériel et méthodes

1. Synthèse des CDs

Réactions solvothermales. La source de carbone et l'agent de passivation sont dissous dans de l'eau et mélangés jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. La solution est ensuite placée dans un ballon muni d'un réfrigérant et chauffée à ébullition (protocole A). Pour atteindre des températures plus élevées, le mélange réactionnel est transféré dans un tube scellé de 10 mL, lui-même placé dans un réacteur de synthèse Anton Paar Monowave 50, permettant un chauffage conventionnel sous pression (protocole B). Une fois la solution refroidie à température ambiante, elle est placée dans un sac de dialyse (Spectra/Por 3) avec un "cut-off" de 100-500, 1000 ou 3500 Da selon le cas, et dialysée pendant 12 h contre 1 L d'une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 N (le milieu de dialyse est changé au bout de 1, 3 et 7 h), et ensuite contre de l'eau ultrapure pendant 12 h. Enfin, le contenu du sac de dialyse est filtré sur une membrane de 0,22 μm (Millex) et lyophilisé à $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 24 à 36 h.

Pyrolyse à haute température sous pression atmosphérique (protocole C). La source de carbone et l'agent de passivation sont introduits dans un bicol de 100 mL, sans solvant. Le mélange est chauffé à $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min sous pression atmosphérique. Pendant cette première étape de chauffage, les espèces volatiles sont intégralement éliminées du milieu réactionnel. La température est ensuite portée à $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min supplémentaires. Après refroidissement du résidu à température ambiante, ce dernier est repris par une solution d'acide chlorhydrique 0,1 N et est traité de la même manière que précédemment.

Pyrolyse sous irradiations micro-onde (protocole D). La source de carbone et l'agent de passivation sont dissous dans 10 mL d'eau et mélangés jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Cette solution est ensuite transférée dans un tube scellé de 10 mL, lui-même placé

dans un réacteur à micro-onde de synthèse Anton Paar Monowave 500. Une fois refroidi à température ambiante, le résidu brut est purifié par dialyse, filtré à travers une membrane de 0,22 μm et lyophilisé comme décrit plus haut.

Pyrolyse sous irradiations micro-onde dans un four domestique (protocole E). La source de carbone, l'agent de passivation et l'additif (le cas échéant) sont mélangés dans une solution de HCl à 0,1 N (5 mL), elle-même placée dans un erlenmeyer jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Le mélange est placé dans un four à micro-onde domestique et chauffé à la puissance nominale du four de 620 W. Une fois le résidu refroidi à température ambiante, il est repris dans HCl 1 N et agité pendant toute la nuit, de manière à dissoudre le maximum de matériel. La solution obtenue est ensuite filtrée sur coton et centrifugée (10000 rpm, 5 min). Le surnageant est dialysé comme décrit précédemment. Le dialysat est filtré sur une membrane de 0,22 μm et lyophilisé.

Pyrolyse à pression normale et sous chauffage conventionnel (protocole F). L'acide citrique, le bPEI600 et le $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sont mélangés dans 50 mL d'eau ultrapure et la solution est chauffée sur plaque chauffante (± 140 °C) dans un bécher jusqu'à évaporation du solvant et formation d'un gel. Le résidu est ensuite redissous dans de l'eau et une nouvelle fois chauffé jusqu'à évaporation du solvant. Quatre cycles de dissolution-évaporation sont ainsi réalisés. Une fois refroidi à température ambiante, le résidu brut est repris dans HCl 1 N et purifié par dialyse, filtré sur une membrane de 0,22 μm et lyophilisé comme décrit plus haut.

Synthèse de CDs à partir de quinones (protocole G). De la triéthylènetétramine (TETA, 1 g, 6,8 mmol) et de la benzoquinone (150 mg, 1,5 mmol) sont dissous dans 25 mL d'eau ultrapure. La solution est ensuite agitée à température ambiante pendant 24 h puis traitée de la même manière que précédemment. Alternativement (protocole H), du bPEI600 (1 g, 23,2 mmol) ainsi que du $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (80 mg, 0,3 mmol) sont dissous dans 10 mL d'eau ultrapure, puis une solution de naphtoquinone (237 mg, 1,5 mmol) dans 10 mL d'éther est ajoutée. Le milieu réactionnel est agité pendant 20 h à température ambiante puis 6 h à 100 °C. Une fois refroidi à température ambiante, le résidu brut est purifié par dialyse, filtré à travers une membrane de 0,22 μm et lyophilisé comme décrit plus haut

Post-fonctionnalisation. La chimie de surface de la particule (**CD20**) est modifiée par activation des acides carboxyliques présents à leur surface sous forme de chlorures d'acides (protocole PF1). Une suspension de CDs dans le chlorure de thionyle est chauffée à ébullition (3 h à 4 jours), puis SOCl_2 est évaporé. Les CDs activés sont ensuite suspendus dans le toluène,

un large excès d'agent de fonctionnalisation (1 à 10 équivalents en poids) est ajouté et le milieu réactionnel est à nouveau porté à ébullition pendant 24 h. Lorsque la fonctionnalisation nécessite une température de mise en œuvre supérieure à la température d'ébullition du solvant, le mélange est chauffé dans un tube scellé pendant 48 à 72 h (protocole PF2). Une fois refroidi à température ambiante, le résidu obtenu est purifié par dialyse, filtré à travers une membrane de 0,22 µm et lyophilisé.

D'une autre manière, la surface de la particule (**CD20**) est modifiée par estérification des acides carboxyliques présents en surface au reflux du méthanol et en présence d'une quantité catalytique de chlorure de thionyle, pendant 7 jours, puis le solvant est évaporé (protocole PF3). Aucune étape de purification supplémentaire n'a été nécessaire dans ce cas.

Alternativement (protocole PF4), l'amidation des acides carboxyliques est réalisée par traitement dans l'éthanol avec 2 équivalents en poids de chlorure de thionyle pendant 30 min à température ambiante, puis addition d'un large excès d'agent de fonctionnalisation (amine, 4 équivalents en poids). Le milieu réactionnel est ensuite porté à ébullition pendant 48 h. Une fois refroidi à température ambiante, le résidu obtenu est purifié par dialyse, filtré à travers une membrane de 0,22 µm et lyophilisé.

Alternativement, la chimie de surface de la particule (**CD20**) est modifiée *via* une transformation préalable des acides carboxyliques en esters activés (protocole PF5). Une solution aqueuse de CDs à pH neutre est agitée avec de l'EDC (1 équivalent en poids), en présence d'un excès d'agent de fonctionnalisation (1 équivalent en poids) et agitée pendant 4 jours à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite traité comme précédemment.

La phosphorylation des groupements hydroxyles présents à la surface de **CD21** a été réalisée en agitant les particules en suspension dans l'oxychlorure de phosphore, pendant 48 h, à température ambiante. L'hydrolyse des groupements chlorophosphates résiduels a ensuite été réalisée par addition lente d'une solution saturée de NaHCO₃, jusqu'à neutralisation du pH du milieu. Au bout de 24 h de réaction, le mélange obtenu est purifié par dialyse, filtré à travers une membrane de 0,22 µm et lyophilisé (protocole PF6).

La protonation des groupements carboxylates de **CD20** est réalisée en ajoutant quelques gouttes d'une solution d'acide chlorhydrique concentrée à une suspension de particules préalablement dissoute dans l'eau. La fonctionnalisation des acides carboxyliques est effectuée par réaction dans l'éthanolamine chauffée à 130 °C pendant 4 jours (protocole PF7). Les CDs hydroxylés ainsi produits sont phosphorylés selon le protocole PF6.

Le composé **4** (ou **5**) est activé pendant 24 h à température ambiante par réaction avec de l'EDC (5 éq.) en présence de sulfo-*N*-hydroxysuccinimide (sulfo-NHS) (6 éq.) dans un mélange H₂O/MeOH (7/4, v/v). Les CDs (**CD3**) sont ensuite ajoutés au milieu réactionnel, le pH du milieu est ajusté à 7 et le mélange est agité à température ambiante pendant 24 h. Les solvants sont ensuite éliminés à l'évaporateur rotatif et le résidu est repris dans HCl 0,1 N et extrait trois fois avec deux volumes de CHCl₃. La phase aqueuse est ensuite traitée comme précédemment (protocole PF8).

2. Chromatographie

L'avancement des réactions mises en œuvre lors de la synthèse des greffons a été suivi par chromatographie sur couche mince de silice (CCM, Merck 0,25 mm, Kieselgel 60 F₂₅₄, 40-60 μm, 230-400 mesh ASTM). La révélation des plaques de CCM a été effectuée par illumination ultraviolette à 254 ou 365 nm, puis par pulvérisation d'un révélateur (acide phosphomolybdique, vanilline, ninhydrine, dichlorophénolindophénol-DCIP), suivi ou non d'un chauffage à 200 °C, ou par exposition à des vapeurs d'iode.

Les chromatographies ont été réalisées sur colonne de silice (Merck, Kieselgel 60, 40-60 μm, 230-400 mesh ASTM). Le système d'élution est précisé pour chaque purification.

3. Spectroscopie infrarouge

Les spectres d'absorption infrarouge (IR) ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre FT-IR Nicolet 380 en mode ATR (attenuated total reflectance) et les nombres d'ondes (ν) sont exprimés en cm⁻¹.

4. Résonance magnétique nucléaire

Les spectres de RMN ¹H et ¹³C ont été enregistrés sur des spectromètres Bruker 300 MHz Avance DPX et 400 MHz Avance III. Les échantillons ont été préparés dans le chloroforme deutéré (CDCl₃) ou l'eau deutérée (D₂O). Les déplacements chimiques sont donnés en partie par million (ppm). Les constantes de couplages (J) sont exprimées en Hertz (Hz). La multiplicité des signaux est présentée de la façon suivante : s : singulet ; t : triplet ; q : quadruplet ; m : multiplet.

5. Caractérisations photo-physiques

Spectroscopie UV-visible et de fluorescence. Les échantillons ont été préparés dans l'eau ultrapure à une concentration de 0,1 mg/mL. Les spectres d'absorption ont été enregistrés sur un spectromètre Uvikon XL (Bio-Tek Instruments) en utilisant une cuve en quartz de 1 mL. Les spectres de fluorescence ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Fluoromax-4 (Horiba Scientific).

Détermination des rendements quantiques. Les rendements quantiques de fluorescence ont été déterminés en utilisant la coumarine 343 ($\Phi_s = 0,63$) comme référence. Les rendements quantiques de fluorescence des CDs ont été calculés selon la formule :

$$\Phi_{CD} = \Phi_s \cdot (F_{CD}/F_s) \cdot (A_s/A_{CD})$$

où Φ_{CD} et Φ_s correspondent aux rendements quantiques des CDs et de la référence respectivement, F_{CD} et F_s correspondent aux intégrales des intensités d'émission, et A_{CD} et A_s sont les absorbances. Afin de minimiser le phénomène de quenching de fluorescence, l'absorbance dans la cuve d'analyse a été maintenue en-dessous de 0,15 (à la longueur d'onde d'excitation).

6. Diffusion dynamique de la lumière

La taille des particules et leur potentiel zêta (ζ) ont été mesurés par DLS en utilisant un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Paris, France). Toutes les mesures ont été réalisées avec des échantillons à une concentration de 1,0 mg/mL dans 1,5 mM NaCl, à 25 °C et en triplicat. Les résultats ont été analysés en utilisant un logiciel de distribution multimodale en nombre fourni avec l'appareil.

