

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies– UMR 7021

THÈSE présentée par:
Heimburger Doriane

Soutenue le : 19 Décembre 2018

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

Discipline/S spécialité: chimie/nanochimie

Synthèse de nanoparticules fluorescentes ultra-brillantes à base de polymères et leur application pour la bio-imagerie

THÈSE dirigée par :

M. KLYMCHENKO Andrey

Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme. ISHOW Elena

Professeur, Université de Nantes

Mme. FERY-FORGUES Suzanne

Directrice de recherche CNRS, Université de Toulouse

AUTRE MEMBRE DU JURY :

M. VANDAMME Thierry

Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg

Co-encadrant :

M. REISCH Andreas

Maître de conférences, Université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Yves Mély pour son accueil au sein du laboratoire de Bioimagerie et Pathologies. Je tiens également à remercier Andrey Klymchenko pour son accueil au sein de l'équipe Biophotonique des interactions moléculaires et cellulaires.

Ce projet a été réalisé dans le cadre du programme « scientifique blanc » dédié à la recherche exploratoire par l'obtention d'une bourse européenne ERC Consolidator Grant (destinée aux jeunes chercheurs sept à douze ans après obtention de leur thèse) pour le projet BrightSens d'Andrey Klymchenko dont le sujet portait sur: « Ultrabright turn-on fluorescent organic nanoparticles for amplified molecular sensing in living cells. »

Je remercie Elena Ishow et Suzanne Ferry-Forgues d'avoir accepté d'être rapportrices de cette thèse ainsi que Thierry Vandamme et Andreas Reisch d'avoir fait partie du jury. Merci beaucoup pour vos conseils et remarques sur ce travail.

Un grand merci à mon duo de chefs : Andrey Klymchenko et Andreas Reisch pour leur encadrement et leur présence durant ces trois années pour fournir conseils, écoute et soutien tout en me laissant suffisamment d'autonomie pour gérer ces recherches. Andrey merci de m'avoir initiée à ce monde qu'est la fluorescence, pour tes conseils avisés et ta volonté de toujours vouloir pousser les gens plus loin. Je te suis également reconnaissante pour les qualités pédagogiques et scientifiques que tu m'as transmises. Andreas, les mots me manquent pour t'exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance tant pour ton implication personnelle, professionnelle qu'humaine. J'ai pu profiter de tes conseils et de tes idées remarquables mais également de ta présence indéfectible, ton soutien toujours positif, et ton humour très particulier à l'allemande... Sans toi, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail. J'ai beaucoup appris à tes côtés et cela a été un honneur de travailler avec toi. Merci du fond du cœur.

Ce travail, à l'interface de plusieurs disciplines m'a amené à rencontrer des gens de tous horizons dont chacune a été enrichissante. Pour commencer, je voudrais remercier très vivement Mayeul Collot pour m'avoir encadré sur la partie synthèse organique des fluorophores et m'avoir accueilli aussi chaleureusement qu'un Parisien

puisse le faire. Nos pauses café ainsi que tes tartes flambées maisons et tes tomates du jardin vont beaucoup me manquer. Je voudrais exprimer toute ma gratitude à Christine Ruhlmann et Corine Cruxifix de la plateforme FRISBI pour m'avoir permis de faire des magnifiques images TEM et de m'avoir partagé leur savoir. Vos conseils m'ont été d'une grande aide et j'ai particulièrement apprécié de collaborer avec vous. Je remercie également l'ensemble des collaborateurs qui ont participé à ce travail tels que Denis Dujardin et Pascal Didier.

Je souhaite remercier toutes les personnes travaillant au sein du laboratoire. Je ne pense pas qu'il y ait une personne que je ne puisse pas remercier pour son accueil, sa gentillesse et son aide ponctuelle. Plus particulièrement, je remercie chaudement Youri Arntz, Nicolas Humbert, Jurga Valanciunaite, Ludovic Richert, Julien Godet, Nicolas et Halina Anton.

Je remercie également tous les thésards, post-docs, stagiaires et autres non-permanents que j'ai côtoyés pendant ces 3 ans : Raphaël Cathagne, Dmytro Danylchuk, Oleksii Dukhno, Kateryna Trofymchuk, Bogdan Andreiuk, Anne Runser, Sylvie Egloff, The Kyong Fam, Oleksandr Glushonkov, Caterina Severi, Pauline Gosset, Krishna Gavvala, Jagannath Kuchlyan, Muhammad Faisal Nadeem, Adarsh Nagappan Pillai, Ashokkumar Pichandi, Liliyana Zaayter, Lesia Kovalenko, Taras Sych et Redouane Bouchaala. Mais je tiens particulièrement à remercier Lucie Esteouille pour ta présence et dans l'aide que tu m'as apporté au laboratoire mais également en tant qu'amie. On a vécu beaucoup de choses ensemble durant ces trois années et ton amitié m'a été précieuse, il suffisait de croiser ton regard dans les couloirs pour retrouver le sourire et d'avoir envie d'un café noisette à la K'Fet avec notre Mumu nationale. Je te souhaite une bonne continuation dans la suite de tes aventures et est hâte de les vivre avec toi.

Merci à tous et bonne chance pour l'avenir.

Pour finir, je voudrais remercier profondément ma famille adorée qui, avec cette question récurrente « quand est-ce que tu soutiens ? » m'a permis de ne jamais dévier de mon objectif final et d'angoisser en période de doutes. Je remercie mes parents, ma sœur, ma tante Caroline et mon oncle anglais Gavin pour leur enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de ma vie en générale. Ces remerciements sont dirigés particulièrement à mes premiers fans que sont mes parents. Leurs présences et leurs encouragements sont pour moi les piliers fondateurs

de ce que je suis et de ce que je fais. Merci de m'avoir rappelé qu'il n'y a pas que les études dans la vie et de savoir profiter de chaque instant.

Pour terminer, une petite pensée pour les petits bonheurs qui ont vu le jour pendant ces trois ans : Margaux, ta présence en ce monde aura été brève mais combien riche en émotions. Tu es devenue trop tôt un ange. Même si ton histoire est triste, tu m'as fait devenir tata pour la première fois. Tu m'as appris au cours de ces 6 mois que la chose la plus essentielle dans ce monde était la famille. Tu as fait de moi une meilleure personne et tu m'as rapproché de ma sœur à qui j'ai dit bien trop rarement que je l'aimais de tout mon cœur. Margaux, tu garderas à jamais une place spéciale dans mon cœur. Azalea, ma deuxième nièce, tu es apparue comme un rayon de soleil, un cadeau de Noël après avoir passé des moments sombres. Je te souhaite de rester en bonne santé le plus longtemps possible et d'avoir une longue vie remplie d'amour avec tes parents, tes grands parents et ta tata bleue à tes côtés. Je t'aime Azalea et il me tarde de faire ta rencontre en Avril.

Sommaire

| | |
|--|----|
| Remerciements | 2 |
| Sommaire | 5 |
| Liste d'abréviations | 7 |
| Introduction..... | 9 |
| Part I: Aperçu bibliographique | 11 |
| I. Principe de la fluorescence | 11 |
| II. Caractéristiques de la fluorescence | 13 |
| A. Spectres d'absorption, d'émission et d'excitation | 13 |
| B. Temps de vie de fluorescence..... | 14 |
| C. Rendement quantique | 15 |
| D. Anisotropie de fluorescence | 16 |
| E. Transfert d'énergie de résonance de Förster (FRET)..... | 18 |
| 1. Distinction dans le processus de transfert d'énergie | 18 |
| 2. Aspects mathématiques du FRET | 19 |
| 3. Efficacité du FRET | 20 |
| III. Sondes fluorescentes..... | 22 |
| A. Les fluorophores naturels | 22 |
| B. Les fluorophores synthétiques..... | 22 |
| C. Les nanoparticules fluorescentes | 24 |
| D. Conditions requises pour propriétés des sondes fluorescentes..... | 25 |
| E. Nanoparticules inorganiques | 26 |
| 1. Quantum Dots | 26 |
| 2. Carbon dots..... | 28 |
| 3. Nanoparticules à conversion ascendante de photons | 28 |
| 4. Les nanoparticules d'or | 29 |
| 5. Nanoparticules de silice | 31 |
| F. Nanoparticules organiques..... | 32 |
| 1. Dendrimères..... | 33 |
| 2. Micelles | 33 |
| 3. Nano-émulsions lipidiques | 34 |

| | |
|---|-----|
| 4. Nanoparticules de polymères conjugués..... | 35 |
| 5. Nanoparticules organiques fluorescentes (FON) | 37 |
| Part II: Nanoparticules dopées en fluorophores..... | 40 |
| IV. Taille des NPs..... | 44 |
| V. Transfert d'énergie au sein des nanoparticules | 49 |
| VI. Stabilité colloïdale | 59 |
| Part III: Technique de caractérisation des NPs..... | 65 |
| VII. Diffusion dynamique de la lumière | 65 |
| VIII. Spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS)..... | 67 |
| IX. Microscopie électronique à transmission (TEM) | 69 |
| X. Microscopie à réflexion interne totale (TIRF) | 70 |
| Part IV : Résultats et discussion | 72 |
| Nanoparticules polymériques dopées en fluorophores de taille semblable à celle des protéines pour une diffusion libre des particules au sein du cytosol | 72 |
| Nanoparticules polymériques fluorescentes furtives enrobées de pluronic : stabilité et suivi <i>in vivo</i> | 94 |
| Stealth fluorescent polymeric nanoparticles coated with pluronic : stability and tracking <i>in vivo</i> | 98 |
| Nanoparticules polymériques dopées en cyanine : Conception du transfert d'énergie pour l'imagerie par fluorescence multicolore | 117 |
| Cyanine-loaded polymer nanoparticles: engineering energy transfer for multi-color fluorescence imaging..... | 121 |
| Part V: Conclusions et perspectives | 142 |
| Résumé | 145 |
| Liste des présentations..... | 156 |
| Liste des publications | 156 |
| Références | 157 |

Liste d'abréviations

| | |
|--------|--|
| ACQ | Désactivation par agrégation |
| AIE | Emission induite par agrégation |
| AuNPs | Nanoparticules d'or |
| C-dots | Carbon dots |
| CMC | Concentration micellaire critique |
| CR | Relaxation croisée |
| CPN | Nanoparticules de polymère conjugué |
| CSU | Sensibilisation coopérative upconversion |
| CuAAC | copper catalyzed azide–alkyne cycloaddition |
| DLS | Diffusion de lumière dynamique |
| DNA | Acide désoxyribonucléique |
| EET | Transfert d'énergie d'excitation |
| ESA | Absorption à l'état excité |
| ESIPT | Transfert de protons intramoléculaires à l'état excité |
| ETU | Transfert d'énergie upconversion |
| FCS | Spectroscopie de corrélation de fluorescence |
| FRET | Transfert d'énergie de résonance de Förster |
| IC | Conversion interne |
| ICT | Transfert de charge intramoléculaire |
| ISC | Croisement intersystème |
| LOD | Limite de détection |
| LR | Lumogen red |
| LSPR | Résonance plasmon de surface |
| NIR | Proche infrarouge |
| NPs | Nanoparticules |
| PA | Avalanche de photons |
| PEG | Polyéthylène glycol |
| PLGA | Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) |
| PMMA | Polyméthylméthacrylate |
| QDs | Quantum dots |
| QY | Rendement quantique |
| RB | Rhodamine B |
| SiNPs | Nanoparticules de silice |
| TEM | Microscopie électronique à transmission |

| | |
|--------|--|
| TEOS | Tetraéthoxysilane |
| TIRF | Réflexion interne totale de fluorescence |
| TMR | Tetraméthylrhodamine |
| UC | Upconversion |
| UCNPs | Nanoparticules à upconversion |
| UV/Vis | Ultraviolet-visible |

Introduction

Depuis la fin du XX^{ème} siècle, les nanotechnologies et plus particulièrement les nanoparticules (NPs) ont connu une expansion fulgurante. On assiste en effet à des progrès remarquables dans des domaines aussi divers que l'énergie, l'industrie ou encore la santé. En effet, en nano-médecine, les nanoparticules sont de plus en plus utilisées pour améliorer la thérapie et le diagnostic précoce de plusieurs maladies, telles que des cancers. Développer de nouveaux outils est donc devenu un enjeu crucial au niveau humain, médical et socio-économique. En outre, leur morphologie et leur taille leur permettent de franchir les barrières physiologiques. De plus, les nanoparticules ont l'avantage de posséder une chimie de surface facilement contrôlable (possibilité de fonctionnalisation et d'incrémenter des charges à la surface de la NP) favorisant ainsi leurs applications en biologie. En effet, les NPs injectées par voie intraveineuse peuvent potentiellement atteindre chaque organe ou tissu vascularisé de notre corps et délivrer des molécules thérapeutiques.

Parallèlement à cet engouement scientifique, ces nanoparticules soulèvent aussi de nombreuses inquiétudes au sujet de leurs effets sur la santé. Elles sont difficilement éliminables par l'organisme (notamment en ce qui concerne les quantum dots) et ont tendance à s'accumuler provoquant une certaine toxicité au sein de l'organisme. Aussi, le développement de nouvelles NPs offrant des opportunités intéressantes en tant qu'agents de contraste et possédant le moins d'effets secondaires est devenu une priorité majeure d'innovation pour les sociétés pharmaceutiques. En particulier, il existe un véritable intérêt pour le développement de NPs organiques polymériques biodégradables qui pallient le problème de l'élimination lié à l'utilisation de nanoparticules métalliques ou de quantum dots.

Dans le cadre de la détection précoce du cancer, l'imagerie par fluorescence est une technique très prometteuse. En effet, elle permet une détection très sensible et non invasive. Le signal de fluorescence peut être modulé en réponse à la présence de biomolécules cibles même à des concentrations extrêmement faibles par le biais du transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET). Les nanoparticules composées d'une matrice polymérique non fluorescente et d'un fluorophore encapsulé dans la matrice sont des nano-objets fluorescents aux propriétés ajustables et

constituent des outils ultimes pour des applications en bio-imagerie et la détection de cellules cancéreuses. Ainsi, la vitesse, la résolution et la sensibilité de l'imagerie de fluorescence d'aujourd'hui peuvent être considérablement améliorées par les nanoparticules organiques fluorescentes qui sont des objets beaucoup plus lumineux que les fluorophores organiques individuels ou encore les quantum dots (QDs).

Les champs d'application des nanoparticules organiques paraissent intéressants. Néanmoins, il existe plusieurs défis afin que les nanoparticules organiques soient optimales pour des applications en bio-imagerie. En effet, les NPs circulant dans le sang sont reconnues par le système phagocytaire mononucléaire et éliminées par phagocytose. De plus, la majorité des nanoparticules organiques sont relativement grosses et leur taille est difficilement ajustable avec précision, ce qui pose des problèmes en ce qui concerne leur libre circulation au sein de l'organisme et notamment au sein de l'ensemble de la cellule.

Au travers de ce travail de thèse, nous avons optimisé les processus de fabrication des nanoparticules organiques polymériques biocompatibles, biodégradables et non toxiques afin de les appliquer à la détection biochimique ou biologique. La première étape de la réalisation de ce projet a été la conception des nanoparticules avec des tailles que l'on puisse parfaitement contrôler en faisant varier la chimie des polymères. La deuxième étape consiste en la fonctionnalisation des nanoparticules polymériques avec un ligand PEG, leur caractérisation et l'étude de leur circulation au sein de l'organisme. La troisième et dernière étape a consisté à déterminer les conditions les plus favorables pour le transfert d'énergie afin d'obtenir un FRET efficace pour les accepteurs uniques au sein des nanoparticules et un effet d'antenne.

Part I: Aperçu bibliographique

Au cours des 20 dernières années, la fluorescence est devenue une technique incontournable en biologie et en imagerie qui tend vers la détection de la molécule unique et l'imagerie *in vivo*. En effet, la fluorescence est une technique *in situ* extrêmement sensible. Cette première partie va s'attarder sur les concepts de base de la fluorescence, ses principales caractéristiques et la description de certains phénomènes essentiels inhérents à la fluorescence qui ont servi durant cette thèse.

I. Principe de la fluorescence

La fluorescence est définie comme un phénomène d'émission d'un photon par la matière après une excitation électronique dans le cadre d'un processus d'absorption de la lumière. Une molécule fluorescente (fluorophore), reçoit de l'énergie lumineuse afin de passer d'un état singulet fondamental à un état singulet excité possédant une énergie plus élevée. Ce fluorophore va ensuite se relaxer vers son état singulet fondamental en émettant de la lumière. Il s'agit du phénomène de fluorescence. Plus précisément, il s'agit de l'émission d'un photon après absorption électronique sans changement de multiplicité de spin. Plusieurs processus de désactivation du fluorophore peuvent avoir lieu et sont généralement illustrés par le diagramme de Jablonski(1) (figure 1.1.).

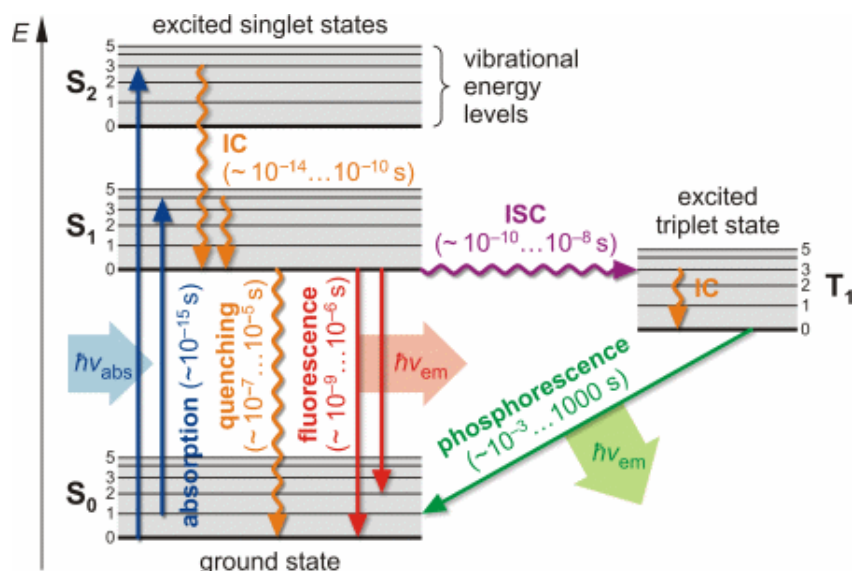


Figure 1.1. Diagramme énergétique de Jablonski illustrant les transitions entre les états électroniques d'une molécule au sein des processus quantiques de fluorescence et de phosphorescence. Les lignes ondulées marquent les transitions non radiatives et les lignes droites correspondent aux transitions radiatives. IC signifie conversion interne et ISC signifie croisement intersystème. Adapté de <http://home.uni-leipzig.de>.

Une molécule dans son état fondamental (S_0) peut être excitée vers des états d'énergie plus élevée (S_1, S_2, \dots, S_n) par absorption d'un photon si l'énergie des photons se propageant dans le milieu correspond à la différence d'énergie entre l'état S_0 et l'état S_1 (processus d'absorption). Les transitions se produisent sur des temps extrêmement courts (de l'ordre de 10^{-15} s), ainsi le déplacement des noyaux lors de la transition énergétique est négligeable d'après le principe de Franck-Condon. Généralement, la molécule est excitée à des niveaux vibrationnels plus élevés mais elle se relaxe rapidement de manière non radiative (lignes ondulées orange) jusqu'au niveau vibrationnel S_1 le plus bas. Il s'agit de la conversion interne qui se produit dans les 10^{-12} s de manière isoénergétique entre niveaux de même multiplicité de spin. A ce niveau, une molécule peut se désexciter soit de manière radiative (lignes droites rouges) vers l'état S_0 ce qui correspond à une émission de fluorescence soit de manière non radiative (lignes ondulées orange) vers l'état S_0 ou par croisement intersystème (lignes ondulées violettes) vers l'état triplet excité T_1 avec une conversion en spin. Comme la probabilité de cette transition $T_1 \rightarrow S_0$ est faible, elle est dite « interdite » en mécanique quantique par les règles de sélection. Le fluorophore peut rester dans l'état T_1 jusqu'à >1000 fois plus longtemps que sa durée de vie habituelle dans l'état S_1 . Ainsi, la transition $T_1 \rightarrow S_0$ se produit sur des temps de 10^{-6} -1 s et se définit comme le phénomène de phosphorescence (ligne droite verte).

Un fluorophore peut être excité non seulement en absorbant un photon mais aussi par absorption simultanée de deux photons ou plus, dont la somme énergétique correspond à l'énergie de la transition $S_0 \rightarrow S_1$. Ce phénomène est appelé excitation multiphotonique. En bio-imagerie, l'excitation biphotonique est très répandue car le laser a suffisamment de puissance pour générer ce processus tout en assurant une absence de bruit de fond. De plus, les lasers proche infrarouge (NIR) utilisés pour l'excitation à deux photons correspondent parfaitement à ce que l'on appelle la fenêtre optique du tissu vivant (région de 650 nm à 1350 nm), où la lumière a sa profondeur maximale de pénétration dans les tissus(2).

II. Caractéristiques de la fluorescence

A. Spectres d'absorption, d'émission et d'excitation

Le spectre d'émission est le paramètre de fluorescence le plus couramment mesuré. Fondamentalement, il s'agit de l'intensité de la lumière émise enregistrée en fonction de la longueur d'onde à une excitation fixe. Ce spectre permet de déduire les principaux comportements du système étudié, en relation avec le déplacement du maximum d'émission et/ou la variation de l'intensité d'émission. En revanche, le spectre d'excitation est obtenu en fixant la longueur d'onde d'émission et en enregistrant la variation d'intensité de fluorescence lorsque la longueur d'onde d'excitation est modifiée. Typiquement, le spectre d'excitation couvre une large gamme de longueurs d'onde qui correspond généralement au spectre d'absorption des fluorophores, à moins que certaines espèces ne soient présentes dans l'état fondamental sous différentes formes (agrégats, complexes, formes tautomères, etc.). Dans ce cas, les spectres d'excitation et d'absorption ne sont plus superposables.

La capacité d'une molécule à absorber la lumière à certaines longueurs d'onde dépend de :

$$\text{Brillance} = N \cdot \epsilon \cdot QY,$$

Cette relation illustre le fait que la lumière émergente de la solution est régulée par trois paramètres qui sont le nombre de molécule (N), le rendement quantique (QY) et la probabilité des photons d'être absorbés par l'échantillon à une longueur d'onde donnée (coefficient d'absorption molaire ϵ de la molécule).

En raison de la nature discrète des états électroniques, les spectres d'émission et d'excitation suivent généralement plusieurs règles :

Le déplacement de Stokes : Le déplacement de Stokes est l'écart entre les maxima des spectres d'absorption et d'émission (exprimé en nombre d'onde). Ce phénomène existe en raison de la relaxation ultra-rapide sur le plus bas niveau vibrationnel S_1 tandis que la transition radiative peut avoir lieu vers les niveaux vibrationnels plus élevés de S_0 entraînant alors une perte d'énergie supplémentaire. L'énergie d'émission est typiquement inférieure à celle de l'excitation. En plus de ces effets, les fluorophores peuvent afficher des déplacements de Stokes plus importants en raison des effets de solvant ou de la formation de complexes. En particulier, la polarité du solvant peut affecter fortement la fluorescence d'un fluorophore possédant une forte variation du moment dipolaire lors de l'excitation électronique. Cet effet de solvant devient plus fort avec l'augmentation de la polarité du solvant, conduisant à un déplacement de l'émission vers des énergies plus basses. Ce déplacement est appelé solvatochromisme positif.

Règle de Kasha-Vavilov : Les spectres d'émission sont généralement indépendants de la longueur d'onde d'excitation car l'excès d'énergie des niveaux électroniques et vibrationnels des molécules, après absorption d'un photon, se dissipe rapidement laissant un fluorophore au niveau vibrationnel le plus bas S_1 .

Règle de l'image miroir : Pour la plupart des fluorophores, le spectre d'absorption est une image miroir du spectre d'émission. Selon le principe de Franck-Condon, lors d'une transition énergétique, les noyaux ne se déplacent pas et, par conséquent, les niveaux vibrationnels du niveau S_1 sont semblables à ceux du niveau S_0 si aucune grande réorganisation nucléaire se produit.

B. Temps de vie de fluorescence

Le temps pour lequel le fluorophore reste dans son état excité ne peut être déterminé avec précision en raison des limitations quantiques (relation d'incertitude d'Heisenberg), néanmoins la valeur moyenne pour une population de molécules peut être déterminée. Le temps moyen passé par une population dans l'état excité singulet est appelé le temps de vie de fluorescence. Ce dernier dépend des taux de désintégration radiative et non radiative de la molécule à l'état excité. Par exemple,

l'encapsulation d'un fluorophore dans une matrice rigide (comme un polymère) augmente cette durée de vie par comparaison avec le même fluorophore en solution. Généralement, la diminution du taux de décroissance non radiatif augmente la durée de vie de la fluorescence, ce qui conduit à une fluorescence plus efficace du fluorophore.

Les processus d'absorption et d'émission sont étudiés à partir d'une population de molécules. En général, le comportement d'une population de fluorophores excités est décrit par une équation de la constante de vitesse :

$$\frac{dn^*(t)}{dt} = -kn^*(t) + f(t),$$

Où n^* est le nombre d'éléments excités à l'instant t , $f(t)$ est une fonction arbitraire du temps décrivant l'excitation et le nombre de photons incidents et k est la somme des constantes de vitesses de toutes les voies possibles de relaxation comprenant fluorescence, conversion interne, relaxation vibrationnelle, croisement intersystème, transfert d'énergie bimoléculaire et d'autres voies non-radiatives. Les réactions de transfert d'énergie qui font intervenir un autre partenaire ne peuvent être simplement décrit par un processus unimoléculaire, d'où le fait que la constante de vitesse soit exprimée en $s^{-1} \cdot mol^{-1} \cdot L$ (transitions par molécule par unité de temps) comme c'est le cas des processus de relaxation par fluorescence, CIS ou CI.

Si l'excitation est éteinte à $t=0$, l'équation décrit la diminution des molécules excitées à tous les autres moments :

$$\frac{dn^*(t)}{dt} = -kn^*(t),$$

Après intégration :

$$n^*(t) = n^*(0)\exp(-kt),$$

Le temps de vie τ est de l'ordre de k^{-1} .

C. Rendement quantique

Le rendement quantique (QY) du système est le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés. Le QY est proportionnel à l'intensité de fluorescence en temps réel. C'est l'une des principales caractéristiques de la fluorescence du système et elle diminue avec l'augmentation de la relaxation non radiative. Elle se situe dans une gamme de valeur comprise entre 0 et 1.

$$QY = \frac{k_f}{k_f + k_{nr}}$$

où k_f est la constante de vitesse d'émission de fluorescence, k_{nr} est la somme des constantes de vitesse de toutes les transitions non radiatives.

Pour déterminer le rendement quantique, on fait une étude comparative qui s'appuie sur l'utilisation d'une gamme d'échantillons standards dont la valeur de QY est connue. Pour cela, les spectres d'absorption et d'émission de l'échantillon et de la référence sont mesurés avec la même longueur d'onde d'excitation, le même gain et la même largeur de fente. Le QY est alors calculé en utilisant l'équation suivante :

$$QY = QY_{ref} \frac{\eta^2}{\eta_{ref}^2} \frac{I}{I_{ref}} \frac{A_{ref}}{A}$$

où QY_{ref} correspond au rendement quantique de la molécule de référence, η est l'indice de réfraction du solvant, I est l'intensité de fluorescence intégrée et A est l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation. L'absorbance est maintenue inférieure ou égale à 0,02-0,05 afin d'être optimale. En effet, on évite les effets de filtre interne et on assure une réponse linéaire de l'intensité. Le rendement quantique de fluorescence est généralement inférieur à 1.

D. Anisotropie de fluorescence

L'anisotropie de fluorescence est un phénomène de dépolarisation de la lumière émise. Sa mesure repose sur le principe de l'excitation photo-sélective des fluorophores par la polarisation. Quand un échantillon est irradié par la lumière polarisée, il est préférentiellement absorbé par les fluorophores dont les moments de transition sont alignés parallèlement aux vecteurs électriques des photons excitateurs. Cette transition a une orientation définie par rapport à l'axe moléculaire (figure 1.2.).

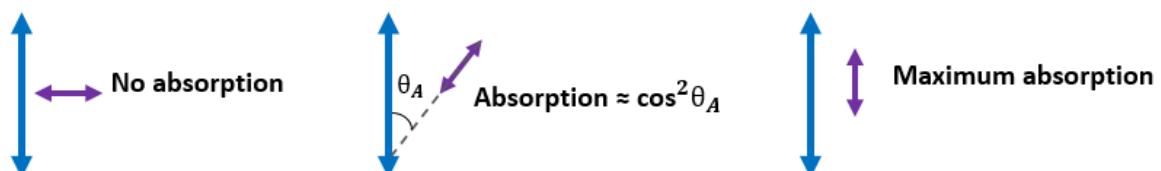


Figure 1.2. Principe de l'excitation photo-sélective. θ_A est l'angle entre le vecteur électrique de la lumière incidente I (flèches bleues) et le moment de transition d'absorption de la molécule (flèches violettes).

En solution isotrope, les fluorophores sont orientés de manière aléatoire, toute molécule dont les moments dipolaires de transition sont orientés parallèlement au vecteur de champ électrique E sera excitée préférentiellement(3). Dans ce cas, seule une fraction des fluorophores sera excitée. Si un fluorophore ne change pas d'orientation pendant la durée de vie de l'état excité, la lumière émise est anisotrope, caractérisée par une anisotropie dite fondamentale. Si l'orientation du fluorophore change, cela conduit à une modification de sa polarisation d'émission, ce qui diminue la valeur d'anisotropie de fluorescence(4) (figure 1.3.).

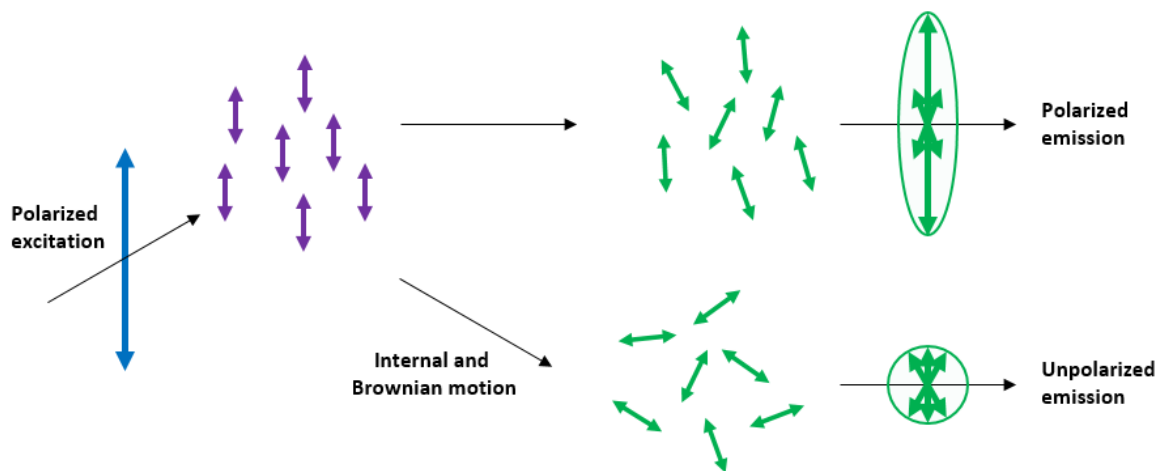


Figure 1.3. Polarisation de fluorescence et anisotropie. L'excitation polarisée est utilisée pour sélectionner les fluorophores alignés sur les dipôles.

Pour mesurer l'anisotropie, l'échantillon est excité avec une lumière polarisée verticalement et l'intensité d'émission est mesurée à travers un polariseur. Lorsque le polariseur d'émission est parallèle à l'excitation polarisée, l'intensité est appelée $I_{||}$, et lorsque le polariseur est perpendiculaire (\perp) à l'excitation, l'intensité d'émission est appelée I_{\perp} . L'anisotropie de fluorescence (r) et la polarisation (P) sont définies comme :

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}}$$

$$P = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}}$$

Les valeurs typiques d'anisotropie de fluorescence(5) pour un fluorophore en rotation libre (dans un solvant non visqueux) sont d'un ordre de grandeur d'environ 10^{-2} alors que dans des matrices de polymères (types NPs) ou dans des solvants visqueux, ces

valeurs augmentent jusqu'à 10^{-1} . Néanmoins, l'anisotropie mesurée peut être inférieure à ces valeurs théoriques à cause de plusieurs phénomènes. L'un d'entre eux est la diffusion par rotation, qui se produit pendant la durée de vie de l'état excité et fait tourner l'angle du dipôle d'émission du fluorophore. La mesure de ce paramètre fournit des informations sur le déplacement angulaire relatif des fluorophores entre les temps d'émission et d'absorption. En solution liquide, la plupart des fluorophores tournent entre 50 et 100 ps. Ainsi, pendant la durée de vie de l'état excité, les molécules peuvent tourner plusieurs fois, l'orientation de l'émission polarisée est quelconque. Pour cette raison, les fluorophores en solution ont des anisotropies proches de zéro. Le transfert d'excitation entre les fluorophores entraîne également une diminution d'anisotropie. Les mesures d'anisotropie du fluorophore dans les nanoparticules peuvent également nous renseigner sur l'environnement autour du fluorophore.

E. Transfert d'énergie de résonance de Förster (FRET)

Le FRET est devenu un outil populaire dans les études biologiques et chimiques. Förster l'a décrit et modélisé au cours des années 1940. Il s'agit d'un processus photo-physique par lequel l'énergie est transférée de manière non radiative d'un fluorophore dans son état électronique excité vers un autre fluorophore par des interactions dipôle-dipôle à longue portée. La technique FRET est considéré comme une règle moléculaire. Pratiquement, lorsque le transfert d'énergie se produit, l'intensité d'émission du donneur diminue tandis que celle de l'accepteur augmente.

1. Distinction dans le processus de transfert d'énergie

Le processus de transfert d'énergie d'excitation (EET) se produit à chaque fois que le spectre d'émission d'un fluorophore donneur (D) chevauche le spectre d'absorption d'un fluorophore accepteur (A). Une distinction doit être faite entre l'hétérotransfert, l'homotransfert, le transfert radiatif et le transfert non radiatif(4).

Le transfert d'énergie d'une molécule excitée D^* à une autre molécule qui est chimiquement différente A ($D^* + A \rightarrow D + A^*$) est appelé hétérotransfert. Si le donneur et l'accepteur sont de même nature, il s'agit d'un homotransfert ($D^* + D \rightarrow D + D^*$). Lorsque l'excitation peut se répéter et migrer sur plusieurs molécules, il s'agit d'un transport d'excitation ou migration d'énergie. De plus, le donneur et l'accepteur doivent être situés à des distances de séparation d'environ 1 à 10 nm l'un de l'autre.

Le transfert radiatif est un processus en deux étapes. Un photon est émis par une molécule D puis absorbé par une molécule A (ou D) ($D^* \rightarrow D + h\nu$ puis $h\nu + A \rightarrow A^*$ ou $h\nu + D \rightarrow D^*$). Ce transfert ne nécessite pas d'interactions entre les molécules mais dépend de leur concentration et du chevauchement spectral entre spectre d'absorption de A et spectre d'émission de D.

Le transfert non radiatif se produit sans émission de photons bien que ce transfert s'effectue par l'intermédiaire de photons. Ce sont des photons dits virtuels. Ce transfert se produit à des distances inférieures à une longueur d'onde, sans émission de photons, et résulte d'interactions à court ou à long portée entre molécules.

2. Aspects mathématiques du FRET

La constante de vitesse du transfert du FRET se calcule selon l'expression suivante :

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r}\right)^6$$

Où r est la distance entre D et A, τ_D est la durée de vie du donneur en l'absence de transfert d'énergie et R_0 est la distance critique ou le rayon de Förster qui est la distance à laquelle on a équiprobabilité de désactivation de l'état excité selon les processus de relaxation unimoléculaire et par FRET.

R_0 , qui est généralement inférieure à 10 nm, peut être déterminée à partir de données spectroscopiques :

$$R_0^6 = \frac{9(\ln 10)k^2\Phi_D^0}{128\pi^5 N_A n^4} J$$

où k^2 est le facteur d'orientation, Φ_D^0 est le rendement quantique de fluorescence du donneur en l'absence de transfert, n est l'indice de réfraction du milieu et J est le chevauchement spectral entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur qui peut être approximé soit en nombre d'onde soit en longueur d'onde :

$$J = \int F_\lambda(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4 d\lambda$$

où F_λ est le spectre d'émission normalisé du donneur excité et ε est le coefficient d'absorption de l'accepteur.

3. Efficacité du FRET

L'efficacité du FRET est définie comme la fraction de molécules excitées qui subissent un transfert d'énergie du donneur vers l'accepteur et peut être exprimée en termes de constantes de vitesse en fonction des processus impliqués :

$$E_{FRET} = \frac{k_{FRET}}{k_{FRET} + k_{donneur}}$$

où E_{FRET} est l'efficacité du FRET, k_{FRET} la constante de vitesse du transfert d'énergie et $k_{donneur}$ est la constante de vitesse de décroissance radiatif et non radiatif du donneur sans FRET. L'efficacité peut également être exprimée en fonction du rapport $\frac{r}{R_0}$.

$$E_{FRET} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}$$

L'efficacité de FRET peut être mesurée expérimentalement de plusieurs façons. Les plus populaires sont les suivantes :

Mesures basées sur l'émission de D :

$$E_{FRET} = 1 - \frac{I_D^A}{I_D}$$

où I_D et I_D^A sont les intensités d'émission en l'absence et en présence de A, respectivement. Le désavantage de cette méthode est que la concentration de D est rarement exactement la même à travers différents échantillons. La différence de concentration entre l'échantillon en présence de A et l'échantillon avec D seul peut être corrigée :

$$E_{FRET} = 1 - \frac{A_D I_D^A}{A_D^A I_D}$$

Où A_D et A_D^A sont les absorbances de D à la longueur d'onde d'excitation dans les échantillons où D est seul et en présence de A, respectivement.

Mesures basées sur la durée de vie D :

On écrit :

$$E_{FRET} = 1 - \frac{\tau_D^A}{\tau_D}$$

où τ_D et τ_D^A sont les déclin de fluorescence (ou durée de vie de fluorescence) en absence et en présence de A, respectivement. La durée de vie étant indépendante de la concentration, cette méthode est moins sujette aux erreurs dues aux différences entre les échantillons. Néanmoins lorsque le donneur a plus d'une durée de vie, il n'existe aucune expression simple et universelle pour calculer l'efficacité du FRET.

Mesures basées sur l'émission de A :

Si A est une molécule fluorescente, l'efficacité de FRET peut être déterminée par quantification de l'intensité de fluorescence de A, selon :

$$E_{FRET} = \frac{I_A^D}{A_D^D} - \frac{I_A^A}{A_D^A}$$

où I_A^D est l'intensité de fluorescence de A après excitation de D, I_A^A est l'intensité de fluorescence de A après excitation de A et A_D^A et A_D^D sont les absorbances de A et de D, respectivement, à la longueur d'onde d'excitation de D.

Mesures basées sur le rapport d'intensité D/A (FRET ratiométrique) :

Si A est une molécule fluorescente, le FRET peut être caractérisé en utilisant le rapport entre les intensités d'émission de D et de A. Le rapport entre les intensités de D et de A dépend non seulement de la valeur de E_{FRET} mais aussi des QY des deux fluorophores. Le FRET ratiométrique est habituellement une méthode relative et ne devrait être utilisé qu'à des fins qualitatives ou pour suivre les changements relatifs dans l'efficacité du FRET.

$$E_{FRET}^{rel} = \frac{I_A}{I_D + I_A}$$

où I_A et I_D sont les intensités de fluorescence de A et de D respectivement après excitation de D. Si les spectres de D et de A se chevauchent, le spectre mixte D + A doit être décomposé en spectres de D et de A isolés.

III. Sondes fluorescentes

Les sondes fluorescentes sont des outils très importants en biologie ainsi qu'en bio-imagerie. Le choix de la sonde appropriée dépend de l'application que l'on souhaite en faire. Il existe différents types de sondes fluorescentes que l'on peut distinguer en trois grandes catégories :

A. *Les fluorophores naturels*

Il s'agit de fluorophores contenant des doubles liaisons conjuguées et/ou groupements aromatiques et présentant une absorption et une émission dans la région des UV dues à la présence d'acides aminés aromatiques. Ils sont utilisés pour suivre une protéine d'intérêt à l'intérieur des cellules vivantes.

B. *Les fluorophores synthétiques*

Il s'agit de fluorophores contenant plusieurs cycles aromatiques combinés avec ou non des doubles liaisons conjuguées. Ils sont caractérisés par de fortes bandes d'absorption et d'émission dans la gamme visible s'étendant jusqu'au proche IR en raison de la présence d'électrons π délocalisés. Leur taille est généralement inférieure à 1 nm et permet leur incorporation dans des structures biologiques telles que l'ADN ou encore dans les membranes sans perturbations environnementales(6). Les fluorophores synthétiques offrent un nombre incalculable de possibilités pour des applications biologiques et en bio-imagerie grâce à la possibilité d'obtenir différentes types de structures et à la diversité de leurs propriétés spectroscopiques(7,8) (figure 1.4.).

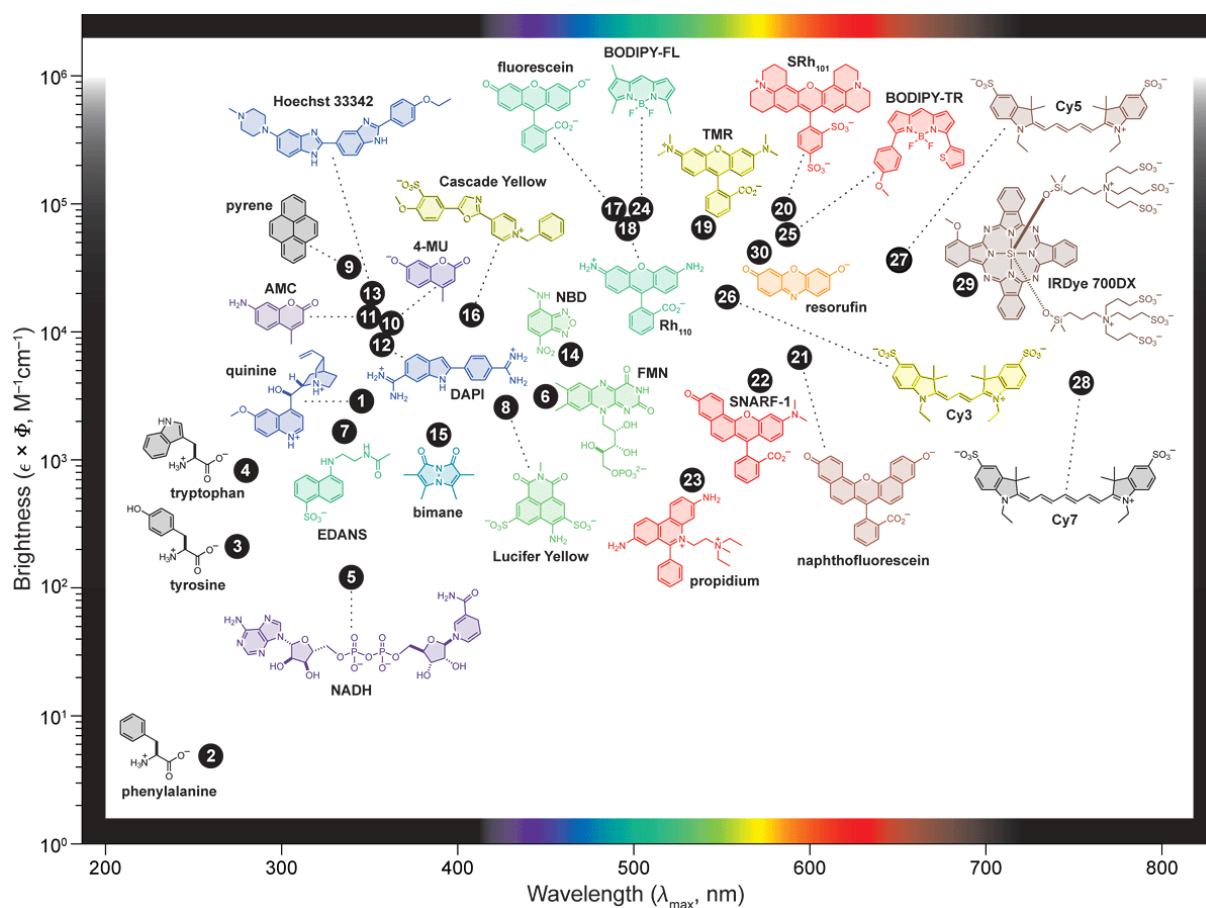


Figure 1.4. Intensité de luminescence du fluorophore en fonction de la longueur d'onde de l'absorption maximale (λ_{\max}) pour différentes classes de fluorophores. Les couleurs de la structure représentée illustrent leurs longueurs d'onde d'émission (λ_{em}). Adapté de la référence 8.

Les fluorophores peuvent être classés en deux catégories : non-réactifs (sondes) et réactifs (marqueurs). Pour l'activité de marquage, les colorants doivent présenter une luminosité et un contraste optimaux ainsi qu'une protection optimale contre divers effets de blanchiment ou de perturbations par le milieu(9). Il existe plusieurs types de colorants correspondant à ces critères tels que les dérivés de la fluorescéine et de la rhodamine(10), les colorants BODIPY(11) et les cyanines(12). Ces colorants possèdent un squelette rigide et présentent des pertes d'énergie minimales liées aux vibrations. Leur densité électronique est délocalisée sur l'ensemble de la structure ce qui permet d'obtenir un fort QY et une faible sensibilité spectrale à l'environnement. Comme exemple, nous pouvons présenter les cyanines qui ont été utilisées dans l'une de nos études.

Les cyanines sont composés d'une chaîne polyméthine (avec un nombre impair de doubles liaisons) insérée entre deux groupements amino/imino, ce qui peut être illustré par la représentation ($R_2N-(CH=CH)_n - CH=N^+R_2$) où n définit la longueur de

conjugaison électronique. Cette famille de fluorophores est largement utilisée dans l'imagerie et en spectroscopie pour des applications biologiques. En faisant varier la longueur de la chaîne polyméthine, l'absorption peut être ajustée de la région du visible jusqu'au proche infrarouge. Cette famille de fluorophores est caractérisée par des coefficients d'absorption élevés (entre 1.2 et $2.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) et des rendements quantiques moyens à élevés entre 0.04 et 0.4 ainsi qu'une bonne photostabilité avec une durée de vie allant de 0.2 à 2.0 ns.

Alternativement pour l'activité "sondes", avant ou après la reconnaissance, les fluorophores doivent atteindre la plage de réponse la plus élevée en termes de variations de durée de vie, d'intensité ou de longueur d'onde d'émission. Pour ce faire, certains mécanismes photophysiques doivent être exploités comme l'ESIPT (transfert de protons intramoléculaire à l'état excité)(13), l'ICT (transfert de charge intramoléculaire) ou encore le FRET (transfert d'énergie résonnante de Förster)(14). Dans notre laboratoire, des sondes ont été développées pour détecter l'interaction biomoléculaire et contrôler les propriétés biophysiques des biomembranes(15). D'autres types de sondes moléculaires ont été développés par d'autres laboratoires afin de détecter le pH, la température, l'oxygène et les ions métalliques dans les systèmes vivants(16).

C. Les nanoparticules fluorescentes

La nanotechnologie est apparue comme un nouveau domaine impliquant la manipulation de la matière à l'échelle nanométrique, ce qui aboutit à une nouvelle classe de matériaux avec des propriétés innovantes pour un large éventail d'applications. Les nanoparticules sont une partie de ces nouveaux matériaux, avec une taille comprise entre 1 et 100 nm. Les nanoparticules ont été utilisées dans diverses applications telles que les biocapteurs, la délivrance de médicaments, l'imagerie moléculaire et la combinaison de ces deux derniers domaines (théranostique).

Ces matériaux démontrent des structures électroniques et des propriétés optiques uniques ainsi que des caractéristiques chimiques et physiques inhabituelles. A titre d'exemple, on peut citer les quantum dots, les clusters, les nanoparticules à conversion ascendante de photons, les carbon dots, les nanoparticules utilisant des fluorophores organiques encapsulés à l'intérieur d'une matrice de polymère, les nanoparticules de

silice dopées avec des fluorophores ou encore les nanoparticules lipidiques. Ces systèmes seront décrits avec plus de précision dans la suite de ce manuscrit.

D. Conditions requises pour propriétés des sondes fluorescentes

Pour les domaines de la bio-détection et de la bio-imagerie, les fluorophores naturels et synthétiques ne sont pas assez efficaces car faiblement fluorescents. Ainsi, les sondes fluorescentes doivent répondre à certains critères afin de répondre aux besoins de la bio-imagerie(17,18).

Rendement quantique élevé : Un haut rendement quantique permettra d'une part d'augmenter l'intensité de fluorescence mais limitera également les phénomènes photochimiques alternatifs tels que le photo-blanchissement ou encore la formation de radicaux libres.

Coefficient d'absorption molaire élevé : Un ϵ élevé d'un fluorophore conduit à une brillance élevée. Par conséquent, une faible intensité d'excitation pourra être utilisée ce qui est idéal pour l'imagerie des tissus vivants ou en imagerie avec une très faible quantité de fluorophores(19).

Longueur d'onde d'excitation optimale : Pour éviter l'auto-fluorescence cellulaire, les longueurs d'onde d'excitation de laser doivent être supérieures à 400-460 nm. Pour une pénétration plus profonde du laser dans les tissus cellulaires, les sources d'excitation NIR autour de 700-1300 nm sont optimales(20).

Longueur d'onde d'émission optimale et grand déplacement de Stokes : De même que pour la longueur d'onde d'excitation, la longueur d'onde d'émission optimale pour les applications biologiques doit être dans la région NIR. Une plus grande séparation entre les bandes d'absorption et d'émission réduit les effets de diffusion de la lumière et de réabsorption.

Durée de vie de fluorescence optimale: Bien que les durées de vie longues soient plus faciles à détecter et à analyser, les durées de vie supérieures à 10^{-7} s sont désactivées par le dioxygène(21) et rendent toute mesure compliquée. Ainsi, une durée de vie courte est préférable pour obtenir une réponse optimale pendant le cycle d'excitation-émission. Pour les mesures d'anisotropie, la durée de vie doit correspondre à l'échelle de temps des mouvements rotationnels.(1)

Photostabilité élevée : Les fluorophores ne peuvent subir qu'un nombre limité de cycles entre l'état fondamental et les états excités. Ceci est lié à la réactivité élevée de l'état excité des molécules. L'interaction entre l'état excité triplet d'une molécule avec une molécule de dioxygène est l'une des voies de photo-blanchissement des fluorophores. À cet égard, dans de nombreuses expériences à l'échelle de la molécule unique, on utilise des systèmes de désoxygénation pour améliorer la stabilité du fluorophore(22), voire des composés photo-stabilisants tels que l'acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique (Trolox), le cyclooctatétraène (COT) ou l'alcool 4-nitrobenzylique (NBA)(23).

Solubilité dans les milieux biologiques et stabilité environnementale : Les sondes doivent être insensibles à des facteurs tels que le pH ou la température afin de permettre des mesures *in vivo*.

E. Nanoparticules inorganiques

Les nanoparticules basées sur l'utilisation de matériaux fluorescents inorganiques ont plusieurs caractéristiques communes. Premièrement, ce sont des matériaux non biodégradables bien que biocompatibles, très lumineux, plus photostables que les fluorophores organiques simples et leurs propriétés optiques étant contrôlées par la taille et la morphologie du matériau et sont différentes de celles des fluorophores organiques. Dans cette partie, nous présenterons différents types de nanoparticules inorganiques, leurs applications ainsi que les méthodes de synthèse et de caractérisation.

1. Quantum Dots

Les « quantum dots » (QDs) sont des nanocristaux constitués de matériaux semi-conducteurs du groupe II-VI (CdSe, CdS, CdTe,...), du groupe III-V (InP) ou encore du groupe IV-VI (ZnS, PbS), dont le diamètre est compris entre 2 et 10 nm(24), recouverts d'une coquille pour modifier leurs propriétés physicochimiques et favoriser leur solubilité (figure 1.5.). Ils possèdent des propriétés électroniques intermédiaires entre celles des molécules et des semi-conducteurs massifs. Ils possèdent des propriétés de luminescence uniques telles qu'une photostabilité, un rendement quantique (0.3-1) et un coefficient d'absorption élevés ($100\ 000-1\ 000\ 000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). La taille des QDs est inférieure au rayon de l'exciton (différence entre l'électron dans la bande de conduction et le trou qu'il laisse dans la bande de valence) laissant ainsi apparaître

des niveaux d'énergie discrets (comme dans les atomes). L'absorption de la lumière par les QDs entraîne la transition d'un électron de la bande de valence vers la bande de conduction générant alors une paire électron-trou. La recombinaison de ces paires entraîne une libération d'énergie sous forme de lumière émise. L'augmentation de la taille des QDs conduit à une diminution de la différence d'énergie entre la bande de valence et la bande de conduction, ce qui libère moins d'énergie après le retour du nanocrystal dans son état fondamental, entraînant une dépendance entre la couleur de la lumière émise et la taille du QD(25). Ainsi, les bandes d'émission de photoluminescence des QDs peut facilement être ajustée en allant des régions UV jusqu'aux régions IR en faisant uniquement varier la taille ou la composition des QDs(26). Leur émission est généralement assez étroite et symétrique, ils sont donc excitables à plusieurs longueurs d'onde.