7. Microscopie électronique à transmission

Les images de microscopie électronique ont été obtenues à l'aide d'un microscope TEM (LVEM5, Cordouan Technologie, Pessac, France) fonctionnant à basse tension (5 kV). Les grilles recouvertes d'un film de carbone ultra-fin (Cu-300HD, Pacific Grid Tech, San Francisco, États-Unis) ont été traitées à 90 V et 2 mA dans un éflueur pendant 15 s avant dépôt de l'échantillon de carbon dots (5 μ L à 1,0 mg/mL, pH 7,0). Les grilles ont ensuite été séchées à

l'air, à température ambiante, pendant au minimum 2 h avant observation. La taille moyenne des particules a été déterminée grâce à une analyse d'image en utilisant le logiciel ImageJ (v 1.50i, NIH, USA), pour un ensemble de 300 à 1000 particules.

8. Analyses élémentaires

La composition élémentaire des CDs a été déterminée sur plateforme d'analyse de l'IPHC/ECPM avec un appareil Elementar Vario EL III (C, H, N) et par ICP-AES sur un spectrophotomètre Varian 720-ES, après minéralisation (Gd).

9. Préparation des complexes CD/ADN

Les complexes CD/ADN produits avec différents rapports en poids ont été préparés en mélangeant volume à volume des solutions de CDs et de pADN (préparées aux concentrations adéquates dans l'eau ultrapure). Les complexes ont ensuite été incubés pendant 30 min à température ambiante, sans traitement supplémentaire. Enfin, le mélange a été homogénéisé en pipetant la solution de bas en haut. Cette dernière est ensuite utilisée pour les expériences de transfection *in vitro*. Les complexes PEI/pADN ont été préparés de la même manière, à partir de solutions de bPEI25k ou de bPEI600 aux concentrations adéquates.

10. Cultures cellulaires

Les différentes évaluations biologiques ont été réalisées sur trois modèles de cellules humaines : les cellules épithéliales alvéolaires de la lignée A549, les cellules épithéliales bronchiques de la lignée Calu-3, et les monocytes de la lignée THP-1, activés en macrophages par le phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA). Ces lignées cellulaires ont été cultivées dans des flacons de culture (Falcon®) maintenus à 37 °C et dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂, dans un milieu de culture adapté. Pour les cellules A549 et Calu-3, ce milieu de culture était du DMEM-F12 contenant 10 % de sérum de veau fœtal et 5 mM d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES). Pour les cellules THP-1, ce milieu était du RPMI-1640 contenant 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté (56 °C, 30 min) et 0,05 mM de 2-mercaptoéthanol. Les deux milieux contenaient également 2 mM de L-glutamine,

100 u/mL de péniciline et 100 µg/mL de streptomycine. Tous les produits proviennent de chez GIBCO®. La mise en culture des cellules dans des dispositifs adaptés aux expériences (plaques 24 ou 96 puits) a été réalisée 24 (A549, THP-1) ou 48 (Calu-3) heures avant le début des expériences, selon les conditions détaillées ci-dessous pour chaque test. Les cellules adhérentes (A549 et Calu-3) ont été décollées des flacons de culture et individualisées par un traitement à la trypsine, centrifugées (4 °C, 5 min, 120 g), resuspendues dans le milieu de culture, et comptées avant d'être déposées dans des plaques 96-puits (expériences de transfection) ou remises en culture. Lors de leur transfert, les cellules THP-1 ont été activées par ajout de 10 ng/mL de PMA au milieu de culture pendant une nuit. Avant chaque expérience, les cellules ont été lavées une fois avec du PBS.

11. Expériences de transfection *in vitro*

Les cellules A549 ont été déposées dans des plaques de culture 96-puits à une densité de 6 000 cellules/puits dans 100 µL de milieu de culture complet. Après 24 h, des complexes CD/pCMV-GLuc fraîchement préparés (10 µL contenant 0,4 µg de pADN) sont ajoutés dans chaque puits. Au bout de 24 h d'incubation sous atmosphère contrôlée, la luciférase de *Gaussia* est quantifiée par mesure de la bioluminescence produite par un aliquot du surnageant de culture (20 µL du surnageant dilué au 1/100^{ème} et préparé dans le milieu de culture décomplémenté) pendant 1 seconde après addition du substrat de l'enzyme (50 µL de coelentérazine 1,5 µM), en utilisant un luminomètre (Berthold Centro LB960 XS, Thoiry, France). La valeur obtenue pour chaque échantillon représente la moyenne d'un triplicat de mesures.

12. Évaluation de la cytotoxicité des CDs

Pour les tests de cytotoxicité, les cellules ont été mises en culture dans des plaques 96-puits à raison de 30 000 (A549) ou 100 000 (THP-1 et Calu-3) cellules par puits. Un (A549 et THP-1) ou deux (Calu-3) jours plus tard, elles ont été exposées pendant 24 h à du milieu de culture contenant 10 % de sérum (contrôle) ou à des solutions de CDs à une concentration allant de 0 à 200 µg/mL (préparées extemporanément dans du milieu de culture contenant 10 % de sérum). La viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide du test colorimétrique au MTT

(bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium), permettant la mesure de l'activité mitochondriale. Pour cela, les cellules ont été lavées une fois avec du PBS (100 μ L). Le MTT (100 μ L d'une solution à 1 mg/mL préparée dans du milieu de culture) a ensuite été déposé sur les cellules qui sont incubées pendant 30 min à 37 °C. Après retrait du surnageant, les cellules ont été lysées par ajout de DMSO (100 μ L). L'absorbance des lysats a été mesurée à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Multiskan FC, Thermo Scientific). La viabilité des cellules traitées a été exprimée en pourcentage d'absorbance par rapport aux cellules non-traitées. La valeur de chaque échantillon représente la moyenne d'un triplicat de mesures.

13. Gels d'électrophorèse

Des complexes CD/ADN sont préparés en mélangeant 0,7 μ g d'ADN avec des quantités croissantes de CDs dans de l'eau ultrapure. Les solutions sont incubées pendant 30 min à température ambiante puis les dotoplexes (40 μ L) sont déposés sur un gel d'agarose 1 % dans un tampon de Tris-acetate-EDTA, pH 8 (TAE). Après électrophorèse (80 V, 1 h), ces derniers sont colorés par une solution de bromure d'éthidium à 0,5 μ g/mL et révélés sous lumière UV.

14. Préparation des "protocells"

Les "protocells" ont été préparées en préparant des complexes CD/ADN comme décrit précédemment. Parallèlement, un mélange lipidique de DOPE et de PP981 (2/1, en poids) en solution dans l'éthanol est préparé en faisant varier le rapport N/P (N représentant la quantité molaire de lipide cationique et P, la quantité molaire de phosphates dans l'acide nucléique) dans chacun des tubes eppendorfs. Un film lipidique est ensuite formé par évaporation lente du solvant, puis ce dernier est repris par une solution aqueuse contenant les dotoplexes. Les différentes solutions sont vigoureusement agitées pendant une vingtaine de secondes, puis incubées pendant 30 min à température ambiante. Les "protocells" ainsi fraîchement préparées sont alors directement utilisées pour des expériences de transfection ou de cytotoxicité.

15. Incorporation de paclitaxel dans les constructions

Évaluation de la cytotoxicité des constructions dopées au PTX. Les CDs dopés au paclitaxel (PTX) sont préparés en mélangeant volume à volume des solutions éthanoliques (EtOH/H₂O 75/25, v/v) de CDs et de PTX préparées aux concentrations adéquates. Les mélanges sont vigoureusement agités pendant une vingtaine de secondes, puis incubés pendant 30 min à température ambiante, sans traitement supplémentaire. Les solvants sont ensuite évaporés pendant 1 h sous pression réduite, et les particules ainsi produites sont utilisées pour des expériences de cytotoxicité après redissolution dans l'eau pure.

Dosage du PTX dans les constructions. Le dopage du PTX dans les constructions est réalisé en mélangeant des suspensions de CDs et de PTX (0,2 et 1 % en poids) dans une solution PBS/MeOH (70/30). Les mélanges obtenus sont vigoureusement agités pendant une vingtaine de secondes, puis incubés pendant 30 min à température ambiante. Les solvants sont évaporés pendant 1 h sous pression réduite, et les particules produites sont reprises dans de l'eau et extraites au chloroforme (3 x 10 mL). Les différentes fractions organiques sont alors récoltées et concentrées à l'évaporateur rotatif. Les résidus obtenus sont dissous dans 1,5 mL de méthanol ou de chloroforme en vue d'une analyse par spectrométrie UV-visible.

Alternativement, les particules dopées au PTX ont été préparées dans 1,5 mL d'une solution de PBS/MeOH (70/30) en mélangeant des suspensions de CDs avec une quantité variable de PTX (de 0 à 100 % en poids). Les différentes solutions ont alors été centrifugées à froid (4 °C, 3 h) sur Centricon™ (2000 Da). Le filtrat (500 µL) est ensuite prélevé dans chacun des tubes et ajustés à 1,5 mL par une solution de PBS/MeOH (70/30) en vue d'une analyse par spectrométrie UV-visible.

16. Relaxométrie

Les mesures relaxométriques ($1/T_1$) sur les différents CDs ont été réalisées sur des suspensions de particules dissoutes dans l'eau à différentes concentrations (de 0 à 100 µM [Gd³⁺]) sur un Stelar SMARTracer Fast Field Cycling Relaxometer (0,01-10 MHz) et sur un électroaimant Bruker WP80 NMR adapté aux mesures de champs variables (20-80 MHz) et contrôlé par une console SMARTracer PC-NMR. Les fortes relaxivités ont été mesurées sur un spectromètre Bruker AVANCE NMR à 300, 400 et 600 MHz. La température a été calibrée avec une résistance de platine et maintenue à 19 °C.

17. Tableau récapitulatif des CDs et de leurs propriétés physico-chimiques

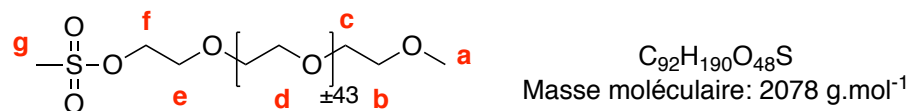
Échantillon	Protocole	Source de carbone	Agent de passivation	Rendement (%)	Taille (pH 7,4)		Potentiel zéta (pH 7,4, mV)	DO (0,1 mg/mL)	$\lambda_{abs.}$ (nm)	$\lambda_{exc.}$ (nm)	$\lambda_{ém.}$ (nm)	Intensité de fluorescence (u.a.)	Rendements quantiques (%)	Composition élémentaire		
					DLS (nm)	TEM (nm)								N (%)	C (%)	H (%)
CD1	D (0,5 h)	Ac. citr. (1 g)	bPEI600 (4 g)	4	29,4±3,3	16,5	+26,7±1,0	-	-	-	-	0	0	13,8	26,6	7,4
CD2	C	Ac. citr. (1,3 g)	bPEI600 (4,98 g)	13	15,3±1,0	14,3	+26,8±2,6	0,5	349	452	483	0,39	12,1	14,1	29,4	7,3
CD3	E	Ac. citr. (125 mg)	bPEI600 (500 mg)	31	20,6±3,6	9,3	+33,3±1,8	0,22	356	428	466	0,51	53,1	14,8	29,9	7,2
CD4	B	Ac. citr. (125 mg)	bPEI600 (500 mg)	3	20,7±2,2	15,6	+32,0±3,7	0,23	357	421	452	1,26	-	-	-	-
CD5	C	Ac. citr. (10,7 g)	EA (10 mL)	14	Ag.	16,0	+11,4±0,4			475	500	0,42	-	11,1	43,4	5,7
CD6	C	Ét. citr. (6,8 mL)	EA (5 mL)	36	Ag.		+14,0±0,5									
CD7	C	Ac. citr. (1,3 g)	PEHA (5 mL)	20	36,4±12,0	17,9	+18,6±0,9	0,25	354	425	460	0,85		12,3	26,7	7,3
CD8	C	Glucose (1,3 g)	PEHA (5 mL)	12	13,3±1,9	15,0	+18,4±1,2	0,33	353	345	472	0,25		14,0	31,4	7,5
CD9	E	Ac. tartr. (125 mg)	bPEI600 (500 mg)	26	9,2±1,2		+31,3±2,5									
CD10	C	Ac. citr. (1,3 g)	bPEI2k (4,97 g)	7	15,4±1,1		+31,4±3,0			452	481	0,3				
CD11	C	bPEI2k (5 g)		8	10,5±2,8		+29,7±2,8									
CD12	C	Ac. citr. (1,3 g)	bPEI25k (4,98 g)	10	13,0±0,7		+37,1±3,4			453	473	0,24				
CD13	C	Ac. citr. (1,3 g)	DETA (5,2 mL)	10	68,0±1,2		+31,6±1,1			454	473	0,71				
CD14	C	Ac. citr. (1 g)	DMEA (1,56 mL)	4	Ag.		+2,9±0,1									
CD15	C	Ac. citr. (1 g)	Choline chl. (2,18 g)	6	Ag.		+8,9±0,1									
CD16	C	Ac. citr. (2,94 g)	DMEDA (5 mL)	11	43,9±2,4	12,6	+21,3±1,9	0,88	350	522	522	0,67		12,5	34,8	6,9

Échantillon	Protocole	Source de carbone	Agent de passivation	Rendement (%)	Taille (pH 7,4)		Potentiel zéta (pH 7,4, mV)	DO (0,1 mg/mL)	$\lambda_{abs.}$ (nm)	$\lambda_{exc.}$ (nm)	$\lambda_{ém.}$ (nm)	Intensité de fluorescence (u.a.)	Rendements quantiques (%)	Composition élémentaire		
					DLS (nm)	TEM (nm)								N (%)	C (%)	H (%)
CD17	C	Ac. citr. (500 mg)	DMEDA (850 μ L) mPEG ₅₅₀ (4,29 g)	10	17,7 \pm 0,9	16,3	+26,9 \pm 1,6	0,19	350	421	501	0,14		2,4	49,0	8,5
CD18	C	Ac. citr. (500 mg)	PEHA (1,91 mL) mPEG ₅₅₀ (4,29 g)	4	29,1 \pm 1,1	17,4	+27,2 \pm 1,3	0,3	353	379	468	0,08		6,9	43,2	8,0
CD19	C	Ac. citr. (500 mg)	PEHA (1,91 mL) mPEG ₅₅₀ (4,29 g)	8	21,1 \pm 2,7	13,4	+21,1 \pm 0,4	0,04	339	452	464	0,03		0,7	49,0	8,7
CD20	E	Ac. citr. (5 g) KH ₂ PO ₄ (1 g) puis NaOH	-	11	63,2 \pm 4,9	14,1	-19,4 \pm 1,8	0,12	337	418	435	0,55		4,3	23,9	3,8
CD21	C	Ac. citr. (6 g)	Mannitol (17 g)	11	45,2 \pm 3,5	28,9	-16,8 \pm 0,6	0	-	-	-	0		0	45,7	6,3
CD22	C	Ac. citr. (500 mg)	mPEG ₅₅₀ (4,29 g)	11	80,6 \pm 1,9	15,9	-17,6 \pm 2,2	0	-	-	-	0		0	48,6	8,6
CD23	A (65 h)	Ac. citr. (2 g)	Hexylamine (1 g)	15	Ag.		-11,9 \pm 2,1									
CD24	PF3	CD20 (500 mg)	Méthanol	-	39,1 \pm 8,5	36,1	-16,3 \pm 2,2	0,06	341	415	446	0,4		2,7	20,0	3,0
CD25	PF2 (48 h)	CD20 (1 g)	EA (5 mL)	-	Ag.	18,6	-10,9 \pm 0,8			453	481	0,35		10,4	31,7	6,7
CD26	PF5	CD20 (300 mg)	PEA (300 mg)	-	36,5 \pm 3,1	15,9	-23,9 \pm 1,6	0,01	340	410	438	0,03		4,1	9,5	3,9
CD27	PF7	CD20	EA puis POCl ₃ / NaHCO ₃	-	30,8 \pm 3,2		-25,0 \pm 1,7			453	461	0,25				
CD28	PF6	CD21 (500 mg)	POCl ₃ / NaHCO ₃	-	21,7 \pm 0,9	14,1	-34,0 \pm 3,9			-	-	0		0	7,1	2,2
CD29	PF1	CD20 (300 mg)	n-BuNH ₂ (249 mg)	-												
CD30	PF1	CD20 (300 mg)	DMEDA (1,5 g)	-	79,2 \pm 7,4	23,9	+13,7 \pm 0,9	0,15	350	395	453	0,08		12,0	25,6	7,4
CD31	PF2 (48 h)	CD20 (300 mg)	PEHA (1,5 g)	-	20,8 \pm 2,1	12,4	+23,9 \pm 2,0			453	462	0,18		13,2	25,7	6,9
CD32	PF4	CD20 (100 mg)	bPEI600 (400 mg)	-	18,6 \pm 4,7		+26,4 \pm 1,3			428	461	0,31				
CD33	PF4	CD20 (100 mg)	bPEI2k (400 mg)	-	25,4 \pm 0,6		+33,5 \pm 1,6			428	464	0,45				
CD34	PF2 (72 h)	CD20 (300 mg)	mPEG ₅₅₀ (3 g)	-	67,2 \pm 2,6	16,1	-20,2 \pm 0,1	0,14	350	431	466	0,08		1,1	47,6	7,8
CD35	B (2 h)	Ac. citr. (2 g)	bPEI25k (1 g)	10	Ag.		-4,6 \pm 0,2	0,87	354	397	456	0,31				

Échantillon	Protocole	Source de carbone	Agent de passivation	Rendement (%)	Taille (pH 7,4)		Potentiel zéta (pH 7,4, mV)	DO (0,1 mg/mL)	$\lambda_{\text{abs.}}$ (nm)	$\lambda_{\text{exc.}}$ (nm)	$\lambda_{\text{ém.}}$ (nm)	Intensité de fluorescence (u.a.)	Rendements quantiques (%)	Composition élémentaire		
					DLS (nm)	TEM (nm)								N (%)	C (%)	H (%)
CD36	A (24 h)	Ac. citr. (5 g)	bPEI25k (2,5 g)	35	Ag.		-2,3±0,2	0,05	358	363	444	0,64				
CD37	D (2 h)	Ac. citr. (1 g)	bPEI25k (500 mg)	13	10,7±0,2		+27,2±3,9	0,01	359	359	446	0,04				
CD38	E	Ac. citr. (500 mg)	bPEI25k (250 mg)	10	100,1±1,0		+23,6±0,9	0,09	357	413	446	0,08				
CD39	E	Ac. citr. (500 mg)	bPEI25k (125 mg)	15	86,2±1,0		-25,4±0,9									
CD40	E	Ac. citr. (250 mg)	bPEI25k (500 mg)	8	10,3±0,8	13,9	+33,1±3,2							15,4	28,2	7,4
CD41	E	Ac. citr. (125 mg)	bPEI25k (500 mg)	7	12,9±0,7		+35,9±1,6	0,08	355	421	479	0,12				
CD42	E	Ac. citr. (125 mg)	bPEI25k (1 g)	9	6,9±0,7		+32,0±0,4									
CD43	E	Ac. citr. (500 mg)	bPEI600 (250 mg)	12	20,0±0,3		+18,4±0,6									
CD44	E	Ac. citr. (500 mg)	PEHA (250 mg)	14	Ag.		-13,3±0,8									
CD45	E	Ac. citr. (500 mg)	DMEDA (250 mg)	16	Ag.		-11,0±0,6	0,39	328	379	442	0,39				
CD46	E	Ac. citr. (125 mg)	PEHA (500 mg)	8	4,1±0,5		+15,0±2,3									
CD47	E	Ac. citr. (500 mg)	bPEI600 (500 mg)	3	6,6±1,6		+26,4±1,3									
CD48	E	Ac. citr. (250 mg)	bPEI600 (500 mg)	15	10,2±1,1		+36,1±2,1							14,8	32,2	6,9
CD49	E (90s)	Ac. citr. (125 mg)	bPEI600 (500 mg)	28	7,5±1,0		+42,8±1,7									
CD50	E (105s)	Ac. citr. (125 mg)	bPEI600 (500 mg)	19	8,9±1,3		+19,5±0,5									
CD51	E (120s)	Ac. citr. (125 mg)	bPEI600 (500 mg)	22	11,7±0,9		+37,6±3,2									
CD52	E	Ac. citr. (250 mg)	bPEI600 (1 g)		19,9±0,8		+22,9±1,4									
CD53	E	Ac. citr. (500 mg)	bPEI600 (2 g)		24,2±1,7		+37,0±2,1									
CD54	PF8	CD3 (100 mg)	mPEGCOOH (25 mg)	-	21,4±1,3		+25,6±2,5									
CD55	PF8	CD3 (100 mg)	mPEGCOOH (10 mg)	-	12,2±0,4		+32,8±1,7									

Échantillon	Protocole	Source de carbone	Agent de passivation	Rendement (%)	Taille (pH 7,4)		Potentiel zéta (pH 7,4, mV)	DO (0,1 mg/mL)	$\lambda_{\text{abs.}}$ (nm)	$\lambda_{\text{exc.}}$ (nm)	$\lambda_{\text{ém.}}$ (nm)	Intensité de fluorescence (u.a.)	Rendements quantiques (%)	Composition élémentaire			
					DLS (nm)	TEM (nm)								N (%)	C (%)	H (%)	
CD56	PF8	CD3 (100 mg)	Alkyl-PEG (25 mg)	-	11,8 ± 0,8		+30,4 ± 2,0										
CD57	PF8	CD3 (100 mg)	Alkyl-PEG (10 mg)	-	17,7 ± 3,2		+26,6 ± 2,1										
CD58	E	Ac. citr. (125 mg)	bPEI600 (500 mg) mPEG-OH (125 mg)	24	13,1 ± 0,5		+29,4 ± 0,4										
CD59	E	Ac. citr. (125 mg)	bPEI600 (500 mg) mPEG-OH (125 mg)	12	30,3 ± 2,2		+29,6 ± 0,8	0,13	357	424	461	0,42					
CD60	B	Ac. citr. (125 mg)	bPEI600 (500 mg) H ₃ PO ₄ (500 mg)	8	14,8 ± 2,9		+22,6 ± 1,0	0,56	356	430	465	1,03					
CD61	E	Ac. citr. (125 mg)	bPEI600 (500 mg) HAuCl ₄ ·3H ₂ O (30 mg)	10						452	475	0,3					
CD62	G	TETA (1 g)	BQ (150 mg)	23	27,1 ± 0,4		+31,4 ± 1,8	0,33	389	453	518	0,19					
CD63	E	Ac. citr. (200 mg)	Urée (200 mg)	24	Ag.		-12,6 ± 0,4	1,06	338	505	539	0,79					
CD64	E (FA)	Ac. citr. (125 mg)	bPEI600 (500 mg)	34						523	569	0,05					
CD65	E	Ac. citr. (125 mg)	bPEI600 (500 mg) Pérylène (125 mg)	11	56,0 ± 1,6		+29,3 ± 1,9	0,13	499	586	592	0,41					
CD66	E	Ac. citr. (125 mg)	bPEI600 (500 mg) Pérylène (5 mg)	19				0,1	357	585	592	0,15					
CD67	E (270 s)	Ac. citr. (125 mg)	bPEI600 (500 mg) GdCl ₃ ·6H ₂ O (30 mg), DTPA (45 mg)	11	11,7 ± 0,2		+42,0 ± 1,0										
CD68	E	Ac. citr. (125 mg)	bPEI600 (500 mg) GdCl ₃ ·6H ₂ O (30 mg)	26	7,5 ± 0,6		+27,5 ± 1,0	0,26	354	424	467	0,59					
CD69	F	Ac. citr. (1 g)	bPEI600 (4 g) GdCl ₃ ·6H ₂ O (0,24 g)	25	7,2 ± 0,8		+22,2 ± 0,6	0,2	360	421	468	0,35					
CD70	H	NQ (237 mg)	bPEI600 (1 g) GdCl ₃ ·6H ₂ O (80 mg)	14	6,0 ± 0,4		+28,1 ± 0,8			523	535	0,04					