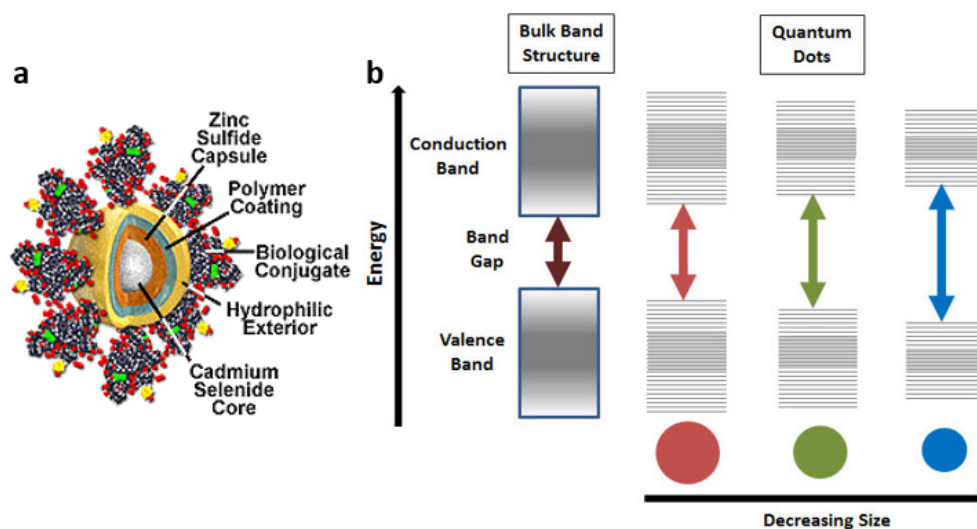


Figure 1.5. Représentation schématique des QDs et de leurs niveaux d'énergie. a) Structure schématique des QD. Image adaptée de www.olympusmicro.com. b) Séparation des niveaux d'énergie dans les QD en raison de l'effet de confinement quantique : la bande interdite des semi-conducteurs augmente avec la diminution de la taille du nanocrystal. Image adaptée de www.sigmaaldrich.com.

Les caractéristiques particulières des QDs les rendent intéressants pour le domaine biomédical comme l'imagerie, le diagnostic et les applications thérapeutiques(27). Néanmoins, étant composés de matériaux généralement toxiques, leurs applications *in vivo* restent compromises(28).

2. Carbon dots

Les « carbon dots », ou C-dots, sont des groupes d'atomes de carbones, formant des nanoclusters, de taille inférieure à 10 nm contenant des atomes d'oxygène et d'azote. Ces matériaux sont préparés soit par combustion(29) ou par chauffage aux micro-ondes(30) (figure 1.6.). Une procédure de synthèse en une étape permet de placer les groupes amino sur la surface des NPs permettant une fonctionnalisation ultérieure de ces groupements réactifs(31). La couleur de leur émission peut être modulée par la variation de certains paramètres durant la synthèse, néanmoins, leurs spectres d'excitation et d'émission sont extrêmement larges et ne permettent pas leurs applications pour l'imagerie multiplexe(32). Les C-dots sont biocompatibles, possèdent une durée de vie de l'ordre de la nanoseconde, une bonne photostabilité ainsi qu'une section efficace d'absorption à deux photons. Ils ont une gamme spectrale pouvant s'étendre de 400 à 700 nm. Malgré des rendements quantiques moyens (0.05-0.3), ces matériaux restent intéressants pour diverses applications pour la bio-détection, la délivrance de médicaments et la bio-imagerie en raison d leurs excellentes propriétés optiques, de leur biocompatibilité élevée et de leur faible toxicité (33).

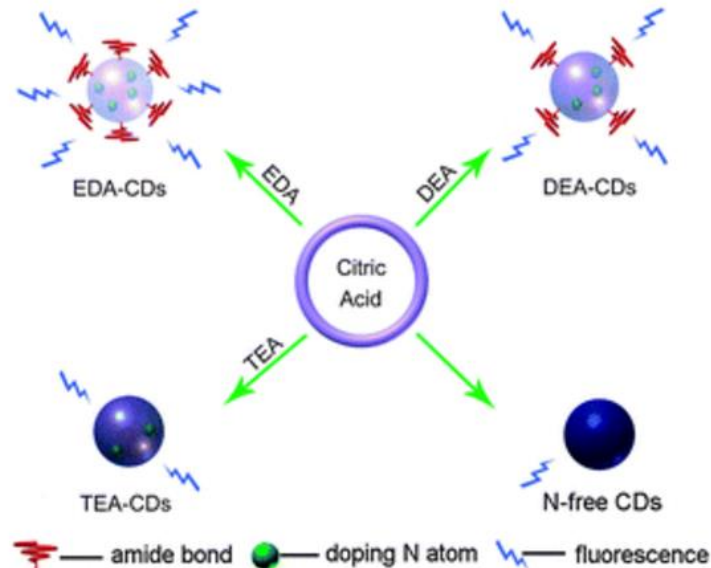


Figure 1.6. Représentation schématique de la synthèse de C-points par la pyrolyse micro-ondes en présence de diverses amines. Adapté de la référence 30.

3. Nanoparticules à conversion ascendante de photons

Les nanoparticules à conversion ascendante de photons (UCNPs) ont émergé comme une nouvelle classe de nanomatériaux se composant d'une matrice hôte telle que le NaY_4 ou le CaF_2 dopée avec un ion de la famille des terres rares comme le Yb^{3+} , le

Tm³⁺ ou encore le Ho³⁺ dans lequel des transitions électroniques se produisent. Ils ont une taille inférieure à 100 nm. Les UCNP sont dopés d'ions lanthanides qui leurs procurent des propriétés uniques puisqu'ils absorbent la lumière NIR et émettent des photons à plus courtes longueurs d'onde (UV/visible)(34), ils sont photostables(35), ont des bandes d'émission discrètes, de longue durée de vie d'émission (μ s-ms), des formes et des tailles contrôlées et une absence de clignotement (figure 1.7.).

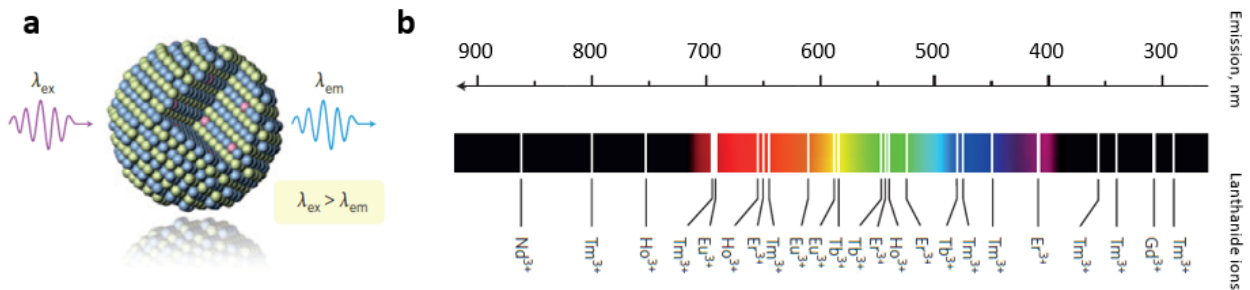


Figure 1.7. Illustration schématique de l'UCNP et de ses propriétés optiques. a) Illustration schématique de l'UCNP composé d'un "hôte" cristallin et d'ions dopants de lanthanides incorporés. b) Bandes d'émission à conversion ascendante typiques de Ln³⁺. Adapté de la référence 35

4. Les nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or (AuNPs) ont été au centre de nombreuses recherches au cours de la dernière décennie en raison de leurs propriétés optiques, électroniques et catalytiques(36). Les AuNPs ont un diamètre compris entre 1 et 100 nm, ont un grand rapport surface/volume et une énergie de surface élevée fournissant une plate-forme d'immobilisation stable pour une grande quantité de molécules(37). Lorsque les AuNPs sont excitées par un rayonnement électromagnétique, elles présentent des oscillations collectives de leurs électrons de conduction en surface conduisant à une forte augmentation du champ électromagnétique local. D'un point de vue optique, leurs propriétés plasmoniques (LSP) fournissent la base pour le développement de capteurs avec des nanoparticules d'or transformant des interactions spécifiques en un signal mesurable. Les modes LSP, excités par une onde électromagnétique, sont le résultat d'oscillations collectives des électrons de la bande de conduction à la surface des particules. L'excitation des LSP conduit à l'émergence de bandes d'extinction dans le visible et le proche infrarouge. Les modes LSP dépendent de la taille et de la forme des nanoparticules, de la nature chimique de l'or et de l'environnement local. Avec les progrès récents de la synthèse chimique et des techniques lithographiques, il a été possible de fabriquer une large gamme de formes et de tailles de particules avec des réponses optiques ajustables permettant d'accorder le LSPR sur l'ensemble du visible

et du proche infrarouge. Deux principaux types de préparation de particules peuvent être envisagés pour des applications plasmoniques: la lithographie par faisceau d'électrons et la synthèse chimique colloïdale en solution(38). La forme des AuNPs modifie leurs propriétés optiques, en effet, les AuNPs isotropes absorbent dans le domaine du visible tandis que les AuNPs anisotropes présentent deux bandes d'extinction, l'une autour de 520 nm le long de l'axe court (mode transverse) et une autre autour de 740 nm le long de l'axe principal (mode longitudinal) qui est très sensible à l'environnement local (figure 1.8.).

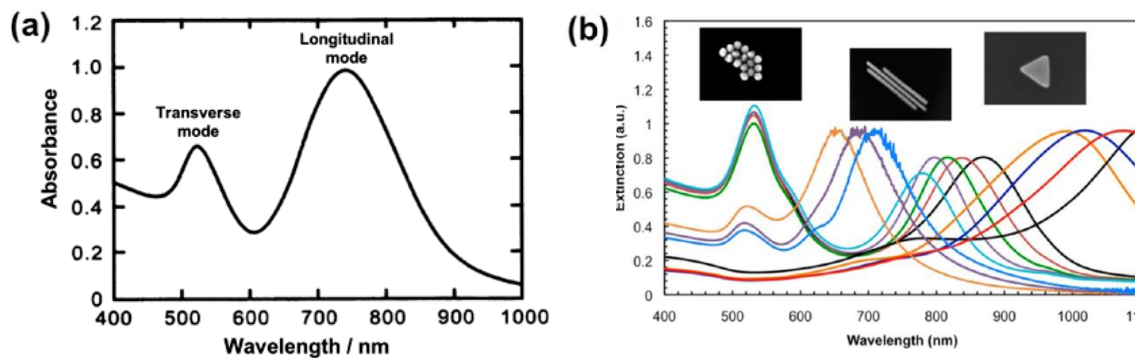


Figure 1.8. Spectres d'extinction typiques des nanoparticules d'or en bâtonnet (AuNRs) montrant les bandes attribuées aux modes transversal et longitudinal ; (b) Les spectres UV-vis-NIR des AuNP varient en fonction de la forme et de la taille des AuNPs. Copyright 2014 American Chemical Society.

La synthèse d'AuNR avec une taille, une forme et une stabilité colloïdale contrôlées dans l'eau est une tâche difficile. En effet, les AuNPs ont un grand rapport surface/volume et une énergie de surface élevée, de sorte qu'elles ont tendance à s'agréger afin de minimiser leur énergie de surface. Pour éviter l'agrégation des AuNR, en utilisant un surfactant comme le bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB)(39) qui protège les nanoparticules par une bicouche chargée positivement, les rendant solubles en solution aqueuse. Le CTAB favorise la croissance anisotrope des AuNPs (ainsi que la formation de micelle cylindrique) en étant adsorbé sélectivement sur certains côtés des AuNPs, ralentissant leur croissance(40). De plus, le nitrate d'argent également impliqué dans cette réaction forme une monocouche sur la face d'énergie supérieure(41).

La fonctionnalisation par des fractions organiques est impérative pour modifier la surface des nanoparticules afin d'assurer la stabilité et la protection contre l'agrégation, de modifier les propriétés optiques, électroniques, catalytiques du noyau d'or et d'ajouter des fonctionnalités pour des propriétés de reconnaissance spécifiques. Les AuNPs ont diverses applications notamment au niveau des traitements

anticancéreux(42). En effet, l'insertion des AuNPs dans les cellules cancéreuses associée à une irradiation IR (à résonance) provoque une augmentation de la température locale induisant ainsi une réponse d'apoptose de la part des cellules, il s'agit de la nanohyperthermie.

5. Nanoparticules de silice

Les nanoparticules de silice (SiNPs) peuvent servir de matrice pour l'encapsulation de fluorophores organiques, organométalliques ou métalliques(43) car elles protègent ces derniers de l'environnement et les gardent dans un espace confiné. Leur polyvalence synthétique permet la préparation de nanosystèmes multifonctionnels(44). Les propriétés spectrales de ces NPs dépendront du type et de la quantité de matériau encapsulé.

Plusieurs stratégies de préparation des SiNPs ont été développées et sont décrites dans la figure 1.9. La méthode de Stöber, proposée à la fin des années 60, repose sur l'hydrolyse de l'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS) dans un mélange éthanol/hydroxyde d'ammonium pour former de l'acide silicique. Lorsque sa concentration dépasse sa solubilité dans l'éthanol, il forme des liaisons covalentes avec le trialkoxysilanes pour former des nanoparticules de silice encapsulant les molécules fluorescentes d'intérêt. Néanmoins, les NPs formées par cette méthode sont inhomogène et donne une distribution de taille assez grande. Récemment, d'autres stratégies de synthèse des SiNPs ont été développées et sont basées sur la microémulsion inverse et les micelles directes comme matrices(43). La méthode de microémulsion inversée se base sur la formation d'un système eau dans huile où les nano-gouttelettes d'eau agissent comme de petits microréacteurs permettant l'hydrolyse du silane et la croissance des NPs(45). Les NPs formées ont une distribution de taille étroite et leur taille peut être ajustée en modifiant les proportions et les types de solvants ou de tensioactifs. Dans le procédé de micelle directe, un tensioactif ou un mélange de tensioactif s'agrège pour former des micelles qui servent de matrice pour la formation des SiNPs. Dans ce cas, le TEOS et les fluorophores sont encapsulés à l'intérieur des micelles et, après hydrolyse du TEOS, des particules homogènes en taille de 10-90 nm sont obtenues.

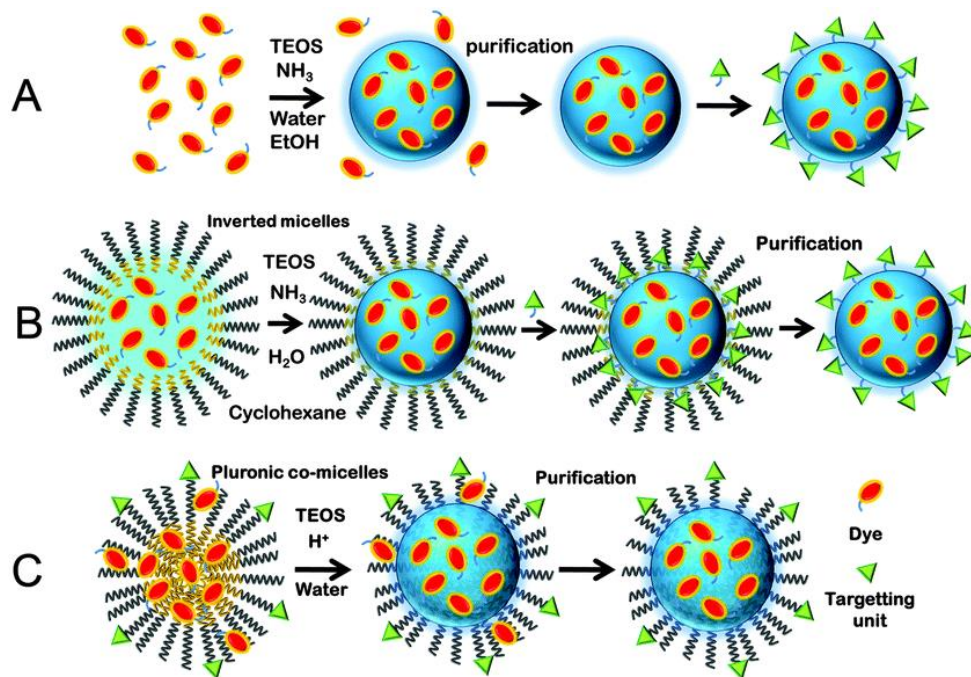


Figure 1.9. Représentation schématique de différentes stratégies de synthèse pour obtenir des nanoparticules de silice dopées au fluorophore : méthode de Stöber (A), méthode de microémulsion inverse (B) et méthode directe assistée par micelles (C). Adapté de la référence 44.

La longueur d'onde émission, la relaxation et les propriétés d'excitation sont principalement définies par les propriétés directes des fluorophores encapsulés dans la matrice de silice. Ce sont des particules biocompatibles avec une chimie de surface simple qui sont largement utilisées en imagerie et dans la détection(39,46).

F. Nanoparticules organiques

Contrairement aux nanoparticules inorganiques, les propriétés optiques des NPs organiques ne dépendent généralement pas de leur taille ou de leur morphologie mais plutôt de la nature même du fluorophore encapsulé dans la matrice (uniquement pour les NPs dopées en fluorophore). Cette matrice, généralement polymérique ou lipidique, protège les fluorophores de l'environnement tout en améliorant leurs propriétés de fluorescence par rapport au même fluorophore libre en solution. De plus, en utilisant des matrices biocompatibles et biodégradables, il est possible de développer des NPs organiques biodégradable parfaitement adaptées à des applications *in vivo*. Dans cette sous-partie, nous ferons une brève description de certains de ces systèmes

1. Dendrimères

Les dendrimères sont une famille de polymères hyperbranchés nanométriques tridimensionnels caractérisés par une taille inférieure à 2 nm et une architecture ramifiée symétrique avec une forte monodispersité. L'architecture dendritique est composée d'un noyau, des branches avec des groupements terminaux fonctionnalisables par des médicaments(47) ou par des sondes moléculaires(48). La synthèse des dendrimères peut être basée sur la chimie click (figure 1.10.). La solubilité, la réactivité chimique et la température de transition vitreuse des dendrimères sont contrôlées par la nature du groupe terminal(49) tandis que la brillance et la couleur sont contrôlées par la taille du dendrimère. Les dendrimères ont un rendement quantique relativement faible (0.5) lorsqu'ils sont utilisés comme agents de contraste malgré un grand coefficient d'absorption molaire ($700\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Les dendrimères sont utilisés pour l'imagerie, la détection, la thérapie photodynamique, la délivrance de médicaments(48) cependant ces NPs sont très coûteuses à fabriquer et sont nocives(50).

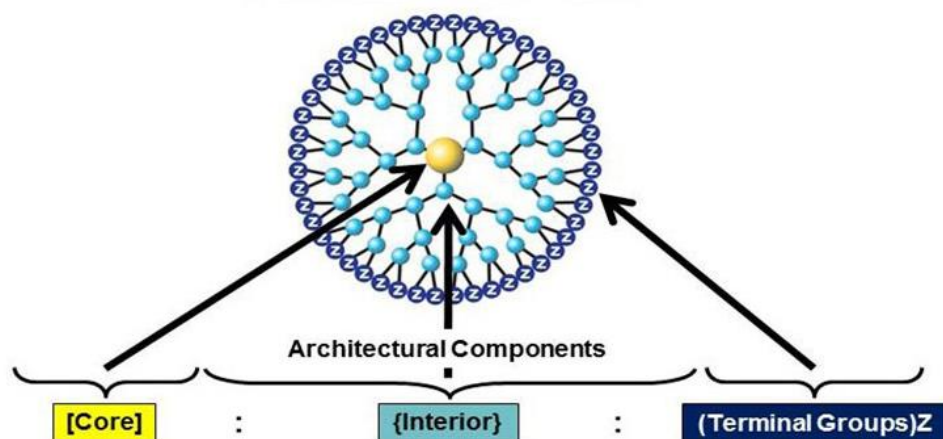


Figure 1.10. Représentation schématique des dendrimères. Adapté de la référence 49.

2. Micelles

Les micelles directes sont des assemblages supramoléculaires autoorganisés de molécules amphiphiles dans lesquels les parties hydrophiles sont en contact avec la solution environnante et la partie hydrophobe tournée vers le centre de la micelle (figure 1.11.). Leur taille est comprise entre 5 et 100 nm. Les micelles fluorescentes peuvent contenir des fluorophores amphiphiles ou lipidiques. Les micelles lipidiques sont préparées à partir d'un tensioactif hydrosoluble portant une chaîne hydrophobe

liée à une tête polaire (groupe chargé, PEG(51)). Les micelles polymériques sont fabriquées à partir de blocs hydrophobes et hydrophiles(52). En raison de leur faible CMC (concentration micellaire critique), les micelles polymériques présentent une meilleure stabilité vis-à-vis de la dilution par rapport aux micelles lipidiques permettant une meilleure conservation du fluorophore(53). La modification de la surface des micelles permet de faire d'elles de bons marqueurs contre les cellules cancéreuses(54).

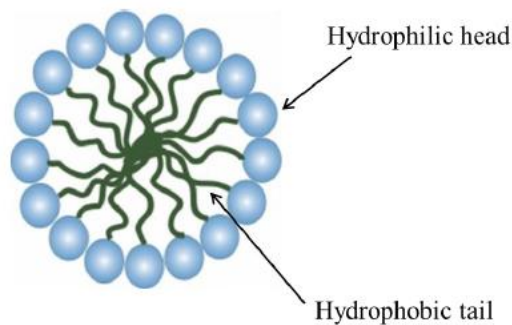


Figure 1.11. Représentation schématique des micelles

3. Nano-émulsions lipidiques

Les nano-émulsions lipidiques sont des émulsions dont la taille des gouttelettes est inférieure à 100 nm. Typiquement, il s'agit d'un mélange de deux phases non miscibles, huile et eau, avec un émulsifiant (tensioactif). L'émulsifiant diminue la tension interfaciale et aide à obtenir des gouttelettes de petite taille plus stables contre la sédimentation.

On distingue trois classes de nano-émulsions en fonction de la composition huile/eau :

- Huile dans eau, où les gouttelettes d'huile sont dispersées en phase aqueuse continue.
- Eau dans huile, où les gouttelettes d'eau sont dispersées en phase huileuse continue.
- Nano-émulsions multiples

Les nanoémulsions lipidiques sont considérées comme des candidats prometteurs pour l'administration de médicaments(55) et le ciblage des cellules cancéreuses(56) en raison de leur faible toxicité, de leur biodégradabilité et de leur capacité à encapsuler des médicaments ou des agents de contraste. Cependant, leurs

applications biomédicales sont actuellement limitées en raison de notre mauvaise connaissance de leur stabilité *in vivo*.

Pour résoudre ce problème, notre groupe(57) a développé des gouttelettes fluorescentes de nano-émulsion de 100 nm en se basant sur la technique du transfert d'énergie par résonance de Förster (FRET) pour étudier leur stabilité *in vivo* (figure 1.12.). Il a été démontré que l'encapsulation du donneur et de l'accepteur à l'intérieur de la gouttelette lipidique fournit un FRET efficace lorsque la gouttelette est intacte et une perte de FRET quand la gouttelette est désintégrée, ce qui est associé à la libération de ses composants dans le milieu biologique. Dans cette optique, deux types de cyanine NIR lipophiles ont été encapsulés dans une gouttelette lipidique de 100 nm, l'un jouant le rôle de donneur (Cy5.5/TPB) et l'autre jouant le rôle d'accepteur (Cy7.5/TPB). Les résultats ont montré une bonne stabilité de ce système, le rendant approprié pour des imageries NIR chez l'animal. En effet, chez la souris, les gouttelettes sont stables dans la circulation sanguine pendant 6 heures en s'accumulant rapidement dans la tumeur par effet de perméabilité et de rétention accrue (EPR).

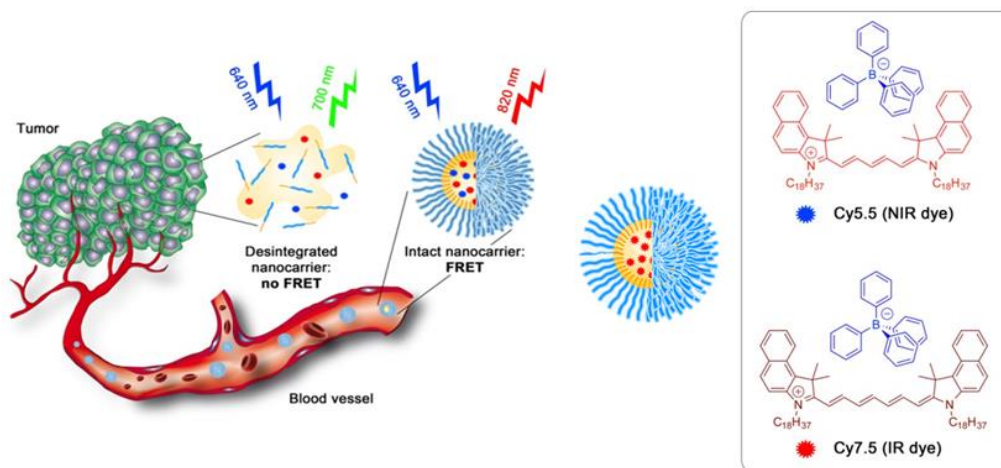


Figure 1.12. Concept des gouttelettes lipidiques FRET qui rendent compte de leur intégrité en modifiant leur couleur d'émission. Les structures chimiques des fluorophores cyanine 5.5 et 7.5 avec leur contre-ion hydrophobe volumineux sont présentés. Adapté de la référence 57.

4. Nanoparticules de polymères conjugués

Les NPs de polymères conjugués (CPN) sont des NPs fluorescentes fabriquées à partir de polymères conjugués dans lesquels les électrons π sont délocalisés sur une partie significative de la chaîne (figure 1.13.). Leur taille est comprise entre 5 et 30 nm, elles possèdent des larges spectres d'absorption avec des profils d'émission étroits et

un haut rendement quantique (0.5-0.6). Elles sont principalement préparées par mini-émulsions ou reprécipitation(58). La méthode de mini-émulsion consiste en l'addition de polymères dissous dans un solvant organique non miscible à l'eau à une solution aqueuse, contenant un tensioactif, suivie d'une ultrasonication et d'une évaporation du solvant. En ce qui concerne la méthode de reprécipitation, le polymère conjugué hydrophobe est dissous dans un solvant approprié à ce dernier et ajouté dans un solvant, tel que l'eau, sous agitation magnétique.

Les propriétés photo-physiques des polymères conjugués dépendent des éléments constitutifs et de la taille des particules(59). En général, ils présentent un coefficient d'absorption molaire très élevé, un rendement quantique modéré et une durée de vie de fluorescence relativement courte. Elles sont parmi les NPs fluorescentes les plus brillantes développées à ce jour.

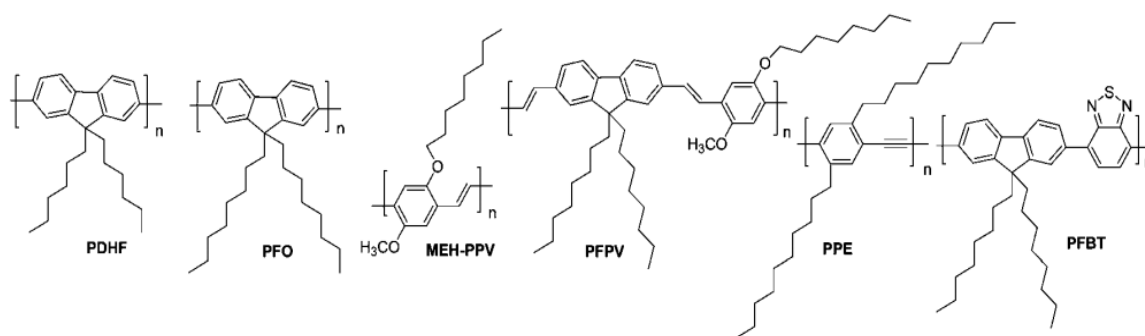


Figure 1.13. Les structures de différents polymères conjugués : poly (9,9-dihexylfluorène) (PDHF), poly (9,9-dioctylfluorène) (PFO), poly [2-méthoxy-5- (2-éthylhexyloxy) -1,4-phénylènevinylène] (MEH-PPV), poly [2-méthoxy-5- (2-éthylhexyloxy) -2,7- (9,9-dioctylfluorène)] (PFPV), poly (p-phénylèneéthynylène) (PPE), poly (9,9-dioctylfluorène-2,7-diyl-co-benzothiadiazole) (PFBT).

Comme décrit dans ce chapitre, les NPs fluorescentes peuvent considérablement améliorer la vitesse et la résolution des techniques de bio-imagerie basées sur la fluorescence. Cependant beaucoup d'entre elles manquent de souplesses en termes de propriétés d'émission et de de chimie de surface. La non-biodégradabilité et la toxicité potentielle dues à la nature de ces matériaux limitent leur application *in vivo*. Les NPs à base de polymère hautement dopé en fluorophore ont été largement utilisées à cet effet mais elles doivent présenter un certain nombre de propriétés. Tout d'abord, la taille des NPs est relativement grande par rapport à un fluorophore libre en solution ce qui peut être un désavantage pour des applications biologiques nécessitant une perturbation minimale de l'environnement biologique mais aussi un avantage en ce qui concerne l'imagerie *in vivo* puisque leur brillance est 100 fois supérieure à celle

des molécules uniques. Bien que l'encapsulation des fluorophores dans une matrice polymérique puisse servir de protection efficace contre les milieux biologiques et que le confinement des fluorophores permette d'obtenir un rendement quantique élevé, un fort nombre de fluorophore peut conduire à un ACQ diminuant le rendement quantique de la NP. Plusieurs approches ont été développées ces dernières années afin de réduire de manière drastique l'ACQ dans les NPs, et ce par la modification des fluorophores avec des groupes latéraux(60) ou encore par l'utilisation de contre-ion volumineux(61). Aussi, de multiples couleurs d'émission peuvent être obtenues par co-encapsulation de différents fluorophores. Les fluorophores confinés à l'intérieur d'une matrice polymérique à des concentrations élevées peuvent produire des phénomènes de coopération tels que le clignotement des particules. Enfin, maîtriser la chimie des NPs est très important en vue d'application en imagerie biologique. En effet, la chimie de surface permet de greffer des ligands qui permet aux NPs de réagir spécifiquement avec le milieu environnant, mais elles doivent aussi présenter des groupements hydrophiles pour assurer leur stabilité colloïdale et minimiser les interactions non spécifiques avec les molécules biologiques.

5. Nanoparticules organiques fluorescentes (FON)

Les nanoparticules organiques fluorescentes (FON) se sont développées sur la dernière décennie en raison de leur bonne biocompatibilité, de leur fonctionnalisation de surface aisée qui peut les rendre dispersables dans l'eau ou encore augmenter leur affinité pour une cible biologique. Il s'agit de molécules fluorescentes à conjugaison π (62) qui se sont auto-assemblées ($> 10^5$ par FON) via un processus de nano-précipitation pour former des nanoparticules brillantes ayant des propriétés émissives comparables à celles des nanoparticules à base de polymères conjugués(63). La taille des FON peut être ajustée en fonction des conditions de préparation. Les FON rivalisent avec les « quantum dots » en termes de polyvalence d'émission, d'efficacité de luminosité mais aussi de biocompatibilité en raison de l'absence d'utilisation de métaux lourds. Une grande quantité de fluorophore (entre 10^4 et 10^8 molécules) peut être encapsulée à l'intérieur de ces assemblages(64). La concentration en fluorophores à l'intérieur de ces nanoparticules est donc particulièrement élevée ce qui, par comparaison avec les sondes avec un seul fluorophore, augmente la brillance de ces nano-objets de plusieurs ordres de grandeur rendant possible un rapport

signal/bruit élevé. Leurs stabilités chimique et photochimique sont aussi augmentées et l'effet du photoblanchiment des fluorophores à l'intérieur de la NP est minime.

Ces NPs ne nécessitent pas d'agents tensioactifs supplémentaires lors de leur synthèse mais peuvent être fonctionnalisées par la suite avec ces agents tensioactifs de sorte que les FON ont suscité un intérêt considérable pour la bio-imagerie(65) et le suivi des cellules(66). En effet, de cette manière, les interactions non spécifiques entre des matériaux non actifs et le milieu environnant sont évitées(67). De plus, les FON présentent une brillance intense lors d'une illumination avec un ou deux photons, ce qui permet de réduire considérablement tout effet d'auto-fluorescence provenant des cellules(68,69).

Cependant, l'efficacité des FON est directement liée au comportement des fluorophores à l'intérieur de la nanoparticule (figure 1.14.). En effet, l'agrégation des fluorophores conduit généralement à une extinction de la fluorescence suite à de fortes interactions moléculaires $\pi - \pi$ entre les noyaux organiques aromatiques(71). Récemment, des fluorophores à émission induite par agrégation (AIE) ont été introduits dans les FON présentant alors un rendement quantique élevé sans atténuation de la fluorescence(72,73). Néanmoins, leur préparation nécessite des approches complexes et des réactifs coûteux limitant ainsi leurs applications.



Figure 1.14. Préparation et fonctionnalisation des FON-NPs. Les nanoparticules ont été préparées par nano-précipitation en ajoutant des molécules fluorescentes de 4,7-di(thiophen-2-yl)benzo[c][1,2,5]thiadiazole dans du THF à 5 mL d'eau sous agitation magnétique. Les NPs sont fonctionnalisées par du PEG. Adapté de la référence 65.

Il existe plusieurs stratégies pour la préparation des FON (figure 1.15) :

- Par précipitation. Une solution concentrée de fluorophores hydrophobes dans un solvant organique est directement ajoutée à de l'eau ce qui entraîne une nucléation rapide.(74)
- Par association ionique de fluorophores. Co-précipitation de fluorophores ioniques dans l'eau en présence de contre-ion hydrophobes.(75)
- Autoassemblage de fluorophores amphiphiles. Des molécules organiques amphiphiles spécialement conçues à cette occasion s'assemblent au sein d'une solution aqueuse en nanostructures à l'architecture bien définie.(76)

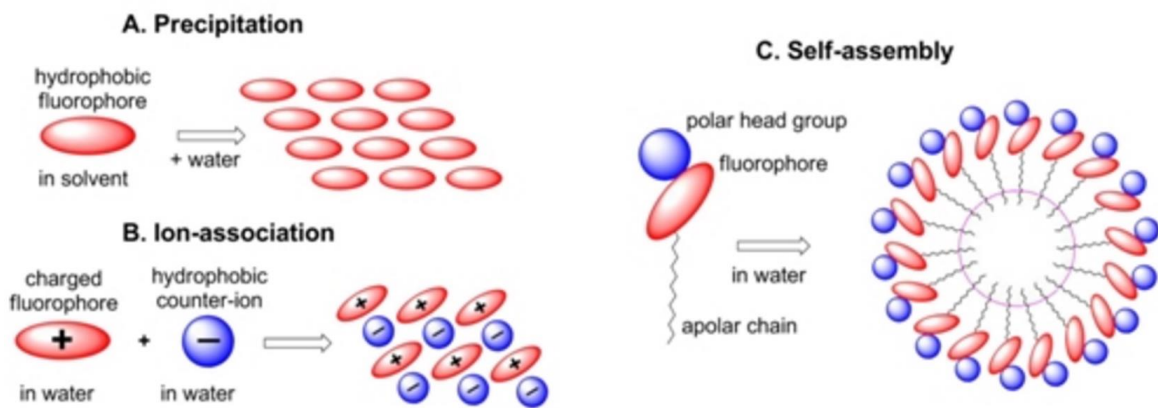


Figure 1.15. Méthodes de précipitation, d'association d'ions et d'autoassemblage pour la préparation de FON-NPs. Adapté de la référence 74.

En raison de leur nature, les FON peuvent être biodégradables et présenter diverses propriétés spectrales et une possibilité de bio-fonctionnalisation. Mais le défi majeur lors de leur préparation consiste à éviter la désactivation de la fluorescence due aux interactions électroniques de molécules proches, autrement appelé, désactivation par agrégation (ACQ).(64)

Part II: Nanoparticules dopées en fluorophores

Au cours des vingt dernières années, diverses approches ont été établies pour la synthèse de NPs à partir de divers polymères avec des tailles bien définies. Contrairement aux polymères conjugués, qui ont une fluorescence intrinsèque, les nanoparticules de polymères dopés en fluorophore sont composées d'une matrice polymérique non fluorescente et d'un fluorophore encapsulé dans la matrice pour créer des nano-objets fluorescents avec des propriétés ajustables. Elles ont une stabilité remarquable dans les milieux biologiques et des propriétés de surface bien contrôlées. L'encapsulation de fluorophore à l'intérieur de la NP peut constituer un outil ultime pour des applications en bio-imagerie et la détection de cellules cancéreuses en raison de leurs propriétés de non toxicité, de brillance et de photostabilité. Le principe de base afin d'obtenir des NPs extrêmement brillantes est d'encapsuler un grand nombre de fluorophores dans un petit espace augmentant ainsi la section efficace d'absorption molaire des particules(77). Néanmoins, il existe plusieurs défis pour encapsuler efficacement des fluorophores au sein d'une matrice polymérique puisqu'il faut introduire un grand nombre de fluorophores tout en évitant les phénomènes d'auto-extinction. Dans ce chapitre, les principaux concepts de synthèse relatifs à l'encapsulation de fluorophores à l'intérieur d'une NP seront brièvement présentés.

Les NPs peuvent être directement synthétisées par polymérisation des monomères dans différents types d'émulsion. En fonction des conditions de réaction, de la nature et de la quantité en tensioactif, on distingue typiquement trois types d'émulsions : l'émulsion classique(78), la mini-émulsion(79) et la micro-émulsion(80) (figure 2.1.).

Lors de la polymérisation en émulsion classique, les monomères sont dispersés avec un tensioactif (typiquement au-dessus de la concentration micellaire critique CMC) dans une phase aqueuse conduisant à la formation de monomères assemblés en micelles relativement grosses (1-100 μm), des gouttelettes de monomère ainsi qu'une petite quantité de monomère dissous. L'amorçage débute par la nucléation de micelles

monomériques dans la phase aqueuse, puis la polymérisation se poursuit au sein de ces micelles par une diffusion des monomères dissous et une réduction continue des gouttelettes. Typiquement, on obtient des tailles comprises entre 50 et 300 nm qui dépendent de la cinétique de polymérisation. Le tensioactif utilisé se place à la surface des particules ce qui permet de les stabiliser. Néanmoins, son élimination ou son échange étant très difficiles, des polymérisations en émulsion classique sans tensioactifs ont été développées(81). L'inconvénient de cette méthode réside dans la diffusion du monomère et du fluorophore à travers la phase aqueuse rendant difficile la conception de NPs avec une distribution en fluorophore homogène.

Dans le cas de la polymérisation en mini-émulsion, la taille des NPs est réduite en appliquant une agitation mécanique à haute vitesse tout en ajoutant un co-stabilisant soluble dans la phase aqueuse. L'amorçage peut avoir lieu dans la phase aqueuse ou directement dans les gouttelettes. Les gouttelettes forment alors directement des NPs après polymérisation. La concentration du tensioactif est généralement maintenue en dessous de la CMC conduisant à l'absence de micelles et à un recouvrement incomplet de la surface des NPs. Ainsi, une stabilisation supplémentaire est nécessaire. La taille des NPs dépend de la concentration en tensioactif et en co-stabilisant, mais aussi de l'homogénéisation. Typiquement les NPs obtenues ont une taille comprise entre 30 et 200 nm.

Enfin, dans le cas de la microémulsion, une émulsion thermodynamiquement stable de la phase contenant le monomère est formée en phase aqueuse puis est polymérisée. Les gouttelettes monomériques alors obtenues sont stabilisées avec une quantité très importante en tensio-actif. Cette méthode donne les plus petites NPs puisque ces dernières ont des tailles variant de 5 à 50 nm allant jusqu'à 10 nm. Cependant, la nucléation inhomogène des NPs entraîne une déstabilisation de l'émulsion et une augmentation spontanée de la taille des NPs ainsi que la formation de NPs sans fluorophores.

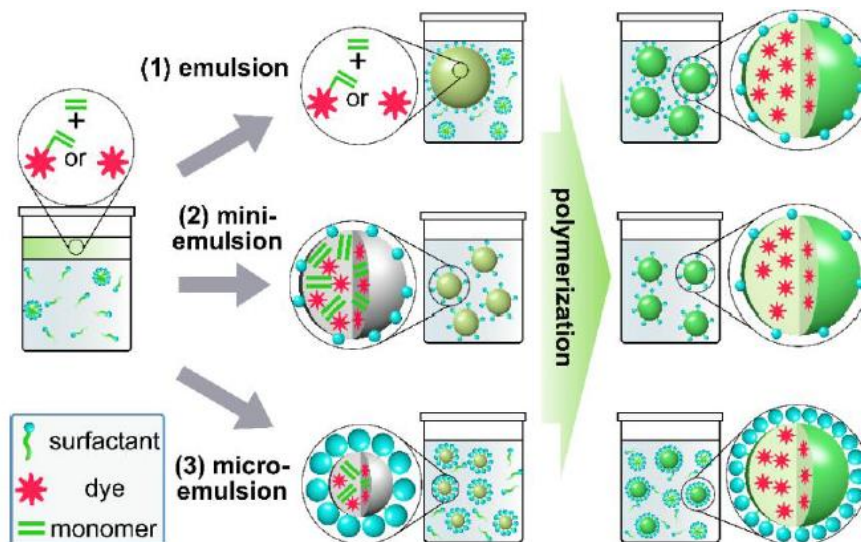


Figure 2.1. Préparation des nanoparticules polymériques dopés aux fluorophores par les stratégies d'émulsions. Adapté de la référence 77.

Les NPs peuvent être également synthétisées à partir de polymères déjà préformés. Cette stratégie permet l'utilisation d'un éventail très large de polymères, dont certains biodégradables, tels que le poly (acide lactique-glycolique) (PLGA) et la polycaprolactone (PCL). Les trois principaux procédés sont: l'évaporation du solvant par émulsification(82), la nano-précipitation(83) et l'autoassemblage(84) (figure 2.2).

Dans le cas de l'émulsification, le polymère est dissous dans un solvant volatil non miscible avec l'eau (dichlorométhane ou de l'acétate d'éthyle), cette solution est ensuite ajoutée dans de l'eau, à l'aide d'un stabilisant sous sonication ou homogénéisation à grande vitesse, ce qui conduit à une émulsion de gouttelettes de solvant avec le polymère à l'intérieur. Les NPs de polymère sont ensuite formées par évaporation du solvant et purifiées par centrifugation. La taille des particules diminue avec la quantité de stabilisant mais dépend aussi de l'homogénéisation. Typiquement, des NPs d'environ 200 nm sont obtenues avec cette technique, mais il est possible de réduire la taille des particules à 100 nm. Si le fluorophore n'est pas lié directement au polymère, la compatibilité et la solubilité de ce dernier doivent être pris en compte pour éviter une séparation de phase lors de l'évaporation.

Certains polymères amphiphiles peuvent s'auto-assembler en NPs micellaires. Dans ce cas, la solution polymérique contenue dans un solvant organique est mélangée avec une phase aqueuse. Quand la concentration du polymère excède la concentration micellaire critique (CMC) l'agrégation de la partie hydrophobe du

polymère a lieu, laissant la partie hydrophile à l'extérieur et formant une coque en forme de brosse. Comme le polymère est amphiphile, il joue lui-même le rôle de tensioactif et de stabilisant si bien qu'il n'est pas nécessaire d'utiliser des tensioactifs supplémentaires. Cette méthode permet d'obtenir des NPs dont la taille est comprise entre 10 et 100nm. Généralement ce sont des copolymères amphiphiles tels que PEG ou des polymères chargés tels que P(M)AA ou des polymères hydrophobes tels que PS, PMMA, PCL, PLGA... qui sont utilisés. L'autoassemblage est un processus thermodynamiquement contrôlé et les micelles peuvent subir un processus d'échange.

Enfin, la nano-précipitation est de loin la méthode la plus utilisée pour obtenir des NPs dopées en fluorophore. Elle est basée sur l'addition du polymère dissous dans un solvant organique (acétonitrile, DMF, THF, DMSO) miscible à l'eau. Lors de l'addition de cette solution à une phase aqueuse, la diffusion rapide du solvant dans la phase aqueuse conduit à une sursaturation du polymère et à la formation de NPs. L'approche la plus directe pour obtenir des NPs dopées en fluorophores consiste à mélanger des fluorophores et des polymères dans la phase organique pour obtenir un piégeage physique des fluorophores au sein de la NP formée. Il s'agit d'un processus cinétiquement contrôlé. La concentration du polymère, la quantité relative des phases organiques et aqueuses, ainsi que la procédure de mélange sont des facteurs déterminants pour ce qui concerne la taille des NPs. Les NPs peuvent avoir un diamètre allant de moins de 10 nm à plusieurs centaines de nm. Le contrôle cinétique facilite l'encapsulation des fluorophores au sein des NPs mais la différence de solubilité du polymère et du fluorophore peut conduire à une distribution totalement inhomogène des fluorophores au sein de la matrice polymérique. Cette technique a été adoptée dans cette thèse pour la fabrication de NPs dopées en fluorophores.

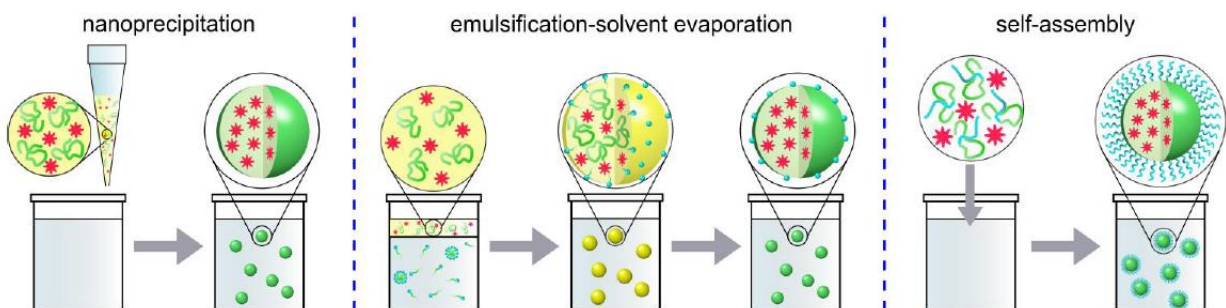


Figure 2.2. Préparation des nanoparticules polymériques à partir de polymères préformés. Les parties hydrophobes des NPs sont représentées en vert, les parties hydrophiles sont représentées en bleu et le solvant organique est représenté en jaune. Adapté de la référence 77.

IV. Taille des NPs

Les nanoparticules élaborées à partir de polymères préformés peuvent être synthétisées selon différents procédés. Chaque technique possède ses avantages et ses inconvénients et choisir la plus adéquate dépend principalement du type de molécule active que l'on souhaite encapsuler, de l'application envisagée et de ses contraintes mais aussi de la technique pour lesquelles ces NPs seront utilisées. La méthode de préparation des nanoparticules est déterminante pour les caractéristiques physico-chimiques et colloïdales des particules, notamment en ce qui concerne la taille, la distribution en taille et la performance de ces nanoparticules *in vivo*. Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à la conception de NPs par nano-précipitation afin d'obtenir un procédé robuste et reproductible permettant de mieux contrôler la taille des nanoparticules au travers de l'étude de l'influence de chaque paramètre expérimental.

Le point de départ de la nano-précipitation est la dissolution complète du polymère dans un bon solvant organique (phase organique) et un non-solvant (phase aqueuse) parfaitement miscible avec le solvant organique. Lorsque ces deux phases sont mélangées, le polymère se trouve dans un « mauvais » solvant puisque son milieu est perturbé via la diffusion du solvant organique vers la phase aqueuse (et inversement). Ceci induit sa précipitation et donc la formation de NPs. Lince et son équipe(85) ont indiqué dans leur étude que le processus de formation des particules par nano-précipitation comprend trois étapes clés qui sont la nucléation, la croissance et l'agrégation. La vitesse de chacune de ces étapes est déterminante en ce qui concerne la taille des NPs. La séparation entre les étapes de nucléation et de croissance est indispensable afin d'obtenir des NPs petites mais aussi avec une faible distribution de taille. Idéalement, les conditions opératoires doivent permettre un taux de nucléation élevé (dépendant de la sursaturation) et un faible taux de croissance. La nature de la phase organique peut fortement influencer les propriétés des nanoparticules. En effet, Khayata et al.(86), ont remarqué que les NPs préparées avec de l'huile de ricin étaient les plus grosses dues à une augmentation de la viscosité de la phase organique. Lorsque la viscosité de la phase organique augmente celle de la phase dispersée augmente également. De même, l'indice de polydispersité augmente en parallèle avec l'augmentation de la viscosité. L'effet de la nature du solvant organique a également

été évalué par l'équipe de Beck-Broichsitter(87). Cette dernière a comparé la taille des particules obtenue à partir du PLGA en fonction de quatre solvants qui sont le THF, le dioxane, le DMSO et l'acétone. Il a été démontré que des solvants de forte polarité donnent naissance à de petites nanoparticules en favorisant une diffusion rapide vers la phase aqueuse puisque la taille des NPs était de 800 nm pour le THF, 700 nm pour le dioxane, 500 nm pour l'acétone et enfin 500 nm pour le DMSO. De plus, la taille des particules a drastiquement diminué lorsque le THF et l'acétone ont été utilisés en combinaison comme solvant organique par rapport au THF seul. L'acétone, étant plus polaire que le THF, augmente la solubilité du polymère dans la phase aqueuse ce qui facilite la formation de petites particules. De même, la taille des particules a augmenté lorsque le mélange DMSO/acétone a été utilisé plutôt que le DMSO seul, ce qui corrobore l'hypothèse que plus le solvant organique est polaire, plus il augmente d'autant plus la solubilité dans la phase aqueuse et les particules résultantes sont alors plus petites. L'ordre d'addition des phases semble également exercer un effet sur les caractéristiques des particules. L'effet de l'addition de la phase aqueuse dans la phase organique et inversement a été étudié par Khayata(86) qui a étudié des nanoparticules chargées en vitamine E. Dans ce cas précis, lorsque la phase aqueuse est ajoutée à la phase organique, des nucléis se forment puisque la phase aqueuse contient un agent stabilisant qui permet la stabilité colloïdale de la particule. En inversant cet ordre d'addition, ces nucléis ne sont plus présents au sein de la solution.

En nano-précipitation, la méthode d'agitation la plus couramment utilisée est l'agitation magnétique. Une augmentation de la vitesse d'agitation conduit généralement à une diminution de la taille des particules, ce qui s'explique par une diffusion plus rapide du soluté dans la phase aqueuse. Prud'homme(88) a mis en évidence la nécessité d'un mélange rapide (de l'ordre de quelques millisecondes) pour la création d'une sursaturation locale élevée du polymère qui conduit à la précipitation du polymère quelle que soit sa nature chimique. Un mélange rapide, de l'ordre de quelques millisecondes, est nécessaire pour la création d'une sursaturation élevée locale uniforme. Ceci conduit à la précipitation de tout soluté ou molécule existant au-dessus de son niveau de saturation, quelle que soit sa nature chimique. Le contrôle du temps d'agitation est également essentiel dans le processus de formation de nanoparticules car il doit correspondre au temps de nucléation et de croissance des NPs et permet d'obtenir un contrôle cinétique du processus. Généralement, une nano-précipitation

réalisée selon un procédé classique conduit à une distribution de tailles de particules polydisperses car le mélange résultant est hétérogène. Ainsi, de nombreux dispositifs ont vu le jour afin d'améliorer la technique en minimisant toute variation provenant du mélange des deux phases comme les dispositifs microfluidiques(89) ou la nano-précipitation flash(88) (FNP). Le dispositif microfluidique est un dispositif de nano-précipitation à flux continu dans lequel une solution de polymère diluée et de l'eau sont pompés séparément afin de procéder à la nucléation au sein du micro-mélangeur. Les nanoparticules obtenues sont recueillies directement à la sortie du micro-mélangeur. L'effet sur la taille de la proportion de solvant par rapport à la proportion de non-solvant est définie par le paramètre R de telle sorte que :

$$R = \frac{\text{Débit volumique de l'eau}}{\text{Débit volumique de la solution polymérique}}$$

Ce nombre R est le facteur déterminant à prendre en compte en ce qui concerne la taille des particules. L'augmentation du rapport R conduit à une sursaturation élevée et à la création d'un nombre important de nucléi pendant la séparation de phase. En conséquence, la concentration locale du polymère est diminuée ce qui conduit à des particules plus petites. Ainsi, le groupe de Baly(89) a montré qu'une augmentation par 10 du facteur R augmentait la taille des particules de 106 à 210 nm. La FNP est un autre procédé évolutif mis au point par Prud'homme en 2003,(88) afin de préparer des nanoparticules avec une taille et une distribution de taille contrôlées. Cette technique produit des particules avec des tailles pouvant aller de 80 nm à 1 µm. Les particules sont obtenues par un procédé de nano-précipitation extrêmement rapide. De plus, elle permet également d'encapsuler de manière efficace plusieurs types de médicaments, de peptides ou encore d'agents d'imagerie au sein d'une même nanoparticule.

Lince et son équipe(85) ont aussi montré que la concentration du polymère joue un rôle prépondérant sur la taille finale des NPs. En effet, en utilisant une solution de poly-ε-caprolactone (phase organique) et une solution aqueuse contenant du polyoxy éthylène –polyoxy propylène co-polymère (agent stabilisant), ils ont constaté que pour une faible concentration de polymère, ni la vitesse d'agitation lors du mélange, ni la façon dont les phases sont mélangées n'avaient d'incidence sur la taille finale des NPs. En revanche, pour une forte concentration en polymère, ces paramètres ont un impact drastique sur la taille des NPs. De manière générale, une augmentation de la

concentration en polymère augmente la taille des particules. Ce phénomène peut s'expliquer par une augmentation de la viscosité de la phase organique qui donne naissance à des particules plus grosses.

De même, la masse moléculaire des polymères est un paramètre crucial qui exerce une forte influence sur la taille des NPs. Fessi et al.(90), ont évalué l'effet de la masse molaire du PCL sur la taille des particules. Il a été remarqué que les nanoparticules les plus grandes ont été obtenues avec le polymère de masse moléculaire la plus élevée en raison d'une augmentation de la viscosité de la phase organique. Inversement, Lince et al.(85), ont constaté que l'augmentation de la masse molaire du PCL conduisait à une diminution de la taille des particules allant de 144.1 à 93.6 nm en raison d'une précipitation plus rapide car le polymère est moins soluble dans le milieu acétone/eau. Dans une autre étude, Legrand et al.(91) ont montré que la masse moléculaire n'avait pas d'influence sur la taille des particules mais sur leur rendement de formation, soulignant qu'il existe une masse molaire idéale du PLA pour obtenir un taux de production élevée des NPs. Il a été suggéré que les chaînes de PLA ayant un poids moléculaire en dehors de la plage optimale précipitent en tant qu'agrégats et contribuent à réduire le rendement de production des nanoparticules.