18. Synthèse des greffons

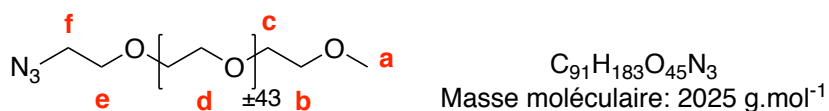
Mésylate de poly(éthylène glycol) 2000 monométhyl éther (**1**)

De la triéthylamine (2,03 mL ; 15 mmol) et du chlorure de mésyle (1,16 mL ; 15 mmol) sont ajoutés successivement à une solution de polyéthylèneglycol monométhyl éther 2000 (10 g ; 5 mmol) dans le dichlorométhane sec (25 mL) à 0 °C. Le mélange est ensuite agité à température ambiante pendant 2 h, puis le milieu réactionnel est successivement lavé à l'eau (50 mL), à HCl à 10 % (50 mL), avec une solution saturée de NaHCO₃ (50 mL), à nouveau à l'eau (50 mL) et enfin à la saumure. Il est ensuite séché sur MgSO₄, filtré et concentré à l'évaporateur rotatif pour fournir le composé **1** (8,92 g ; 86 %) est obtenu sous forme d'une graisse blanche.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,33 (t, 2H, H_f, ³J_{f-e} = 4,5) ; 3,76 (t, 2H, H_e, ³J_{f-e} = 4,5) ; 3,71 (t, 2H, H_b, ³J_{b-c} = 4,5) ; 3,64-3,40 (m, 180H, H_{c,d}) ; 3,32 (s, 3H, H_a) ; 3,03 (s, 3H, H_g).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 71,8 ; 70,5 ; 69,2 ; 68,9 ; 58,9 ; 37,6.

IR ν 2885 ; 1467 ; 1359 ; 1341 ; 1279 ; 1241 ; 1148 ; 1101 ; 1060 ; 956 ; 841 ; 528.

Azoture de poly(éthylène glycol) 2000 monométhyl éther (**2**)

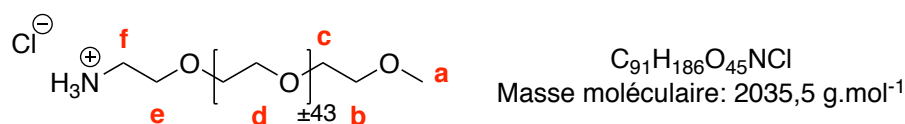
De l'azoture de sodium (1,1 g ; 16,9 mmol) est ajouté à une solution du composé **2** (8,86 g ; 4,26 mmol) dans l'eau (20 mL). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 48 h puis refroidi. Il est ensuite extrait au dichlorométhane (3 x 50 mL) et les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées sur coton et concentrées à l'évaporateur rotatif pour livrer le composé **2** (7,69 g ; 89 %) est obtenu sous forme d'un solide blanc.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 3,74-3,44 (m, 180H, $\text{H}_{b,c,d,e}$) ; 3,34 (m, 5H, $\text{H}_{a,f}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 71,8 ; 70,6 ; 70,5 ; 70,5 ; 69,9 ; 58,9 ; 50,6.

IR ν 2885 ; 2103 ; 1467 ; 1453 ; 1359 ; 1341 ; 1279 ; 1240 ; 1148 ; 1103 ; 1060 ; 946 ; 841 ; 529 ; 509.

Chlorhydrate d' amino poly(éthylène glycol) 2000 monométhyl éther (**3**)



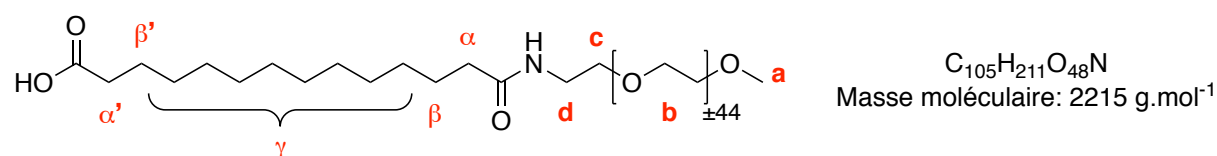
De la triphénylphosphine (1,16 g ; 4,41 mmol) ainsi qu'une solution concentrée d'acide chlorhydrique (368 μL ; 4,41 mmol) sont ajoutés successivement à une solution du composé **3** (3 g ; 1,48 mmol) dans 10 mL d'un mélange THF/ H_2O (1:1). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 24 h. Le milieu est ensuite extrait dans un premier temps à l'acétate d'éthyle (3 x 30 mL) puis à l'éther diéthylique (30 mL). La phase aqueuse est ensuite lyophilisée pour conduire au composé **3** (2,16 g ; 72 %) est obtenu sous forme d'un solide blanc.

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 3,88 (t, 2H, H_e , $^3J_{e-f} = 4,5$) ; 3,83-3,63 (m, 180H, $\text{H}_{b,c,d}$) ; 3,52 (t, 2H, H_f , $^3J_{e-f} = 4,5$) ; 3,38 (s, 3H, H_a).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ 72,1 ; 71,4 ; 69,9 ; 69,8 ; 60,7 ; 58,5.

IR ν 2884 ; 1467 ; 1453 ; 1359 ; 1342 ; 1279 ; 1241 ; 1148 ; 1106 ; 1061 ; 962 ; 842.

Monoamide de l'acide tétradécanedioïque avec l' amino-poly(éthylène glycol) 2000 monométhyl éther (**4**)



À une solution du composé **3** (400 mg ; 0,2 mmol) dans le THF anhydre (10 mL) sont ajoutés successivement de l'acide tétradécanedioïque (254 mg ; 0,98 mmol), du N,N' -dicyclohexylcarboxydiimide (162 mg ; 0,79 mmol), de la 4-(diméthylamino)pyridine (12 mg ;

0,01 mmol) et de la *N,N*-diisopropyléthylamine (5 gouttes). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 1 h, puis une dizaine de gouttes d'une solution d'acide chlorhydrique à 10 % sont ajoutées à la solution afin de décomposer l'acide activé résiduel. Le mélange est ensuite séché sur MgSO_4 , filtré puis réduit sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur silice (AcOEt/MeOH 100:0 à 90:10, puis $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 80:20). Le composé **4** (207 mg ; 47 %) est obtenu sous forme d'une huile jaune.

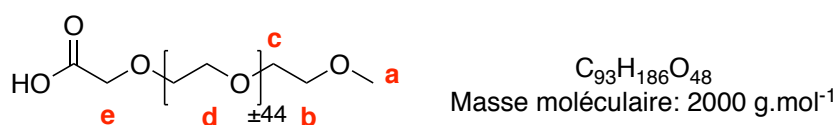
$R_f = 0,4$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 10:3:0,3).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,21 (s, 1H, -NH) ; 3,81-3,56 (m, 180H, H_b) ; 3,53 (t, 2H, H_c , $^3J_{c-d} = 4,3$) ; 3,44 (t, 2H, H_d , $^3J_{c-d} = 4,3$) ; 3,36 (s, 3H, H_a) ; 2,30 (m, 4H, $\text{H}_{\alpha,\alpha'}$) ; 1,28 (m, 20H, $\text{H}_{\gamma,\beta,\beta'}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 174,0 ; 72,1 ; 70,8 ; 70,4 ; 69,4 ; 63,5 ; 59,2 ; 42,9 ; 34,4 ; 34,1 ; 33,9 ; 29,6 ; 29,5 ; 29,4 ; 29,2 ; 25,1 ; 25,0.

IR ν 2885 ; 1466 ; 1455 ; 1359 ; 1340 ; 1279 ; 1240 ; 1147 ; 1100 ; 1060 ; 957 ; 841 ; 529.

Acide 2-[poly(éthylène glycol) monométhyl éther 2000] acétique (**5**)



Du réactif de Jones ($\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$) est ajouté lentement à température ambiante à une solution de poly(éthylène glycol) monométhyl éther 2000 (8,5 g ; 4,25 mmol) dans l'acétone jusqu'à obtenir une coloration jaune persistante. Le chrome (VI) en excès est réduit par ajout de quelques gouttes d'isopropanol, puis l'acétone est évaporée sous vide. Le résidu est repris dans le chloroforme et lavé par une solution saturée de NaCl . La phase organique est ensuite séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée sous pression réduite pour conduire au composé **5** (5,96 g ; 70 %) qui est obtenu sous la forme d'un solide blanc.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,12 (s, 2H, H_e) ; 3,79 (t, 2H, H_b , $^3J_{b-c} = 4,5$) ; 3,72-3,42 (m, 180H, $\text{H}_{c,d}$) ; 3,35 (s, 3H, H_a).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 171,7 ; 72,0 ; 71,2 ; 70,7 ; 69,0 ; 59,1.

IR ν 2884 ; 1466 ; 1455 ; 1359 ; 1340 ; 1279 ; 1147 ; 1103 ; 1060 ; 947 ; 841 ; 529

Références bibliographiques

1. Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset). Évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et l'environnement. 2010. <https://www.anses.fr/> (accessed Jan 20, 2017)
2. Recommandation de la Commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux. Journal officiel de l'Union européenne October 20, 2011.
3. ISO/TS 27687. Nanotechnologies - Terminology and definitions for nano-objects - Nanoparticle, nanofibre and nanoplate. 2008.
4. W.J. Stark. Nanoparticles in biological systems. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50 (6), 1242–1258.
5. E. Blanco, H. Shen, M. Ferrari. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **2015**, 33 (9), 941–951.
6. The cost of air pollution: strengthening the economic case for action. World Bank and Institute for Health Metrics and Evaluation. Washington, DC: World Bank. License: Creative Commons Attribution CC BY 3.0 IGO, **2016**.
7. A. Solga, Z. Cerman, B.F. Striffler, M. Spaeth, W. Barthlott. The dream of staying clean: Lotus and biomimetic surfaces. *Bioinspir. Biomim.* **2007**, 2 (4), S126–S134.
8. K. Autumn, Y.A. Liang, S.T. Hsleh, W. Zesch, W.P. Chan, T.W. Kenny, R. Fearing, R. Full. Adhesive force of a single gecko foot-hair. *Nature* **2000**, 405, 681–685.
9. K. Zarschler, L. Rocks, N. Licciardello, L. Boselli, E. Polo, K.P. Garcia, L. De Cola, H. Stephan, K.A. Dawson. Ultrasmall inorganic nanoparticles: state-of-the-art and perspectives for biomedical applications. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2016**, 12 (6), 1663–1701.
10. P. Pandey, M. Dahiya. A brief review on inorganic nanoparticles. *J Crit Rev* **2016**, 3, 18–26.
11. P.K. Jain, K.S. Lee, I.H. El-Sayed, M.A. El-Sayed. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110 (14), 7238–7248.
12. M. Haruta, T. Kobayashi, H. Sano, N. Yamada. Novel gold catalysts for the oxidation of carbon monoxide at a temperature far below 0 °C. *Chem. Lett.* **1987**, 2, 405–408.
13. J. Han, Y. Liu, R. Guo. Facile synthesis of highly stable gold nanoparticles and their unexpected excellent catalytic activity for Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction in water. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (6), 2060–2061.
14. S. Kundu, K. Wang, H. Liang. Size-selective synthesis and catalytic application of polyelectrolyte encapsulated gold nanoparticles using microwave irradiation. *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113 (13), 5157–5163.
15. L.A. Dykman, N.G. Khlebtsov. Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects. *Acta Naturae* **2011**, 3 (2), 34–55.
16. D. Pissuwan, T. Niidome, M.B. Cortie. The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems. *J. Controlled Release* **2011**, 149 (1), 65–71.
17. M. Rai, A. Yadav, A. Gade. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* **2009**, 27 (1), 76–83.
18. G. Premanand, N. Shanmugam, N. Kannadasan, K. Sathishkumar, G. Viruthagiri. Nelumbo nucifera leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial properties against some human pathogens. *Appl. Nanosci.* **2016**, 6 (3), 409–415.