A ce jour, plusieurs types de polymères biocompatibles avec des groupements fonctionnels ont été utilisés pour la préparation de nanoparticules comme le poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA), le 1,2-distéaroyl-singlycero- 3-phosphoéthanolamine-N-(polyéthylène glycol) (DSPEPEG), le PS-PEG/PSMA ainsi que leurs dérivés. Il a été montré que les polymères à caractère amphiphile élevé donnent les plus petites nanoparticules de telle sorte que lorsque PLGA est utilisé comme matrice, la taille des NPs est de 243 nm(92). Ces tailles diminuent fortement (55 et 7 nm) par l'utilisation du DSPE-PEG et du PS-PEG (93,94). Ainsi, il est possible d'obtenir des nanoparticules allant de quelques centaines de nanomètres à quelques dizaines de nanomètres en modifiant la nature même du polymère utilisé.

Récemment, notre groupe a proposé une approche alternative d'autoassemblage, basée sur la nano-précipitation à charge contrôlée(95) (figure 2.3.). Nous avons étudié l'influence de la modification des groupes terminaux des chaînes polymériques sur la taille finale des nanoparticules. Nous avons modifié les groupes du PLGA, PCL et PMMA avec des groupes neutres PEG, un groupement chargé négativement SO_3H et

un groupement chargé positivement NMe_3 . Pour ces trois polymères, les particules les plus grosses ont été obtenues avec le groupe non chargé avec des tailles supérieures à 100 nm. Les polymères avec des groupements carboxyles conduisaient à des tailles de particules comprises entre 60 et 100 nm, tandis que les particules fabriquées à partir des groupements chargés ont donné des tailles inférieures à 25 nm. Notre équipe a pu montrer que la taille des nanoparticules diminuait dans l'ordre suivant : $\text{PEG} > \text{COOH} > \text{NMe}_3 > \text{SO}_3\text{H}$ avec des tailles allant de 150 nm jusqu'à 25 nm. L'influence du groupement chargé sur la chaîne du polymère influe donc grandement sur le comportement de la nanoparticule. La croissance des particules et l'incorporation de nouveaux polymères dans les nanoparticules atteignent donc un seuil dû à la répulsion électrostatique introduite par les groupes chargés au sein des chaînes de polymère. En conséquence, la taille des particules diminue. Cet effet est beaucoup moins important pour le groupe COOH car la charge effective de ce groupement est plus faible que celle introduite par NMe_3 et SO_3H , ce qui implique que les nanoparticules atteignent des tailles plus importantes. Ainsi, en faisant varier un seul groupe dans une chaîne de polymère, il est possible d'ajuster la taille de la particule.

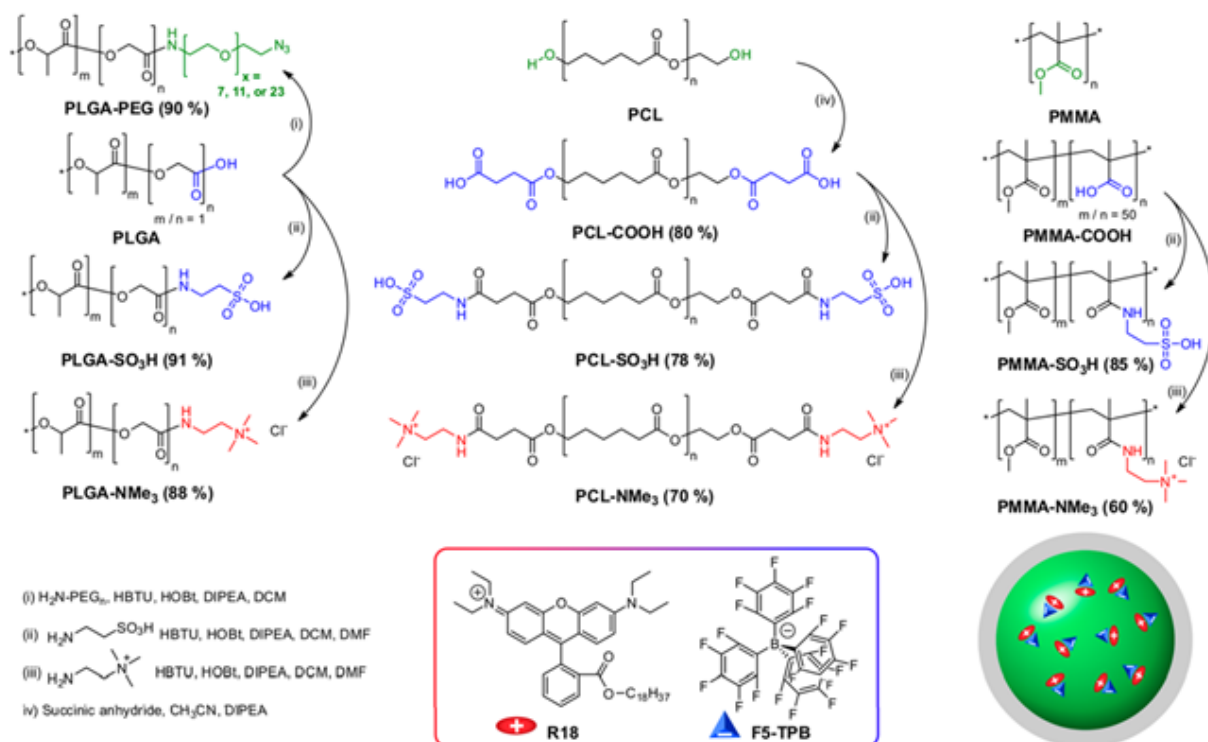


Figure 2.3. Polymères modifiés chimiquement et vue schématique de la synthèse de NPs dopées en fluorophores. Ici, le poly PLGA portant un groupement carboxylate à une extrémité de la chaîne, le PCL portant des groupements hydroxyle aux deux extrémités de la chaîne et un copolymère de PMMA avec son groupement acide méthacrylique modifié avec des groupements PEG, carboxylate, sulfonate et triméthylammonium. Un sel d'ester octadécyle de rhodamine B (R18) avec du tétrakis (pentafluorophényl) borate (F5-TPB) en tant que contre-ion a été utilisé en tant que fluorophore pour l'encapsulation au sein de la NP. Adapté de la référence 95.

V. Transfert d'énergie au sein des nanoparticules

En utilisant différentes combinaisons donneur-accepteur, le processus de FRET peut être ajusté ce qui entraîne une augmentation du décalage de Stokes. En faisant varier le rapport donneur/accepteur, la détection multi-couleur peut également être obtenue comme le démontrent les travaux de Wang et Tan(98). En outre, plusieurs systèmes de nanoparticules polymériques utilisant un système de détection basés sur le FRET ont été développés à des fins de bio-imagerie et de bio-sensibilité. Une des caractéristiques clés des NPs polymériques fluorescentes est la présence de bandes d'absorption et d'émission définies à presque toutes les longueurs d'ondes souhaitables sur une fenêtre optique comprise entre 400 et 800 nm. De plus, ces bandes ne se chevauchent pas ce qui permet de détecter spécifiquement une nanoparticule, dans le cadre de l'imagerie multi-couleur par exemple, par l'excitation

sélective d'une de leur bande afin d'éviter tout phénomène d'artéfacts. De plus, l'un des avantages considérables du FRET par rapport aux fluorophores individuels est que l'écart entre les maxima d'excitation et d'émission est relativement grand et réduit donc le bruit de fond pendant des études en imagerie. Néanmoins, il existe un intérêt certain d'obtenir des nanoparticules émettant dans le proche infrarouge et le rouge lointain car ces régions présentent une auto-fluorescence minimale des tissus vivants. L'émission de ces nanoparticules atteint généralement le rouge lointain, mais pour introduire l'émission NIR, ces NPs nécessitent un dopage avec un fluorophore NIR en tant qu'accepteur FRET.

Pour résoudre ce problème, le groupe de Jin(99) a décrit un polymère fluorescent NIR (Pdot) en introduisant le bis (trihexylsilyloxyde) de 2,3-naphtalocyanine de silicium (NIR775) dans une matrice de poly (9,9-dioctylfluorène-co benzothiadiazole) (PFBT) qui présente un large pseudo-déplacement de Stokes (figure 2.4.). Le PFBT est un polymère semi-conducteur qui peut être facilement excité dans le bleu (457 nm) et émet une fluorescence à 546 nm. Le NIR775, quant à lui, présente une forte fluorescence NIR à 777 nm dans un environnement hydrophobe. Lors de l'encapsulation du NIR775 à l'intérieur du Pdot, ce fluorophore a reçu de l'énergie provenant du PFBT et l'a convertie en fluorescence NIR de manière efficace. Ainsi, sa brillance a été considérablement accrue de près de 40 fois par rapport au fluorophore seul en solution. Il s'agit alors d'un système Pdot PFBT-NIR775 émettant dans le NIR avec un grand décalage de Stokes puisque la longueur d'onde d'excitation est celle du polymère à 457 nm et la longueur d'émission est celle du fluorophore à 777 nm, ce qui est impossible à obtenir avec des fluorophores seuls. Ces nanoparticules ont ensuite été étudiées avec succès en imagerie *in vivo*, notamment pour l'imagerie à deux photons, puisque les Pdots ont des sections efficaces d'absorption à deux photons particulièrement importants et que le grand décalage de Stokes est parfaitement adapté à ce type d'étude.

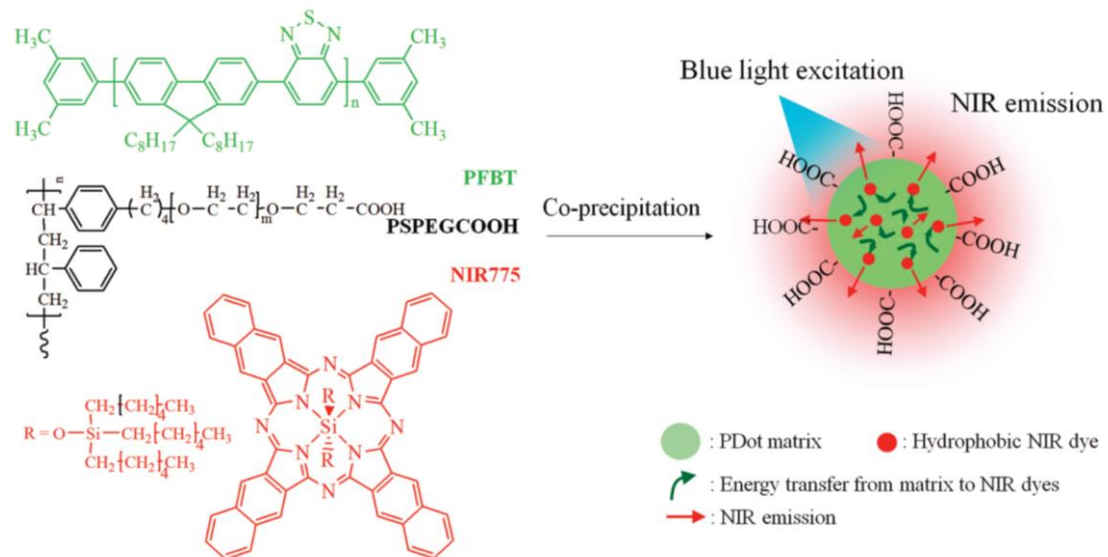


Figure 2.4. Structure chimique du PFBT, du PS-PEG-COOH et du NIR775 et co-précipitation dans de l'eau sous sonication pour la fabrication des Pdots. La matrice du Pdot absorbe la lumière bleue et transfère l'énergie au fluorophore (indiqués par des flèches vertes), qui émet alors une fluorescence NIR (indiquée par des flèches rouges). Adapté de la référence 99.

Un exemple de FRET à l'intérieur d'une nanoparticule polymérique de PMMA est l'encapsulation du 9-nitrobenzoxadiazole (NBD) et de la 9-(diethylamino)benzo[a]phenoxazin-5-one (NR), rapporté par l'équipe de Chen(100) (figure 2.5.). Dans cette étude, la bande d'émission du donneur NBD se chevauche parfaitement avec la bande d'absorption de l'accepteur NR rendant alors possible un FRET entre ces deux fluorophores. En augmentant le rapport molaire NBD/NR de 1/0 à 1/1, l'intensité d'émission du NBD diminue et celle du NR augmente. Ainsi les signaux d'émission du FRET peuvent être ajustés de sorte que les nanoparticules présentent des couleurs caractéristiques. En faisant varier le taux d'encapsulation et le rapport entre les deux fluorophores au sein de la nanoparticule, il est possible d'obtenir des NPs de 60 nm idéales pour des études d'imagerie multiplexe. De plus, l'efficacité du FRET a atteint les 75.2% lorsqu'une molécule de NBD était entourée de six molécules de NR.

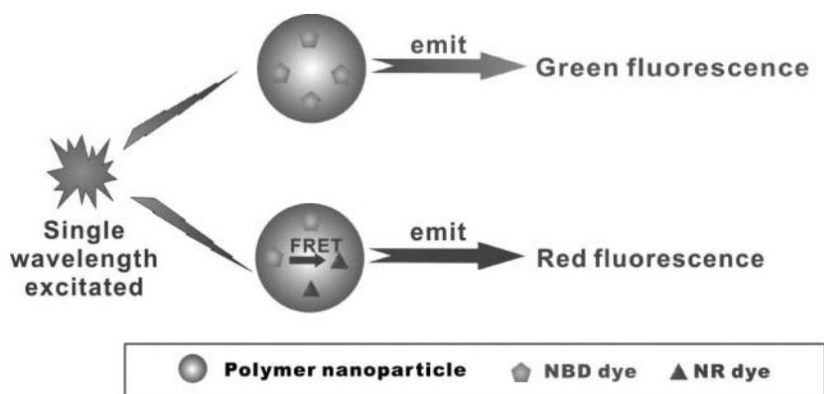


Figure 2.5. Illustration schématique des nanoparticules polymériques fluorescentes contenant un ou deux fluorophores (NBD) et (NR) sous excitation à 467 nm. Adapté de la référence 100.

Un autre exemple de FRET à l'intérieur d'une nanoparticule de PMMA a été développé en utilisant une molécule photochromique comme accepteur FRET afin de créer des NPs commutables(101) (figure 2.6.). Une molécule photochrome dérivée du spiropyrane modifié à l'acrylique (SPEA) et une molécule dérivée de l'azocarbazole (AzoCzEA) ont été synthétisées et incorporées à l'intérieur d'une nanoparticule à base PMMA par la méthode de la polymérisation en émulsion. L'AzoCzEA se caractérise par une forte fluorescence verte à $\lambda_{em} = 530$ nm et ne possède pas de recouvrement avec la bande d'absorption du SPEA. Après une illumination UV, le SPEA est capable de s'isomériser et subit une transition de structure. En effet, le SPEA peut passer de sa forme fermée (spiro) à une forme ouverte (mérocyanine) avec l'apparition d'une bande d'absorption très forte à 400-700 nm et une émission de fluorescence à 560 nm. Ainsi, la bande d'émission du AzoCzEA recouvre la bande d'absorption du SPEA de sorte qu'on obtient un FRET efficace inhibant l'émission de fluorescence spontanée du AzoCzEA. Une illumination du système avec de la lumière dans le visible ramène le SPEA sous une forme fermée, neutralisant ainsi le FRET obtenu.

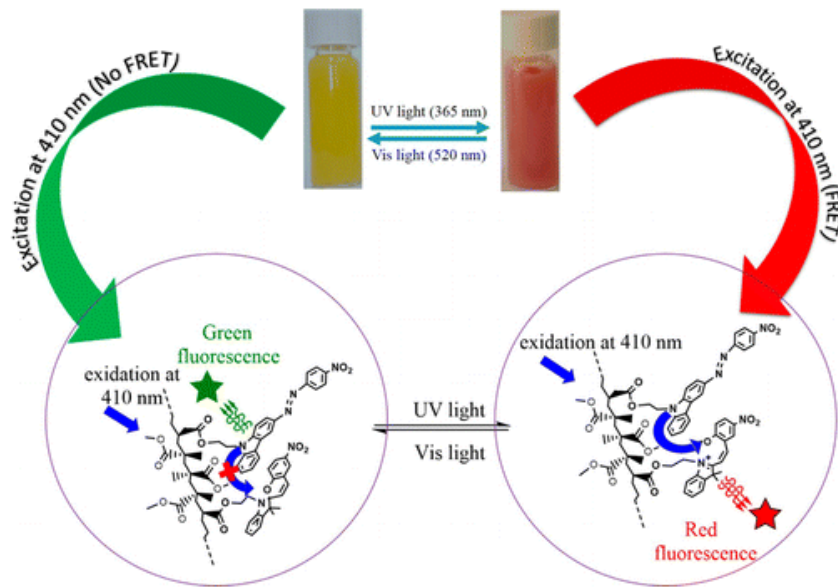


Figure 2.6. Illustration schématique d'une chaîne de copolymère SPEA- AzoCzEA-MMA et du procédé FRET s'accompagnant d'un changement de couleur de fluorescence lors d'une irradiation dans l'UV ou le visible. Adapté de la référence 101.

Le groupe de Low(102), a synthétisé des NPs de PLGA et de polyéthylène glycol (PEG) dans lesquelles des fluorophores NIR lipophiles issus de la famille des cyanines ont été encapsulés (figure 2.7.). Ici, il s'agit du DiD jouant le rôle de donneur et du DiR jouant le rôle d'accepteur (ces deux fluorophores ont été encapsulés selon un rapport 1/1). Il a été montré dans cette étude que le transfert FRET était efficace malgré un faible chevauchement entre les spectres d'émission et d'absorption du DiD et du DiR. De plus, ce FRET s'est avéré encore plus efficace avec l'augmentation de la concentration des fluorophores à l'intérieur de la nanoparticule, bien que cela ait entraîné une diminution de l'intensité de fluorescence et une augmentation de la taille de la particule. Le transfert d'énergie entre DiD et DiR a entraîné une diminution des maxima d'émission à 668 nm et une augmentation de l'émission à 795 nm soit un pseudo-déplacement de Stokes de plus de 100 nm qui permet à la nanoparticule une application *in vivo*.

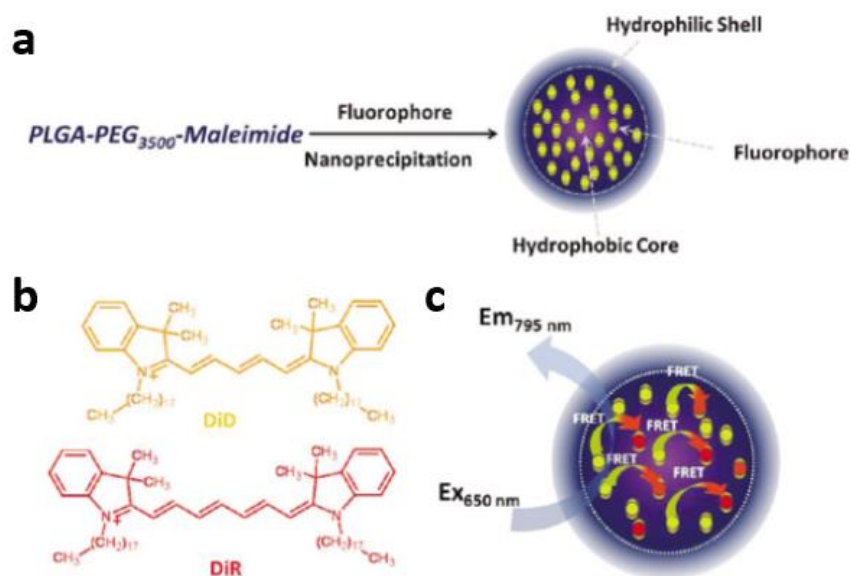


Figure 2.7. Conception des NPs. a) Préparation des NPs par nano-précipitation. b) Structures chimiques des fluorophores DiD et DiR. c) Encapsulation des fluorophores au sein de la nanoparticule et représentation du FRET en résultant. Adapté de la référence 102.

Ce même groupe a publié un an plus tard une nouvelle étude(103) dans laquelle toute une série de nanoparticules avec des émissions allant de 500 à 790 nm a été développée (figure 2.8.). Ces particules contiennent différentes combinaisons de quatre fluorophores qui sont le DiO, le DiI, le DiD et le DiR. En changeant la quantité de fluorophores mais aussi le rapport entre les fluorophores, il est possible de changer drastiquement les propriétés d'émission de la NP. Ces nanoparticules ont la faculté d'émettre à trois longueurs d'onde d'excitation distinctes (570, 672 et 777 nm) lors d'une excitation à 485 nm grâce à un effet cascade du FRET entre les fluorophores puisque ces derniers sont situés à proximité les uns des autres dans un espace confiné. Ainsi, grâce à ces différentes combinaisons et en jouant sur le nombre et la concentration des fluorophores, les propriétés optiques des NPs peuvent être ajustées pour l'imagerie multicolore ou l'imagerie multiplexe *in vivo*.

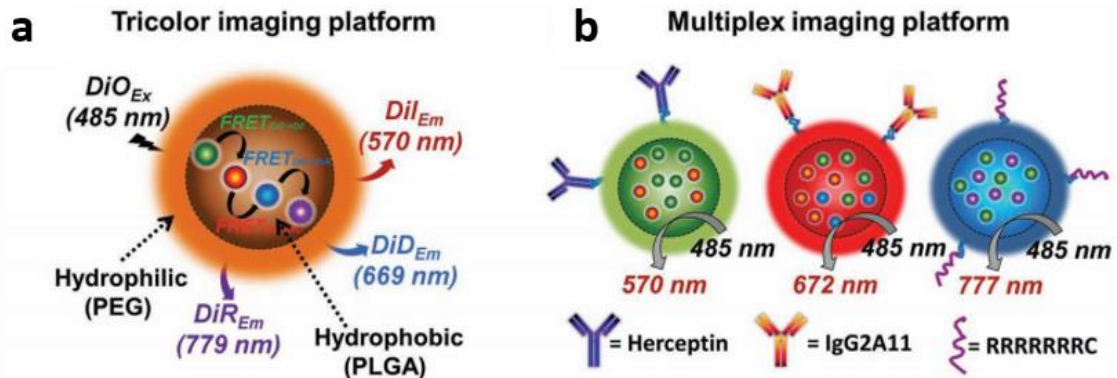


Figure 2.8. a) Représentation schématique des nanoparticules avec plusieurs mécanismes en cascade. b) Imagerie multi-couleur. Adapté de la référence 103.

Les nanoparticules polymériques à base de FRET ont également été utilisées pour détecter des espèces ioniques montrant ainsi une bonne sensibilité (figure 2.9.). Par exemple, Frigoli et ses collègues ont développé des NPs à base de polystyrène incorporant du 9,10-diphénylanthracène (DPA) et des molécules de pyrrométhène 567 (PM 567) dont la surface est fonctionnalisée avec le tétraazacyclotétradécane (cyclame), un ligand sélectif du cuivre. Ce dernier est capable d'inhiber l'émission de fluorescence du PM 567 lors de la reconnaissance du cuivre. Ce système a une limite de détection du cuivre dans la gamme du nanomolaire(104).

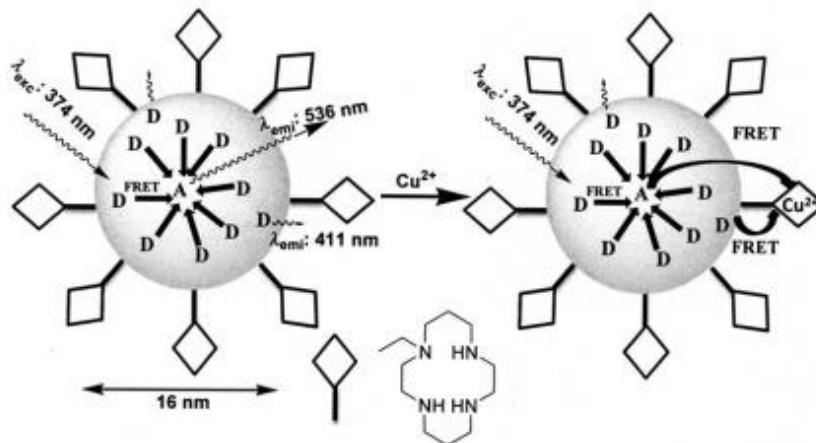


Figure 2.9. a) Représentation schématique des nanoparticules ratiométriques basés sur le FRET : Les molécules D sont excitées et l'énergie est transférée aux molécules A au sein de NPs recouvertes de cyclame. En l'absence de Cu²⁺, les complexes cuivre-cyclame qui se forment agissent comme des inhibiteurs qui vont fortement atténuer l'émission de fluorescence des molécules A, tandis que celle des molécules D est moins touchée. Adapté de la référence 104.

Mettant à profit le même mécanisme, Chen et ses collègues(105) ont développé des NPs cœur/coquille où le cœur était constitué de PMMA imprégné de Rouge du Nil et

où la coquille était constituée de polyéthylèneimine hydrophile (PEI) pour une forte complexation avec le cuivre Cu^{2+} . La complexation entre le PEI et le cuivre à la surface de la NP conduit à l'extinction de l'émission de fluorescence du Nile Red due au FRET. Ce système a montré une grande sélectivité vis-à-vis du Cu^{2+} , puisqu'aucune extinction de fluorescence n'a été détectée en présence d'autres cations métalliques. De même, Ma et ses collègues(106) ont développé un nano-capteur FRET pour la détection du fer Fe^{3+} en milieu aqueux. En effet, des micelles polymériques à base d'un dérivé de rhodamine réactif au Fe^{3+} ont la propriété d'émettre de la fluorescence par une réaction d'ouverture de cycle induite par une interaction avec le fer. Le système est extrêmement sensible mais la nature irréversible du mécanisme rend difficile toute application en imagerie.

Il est bien connu que dans des conditions très diluées, les polymères sensibles aux variations de chaleur et de pH présentent généralement un affaissement de leur chaîne polymérique au-dessus ou en-dessous d'un pH critique (pKa) ou d'une température(107). Si les extrémités de ces chaînes polymériques sont marquées par des molécules fluorescentes jouant le rôle de donneur et d'accepteur d'énergie, l'efficacité du FRET peut être modulée suite à des changements conformationnels induits par des stimuli. Dans un exemple typique, le groupe de Wang(108) a récemment rendu compte de la synthèse d'un microgel composé de poly(NIPAM-APBA-NBDAERhBEA) sensible à la température et au glucose (figure 2.10.). Le NBDAE et le RhBEA servent respectivement de donneurs et d'accepteurs d'énergie. En l'absence de glucose, la température de transition de phase du microgel est inférieure à celles des microgels classiques de PNIPAM en raison de l'hydrophobicité des segments APBA à pH 8. L'effondrement du microgel est dû à un changement de température au-dessus de la température de transition de phase (VPTT1) et module la distribution spatiale des donneurs et accepteurs. Ainsi, l'efficacité du FRET est grandement améliorée. En présence de glucose, le résidu APBA se lie avec ce dernier et forme un fragment boronate cyclique chargé négativement, ce qui conduit à une température plus élevée que la température de transition de phase (VPTT2) et donc à un gonflement du microgel. Ainsi, l'ajout de glucose à un intervalle de température compris entre VPTT1 et VPTT2 peut directement entraîner le gonflement des microgels initialement affaissés, entraînant une diminution de l'efficacité du FRET. Par

conséquent, le processus de FRET au sein des microgels poly(NIPAM-APBA-NBDAERhBEA) peut être contrôlé par la température ou la concentration en glucose.

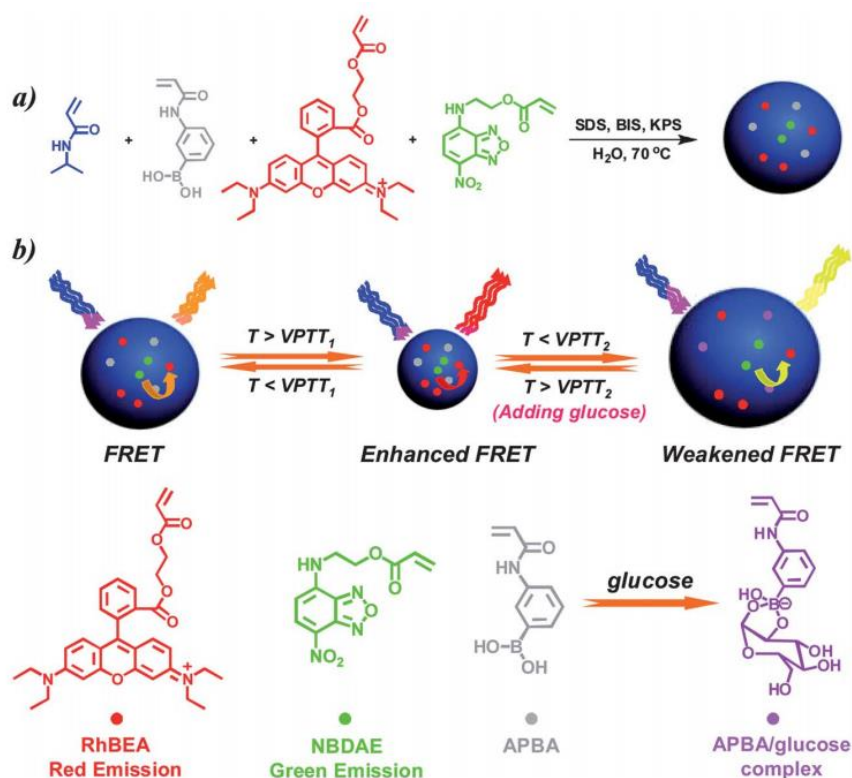


Figure 2.10. a) Représentation schématique des microgels poly(NIPAM-APBA-NBDAERhBEA) fluorescents thermo et gluco sensibles préparés par polymérisation en émulsion. b) Illustration schématique de la modulation du FRET au sein du microgel par variations de la température et de la concentration en glucose. Adapté de la référence 107.

Des nano-capteurs de pH basés sur le FRET(109) ont également été utilisés pour la bio-sensibilité intracellulaire dans des cellules rénales de rats vivants. Après internalisation, les NPs se sont accumulées dans les organelles intracellulaires telles que l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique. Il est intéressant de noter que la taille du nanogel n'a été que faiblement affectée par les changements radicaux de pH et a démontré une excellente stabilité dans l'intervalle de pH physiologique. Cependant, le temps de réponse de ce système vis-à-vis de la variation du pH était de l'ordre de quelques secondes.

Récemment, notre groupe a présenté un nouveau concept de nanoparticules présentant un comportement coopératif des fluorophores(61) (figure 2.11.). En introduisant un nouveau concept de nanoparticules polymères fluorescentes dopées avec un sel cationique, l'octadécyl rhodamine B (R18), avec son contre-ion fluoré, le tétraphénylborate (F5-TPB) qui sert d'espaceur afin de minimiser l'agrégation des

fluorophores. Il a été montré que les nanoparticules obtenues avaient une taille de 40 nm et présentaient une commutation ON/OFF entre un état fluorescent et un état noir de plus de 500 fluorophores par particule. La raison d'un tel comportement réside dans le transfert d'énergie d'exciton ultra-rapide qui fait qu'une seule espèce non émissive peut inhiber l'ensemble de la population et provoquer un clignotement. La brillance de ces particules dépasse de six fois celle des quantum dots-605. Ces nanoparticules peuvent pénétrer dans les cellules par endocytose pour le marquage cellulaire.

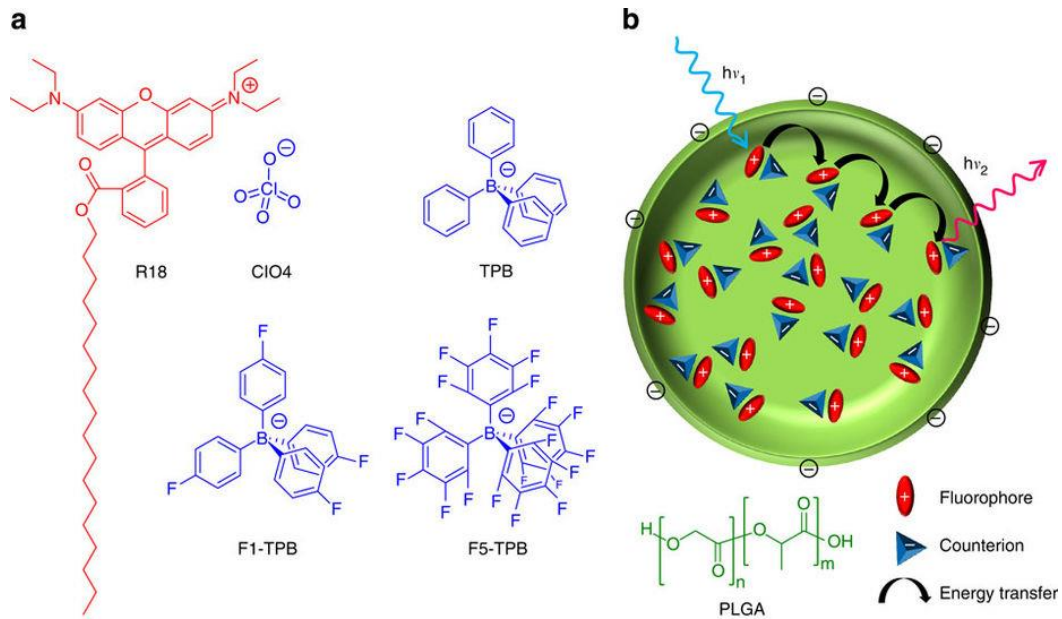


Figure 2.11. a) Structures chimiques de la rhodamine B (R18) et de ses différents contre-ions: perchlorate (ClO₄), tétraphénylborate (TPB), tétrakis(4-fluorophényl)borate (F1-TPB) et tétrakis(pentafluorophényl)borate (F5-TPB). (b) Représentation schématique d'une nanoparticule de PLGA dopée avec son fluorophore. Adapté de la référence 61.

Plus tard, notre groupe a montré que l'utilisation de larges populations de fluorophores couplés par EET à l'intérieur d'une nanoparticule peut générer des antennes collectrices géantes en amplifiant la fluorescence d'un fluorophore unique(110) (figure 2.12.). Pour cela des nanoparticules, avec une taille comprise entre 60 et 100 nm, de PMMA-MA encapsulant du R18/F5-TPB ont été étudiées. Il a été montré qu'un rapport de 10^{-4} (accepteur/donneur) était suffisamment efficace pour transférer l'énergie et que cela résulte en un effet d'antenne proche de 1000. Cette amplification permet d'observer des molécules acceptrices uniques avec une très faible puissance lumineuse (proche de la lumière ambiante).

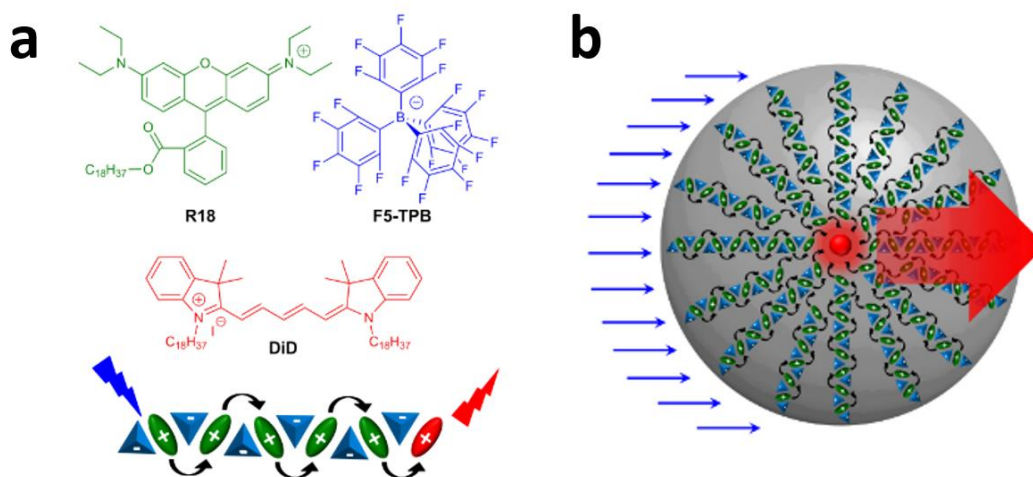


Figure 2.12. a) Structures chimiques du donneur octadecyl ester rhodamine B (R18) et de son contre-ion tétrakis(pentafluorophényl)borate (F5-TPB) et de l'accepteur DiD b) Schéma d'une nano-antenne collectrice géante. Adapté de référence 110.

VI. Stabilité colloïdale

La maîtrise de la chimie de surface des NPs est importante pour leurs applications en biologie. En effet, les NPs injectées par voie intraveineuse peuvent potentiellement atteindre chaque organe ou tissu vascularisé de notre corps et relarguer des molécules thérapeutiques à. Ainsi, prolonger le temps de rétention dans le sang des NPs est devenu une tâche primordiale. Néanmoins, cette dernière est rendue difficile puisque les NPs sont rapidement dégradées et éliminées du flux sanguin par le système phagocytaire mononucléaire (MPS). Le MPS se compose de cellules dendritiques, de leucocytes, de granulocytes et de macrophages résidant dans les tissus du foie, de la rate et des ganglions lymphatiques responsables du traitement, de l'élimination et de la dégradation des substances exogènes dans le sang(111). Ainsi, les NPs circulant dans le sang sont reconnues par des protéines, appelées opsonines(112), qui vont s'adsorber sur leur surface (phénomène d'opsonisation) rendant les NPs plus sensibles à la phagocytose par les cellules du MPS. La reconnaissance entre les opsonines et les NPs se fait préférentiellement par des interactions hydrophobes(113) mais également par des interactions électrostatiques et par liaisons hydrogène(114). De plus, l'agrégation des NPs circulant dans le flux sanguin peut également nuire à leur temps de circulation et ce de manière totalement indépendante de la capture par le MPS. Les NPs non chargées s'agrègent très facilement par l'intermédiaire des forces de Van der Waals en milieu aqueux, tandis que les NPs chargées (positivement ou négativement) gardent leur stabilité colloïdale en raison des forces électrostatiques

répulsives. Cependant, dans le flux sanguin, la force ionique est élevée, résultant en de multiples interactions entre les NPs chargées et les contre-ions neutralisant la charge à la surface des NPs. Ainsi, les NPs sont susceptibles de s'agréger et d'être éliminées du flux sanguin sans avoir atteint leur cible. Généralement, les NPs sont éliminées seulement 10 minutes après leur injection dans le flux sanguin et ce quel que soit la nature de la NP(111).

Depuis le début des années 90, de multiples recherches ont émergé afin de surmonter ces contraintes, ce qui a conduit à la PEGylation en tant que stratégie visant à conférer des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques aux NPs (figure 2.13.). L'approche consiste à revêtir la surface de la NP d'un polymère inerte qui résiste aux interactions avec les composants du flux sanguin et confère des propriétés « furtives » à la NP. Les NPs sont alors recouvertes de chaîne polymériques hydrophiles neutres qui forment une couronne stérique empêchant la fixation des protéines et, plus particulièrement des opsonines, diminuant drastiquement leur phagocytose et augmentant leur temps de circulation dans le sang(115). Au fil des années, le polyéthylène glycol (PEG) a été présenté comme un matériau biocompatible et non toxique approuvé par la « Food and Drug Administration » (FDA) pour un usage humain(115).

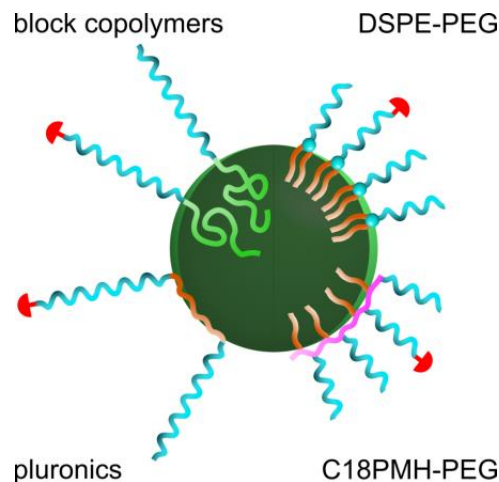


Figure 2.13. Vue schématique des approches utilisées pour contrôler la chimie de surface des nanoparticules.

Le PEG, $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-H}$, est sous forme linéaire ou ramifiée. Les motifs récurrents de base sont du poly(éthylèneglycol) et du poly(propylèneglycol). En raison de la structure chimique des unités récurrentes, ces polymères sont également connus sous le nom de poly(oxyde d'éthylène) (PEO) et poly(oxyde de propylène) (PPO). Ce

polymère est extrêmement flexible, non chargé, antiphagocytose contre les macrophages, biocompatible, ne se combine pas avec les protéines, hydrophile et extrêmement soluble dans l'eau comme dans les solvants organiques(116–118). Il peut également former des monocouches minces à l'interface air-eau ce qui est une propriété typique des molécules amphiphiles. L'efficacité du PEG à la surface des NPs a été montrée pour de nombreuses NPs à base de PLGA(119) ou de PLA(120).

Les modes de fixation classique du PEG à la surface des NPs sont soit des méthodes physiques impliquant le revêtement de NPs préformées avec un conjugué PEG, soit la préparation de NPs avec des copolymères PEG séquencés, soit la fixation covalente du PEG avec un groupement fonctionnel réactif sur une surface préformée de NPs(121). Lorsque les NPs sont formées par des techniques d'émulsification, telles que la nano-précipitation, la stratégie d'association par physisorption est généralement utilisée. Cette dernière consiste à incuber les NPs préformées avec des molécules contenant du PEG dans un solvant aqueux afin de permettre l'association du PEG amphiphile à la surface de la NP par des interactions hydrophobes. Un exemple simple est l'utilisation du pluronic, une classe de polymère tribloc contenant un segment hydrophobe PPO flanqué de deux chaînes PEG hydrophiles, pour former un revêtement de PEG dense à la surface des NPs (figure 2.14.). Des études ont montré que le pluronic devait posséder un segment de chaîne hydrophobe supérieur à 3 kDa pour une adsorption et un masquage suffisant de l'enveloppe hydrophobe de la particule et ce quel que soit le type de polymère (PLGA, PCL, polystyrène,...)(122). Aussi, des NPs à base de PLGA enrobées de pluronic F-127 ont été capables de pénétrer dans les sécrétions de mucus, ce qui améliore leur distribution dans les cellules cancéreuses de la muqueuse vaginale ce qui a pour conséquence de supprimer plus efficacement la croissance tumorale et de prolonger la survie chez les souris(123). Dans un autre exemple, les NPs à base de polystyrène modifiées en surface par la poloxamine 908 se sont avérées efficaces pour contourner la reconnaissance par le MPS entraînant alors une résidence prolongée dans le sang(124).

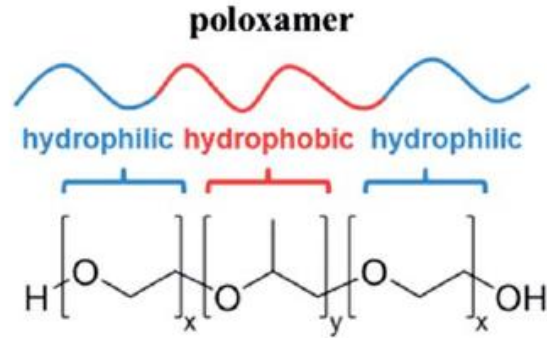


Figure 2.14. Structure théorique du poloxamère

Dans le but d'obtenir des nanoparticules capables d'administrer des médicaments de manière spécifique, le groupe de Kess(125), a synthétisé des nanoparticules de 115 nm de diamètre à base de PLGA par nano-précipitation stabilisées soit par du pluronic soit par du poloxamine. Les deux systèmes ont démontré une stabilité colloïdale élevée face à l'augmentation de la force électrolytique de la solution tandis que les nanoparticules sans pluronic s'agrègent. Les particules de PLGA ont un potentiel zêta négatif dû aux groupes terminaux carboxylates des chaînes de PLGA situées en surface. Néanmoins, une diminution du potentiel zêta des particules stabilisée par le pluronic amine a été constatée. Cette diminution est due à la protonation des groupes aminés. Ainsi, le pluronic rend la nanoparticule moins sensible aux variations de concentrations de l'électrolyte dans le milieu. De plus, l'introduction de groupes amine primaire à la surface des NPs offre une possibilité de couplage avec divers ligands permettant d'améliorer l'affinité membranaire des NPs.

Au-delà des poloxamères, il existe d'autres matériaux pouvant être utilisés pour recouvrir la surface des NPs telles que le polysorbate (Tween80) ou encore le DSPE-PEG (figure 2.15.) qui est l'un des surfactants les plus utilisés dans cette optique. Le groupe de Wang(126), utilise du DSPE-PEG modifié avec du maléimide pour encapsuler le StCN((Z)-2,3-bis[4-(N-4-(diphénylamino)styryl)phényl]-acrylonitrile). Les nanomicelles de phospholipides StCN@PEG obtenues ont un diamètre de 20 nm et présentent une excellente stabilité chimique. En effet, il a été prouvé dans cette étude que les nanomicelles rendent le fluorophore plus stable dans divers environnements biologiques et que les NPs résultantes sont facilement conjuguables avec des biomolécules. Les nanomicelles ont été mises en contact avec le Tween-20 (un surfactant très puissant) en solution aqueuse et aucune dissolution de la NP n'ont été constatées, ni aucune libération du fluorophore en solution.

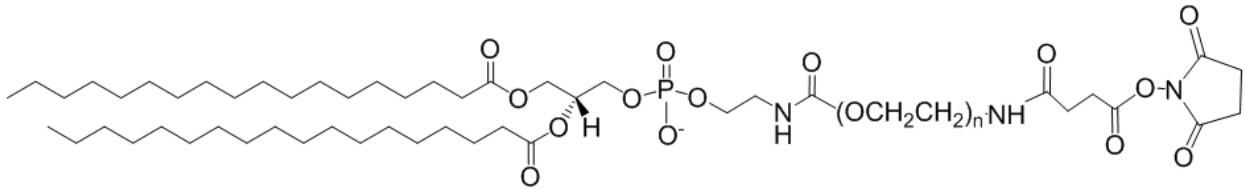


Figure 2.15. Structure théorique du DSPE-PEG

De même, notre groupe a récemment proposé l'utilisation du Tween80 ou du pluronic F127 comme agents stabilisants sur des nanoparticules de PLGA, PMMA et PCL(95) (figure 2.16.). Ces polymères ont été synthétisés par nano-précipitation afin d'obtenir de petites NPs et ensuite recouverts de surfactant de manière non covalente. L'utilisation du Tween80 a augmenté la taille des nanoparticules de 1,5 nm tandis que le pluronic l'a augmentée de 4,5 nm. Ces augmentations de taille correspondent à la formation d'une monocouche de surfactant à la surface des NPs. Ces surfactants ont rendu les NPs stables dans les milieux salins et surtout empêchent leurs interactions avec des protéines.

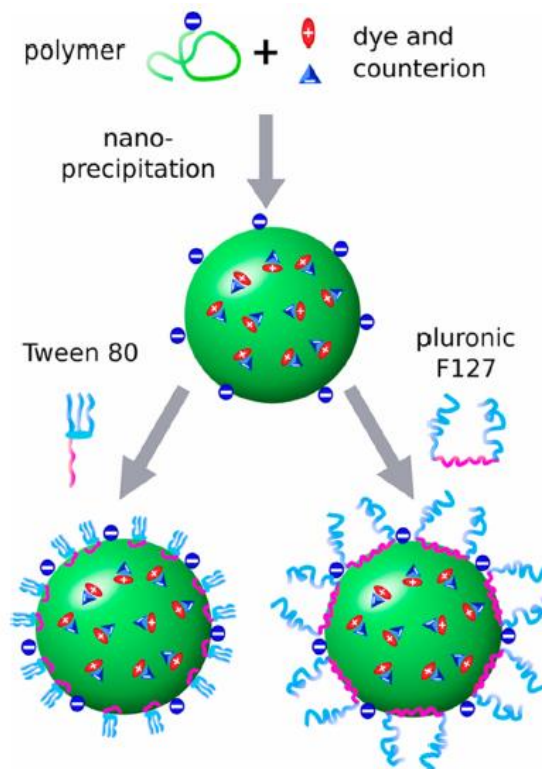


Figure 2.16. Schéma de la préparation des nanoparticules stabilisées par des surfactants de type Tween80 et pluronic F-127. Adapté de la référence 95.

Cette méthode a l'avantage d'être simple. Néanmoins, le surfactant directement adsorbé en surface peut également se désorber facilement laissant ainsi des « trous » dans l'enveloppe où les opsonines peuvent se lier(127).

Part III: Technique de caractérisation des NPs

De nos jours, diverses techniques de caractérisation des NPs ont été développées. Afin de déterminer, les caractéristiques de chaque échantillon, toutes les restrictions relatives à l'échantillon, les informations requises et le temps doivent être pris en compte (Tableau 3).

| Technique | Mesure | Echantillon | Sensibilité |
|-------------|--|---|-------------------------|
| DLS | Taille moyenne et répartition en taille | Suspension diluée | 1nm -10µm |
| FCS | Taille moyenne et distribution de taille, concentration et luminosité | Suspension diluée d'échantillon fluorescent | Jusqu'à 1nm |
| TIRF | Luminosité et distribution de la luminosité, photostabilité, comportement de la fluorescence | Fluorescent, immobilisé sur une surface en verre | Pas d'accès à la taille |
| TEM | Taille et caractérisation | <1µg doit être préparé sous forme de film mince et être stable sous un faisceau d'électrons et sous vide poussé | Jusqu'à 1nm |

Tableau 3. Comparaison des techniques couramment utilisées pour la caractérisation des NPs.

VII. Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est la technique non invasive la plus couramment utilisée dans la caractérisation de la taille et de la distribution des tailles des nanoparticules généralement dans la région submicronique. Cette technique nécessite une préparation minimale de l'échantillon et ne requiert aucun étalonnage pré-expérimental. Elle est basée sur la mesure du mouvement Brownien qui est un

déplacement aléatoire des particules provoqué par leur bombardement par des molécules de solvant. La DLS relie le mouvement Brownien et la taille des particules selon l'équation de Stokes-Einstein :

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

où $d(H)$ correspond au diamètre hydrodynamique, D est le coefficient de diffusion, k la constante de Boltzmann (constante physique reliant l'énergie au niveau de la particule individuelle avec la température, $1.38E^{23}$ J/K), T la température absolue, η la viscosité.

Le mouvement Brownien peut être mesuré en analysant le taux de fluctuation de la lumière diffusée. La lumière diffusée par les NPs est proportionnelle à r^6 (leur rayon à la puissance 6). La théorie de Rayleigh (diffusion élastique) est applicable aux petites molécules et particules dont le diamètre est inférieur au dixième de la longueur d'onde du laser. Cependant, lorsque les NPs deviennent plus grande que cette valeur, la diffusion devient anisotrope et la théorie de Mie devient applicable (diffusion inélastique).

Le mouvement brownien pourrait être mesuré en analysant le taux de fluctuation de la lumière diffusée. Habituellement, la fonction d'autocorrélation de photons est utilisée pour cela. L'idée est de mesurer le degré de similarité entre deux signaux, ou un signal avec lui-même sur différents intervalles de temps.

La fonction d'autocorrélation diminue dès le début de l'expérience, cependant, plus les particules sont petites et plus la fonction d'autocorrélation diminue rapidement (figure 3.1.).

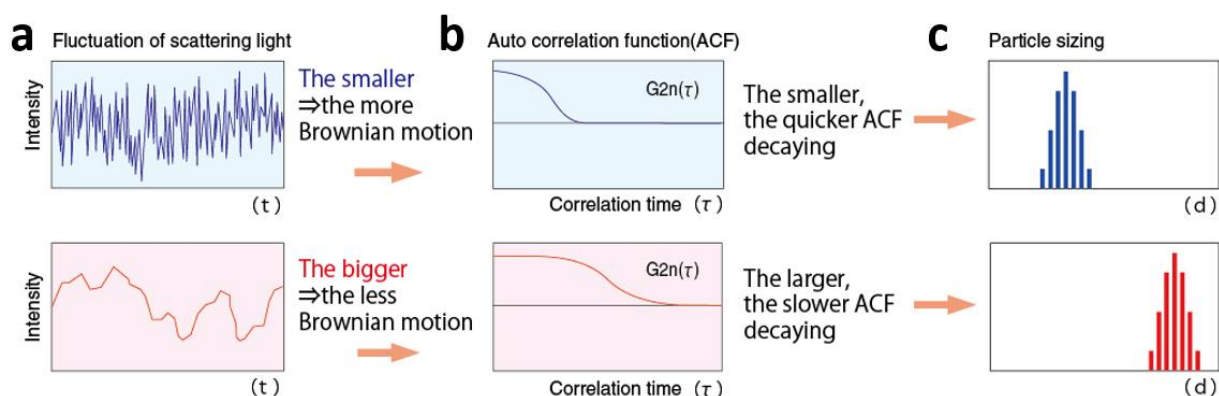


Figure 3.1. Exemples de mesures de diffusion de la lumière dynamique : a) courbe d'autocorrélation b) distribution de taille c) de petites NPs (encart supérieur) et grandes NPs (encart inférieur). Image adaptée de otsukael.com.

La taille peut être obtenue à partir de la fonction de corrélation en ajustant un exposant pour obtenir la taille moyenne (diamètre moyen z) et une estimation de la largeur de distribution en intensité (indice de polydispersité) ou multi-exponentielle pour obtenir la distribution de taille des particules. En utilisant la théorie de Mie, il est également possible d'obtenir une distribution en volume ou en nombre qui donne une vision plus réaliste du système.

La taille, déterminée par DLS, est la taille d'une sphère purement hypothétique qui a le même coefficient de diffusion que la particule et dépend de la structure de surface et de la couche de solvatation.

VIII. Spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS)

La spectroscopie de corrélation de fluorescence est une méthode permettant l'analyse temporelle et spatiale de molécules fluorescentes à faible concentration. Cette technique était initialement appliquée à l'étude des molécules puis c'est étendu aux NPs. Alors que la plupart des techniques de fluorescence s'intéressent à l'intensité du signal de fluorescence, la FCS est basée sur l'analyse des fluctuations temporelles de l'intensité de fluorescence mesurées dans un petit volume de l'ordre du femtolitre (volume focal) qui dépend du nombre de fluorophores et de la concentration en NPs. Les informations que l'on peut déduire par cette technique sont la concentration locale des NPs, leur constante de diffusion ainsi que leur brillance. Il s'agit d'une méthode non invasive et très sensible.

Dans une mesure FCS typique, l'intensité de fluorescence est enregistrée pour un petit nombre de molécules dans le volume focal sur une plage de temps allant d'une microseconde à 1 seconde. L'intensité de fluorescence dépendant du temps $F(\tau)$ est analysée par sa fonction d'autocorrélation temporelle $G(\tau)$ qui compare l'intensité de fluorescence au temps t avec l'intensité à $(t + \tau)$ où τ est un intervalle de temps moyenné sur l'ensemble des données de la série :

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(\tau) * \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle \delta F(\tau) \rangle^2}$$

La fonction d'autocorrélation contient toutes les informations concernant les concentrations, la cinétique de réaction et les vitesses de diffusion des molécules dans l'échantillon (figure 3.2.). L'amplitude de la fonction d'autocorrélation est inversement proportionnelle au nombre de molécules dans le volume focal et elle diminue de sa valeur initiale avec une dépendance temporelle déterminée par les vitesses de diffusion moléculaire.

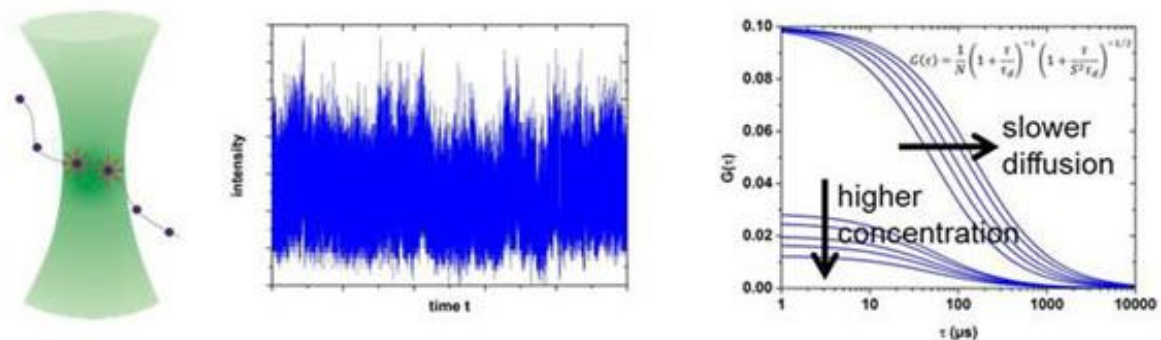


Figure 3.2. Schéma illustrant le principe de FCS. A) Faisceau d'excitation focalisé dans un liquide. B) Sonde diffusant à travers le volume focal donnant la fluctuation de l'intensité de fluorescence. C) Fonction d'autocorrélation.

Typiquement, une configuration FCS comprend une solution aqueuse contenant les espèces émissives dans une plaque à puits. Le faisceau laser est réfléchi par un miroir dichroïque dans un objectif avec une ouverture numérique élevée (NA) (figure 3.3.). La lumière de fluorescence émise est collectée par le même objectif, transmis à travers le miroir dichroïque et focalisée sur un diaphragme qui élimine toute la lumière émise à l'extérieur du volume focal. Une solution aqueuse contenant des espèces émissives est placée sur la plaque des puits. Le signal est ensuite détecté par une photodiode à avalanche en mode photocomptage puis corrélé pour générer la courbe FCS.

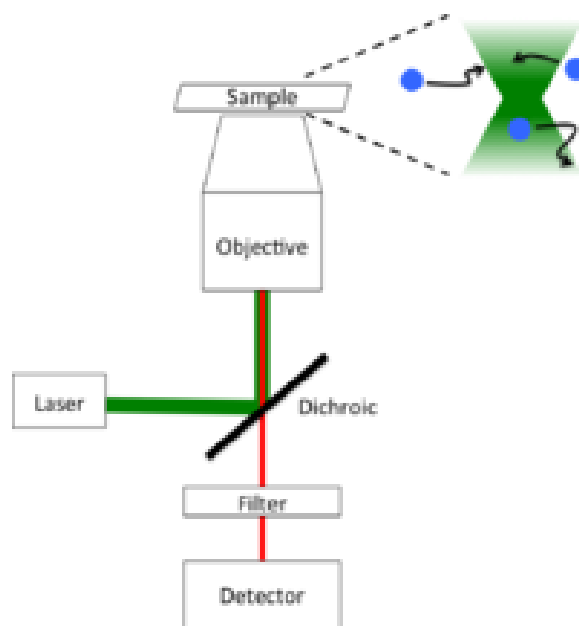


Figure 3.3. Schéma d'une configuration confocale pour la spectroscopie de corrélation de fluorescence.

Le FCS analyse correctement les échantillons uniquement si les volumes d'observation sont suffisamment petits et que l'échantillon est suffisamment dilué de sorte que seules quelques molécules peuvent être détectées simultanément. La FCS est très largement utilisée en recherche pour l'étude de processus multiples comme les interactions moléculaires et la cinétique. Elle peut également caractériser la taille, la luminosité et la stabilité des NPs fluorescentes.

IX. Microscopie électronique à transmission (TEM)

La microscopie électronique à transmission (TEM) est basée sur les mêmes principes que la microscopie optique mais exploite les électrons qui permettent d'obtenir une résolution allant jusqu'à 1 nm. Un canon à électron au sommet du microscope émet des électrons dans le vide au travers de la colonne du microscope après avoir été focalisé par l'intermédiaire de lentilles électromagnétiques dans un faisceau très mince. Ce faisceau traverse l'échantillon et, en fonction de la densité du matériau, certains des électrons sont dispersés et disparaissent du faisceau. Au bas du microscope, les électrons non diffusés frappent un écran fluorescent et forment une image à contraste de phase de l'échantillon (figure 3.4.). L'image aura une résolution déterminée par la longueur d'onde des électrons mais aussi par les imperfections de l'optique électronique.

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{\sqrt{2m_e E_b}}$$

La qualité de l'imagerie des NPs dépend fortement du contraste de l'échantillon à l'arrière-plan. À cette fin, les NP doivent être séchées sur une grille de cuivre recouverte d'une fine couche de carbone. Les matériaux avec une densité électronique plus élevée que le carbone amorphe sont facilement imagés (argent, or, cuivre, aluminium, etc.). Pour d'autres matériaux, une coloration supplémentaire doit être appliquée. L'analyse de la taille est simple puisqu'une moyenne peut être faite si les NPs apparaissent en surface. Les résultats généralement présentés sont la taille moyenne et l'écart-type de la distribution en taille de l'échantillon.

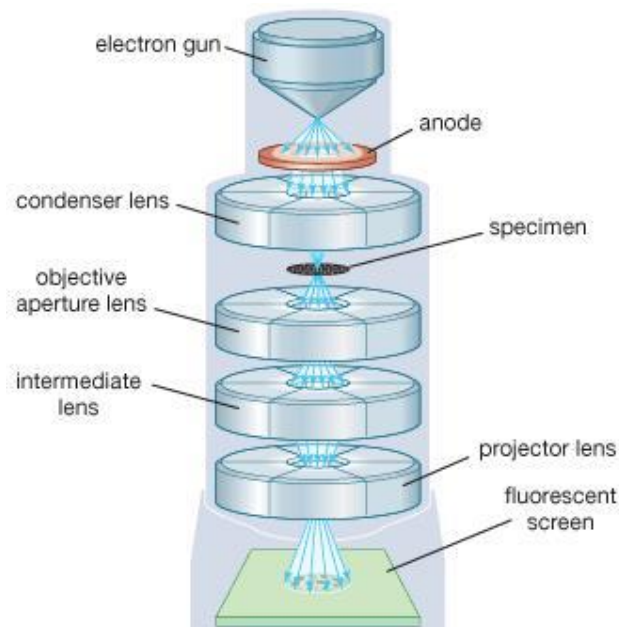


Figure 3.4. Représentation schématique du TEM. Adapté de britannica.com.

X. Microscopie à réflexion interne totale (TIRF)

La microscopie à réflexion interne totale (TIRF) ou microscopie à onde évanescente est appropriée pour des études de localisation et de dynamique des molécules. Elle repose sur l'excitation de l'échantillon par des ondes évanescentes. Ces dernières existent lorsque la lumière est totalement réfléchi au niveau de l'interface entre deux milieux ayant des indices de réfractifs dissemblables. Quand le faisceau d'excitation passe d'un milieu d'indice de réfraction $n_1 = 1.51$ (lamelle en verre) à un milieu d'indice de réfraction $n_2 = 1.33$ (eau) inférieur, il heurte l'interface entre ces milieux à un angle

d'incidence suffisamment faible pour lequel il lui est impossible de se propager dans le second milieu et est ainsi réfléchi dans le premier. En conséquence, seuls les fluorophores dans une zone mince de 100 nm à partir d'une surface solide d'indice de réfraction supérieur au milieu de l'échantillon sont excités. On obtient alors une image de haute qualité avec un faible bruit de fond de fluorescence et sans aucune fluorescence non focalisée pour lequel il devient possible d'observer la fluorescence des molécules individuelles (figure 3.5.).

L'illumination se fait avec un angle donnant une réflexion totale qui peut être obtenu de 2 façons :

- 1) Le faisceau d'excitation passe par un prisme et excite l'échantillon en réflexion totale puis la fluorescence est récupérée par l'objectif.
- 2) Le faisceau d'excitation passe par un objectif de grande ouverture numérique, avec un angle supérieur à l'angle critique, puis la fluorescence est récupérée par l'objectif.

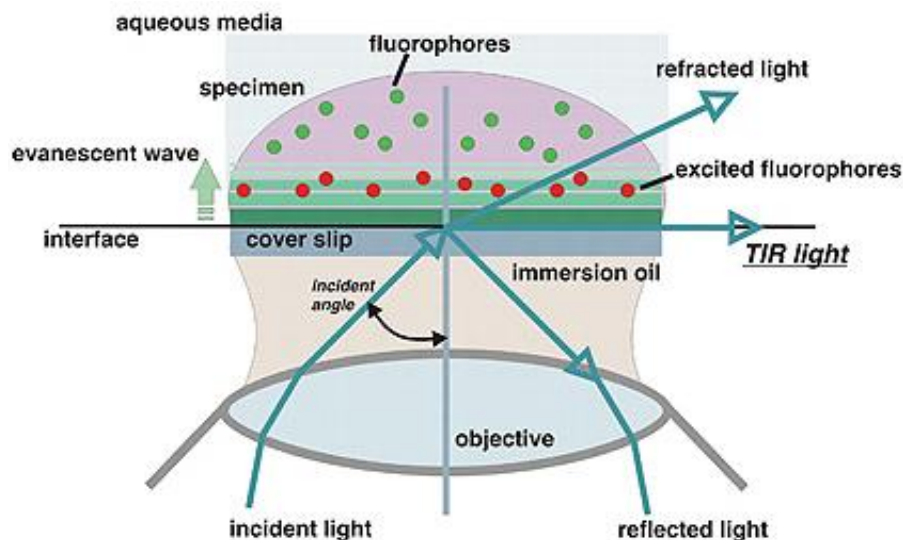


Figure 3.5. Représentation schématique du TIRF. Adapté de ncl.ac.uk

Part IV : Résultats et discussion

Nanoparticules polymériques dopées en fluorophores de taille semblable à celle des protéines pour une diffusion libre des particules au sein du cytosol

Dans ce chapitre, nous allons tenter de répondre à une question fondamentale : quelle taille doivent avoir des nanoparticules afin de pouvoir bouger librement dans le cytosol ? Répondre à cette question reste un défi car il est difficile d'obtenir une série de nanoparticules de même nature et de mêmes propriétés de surface avec des tailles bien définies et allant de celle des protéines jusqu'à des dizaines, voire une centaine de nanomètres (celle des endosomes). Or, atteindre toutes les parties du cytosol est d'une importance capitale pour pratiquement toute application des nanoparticules à l'intérieur des cellules.

A cette fin, nous avons développé un concept original pour obtenir des nanoparticules d'une taille similaire à celle des protéines. Ici, nous utilisons des groupements chargés directement sur les polymères et en particulier en faisant varier leur nombre et leur type pour réduire et contrôler la taille de NPs assemblées par nano-précipitation. Trois séries de copolymères à base de méthacrylate de méthyle portant des groupements acides carboxylique, sulfonate ou triméthylammonium dans leurs chaînes latérales ont été synthétisées. Le pourcentage de groupes chargés a été modifié de 1 à 10% en moles. Ces nanoparticules encapsulent un fluorophore avec son contre-ion volumineux (R18/F5-TPB ou DiD/F12-TPB) les rendant extrêmement fluorescentes et permettant un suivi au niveau de la particule unique dans le cytosol des cellules (schéma 1).

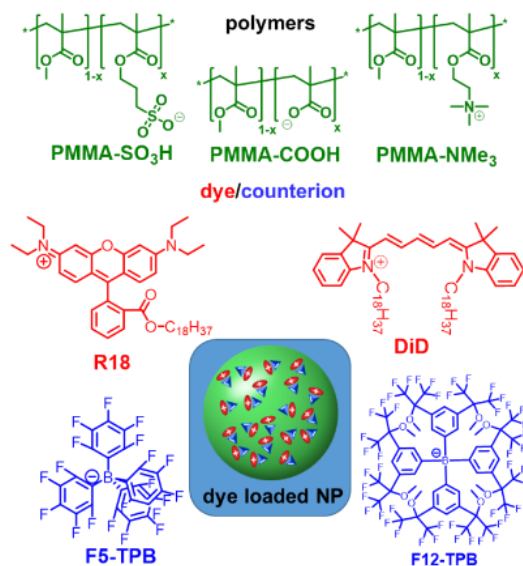


Schéma 1. Structure des polymères, des fluorophores et des contre-ions ainsi que la représentation schématique d'une nanoparticule.

A partir de ces polymères, nous avons assemblé des NPs par nano-précipitation. La taille des NPs obtenues a diminué systématiquement avec l'augmentation du pourcentage de groupements chargés. Pour les polymères portant des groupes sulfonate et triméthylammonium, la taille a atteint respectivement 8 et 7 nm pour un pourcentage de 5%. Les particules fabriquées à partir de polymères portant les groupes carboxylate sont systématiquement plus grandes. L'incorporation de groupes chargés, que ce soit négativement ou positivement, permet donc d'obtenir des NPs plus petites grâce à la répulsion électrostatique des chaînes de polymères et une densité de charge élevée à la surface des NPs. De plus, l'ajout de NaCl dans le milieu de précipitation diminue ces forces répulsives et nous a permis d'augmenter la taille des particules (figure 1).

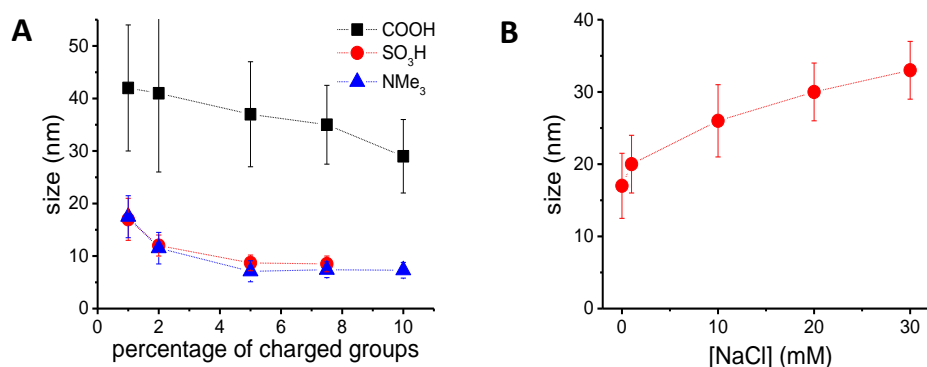


Figure 4.1. Tailles des nanoparticules polymériques synthétisées par nano-précipitation : A) Influence de la fraction des groupes chargés sur le polymère et B) de la concentration en NaCl pour des particules assemblées avec un PMMA-SO₃H 1%.

De cette façon, nous avons synthétisé des nanoparticules de diamètre allant de 50 nm à 7 nm, qui sont parmi les plus petites tailles obtenues pour des nanoparticules fluorescentes organiques.

Ces nanoparticules ont ensuite été micro-injectées dans le cytosol de cellules HeLa. L'imagerie et le suivi des particules au niveau de la particule unique ont mis en évidence une diffusion des nanoparticules fortement dépendante de leur taille. En effet, les particules avec une taille moyenne inférieure à 17 nm ont la faculté de diffuser plus rapidement et d'accéder à toutes les parties du cytosol lors de la micro-injection que les particules avec une taille moyenne supérieure à 32 nm. Ainsi, cette étude suggère qu'une taille de particules critique de 23 nm est nécessaire pour une diffusion libre des nanoparticules au sein du cytosol (figure 2).

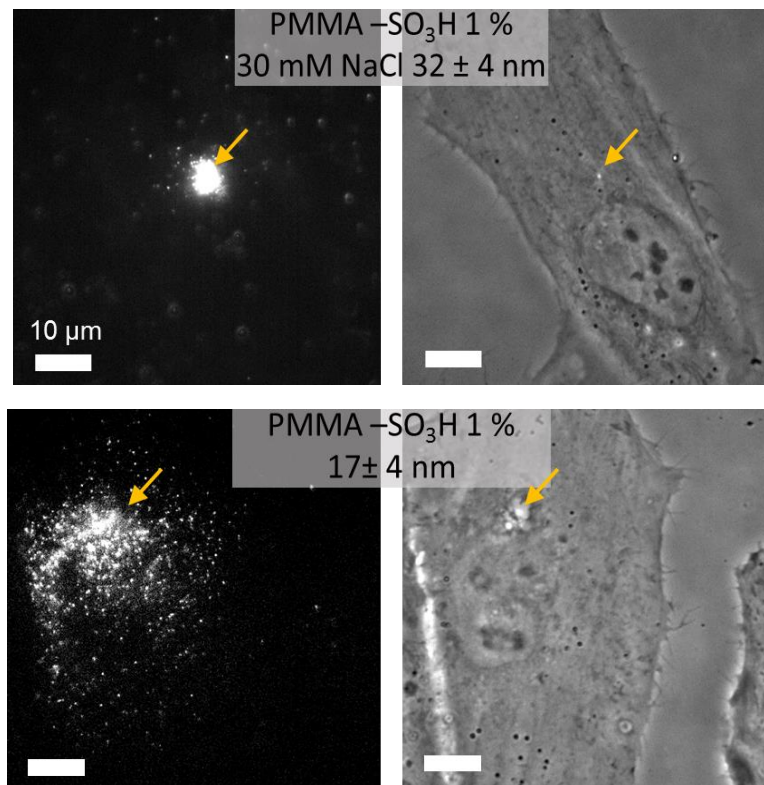


Figure 2. Microinjection de nanoparticules dans des cellules HeLa. Les images de gauche sont des projections maximales de micrographies de fluorescence recueillies pendant 1 minute (50 ms par image) de nanoparticules constituées de PMMA-SO₃H, chargées avec 10% de R18/F5-TPB et recouvertes de Tween 80. Les images de droite sont des images en contraste de phase des cellules correspondantes. Les barres d'échelle correspondent à 10 µm.

L'utilisation de polymères chargés pour l'assemblage de NPs par nanopréciipitation ouvre la voie à des nanoparticules fluorescentes organiques de très petites taille permettant des applications allant du suivi à grande vitesse des biomolécules uniques

avec une précision de localisation élevée. De plus, cette approche de contrôle de taille des nanoparticules peut devenir une technique générale pour la préparation de « nanocarriers » à base de polymères transportant soit des médicaments soit des agents de contraste.

Ces résultats ont été publiés dans l'article : Andreas Reisch, Doriane Heimbürger, Pauline Ernst, Anne Runser, Pascal Didier, Denis Dujardin, and Andrey S. Klymchenko. Protein-sized dye-loaded polymer nanoparticles for intracellular single-particle imaging. *Adv. Funct. Mater.* (<https://doi.org/10.1002/adfm.201805157>) La description complète de ce travail se trouve dans l'article ci-dessous.



Protein-Sized Dye-Loaded Polymer Nanoparticles for Free Particle Diffusion in Cytosol

Andreas Reisch,* Doriane Heimburger, Pauline Ernst, Anne Runser, Pascal Didier, Denis Dujardin, and Andrey S. Klymchenko*

How small should nanoparticles be in order to travel freely through the cytosol similar to proteins? Answering this question remains a challenge, because the majority of nanoparticles are relatively large and their size cannot be finely tuned to match that of proteins. Here, poly(methyl methacrylate) copolymers with varied fraction and type of charged groups (carboxylate, sulfonate, and trimethylammonium) are developed, yielding nanoparticles with controlled sizes from 50 to 7 nm through nanoprecipitation. Loading these nanoparticles with a rhodamine dye/bulky counterion pair at 10wt% makes them highly fluorescent. After their coating with polyethylene glycol groups for preventing non-specific protein binding and microinjection into living cells, the first systematic study of the size effect on diffusion in the cytosol for solid nanoparticles of the same nature is realized. Single-particle-tracking data provide evidence for distinct particle sieving in the cytosol, suggesting that only nanoparticles below a critical size of 23 nm exhibit free diffusion and spreading. These findings show the size limitations imposed by intracellular crowding and compartmentalization, which is critical for applications of nanomaterials in the cytosol. The proposed concept of polymer design opens the route to organic nanoparticles of ultrasmall sizes and high loading for bioimaging and drug-delivery applications.

1. Introduction

Proteins are nature's ultimate nanoparticles (NPs), combining a large spectrum of functionalities with highest specificity, a size small enough to access nearly any desired location, and biodegradability. In consequence, ultrasmall polymer NPs mimicking their behavior have a high potential as bioimaging agents and drug carriers.^[1,2] They could, for example, play a key role in single-molecule imaging of biomolecules inside living cells using fluorescence microscopy. Studying the behavior of single molecules is of key importance for the understanding of biological processes at the molecular level, but requires labeling

of the biomolecules of interest with fluorescent probes.^[3–5] The speed and resolution, with which the biomolecules can then be tracked, depend on the number of collected photons.^[6] In consequence, the brightness of the probe is particularly important, especially as already quite low light intensities can alter the behavior of cells.^[7–9] At the same time, the probes themselves should not interfere with the studied biological systems. Ideal probes would thus combine high brightness with small size, close to that of single proteins,^[10,11] and absence of non-specific interactions.^[12–14]

The limited brightness of organic fluorophores and fluorescent proteins, can be overcome by using fluorescent NPs.^[15–17] The most popular examples include quantum dots (QDs),^[13,18–20] dye-doped silica NPs,^[21] NPs based on the assembly of dyes,^[22,23] conjugated polymer NPs,^[24–27] aggregation induced emission NPs,^[28,29] dye-loaded polymer NPs,^[30,31] etc. The latter appeared recently as systems with exceptional brightness,^[32,33] which already found applications in super-resolution imaging,^[32] amplified single-molecule detection,^[34] and multicolor cellular imaging.^[35,36]

Non-specific interactions of NPs with biological molecules, on the other hand, can be suppressed through modification of the surface with polyethylene glycol (PEG) or other hydrophilic groups as zwitterions.^[37,38] However, what is the ideal size of NPs for intracellular applications, notably in view of the crowded and complex structure of the cytosol?^[39–44] Do NPs have to be as small as proteins, or is the size of endosomes sufficient? Indeed, while the influence of NP size on their fate *in vivo*^[45,46] or on the interactions with cells has been evaluated in detail,^[47,48] studies on its influence on intracellular diffusion of solid NPs, especially on the single-particle level, are largely missing. Size dependence of intracellular behavior has, up to now, mainly been studied for macromolecules as dextrans^[49] and DNA^[50] using ensemble methods.^[41,42,51] These macromolecular nanoscale objects are, however, expected to behave, in view of their deformability, totally different from "hard" (solid) NPs, such as QDs, magnetic, carbon, and silica NPs or NPs based on hydrophobic polymers. Although solid particles have been extensively studied in biological and biomedical fields for imaging to drug-delivery applications,^[15,16,52–54] the effect of their size on the intracellular diffusion at the single-particle level has not been systematically

Dr. A. Reisch, D. Heimburger, P. Ernst, A. Runser, Prof. P. Didier,
Dr. D. Dujardin, Dr. A. S. Klymchenko
Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies
UMR 7021 CNRS
Faculté de Pharmacie
Université de Strasbourg
67401 Illkirch, France
E-mail: reisch@unistra.fr; andrey.klymchenko@unistra.fr

The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/adfm.201805157>.

DOI: 10.1002/adfm.201805157

investigated. A probable reason is that it remains a challenge to prepare a series of fluorescent NPs of the same nature with finely tuned sizes down to the level of single proteins, while maintaining a sufficient brightness for single-particle visualization.^[55] To evaluate the optimal size for intracellular imaging, we consider dye-loaded polymer NPs to be excellent candidates.

Approaches to the synthesis of small polymeric NPs include notably different types of emulsion polymerizations^[56,57] and self-assembly of block copolymers.^[58,59] Nanoprecipitation of preformed polymers is a simple technique for preparation of NPs, which also allows encapsulation of drugs and contrast agents.^[60,61] In order to reduce the size of polymeric NPs in the latter case, controlling the parameters of nanoprecipitation, e.g. the presence of charged groups,^[62] concentration,^[63] mixing speed,^[64] and type of solvent,^[65] can be successfully employed. However, so far, dye-loaded polymer NPs, assembled through nanoprecipitation, had never reached sizes of ≤ 10 nm, which would match the dimensions of proteins. Here, we varied the type and the fraction of charged groups on poly(methyl methacrylate) (PMMA) to reduce maximally the size of dye-loaded polymer NPs. This allowed us to create series of particles of the same nature and surfaces but varying size. We then studied the influence of the size and surface of these particles on their behavior in the cytosol. The observed size-dependent diffusion of the particles has profound consequences for understanding steric restrictions imposed by the cytosol on nanomaterials, which is of key importance for their intracellular applications.

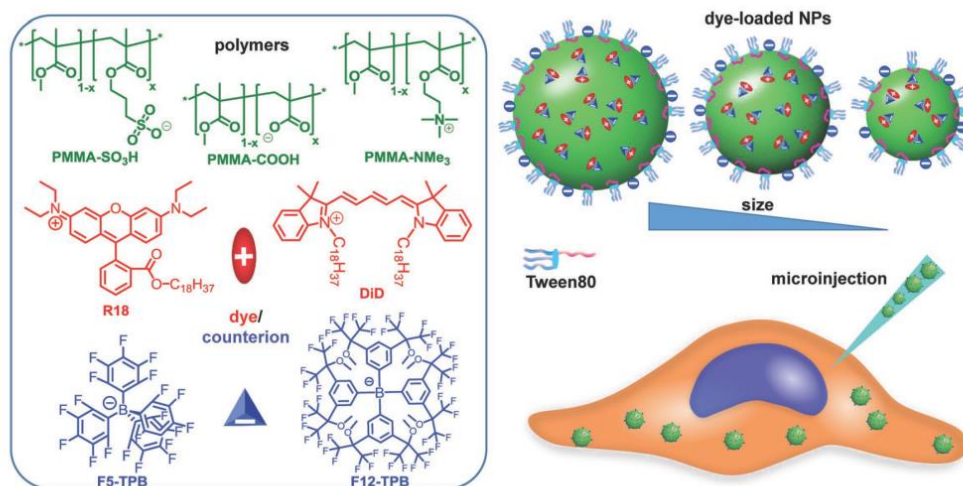
2. Results and Discussion

2.1. Polymer Synthesis and Nanoparticle Assembly and Characterization

Three series of methyl methacrylate-based copolymers bearing either carboxylic acid, sulfonate or trimethylammonium

groups in their side chains were synthesized (**Scheme 1**). The percentage of charged groups was varied from 1 to 10 mol%. Polymerization yielded copolymers with molecular weights around 50 000 for carboxylate and sulfonate polymers and 90 000 for trimethylammonium polymers. The fraction of charged groups in the polymers could be well controlled and was, according to NMR, close to the fraction in the feed. These polymers, dissolved in acetonitrile, were then nanoprecipitated in water to yield NPs. Their size decreased systematically with increasing percentage of charged groups (**Figure 1**). For sulfonate and trimethylammonium-bearing polymers the size reached 8 and 7 nm, respectively, at $\geq 5\%$ of charged groups. This corresponds to approximately 8 and 4 polymer chains per NP at the obtained molecular weights. At 10% of sulfonate groups transmission electron microscopy (TEM) images did not show particles anymore, but rather deposition of unstructured polymer, indicating a limit to particle formation. Particles made from carboxylate bearing polymers were systematically larger, though the size was reduced using buffer at pH 7.4 (Figure S2, Supporting Information). Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) was used to measure the hydrodynamic diameter of the particles (**Figure 2**). These results confirmed the trends observed by TEM, giving nearly identical sizes for the small sulfonate particles [17, 13, and 9 nm for 1, 2, and 5% PMMA-SO₃H (poly(methyl methacrylate-co-3-sulfoethyl methacrylate)) NPs, respectively]. A bit larger sizes were observed for the larger NPs [86 nm for poly(methyl methacrylate-co-methacrylic acid) (PMMA-COOH) 1% NPs and 53 nm for PMMA-SO₃H 1% NPs made in 30×10^{-3} M NaCl] due to the stronger contribution of larger particles to the fluorescence signal.

For sulfonate and trimethylammonium polymers, the number of charged groups per particle was around 100 independently of polymer composition and thus particle size (Table S1, Supporting Information). Particle growth and thus incorporation of new polymers in the NPs, hence, stopped once this threshold was reached, probably due to electrostatic repulsion.



Scheme 1. Structures of polymers, dyes, and counterions used in this study, and schematic representation of preparation of dye-loaded NPs of different sizes and their microinjection.

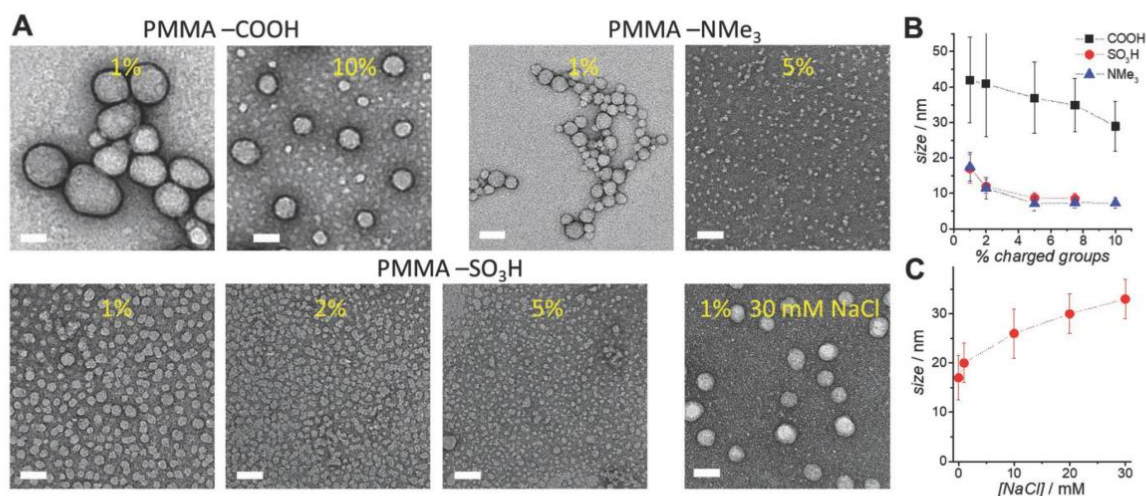


Figure 1. Sizes of NPs made by nanoprecipitation: A) TEM images of NPs made from different polymers in water or 30×10^{-3} M NaCl. Scale bars, 50 nm. B) Influence of the fraction of charged groups on the size of NPs. C) Influence of NaCl concentration in the precipitation medium on the size of PMMA-SO₃H 1% NPs. In (B) and (C), mean values of sizes determined by TEM are given for NPs loaded with 10 wt% of R18/F5-TPB. At least 200 NPs were analyzed per condition. Error bars give full width at half-maximum of the distribution.

In consequence, the particle size decreased for more charged polymer. In MilliQ water, the Debye screening length exceeds 10 nm and thus all the charges on these small NPs can

contribute to repulsion of an incoming chain. By contrast, the effective charge of the carboxylate groups in MilliQ water is lower, and the particles thus reach sizes larger than the Debye screening length. In consequence, particle growth is stopped only when a given surface charge density is reached, as observed previously.^[66,67] Importantly, addition of NaCl in the precipitation medium that decreases these repulsive forces allowed us to increase the size of particles made from a given polymer (Figure 1).

These NPs were made fluorescent through the encapsulation of 10 wt% of a rhodamine dye salt (R18/F5-TPB, wt% relative to polymer, Scheme 1).^[32] The bulky counterion prevents aggregation of dyes in the polymer matrix, leading to high fluorescence quantum yields $\approx 50\%$ even at this high loading (Table S2, Supporting Information). Consequently, the estimated brightness of 17, 12, and 9 nm PMMA-SO₃H NPs was 7×10^6 , 2×10^6 , and 7×10^5 M cm⁻¹, respectively, that is 25, 10, and 3 times higher than that of corresponding quantum dots (QD585) at 532 nm excitation. Fluorescence microscopy of single particles immobilized on surfaces confirmed these estimations (Figure 3A and Figure S4, Supporting Information), showing that our NPs are brighter than QDs despite their much smaller size.

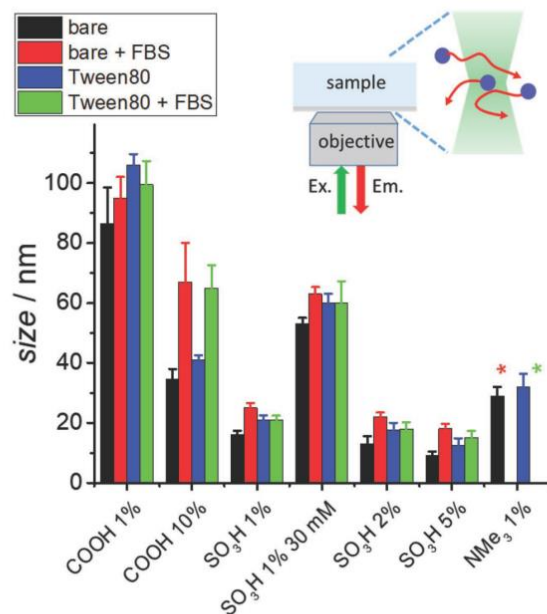


Figure 2. FCS on dye-loaded polymer NPs: hydrodynamic sizes of NPs with and without surface treatment with Tween 80 in different conditions as determined by FCS. Given are the sizes of as made NPs, NPs exposed to 10 vol% FBS solution, NPs pre-treated with 0.05 mg mL⁻¹ Tween 80 and then exposed or not to 10 vol% FBS solution. NPs were loaded with 1 or 2 wt% of R18/F5-TPB. Error bars give SEM over three measurements. *Aggregation or no particles were detected. Inset: Schematic view of the FCS technique.

2.2. Microinjection of Nanoparticles

In order to render these NPs resistant to protein adsorption they were treated with Tween 80, a PEG-bearing surfactant.^[62] Their interaction with serum proteins was then studied with FCS (Figure 2). Adsorption of Tween 80 led to an increase of the particle size by ≈ 5 nm, which suggests adsorption of a monolayer. When solutions of 10% fetal bovine serum (FBS) were added to the resulting particles, the particle size for PMMA-SO₃H and 1%-PMMA-COOH NPs did not change, suggesting that a monolayer of Tween 80 is sufficient to suppress

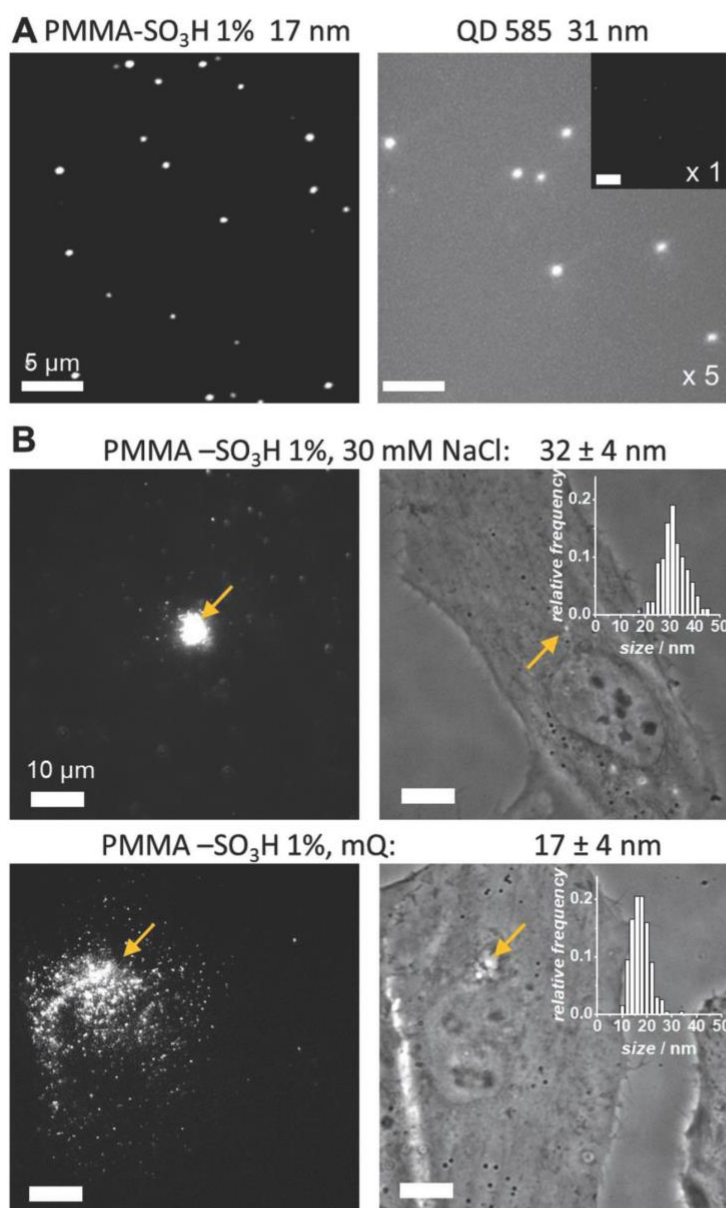


Figure 3. Microscopy of NPs on surfaces and in the cytosol. A) Microscopy images of PMMA-SO₃H 1% NPs loaded with 10 wt% R18/F5-TPB and of QDs 585 immobilized on a surface in TIRF mode (532 nm laser excitation, 12 W cm⁻²). For better visibility, the QD intensity was increased fivefold (original in inset). Scale bars, 5 μm. B) Microinjection of NPs in living HeLa cells. Left hand: epi-fluorescence micrographs of 32 and 17 nm PMMA-SO₃H 1% NPs made in 30 × 10⁻³ M NaCl and MilliQ water, respectively. Right hand: phase-contrast images of the corresponding cells. Injection points are indicated by arrows. Scale bars, 10 μm. Insets show distributions of particle sizes obtained by TEM. NPs were loaded with 10 wt% of R18/F5-TPB and coated with Tween 80.

non-specific interactions with serum proteins. The behavior of these NPs treated with Tween 80 and having different sizes was then studied in the cytosol. For this, we microinjected solutions

of NPs directly into the cytosol of living HeLa cells (Figure 3B, and Figure S5 for other NP types and videos in SI). Dye leaching from all used NPs was virtually absent, at least on the time scale of our study. Indeed, no diffuse intracellular labeling (notably of mitochondria) was observed, as would be expected for the case of leaching of the used R18 dye.^[68,69] Individual NPs and their movement could be easily observed and tracked inside cells at low illumination intensities (2 W cm⁻²). The vast majority of larger NPs (42 nm, and 29 nm NPs made of PMMA-COOH 1% and 10%, respectively, and 32 nm PMMA-SO₃H 1% particles, made in 30 × 10⁻³ M NaCl) remained close to the point of injection. Only very few of these particles actually moved inside the cell and their movements were restricted to the immediate surroundings of the injection point. However, smaller NPs of 17 nm, made from PMMA-SO₃H 1% in MilliQ water, spread practically through the entire cell. Most (≈90%) of these particles moved quickly throughout the cytosol (Figure 3B and Supporting Videos). This suggests a critical size required for efficient spreading throughout the cytosol. A closer look at the image sequences shows that some particles from 32-nm formulation spread inside the cells, whereas about 10% of particles from 17-nm formulation remained close to the point of injection. This phenomenon can be explained by non-negligible size distribution in these two formulations of NPs. The particle size distribution of the NPs from the 17-nm formulation (insets in Figure 3B) shows that about 10% of the particles are larger than 23 nm, while about 5% of NPs from the 32-nm formulation are smaller than 23 nm. This indicates that the actual critical size of the hard particle core for spreading throughout the cytosol is situated at around 23 nm.

We then studied the intracellular movement of these NPs in more detail. In particular, we wanted to know, whether and how a further reduction in the size of NPs would influence their movement inside cells. PMMA-SO₃H NPs of 12 and 9 nm size, as those of 17 nm, spread well throughout the cells and retained a high mobility (Figure 4 and Figure S5, Supporting Information). A particularly good impression of the spreading of the particles can notably be obtained through a maximum projection of the particle fluorescence over a given observation time (Figures 4A and 5). We then performed single-particle-tracking analysis on 17 and 9 nm particles using threefold lower particle concentration

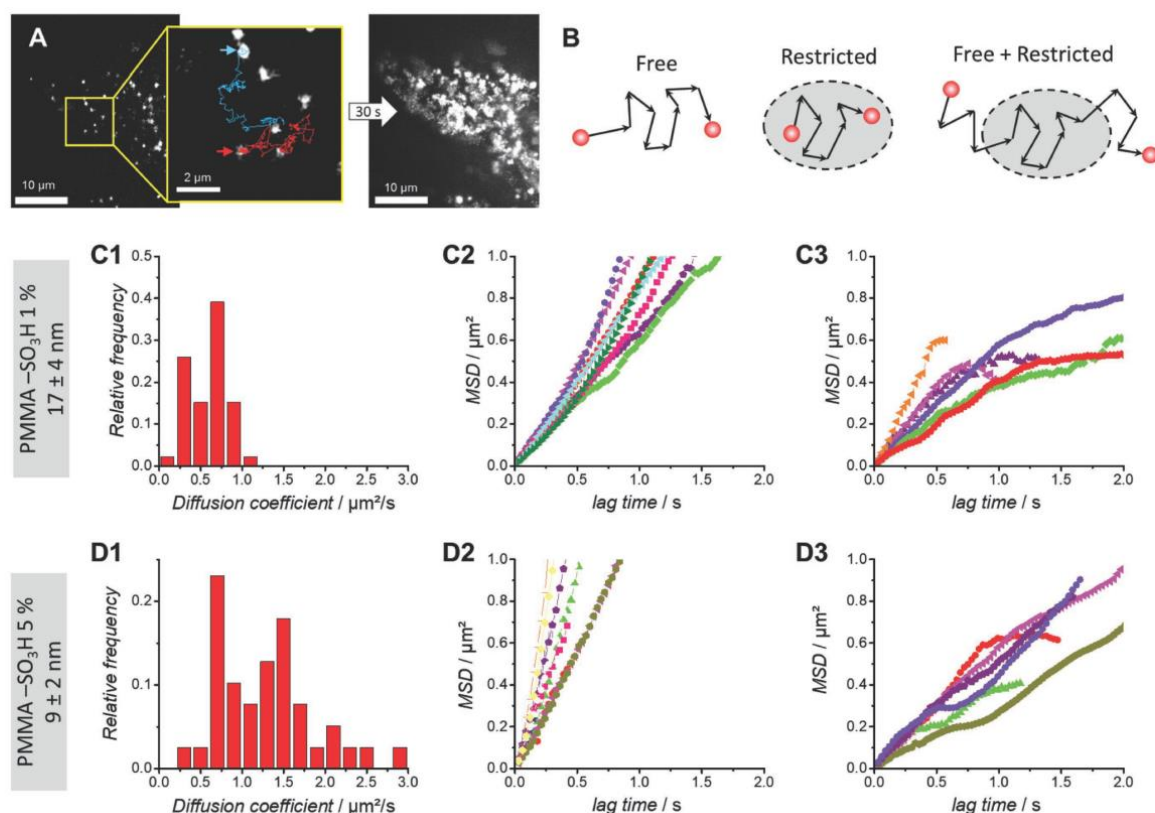


Figure 4. Diffusion of NPs in the cytosol studied by single-particle fluorescence microscopy. A) 17 nm PMMA-SO₃H NPs in a HeLa cell (HiLo mode, 532 nm laser excitation, 2 W cm⁻², 30 ms per frame). The trajectories of two particles (arrows) are shown. Right hand: maximum projection of the acquisition over 30 s. NPs were loaded with 10 wt% of R18/F5-TPB and coated with Tween 80. B) Three simplified cases of intracellular diffusion: free, restricted, and combination of free and restricted diffusion. Analysis of single-particle trajectories for PMMA-SO₃H 1% 17 nm NPs (C1–C3) and PMMA-SO₃H 5% 9 nm NPs (D1–D3). C1, D1) Distribution of diffusion coefficients as obtained from the initial slope of the MSD curves. C2, C3, D2, D3) MSD versus lag time for several representative trajectories, showing straight curves (C2, D2) and kinks (C3, D3). At least 60 trajectories from three different cells were analyzed per condition.

and a microscope operating in highly inclined and laminated optical sheet (HILO) mode^[70] with laser illumination and an EMCCD camera. Plotting mean square displacement (MSD) versus time for individual trajectories allows characterizing the diffusion behavior, such as diffusion coefficient and type of diffusion (i.e., free, restricted diffusion or their combination, Figure 4B).^[42,71,72] First, the initial slope can be used to extract the diffusion coefficient on a local scale for the 2D projection.^[71,72] Both 17 and 9 nm NPs showed a broad (nearly bimodal) distribution of diffusion times, indicating that the diffusion of part of NPs (about 30%) was significantly slowed, probably due to non-specific interactions or a strong spatial restriction (Figure 4B, C1, and D1). The diffusion coefficients were centered $\approx 0.7 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ for the 17 nm NPs and $\approx 1.5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ for the 9 nm NPs, corresponding to the higher mobility of the smaller particles. These values are considerably higher than diffusion coefficients obtained for QDs in the cytosol,^[73–75] in line with the smaller size of our NPs. Second, further information on the movement of the particles can be obtained from the shape of the plots of MSD as a function of

lag time (Figure 4C2, C3, D2, and D3): free Brownian diffusion is seen as a straight line; occurrence of plateaus or kinks indicates confined (restricted) diffusion, with the position of the plateau giving access to the size of the involved structures; and upward bending of the curves indicates superdiffusion often due to an active transport or a flow.^[42,71,72] The latter was virtually absent for both particle sizes analyzed here. The relative importance of free-diffusive and subdiffusive behavior, however, was significantly different for 17 versus 9 nm NPs. In the case of 9 nm NPs more than 60% of the MSD curves were entirely straight indicating free diffusion. These corresponded mainly to those having high initial diffusion coefficients. Interestingly from the curves having visual kinks, corresponding to restricted diffusion, about 75% showed a stabilization or even a regain in the slope of the curve after the kink (Figure 4C, bottom right). This behavior indicates that the particles were able to overcome the spatial restrictions.^[42,72] In the case of the 17 nm NPs only about 40% of the particles showed relatively straight MSD curves corresponding to free Brownian diffusion. Furthermore, in the cases where the MSD curves showed

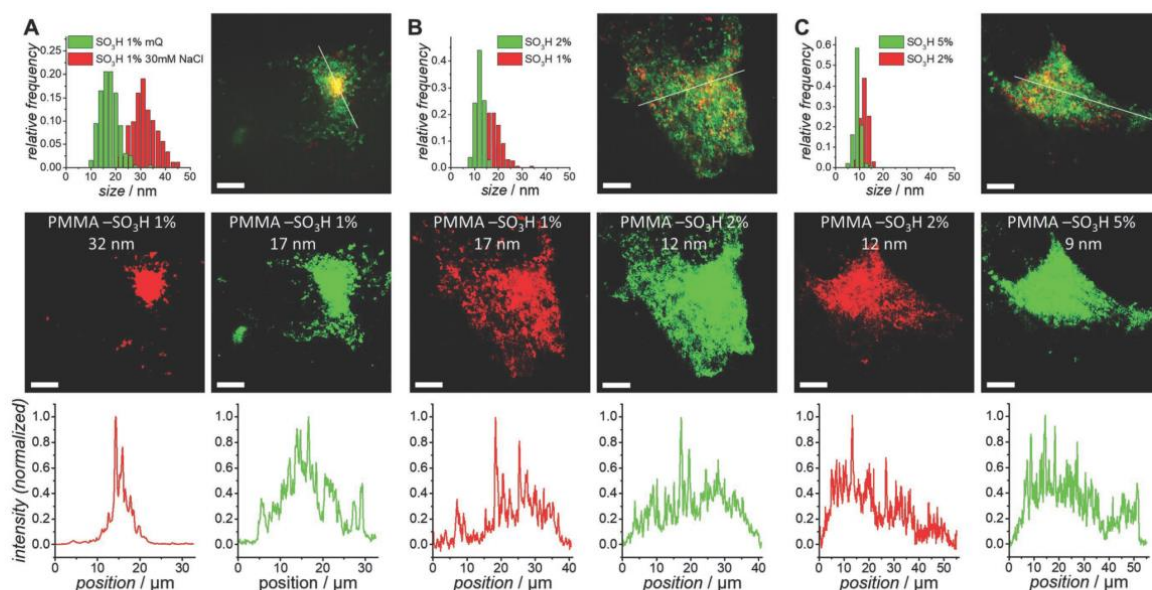


Figure 5. Two-color imaging of different sets of PMMA-SO₃H NPs co-microinjected into the cytosol. A) 32 nm (red) and 17 nm (green) NPs, prepared from PMMA-SO₃H 1% in 30×10^{-3} M NaCl and MilliQ water, respectively. B) 17 nm (red) and 12 nm (green) NPs. C) 12 nm (red) and 9 nm (green) NPs. Particles presented in red were loaded with 20×10^{-3} M DiD/F12-TPB, particles in green with 10 wt% of R18/F5-TPB, all were coated with Tween 80. In each part, the panels represent: top left: size distributions from TEM; top right: superposition of maximum projections over 1 min; middle: threshold images obtained from the projections; and bottom: intensity profiles along the lines indicated in top right. Scale bars, 10 μ m.

kinks, most actually reached plateau values, indicating that particle movement was indeed restricted to certain regions.

In order to directly compare the intracellular behavior of different NPs of close sizes (and thus overcome cell-to-cell variations in injection or morphology), we performed pairwise comparison of a subset of NPs co-injected in the same cell. For this, we labeled two different types of NPs to be compared with dyes of different colors, a rhodamine (R18/F5-TPB) and a cyanine 5 (DiD/F12-TPB) (Scheme 1), mixed them at equivalent particle concentrations, and injected them together, before imaging them in two separate channels (Figure 5). Comparison of the 32 and 17 nm PMMA-SO₃H NPs confirmed the differences observed when injecting the particles in different cells (Figures 5A and 3B): localization and immobilization of the larger NPs around the injection point and spreading of the smaller ones. Co-injecting 17 and 12 nm PMMA-SO₃H NPs showed that both spread through the entire cell (Figure 5B). However, the 17 nm NPs were excluded from several intracellular regions where the 12 nm NPs had access (lower panels in Figure 5B). Finally, a comparison of 12 and 9 nm PMMA-SO₃H NPs showed slightly better accessibility of the latter mainly at the edge of cells with a flat morphology (Figure 5C).

We thus observed distinct diffusion behavior of solid NPs depending on their size: particles with sizes of 32 nm remained (on the time scale of our experiments) confined to the region of injection. Particles of 17 nm already spread throughout the entire cell. Comparison of the size distributions for these two types of NPs gave a critical size of 23 nm, below which NPs tended to spread well inside the cells. Smaller NPs of 12 and 9 nm showed improved access to some regions of the cytosol.

Especially, the 9 nm NPs were capable to access regions at the edge of the cell, and were, based on the MSD curves better capable to escape from restricted compartments. It should be taken into account that the particle sized described here correspond to hard-sphere diameters estimated from TEM, whereas intracellular diffusion should be governed by the hydrodynamic diameter, which is somewhat larger (Figure 2).

These results can be compared to previous experimental data using mostly ensemble methods and deformable macromolecules as well as to different approaches to model diffusion in the cytosol.^[39,40,42,51,76] From a structural point of view, a major barrier to diffusion is the cytoskeleton. Using different methods, mesh sizes in the range of 30–100 nm were found,^[77,78] although even smaller particles of 10 nm were restricted in their movement by the actin cytoskeleton.^[79] A second barrier to diffusion, notably in the perinuclear region, is constituted by the endoplasmatic reticulum (ER) and the Golgi apparatus. It has notably been observed that QDs of 27 nm and macromolecules of 48 nm were restricted in their movement by the ER and the trans-Golgi.^[73,77] The increased density and finely divided filaments of the cytoskeleton at the edge of the cells were noted to restrict the access of macromolecules further, leading to strongly decreased partitioning for macromolecules larger than 20 nm.^[77,80] The nucleus finally was only accessible to macromolecules smaller than 7 nm.^[49] This suggests that spreading of our larger particles, injected in the perinuclear region, is limited by the ER and the Golgi in combination with the cytoskeleton. The critical size of 23 nm revealed in our work for hard particles is in good agreement with the lower mesh sizes found for the cytoskeleton (30 nm). This suggests that

the smallest mesh sizes are effective for restricting the motion of hard particles. The diffusion restrictions for intermediate-sized particles of 17 nm, could notably stem from the spaces in-between cisternae of the Golgi and in voids of the ER, which create small compartments. Smaller particles can probably still escape relatively quickly from such compartments. Our results showed that particles larger than 10 nm were at least partially excluded from the edges of the cells, indicating again that the critical sizes for hard particles are smaller than those for deformable macromolecules. Finally, our particles did not significantly enter the nucleus and did not appear to localize specifically inside other intracellular compartments, in line with the size restrictions mentioned above.

In a different approach, the so-called length-scale-dependent viscosity model, the cytosol is considered as a heterogeneous, crowded mixture, and the viscosity experienced by a probe depends on its size (relative to that of the crowding agent) and on the relative crowding.^[42,51] Two limiting dimensions of the diffusing particles emerge from this model: particles smaller than the correlation length feel the nanoscale viscosity of the solution and basically move freely in-between the obstacles. Particles with sizes above the limiting length, on the other hand, are subject to the macroscale viscosity. For these particles, the cytosol resembles a gel or even a colloidal glass strongly restricting their motion. For HeLa and Swiss 3T3 cells, these lengths were found, mainly based on DNA and dextrans, to be respectively 5 and 7 nm for the correlation length and 86 and 30 nm for the limiting size. Similar results were found for bacterial cytoplasm, with a critical size in the range of 30–40 nm for the diffusion of protein-based particles. Above this size the bacterial cytoplasm showed glass-like properties in the absence of metabolic activity.^[81] With respect to this model even the sizes of the smallest particles studied here were already above the correlation length. The critical size of 23 nm found here is of the same order, yet again below that found for deformable macromolecules. Together these results show the influence and importance of particle size for the behavior of solid NPs, and, how these differ from the results obtained for deformable macromolecules, even though they follow the same trends.