19. A. Panáček, M. Kolář, R. Večeřová, R. Pucek, J. Soukupová, V. Krystof, P. Hamal, R. Zbořil, L. Kvitek. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* **2009**, 30 (31), 6333–6340.
20. J. Pulit, M. Banach, R. Szczyglowska, M. Bryk. Nanosilver against fungi, silver nanoparticles as an effective biocidal factor. *Acta Biochim Pol.* **2013**, 60, 795–798.
21. P. Jain, T. Pradeep. Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, 90 (1), 59–63.
22. X.-Y. Dong, Z.-W. Gao, K.-F. Yang, W.-Q. Zhang, L.-W. Xu. Nanosilver as a new generation of silver catalysts in organic transformations for efficient synthesis of fine chemicals. *Catal. Sci. Technol.* **2015**, 5 (5), 2554–2574.
23. M. Xing, L. Ge, M. Wang, Q. Li, X. Li, J. Ouyang. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *Int. J. Nanomed.* **2014**, 2399.
24. X.-H. Peng, X. Qian, H. Mao, A.Y. Wang, Z. Chen, S. Nie, D.M. Shin. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy. *Int. J. Nanomed.* **2008**, 3 (3), 311–321.
25. A. Elias, A. Tsourkas. Imaging circulating cells and lymphoid tissues with iron oxide nanoparticles. *Hematology* **2009**, 2009 (1), 720–726.
26. F. Sonvico, S. Mornet, S. Vasseur, C. Dubernet, D. Jaillard, J. Degrouard, J. Hoebeke, E. Duguet, P. Colombo, P. Couvreur. Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments. *Bioconjug. Chem.* **2005**, 16 (5), 1181–1188.
27. J.-H. Lee, J. Jang, J. Choi, S.H. Moon, S. Noh, J. Kim, J.-G. Kim, I.-S. Kim, K.I. Park, J. Cheon. Exchange-coupled magnetic nanoparticles for efficient heat induction. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, 6 (7), 418–422.
28. I.I. Slowing, B.G. Trewyn, S. Giri, V.S.-Y. Lin. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing applications. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, 17 (8), 1225–1236.
29. S. Saroj, S.J. Rajput. Composite smart mesoporous silica nanoparticles as promising therapeutic and diagnostic candidates: recent trends and applications. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2018**, 44, 349–365.
30. F. Chen, G. Hableel, E.R. Zhao, J.V. Jokerst. Multifunctional nanomedicine with silica: role of silica in nanoparticles for theranostic, imaging, and drug monitoring. *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, 521, 261–279.
31. M. Kulkarni, A. Mazare, E. Gongadze, š Perutkova, V. Kralj-Iglič, I. Milošev, P. Schmuki, A. Iglič, M. Mozetič. Titanium nanostructures for biomedical applications. *Nanotechnology* **2015**, 26 (6), 062002.
32. H. Shi, R. Magaye, V. Castranova, J. Zhao. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part. Fibre Toxicol.* **2013**, 10 (1), 15.
33. M. Czajka, K. Sawicki, K. Sikorska, S. Popek, M. Kruszewski, L. Kapka-Skrzypczak. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles in central nervous system. *Toxicol. In Vitro* **2015**, 29 (5), 1042–1052.
34. A.P. Alivisatos. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science* **1996**, 271, 933–937.
35. M. Bruchez Jr. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* **1998**, 281 (5385), 2013–2016.
36. X. Michalet. Quantum dots for live Cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* **2005**, 307 (5709), 538–544.

37. U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat. Methods* **2008**, 5 (9), 763–775.
38. D. Bera, L. Qian, T.-K. Tseng, P.H. Holloway. Quantum dots and their multimodal applications: a review. *Materials* **2010**, 3 (4), 2260–2345.
39. N.L. Rosi, J. Eckert, M. Eddaoudi, D.T. Vodak, J. Kim, M. O'Keeffe, O.M. Yaghi. Hydrogen storage in microporous metal-organic frameworks. *Science* **2003**, 300 (5622), 1127–1129.
40. A.R. Millward, O.M. Yaghi. Metal–organic frameworks with exceptionally high capacity for storage of carbon dioxide at room temperature. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (51), 17998–17999.
41. D. Farrusseng, S. Aguado, C. Pinel. Metal-organic frameworks: opportunities for catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48 (41), 7502–7513.
42. H.-S. Wang. Metal–organic frameworks for biosensing and bioimaging applications. *Coord. Chem. Rev.* **2017**, 349, 139–155.
43. P. Horcajada, T. Chalati, C. Serre, B. Gillet, C. Sebrie, T. Baati, J.F. Eubank, D. Heurtaux, P. Clayette, C. Kreuz et al. Porous metal–organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging. *Nat. Mater.* **2010**, 9 (2), 172–178.
44. F. Zhao, Y. Shi, L. Pan, G. Yu. Multifunctional nanostructured conductive polymer gels: synthesis, properties, and applications. *Acc. Chem. Res.* **2017**, 50 (7), 1734–1743.
45. S. Ghosh, N.A. Kouamé, L. Ramos, S. Remita, A. Dazzi, A. Deniset-Besseau, P. Beaunier, F. Goubard, P.-H. Aubert, H. Remita. Conducting polymer nanostructures for photocatalysis under visible light. *Nat. Mater.* **2015**, 14 (5), 505–511.
46. S. Mallakpour, V. Behranvand. Polymeric nanoparticles: recent development in synthesis and application. *Express Polym. Lett.* **2016**, 10 (11), 895–913.
47. Y. Shi, L. Peng, Y. Ding, Y. Zhao, G. Yu. Nanostructured conductive polymers for advanced energy storage. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44 (19), 6684–6696.
48. Y. Li, T. Thambi, D.S. Lee. Co-delivery of drugs and genes using polymeric nanoparticles for synergistic cancer therapeutic effects. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, 7 (1), 1700886.
49. D. Astruc, E. Boisselier, C. Ornelas. Dendrimers designed for functions: from physical, photophysical, and supramolecular properties to applications in sensing, catalysis, molecular electronics, photonics, and nanomedicine. *Chem. Rev.* **2010**, 110 (4), 1857–1959.
50. A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S.W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi, K. Nejati-Koshki. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, 8 (1), 102.
51. A. Madni, M. Sarfraz, M. Rehman, M. Ahmad, N. Akhtar, S. Ahmad, N. Tahir, S. Ijaz, R. Al-Kassas, R. Löbenberg. Liposomal drug delivery: a versatile platform for challenging clinical applications. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2014**, 17 (3), 401.
52. M. Cagel, F.C. Tesan, E. Bernabeu, M.J. Salgueiro, M.B. Zubillaga, M.A. Moretton, D.A. Chiapetta. Polymeric mixed micelles as nanomedicines: achievements and perspectives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, 113, 211–228.
53. D. Jariwala, V.K. Sangwan, L.J. Lauhon, T.J. Marks, M.C. Hersam. Carbon nanomaterials for electronics, optoelectronics, photovoltaics, and sensing. *Chem Soc Rev* **2013**, 42 (7), 2824–2860.
54. G. Hong, S. Diao, A.L. Antaris, H. Dai. Carbon nanomaterials for biological imaging and nanomedicinal therapy. *Chem. Rev.* **2015**, 115 (19), 10816–10906.

55. H.W. Kroto, J.R. Heath, S.C. O'Brien, R.F. Curl, R.E. Smalley. C60: buckminsterfullerene. *Nature* **1985**, 318, 162–163.
56. M. Maggini, G. Scorrano, M. Prato. Addition of azomethine ylides to C60: synthesis, characterization, and functionalization of fullerene pyrrolidines. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115 (21), 9798–9799.
57. M. Brettreich, A. Hirsch. A highly water-soluble dendro[60]fullerene. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39 (18), 2731–2734.
58. T. Andersson, K. Nilsson, M. Sundahl, G. Westman, O. Wennerström. C60 embedded in γ -cyclodextrin: a water-soluble fullerene. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, No. 8, 604–606.
59. V.M. Torres, M. Posa, B. Srdjenovic, A.L. Simplício. Solubilization of fullerene C60 in micellar solutions of different solubilizers. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, 82 (1), 46–53.
60. T.Y. Zakharian, A. Seryshev, B. Sitharaman, B.E. Gilbert, V. Knight, L.J. Wilson. A fullerene–paclitaxel chemotherapeutic: Synthesis, characterization, and study of biological activity in tissue culture. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (36), 12508–12509.
61. H. Isobe, W. Nakanishi, N. Tomita, S. Jinno, H. Okayama, E. Nakamura. Nonviral gene delivery by tetraamino fullerene. *Mol. Pharm.* **2006**, 3 (2), 124–134.
62. K.B. Ghiassi, M.M. Olmstead, A.L. Balch. Gadolinium-containing endohedral fullerenes: structures and function as magnetic resonance imaging (MRI) agents. *Dalton Trans* **2014**, 43 (20), 7346–7358.
63. L.R. Karam, M.G. Mitch, B.M. Coursey. Encapsulation of Tc-99m within fullerenes: a novel radionuclidic carrier. *Appl. Radiat. Isot.* **1997**, 48, 771–776.
64. S. Iijima. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**, 354 (6348), 56–58.
65. J.T. Robinson, K. Welsher, S.M. Tabakman, S.P. Sherlock, H. Wang, R. Luong, H. Dai. High performance in vivo near-IR (>1 μm) imaging and photothermal cancer therapy with carbon nanotubes. *Nano Res.* **2010**, 3 (11), 779–793.
66. N.W.S. Kam, Z. Liu, H. Dai. Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: an investigation of the uptake mechanism and pathway. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45 (4), 577–581.
67. Z. Liu, A.C. Fan, K. Rakhra, S. Sherlock, A. Goodwin, X. Chen, Q. Yang, D.W. Felsher, H. Dai. Supramolecular stacking of doxorubicin on carbon nanotubes for in vivo cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48 (41), 7668–7672.
68. K.S. Novoselov. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science* **2004**, 306 (5696), 666–669.
69. K.I. Bolotin, K.J. Sikes, Z. Jiang, M. Klima, G. Fudenberg, J. Hone, P. Kim, H.L. Stormer. Ultrahigh electron mobility in suspended graphene. *Solid State Commun.* **2008**, 146 (9–10), 351–355.
70. Y. Yang, A.M. Asiri, Z. Tang, D. Du, Y. Lin. Graphene based materials for biomedical applications. *Mater. Today* **2013**, 16 (10), 365–373.
71. S.-J. Cheng, H.-Y. Chiu, P.V. Kumar, K.Y. Hsieh, J.-W. Yang, Y.-R. Lin, Y.-C. Shen, G.-Y. Chen. Simultaneous drug delivery and cellular imaging using graphene oxide. *Biomater. Sci.* **2018**.
72. V.N. Mochalin, O. Shenderova, D. Ho, Y. Gogotsi. The properties and applications of nanodiamonds. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, 7 (1), 11–23.
73. K. Turcheniuk, V.N. Mochalin. Biomedical applications of nanodiamond (Review). *Nanotechnology* **2017**, 28 (25), 252001.