3. Conclusions

In order to address the question of the optimal size of NPs for intracellular applications, we designed a series of dye-loaded polymer NPs with finely tuned sizes. The control of the fraction of charged groups, notably sulfonate and trimethylammonium, allowed achieving particle sizes below 10 nm, and thus attaining the sizes of proteins. Despite their small size these particles could be made brightly fluorescent (3–25-fold brighter than corresponding QDs) by encapsulating dyes at high concentration. This in turn made them suitable for single-particle tracking inside the cytosol even at low light excitation intensities. Using a series of NPs with sizes of 9, 12, 17, and 32 nm, we could evaluate for the first time the influence of particle size on the movement of solid particles in the cytosol: NPs below a critical size of ≤ 23 nm were required to obtain spreading throughout the living cell. Still smaller particle sizes are required to quickly reach all regions of the cytosol. Our findings

on the size-dependent intracellular diffusion of solid particles are of highest importance for practically any application of NPs in the complex intracellular environment. Moreover, our concept of polymer design opens the route to organic NPs of ultra-small sizes, which should enable high-speed tracking of single biomolecules with high localization precision.

4. Experimental Section

Materials: Methyl methacrylate (99%), methacrylic acid (99%), 3-sulfopropyl methacrylate potassium salt (98%), [2-(methacryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride (75% in water), acetonitrile (anhydrous, 99.8%), rhodamine B octadecyl ester perchlorate (>98.0%), lithium tetrakis(pentafluorophenyl)borate ethyl etherate were purchased from Sigma–Aldrich.

R18/F5-TPB, the salt of Rhodamine B octadecyl ester with tetrakis(pentafluorophenyl)borate, and Cy5/F12-TPB (or DiD/F12-TPB), the salt of DiD with sodium tetrakis[3,5-bis(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-methoxy-2-propyl)phenyl]borate trihydrate were synthesized through dye exchange followed by purification through column chromatography as described previously.^[32,35] MilliQ-water (Millipore) was used in all experiments. Qdot 585 Streptavidin Conjugates were purchased from Thermo-Fisher Scientific.

Synthesis of Polymers: The different polymers were synthesized through free radical polymerization. Methyl methacrylate and the corresponding charged monomer were both dissolved in degassed acetonitrile or DMSO and mixed at the desired ratio. 0.01 eq. of AIBN were added and the round bottom flask was placed in an oil bath preheated to 70 °C. Once the conversion reached 25%, the reaction was stopped and the polymers reprecipitated twice in methanol and/or water. After drying, the polymers were characterized through NMR and size exclusion chromatography.

Poly(Methyl Methacrylate-co-Methacrylic Acid): Methyl methacrylate and methacrylic acid were both dissolved in degassed acetonitrile at a concentration of 1 M. The two solutions were then mixed in a 100 mL two-neck round bottom flask equipped with a stirring bar at the desired ratio to give a total volume of 40 mL (e.g., for 1% of methacrylic acid: 39.6 mL of methyl methacrylate solution and 0.4 mL of methacrylic acid solution). The mixture was degassed by bubbling argon for 5 min and placed under argon atmosphere. 0.01 eq of AIBN in acetonitrile (40 mg mL⁻¹) were added and the round bottom flask was placed in an oil bath preheated to 70 °C. At regular intervals, samples were drawn, dissolved in DMSO-d₆ and analyzed by NMR. Once the conversion reached 25%, the reaction was stopped by quickly cooling it to RT. Part of the acetonitrile was evaporated under reduced pressure and the reaction mixture was added dropwise to methanol. After filtration, the precipitate was redissolved in a small amount of acetonitrile and reprecipitated twice in methanol. The obtained polymer was dried under vacuum. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 3.60 (s, 3 H), 2.2–0.5 (m, 6 H). Molecular weight by GPC: 1%: $M_w = 38\ 100$, $M_w/M_n = 1.35$; 5%: $M_w = 46\ 800$, $M_w/M_n = 1.34$.

Poly(Methyl Methacrylate-co-3-Sulfopropyl Methacrylate): Methyl methacrylate and 3-sulfopropyl methacrylate potassium salt were dissolved in degassed DMSO at a concentration of 2 M. The two solutions were then mixed in a 50 mL two-neck round bottom flask equipped with a stirring bar at the desired ratio to give a total volume of 20 mL. The mixture was degassed by bubbling argon for 5 min and placed under argon atmosphere. 0.01 eq. of AIBN in DMSO (40 mg mL⁻¹) were added and the round bottom flask was placed in an oil bath preheated to 70 °C. At regular intervals samples were drawn, dissolved in DMSO-d₆ and analyzed by NMR. Once the conversion reached 25%, the reaction was stopped by quickly cooling it to RT. The reaction mixture was then added dropwise to methanol, or, for higher percentages of the charged monomer, to water. After filtration, the precipitate was redissolved in a small amount of acetonitrile and reprecipitated twice in methanol (water for highest percentages). The obtained polymer was dried under vacuum. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ): 3.97 (br. s, 0.02–0.2 H),

3.57 (s, 3 H), 2.45 (m, partial covered by the solvent peak), 2.1–0.5 (m, 6 H). Fraction of SO₃H groups based on the peak at 3.97 ppm (feed: obtained): 1%:1.1%; 2%:2.3%; 5%:5.5%, 10%:12%. Molecular weight by GPC: 1%: $M_w = 51\,200$, $M_w/M_n = 1.58$; 5%: $M_w = 48\,400$, $M_w/M_n = 1.08$.

Poly(Methyl Methacrylate-co-[2-(Methacryloyloxy)ethyl]trimethylammonium) (PMMA-NMe₃): Methyl methacrylate was dissolved in degassed DMSO at a concentration of 2 M. [2-(methacryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride was diluted with DMSO to yield a 2 M solution. The two solutions were then mixed in a 50 mL two-neck round bottom flask equipped with a stirring bar at the desired ratio to give a total volume of 20 mL. The mixture was degassed by bubbling argon for 5 min and placed under argon atmosphere. 0.01 eq. of AIBN in DMSO (40 mg mL⁻¹) were added and the round bottom flask was placed in an oil bath preheated to 70 °C. At regular intervals, samples were drawn, dissolved in DMSO-d₆ and analyzed by NMR. Once the conversion reached 25%, the reaction was stopped by quickly cooling it to RT. The reaction mixture was then added dropwise to methanol, or, for higher percentages of the charged monomer, to water. After filtration, the precipitate was redissolved in a small amount of acetonitrile and reprecipitated twice in methanol (water for highest percentages). The obtained polymer was dried under vacuum. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ): 4.37 (br. s, 0.02–0.2 H), 3.70 (br. s, 0.02–0.2), 3.55 (s, 3 H), 3.17 (s, 0.09–0.9 H), 2.1–0.4 (m, 6 H). Fraction of NMe₃ groups based on the peak at 3.17 ppm (feed: obtained): 1%:1.1%; 2%:2.4%; 5%:5.8%, 10%:12.2%. Molecular weight by GPC: 1%: $M_w = 99\,900$, $M_w/M_n = 1.62$; 5%: $M_w = 95\,300$, $M_w/M_n = 1.22$.

Preparation of NPs: Solutions of the polymers at 2 mg mL⁻¹ in acetonitrile (up to 15 vol% methanol for >5% charged groups), containing the desired amount of dye (1, 10, or 20 wt% relative to the polymer) were added quickly and under stirring (shaking) using a micropipette to a tenfold volume excess of water, NaCl solution, or 20 × 10⁻³ M pH 7.4 phosphate buffer at 21 °C. The particle solution was then quickly diluted fivefold in water.

For FCS experiments these solutions were diluted twofold, and Tween 80 was added to obtain a Tween 80 concentration of 0.05 g L⁻¹. For cell experiments, the particle solutions were diluted to a particle concentration of 2–5 nM, followed by the addition of Tween 80 to obtain a Tween 80 concentration of 0.05 g L⁻¹.

Characterization of NPs: Absorption and emission spectra were recorded on a Cary 4000 Scan ultraviolet–visible spectrophotometer (Varian) and FluoroMax-4 spectrofluorometer (Horiba Jobin Yvon) equipped with a thermostated cell compartment, respectively. QYs were calculated using rhodamine 101 in ethanol as standard (QY = 0.9).^[82]

Electron Microscopy: 5 μL of the particle solution were deposited onto carbon-coated copper–rhodium electron microscopy grids that were used either as obtained or following an air or amylamine glow-discharge. The grids were then treated for 1 min with a 2% uranyl acetate solution for staining and observed with a Philips CM120 TEM equipped with an LaB₆ filament and operating at 100 kV. Areas covered with NPs of interest were recorded at different magnifications on a Peltier cooled CCD camera (Model 794, Gatan, Pleasanton, CA). Image analysis was performed using the Fiji software.

Fluorescence Correlation Spectroscopy: FCS measurements were performed on a home-built confocal set-up based on a Nikon inverted microscope with a Nikon 60 × 1.2NA water immersion objective. Excitation was provided by a continuous wave (CW) laser diode (532 nm, Oxixius) and photons were detected with a fibered avalanche photodiode (APD SPCM-AQR-14-FC, Perkin Elmer) connected to an online hardware correlator (ALV7000-USB, ALV GmbH, Germany). Typical acquisition time was 5 min (10 × 30 s) with an excitation power of 0.5 mW at the sample level. The data were analyzed using the PyCorrFit software.^[83]

Fluorescence Microscopy: Two set-ups were used for fluorescence microscopy: microinjection itself and part of the cellular single-particle imaging (notably the two-color imaging) were performed on a Leica DMIRE 2 microscope equipped with a control system of 37 °C, 5% CO₂ (Life Imaging Services), a 100 × HCX PL APO CS (1.4 NA) objective using a Photometrics Prime sCMOS camera piloted by the Metamorph software, a Xenon-lamp and Leica Y3 and Y5 filter cubes. Single-particle

measurements and part of the intracellular single-particle tracking were performed in the TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) or HILO mode on a home-made wide-field setup based on an Olympus IX-71 microscope with an oil immersion objective (NA = 1.49, 100x). A DPPS (Cobolt) CW laser emitting at 532 nm was used for excitation at 12 W cm⁻² for immobilized single particles, and at 2 W cm⁻² for cellular imaging. The fluorescence signal was recorded with an EMCCD (ImagEM Hamamatsu) using an exposure of 30.5 ms per image frame. For single-particle fluorescence microscopy measurements, the NPs were immobilized either on glass surfaces on which a polyethyleneimine layer was initially adsorbed or in 15 wt% poly(vinyl alcohol), as described previously.^[11,32] The surfaces were left in MilliQ-water during microscopy. QDs were immobilized and imaged in the same way as the NPs. Single-particle analysis was performed using the Fiji software as described previously.^[82,33]

Cellular Experiments: HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (without phenolred, Gibco-Invitrogen), supplemented with 10% FBS (Lonza), L-glutamine, and 1% antibiotic solution (penicillin-streptomycin, Gibco-Invitrogen) at 37 °C in humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells were seeded onto round microscope cover glasses (diameter 18 mm) deposited in six well plates at a density of 125 × 10³ cells per well 24 h before the microinjection.

Microinjection of NPs and Cellular Imaging: For microinjection experiments, subconfluent HeLa cells plated on glass coverslips were mounted in a Ludin Chamber (Life Imaging Services, Basel, Switzerland). The cells were then placed on the Leica DMIRE 2 microscope and solutions of the different NPs at particle concentrations of 0.5–2 nM were microinjected into the perinuclear region of the cells, using a Femtojet/InjectMan NI2 microinjector (Eppendorf). Images sequences were then acquired either on the same setup or with the Olympus set-up used for single-particle imaging after transfer of the samples. Time-lapse movies were analyzed using the ImageJ (National Institutes of Health, USA) software with the Mosaic module for single-particle tracking.^[84] Obtained trajectories were checked for artefacts (e.g., wrong connections, which were rare). At least three cells with 60 trajectories per condition were analyzed.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

D.H. and P.E. contributed equally to this work. This work was supported by the European Research Council ERC Consolidator grant BrightSens 648528 and by the Agence Nationale de Recherche JC/JC grant "Supertrack" ANR-16-CE09-0007. The authors thank C. Ruhlmann and C. Crucifix from the FRISBI platform (ANR-10-INBS-05) for help with electron microscopy, R. Vauchelles and the QUEST platform imaging facility for help with fluorescence microscopy, and M. Legros and C. Fousat for size exclusion chromatography.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords

diffusion in the cytosol, fluorescent polymer nanoparticles, intracellular particle sieving, single-particle tracking

Received: July 26, 2018
Revised: September 5, 2018
Published online:

- [1] C. Wong, T. Stylianopoulos, J. Cui, J. Martin, V. P. Chauhan, W. Jiang, Z. Popović, R. K. Jain, M. G. Bawendi, D. Fukumura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 2426.
- [2] Y. Tsvetkova, N. Beztsinna, M. Baues, D. Klein, A. Rix, S. K. Golombek, W. Al Rawashdeh, F. Gremse, M. Barz, K. Koynov, S. Banala, W. Lederle, T. Lammers, F. Kiessling, *Nano Lett.* **2017**, *17*, 4665.
- [3] S. Shashkova, M. C. Leake, *Biosci. Rep.* **2017**, *37*, BSR20170031.
- [4] A. Kusumi, T. A. Tsunoyama, K. M. Hirose, R. S. Kasai, T. K. Fujiwara, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 524.
- [5] A. J. Nelson, S. T. Hess, *J. Microsc.* **2014**, *254*, 1.
- [6] H. Deschout, F. C. Zancchi, M. Młodzianowski, A. Diaspro, J. Bewersdorf, S. T. Hess, K. Braeckmans, *Nat. Methods* **2014**, *11*, 253.
- [7] R. Dixit, R. Cyr, *Plant J.* **2003**, *36*, 280.
- [8] J. Icha, M. Weber, J. C. Waters, C. Norden, *BioEssays* **2017**, *39*, 1700003.
- [9] P. P. Laissue, R. A. Alghamdi, P. Tomancak, E. G. Reynaud, H. Shroff, *Nat. Methods* **2017**, *14*, 657.
- [10] P. Çakir, A. Cutivet, M. Resmini, B. T. S. Bui, K. Haupt, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 1048.
- [11] I. Shulov, R. V. Rodik, Y. Arntz, A. Reisch, V. I. Kalchenko, A. S. Klymchenko, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 15884.
- [12] C. Veigel, C. F. Schmidt, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 163.
- [13] F. Pinaud, S. Clarke, A. Sittner, M. Dahan, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 275.
- [14] S. J. Sahl, S. W. Hell, S. Jakobs, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 685.
- [15] O. S. Wolfbeis, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4743.
- [16] P. D. Howes, R. Chandrawati, M. M. Stevens, *Science* **2014**, *346*, 1247390.
- [17] M. Elsbahy, G. S. Heo, S.-M. Lim, G. Sun, K. L. Wooley, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 10967.
- [18] P. Pierobon, G. Cappello, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 167.
- [19] L. Cognet, C. Leduc, B. Lounis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *20*, 78.
- [20] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Science* **2005**, *307*, 538.
- [21] S. Bonacchi, D. Genovese, R. Juris, M. Montalti, L. Prodi, E. Rampazzo, N. Zaccheroni, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 4056.
- [22] A. Kaeser, A. P. H. J. Schenning, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 2985.
- [23] E. Genin, Z. Gao, J. A. Varela, J. Daniel, T. Bsaibess, I. Gosse, L. Groc, L. Cognet, M. Blanchard-Desce, *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 2258.
- [24] J. Yu, C. Wu, S. P. Sahu, L. P. Fernando, C. Szymanski, J. McNeill, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18410.
- [25] J. Pecher, S. Mecking, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6260.
- [26] C. Wu, D. T. Chiu, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 3086.
- [27] H. Wang, P. Zhang, Y. Hong, B. Zhao, P. Yi, J. Chen, *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 5795.
- [28] K. Li, B. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 6570.
- [29] X. Gu, R. T. K. Kwok, J. W. Y. Lam, B. Z. Tang, *Biomaterials* **2017**, *146*, 115.
- [30] A. Reisch, A. S. Klymchenko, *Small* **2016**, *12*, 1968.
- [31] M. P. Robin, R. K. O'Reilly, *Polym. Int.* **2015**, *64*, 174.
- [32] A. Reisch, P. Didier, L. Richert, S. Oncul, Y. Arntz, Y. Mély, A. S. Klymchenko, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4089.
- [33] A. Reisch, K. Trofymchuk, A. Runser, G. Fleith, M. Rawiso, A. S. Klymchenko, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 43030.
- [34] K. Trofymchuk, A. Reisch, P. Didier, F. Fras, P. Gilliot, Y. Mely, A. S. Klymchenko, *Nat. Photonics* **2017**, *11*, 657.
- [35] B. Andreiuk, A. Reisch, M. Lindecker, G. Follain, N. Peyri ras, J. G. Goetz, A. S. Klymchenko, *Small* **2017**, *13*, 1701582.
- [36] J. Chen, W. Zhong, Y. Tang, Z. Wu, Y. Li, P. Yi, J. Jiang, *Macromolecules* **2015**, *48*, 3500.
- [37] J. S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, L. M. Ensign, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2016**, *99*, 28.
- [38] Z. G. Estephan, P. S. Schlenoff, J. B. Schlenoff, *Langmuir* **2011**, *27*, 6794.
- [39] K. Luby-Phelps, *Int. Rev. Cytol.* **2000**, *192*, 189.
- [40] K. Luby-Phelps, *Mol. Biol. Cell* **2013**, *24*, 2593.
- [41] K. Norregaard, R. Metzler, C. M. Ritter, K. Berg-Sørensen, L. B. Oddershede, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 4342.
- [42] F. Höfling, T. Franosch, *Rep. Prog. Phys.* **2013**, *76*, 046602.
- [43] D. Wirtz, *Annu. Rev. Biophys.* **2009**, *38*, 301.
- [44] J. A. Dix, A. S. Verkman, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 247.
- [45] H. S. Choi, W. Liu, F. Liu, K. Nasr, P. Misra, M. G. Bawendi, J. V. Frangioni, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 42.
- [46] H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno, Q. Chen, M. Murakami, M. Kimura, Y. Terada, M. R. Kano, K. Miyazono, M. Uesaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 815.
- [47] R. Ferrari, M. Lupi, F. Falcetta, P. Bigini, K. Paoletta, F. Fiordaliso, C. Bisighini, M. Salmona, M. D'Incalci, M. Morbidelli, D. Moscatelli, P. Ubezio, *Nanotechnology* **2014**, *25*, 045102.
- [48] L. Shang, K. Nienhaus, G. U. Nienhaus, *J. Nanobiotechnol.* **2014**, *12*, 5.
- [49] K. Luby-Phelps, D. L. Taylor, F. Lanni, *J. Cell Biol.* **1986**, *102*, 2015.
- [50] E. Dauty, A. S. Verkman, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 7823.
- [51] T. Kalwarczyk, N. Ziębacz, A. Bielejewska, E. Zaboklicka, K. Koynov, J. Szymański, A. Wilk, A. Patkowski, J. Gapiński, H.-J. Butt, R. Hołyst, *Nano Lett.* **2011**, *11*, 2157.
- [52] L. H. Reddy, J. L. Arias, J. Nicolas, P. Couvreur, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 5818.
- [53] F. Tang, L. Li, D. Chen, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 1504.
- [54] F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, V. Preat, *J. Controlled Release* **2012**, *161*, 505.
- [55] M. J. Saxton, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 12805.
- [56] K. Landfester, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 4488.
- [57] F. Candau, M. Pabon, J.-Y. Anquetil, *Colloids Surf. A* **1999**, *153*, 47.
- [58] F. Gu, L. Zhang, B. A. Tepy, N. Mann, A. Wang, A. F. Radovic-Moreno, R. Langer, O. C. Farokhzad, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2586.
- [59] G. Riess, *Prog. Polym. Sci.* **2003**, *28*, 1107.
- [60] E. Lepeltier, C. Bourgaux, P. Couvreur, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2014**, *71*, 86.
- [61] S. Schubert, J. T. Delaney, U. S. Schubert, *Soft Matter* **2011**, *7*, 1581.
- [62] A. Reisch, A. Runser, Y. Arntz, Y. Mély, A. S. Klymchenko, *ACS Nano* **2015**, *9*, 5104.
- [63] F. Lince, D. L. Marchisio, A. A. Barresi, *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *322*, 505.
- [64] W. S. Saad, R. K. Prud'homme, *Nano Today* **2016**, *11*, 212.
- [65] M. Beck-Broichsitter, J. Nicolas, P. Couvreur, *Nanoscale* **2015**, *7*, 9215.
- [66] M. Li, M. Jiang, L. Zhu, C. Wu, *Macromolecules* **1997**, *30*, 2201.
- [67] D. Horn, J. Rieger, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 4330.
- [68] B. Andreiuk, A. Reisch, V. G. Pivovarenko, A. S. Klymchenko, *Mater. Chem. Frontiers* **2017**, *1*, 2309.
- [69] I. Shulov, S. Oncul, A. Reisch, Y. Arntz, M. Collot, Y. Mely, A. S. Klymchenko, *Nanoscale* **2015**, *7*, 18198.
- [70] M. Tokunaga, N. Imamoto, K. Sakata-Sogawa, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 159.
- [71] N. Ruthardt, D. C. Lamb, C. Bräuchle, *Mol. Ther.* **2011**, *19*, 1199.
- [72] C. D. Rienzo, E. Gratton, F. Beltram, F. Cardarelli, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 12307.
- [73] H. Li, S.-X. Dou, Y.-R. Liu, W. Li, P. Xie, W.-C. Wang, P.-Y. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 436.
- [74] K. Susumu, E. Oh, J. B. Delehanty, F. Pinaud, K. B. Gemmill, S. Walper, J. Breger, M. J. Schroeder, M. H. Stewart, V. Jain, C. M. Whitaker, A. L. Huston, I. L. Medintz, *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 5327.

- [75] E. Derivery, E. Bartolami, S. Matile, M. Gonzalez-Gaitan, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 10172.
- [76] T. Kalwarczyk, K. Sozanski, A. Ochab-Marcinek, J. Szymanski, M. Tabaka, S. Hou, R. Holyst, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *223*, 55.
- [77] D. W. Provan, A. McDowall, M. Marko, K. Luby-Phelps, *J. Cell Sci.* **1993**, *106*, 565.
- [78] C. Kronlage, M. Schäfer-Herte, D. Böning, H. Oberleithner, J. Fels, *Biophys. J.* **2015**, *109*, 687.
- [79] M. E. Grady, E. Parrish, M. A. Caporizzo, S. C. Seeger, R. J. Composto, D. M. Eckmann, *Soft Matter* **2017**, *13*, 1873.
- [80] L. W. Janson, K. Ragsdale, K. Luby-Phelps, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 1228.
- [81] B. R. Parry, I. V. Surovtsev, M. T. Cabeen, C. S. O'Hern, E. R. Dufresne, C. Jacobs-Wagner, *Cell* **2014**, *156*, 183.
- [82] C. Würth, D. Geißler, T. Behnke, M. Kaiser, U. Resch-Genger, *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 59.
- [83] P. Müller, P. Schwille, T. Weidemann, *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2532.
- [84] I. F. Sbalzarini, P. Koumoutsakos, *J. Struct. Biol.* **2005**, *151*, 182.

Supplementary Information to:

Protein-sized Dye-loaded Polymer Nanoparticles for Free Particle Diffusion in Cytosol

Andreas Reisch, Doriane Heimburger,¹ Pauline Ernst,¹ Anne Runser, Pascal Didier, Denis Dujardin, and Andrey S. Klymchenko**

Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, UMR 7021 CNRS, Faculté de Pharmacie,
Université de Strasbourg, 67401, Illkirch, France.

E-mail: reisch@unistra.fr and andrey.klymchenko@unistra.fr

¹ Have contributed equally.

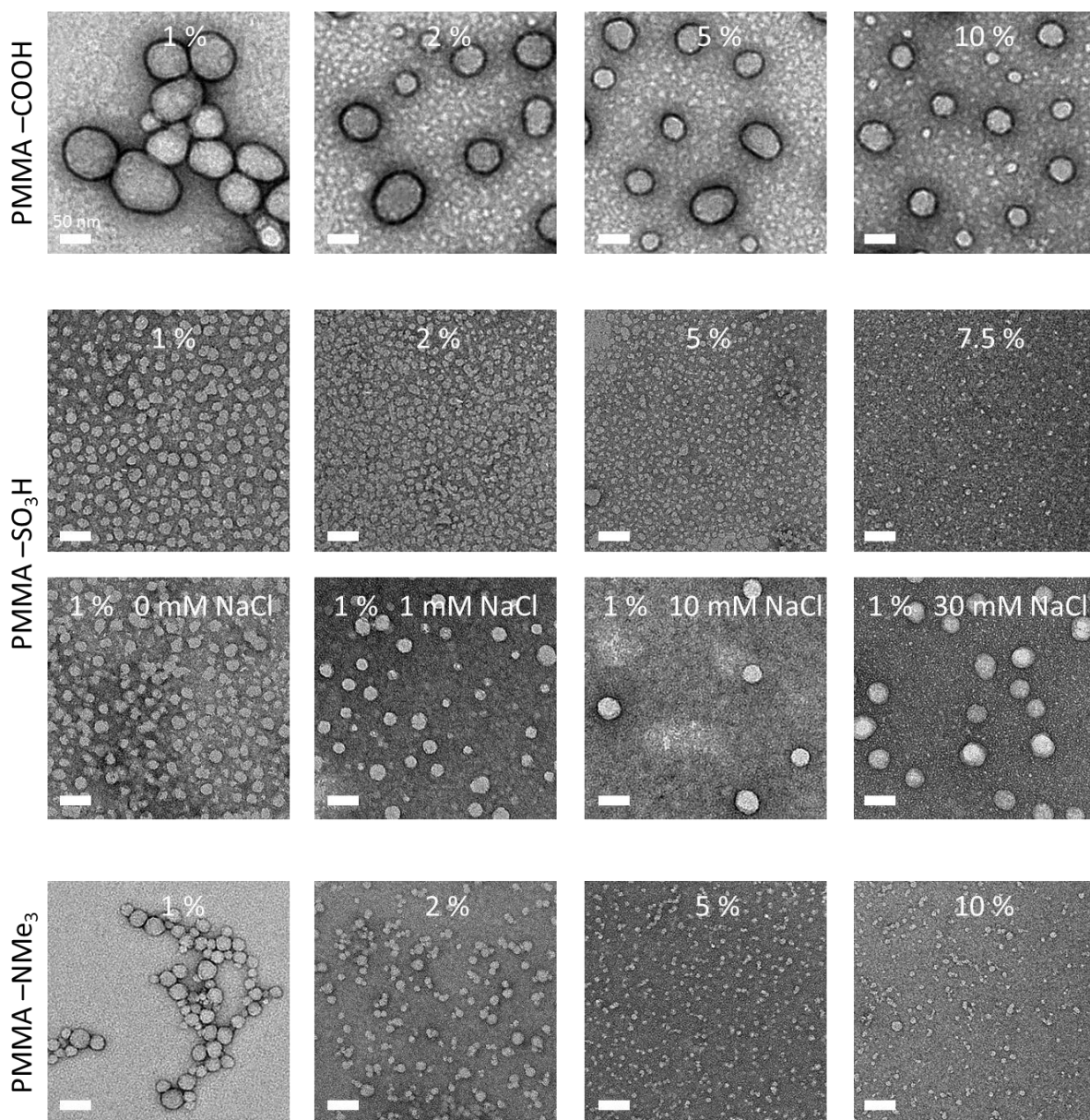


Figure S1. Transmission electron microscopy (TEM) images of particles made by nanoprecipitation for different percentages and type of charged groups. NPs were loaded with 10 wt% of R18/F5-TPB. Where not mentioned, nanoprecipitation was carried out in milliQ water. For PMMA-SO₃H at 1% nanoprecipitations were carried out in different NaCl concentrations as noted. Scale bars correspond to 50 nm.

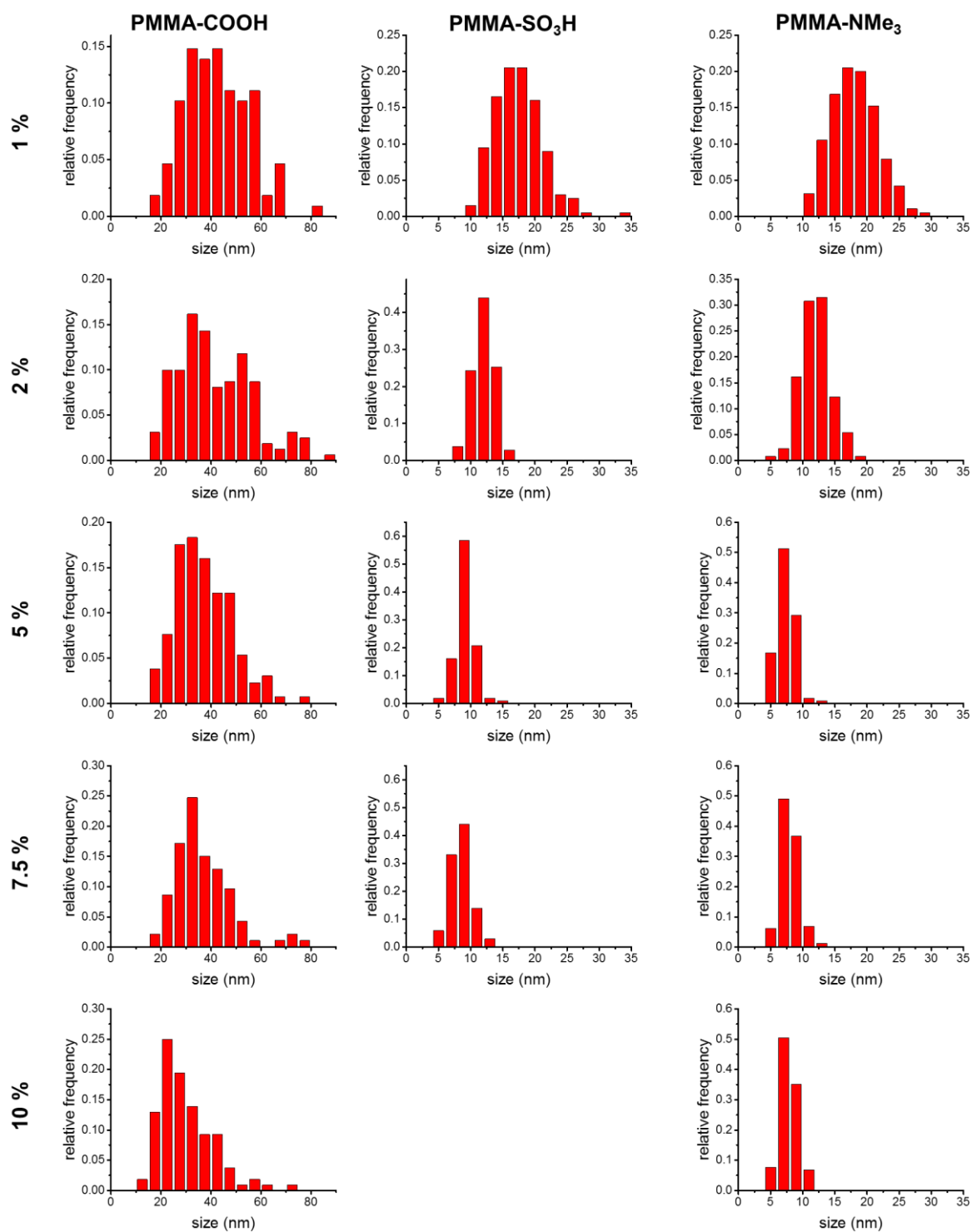


Figure S2. Histograms of sizes of particles made by nanoprecipitation as a function on percentage and type of charged groups as determined by TEM. Mean values of sizes determined by transmission electron microscopy are given for NPs loaded with 10 wt% of R18/F5-TPB. At least 200 NPs were analyzed per condition. Error bars give full width at half maximum of the distribution.

Table S1. Particle sizes as determined by TEM and estimated number of charged groups per nm² of particle surface and total number per particle.

| % | COOH | | | SO ₃ H | | | NMe ₃ | | |
|-----|------|---------------------|--------|-------------------|---------------------|--------|------------------|---------------------|--------|
| | size | charged groups | | size | charged groups | | size | charged groups | |
| | (nm) | per nm ² | per NP | (nm) | per nm ² | per NP | (nm) | per nm ² | per NP |
| 1 | 42 | 0.4 | 2300 | 17 | 0.17 | 150 | 18 | 0.18 | 180 |
| 2 | 41 | 0.8 | 4300 | 12 | 0.24 | 107 | 12 | 0.24 | 110 |
| 5 | 37 | 1.9 | 8042 | 9 | 0.43 | 109 | 7 | 0.34 | 52 |
| 7.5 | 35 | 2.6 | 9400 | 8 | 0.56 | 112 | 7 | 0.53 | 90 |
| 10 | 29 | 2.9 | 7800 | | | | 7 | 0.66 | 100 |

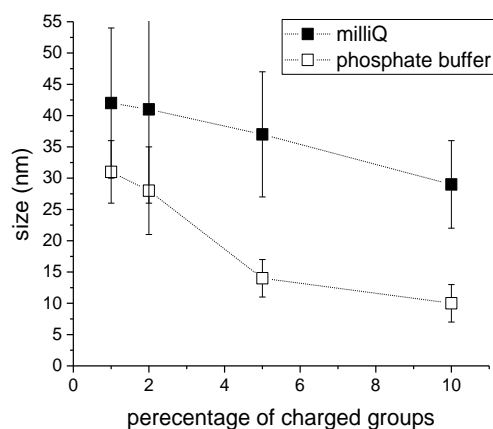


Figure S3. Influence of the precipitation medium on the size of nanoparticles made by nanoprecipitation of carboxylate bearing polymers. Mean values of sizes determined by transmission electron microscopy are given for NPs loaded with 10 wt% of R18/F5-TPB. At least 200 NPs were analyzed per condition. Error bars give full width at half maximum of the distribution.

Table S2. Steady state fluorescence properties of selected nanoparticles loaded with 10 wt% R18/F5-TPB. Measurements were carried out in a FluoroMax-4 spectrofluorometer with an excitation at 530 nm and an intensity of about 1 mW/cm².

| | Charged groups % | Size nm | Fluorophores per NP | QY % | Brightness M.cm ⁻¹ | Fluorescence cross section cm ² |
|------------------------|------------------|---------|---------------------|--------|-------------------------------|--|
| PMMA-COOH | 1 | 42 | 1700 | 59 ± 2 | 1.0 x 10 ⁸ | 3.8 x 10 ⁻¹³ |
| | 10 | 29 | 560 | 59 ± 2 | 4.3 x 10 ⁷ | 1.3 x 10 ⁻¹³ |
| PMMA-SO ₃ H | 1 | 17 | 110 | 61 ± 3 | 6.9 x 10 ⁶ | 2.6 x 10 ⁻¹⁴ |
| | 2 | 12 | 40 | 55 ± 1 | 2.2 x 10 ⁶ | 8.4 x 10 ⁻¹⁵ |
| | 5 | 9 | 18 | 41 ± 2 | 7.0 x 10 ⁵ | 2.7 x 10 ⁻¹⁵ |
| PMMA-NMe ₃ | 1 | 18 | 120 | 35 ± 3 | 4.3 x 10 ⁶ | 1.6 x 10 ⁻¹⁴ |

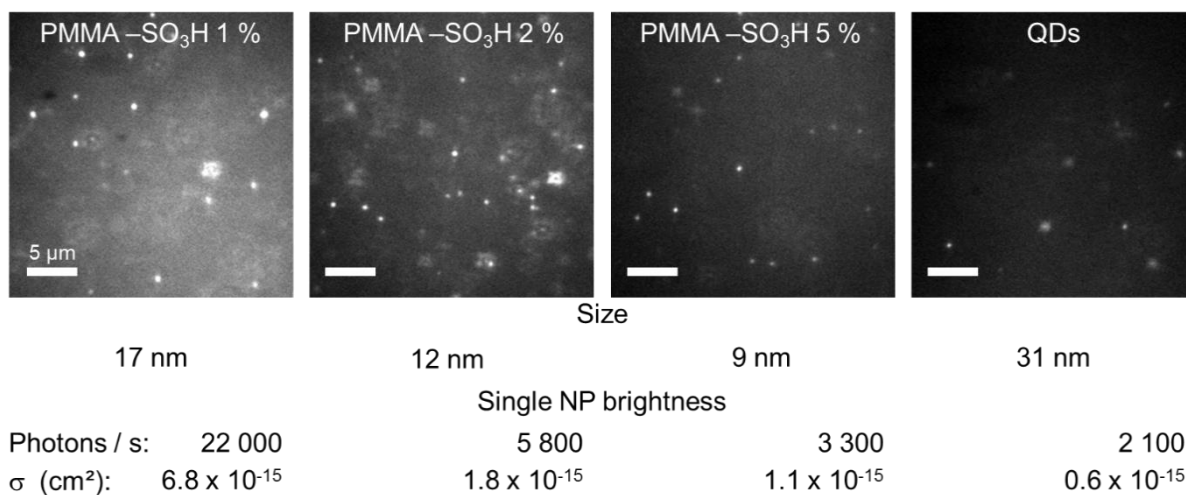


Figure S4. Single-particle fluorescence microscopy. The nanoparticles were immobilized in solutions of polyvinylalcohol (PVA) in water with a PVA concentration of 15 wt%. Images were acquired using an excitation at 532 nm with an intensity of 1 W/cm². The conditions for excitation, recording and presentation are identical for all images. The mean number of emitted photons per particle per second and the per particle fluorescence cross-sections are given. At least 50 particles were analyzed per condition.

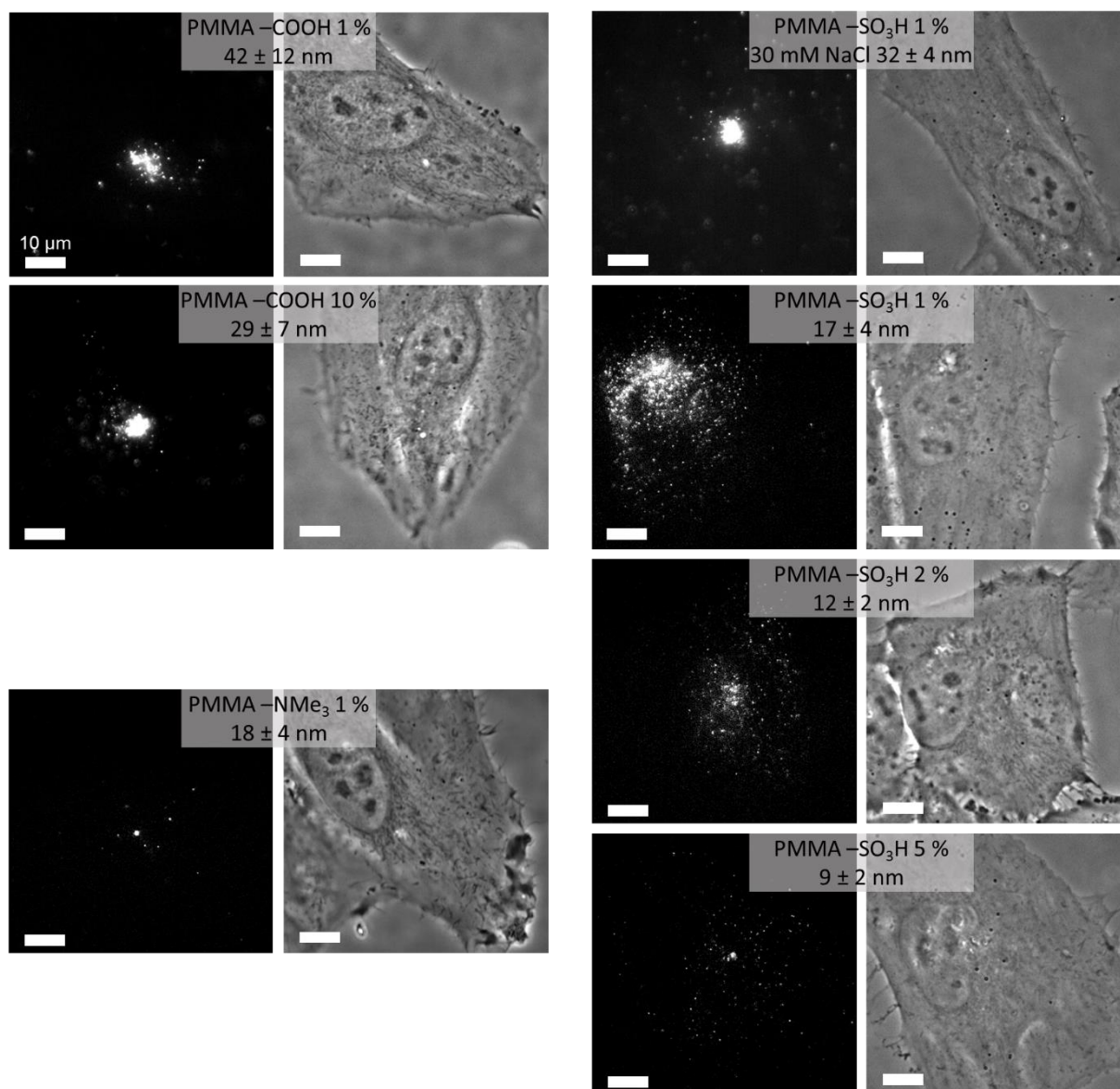


Figure S5. Microinjection of nanoparticles in living HeLa cells. The left hand images are maximum projections of fluorescence micrographs collected over 1 min (50 ms per frame) of nanoparticles made from different polymers, loaded with 10 wt% of R18/F5-TPB and coated with Tween 80. Right hand images are phase-contrast images of the corresponding cells. Scale bars correspond to 10 μm .

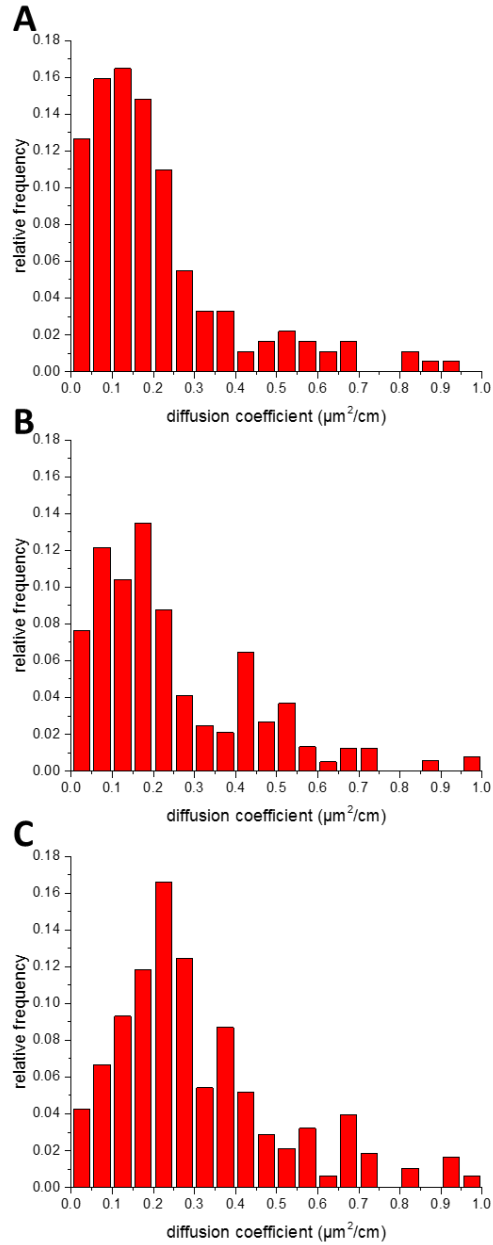


Figure S6. Distribution of diffusion coefficients of individual nanoparticles made from (A) PMMA-SO₃H 1% (made in Milli-Q water), (B) PMMA-SO₃H 2%, (C) PMMA-SO₃H 5% microinjected in HeLa cells. 100 particle trajectories were analyzed.

Nanoparticules polymériques fluorescentes furtives enrobées de pluronic : stabilité et suivi *in vivo*

Ici, le but de ce chapitre est d'étudier l'effet de l'adsorption d'un bloc copolymère de type PEG (pluronic) à la surface de ces NPs à base de PMMA-SO₃H sur les propriétés physicochimiques et biologiques(95), principalement leur stabilité en milieu physiologique et l'adsorption de protéines.

Ainsi, des nanoparticules dopées en rhodamine (R18) avec son contre-ion F5-TPB ont été préparées par nano-précipitation. Les nanoparticules obtenues ont été caractérisées par diffusion dynamique de la lumière et mesurent 30 nm. Ces NPs sont ensuite modifiées par une molécule amphiphile portant un dérivé du PEG, le pluronic qui est directement adsorbé en surface. Ce pluronic a été modifié par des fluorophores (cyanine5, lissamine, rhodamine) afin d'accéder à la stabilité de la coquille de pluronic à la surface des NPs mais aussi au nombre de molécules de surfactant adsorbées par NP (figure 1).

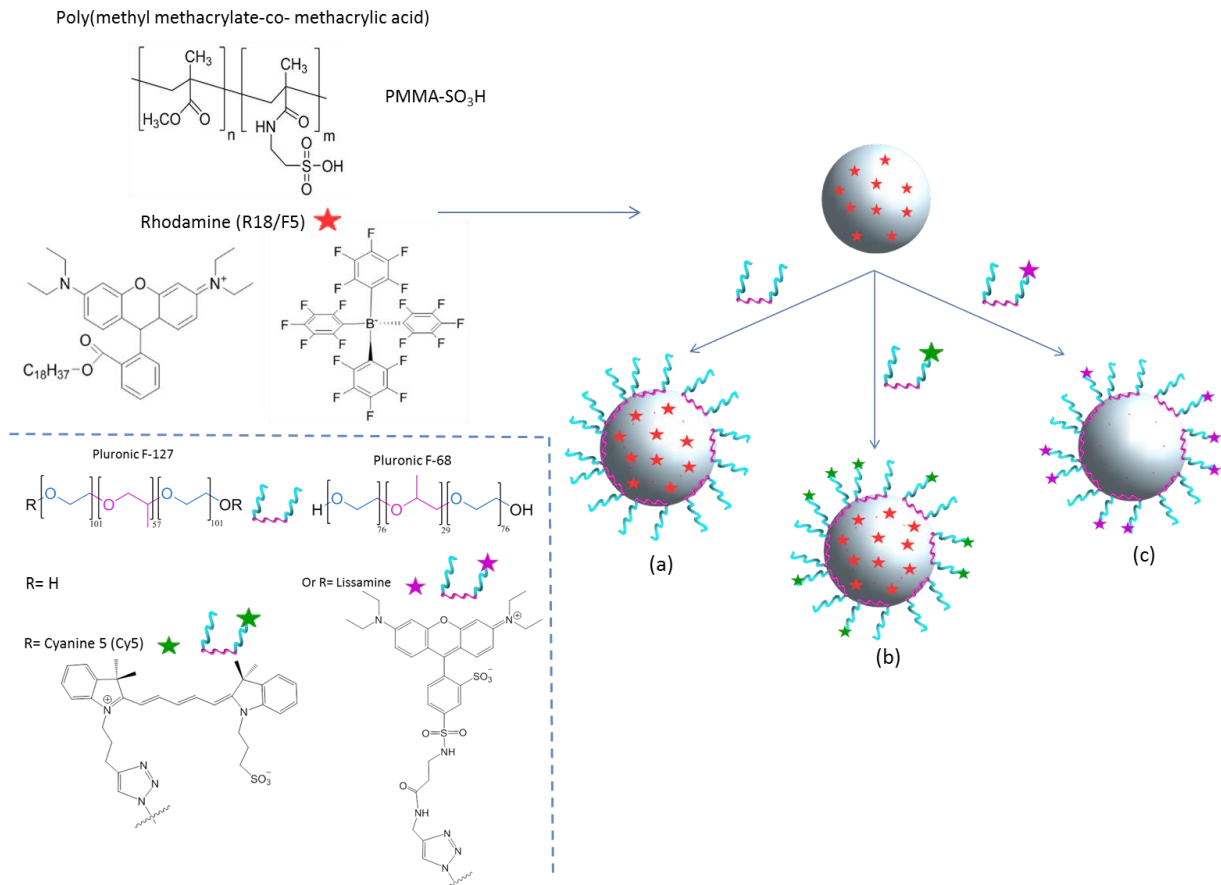


Figure 1. Structure du polymère PMMA-SO₃H avec son fluorophore, la rhodamine, le pluronic modifié F-127 par la lissamine et la cyanine5 et le pluronic F-68. Première étape, le PMMA-SO₃H est mélangé avec la rhodamine dans l'acétone et soumis à une précipitation dans de l'eau. Seconde étape, les particules résultantes sont stabilisées en utilisant des dérivés de pluronic F-127 ou F-68. (a) NPs PMMA SO₃H dopées avec 5% de R18/F5 , (b) NPs FRET PMMA SO₃H dopées avec 5% de R18/F5 et Cy5 en surface et (c) NPs PMMA SO₃H recouvertes de lissamine en surface

L'étape de dialyse est importante pour éliminer l'excès de pluronic en solution sans dégrader la couche de pluronic s'étant déposée à la surface des NPs. Ceci a été confirmé par la conservation du FRET après dialyse par rapport aux mesures faites avant dialyse (figure 2).

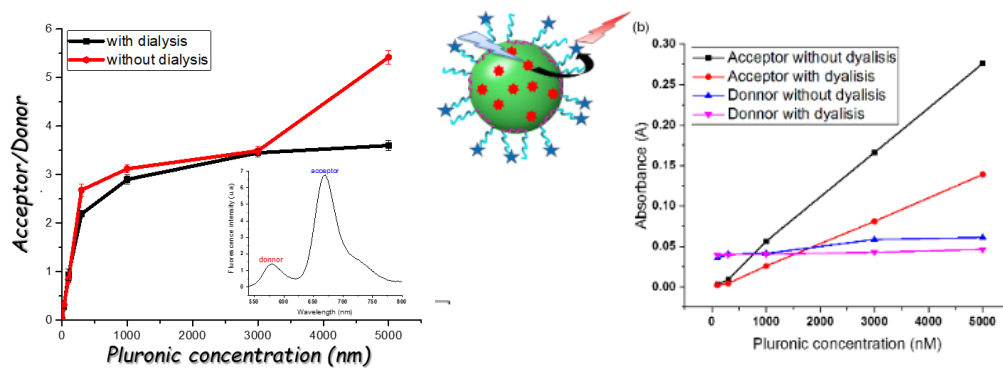


Figure 2. (a) Comparaison du FRET entre le donneur (R18/F5) à l'intérieur de la nanoparticule et l'accepteur conjugué au pluronic (Cy5) adsorbé à la surface de la NP avant et après dialyse et (b) absorbance du donneur et de l'accepteur en fonction de la concentration en pluronic.

Le nombre de molécules adsorbées à la surface des NPs mais aussi leur stabilité a été étudiés par la technique de diffusion dynamique de la lumière et par la spectroscopie de corrélation de fluorescence. Il a été montré qu'un total de 85 molécules de pluronic pouvait s'adsorber à la surface des NPs. De plus, elles sont stables aussi bien dans l'eau que dans un environnement physiologique en fonction du nombre de pluronic à la surface de la particule.

En outre, pour étudier la bio-distribution des NPs *in vivo*, ces dernières ont été injectées dans le système vasculaire des souris et étudiées par imagerie du cerveau en utilisant un microscope à deux photons sur une durée d'environ 1 heure (figure 3). Des NPs PEGylés et non PEGylés ont été étudiées. Il est important de noter que les NPs revêtues de pluronic présentent un temps de circulation beaucoup plus long que les NPs nues, ce qui correspond à une adsorption beaucoup plus faible des composants protéiques du sérum dans nos mesures *in vitro*. Nos résultats montrent que l'adsorption de copolymères à blocs amphiphiles à la surface des nanoparticules polymériques ce qui crée une coque stable empêchant les interactions non spécifiques et permettant un temps de circulation important au sein de l'organisme.

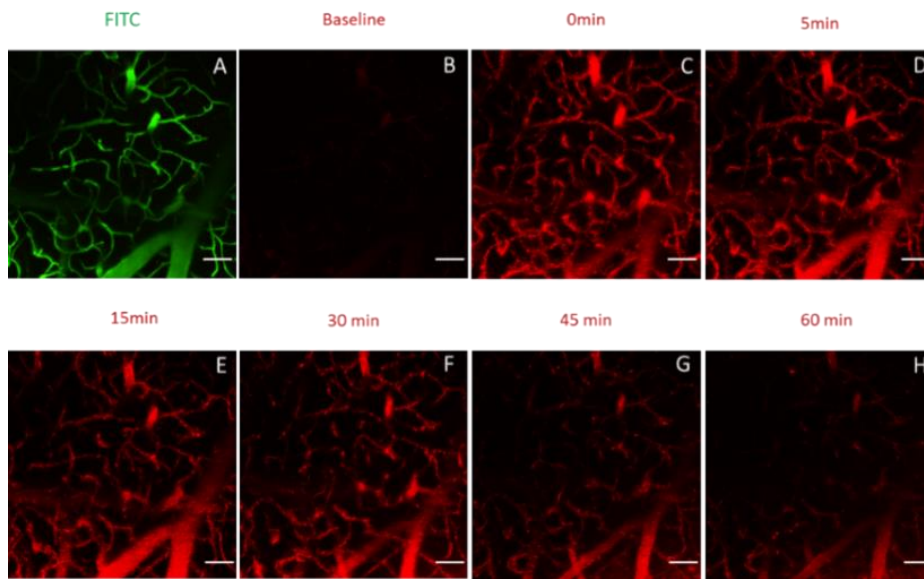


Figure 3. Etude *in vivo* de NPs à base de PMMA recouvertes de pluronic F-68 directement injectées dans l'artère fémorale d'une souris par microscopie à deux-photons adaptée à l'imagerie intravivale de petits animaux. A) Identification des vaisseaux du cerveau avec du FITC-dextrane (0.05 mL) b) à h) suivi des NPs au sein de la souris sur une période de 180 minutes.