74. X. Xu, R. Ray, Y. Gu, H.J. Ploehn, L. Gearheart, K. Raker, W.A. Scrivens. Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (40), 12736–12737.
75. A.L. Himaja, P.S. Karthik, S.P. Singh. Carbon dots: the newest member of the carbon nanomaterials family. *Chem. Rec.* **2015**, 15 (3), 595–615.
76. R. Wang, K.-Q. Lu, Z.-R. Tang, Y.-J. Xu. Recent progress in carbon quantum dots: synthesis, properties and applications in photocatalysis. *J. Mater. Chem. A* **2017**, 5 (8), 3717–3734.
77. S.N. Baker, G.A. Baker. Luminescent carbon nanodots: emergent nanolights. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49 (38), 6726–6744.
78. V. Mishra, A. Patil, S. Thakur, P. Kesharwani. Carbon dots: emerging theranostic nanoarchitectures. *Drug Discov. Today* **2018**.
79. J. Nicolas, P. Couvreur. Les nanoparticules polymères pour la délivrance de principes actifs anticancéreux. *Médecine/sciences* **2017**, 33 (1), 11–17.
80. D. Owensiii, N. Peppas. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2006**, 307 (1), 93–102.
81. N. Chiannikulchai, N. Ammouy, B. Caillou, J.P. Devissaguet, P. Couvreur. Hepatic tissue distribution of doxorubicin-loaded nanoparticles after in vivo administration in reticulosarcoma M 5076 metastasis-bearing mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1990**, 26, 122–126.
82. L. Barraud, P. Merle, E. Soma, L. Lefrançois, S. Guerret, M. Chevallier, C. Dubernet, P. Couvreur, C. Trépo, L. Vitvitski. Increase of doxorubicin sensitivity by doxorubicin-loading into nanoparticles for hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *J. Hepatol.* **2005**, 42 (5), 736–743.
83. A.K. Iyer, G. Khaled, J. Fang, H. Maeda. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov. Today* **2006**, 11 (17–18), 812–818.
84. D.K. Chatterjee, P. Diagaradjane, S. Krishnan. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. *Ther. Deliv.* **2011**, 2 (8), 1001–1014.
85. H.Y. Yoon, S. Jeon, D.G. You, J.H. Park, I.C. Kwon, H. Koo, K. Kim. Inorganic nanoparticles for image-guided therapy. *Bioconjug. Chem.* **2017**, 28 (1), 124–134.
86. E. Marshall. CLINICAL TRIALS: gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* **1999**, 286 (5448), 2244–2245.
87. S. Hacein-Bey-Abina, C. von Kalle, M. Schmidt, F. Le Deist, N. Wulffraat, E. McIntyre, I. Radford, J.-L. Villeval, C.C. Fraser, M. Cavazzana-Calvo, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **2003**, 348 (3), 255–256.
88. H. Sakurai, K. Kawabata, F. Sakurai, S. Nakagawa, H. Mizuguchi. Innate immune response induced by gene delivery vectors. *Int. J. Pharm.* **2008**, 354 (1–2), 9–15.
89. Glybera, la première thérapie génique autorisée en Europe <http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/actu/d/medecine-glybera-premiere-therapie-genique-autorisee-europe-42386/> (accessed Apr 25, 2015).
90. FDA approves groundbreaking gene therapy for cancer. <https://www.technologyreview.com/s/608771/the-fda-has-approved-the-first-gene-therapy-for-cancer/> (accessed Sep 6, 2018).
91. M.A. Mintzer, E.E. Simanek. nonviral vectors for gene delivery. *Chem. Rev.* **2009**, 109 (2), 259–302.

92. H. Yin, R.L. Kanasty, A.A. Eltoukhy, A.J. Vegas, J.R. Dorkin, D.G. Anderson. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, 15 (8), 541–555.
93. S. Dizaj, S. Jafari, A. Khosroushahi. A sight on the current nanoparticle-based gene delivery vectors. *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, 9, 252.
94. A.B. Hill, M. Chen, C.-K. Chen, B.A. Pfeifer, C.H. Jones. Overcoming gene-delivery hurdles: Physiological considerations for nonviral vectors. *Trends Biotechnol.* **2016**, 34 (2), 91–105.
95. Y. Xia, M.V. Matham, H. Su, P. Padmanabhan, B. Gulyás. Nanoparticulate contrast agents for multimodality molecular imaging. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2016**, 12 (8), 1553–1584.
96. P. Andujar, S. Lanone, P. Brochard, J. Boczkowski. Respiratory effects of manufactured nanoparticles. *Rev. Mal. Respir.* **2011**, 28 (8), e66–e75.
97. A. Nel. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **2006**, 311 (5761), 622–627.
98. T. Kaewamatawong, N. Kawamura, M. Okajima, M. Sawada, T. Morita, A. Shimada. Acute pulmonary toxicity caused by exposure to colloidal silica: particle size dependent pathological changes in mice. *Toxicol. Pathol.* **2005**, 33 (7), 745–751.
99. H.M. Braakhuis, I. Gosens, P. Krystek, J.A. Boere, F.R. Cassee, P.H. Fokkens, J.A. Post, H. van Loveren, M.V. Park. Particle size dependent deposition and pulmonary inflammation after short-term inhalation of silver nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* **2014**, 11 (1).
100. E. Fröhlich. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, 5577.
101. B.D. Chithrani, W.C.W. Chan. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.* **2007**, 7 (6), 1542–1550.
102. I.-L. Hsiao, Y.-J. Huang. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO₂ nanoparticles toward human lung epithelial cells. *Sci. Total Environ.* **2011**, 409 (7), 1219–1228.
103. J.O. Anderson, J.G. Thundiyil, A. Stolbach. Clearing the air: A review of the effects of particulate matter air pollution on human health. *J. Med. Toxicol.* **2012**, 8 (2), 166–175.
104. A. Cayuela, M.L. Soriano, C. Carrillo-Carrión, M. Valcárcel. Semiconductor and carbon-based fluorescent nanodots: the need for consistency. *Chem. Commun.* **2016**, 52 (7), 1311–1326.
105. J. Zhou, C. Booker, R. Li, X. Zhou, T.-K. Sham, X. Sun, Z. Ding. An electrochemical avenue to blue luminescent nanocrystals from multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs). *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (4), 744–745.
106. H. Tao, K. Yang, Z. Ma, J. Wan, Y. Zhang, Z. Kang, Z. Liu. In vivo NIR fluorescence imaging, biodistribution, and toxicology of photoluminescent carbon dots produced from carbon nanotubes and graphite. *Small* **2012**, 8 (2), 281–290.
107. Y. Dong, C. Chen, X. Zheng, L. Gao, Z. Cui, H. Yang, C. Guo, Y. Chi, C.M. Li. One-step and high yield simultaneous preparation of single- and multi-layer graphene quantum dots from CX-72 carbon black. *J. Mater. Chem.* **2012**, 22 (18), 8764.
108. S. Zhu, J. Zhang, C. Qiao, S. Tang, Y. Li, W. Yuan, B. Li, L. Tian, F. Liu, R. Hu et al. Strongly green-photoluminescent graphene quantum dots for bioimaging applications. *Chem. Commun.* **2011**, 47 (24), 6858.
109. B. Zhang, C. Liu, Y. Liu. A novel one-step approach to synthesize fluorescent carbon nanoparticles. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, 2010 (28), 4411–4414.

110. C.-W. Lai, Y.-H. Hsiao, Y.-K. Peng, P.-T. Chou. Facile synthesis of highly emissive carbon dots from pyrolysis of glycerol; gram scale production of carbon dots/mSiO₂ for cell imaging and drug release. *J. Mater. Chem.* **2012**, 22 (29), 14403.
111. H. Zhu, X. Wang, Y. Li, Z. Wang, F. Yang, X. Yang. Microwave synthesis of fluorescent carbon nanoparticles with electrochemiluminescence properties. *Chem. Commun.* **2009**, No. 34, 5118.
112. Q. Hu, X. Gong, L. Liu, M.M.F. Choi. Characterization and analytical separation of fluorescent carbon nanodots. *J. Nanomater.* **2017**, 2017, 1–23.
113. Q. Wang, S. Zhang, H. Ge, G. Tian, N. Cao, Y. Li. A fluorescent turn-off/on method based on carbon dots as fluorescent probes for the sensitive determination of Pb²⁺ and pyrophosphate in an aqueous solution. *Sens. Actuators B Chem.* **2015**, 207, 25–33.
114. W. Chen, C. Hu, Y. Yang, J. Cui, Y. Liu. Rapid synthesis of carbon dots by hydrothermal treatment of lignin. *Materials* **2016**, 9 (3), 184.
115. H. Peng, J. Travas-Sejdic. Simple aqueous solution route to luminescent carbogenic dots from carbohydrates. *Chem. Mater.* **2009**, 21 (23), 5563–5565.
116. Y.-P. Sun, B. Zhou, Y. Lin, W. Wang, K.A.S. Fernando, P. Pathak, M.J. Meziani, B.A. Harruff, X. Wang, H. Wang. Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (24), 7756–7757.
117. S. Zhu, Y. Song, X. Zhao, J. Shao, J. Zhang, B. Yang. The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): current state and future perspective. *Nano Res.* **2015**, 8 (2), 355–381.
118. S. Zhu, Y. Song, J. Wang, H. Wan, Y. Zhang, Y. Ning, B. Yang. Photoluminescence mechanism in graphene quantum dots: quantum confinement effect and surface/edge state. *Nano Today* **2017**, 13, 10–14.
119. H. Li, X. He, Z. Kang, H. Huang, Y. Liu, J. Liu, S. Lian, C.H.A. Tsang, X. Yang, S.-T. Lee. Water-soluble fluorescent carbon quantum dots and photocatalyst design. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49 (26), 4430–4434.
120. C. Liu, P. Zhang, F. Tian, W. Li, F. Li, W. Liu. One-step synthesis of surface passivated carbon nanodots by microwave assisted pyrolysis for enhanced multicolor photoluminescence and bioimaging. *J. Mater. Chem.* **2011**, 21 (35), 13163.
121. S. Zhu, Q. Meng, L. Wang, J. Zhang, Y. Song, H. Jin, K. Zhang, H. Sun, H. Wang, B. Yang. Highly photoluminescent carbon dots for multicolor patterning, sensors, and bioimaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52 (14), 3953–3957.
122. Y. Dong, H. Pang, H.B. Yang, C. Guo, J. Shao, Y. Chi, C.M. Li, T. Yu. Carbon-based dots co-doped with nitrogen and sulfur for high quantum yield and excitation-independent emission. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52 (30), 7800–7804.
123. Q.-L. Zhao, Z.-L. Zhang, B.-H. Huang, J. Peng, M. Zhang, D.-W. Pang. Facile preparation of low cytotoxicity fluorescent carbon nanocrystals by electrooxidation of graphite. *Chem. Commun.* **2008**, No. 41, 5116.
124. S. Dutta Choudhury, J.M. Chethodil, P.M. Gharat, P.K. Praseetha, H. Pal. pH-elicited luminescence functionalities of carbon dots: mechanistic insights. *J. Phys. Chem. Lett.* **2017**, 8 (7), 1389–1395.
125. H. Wang, C. Sun, X. Chen, Y. Zhang, V.L. Colvin, Q. Rice, J. Seo, S. Feng, S. Wang, W.W. Yu. Excitation wavelength independent visible color emission of carbon dots. *Nanoscale* **2017**, 9 (5), 1909–1915.

126. M.L. Liu, L. Yang, R.S. Li, B.B. Chen, H. Liu, C.Z. Huang. Large-scale simultaneous synthesis of highly photoluminescent green amorphous carbon nanodots and yellow crystalline graphene quantum dots at room temperature. *Green Chem.* **2017**, 19 (15), 3611–3617.
127. M.J. Krysmann, A. Kelarakis, P. Dallas, E.P. Giannelis. Formation mechanism of carbogenic nanoparticles with dual photoluminescence emission. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (2), 747–750.
128. F. Ehrat, S. Bhattacharyya, J. Schneider, A. Löf, R. Wyrwich, A.L. Rogach, J.K. Stolarczyk, A.S. Urban, J. Feldmann. Tracking the source of carbon dot photoluminescence: aromatic domains versus molecular fluorophores. *Nano Lett.* **2017**, 17 (12), 7710–7716.
129. L. Cao, X. Wang, M.J. Meziani, F. Lu, H. Wang, P.G. Luo, Y. Lin, B.A. Harruff, L.M. Veca, D. Murray et al. Carbon dots for multiphoton bioimaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (37), 11318–11319.
130. R.-J. Fan, Q. Sun, L. Zhang, Y. Zhang, A.-H. Lu. Photoluminescent carbon dots directly derived from polyethylene glycol and their application for cellular imaging. *Carbon* **2014**, 71, 87–93.
131. K. Wang, Z. Gao, G. Gao, Y. Wo, Y. Wang, G. Shen, D. Cui. Systematic safety evaluation on photoluminescent carbon dots. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, 8 (1), 122.
132. X. Li, M. Rui, J. Song, Z. Shen, H. Zeng. Carbon and graphene quantum dots for optoelectronic and energy devices: a review. *Adv. Funct. Mater.* **2015**, 25 (31), 4929–4947.
133. F. Yuan, S. Li, Z. Fan, X. Meng, L. Fan, S. Yang. Shining carbon dots: Synthesis and biomedical and optoelectronic applications. *Nano Today* **2016**, 11 (5), 565–586.
134. P. Mirtchev, E.J. Henderson, N. Soheilnia, C.M. Yip, G.A. Ozin. Solution phase synthesis of carbon quantum dots as sensitizers for nanocrystalline TiO₂ solar cells. *J. Mater. Chem.* **2012**, 22 (4), 1265–1269.
135. Z. Ma, Y.-L. Zhang, L. Wang, H. Ming, H. Li, X. Zhang, F. Wang, Y. Liu, Z. Kang, S.-T. Lee. Bioinspired photoelectric conversion system based on carbon-quantum-dot-doped dye–semiconductor complex. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5 (11), 5080–5084.
136. Y. Li, Y. Hu, Y. Zhao, G. Shi, L. Deng, Y. Hou, L. Qu. An electrochemical avenue to green-luminescent graphene quantum dots as potential electron-acceptors for photovoltaics. *Adv. Mater.* **2011**, 23 (6), 776–780.
137. L. Tang, R. Ji, X. Cao, J. Lin, H. Jiang, X. Li, K.S. Teng, C.M. Luk, S. Zeng, J. Hao et al. Deep ultraviolet photoluminescence of water-soluble self-passivated graphene quantum dots. *ACS Nano* **2012**, 6 (6), 5102–5110.
138. W. Kwon, S. Do, J. Lee, S. Hwang, J.K. Kim, S.-W. Rhee. Freestanding luminescent films of nitrogen-rich carbon nanodots toward large-scale phosphor-based white-light-emitting devices. *Chem. Mater.* **2013**, 25 (9), 1893–1899.
139. X. Zhang, Y. Zhang, Y. Wang, S. Kalytchuk, S.V. Kershaw, Y. Wang, P. Wang, T. Zhang, Y. Zhao, H. Zhang et al. Color-switchable electroluminescence of carbon dot light-emitting diodes. *ACS Nano* **2013**, 7 (12), 11234–11241.
140. H. Yu, H. Zhang, H. Huang, Y. Liu, H. Li, H. Ming, Z. Kang. ZnO/carbon quantum dots nanocomposites: one-step fabrication and superior photocatalytic ability for toxic gas degradation under visible light at room temperature. *New J. Chem.* **2012**, 36 (4), 1031.
141. J. Liu, Y. Liu, N. Liu, Y. Han, X. Zhang, H. Huang, Y. Lifschitz, S.-T. Lee, J. Zhong, Z. Kang. Metal-free efficient photocatalyst for stable visible water splitting via a two-electron pathway. *Science* **2015**, 347 (6225), 970–974.

142. H. Li, R. Liu, S. Lian, Y. Liu, H. Huang, Z. Kang. Near-infrared light controlled photocatalytic activity of carbon quantum dots for highly selective oxidation reaction. *Nanoscale* **2013**, 5 (8), 3289.
143. X. Sun, Y. Lei. Fluorescent carbon dots and their sensing applications. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2017**, 89, 163–180.
144. H. Zhang, Y. Chen, M. Liang, L. Xu, S. Qi, H. Chen, X. Chen. Solid-phase synthesis of highly fluorescent nitrogen-doped carbon dots for sensitive and selective probing ferric ions in living cells. *Anal. Chem.* **2014**, 86 (19), 9846–9852.
145. C. Yuan, B. Liu, F. Liu, M.-Y. Han, Z. Zhang. Fluorescence “turn on” detection of mercuric ion based on bis(dithiocarbamate)copper (II) complex functionalized carbon nanodots. *Anal. Chem.* **2014**, 86 (2), 1123–1130.
146. A. Zhu, Q. Qu, X. Shao, B. Kong, Y. Tian. Carbon-dot-based dual-emission nanohybrid produces a ratiometric fluorescent sensor for in vivo imaging of cellular copper ions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51 (29), 7185–7189.
147. H.X. Zhao, L.Q. Liu, Z.D. Liu, Y. Wang, X.J. Zhao, C.Z. Huang. Highly selective detection of phosphate in very complicated matrixes with an off–on fluorescent probe of europium-adjusted carbon dots. *Chem. Commun.* **2011**, 47 (9), 2604.
148. Q. Wang, X. Liu, L. Zhang, Y. Lv. Microwave-assisted synthesis of carbon nanodots through an eggshell membrane and their fluorescent application. *The Analyst* **2012**, 137 (22), 5392.
149. P. Shen, Y. Xia. Synthesis-modification integration: one-step fabrication of boronic acid functionalized carbon dots for fluorescent blood sugar sensing. *Anal. Chem.* **2014**, 86 (11), 5323–5329.
150. C.-I. Wang, W.-C. Wu, A.P. Periasamy, H.-T. Chang. Electrochemical synthesis of photoluminescent carbon nanodots from glycine for highly sensitive detection of hemoglobin. *Green Chem.* **2014**, 16 (5), 2509.
151. W. Bai, H. Zheng, Y. Long, X. Mao, M. Gao, L. Zhang. A carbon dots-based fluorescence turn-on method for DNA determination. *Anal. Sci.* **2011**, 27 (3), 243.
152. X. Zhai, P. Zhang, C. Liu, T. Bai, W. Li, L. Dai, W. Liu. Highly luminescent carbon nanodots by microwave-assisted pyrolysis. *Chem. Commun.* **2012**, 48 (64), 7955.
153. P.-C. Hsu, H.-T. Chang. Synthesis of high-quality carbon nanodots from hydrophilic compounds: role of functional groups. *Chem. Commun.* **2012**, 48 (33), 3984.
154. J.-H. Liu, L. Cao, G.E. LeCroy, P. Wang, M.J. Mezziani, Y. Dong, Y. Liu, P.G. Luo, Y.-P. Sun. Carbon “quantum” dots for fluorescence labeling of cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, 7 (34), 19439–19445.
155. L. Yang, W. Jiang, L. Qiu, X. Jiang, D. Zuo, D. Wang, L. Yang. One pot synthesis of highly luminescent polyethylene glycol anchored carbon dots functionalized with a nuclear localization signal peptide for cell nucleus imaging. *Nanoscale* **2015**, 7 (14), 6104–6113.
156. Q. Li, T.Y. Ohulchanskyy, R. Liu, K. Koynov, D. Wu, A. Best, R. Kumar, A. Bonoiu, P.N. Prasad. Photoluminescent carbon dots as biocompatible nanoprobe for targeting cancer cells *in Vitro*. *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114 (28), 12062–12068.
157. Y. Song, W. Shi, W. Chen, X. Li, H. Ma. Fluorescent carbon nanodots conjugated with folic acid for distinguishing folate-receptor-positive cancer cells from normal cells. *J. Mater. Chem.* **2012**, 22 (25), 12568.
158. J. Mobley, T. Vo-Dinh. *Biomedical Photonics Handbook*, CRC Press.; T. Vo-Dinh, **2003**.

159. S. Hu, A. Trinchì, P. Atkin, I. Cole. Tunable photoluminescence across the entire visible spectrum from carbon dots excited by white light. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54 (10), 2970–2974.
160. H. Ding, J.-S. Wei, N. Zhong, Q.-Y. Gao, H.-M. Xiong. Highly efficient red-emitting carbon dots with gram-scale yield for bioimaging. *Langmuir* **2017**, 33 (44), 12635–12642.
161. L. Pan, S. Sun, L. Zhang, K. Jiang, H. Lin. Near-infrared emissive carbon dots for two-photon fluorescence bioimaging. *Nanoscale* **2016**, 8 (39), 17350–17356.
162. A.B. Bourlinos, A. Bakandritsos, A. Kouloumpis, D. Gournis, M. Krysmann, E.P. Giannelis, K. Polakova, K. Safarova, K. Hola, R. Zboril. Gd(iii)-doped carbon dots as a dual fluorescent-MRI probe. *J. Mater. Chem.* **2012**, 22 (44), 23327.
163. S. Srivastava, R. Awasthi, D. Tripathi, M.K. Rai, V. Agarwal, V. Agrawal, N.S. Gajbhiye, R.K. Gupta. Magnetic-nanoparticle-doped carbogenic nanocomposite: an effective magnetic resonance/fluorescence multimodal imaging probe. *Small* **2012**, 8 (7), 1099–1109.
164. L. Wu, X. Cai, K. Nelson, W. Xing, J. Xia, R. Zhang, A.J. Stacy, M. Luderer, G.M. Lanza, L.V. Wang, et al. A green synthesis of carbon nanoparticles from honey and their use in real-time photoacoustic imaging. *Nano Res.* **2013**, 6 (5), 312–325.
165. M. Zheng, S. Liu, J. Li, D. Qu, H. Zhao, X. Guan, X. Hu, Z. Xie, X. Jing, Z. Sun. Integrating oxaliplatin with highly luminescent carbon dots: an unprecedented theranostic agent for personalized medicine. *Adv. Mater.* **2014**, 26 (21), 3554–3560.
166. L. Yang, Z. Wang, J. Wang, W. Jiang, X. Jiang, Z. Bai, Y. He, J. Jiang, D. Wang, L. Yang. Doxorubicin conjugated functionalizable carbon dots for nucleus targeted delivery and enhanced therapeutic efficacy. *Nanoscale* **2016**, 8 (12), 6801–6809.
167. J. Tang, B. Kong, H. Wu, M. Xu, Y. Wang, Y. Wang, D. Zhao, G. Zheng. Carbon nanodots featuring efficient FRET for real-time monitoring of drug delivery and two-photon imaging. *Adv. Mater.* **2013**, 25 (45), 6569–6574.
168. S. Li, D. Amat, Z. Peng, S. Vanni, S. Raskin, G. De Angulo, A.M. Othman, R.M. Graham, R.M. Leblanc. Transferrin conjugated nontoxic carbon dots for doxorubicin delivery to target pediatric brain tumor cells. *Nanoscale* **2016**, 8 (37), 16662–16669.
169. C. Liu, P. Zhang, X. Zhai, F. Tian, W. Li, J. Yang, Y. Liu, H. Wang, W. Wang, W. Liu. Nano-carrier for gene delivery and bioimaging based on carbon dots with PEI-passivation enhanced fluorescence. *Biomaterials* **2012**, 33 (13), 3604–3613.
170. O. Boussif, F. Lezoualc’h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Sherman, B. Demeneix, J.P. Behr. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, 92 (16), 7297–7301.
171. P. Pierrat, R. Wang, D. Kereselidze, M. Lux, P. Didier, A. Kichler, F. Pons, L. Lebeau. Efficient in vitro and in vivo pulmonary delivery of nucleic acid by carbon dot-based nanocarriers. *Biomaterials* **2015**, 51, 290–302.
172. S. Kim, Y. Choi, G. Park, C. Won, Y.-J. Park, Y. Lee, B.-S. Kim, D.-H. Min. Highly efficient gene silencing and bioimaging based on fluorescent carbon dots in vitro and in vivo. *Nano Res.* **2017**, 10 (2), 503–519.
173. H.-J. Wang, X. He, T.-Y. Luo, J. Zhang, Y.-H. Liu, X.-Q. Yu. Amphiphilic carbon dots as versatile vectors for nucleic acid and drug delivery. *Nanoscale* **2017**, 9 (18), 5935–5947.
174. J. Ge, Q. Jia, W. Liu, M. Lan, B. Zhou, L. Guo, H. Zhou, H. Zhang, Y. Wang, Y. Gu, et al. Carbon dots with intrinsic theranostic properties for bioimaging, red-light-triggered photodynamic/photothermal simultaneous therapy in vitro and in vivo. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, 5 (6), 665–675.