Stealth fluorescent polymeric nanoparticles coated with pluronic : stability and tracking *in vivo*

Doriane Heimburger,¹ Igor Khalin,² Nicolas Plesnila,² Andreas Reisch,^{1,*} Andrey S. Klymchenko^{1,*}

1. Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74, Route du Rhin, 67401 Illkirch, France

2. Institute for Stroke and Dementia Research (ISD), Klinikum der Universität München, Feodor-Lynen-Straße 17, D-81377 Munich

*Corresponding authors : reisch@unistra.fr, andrey.klymchenko@unistra.fr

Abstract

Fluorescent polymeric nanoparticles (NPs) emerged recently as promising candidates for bio-imaging and theranostics due to their extreme brightness, small size, low toxicity and potential biodegradability. Ideally, NPs should feature controlled interactions and high specificity toward their target. To this end, we studied the use of pluronic F-127 and pluronic F-68 for reducing non-specific interactions of 30 nm ultrabright polymer NPs. Fluorescence correlation spectroscopy and Förster resonance energy transfer allowed determining the number of pluronic molecules adsorbed per NP as well as the stability of the pluronic shell in biological media. Adsorption of pluronic gave NPs with a precisely controlled number of ligands. Two-photon intravital imaging in mice brain showed that pluronic F-68 coated NPs remain in blood circulation on the time scale of hours, while non-coated NPs are rapidly eliminated. Owing to their high brightness, the resulting NPs traveled freely into the femoral artery of a mouse for 1 hour without being degraded. Our results show that simple adsorption of amphiphiles suppresses non-specific interactions of small fluorescent polymer NPs and improve their circulation in blood stream of mice

Introduction

Nanoparticles (NPs) have attracted over the last decade increasing interest in view of their use as carriers of contrast-agents.(128) In particular, their capacity to combine detection or imaging with release of active compounds in so-called theranostics applications is expected to play a major role in the development of personalized medicine.(129) Achieving very high sensitivity in such applications down to the level of single particles or molecules requires very bright nanoprobe. Notably fluorescent polymer NPs as conjugated polymer particles or dye-loaded polymer NPs have emerged over the last years as very bright fluorescent labels.(59,77,130) This was made possible by the development of different approaches to overcome aggregation-caused quenching of the dyes encapsulated at high concentrations within the NPs, e.g. aggregation-induced emission dyes(71) or the use of bulky counterions.(77)

Successful biomedical applications of such NPs require controlling their behavior in biological environments. In particular, NPs circulating in the blood are recognized by serum proteins called opsonins.(112) Adsorption of opsonins onto the NPs surface renders NPs more susceptible to being uptaken by the reticuloendothelial system and are shuttled out of circulation to the liver or the spleen.(131) Moreover, in contact with biological media, NPs have the tendency to aggregate, due to high ionic strength, which undermines their circulation time and leads to their entrapment in the liver and the lungs.(132) It is thus necessary to design long-circulating NPs, so-called stealth NPs, which involves avoidance of non-specific recognition by serum proteins.

Poly(ethylene glycol) (PEG) is the gold standard for avoiding non-specific adsorption of proteins to surfaces.(132) Many studies showed a drastic reduction of opsonin adsorption(116,133,134) and thus an increased blood circulation time with increasing density of PEG onto NP surfaces.(135,136). Solubility and stability in physiological salt concentration are also increased (137) thanks to steric repulsion.(138) PEG can be implemented to the NP surface either covalently or non-covalently. (122) The advantage of the non-covalent approach is that it does not require the use of coupling agents and purification, thus drastically simplifying formulation and decreasing risks of toxicity. One of the best examples is the use of pluronic, a tri-block copolymer of polyethylene oxide (PEO) and polypropylene oxide (PPO), that can be used to form a

PEG-coating on the surface of hydrophobic NPs. Pluronic with a PPO chains molecular weight (MW) over 3KDa is required to stabilize particle and mask the NPs core. It has been shown that particles stabilized by pluronic are less prone to protein and bacterial adsorption than uncoated nanoparticles. Indeed, treatment of hydrophilic silica surface with pluronic F-108 reduced adsorption of proteins by 60% and silica surface with pluronic F-108 completely avoid protein adsorption (137). Pluronic F-127 coated PLGA NPs loaded with paclitaxel were able to spread into cancer cells by better penetration of mucus secretions, and thus, lead to a long circulation-time in mice and high efficiency in suppression of tumor growth.(123)

The aim of the present study was to apply and optimize pluronic based coatings to the stabilization of a recently developed series of fluorescent polymer NPs for their use in biological environments. In particular, the combination of different fluorescent-based methods made it possible to study (i) adsorption of the pluronics on the particle surface, (ii) the stability of the obtained coating, and (iii) how it affects the stability of the particles in the presence of salt and imparts non-fouling properties. The combination of these results then allowed designing a coating suitable for *in vivo* experiments. The resulting NPs was then successfully imaged at the single-particle level directly in the vasculature of mouse brain.

Materials and methods

1) Materials

Poly(methyl methacrylate-co-methacrylic acid) (PMMA-COOH, 1,5% methacrylic acid, $M_n \sim 15\,000$ and $M_w \sim 34\,000$), poloxamer 407 (Pluronic F-127) and poloxamer 188 (Pluronic F-68), propargylamine (98%), copper(II) sulfate pentahydrate (98.0%), sodium ascorbate (>98.0%), sodium azide (99%), Triethylamine TEA, >99.5%), acetonitrile (anhydrous, 99.8%), dichloromethane (anhydrous, >99.8%), and N,N-dimethylformamide (absolute >99.8%) were purchased from Sigma-Aldrich.

N,N-diisopropylethylamine (DIPEA, >99.0%), methanesulfonyl chloride (>99.7%), and 2-aminoethane sulfonic acid (taurine, >98.0%) were obtained from TCI.

1-hydroxybenzotriazole (HOBT, >99.0%), N-tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate (HBTU, 99.5%), 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (HATU, 99.8%) were purchased from chemPrep.

Sodium phosphate monobasic (>99.0%, Sigma-Aldrich) and sodium phosphate dibasic dihydrate (>99.0%, Sigma-Aldrich) were used to prepare 20 mM phosphate buffer solutions at pH 7.4; Water was deionized using a Millipore purification system.

2) Synthesis

Sulfonated lissamine-alkyne. Lissamine(139),(100 mg, 0.16 mmol, 1 eq), propargylamine (11 mg, 0.19 mmol, 1.2 eq), HATU (76 mg, 0.16 mmol, 1 eq), and DIPEA (127 μ L, 0.75 mmol, 5 eq) were solubilized in anhydrous DMF (5 mL) under argon. The solution was stirred under argon for 24h at room temperature. The reaction mixture was dried under reduced pressure at 65°C and then diluted with DCM (20 mL) and extracted four times with water. The combined organic phases were dried over sodium sulfate and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by flash chromatography eluting with DCM/MeOH (99:1) to give 89.5 mg of a pink solid (yield: 54%).

^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 8.65 (1H, s, ar. CH) + 8.03 (1H, d, ar. CH) + 7.29 (1H, d, ar. CH) + 7.16 (2H, d, ar. CH) + 6.85 (2H, d, ar. CH) + 6.73 (2H, s, ar. CH) ~9H, 3.95 (2H, s, -NCH₂C-), 3.51-3.65 (8H, m, -NCH₂CH₃), 2.45 (2H, t, -NCOCH₂-), 2.27 (1H, s, CCH), 1.23-1.34 (12H, m, -NCH₂CH₃);

Sulfonated Cy5-alkyne. To a solution of pentynyl indoleninium iodide (200 mg, 0.566 mmol, 1 eq) in acetic anhydride (10 mL) was added malonaldehyde dianilide

hydrochloride (161 mg, 0.623 mmol, 1.1 eq). The solution was heated at 100°C for 3 h before the solvents were evaporated. To the residue was added indoleninium propanesulfonate (175 mg, 0.623 mmol, 1.1 eq) and pyridine (5 mL). The mixture was heated at 50°C for 2 h and quickly turned deep blue. The solvents were evaporated and the residue was extracted with DCM, washed with HCl (1 M) and a saturated solution of NaHCO₃. The organic phase was dried over anhydrous MgSO₄ filtered, evaporated and the crude was purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, 98/2 to 85/15) to obtain 138 mg (yield: 45%) of the sulfonated Cy5-alkyne as a shiny deep blue solid. R_f = 0.34 (DCM/MeOH: 9/1)).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 8.36 (m, 2H, CH), 7.61 (t, J = 8.4 Hz, 1H, CH Ar), 7.49 (d, J = 8 Hz, CH Ar), 7.42-7.34 (m, 3H, CH Ar), 7.27-7.20 (m, 2H, H Ar), 6.52 (m, 2H, 2 CH), 6.32 (d, J = 14 Hz, 1H, CH), 4.30 (t, J = 7.6 Hz, 2H, CH₂-N), 4.12 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂-N), 2.96 (t, J = 2.4 Hz, 1H, C≡CH), 2.56 (t, J = 6.8 Hz, 2H, CH₂), 2.32 (m, 2H, CH₂), 2.00 (m, 2H, CH₂), 1.87 (m, 2H, CH₂), 1.68 (s, 6H, 2 CH₃), 1.67 (s, 6H, 2 CH₃).

Dimesyl derivative of Pluronic F-127. Pluronic F-127 (6.3 g, 0.5 mmol, 1 eq) was solubilized in DCM (25 mL) and cooled to 0°C. Next, TEA (420 μL, 3 mmol, 6 eq), and methanesulfonyl chloride (234 μL, 3 mmol, 6 eq) were added. The reaction mixture was kept under stirring at 0°C for 3 h and then at room temperature overnight. The solution was dried under reduced pressure at 40°C for 30 minutes. The obtained solid was redispersed in water and purification is carried out by means of dialysis against water (48 h) to give 5.2 g of a white solid (yield: 82 %).

¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 3.81-3.78 (4H, m, -SOCH₂CH₂-), 3.77-3.61 (-OCH₂CH₂O-) + 3.59-3.51 (m, -OCH₂CH-) + 3.43-3.38 (m, -CHCH₃) ~1000H, 3.14 (6H, s, CH₃SOO⁻), 1.16 (~195H, m, -CHCH₃);

Diazide derivative of Pluronic F-127. The dimesyl derivative of Pluronic F-127 (5.2 g, 0.41 mmol, 1 eq) and sodium azide (165 mg, 2.46 mmol, 6 eq) were solubilized in acetonitrile (25 mL) and heated under reflux for 48 h. The obtained solid was redispersed in water and purification was carried out by means of dialysis against water (48 h) to give 4.6 g of a white solid (yield: 87%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 3.77-3.61 (-OCH₂CH₂O-) + 3.59-3.51 (m, -OCH₂CH-) + 3.43-3.38 (m, -CHCH₃ + CH₂N₃) ~1000H, 1.16 (~195H, m, -CHCH₃);

Click reaction on pluronic. The same procedure was used for the click reaction for sulfonated lissamine-alkyne and sulfonated Cy5-alkyne. Given is, as an example, the detailed procedure for lissamine.

Sodium ascorbate (13 mg, 0.074 mmol, 16.5 eq in 100 μ L of water) was added to a Copper(II) sulfate pentahydrate (10 mg, 0.04 mmol, 9 eq in 100 μ L of water). Then the solution was added in a mixture of diazide derivative of Pluronic F-127 (55 mg, 0.0045 mmol, 1 eq), and alkyne lissamine (9 mg, 0.013 mmol, 2.9 eq) dissolved in anhydrous DMF (5 mL). The heterogeneous mixture was stirred vigorously for 24 hours at 55°C under argon. The reaction mixture was dried under reduced pressure at 60°C, diluted in DCM, and then extracted four times with water. The combined organic phases were dried over sodium sulfate and purified by LH20 (from Sigma Aldrich) eluting with DCM/MeOH (1:1) to give 31 mg of a pink solid (yield: 57%)

^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 8.65-6.70 (~11H, m, ar CH), 3.77-3.61 (-OCH₂CH₂O-) + 3.59-3.51 (m, -OCH₂CH-) + 3.43-3.38 (m, -CHCH₃) ~1000H, 1.04 (~195H, m, -CHCH₃); Degree of modification 61% (percentage of sulfonate lissamine-alkyne linked to pluronic thanks to copper(II) click reaction).

Cyanine 5: 35 mg obtained (yield 80%). Degree of modification 53%.

PMMA-SO₃H. PMMA-COOH (300 mg, 0.045 mmol, 1 eq of COOH) was dissolved in anhydrous DCM (2 mL) under argon. Taurine (56 mg, 0.45 mmol, 10 eq), DIPEA (235 μ L, 0.45 mmol, 10 eq), HOBt (61 mg, 0.45 mmol, 10 eq), and HBTU (137 mg, 0.45 mmol, 10eq) were dissolved in anhydrous DMF (3 mL) under argon, and added to the DCM solution. The solution was stirred under argon for 40 h at 40°C. The reaction mixture was dried under reduced pressure at 60°C, then the solution was precipitated in methanol. The precipitate was washed with methanol, redissolved in acetonitrile and reprecipitated twice in methanol. After drying under vacuum 159 mg of solid were obtained (yield: 53%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.67 (3H, s, -CCH₃), 3.25-3.25 (0.02H, m, -NCH₂CH₂S-), 2.19-1.70 (2H, m, CCH₂); Degree of modification 77% (percentage of sulfonate groups which substituted carboxylic acid groups).

Nanoparticle preparation. Stock solutions of the polymer in acetonitrile were prepared at a concentration of 10 mg/mL. The solution was then diluted with acetonitrile to the desired concentration (1 or 4 mg/mL) and the desired amount of R18/F5-TPB was added (0, 5, or 20 wt% relative to the polymer). 50 μ L of the polymer solution were then added quickly using a micropipette and under shaking (Thermomixer comfort,

Eppendorf, 1100 rpm, 21°C) to 450 µL of milliQ water or milliQ water containing 4 mM NaCl. The particle solution was then quickly diluted 5-fold with water. For stabilization of NPs, different amounts of 1 or 0.1 mg/mL solutions of pluronic F-127 were added under stirring to the NP solutions.

In vivo study. Animals were administered 0.1 mL of either PMMA nanoparticles or PMMA nanoparticles coated with 1% Pluronic F-68 directly injected into the femoral artery. With the aim to identify the brain vessels mice were then injected with FITC-dextran (0.05 mL). Afterwards, mice were placed on a multiphoton microscope adapted for intravital imaging of small animals (see below), and images were taken over 180 min.

3) Instrumentation

NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III 400 MHz spectrometer. The size measurements of the NPs were performed by dynamic light scattering (DLS) on a Zetasizer Nano series DTS 1060 (Malvern Instruments S.A.). It uses a laser source at 633 nm, which excludes any light excitation of our dye-doped NPs. Absorption and emission spectra were recorded on a Cary 400 Scan ultraviolet-visible spectrophotometer (Varian) and a FluoroMax-4 spectro-fluorometer (Horiba Jobin Yvon) equipped with a thermostated cell compartment, respectively. For standard recording of fluorescence spectra, the excitation wavelength was set to 530 nm and emission was recorded from 540 to 800 nm. The fluorescence spectra were corrected for detector response and lamp fluctuations.

FCS measurements were performed on a two-photon platform including an Olympus IX70 inverted microscope. Two-photon excitation at 780 nm (5 mW laser output power) was provided using a mode-locked Tsunami Ti: sapphire laser pumped using a Millennia V solid state laser (Spectra Physics). The measurements were carried out in an eight-well Lab-Tek II coverglass system, using 300 µL volume per well. The focal spot was set about 20 µm above the coverslip. The normalized autocorrelation function, $G(\tau)$, was calculated online using an ALV-5000E correlator (ALV, Germany) from the fluorescence fluctuations, $\delta F(t)$, by $G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$ where t is the mean fluorescence signal and τ is the lag time. Assuming that NPs diffuse freely in a Gaussian excitation volume, the correlation function, $G(\tau)$, calculated from the fluorescence fluctuations was fitted according to Thompson(140):

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_d}\right)^{-1} \left(1 + \frac{1}{S^2} \frac{\tau}{\tau_d}\right)^{-1/2}$$

where τ_d is the diffusion time, N is the mean number of fluorescent species within the two-photon excitation volume, and S is the ratio between the axial and lateral radii of the excitation volume. The excitation volume is about 0.34 fL and S is about 3 to 4. The typical data recording time was 5 min, using freshly prepared PMMA NPs without further dilution. The measurements were done with respect to a reference 5(6)-carboxytetramethylrhodamine (TMR from Sigma-Aldrich) in water. The hydrodynamic diameter, d , of NPs was calculated as $d_{\text{NPs}} = \tau_d(\text{NPs})/\tau_d(\text{TMR}) \times d_{\text{TMR}}$, where d_{TMR} is the hydrodynamic diameter of TMR (1.0 nm). The concentration of NPs was calculated from the number of species by $C_{\text{NPs}} = N_{\text{NPs}}/N_{\text{TMR}} \times C_{\text{TMR}}$, using a TMR concentration of 50 nM. NPs stability was tested by adding 10 vol% of a 10-fold concentrated PBS to the solutions of the corresponding NPs containing 10% of R18/F5 and measuring the hydrodynamic diameter and concentration. Interaction with 10% fetal bovine serum and a 1:1 mixture of 10% fetal bovine serum:PBS were tested in the same way. For multiphoton imaging we used an upright Zeiss LSM710 confocal microscope equipped with a Ti:Sa laser (Chameleon Vision II) from Coherent (Glasgow, Scotland) and 2 external photomultiplier detectors for red and green fluorescence. All animal experiments were conducted in accordance with institutional guidelines and approved by the Government of Upper Bavaria. 8-week old C56/Bl6J mice were anesthetized intraperitoneally with a combination of medetomidine (0.5 mg/kg), fentanyl (0.05 mg/kg), and midazolam (5mg/kg). They were then endotracheally intubated and ventilated in a volume controlled mode (MiniVent 845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hungstetten, Germany) with continuous recording of end-tidal pCO₂. Throughout the experiment, body temperature was monitored and maintained by a rectal probe attached to a feedback-controlled heating pad. A probe was placed in the femoral artery for measurement of mean arteriolar blood pressure and for administration of the fluorescent dye. A rectangular 4×4-mm cranial window was drilled over the right frontoparietal cortex under continuous cooling with saline, while special care was taken to leave the dura mater intact. The window was located 1-mm lateral to the sagittal suture and 1-mm frontal to the coronar suture. After removal of the bone flap the brain was rinsed with saline. Subsequently, an exact fitting rectangular cover glass of 0.175 μm thickness was placed upon the window and fixed onto the skull with dental cement.

Results and discussion

Particle size and size distribution.

PMMA based NPs were assembled through nanoprecipitation. In order to reduce their size, we used PMMA bearing a low percentage (1.1 mol%) of sulfonate groups, which was synthesized through the modification of PMMA-COOH with taurine.(95) Where needed, the salt of a rhodamine B derivative (R18) with a bulky hydrophobic counterion, tetrakis(pentafluorophenyl) borate (F5),(61) was mixed at the desired proportion with the polymer in acetonitrile before precipitation in water to obtain dye-loaded NPs. The resulting particles had a mean size of 34 nm and a low polydispersity index, as measured by DLS. The particles loaded with 5% of R18/F5-TPB was 36.4 nm.

In a second step, we then added an aqueous solution of either pluronic F-127 or F-68 to the preformed NPs to coat them. The NP suspensions were then purified through dialysis for 48 h. DLS indicated an increase of the particle size by about 7 nm for Pluronic F-127 and by about 4 nm for Pluronic F-68 corresponding to a corona thickness of 3.5-4 nm in good agreement with the length of the PEG-blocks. The size showed only a very small decrease upon dialysis.

| PMMA-SO₃H | | |
|---|-----------------------|---------------|
| Sample | Size, DLS (nm) | PDI |
| <i>Bare</i> | 34.1 ± 3.1 | 0.118 ± 0.037 |
| <i>Loaded with 5% of R18/F5-TPB</i> | 36.4 ± 2.7 | 0.127 ± 0.041 |
| <i>Coated with pluronic (before dialysis)</i> | 41.2 ± 1.8 | 0.141 ± 0.03 |
| <i>Coated with pluronic (after dialysis)</i> | 40.9 ± 2.5 | 0.133 ± 0.045 |

Table 1. DLS measurement of PMMA NPs

Adsorption and Stability of Pluronics on NPs studied using FRET

Förster Resonance Energy Transfer (FRET) is strongly affected by the distance between the donor and acceptor fluorophores in the range of a few nanometers(98). FRET is thus a technique of choice for studying the adsorption of molecules to the surface of NPs. Furthermore, owing to the high surface-to-volume ratio and the excellent Homo-FRET between dyes inside our NPs, they are valuable scaffolds for

the development of FRET-based systems using energy transfer between a donor confined in the particle and an acceptor attached to the surface.(110) As donor, we selected R18 with F5 as counterion, as this dye salt is highly hydrophobic and can be loaded in high amounts in PMMA NPs during nanoprecipitation.(141) As acceptor, we selected Cyanine 5 (Cy5) grafted directly at the terminal end of pluronic thanks to 1, 3-dipolar cycloaddition between pluronic bearing azides group and Cy5 bearing alkynes. In this system FRET should thus occur only between the dye-loaded NP and pluronic adsorbed onto the particle surface (figure 1).

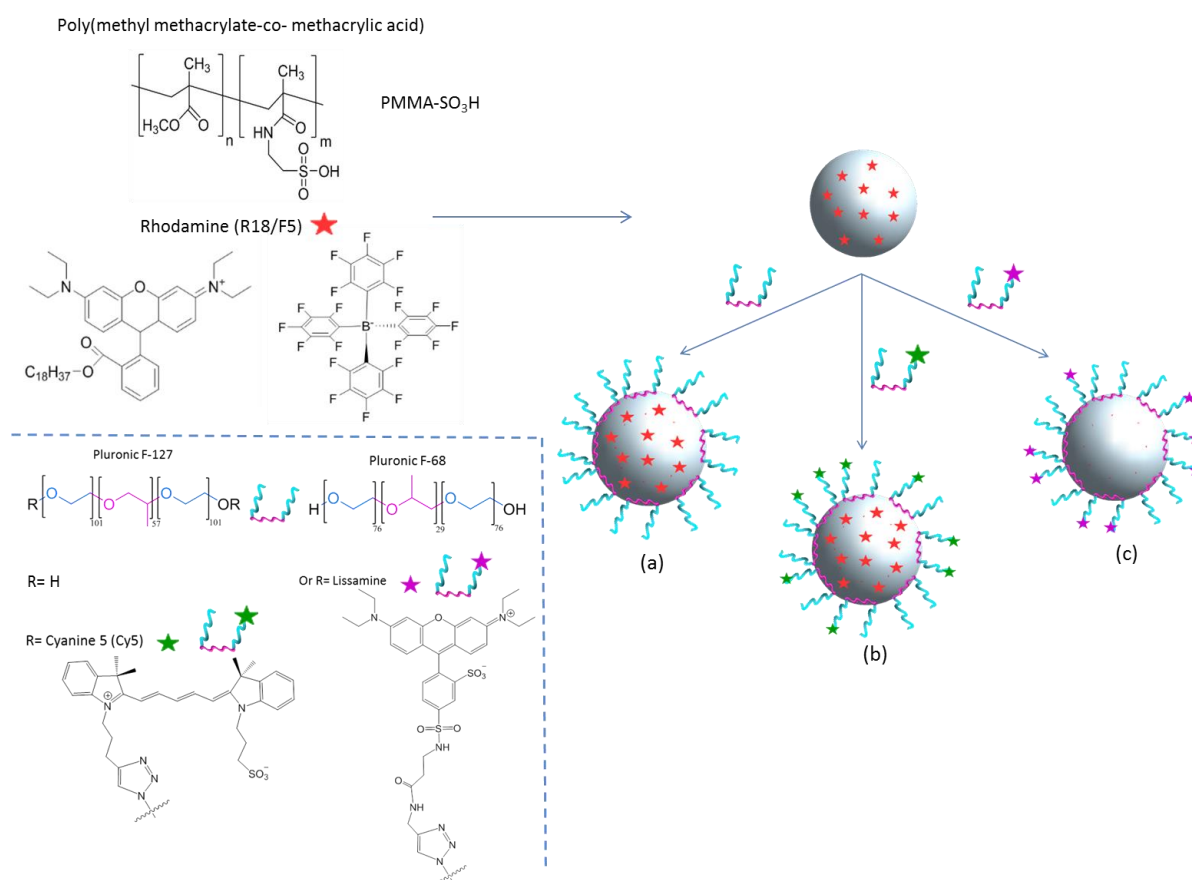


Figure 1. Structure of the polymers PMMA-SO₃H with his dye, rhodamine, modified pluronic F-127 by lissamine and cyanine5 and pluronic F-68. First step, PMMA-SO₃H is mixed with the dye salt rhodamine in acetone and precipitated in water. Second step, the resulting particles are stabilized in a second step using derivatives of pluronic F-127 or pluronic F-68. (a) FRET PMMA SO₃H NPs loaded with lissamine on the surface, (b) PMMA SO₃H NPs loaded with 5% of R18/F5 and (c) FRET PMMA SO₃H NPs loaded with 5% of R18/F5 and Cy5 on the surface.

We then used this system to study adsorption of pluronics on the particle surface. Different concentrations of pluronic-Cy5 were added to the uncoated rhodamine loaded NPs and we monitored the changes in the absorption and emission spectra as a function of the pluronic concentration before and after dialysis (Figure 2). Increasing pluronic-Cy5 concentration resulted in a gradual increase in the absorbance at 645

nm. Moreover, increasing the pluronic-Cy5 concentration produced an increase in the acceptor emission at 650 nm accompanied by a decrease in the donor fluorescence at 580 nm, corresponding to the occurrence of FRET and confirming the successful adsorption of pluronic-Cy5 on the NP surface. Interestingly, after dialysis the absorbance strongly decreased, especially for high concentrations, but the photoluminescence practically did not change. This means that practically all the adsorbed pluronic remained even after 48 h of dialysis and only the free pluronic was removed during the dialysis. The pluronic shell on our NPs thus seems to have a quite high stability.

The acceptor absorbance and also the acceptor to donor emission ratio increased up to 5000 nM of pluronic-Cy5. However, at the highest concentrations the acceptor emission did not increase further, indicating quenching, probably due to aggregation of the Cy5 dyes. This made interpretation of the pluronic adsorption based on FRET more cumbersome. In consequence, we chose pluronic concentrations of 1000 and 3000 nM for further experiments.

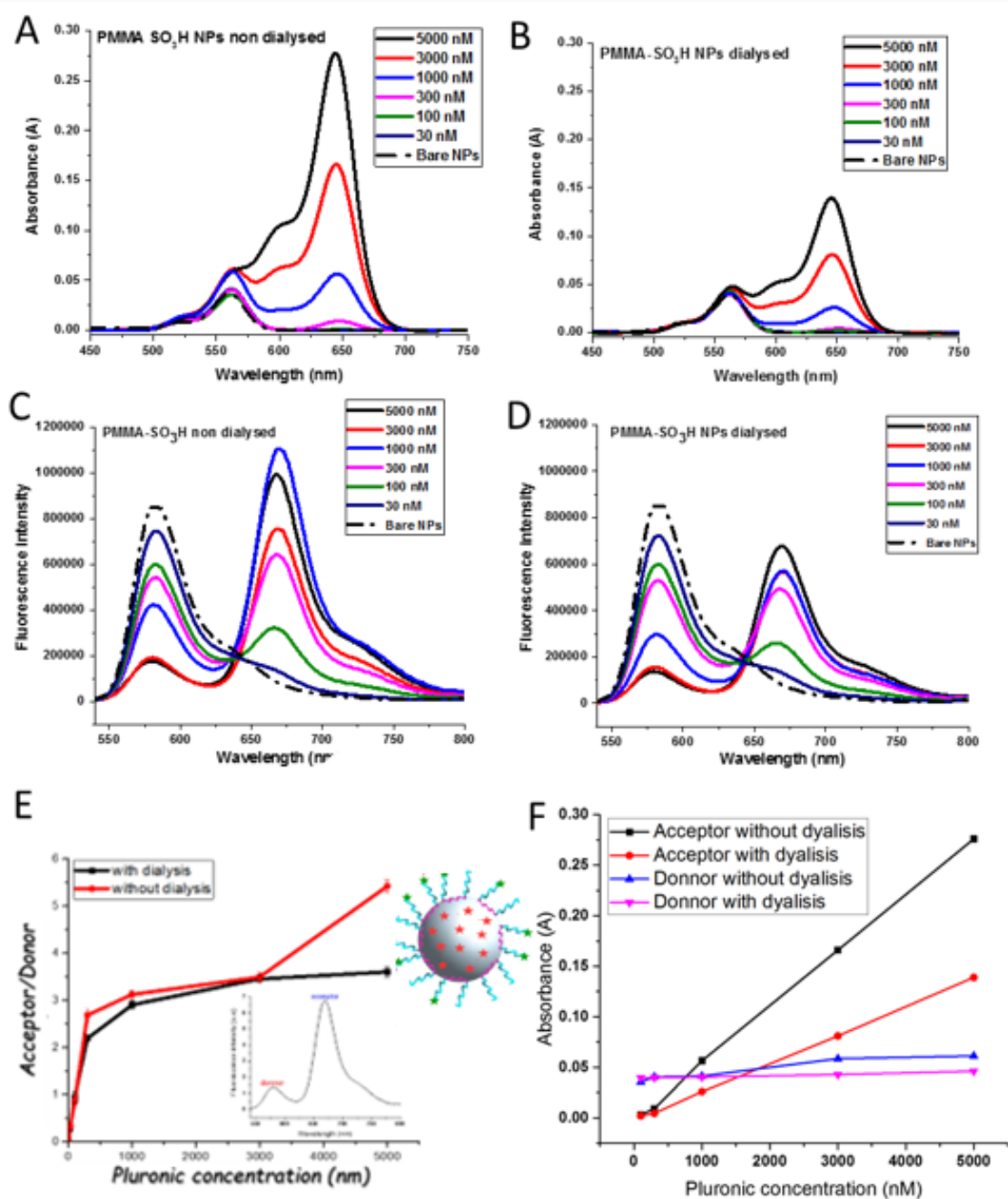


Figure 2. FRET comparison between the donor (R18 / F5) inside PMMA-SO₃H nanoparticle and the acceptor (Cy5) adsorbed on the NP surface thanks to pluronic before and after dialysis. (a) absorbance before dialysis, (b) Absorbance after dialysis, (c) FRET before dialysis, (d) FRET after dialysis depending on the pluronic concentration, (e) Comparison of the FRET between the donor (R18 / F5) inside the nanoparticle and the acceptor (Cy5) adsorbed on the surface of the NP thanks to the pluronic before and after dialysis and (f) absorbance of donor and acceptor as a function of pluronic concentration.

Since nanoparticles stabilized by pluronic shell are intended for use in multicomponent biological systems, we then wanted to evaluate the stability of the pluronic shell in presence of different competitors. We hence quantified the influence of the presence of various concentrations of three competitors, unlabeled pluronic, tween80 and bovine

serum albumin (BSA), on the FRET between the NPs and the adsorbed pluronic-Cy5 (figure 3). A desorption or a reorganization of pluronic-Cy5 from/on the NP surface is expected to result in a change of the FRET signal. All measurements have been carried out below the CMC of the surfactants in order to minimize contributions from micelles. The NPs stabilized with pluronic did not reveal any tendency to aggregate over the whole range of competitor concentrations, as seen from the constant absorbance signal.

BSA only led to a slight decrease in the FRET signal, even at relatively high concentrations, indicating a good stability of the pluronic shell towards protein adsorption or exchange with proteins. Only at very high albumin concentrations a significant decrease in FRET was observed, which might indicate some desorption of pluronic-Cy5 or a stretching of the PEGs leading to an increase in the donor-acceptor distance. The situation was, however, very different when unlabeled pluronic was used as competitor. In this case a strong decrease of the FRET signal was observed even for low concentrations of pluronic. Such a strong decrease in FRET can only be explained by desorption of pluronic-Cy5 from the particle surface. Even though the pluronic shell showed an excellent stability towards dialysis and proteins, it thus seemed to remain highly dynamic with respect to exchange with free pluronic. We then tested the exchange with a different PEGylated surfactant, Tween80. Again a clear decrease in the FRET signal was observed, indicating exchange of pluronic-Cy5 by an excess of Tween80. However, the observed decrease was less pronounced than in the case of pluronic and a threefold excess of Tween80 was required to obtain efficient exchange. Pluronic thus seems to have a particularly strong partitioning to the surface of our PMMA based NPs.

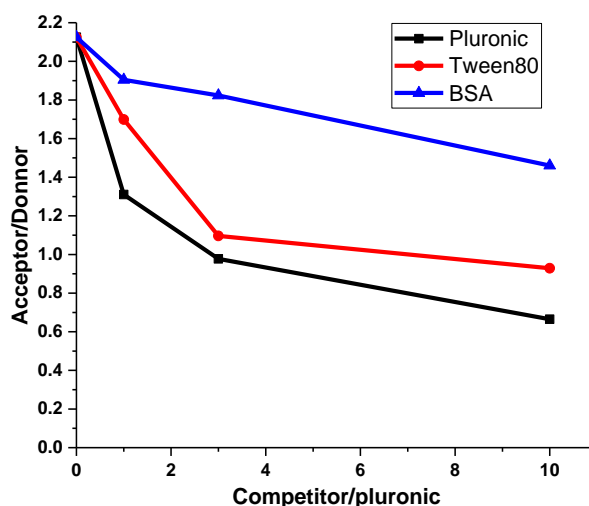
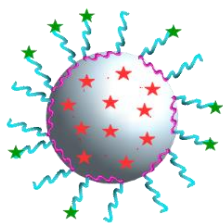


Figure 3. Substitution of pluronic at 3000 nM on the FRET PMMA-SO₃H NP surface by competitors (pluronic, Tween80 and BSA) as function of acceptor/donor ratio.

Characterization of Pluronic Shell and NP Stability using FCS

To better characterize the adsorbed pluronic shell and how it affects NP stability, we then designed fluorescence correlation spectroscopy (FCS) experiments. FCS is a powerful method to analyze fluorescent species and notably fluorescent NPs, as it allows obtaining simultaneously information on the size, brightness and concentration of NPs or fluorescent emitters in situ. FCS measures the average duration of brief burst of photons from individual fluorescence emitters diffusing through an observation volume in a confocal microscope(142).

We first used FCS to determine the number of pluronics adsorbed per NP (figure 4). For this, pluronic was modified with lissamine rhodamine dye at a concentration of 1 dye per pluronic. The labelled pluronic was then diluted with unlabeled pluronic to avoid interactions between the fluorophores. Different concentrations of this mixtures were then added to “empty” NPs without loaded dye, followed by dialysis as above. The resulting pluronic coated NPs were then analyzed by FCS. The number of pluronics per NP was then determined by measuring the brightness of the resulting NPs and comparing it to the brightness of individual lissamine labeled pluronics under the same conditions.

The quantity of pluronic molecules adsorbed on the NP surface increased with the total concentration of pluronic-lissamine. This increase was nearly linear for low concentrations of lissamine but became less pronounced above 1000 nM, indicating a

Langmuir-type adsorption behavior. At 3000 nM of pluronic 86 pluronic molecules were adsorbed per NP. Corresponding to 1 PEG chain per 5.5 nm² of NP surface (compare to literature 1 PEG chain per 2.1 nm²(118); 1 PEG chain per 5.6 nm²(143), 1 PEG chain per 4.4 nm²(144)).

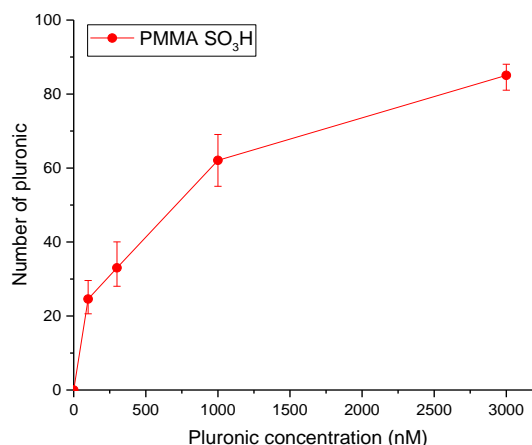
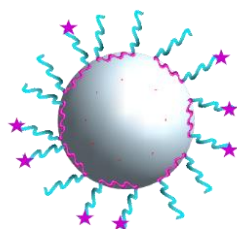


Figure 4. Number of lissamine adsorbed on PMMA-SO₃H NPs thanks to pluronic after dialysis, determined by FCS.

We then studied how the pluronic shell influenced the stability of the NPs. In particular, NPs intended for biological applications should show a high colloidal stability, notably in the presence of salt, and avoid the nonspecific adsorption of proteins, leading to the formation of a protein corona (112,145). Therefore, FCS was used to investigate the performance of our pluronic coated NPs in phosphate buffered saline (PBS), a medium mimicking ionic strength and pH of typical biological media, and in the presence of serum, which is a complex mixture of biomolecules. For this, we monitored changes in the size distribution and concentration of bare NPs and NPs coated with two different concentration of pluronic after incubation of 1h. Loading the NPs with a low percentage (1 wt.%) of the R18/F5 dye salt allowed measuring diffusion coefficients, and thus size, brightness, and concentration of the NPs in model biological media without any interferences due to the high concentrations of proteins in the media (146).

As shown in figure 5, the average size of NPs as measured by FCS in aqueous medium was 25 nm for bare NPs. The slightly smaller size compared to the DLS measurements stems from the fact that DLS is particularly sensitive to larger particles, which show higher scattering. Upon coating with pluronic the particle size increased to 30 nm, in good accordance with the thickness of the PEG-shell and DLS results. Exposing the

particles to PBS resulted in fast aggregation in the case of bare particles, but also for particles coated with pluronic F-127 at a concentration of 1000 nM. For NPs coated at a concentration of 3000 nM with either pluronic F-127 or F-68, however, no size increase was observed. The pluronic shell thus renders them stable against aggregation in saline solution. When exposed to a 10% serum solution, the size of bare NPs increased by about 10 nm, corresponding to the adsorption of at least a monolayer of serum proteins. In the case of NPs treated with 1000 or 3000 nM of pluronic F-127, this effect was negligible (<2 nm of size increase). The size increase upon exposure to serum proteins was still less pronounced (<1 nm) for particles coated with 3000 nM pluronic F-68.

Pluronic, being amphiphilic block copolymers, thus adsorbed strongly onto the surface of our hydrophobic NPs via their hydrophobic polyoxypropylene (POP) center block. In this way the hydrophilic polyoxyethylene (PEG) blocks form a brush layer on the particle surface. Once a sufficient density of this PEG brush is reached, it provided particle stability vs particle aggregation in saline solutions and prevented adsorption of serum proteins, presumably through steric repulsion.(147) The slightly higher protein resistance of NPs coated with pluronic F-68 is probably due to the higher PEG content of the later, leading to a denser brush. For this reason, pluronic F-68 was chosen for *in vivo* experiments.

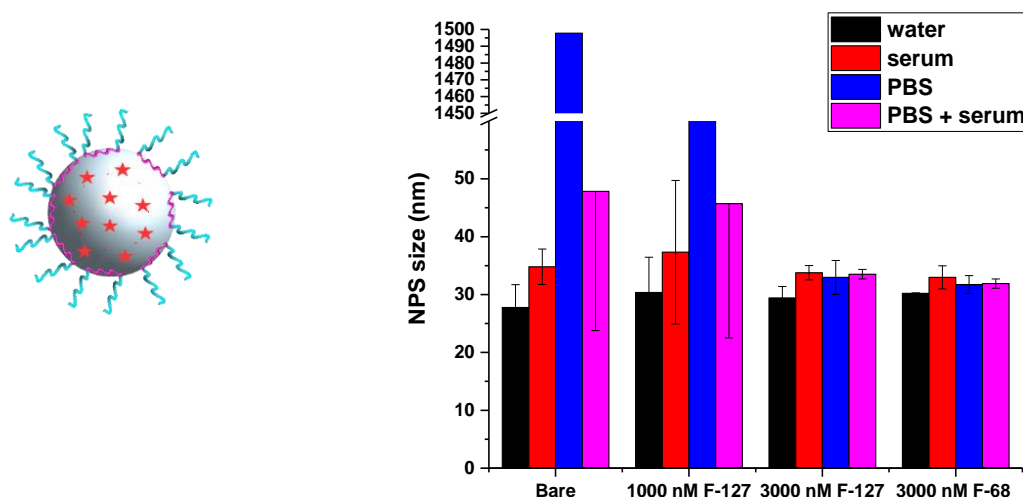


Figure 5. Stability of PMMA-SO₃H-based NPs encapsulating 1% R18/F5 under physiological conditions and in the presence of serum, studied by FCS for bare PMMA-SO₃H, PMMA-SO₃H coated with pluronic F-127 at 1000 and 3000nM, and PMMA-SO₃H coated with pluronic F-68 at 3000 nM.

In vivo Imaging of Pluronic Coated NPs.

In order to evaluate the potential of our pluronic coated fluorescent NPs for *in vivo* imaging, we monitored them directly in the vasculature of mouse brain. For this the PMMA-SO₃H NPs of 70 nm were labeled with 20 wt.% relative to the polymer of R18/F5-TPB and coated with pluronic F-68 (figure 6). Bare dye loaded NPs were tested for comparison (figure 7). Each formulation was injected in the blood circulation of mouse and the brain studied using two-photon microscope over a time course of approximately 1 hour. The recorded videos showed fluorescent objects moving throughout the entire vasculature. We can assign these objects to individual NPs, but more work is needing to prove that these are single NPs. The individual images of brain over time revealed clear difference in the clearance of bare on pluronic-coated NPs. Indeed, pluronic F68 coated NPs remained much longer in the circulation showing pronounced decrease in the intensity only after 45 min of injection. By contrast, bare NPs showed strong signal loss already after 5 min. This drastic difference in the circulation time is in line with much weaker adsorption of protein components of serum for pluronic-coated NPs compared to bare NPs in our FCS measurements. Nevertheless, the dynamic nature of the pluronic shell results in a limited circulation time even for particles coated with pluronic.

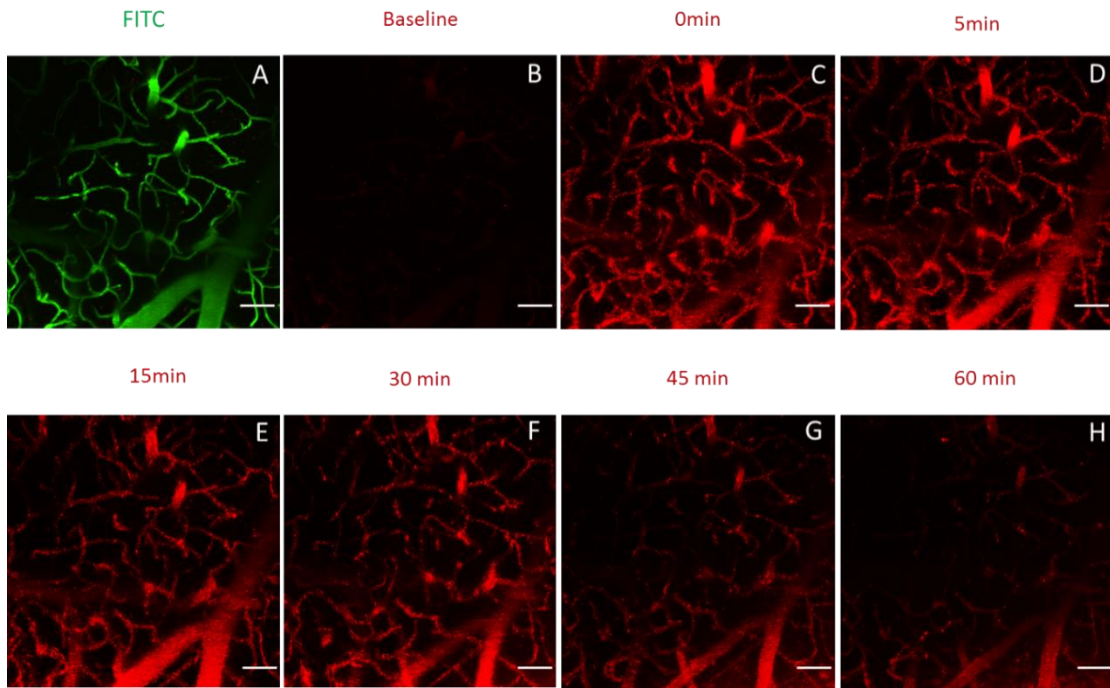


Figure 6. In-vivo study of PMMA-based NPs coated with pluronic F-68 directly injected into the femoral artery of a mouse by two-photon microscopy using intravital imaging of small animals. a) Identification of the brain vessels with FITC-dextran (0.05 mL) b) to h) followed by imaging of NPs within the mouse over a period of 60 minutes. Laser power 3.5%-15%. A – GAASP, LP<570, master gain 600. B-H – GAASP, LP>570, master gain 530. Scale bar 50 μ m.

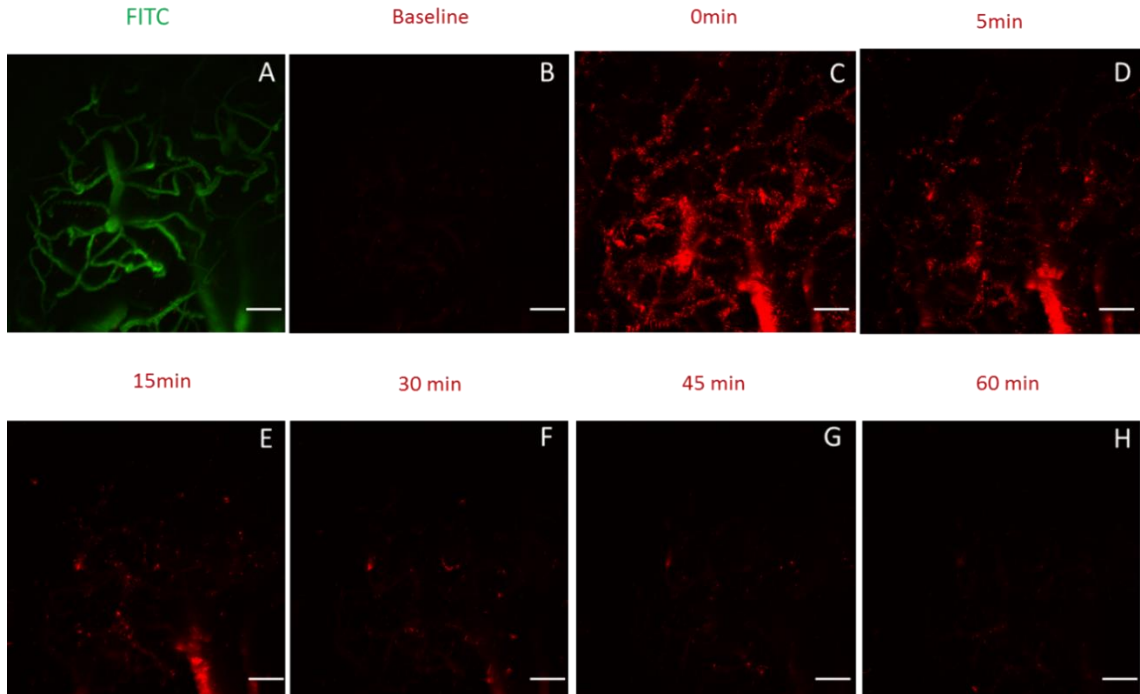


Figure 7. In-vivo study of bare PMMA-based NPs directly injected into the femoral artery of a mouse by two-photon microscopy using intravital imaging of small animals. a) Identification of the brain vessels with FITC-dextran (0.05 mL) b) to h) followed by imaging of NPs within the mouse over a period of 60 minutes. Laser power 3.5%-15%. A – GAASP, LP<570, master gain 600. B-H – GAASP, LP>570, master gain 530. Scale bar 50 μ m.

Conclusion

This report demonstrated that a PEGylated ligand as pluronic was efficient in stabilizing monodisperse PMMA-SO₃H nanoparticles made by nanoprecipitation. Combining FRET and FCS measurements allowed characterizing the adsorbed pluronic shell with in terms of density but also stability. It was also shown that simple adsorption of pluronic rendered these hydrophobic nanoparticles stable in physiological environment and imparted resistance to non-specific protein adsorption. Moreover, *in vivo* imaging in mice brain revealed that particles clearance from blood decreased drastically in the presence of pluronic coating, so that NPs could be clearly detected over course of 1h. Combining the very high fluorescence brightness of dye-loaded polymer NPs with a simple surface modification scheme made it possible to image fluorescent NPs directly in the vasculature of the mouse brain, which has been a challenge do far. This study shows that pluronic can provide a very useful route to imparting colloidal stability and stealth properties to polymer NPs for both *in vitro* and *in vivo* experiments. Even though the dynamic nature of the pluronic coating limits the time scale over which the protection is effective, the presented approach can be valuable for rapid assessment of the performance of various polymer based NP systems for applications in bio-imaging and drug delivery.

Nanoparticules polymériques dopées en cyanine : Conception du transfert d'énergie pour l'imagerie par fluorescence multicolore

Le développement des nanoparticules polymériques fluorescentes ultra-brillantes a fait un pas en avant après l'introduction de la méthode d'encapsulation de sels de dérivés de rhodamine avec des contre-ions hydrophobes pour lutter contre l'extinction causée par l'agrégation mais a aussi conduit à un comportement collectif des fluorophores dû à un couplage entre fluorophore par EET(61). Ce phénomène peut notamment être utilisé pour générer des antennes collectrices géantes en amplifiant la fluorescence d'un fluorophore unique. Néanmoins, cette approche n'ayant été validée que pour l'ester octadécylrique de la rhodamine B (R18), il était important de démontrer que ce transfert d'énergie peut également s'appliquer avec d'autres fluorophores cationiques tels que les cyanines.

Nous avons choisi quatre fluorophores issus de la famille des cyanines, émettant du vert au proche infrarouge, avec leur contre-ion volumineux F12-TPB que nous avons encapsulés au sein de nanoparticules de PLGA et de PMMA-MA à différentes concentrations (50 et 200 mM) afin de créer un comportement coopératif au sein de la matrice polymérique (figure 1). La synthèse et la purification de tous les sels de fluorophore ont été réalisées avec l'aide de l'ancien doctorant Bohdan Andreiuk. Ces sels ont été encapsulés dans des NP polymériques en utilisant la même approche de nano-précipitation que celle décrite précédemment, dans laquelle des solutions de sel de fluorophore et de polymère dans de l'acétonitrile est rapidement mélangées à de l'eau.

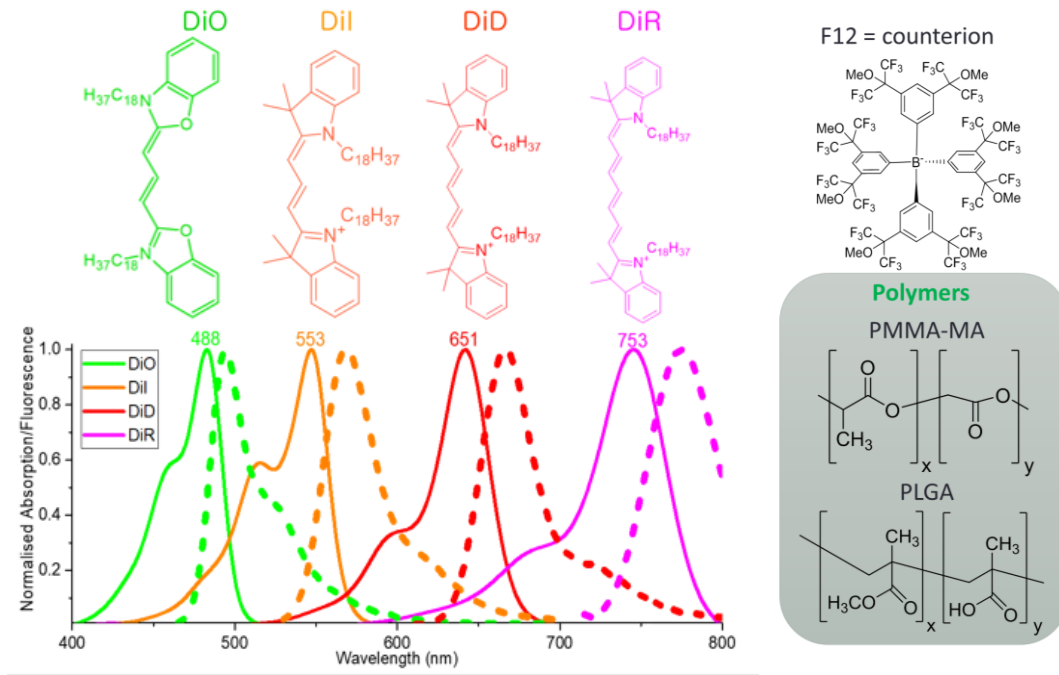


Figure 1. NPs dopées en fluorophores : structures des polymères PLGA et PMMA-MA ; les structures des fluorophores et son contre-ion F12-TPB et la représentation schématique d'un polymère NP dopé en fluorophore.

Il a été constaté qu'avec l'augmentation de la concentration en fluorophore au sein de la NP, les rendements quantiques de fluorescence des nanoparticules fluorescentes restent relativement élevés (figure 2). En général, le rendement quantique diminue lorsque la concentration du fluorophore augmente. Cependant, cette chute est faiblement prononcée dans ce cas quelle que soit la nature de la matrice polymérique. De plus, les meilleurs rendements quantiques ont été obtenus avec les NPs à base de PMMA-MA démontrant une auto-extinction moins forte des fluorophores dans la matrice polymérique à base de PMMA-MA que dans celle à base de PLGA.

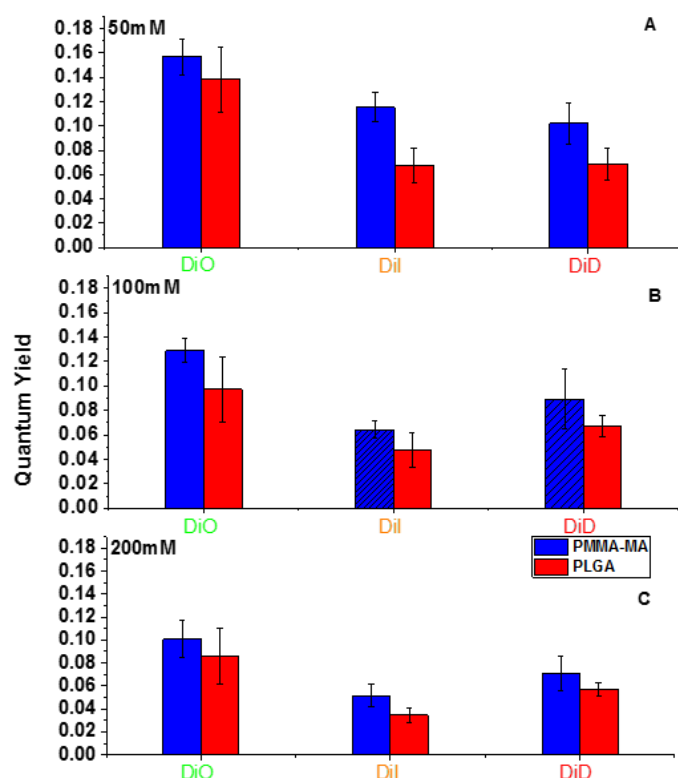


Figure 2. Rendement quantique des NPs à base de PLGA (rouge) de PMMA-MA (bleu) pour concentrations différentes de cyanine avec F12-TBP en contre-ion (par rapport au polymère) : (a) 50mM, (b) 100mM et (c) 200mM.

Pour obtenir un FRET efficace à l'intérieur des NPs nous avons encapsulé à la fois une quantité élevée en fluorophore donneur et une quantité moindre en fluorophore accepteur au sein des NPs polymériques (rapport D/A élevé). Dans ce cas, les donneurs devraient constituer un système efficace de capture de la lumière qui transfère de l'énergie à un petit nombre d'accepteurs, fournissant ainsi une amplification de son émission. Ainsi, nous avons cherché à obtenir un rapport accepteur/donneur optimal afin d'avoir une auto-extinction de l'accepteur minimale et une efficacité FRET maximale (figure 3). Dans les nanoparticules de PMMA-MA et PLGA, l'augmentation du rapport accepteur/donneur a accru l'efficacité du FRET. De manière remarquable, pour une concentration en donneur faible et un rapport accepteur/donneur faible, l'efficacité du FRET était systématiquement supérieure dans les NPs de PLGA. Cela indique que même avec une faible concentration en donneur au sein des NPs de PLGA, les fluorophores communiquent pour assurer un FRET efficace. Cette observation est conforme aux études antérieures montrant que le sel de fluorophore R18 présentait déjà un clignotement des particules lorsque la

concentration en colorant était faible, contrairement aux NPs à base de PMMA-MA, où lorsque la concentration est faible la communication fluorophore-fluorophore et le clignotement sont très faiblement marqués. Avec une concentration en fluorophore élevée (200 mM), l'efficacité du FRET augmente considérablement pour les NPs à base de PMMA-MA, conformément aux données précédentes pour le sel de fluorophore à base de rhodamine (R18) en tant que donneur. Cependant, dans le cas du PLGA, aucune amélioration de l'efficacité du FRET n'est observée pour une concentration du colorant plus élevée. Dans ce cas, une grande quantité de donneurs devraient constituer un système efficace de récupération de la lumière qui transfère l'énergie à quelques accepteurs, fournissant ainsi une amplification de son émission.

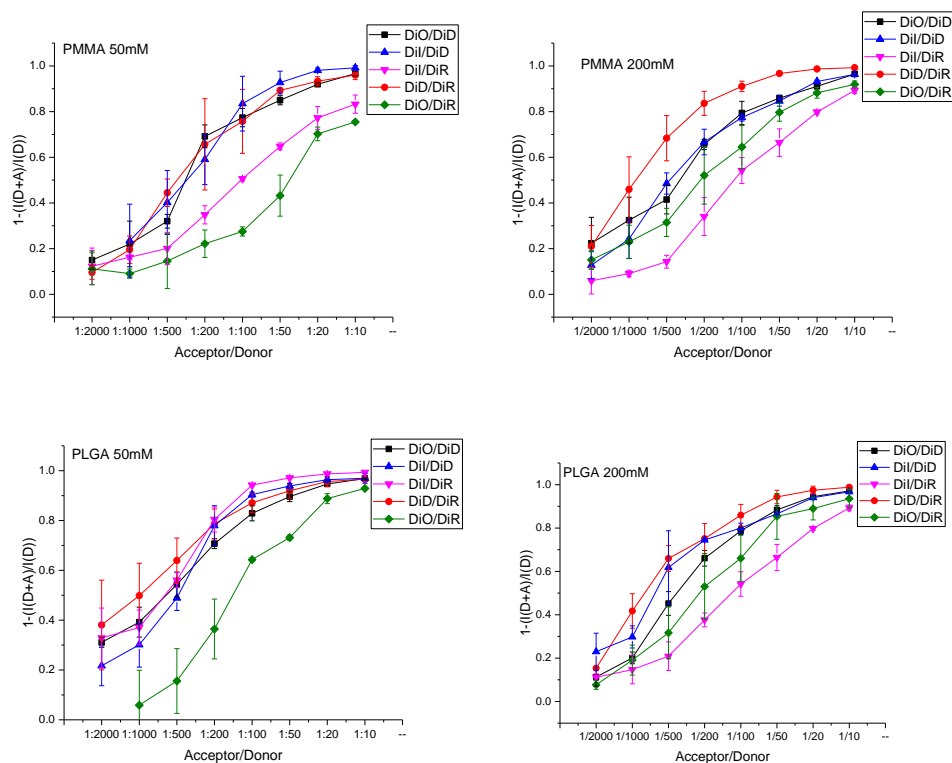


Figure 3. Efficacité semi-quantitative du FRET dans des particules de PMMA-MA ou de PLGA à deux concentrations différentes de cyanine/F12-TPB : 50 et 200 mM et en fonction du rapport accepteur/donneur.

Cyanine-loaded polymer nanoparticles: engineering energy transfer for multi- color fluorescence imaging

Doriane Heimbürger, Andreas Reisch, Bohdan Andreiuk, and Andrey S. Klymchenko

Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, UMR 7021 CNRS, Faculté de Pharmacie,
Université de Strasbourg, 67401, Illkirch, France.

Abstract

In this work, we explore the possibility of improving the emission of a single molecule by a polymeric nano-antenna capable of capturing the energy of thousands of donor fluorophores to a single acceptor fluorophore. In this nano-antenna, the fluorophores are very close within the nanoparticle thanks to their bulky counter-ion allowing an ultra-fast diffusion of the excitation energy. Our ~ 30-35 nm nanoparticles contain between 60 and 300 donor fluorophores that can efficiently transfer energy to 1 or 2 acceptor molecules, giving an antenna effect of about 500.

Introduction

When several donor fluorophores efficiently collect light energy and transfer it via the FRET to a single acceptor, amplification of the fluorescence emission of the latter can be observed. A dye-doped polymeric nanoparticle is a promising platform for the fabrication of light-harvesting nanoantennas since the fluorophores are encapsulated in a confined space and are coupled by excitation energy transfer (EET). In addition, the fluorophores are encapsulated with minimal aggregation-caused quenching. (77) Currently, the detection of single fluorescent molecules requires a particularly dedicated microscopic configuration with a high laser excitation power density ranging from from 100 to 5000 W / cm² (145). To drastically decrease the excitation power, one solution is to generate a giant light-harvesting nanoantenna to amplify the fluorescence of a single fluorophore. Our recent work has shown that the encapsulation of several fluorophores inside polymeric nanoparticles by the use of large counterions minimizes the self-quenching of fluorophores and produces a fluorescence switching of up to 500 fluorophores per particle. (61) More recently (110), we coupled by EET a much larger number of fluorophores to generate a giant light-harvesting nanoantenna. Indeed, using rhodamine-based cationic fluorophores (R18 / F5-TPB) encapsulated in a matrix of poly (methyl methacrylate and methacrylic acid) (PMMA-MA) at 30% by weight, it was possible to obtain NPs of different size (from 30 to 107 nm according to TEM) which can generate an unprecedented amplification (antenna effect) of the acceptor Cyanine5 (DiD) emission encapsulated inside the nanoparticle. We also demonstrated that this antenna effect (calculated as the ratio between the maximum excitation intensity of the donor and that of the acceptor (146)) depended on the size of the NPs obtained. Remarkably, for the larger NPs (~60 nm), the antenna effect reached ~1000 which is the largest amplification reported to date, being even larger than that obtained with best plasmonic nanoantennas. Based on these results, we hypothesized that the developed light-harvesting concept could be extended to a different family of fluorophores, such as cyanine, which would enable preparation of nanoantennas operating over a spectral range from green to near infrared. For this, we used four cyanine derivatives, DiO, DiI, DiD and DiR bearing two octadecyl chains, in PMMA-MA and PLGA NPs in order to create NPs with fluorophores with extremely cooperative behavior within the polymer matrix. These NPs ~ 30-35 nm in diameter can generate an effective FRET of more than 2000 donors

communicating with one or two acceptor molecules. In addition, we have demonstrated that nanoantennas of any desired color can be developed.

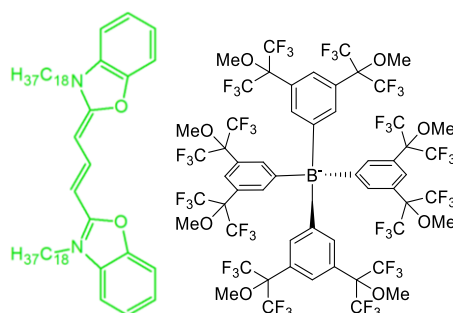
Materials and methods

1) Materials

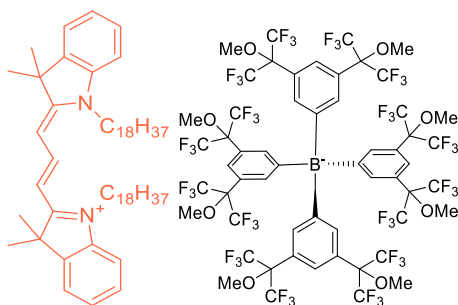
PLGA poly(lactide-co-glycolic acid), lactide 50 mole%, glycolide 50mole%, $M_n \sim 24\ 000$, PMMA poly(methyl methacrylate-co-methacrylic acid) 1,5% methacrylic acid, $M_n \sim 15\ 000$ and $M_w \sim 34\ 000$, sodium tetrakis[3,5-bis(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-methoxy-2-propyl)phenyl]borate trihydrate (F12), 3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate (DiO-Cl), and acetonitrile were purchased from Sigma-Aldrich and used as received. DiI-Cl and DiD-Cl were synthesized according to a previously described procedure(148). Lithium tetrakis(pentafluorophenyl)borate-ethyl ether (F5) was purchased from TCI and used as received. Sodium phosphate monobasic (99%, Sigma-Aldrich) and sodium phosphate dibasic dehydrate (99%, Sigma-Aldrich) were used to prepare 20 mM phosphate buffer solution at pH 7.4.

2) Synthesis of dye salts

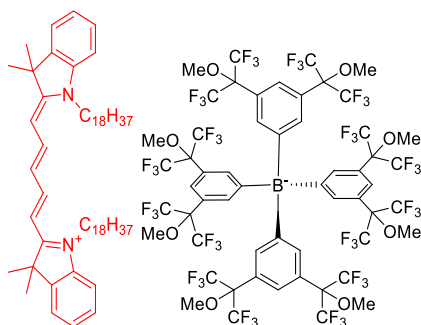
DiO-F12. DiO-Cl (1 eq., 22 mg, 0.023 mmol) and sodium tetrakis[3,5-bis(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-methoxy-2-propyl)phenyl]borate trihydrate (F12) (3 eq., 111 mg, 0.068 mmol) were mixed in 0.5 ml of dichloromethane, TLC has shown instant conversion. Product was purified by TLC using dichloromethane/methanol 98/2 as eluent. After evaporation of solvents 48 mg of DiO-F12 was obtained (77 % yield).



DiI-F12. DiI-Cl (1 eq., 20 mg, 0.026 mmol) and sodium tetrakis[3,5-bis(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-methoxy-2-propyl)phenyl]borate trihydrate (F12) (2 eq., 100 mg, 0.052 mmol) were mixed in 0.5 ml of dichloromethane, TLC has shown instant conversion. Product was purified by TLC using dichloromethane/methanol 95/5 as eluent. After evaporation of solvents 58 mg of DiI-F12 was obtained (86 % yield).



DiD-F12. DiD-Cl (1 eq., 20 mg, 0.02 mmol) and sodium tetrakis[3,5-bis(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-methoxy-2-propyl)phenyl]borate trihydrate (F12) (2 eq., 74 mg, 0.04 mmol) were mixed in 0.5 ml of dichloromethane, TLC has shown instant conversion. Product was purified by TLC using dichloromethane/methanol 95/5 as eluent. After evaporation of solvents 38 mg of DiD-F12 was obtained (73 % yield).



3) Preparation of fluorescent nanoparticles

PLGA and PMMA were prepared at a concentration of 10 mg/mL. PLGA was then diluted with acetonitrile to a concentration of 2 mg/mL and PMMA was then diluted with acetonitrile to a concentration of 1 mg/mL with acetonitrile containing different concentrations of dyes ranging from 50 mM to 200 mM dye loading with respect to the polymer (assuming that polymer density inside NPs is 1 g/mL). 50 μ L of the polymer solution were then added quickly using a micropipette to 450 μ L of fresh phosphate buffer under shaking (Thermomixer comfort, Eppendorf, 1100 rpm, 21°C). The particle solution was then quickly diluted fivefold with the same buffer.

4) Nanoparticles characterization

DLS measurements were performed on a Zetasizer Nano series DTS 1060 (Malvern Instruments S.A.). Electron microscopy was performed on Philips CM120 transmission electron microscope. Absorption and emission spectra were recorded on a Cary 400 Scan ultraviolet–visible spectrophotometer (Varian) and FluoroMax-4 spectrofluorometer (Horiba Jobin Yvon) equipped with a thermostated cell compartment, respectively. QYs were calculated using rhodamine B in MeOH (QY =

0.7) for DiI NPs, fluorescein in 0.1 M NaOH (QY = 0.92) for DiO NPs and DiD in MeOH (QY = 0.33) for DiD NPs. Fluorescence life time measurement were performed with the time-correlated single-photon counting (TCSPC) technique of Edinburgh spectrofluorometer using excitation pulses at 488 nm. Emission was at 520 nm for DiO (donor) and at 665 nm for DiD (acceptor). Time-resolved intensity data were treated with Edinburgh spectrofluorometer software. Radiative (k_r) and non-radiative (k_{nr}) rate constants were calculated with the QY and mean lifetime of the NPs.

Results and discussion

Dye-loaded NPs of small size were prepared through the nanoprecipitation of the polymer and dye salt from acetonitrile in phosphate buffer based on our recently developed protocol of charge-controlled nanoprecipitation.(61,95) As fluorophores, we selected cyanine derivatives bearing two octadecyl chains DiO, DiI and DiD known to be highly hydrophobic and insoluble in phosphate buffer to precipitate with the polymer during nanoprecipitation (figure 1). F12, a bulky hydrophobic tetraphenylborate, was chosen as counterion in order to facilitate the encapsulation of our cationic dyes into polymer and minimize its self-quenching(149). Indeed, among previously studied tetraphenylborates, the bulkiest F12 was the most efficient in preventing aggregation-caused quenching of cyanines (149).

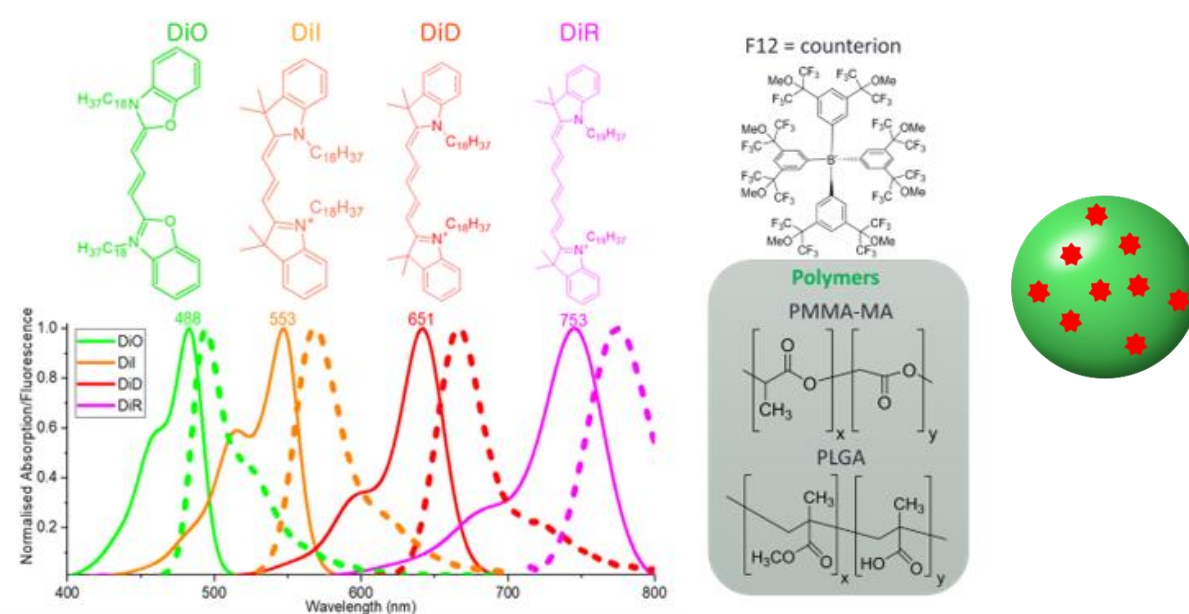


Figure 1. Dye-loaded NPs: structures of the polymers PLGA, and PMMA-MA; structures of the cyanine dyes and their bulky counterion F12 used in this study; and schematic representation of a dye-loaded polymer NP.

According to dynamic light scattering (DLS), the sizes of the obtained NPs increased slightly for the PLGA polymers with increasing dye loading where there is no change in size for PMMA-MA polymer. Transmission electron microscopy (TEM) confirmed this tendency revealing smaller size from around 29-33 and 36-44 nm for 50 and 200 mM, respectively, of dye loading in PLGA NPs (Fig. 2, Table 2) and 28-37 and 34-38 nm for 50 and 200 mM, respectively, of dye loading in PMMA NPs (Fig. 2, Table 1). Thus, independently of the loaded dye, NPs displayed similar size and spherical structure

meaning that the nature of encapsulated dye does not influence the process of NPs formation.

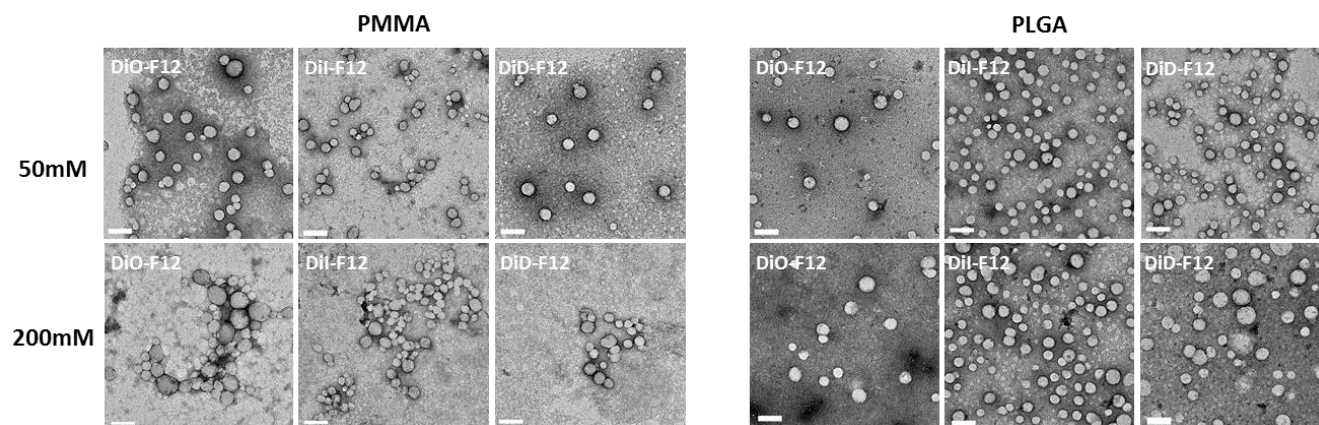


Figure 2. TEM images of dye-loaded NPs made from PMMA-MA and PLGA polymers in phosphate buffer. Scale bars, 100 nm.

| Sample | Dye loading (mM) | Size, DLS (nm) | PDI | Size, TEM (nm) | Donor per NP |
|--------|------------------|----------------|---------------|----------------|--------------|
| DiO | 50 | 52.1 ± 0.67 | 0.138 ± 0.034 | 28 ± 3.8 | 580 |
| DiI | 50 | 52 ± 2.5 | 0.111 ± 0.043 | 34 ± 6.3 | 710 |
| DiD | 50 | | | 37 ± 5.7 | 920 |
| DiO | 200 | 79.4 ± 1.7 | 0.106 ± 0.027 | 38 ± 6.2 | 3330 |
| DiI | 200 | 51.3 ± 1 | 0.113 ± 0.037 | 34 ± 5.3 | 2380 |
| DiD | 200 | | | 36 ± 6.8 | 2830 |

Table 1. Size, spectroscopic and single-particle properties of PMMA-MA NPs

| Sample | Dye loading (mM) | Size, DLS (nm) | PDI | Size, TEM (nm) | Donor per NP |
|--------|------------------|----------------|---------------|----------------|--------------|
| DiO | 50 | 49.6 ± 1.1 | 0.146 ± 0.052 | 29 ± 3.7 | 540 |
| DiI | 50 | 42.8 ± 1.3 | 0.130 ± 0.02 | 32 ± 4.5 | 600 |
| DiD | 50 | | | 33 ± 4.1 | 650 |
| DiO | 200 | 62.3 ± 1.5 | 0.114 ± 0.017 | 40 ± 7.9 | 3880 |
| DiI | 200 | 93.9 ± 1.2 | 0.151 ± 0.033 | 36 ± 5.8 | 2830 |
| DiD | 200 | | | 44 ± 9.5 | 5170 |

Table 2. Size, spectroscopic and single-particle properties of PLGA-NPs

The fluorescence quantum yield (QY) of the obtained NPs decreased and the absorption bands became broader with increase in the dye loading which are related to some dye aggregation (figure 3). Nevertheless, quantum yield remained high even at 200 mM loading, indicating that the extend of aggregation-caused quenching is moderate. This is in line with relatively small changes in the absorption and emission spectra of the NPs, as compared to loading of dyes with small inorganic counterions (see ref. 145). The QY values were systematically better in PMMA-MA polymer matrix compared to PLGA, in line with our earlier study using R18/F5-TPB dye salt. These results suggest that salts of cyanine dyes also show tendency to aggregate less in PMMA-MA as compared to PLGA matrix.

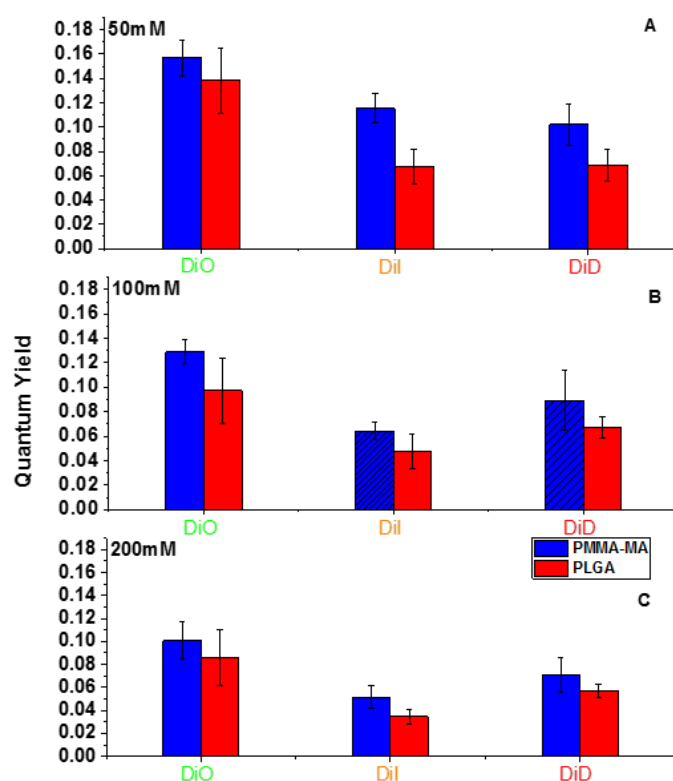


Figure 3. Fluorescence quantum yields of PMMA-MA and PLGA NPs loaded at different concentrations with three cyanine dyes and F12 counterion. The error bars are standard error of the mean (n= 5).

Next, we introduced DiD or DiR as energy acceptor inside DiI loaded NPs. The spectral overlap between emission spectrum of donor (DiI) and absorption spectrum of acceptor (DiD), required for FRET, entrapped separately in PMMA-MA NPs, is shown in Figure 4.

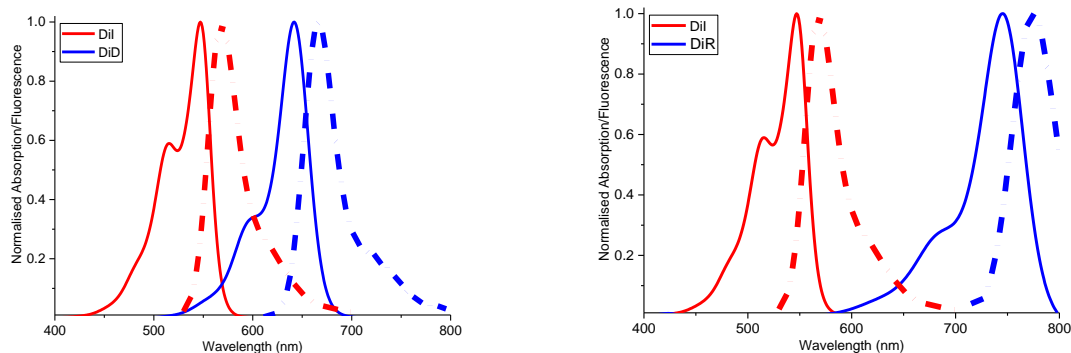


Figure 4. Normalized absorption (solid) and fluorescence (dashed) spectra of donor (DiD/DiR) and acceptor (Dil) entrapped separately in nanoparticles.

For both polymers NPs containing 50 mM of donor dyes, an increase in the acceptor concentration resulted in a rapid growth of acceptor emission, accompanied by a drop in the donor emission, indicating that the energy absorbed by the donor has been successfully transferred to the acceptor (Figure 5). An efficient FRET process was observed for Dil/DiD thanks to the significant overlap between absorption spectrum of Dil and DiD. Also, overlap between the emission spectra of Dil and the absorption spectra of DiR enables an energy transfer between the dyes. Thus, we can combine Dil and DiR with large Stokes shift and extraordinary NIR emission property at the same time.

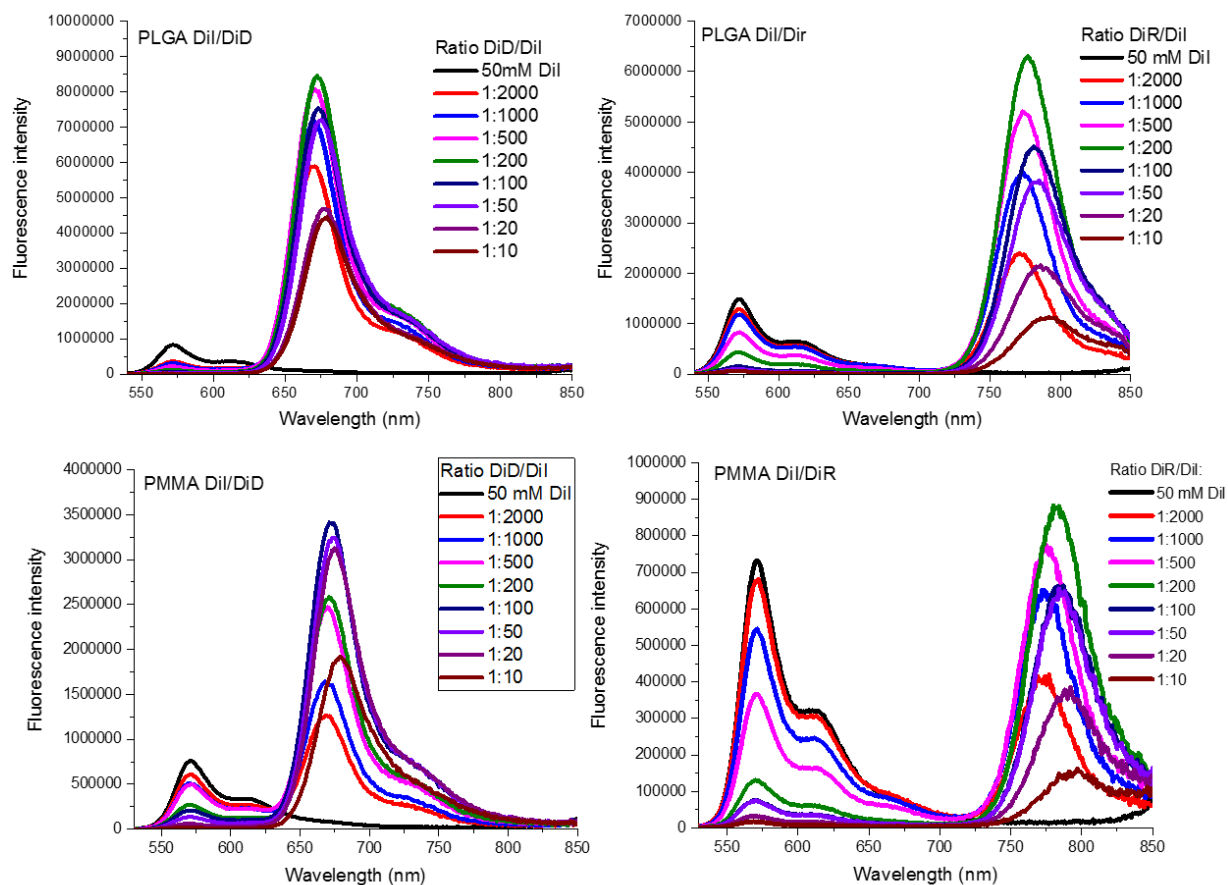


Figure 5. Fluorescence spectral measurements of FRET PLGA NPs (top) and PMMA-MA NPs (bottom) loaded with (left) DiI/DiD (right) DiI/DiR and their counterion F12 at 50 mM of the donor.

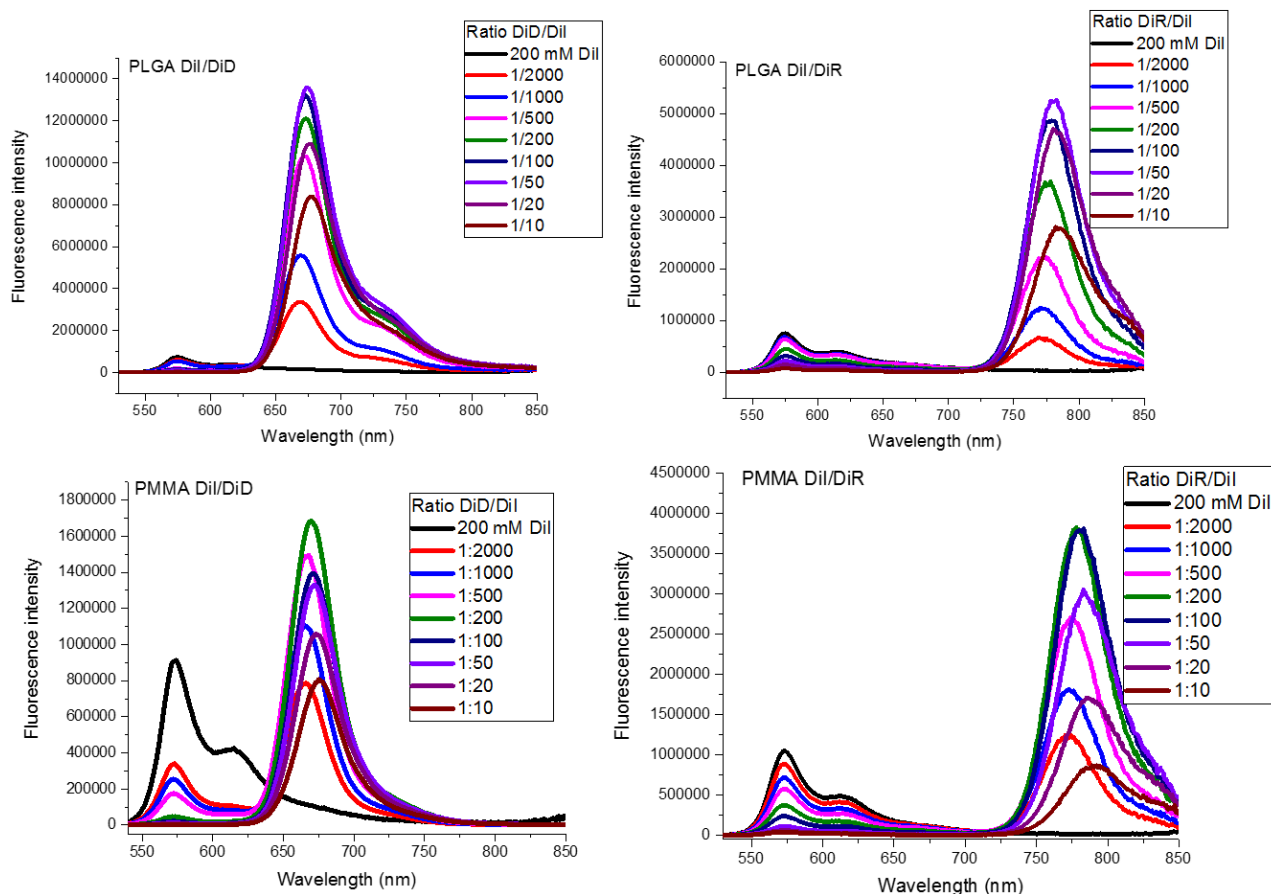


Figure 6. Fluorescence spectral measurements of FRET PLGA NPs (top) and PMMA-MA NPs (bottom) loaded with (left) DiI/DiD (right) DiI/DiR and their counterion F12 at 200 mM of the donor.

The FRET efficiency $1 - \frac{I_D^A}{I_D}$, where I_D and I_D^A are the donor emission intensities in the absence and presence of acceptor respectively, was measured for a constant concentration of donor (50 and 200 mM) inside NPs and an increase in the donor loading from 1/2000 to 1/10 for acceptor/donor ratio. Estimated FRET efficiency reached ~ 0.9 in PLGA DiI/DiD NPs for the 1/200 acceptor/donor ratio, while similar efficiency was achieved in PMMA-MA NPs for the 1/100 acceptor/donor ratio. However, it should be mentioned that further increase in the acceptor loading leads to self-quenching of the acceptor dyes, so the dye-loading amount has to be experimentally optimized to find a compromise between minimal self-quenching and maximal FRET efficiency.

For a constant concentration of acceptor inside NPs, an increase in the donor loading from 50 to 200 mM produced a significant growth in FRET efficiency in the case of PMMA and led to a decrease in FRET efficiency in the case of PLGA (figure 5 and 6). Such differences in the FRET efficiency is supposed to be linked to the dye organization inside the polymer matrix. In the case of PMMA NPs, the dye is probably

homogeneously distributed within the particle during nanoprecipitation due to the hydrophobic nature of the polymer, whereas, in the case of less hydrophobic PLGA, the particles are formed slower, which leads to formation of dyes cluster inside PLGA NPs. This hypothesis is in accordance with our earlier studies of R18/F5-TPB loading into PMMA-MA and PLGA NPs, where dye clustering was significantly more pronounced for PLGA NPs. The present work shows that this phenomenon is also more applied to salts of cyanine dyes. Moreover, here we show for the first time that the nature of polymer controls the efficiency of FRET. Indeed, at low dye loading (50 mM), clustering of dyes in PLGA NPs favors more efficient FRET as compared to PMMA-MA NPs. On the other hand, at high dye loading (200 mM), dye-dye proximity in PMMA-MA becomes sufficiently short to ensure strong FRET. By contrast, in PLGA NPs higher dye loading leads to self-quenching of donor dyes, which decreases apparent FRET efficiency (figure 7).

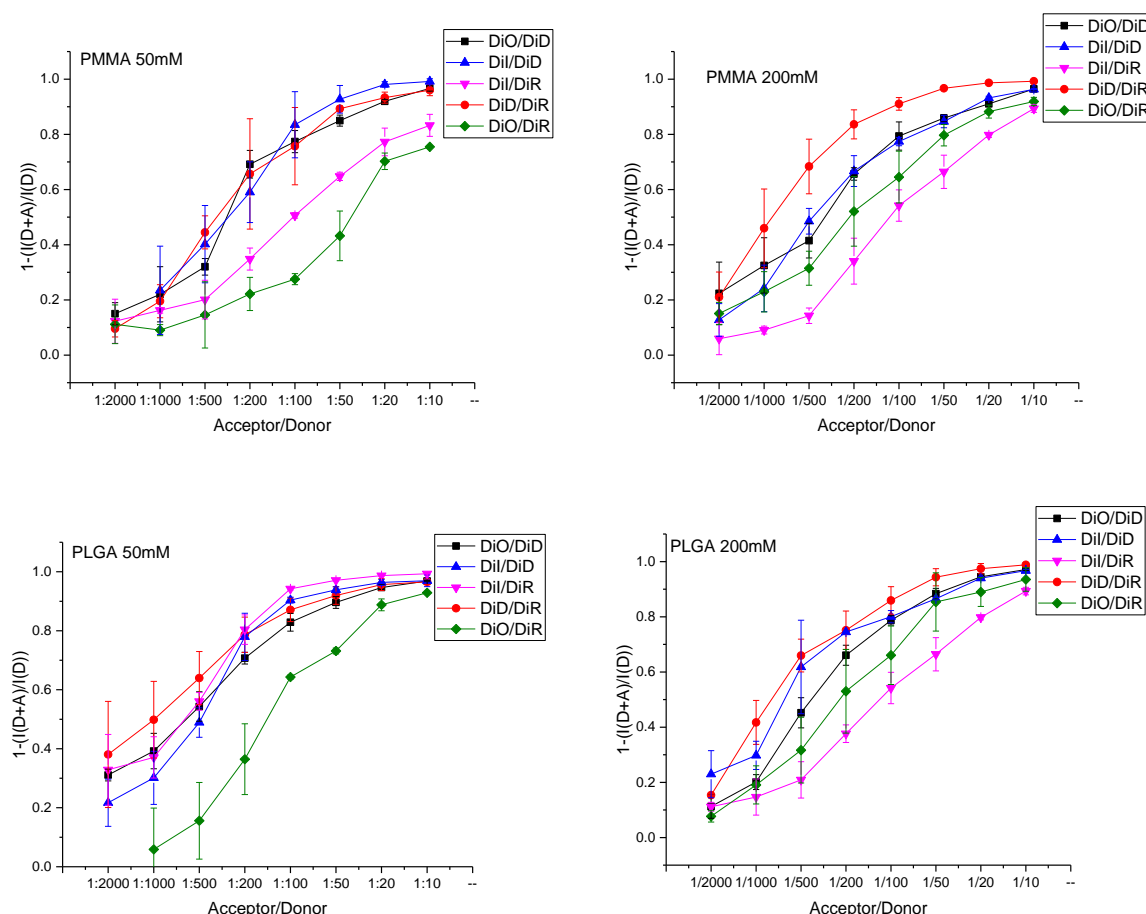


Figure 7. Semi-quantitative FRET efficiency measured for PMMA-MA and PLGA NPs at 50mM (left) and 200mM (right) loading with different cyanines F12 salts.

Other FRET pairs were also investigated, namely DiI/DiR, DiO/DiD, DiO/DiR and DiD/DiR (for DiI/DiR see Figure 5 for other see SI). It should be noted that efficient

FRET was observed in all cases (Fig. 6 and Fig. 4 in SI). Moreover, the effect of polymer nature was systematic in all these cases, higher dye clustering in PLGA NPs (at least at low dye loading) is a generic phenomenon, independent of the dyes. The other important tendency is that FRET efficiency correlated with the spectral overlap of donor with acceptor. For example, the FRET efficiency is significantly larger for DiI/DiD couple as compared to DiI/DiR (Figs 5 and 6), which corresponds to much larger spectral overlap for the former, shown in Fig. 4. The tendency was similar for other dye couple, where FRET efficiencies for DiD/DiR and DiO/DiD couples were systematically higher compared to those for DiO/DiR.

Then, using excitation spectra, we estimated the antenna effect of our FRET NPs, which provides direct information on the amplification of the acceptor emission in our light-harvesting nanoantennas(110). Several tendencies should be noted here. First, the antenna effect was systematically higher for the lower donor/acceptor ratio, independently of the dye couple and polymer used. This is expected because lower acceptor/donor ratio corresponds to higher number of energy donors pumping energy to a single acceptor. Second, as exemplified in Figure 7, DiI/DiD couple exhibits significantly larger antenna effect than that of DiI/DiR couple, which corresponds to better spectral overlap and higher FRET efficiency of the former (see above). Similar tendency was observed for other FRET couples (see SI). Third, for the low donor/acceptor ratio (1/2000), when the concentration of a donor inside PMMA NPs is higher, the antenna effect is higher, while the opposite is observed for PLGA NPs (Figure 8 and SI). This result confirms, the effect of the polymer nature of the nanoantenna performance. Increase in the dye loading has positive effect in PMMA-MA NPs because it decreases distance between donor dyes, thus favoring EET and the light-harvesting process. By contrast, in PLGA, the donor dyes are clustered already at low loading, so that further increase in the donor concentration leads only to the self-quenching of donor dyes and thus deterioration of the nanoantenna performance. Two remarkable features of the obtained nanoantennas should be mentioned. First, based on DiI as donor and DiD as acceptor, we obtained antenna effect in PMMA-MA reaching 415, which is close to what we obtained earlier for R18/F5-TPB and DiD couple for particles of similar sizes and loading. This means that cyanines can perform as good as rhodamines in our light-harvesting nano-system. Moreover, for DiI/DiR, it has been possible to reach antenna effect of 130 (Figure 8), despite relatively low overlap between emission spectrum of DiI donor and absorption

spectrum of DiR acceptor (Fig. 4), indicating the same nanoantenna can amplify emission of dyes of significantly different color.

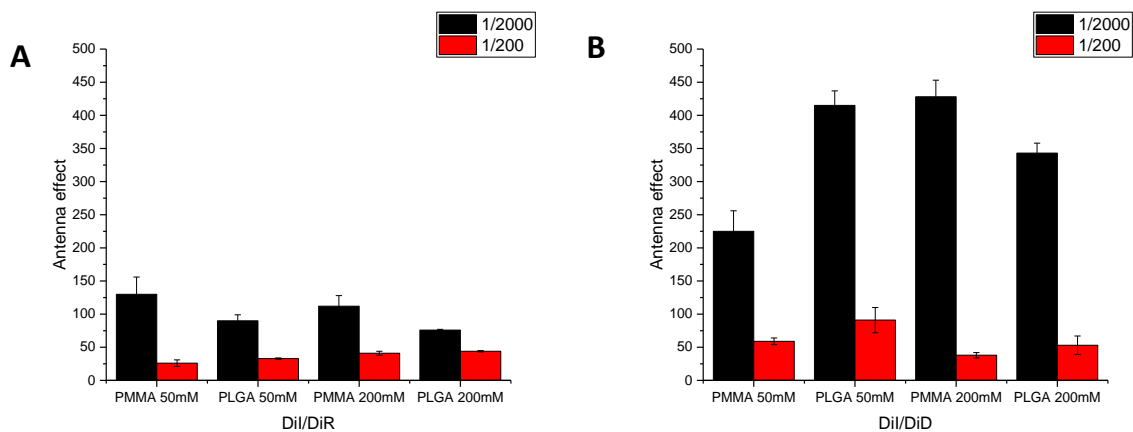


Figure 8. Amplification of acceptor emission of (a) DiR-F12 and (b) DiD-F12 encapsulated into PLGA and PMMA-MA NPs loaded with 50 or 200mM of donor (DiI-F12) at an acceptor concentration corresponding to a acceptor/donor ratio of 1/2000 and 1/200. Error bars represent standart deviation.

Conclusion

Recently, we have developed giant light-harvesting nanoantenna based on polymer nanoparticle loaded with thousands of rhodamine/bulky counterion salts undergoing fast excitation energy migration ensuring efficient FRET to a single acceptor. Here, to extend these new nanomaterials to different dyes and thus different colours, we have systematically analysed energy transfer in PMMA-MA and PLGA NPs loaded with different cyanine dyes, using photoluminescence techniques. The photophysics of these systems has revealed that the FRET efficiency is mostly influenced by donor/acceptor spectral overlap, donor concentration as well as by the polymer matrix nature. As expected, FRET efficiency and corresponding antenna effect improves for FRET couples with better spectral overlap. FRET efficiency and antenna effect also improved with the donor concentration in PMMA-MA NPs, probably because the migration of the excitation energy among donors is favoured. By contrast, the opposite is observed in PLGA, probably because the dyes are well clustered at low loading, but significantly self-quench at higher loading. For couples with high spectral overlap, we achieved antenna effect of >400, which is comparable to the performance of nanoantennas of the same size loaded with rhodamine-based donor. Moreover, for couples with weak spectral overall, we, nevertheless, obtained relatively high antenna effects >100, showing potential of the same nanoantenna to amplify emission of acceptors of different colours. Overall, we have demonstrated that the concept of light-harvesting nanoantenna can be extended to cyanines, which extend the operation range of these nanoantennas over a spectral range from green to near infrared. This opens the route to development of FRET-based probes of different colour and enables development of multiplexing assays.

Supporting Information

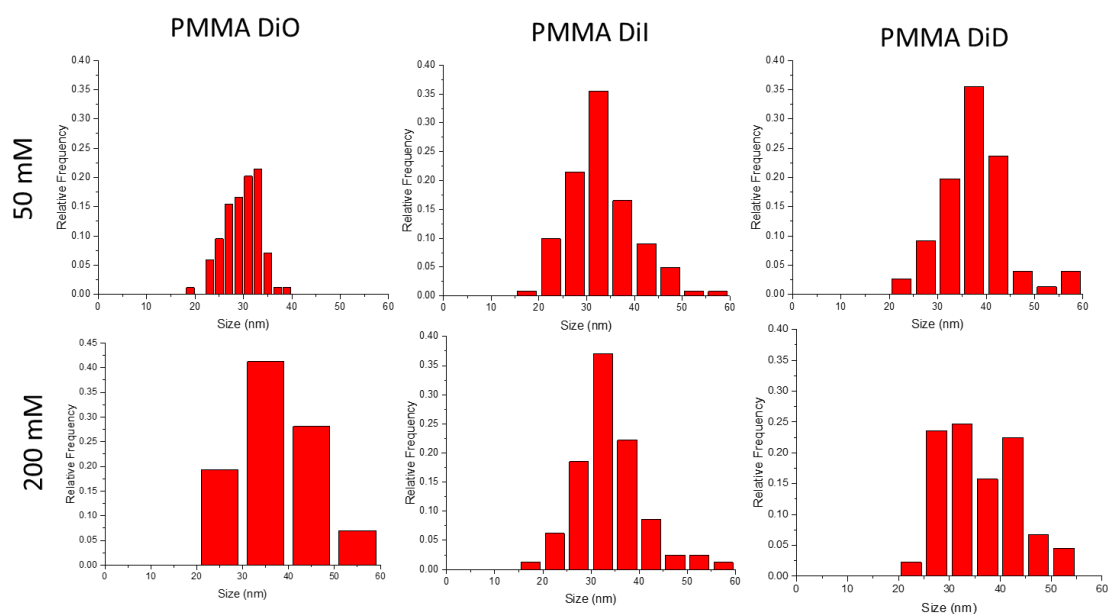


Figure S1. Histograms of sizes of PMMA-MA particles made by nanoprecipitation as a function on concentration and type of charged dye as determined by TEM. Mean values of sizes determined by transmission electron microscopy. At least 200 NPs were analyzed per condition.

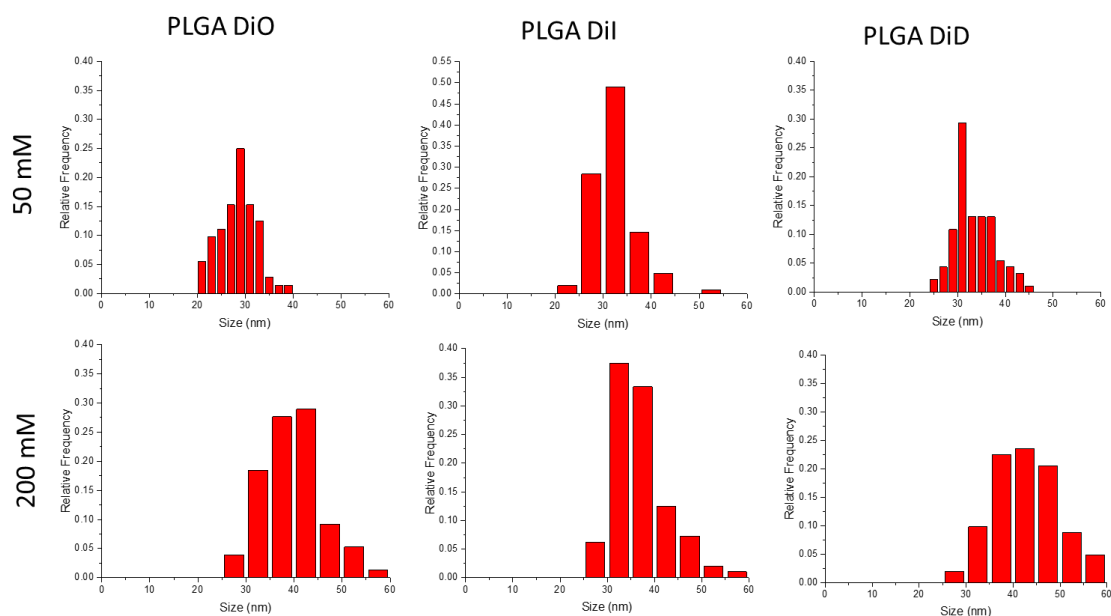


Figure S2. Histograms of sizes of PLGA particles made by nanoprecipitation as a function on concentration and type of charged dye as determined by TEM. Mean values of sizes determined by transmission electron microscopy. At least 200 NPs were analyzed per condition.

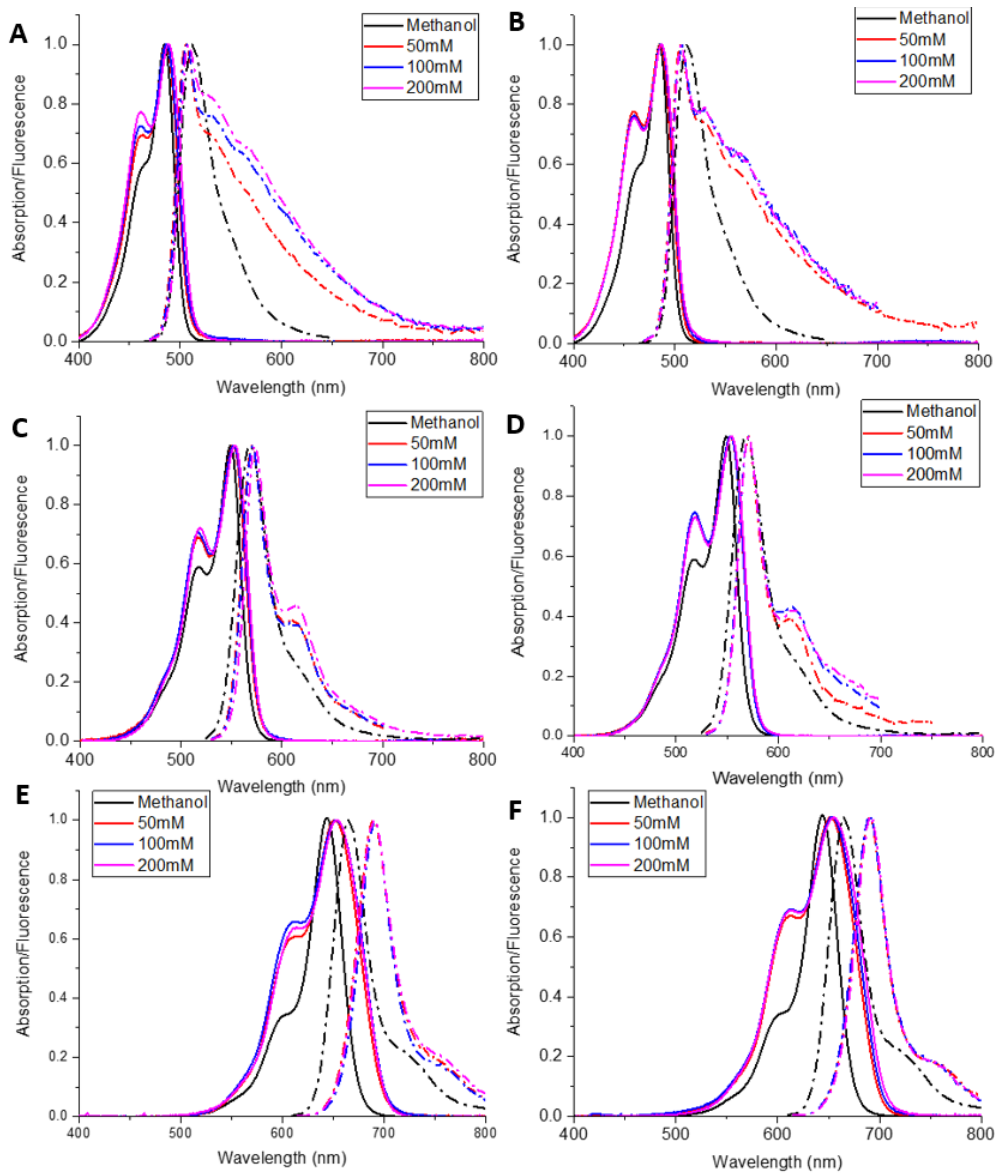


Figure S3. Effect of dye-loading on spectral properties for PLGA and PMMA-MA NPs. Normalized absorption and fluorescence spectra of (a) DiO PMMA-MA NPs, (b) DiO PLGA NPs, (c) DiI PMMA-MA NPs, (d) DiI PLGA NPs, (e) DiD PMMA-MA NPs and (f) DiD PLGA NPs.