175. M. Nurunnabi, Z. Khatun, G.R. Reeck, D.Y. Lee, Y. Lee. Photoluminescent graphene nanoparticles for cancer phototherapy and imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6 (15), 12413–12421.
176. M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cederwall, K.A. Dawson. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105 (38), 14265–14270.
177. M.P. Monopoli, D. Walczyk, A. Campbell, G. Elia, I. Lynch, F. Baldelli Bombelli, K.A. Dawson. Physical–Chemical Aspects of Protein Corona: Relevance to *in Vitro* and *in Vivo* Biological Impacts of Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (8), 2525–2534.
178. J. Herrmann. Nanoparticle characterisation instrumentation. National Measurement Institute, Australia 2012.
179. A. Hawe, W.L. Hulse, W. Jiskoot, R.T. Forbes. Taylor dispersion analysis compared to dynamic light scattering for the size analysis of therapeutic peptides and proteins and their aggregates. *Pharm. Res.* **2011**, 28 (9), 2302–2310.
180. Q. Xu, T. Kuang, Y. Liu, L. Cai, X. Peng, T. Sreenivasan Sreepasad, P. Zhao, Z. Yu, N. Li. Heteroatom-doped carbon dots: synthesis, characterization, properties, photoluminescence mechanism and biological applications. *J Mater Chem B* **2016**, 4 (45), 7204–7219.
181. Y. Choi, B. Kang, J. Lee, S. Kim, G.T. Kim, H. Kang, B.R. Lee, H. Kim, S.-H. Shim, G. Lee, et al. Integrative approach toward uncovering the origin of photoluminescence in dual heteroatom-doped carbon nanodots. *Chem. Mater.* **2016**, 28 (19), 6840–6847.
182. J. Zhou, H. Zhou, J. Tang, S. Deng, F. Yan, W. Li, M. Qu. Carbon dots doped with heteroatoms for fluorescent bioimaging: a review. *Microchim. Acta* **2017**, 184 (2), 343–368.
183. S. Sarkar, M. Sudolská, M. Dubecký, C.J. Reckmeier, A.L. Rogach, R. Zbořil, M. Otyepka. Graphitic nitrogen doping in carbon dots causes red-shifted absorption. *J. Phys. Chem. C* **2016**, 120 (2), 1303–1308.
184. S.R.M. Santiago, Y.A. Wong, T.-N. Lin, C.-H. Chang, C.-T. Yuan, J.-L. Shen. Effect of nitrogen doping on the photoluminescence intensity of graphene quantum dots. *Opt. Lett.* **2017**, 42 (18), 3642.
185. B.C.M. Martindale, G.A.M. Hutton, C.A. Caputo, S. Prantl, R. Godin, J.R. Durrant, E. Reisner. Enhancing light absorption and charge transfer efficiency in carbon dots through graphitization and core nitrogen doping. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56 (23), 6459–6463.
186. M.S. Fernandez, P. Fromherz. Lipid pH indicators as probes of electrical potential and polarity in micelles. *J. Phys. Chem.* **1977**, 81 (18), 1755–1761.
187. F.C. Tsui, D.M. Ojcius, W.L. Hubbell. The intrinsic pKa values for phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in phosphatidylcholine host bilayers. *Biophys. J.* **1986**, 49 (2), 459–468.
188. E.M. Egorova. Dissociation constants of lipid ionizable groups I. Corrected values for two anionic lipids. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **1998**, 131 (1–3), 7–18.
189. P. Pierrat, L. Lebeau. Characterization of titratable amphiphiles in lipid membranes by fluorescence spectroscopy. *Langmuir* **2015**, 31 (45), 12362–12371.
190. L. Hu, Y. Sun, S. Li, X. Wang, K. Hu, L. Wang, X. Liang, Y. Wu. Multifunctional carbon dots with high quantum yield for imaging and gene delivery. *Carbon* **2014**, 67, 508–513.

191. L. Wang, X. Wang, A. Bhirde, J. Cao, Y. Zeng, X. Huang, Y. Sun, G. Liu, X. Chen. Carbon-dot-based two-photon visible nanocarriers for safe and highly efficient delivery of siRNA and DNA. *Adv. Healthc. Mater.* **2014**, 3 (8), 1203–1209.
192. S. Patnaik, K.C. Gupta. Novel polyethylenimine-derived nanoparticles for *in vivo* gene delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2013**, 10 (2), 215–228.
193. E.C. Dengler, J. Liu, A. Kerwin, S. Torres, C.M. Olcott, B.N. Bowman, L. Armijo, K. Gentry, J. Wilkerson, J. Wallace, et al. Mesoporous silica-supported lipid bilayers (protocells) for DNA cargo delivery to the spinal cord. *J. Controlled Release* **2013**, 168 (2), 209–224.
194. P. Pierrat, A. Casset, P. Didier, D. Kereselidze, M. Lux, F. Pons, L. Lebeau. Cationic DOPC-detergent conjugates for safe and efficient *in vitro* and *in vivo* nucleic acid delivery. *ChemBioChem* **2016**, 17, 1771–1783.
195. Y. Ikeda, Y. Nagasaki. Impacts of PEGylation on the gene and oligonucleotide delivery system. *J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, 131 (9), 40293–40303.
196. H. Wang, K. Wang, B. Tian, R. Revia, Q. Mu, M. Jeon, F.-C. Chang, M. Zhang. Preloading of Hydrophobic Anticancer Drug into Multifunctional Nanocarrier for Multimodal Imaging, NIR-Responsive Drug Release, and Synergistic Therapy. *Small* **2016**, 12 (46), 6388–6397.
197. Y.A. Mehdi, A. Itatahine, M. Fizir, D. Xiao, P. Dramou, H. He. Multifunctional core-shell silica microspheres and their performance in self-carrier decomposition, sustained drug release and fluorescent bioimaging. *J. Solid State Chem.* **2018**, 263, 148–156.
198. T. Sun, M. Zheng, Z. Xie, X. Jing. Supramolecular hybrids of carbon dots with doxorubicin: synthesis, stability and cellular trafficking. *Mater. Chem. Front.* **2017**, 1 (2), 354–360.
199. A. Mewada, S. Pandey, M. Thakur, D. Jadhav, M. Sharon. Swarming carbon dots for folic acid mediated delivery of doxorubicin and biological imaging. *J Mater Chem B* **2014**, 2 (6), 698–705.
200. P. Kesarwani, R.K. Tekade, N.K. Jain. Spectrophotometric estimation of paclitaxel. *Int. J. Adv. Pharm. Sci.* **2011**, 2, 29–32.
201. Q. Wang, C. Li, T. Ren, S. Chen, X. Ye, H. Guo, H. He, Y. Zhang, T. Lin, X.-J. Liang, et al. Poly(vinyl methyl ether/maleic anhydride)-Doped PEG-PLA Nanoparticles for Oral Paclitaxel Delivery To Improve Bioadhesive Efficiency. *Mol. Pharm.* **2017**, 14 (10), 3598–3608.
202. Š. Koudelka, P. Turánek-Knötigová, J. Mašek, Z. Korvasová, M. Škrabalová, J. Plocková, E. Bartheldyová, J. Turánek. Liposomes with high encapsulation capacity for paclitaxel: Preparation, characterisation and *in vivo* anticancer effect. *J. Pharm. Sci.* **2010**, 99 (5), 2309–2319.
203. D. Qu, M. Zheng, L. Zhang, H. Zhao, Z. Xie, X. Jing, R.E. Haddad, H. Fan, Z. Sun. Formation mechanism and optimization of highly luminescent N-doped graphene quantum dots. *Sci. Rep.* **2015**, 4 (1).
204. F. Arcudi, L. Đorđević, M. Prato. Rationally designed carbon nanodots towards pure white-light emission. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56 (15), 4170–4173.
205. N. Tsapis. Agents de contraste pour l'imagerie médicale: les exemples de l'IRM et de l'ultrasonographie. *Médecine/sciences* **2017**, 33 (1), 18–24.

Mickaël CLAUDEL

Carbon dots : synthèse pour des études toxicologiques et développement d'outils théranostiques

Résumé

La récente découverte des carbon dots (CDs) et de leurs propriétés physico-chimiques exceptionnelles (stabilité chimique, solubilité en milieu aqueux, faible toxicité, biocompatibilité, photoluminescence et résistance au photoblanchiment) permet d'envisager l'utilisation de ces matériaux carbonés de taille nanométrique dans de nouvelles approches en imagerie biomédicale (fluorescence, IRM...), pour la vectorisation d'acides nucléiques (ADN, siARN) et la délivrance d'actifs thérapeutiques. Dans ce contexte, les objectifs de ce travail de thèse s'articulent autour de deux thématiques bien précises : échantillonnage de nanoparticules carbonées et développement de plateformes théranostiques. Une première partie a ainsi été consacrée à la préparation de carbon dots diversement fonctionnalisés de façon à pouvoir explorer l'espace structural et mener des études de relation structure-toxicité sur différentes lignées de cellules en culture. La seconde partie a été centrée sur l'élaboration d'une plateforme théranostique à base de carbon dots visant, d'une part, à délivrer un acide nucléique de façon intracellulaire et, d'autre part, à permettre un suivi des particules par différentes techniques d'imagerie.

Mots clés : carbon dots, toxicologie, délivrance de gènes, thérapie combinée, photoluminescence, plateforme théranostique, imagerie bimodale.

Abstract

The recent discovery of carbon dots (CDs) and their very interesting physico-chemical properties (chemical stability, water solubility, low toxicity, biocompatibility, photoluminescence and resistance to photobleaching) make these carbon nanoparticles a powerful platform for biomedical imaging (fluorescence, MRI...), nucleic acids vectorization (DNA, siRNA) and drug delivery. In this context, the objectives of the thesis work are divided into two different thematics: carbon nanoparticles sampling and development of theranostic platforms. The first part is devoted to the preparation of various functionalized carbon dots to explore the structural space and to manage structure-toxicity relationship studies on different cell lines. The second part is focused on the development of a theranostic platform based on carbon dots in order to promote simultaneously nucleic acids delivery into cells and to monitor them by different imaging techniques.

Key words: carbon dots, toxicology, gene delivery, combined therapy, photoluminescence, theranostic platform, bimodal imaging.