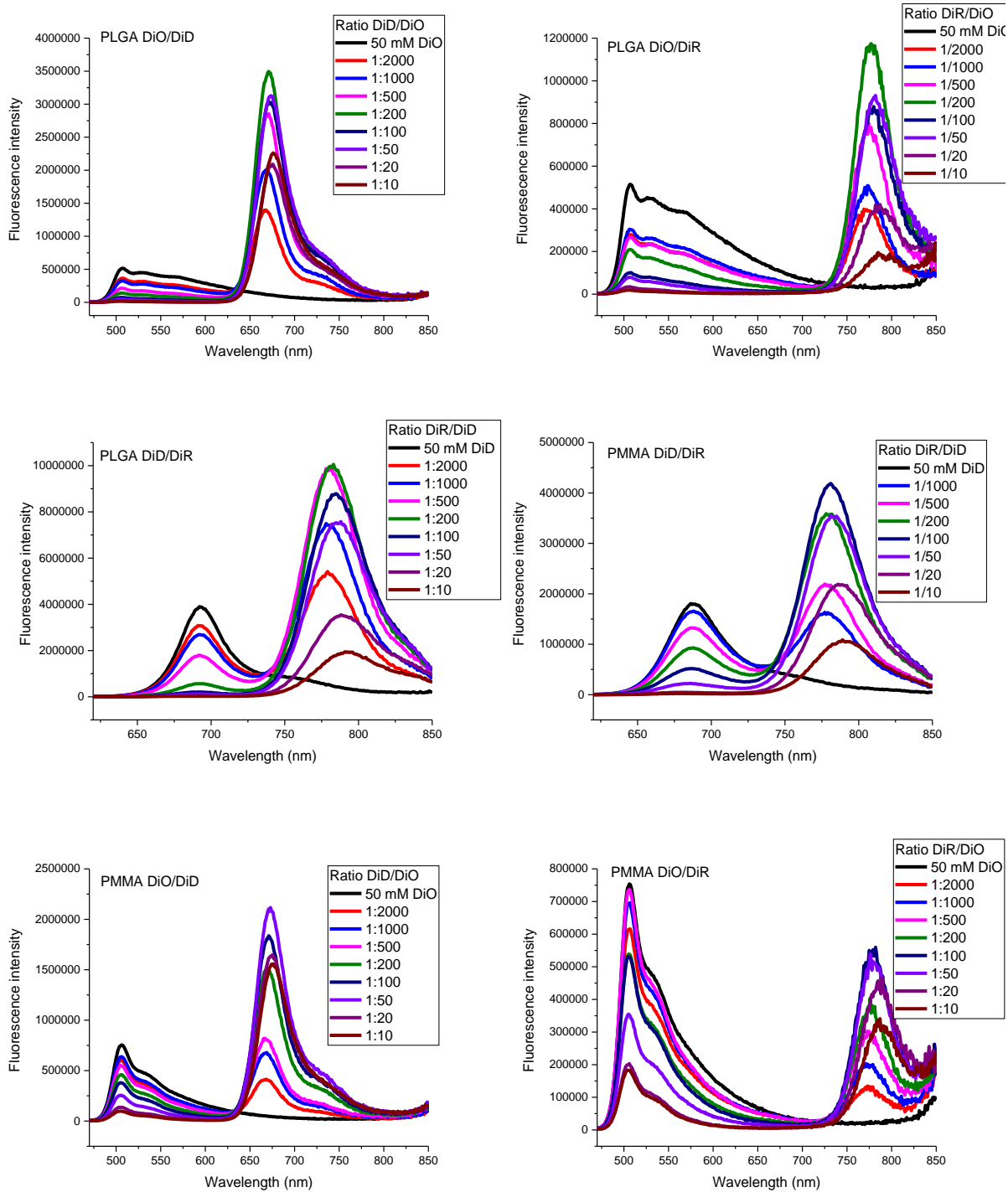


Figure S4. Fluorescence spectral measurement of FRET PLGA NPs and PMMA-MA NPs loaded with DiO/DiD, DiO/DiR and DiD/DiR with F12 counterion at 50 mM of the donor.

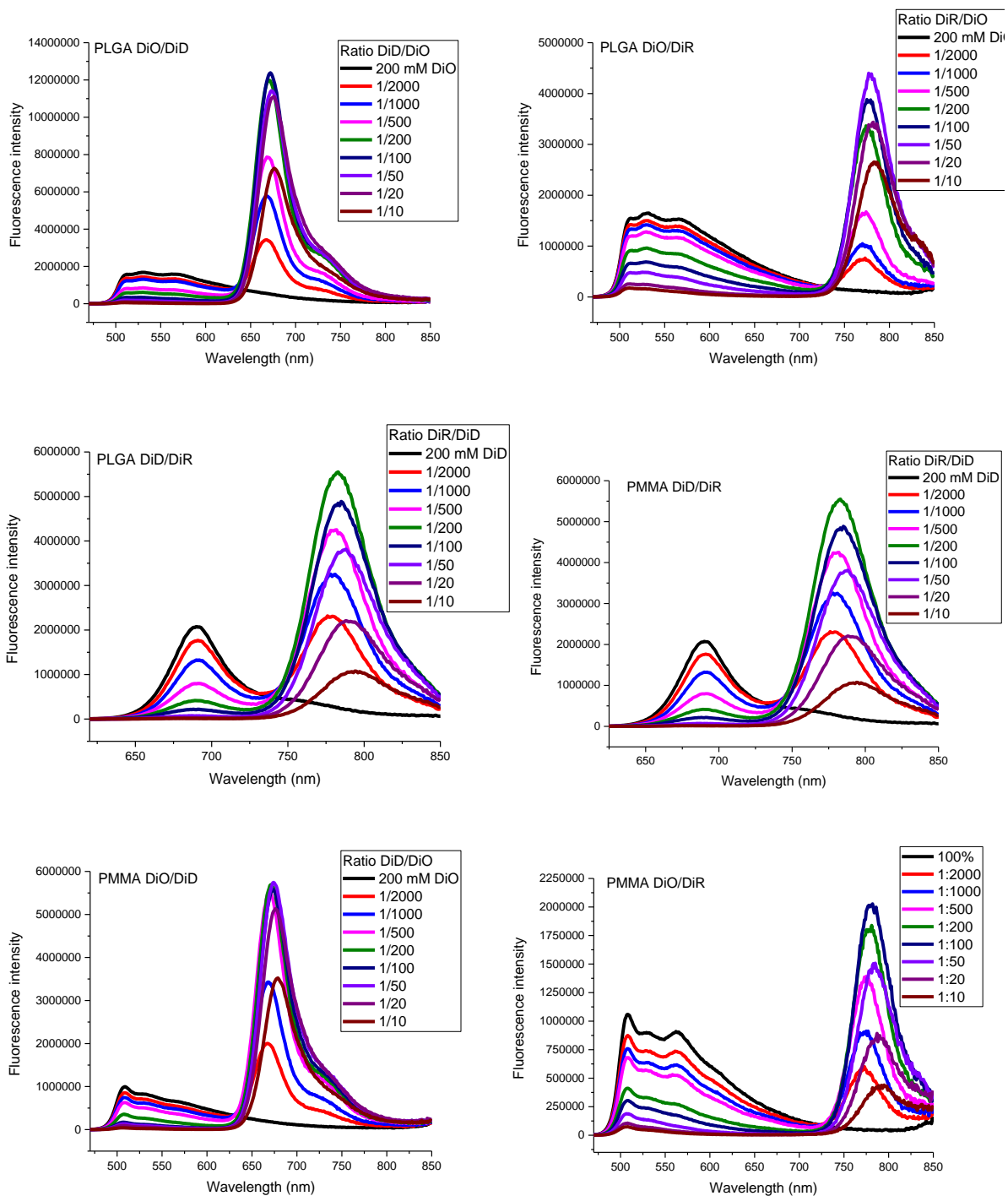


Figure S5. Fluorescence spectral measurement of FRET PLGA NPs and PMMA-MA NPs loaded with DiO/DiD, DiO/DiR and DiD/DiR with F12 counterion at 200 mM of the donor.

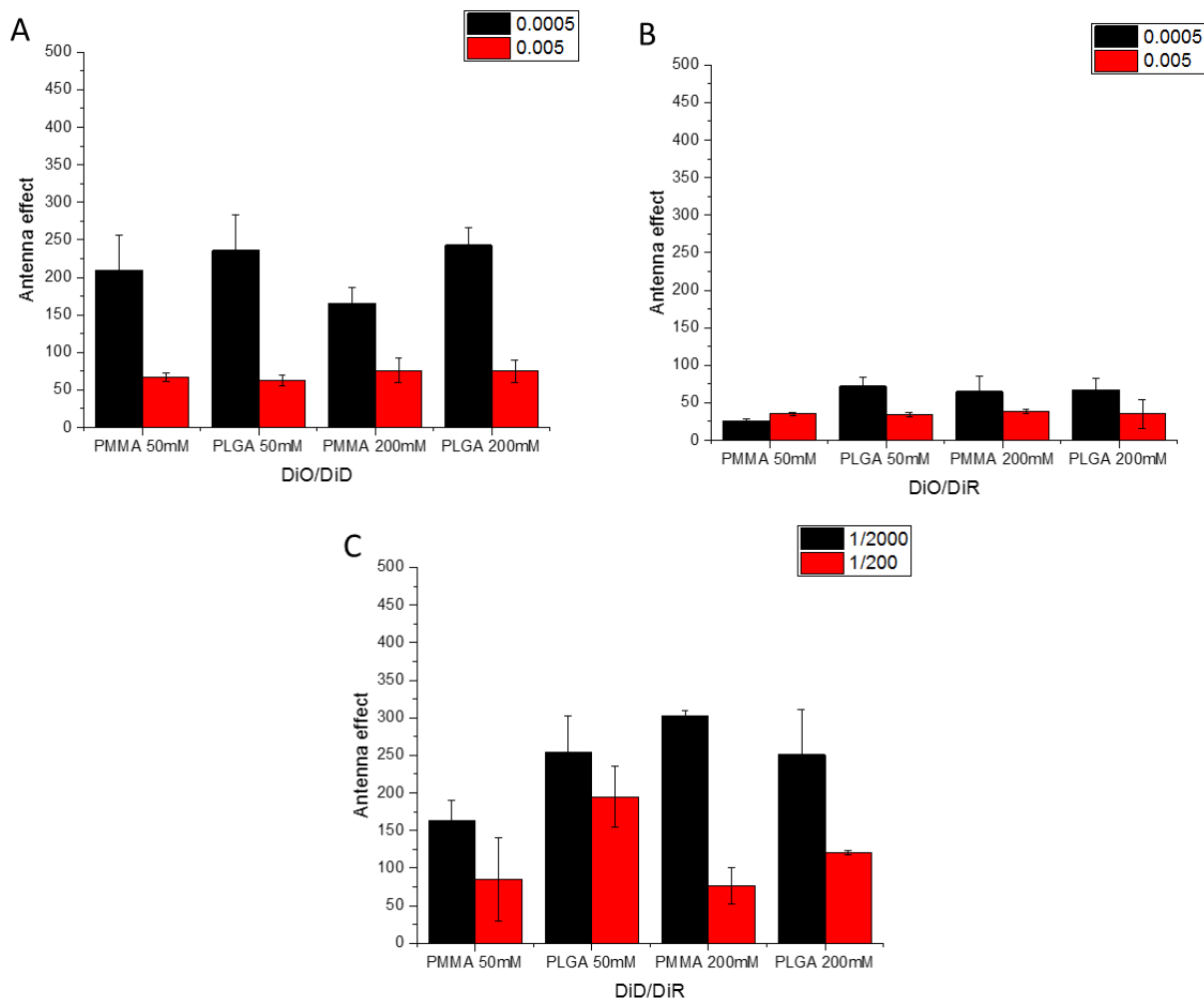


Figure S6. Amplification of acceptor emission of (a) DiD-F12 and (b) DiR-F12 encapsulated into PLGA and PMMA-MA NPs loaded with 50 or 200mM of donor (DiO-F12) at an acceptor concentration corresponding to a donor/acceptor ratio of 1/2000 and 1/200. (c) Amplification of acceptor emission of DiR-F12 encapsulated into PLGA and PMMA-MA NPs loaded with 50 or 200mM of donor (DiD-F12) at an acceptor concentration corresponding to a donor/acceptor ratio of 1/2000 and 1/200. Error bars represent standart deviation.

Part V: Conclusions et perspectives

Le but de mon travail de thèse a été, d'une part, de développer des NPs organiques biocompatibles avec une taille que l'on peut contrôler ainsi qu'une brillance élevée afin d'assurer un suivi des particules uniques pour des applications intracellulaire et d'autre part de modifier la surface des NPs avec des copolymères à blocs tels que le pluronic afin de les appliquer pour le suivi *in vivo*. Enfin, le développement de NPs de différentes couleurs pour le transfert d'énergie pour des applications en tant que biocapteur a également été un axe de recherche.

Dans la première partie de mon travail, j'ai évalué la possibilité d'utiliser des groupements chargés sur des polymères pour le contrôle de la taille de NPs assemblées par nano-précipitation. Pour cela nous avons fait varier la nature et le pourcentage des groupements latéraux chargés sur des polymères à base de poly (méthacrylate de méthyle) Cela nous a permis de créer des séries de particules de même nature et de même surface mais de taille variable entre moins de 10 à plus de 50 nm. Malgré leur petite taille, ces NPs peuvent être rendues extrêmement fluorescentes par l'encapsulation d'une forte concentration en fluorophores. Leur brillance est 3 à 25 fois supérieure à celle des « quantum dots » de la même taille. L'excellente photostabilité et la brillance des nanoparticules malgré leurs petites tailles en font des substituts biodégradables aux « quantum dots » et pourraient trouver diverses applications en imagerie biologique. En étudiant l'influence de la taille et de la surface de ces particules sur leur comportement au sein du cytosol, nous avons constaté que les NPs de plus petites tailles étaient nécessaires pour atteindre toutes les régions du cytosol, la taille critique étant inférieure à 23 nm. Cette étude ouvre la voie pour la conception de sondes ultrabrillantes pour l'imagerie et le suivi à haute vitesse de biomolécules uniques dans les cellules. La possibilité de moduler avec précision la taille des NPs pourrait être utilisée pour étudier d'autres phénomènes (à petites tailles) telle que la biodistribution et l'élimination des NPs, l'effet EPR et la pénétration dans les tumeurs mais aussi l'entrée dans cellules (directe, par endocytose ou par électroporation).

La prochaine étape importante du projet consistait à avoir un contrôle de la chimie de surface des NPs afin de préserver au maximum le temps de rétention des NPs au sein

de la circulation sanguine et limiter les interactions non spécifiques. Pour cela, nous avons opté pour une stratégie de PEGylation par adsorption directe de pluronics sur la surface des NPs afin d'augmenter leur stabilité en milieu physiologique et empêcher l'adsorption non-spécifique de protéines. Les résultats ont montré que le pluronic était efficace pour stabiliser des nanoparticules à base de PMMA dans un environnement physiologique et empêchait l'adsorption de protéines du sérum en fonction du nombre de molécules de pluronic à la surface des NPs. En outre, le temps de rétention des particules au sein d'un système vasculaire cérébral de souris a considérablement augmenté. Cette étude montre que le pluronic peut fournir une voie très utile pour créer une plate-forme polymérique robuste, biocompatible, sûre et clairement détectable *in vivo*. Ces données peuvent servir de base au développement futur de la bio-imagerie cérébrale et du système d'administration de médicaments. En effet, il s'agit d'une plateforme pour des tests rapides. De cette manière, on peut implémenter facilement de nouveaux types de NPs pour l'imagerie *in vivo*.

Dans la troisième et dernière partie de mon travail, j'ai exploité l'EET entre des fluorophores de type cyanine afin d'obtenir un FRET efficace pour un accepteur unique. Les résultats obtenus démontrent l'importance du comportement coopératif des fluorophores à l'intérieur des NPs pour assurer l'efficacité du FRET et ainsi produire un effet d'antenne efficace. Ce système avait déjà été testé par notre équipe avec la rhodamine, mais ici, en l'appliquant aux cyanines, nous avons réussi à améliorer le système car ces fluorophores possèdent un coefficient d'absorption plus élevé ainsi qu'un comportement de clignotement beaucoup moins prononcé tout en conservant le phénomène de coopérativité. De plus, la plage spectrale des fluorophores encapsulés à l'intérieur de la nanoparticule s'étend du vert au proche infrarouge. Ainsi, nous avons généré une antenne géante captant la lumière, amplifiant la fluorescence d'un seul fluorophore et ce avec n'importe quel type de couleur que l'on peut moduler en modifiant le type de fluorophore au sein de la NP. Ce travail ouvre la voie de la production de nanoantennes pour une détection ultrasensible de biomarqueurs jusqu'à la particule individuelle tels que les biocapteurs à base de FRET mais aussi obtenir des NPs avec un déplacement de Stokes très important pour l'imagerie sans autofluorescence au sein des milieux biologiques.

Plusieurs problèmes restants devront être résolus pour une application ultérieure réussie des NP polymères en bio-imagerie. Par exemple, un meilleur contrôle de

l'homogénéité de la taille des NPs afin d'obtenir des particules avec des caractéristiques identiques. De plus, obtenir des NPs modifiées par des anticorps ou des ligands spécifiques permettrait un ciblage plus spécifique des objets biologiques à la fois *in vivo* et *in vitro*. Les propriétés obtenues à ce jour et les travaux systématiques sur les problèmes relatifs promettent un avenir pour les NPs polymériques dopées en fluorophore dans des applications de bio-imagerie

Résumé

1) Introduction :

L'organisme humain est composé d'une grande variété de cellules, chacune contenant une quantité importante de biomolécules différentes. Leurs concentrations, leurs modifications et leurs interactions sont généralement contrôlées avec une précision tant spatiale que temporelle élevée. Tout changement dans ces processus complexes peut conduire à des maladies, notamment les cancers. La connaissance de ces mécanismes, ainsi que la possibilité de détecter des biomolécules même à des concentrations extrêmement faibles, permettrait une meilleure compréhension et même un diagnostic précoce de maladies comme le cancer. Etant donné sa haute sensibilité, sa détection rapide et non-invasive, la fluorescence est une technique très prometteuse pour détecter ces biomolécules même à faible concentration(150).

Au cours des vingt dernières années, diverses approches ont été établies pour améliorer la vitesse, la résolution et la sensibilité de la bio-imagerie à l'aide des nanoparticules fluorescentes dont les « dye-loaded » NPs à base de polymère. En effet, ces NPs présentent une luminosité supérieure aux sondes organiques et protéines fluorescentes. Elles sont composées d'une matrice polymérique non fluorescente et d'un fluorophore encapsulé dans la matrice pour créer des nano-objets fluorescents avec des propriétés ajustables. Le principe de base, afin d'obtenir des NPs extrêmement brillantes, est d'encapsuler un grand nombre de fluorophore dans un petit espace augmentant ainsi le coefficient d'absorption molaire des particules(2). Ces NPs sont des alternatives intéressantes aux nanoparticules inorganiques, tels que les quantum dots (QDs)(3), qui sont largement utilisés dans le domaine, en raison de l'utilisation de polymères biodégradables et biocompatibles approuvée par la FDA. Dans cette optique, les nanoparticules fluorescentes à base de polymères apparaissent comme des outils importants pour l'imagerie en temps réel des processus biologiques au niveau moléculaire et cellulaire. L'objectif de mon projet de doctorat a été d'optimiser les nanoparticules polymériques fluorescentes pour l'imagerie biologique. Ce projet s'est articulé autour de trois axes.

2) Résultats et discussions :

Contrôle de la taille des NPs. Une première question importante en vue de l'utilisation de NPs fluorescentes comme marqueurs intracellulaire est la taille idéale de celles-ci. Afin de répondre à cette question il faut dans un premier temps obtenir des nanoparticules polymériques avec des tailles que l'on puisse parfaitement contrôler. Pour surmonter ce problème, le premier axe de mon projet a été d'étudier l'influence de la nature et du nombre de groupes chargés par polymère sur la taille des NPs résultantes. Pour cela, nous avons développé des copolymères de poly (méthacrylate de méthyle) (PMMA) avec des groupements chargés de type carboxylate, sulfonate et triméthylammonium (Schéma 1), et nous avons fait varier le pourcentage de ces groupements chargés de 1 à 10% en moles.

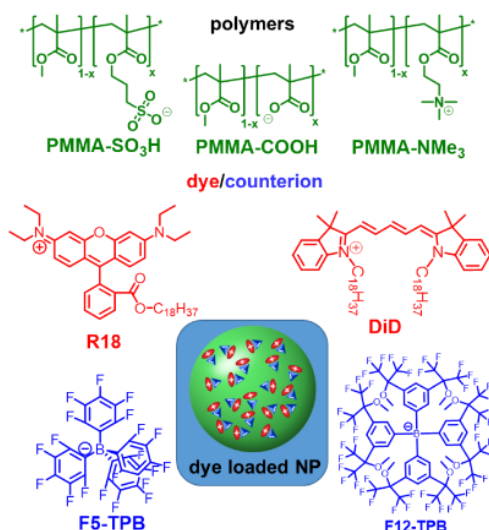


Schéma 1. Structures des polymères, des fluorophores et des contre-ions ainsi que la représentation schématique d'une nanoparticule.

A partir de ces polymères, nous avons assemblé des NPs par nano-précipitation. La taille des NPs obtenues a diminué systématiquement avec l'augmentation du pourcentage de groupes chargés (Figure 1). Pour les polymères portant des groupes sulfonate et triméthylammonium, la taille a atteint respectivement 8 et 7 nm pour un pourcentage de 5%. Les particules fabriquées à partir de polymères portant les groupes carboxylates sont systématiquement plus grandes. L'incorporation de groupes chargés, que ce soit négativement ou positivement, permet donc d'obtenir des NPs plus petites grâce à la répulsion électrostatique des chaînes de polymères et une densité de charge élevée à la surface des NPs. De plus, l'ajout de NaCl dans le

milieu de précipitation diminue ces forces répulsives et nous a permis d'augmenter la taille des particules (figure 1).

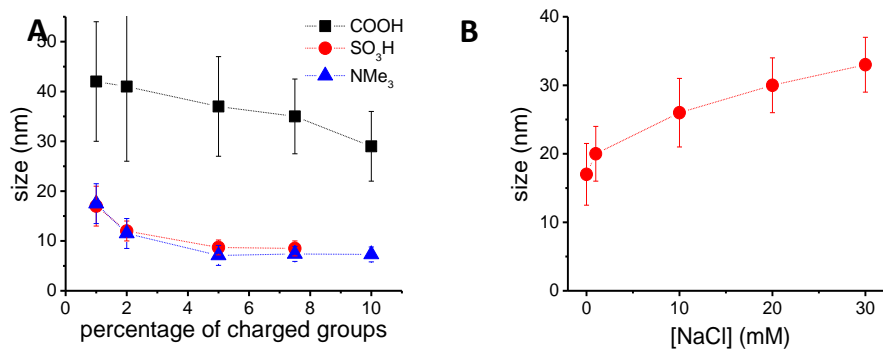


Figure 1. Tailles des nanoparticules polymériques synthétisées par nano-précipitation : A) Influence de la fraction des groupes chargés sur le polymère et B) de la concentration en NaCl.

Ces NPs ont ensuite été rendues fluorescentes par encapsulation de 10%wt de Rhodamine. Selon des mesures de microscopie de fluorescence à champ large en excitation laser à 532 nm, nos NPs ayant une taille de 17 nm sont 25 fois plus lumineuses que des quantum dots (QDs 585) (Figure 2). La stabilité des NPs après stabilisation avec Tween80 en présence de 10% en sérum bovin a été confirmée par spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS).

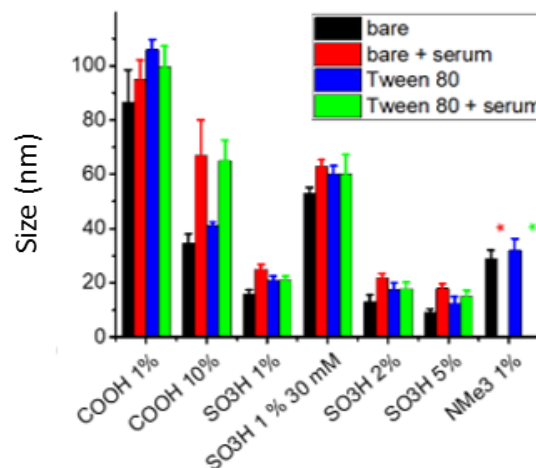


Figure 2. Tailles hydrodynamiques des NPs à base de PMMA encapsulant 1% de R18/F5, déterminées par FCS. Les NPs ont été prétraités à base de différents polymères avec ou sans 0,05 mg / mL de Tween80 et exposée ou non à 10% en volume de FBS.

Pour évaluer l'influence de la taille sur le comportement intracellulaire, ces NPs ont été injectées directement dans le cytosol des cellules HeLa pour être ensuite imagées par

imagerie en molécule unique (Figure 3). La petite taille des NPs s'est révélée bénéfique pour obtenir une répartition optimale dans toute la cellule et les résultats suggèrent qu'une taille de particule critique d'environ 23 nm était suffisante pour la diffusion libre et la propagation dans le cytosol. La publication de ce travail a été acceptée dans Adv. Funct. Mater

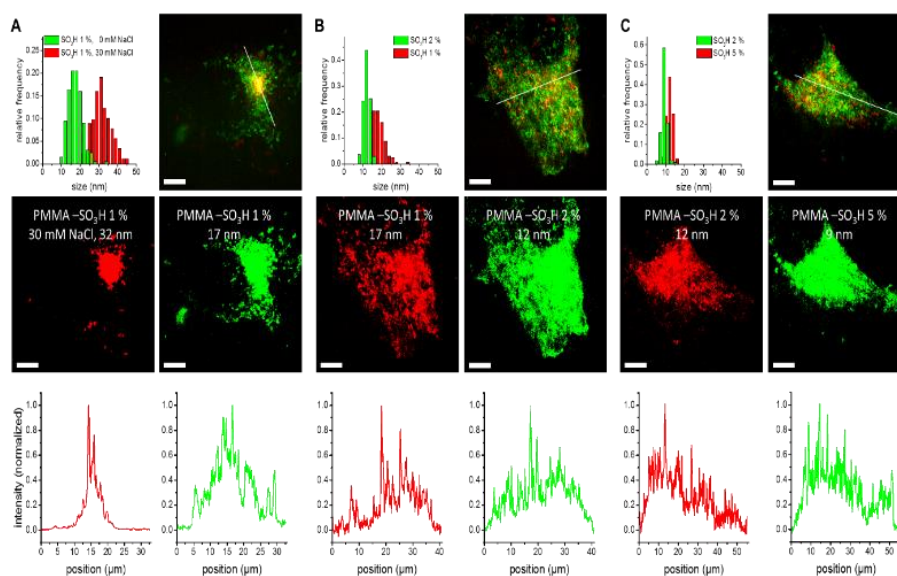


Figure 3. Imagerie bicolore de NPs de différentes tailles marquées de deux couleurs différentes et co-injecté dans le cytosol de cellules vivantes. (A) 32 nm (rouge) et 17 nm (vert) NPs. (B) NP à 17 nm (rouge) et 12 nm (vert). (C) 12 nm (rouge) et 9 nm (vert).

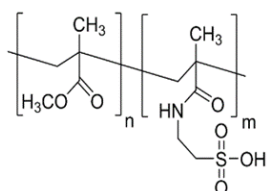
En conclusion, nous avons montré qu'il était possible, en faisant varier la structure des polymères, de réduire de manière significative la taille des nanoparticules obtenues par nano-précipitation. Le contrôle de la fraction des groupes chargés a permis d'atteindre des tailles de particules inférieures à 10 nm. Leur petite taille s'est avérée bénéfique pour obtenir une répartition optimale dans l'ensemble de la cellule ce qui devrait ouvrir la voie pour de nouvelles applications thérapeutique au niveau cellulaire et animal.

Contrôle de la chimie de surface des NPs. La maîtrise de la chimie de surface des NPs est importante pour leurs applications en biologie. En effet, les NPs injectées par voie intraveineuse sont rapidement dégradées et éliminées du flux sanguin à cause du système phagocytaire mononucléaire (MPS). Les NPs circulant dans le sang sont reconnues par des protéines, appelées opsonins(4), qui vont s'adsorber sur la

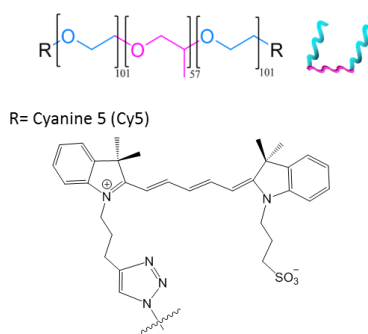
surface des NPs (phénomène d'opsonisation) rendant les NPs plus sensibles à la phagocytose par les cellules de la MPS. Ainsi, prolonger le temps de rétention dans le sang des NPs est devenu une tâche primordiale. Afin de surmonter ces contraintes, la PEGylation a été la stratégie adoptée afin de conférer des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques(5,6). En effet, au fil des années, le polyéthylène glycol (PEG) a été présenté comme un matériau biocompatible et non toxique approuvé par la « Food and Drug Administration » (FDA) pour un usage humain(151).

Ainsi, nous avons étudié la modification de NPs polymériques à base de PMMA-SO₃H contenant 5 wt% en rhodamine avec des amphiphiles PEGylés. Les nanoparticules obtenues après nano-précipitation ont été caractérisées par diffusion dynamique de la lumière et mesure 20 nm. Ces NPs sont ensuite modifiées par du pluronic adsorbé directement en surface. Les NPs sont alors recouvertes de chaînes polymériques hydrophiles neutre qui forment une couronne stérique autour de la NP. Ce pluronic a été modifié par des fluorophores (cyanine5, lissamine, rhodamine) afin d'accéder à la stabilité du pluronic à la surface des NPs mais aussi au nombre de molécule de surfactant adsorbé par NP.

Poly(methyl methacrylate-co- methacrylic acid)



Pluronic (Plu)



Or R= Lissamine

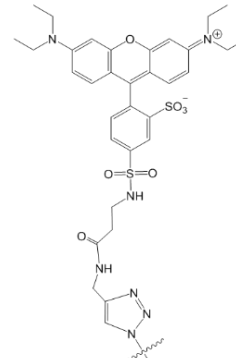


Schéma 2. Structure du polymère et modification du pluronic F127 par réaction Click par de la lissamine et de la cyanine5.

Des mesures de spectroscopies de fluorescence à 530 nm ont permis de quantifier le nombre de molécules de pluronic adsorbé par particule en fonction de la concentration en pluronic introduite en solution (figure 4.a). L'étape de dialyse est importante pour éliminer l'excès de pluronic en solution sans dégrader la couche de pluronic s'étant déposée à la surface des NPs ce qui a été confirmé par la conversation du FRET après dialyse par rapport aux mesures faites avant dialyse (figure 4.b). Il a été démontré qu'un nombre total de 85 molécules par NP ont été adsorbées. De plus, des phénomènes d'échange peuvent être observés en introduisant des surfactants en

solution néanmoins, de très faibles changements ont été observé en présence de sérum démontrant une stabilité des NPs en milieu biologique.

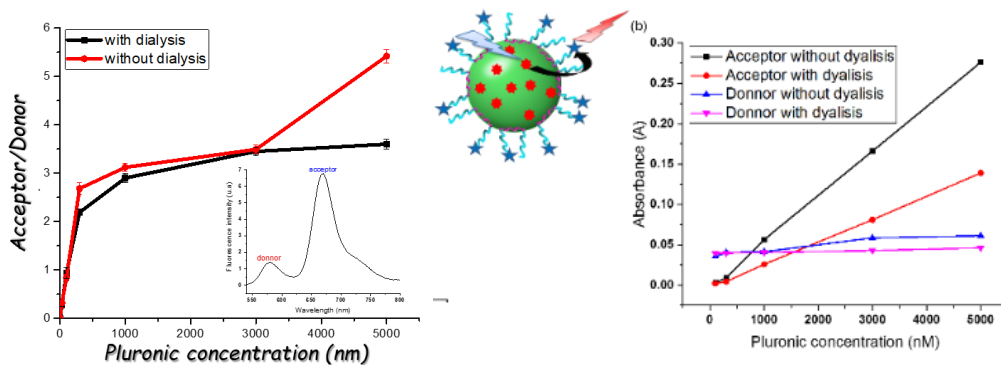


Figure 4. (a) Comparaison du FRET entre le donneur (R18/F5) à l'intérieur de la nanoparticule et l'accepteur (Cy5) adsorbé à la surface de la NP grâce au pluronic avant et après dialyse et (b) absorbance du donneur et de l'accepteur en fonction de la concentration en pluronic.

Des mesures de spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) indiquent que les NPs sont stables lorsque la surface est recouverte de pluronic dans des conditions physiologiques et en présence d'albumine de sérum bovin pour une concentration initiale de 3000 nM en pluronic. En dessous de cette valeur et sans pluronic, les NPs tendent à s'agréger (figure 5).

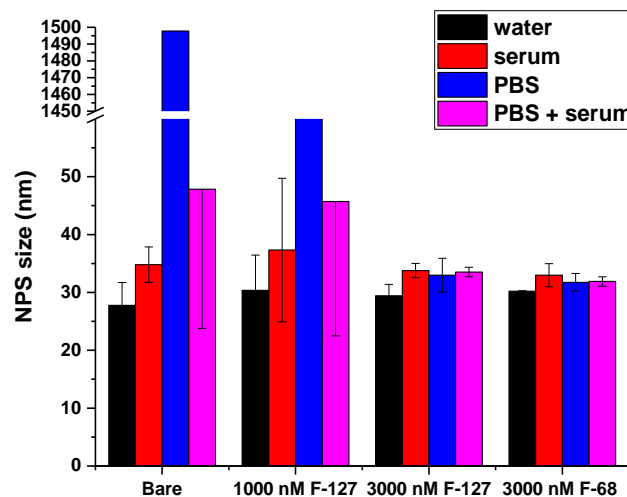


Figure 5. Stabilité des NP à base de PMMA-SO₃H encapsulant 1% de R18/F5 dans des conditions physiologiques et en présence de sérum, étudiée par FCS pour le PMMA-SO₃H, PMMA-SO₃H recouvert de pluronic F-127 à 1000 et 3000nM et PMMA- SO₃H recouvert de pluronic F-68 à 3000 nM.

Une étude *in vivo* a montrée explicitement que les NPs nues des PMMA sont clairement détectables dans le système vasculaire cérébral de la souris en utilisant un microscope à deux photons (figure 6). Il est important de noter que les NPs revêtues de pluronic présentent un temps de circulation beaucoup plus long que les NPs nues,

ce qui correspond à une adsorption beaucoup plus faible des composants protéiques du sérum dans nos mesures *in vivo*.

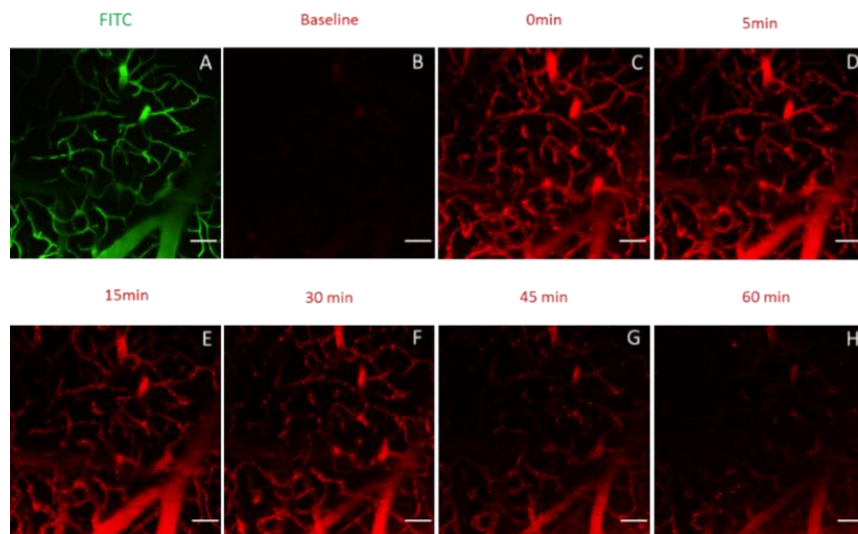


Figure 6. Etude *in vivo* de NPs à base de PMMA recouvertes de pluronic P-188 directement injectées dans l'artère fémorale d'une souris par microscopie à deux-photons adaptée à l'imagerie intravitale de petits animaux. A) Identification des vaisseaux du cerveau avec du FITC-dextrane (0.05 mL) b) à h) suivi des NPs au sein de la souris sur une période de 180 minutes.

Nous avons démontré qu'un ligand PEGylé, tel que le pluronic, était efficace pour stabiliser les nanoparticules de PMMA-SO₃H fabriquées par nano-précipitation. Les NPs sont stables aussi bien dans l'eau que dans un environnement physiologique en fonction du nombre de pluronic sur la surface de la particule. Nos résultats montrent l'adsorption de copolymères à blocs amphiphiles sur la surface des nanoparticules polymériques crée une coque stable empêchant les interactions non spécifiques et permettant un temps de circulation important au sein de l'organisme. Nous avons créé une plate-forme polymère robuste, biocompatible, sûre et sans danger, clairement détectable à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ces données peuvent servir de base au développement futur des systèmes de bio-imagerie cérébrale. Sur la base de ce travail, un manuscrit est en cours de préparation.

Contrôle de la couleur et du transfert d'énergie des NPs. L'encapsulation de sels de dérivés de rhodamine avec des contre-ions hydrophobes dans des NPs polymériques (à de hautes concentrations) conduit à un comportement collectif des fluorophores(8). Il a été démontré que ce comportement est dû à un couplage des fluorophores par transfert d'énergie d'excitation (EET) à l'intérieur des NPs(9). Ce phénomène peut notamment être utilisé pour générer des antennes collectrices

géantes en amplifiant la fluorescence d'un fluorophore unique(10). En partant de ce constat, nous avons émis l'hypothèse que ce transfert d'énergie pouvait s'appliquer à d'autres fluorophores cationiques tels que les cyanines. Pour cela, nous avons utilisé trois dérivés de cyanine, DiO, DiI et DiD, portant deux chaînes octadécyles, dans des NPs de PMMA et de PLGA afin de créer des NPs présentant des fluorophores avec un comportement extrêmement coopératif au sein de la matrice du polymère (Figure 7).

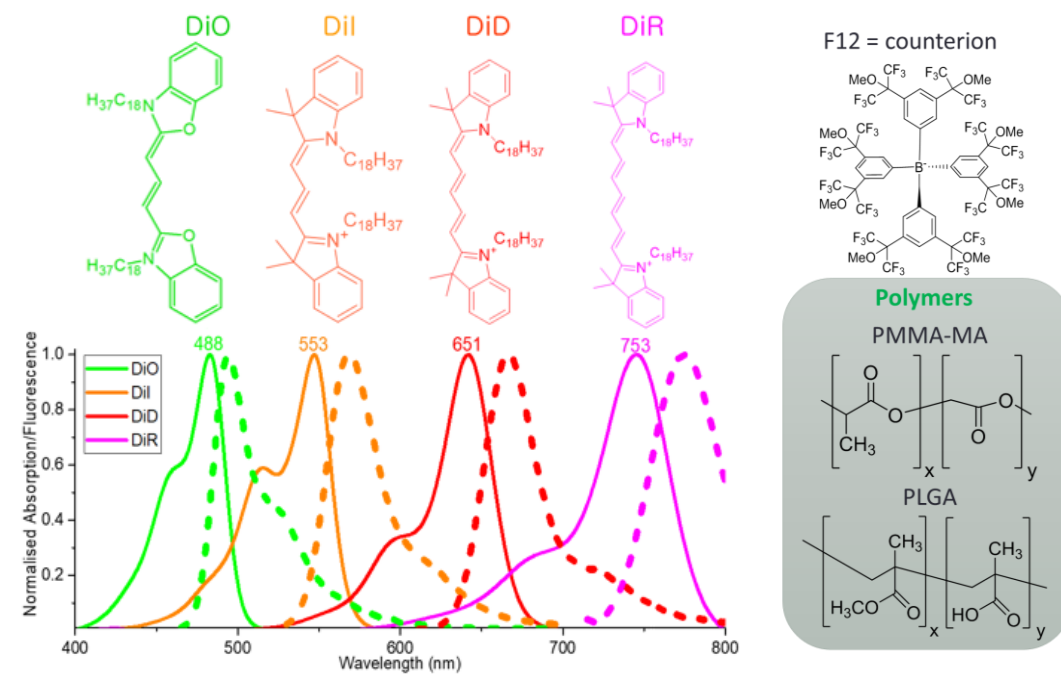


Figure 7. NPs dopées en fluorophores : structures des polymères PLGA et PMMA ; les structures des fluorophores et son contre-ion F12-TPB et la représentation schématique d'un polymère NP dopé en fluorophore.

Deux concentrations en fluorophore ont été choisies dans cette étude : 50 et 200mM. Le rendement quantique de fluorescence des NP a diminué avec l'augmentation de la concentration en fluorophore. Néanmoins, le rendement quantique reste élevé, même à une concentration de 200 mM. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une matrice de polymère PMMA montrant que l'encapsulation des colorants dans le PLGA est plus difficile que dans le PMMA.

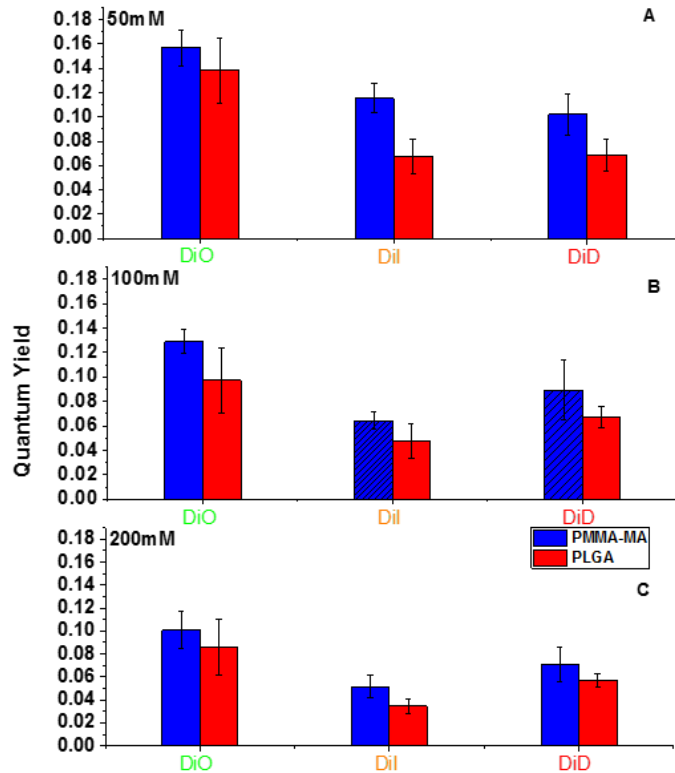


Figure 8. Rendement quantique des NPs à base de PLGA (rouge) de PMMA (bleu) pour concentrations différentes de cyanine avec F12-TBP en contre-ion (par rapport au polymère) : (a) 50mM, (b) 100mM et (c) 200mM.

La microscopie électronique à transmission (MET) a révélé une taille d'environ 32 nm pour une concentration en fluorophore de 50 mM et d'environ 40 nm pour 200 mM pour les nanoparticules à base de PLGA tandis que les NPs à base de PMMA ont une taille d'environ 35 nm. Indépendamment de la nature du fluorophore, les NPs ont la même taille et la même structure sphérique, ce qui signifie que nous avons obtenu des NP fluorescentes de trois couleurs différentes avec les mêmes dimensions et propriétés de surface.

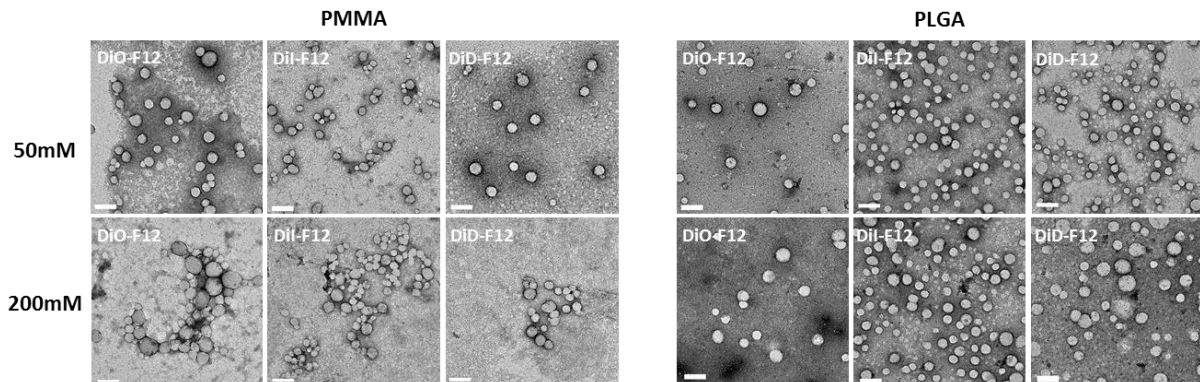


Figure 9. Images MET des NPs à base de PMMA et de PLGA en fonction de la concentration et de la nature du fluorophore. Barres d'échelle, 100 nm.

L'efficacité du FRET a été mesurée pour une concentration constante de donneur (50 mM et 200 mM) dans les NPs et une augmentation de la concentration en donneur. Nous avons cherché à obtenir un rapport accepteur/donneur optimal afin d'avoir une auto-extinction minimale et une efficacité FRET maximale. Ainsi, il a été mesuré comme étant optimal dans les NPs de PLGA pour un rapport accepteur/donneur de 1/200 et dans les NPs à base de PMMA pour 1/100. Pour une concentration constante en accepteur dans les NPs, une augmentation de la concentration du donneur a entraîné une augmentation significative de l'efficacité du FRET dans le cas du PMMA et une diminution de l'efficacité du FRET dans le cas du PLGA. Ces différences dans l'efficacité du FRET sont supposées être liées à l'organisation des fluorophores à l'intérieur de la matrice polymérique. Sur la base de ce travail, un manuscrit d'un article est en préparation.

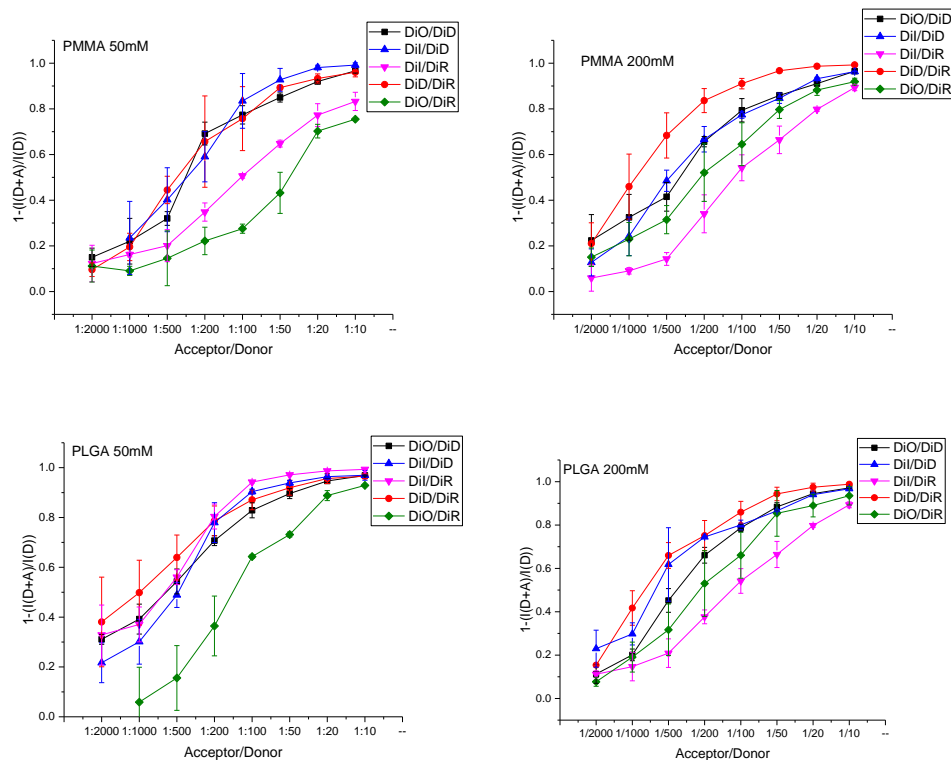


Figure 10. Efficacité semi-quantitative du FRET dans des particules de PMMA ou de PLGA à deux concentrations différentes de cyanine/F12-TPB : 50 et 200 mM et en fonction du ratio accepteur/donneur.

Dans ce travail, nous avons prouvé que le concept de contre-ion développé par notre laboratoire peut être étendu aux cyanines pour la préparation de NP brillantes opérant sur une plage spectrale allant du vert au proche infrarouge. Ces NPs présentent un FRET efficace de plus de 500 donneurs communiquant avec une ou deux molécules acceptrices ce qui ouvre la voie vers des nano-antennes amplificatrice

de lumière de différentes couleurs. Aussi, ce résultat démontre que des NPs de n'importe quelle couleur désirée peuvent être développées et appliquées pour la production de biocapteurs à base de FRET, comme cela a été récemment montré pour les nano-capteurs d'ADN(152). Sur la base de ce travail, un manuscrit d'un article est en préparation.

3) Conclusion :

Lors de ma thèse j'ai pu améliorer les nanoparticules fluorescentes à base de polymères en vue de leur application en bio-imagerie. Premièrement, nous avons pu, en variant la chimie des polymères, obtenir un très bon contrôle de leur taille. Ceci a permis de mettre en évidence l'importance de la taille des NPs pour des applications intracellulaires avec une taille maximale de 23 nm pour une distribution dans tout le cytosol. Deuxièmement, nous avons pu montrer que la simple adsorption d'un amphiphile PEGylé de type Pluronic permet la stabilisation des nanoparticules dans des milieux biologiques. Le nombre de molécules adsorbés et leur stabilité a été étudié en combinant des techniques de FRET et de FCS. Les meilleures formulations résultent en une stabilité des nanoparticules *in vivo*, ce qui a permis leur imagerie en tant que particules individuelles dans les vaisseaux sanguins du cerveau de souris. Troisièmement, le transfert d'énergie entre différents fluorophores encapsulés dans les NPs a été étudié et optimisé. Les nanoparticules résultantes ont un grand potentiel pour améliorer des nano-antennes dans des applications de senseurs pour biomolécules individuelles, mais également comme marqueurs avec un déplacement de Stokes élevé.

L'ensemble de ces résultats devrait aider à significativement avancer les possibilités des nanoparticules fluorescentes polymériques pour des applications en bio-analyse et bio-imagerie.

Liste des présentations

1. Doriane Heimbürger, Andreas Reisch and Andrey S. Klymchenko. Surface modification of fluorescent polymeric nanoparticles by pluronic: tuning specific interactions with cells, Bionanomed 2016 (poster presentation). *Krems, Autriche, 6-8 Avril 2016.*
2. Doriane Heimbürger, Andreas Reisch, Mayeul Collot and Andrey S. Klymchenko. Nanomedicine in Strasbourg, CLINAM 2017, (poster presentation). *Basel, Suisse, 7-10 Mai 2017.*
3. Doriane Heimbürger, Andreas Reisch and Andrey S. Klymchenko, Surface modification of fluorescent polymeric nanoparticles by pluronic: tuning specific interactions with cells. Journée Campus Illkirch, 2017 (poster presentation). *Illkirch, France, 27-28 Mars 2017.*
4. Doriane Heimbürger, Andreas Reisch, Bohdan Andreiuk, Kateryna Trofymchuk and Andrey S. Klymchenko. Cyanine-loaded polymer nanoparticles as tools for multi-color fluorescence imaging, MAF 2017 (poster presentation). *Bruges, Belgique, 10-13 Septembre 2017.*
5. Doriane Heimbürger, Andreas Reisch, Pauline Ernst, Anne Runser, Pascal Didier, Denis Dujardin, and Andrey S. Klymchenko. Is there an ideal size for nanoparticles for intracellular applications? Journée Campus Illkirch 2018 (oral presentation). *Illkirch, France, 15-16 Mai 2018.*

Liste des publications

Andreas Reisch, Doriane Heimbürger, Pauline Ernst, Anne Runser, Pascal Didier, Denis Dujardin, and Andrey S. Klymchenko. Protein-sized dye-loaded polymer nanoparticles for intracellular single-particle imaging. **Adv. Funct. Mater. (Accepted)**. <https://doi.org/10.1002/adfm.201805157>.

Références

1. Frontmatter. In: Introduction to Biophotonics [Internet]. Wiley-Blackwell; 2004 [cité 27 sept 2018]. p. i-xvii. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471465380.fmatter>
2. Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods*. déc 2005;2(12):932-40.
3. Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy [Internet]. 3^e éd. Springer US; 2006 [cité 25 sept 2018]. Disponible sur: [//www.springer.com/la/book/9780387312781](http://www.springer.com/la/book/9780387312781)
4. Valeur B, Berberan-Santos MN. Molecular Fluorescence: Principles and Applications [Internet]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2012 [cité 25 sept 2018]. Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527650002>
5. Devauges V, Matthews DR, Aluko J, Nedbal J, Levitt JA, Poland SP, et al. Steady-State Acceptor Fluorescence Anisotropy Imaging under Evanescent Excitation for Visualisation of FRET at the Plasma Membrane. *PLOS ONE*. 31 oct 2014;9(10):e110695.
6. Kucherak OA, Oncul S, Darwich Z, Yushchenko DA, Arntz Y, Didier P, et al. Switchable Nile Red-Based Probe for Cholesterol and Lipid Order at the Outer Leaflet of Biomembranes. *J Am Chem Soc*. 7 avr 2010;132(13):4907-16.
7. Lavis LD, Raines RT. Bright Ideas for Chemical Biology. *ACS Chem Biol*. 1 mars 2008;3(3):142-55.
8. Front Matter. In: Handbook of Fluorescent Dyes and Probes [Internet]. Wiley-Blackwell; 2015 [cité 27 sept 2018]. p. i-xviii. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119007104.fmatter>
9. Gonçalves MST. Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes. *Chem Rev*. janv 2009;109(1):190-212.
10. Beija M, Afonso CAM, Martinho JMG. Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chem Soc Rev*. août 2009;38(8):2410-33.
11. Ziessel R, Ulrich G, Harriman A. The chemistry of Bodipy: A new El Dorado for fluorescence tools. *New J Chem*. 4 avr 2007;31(4):496-501.
12. Lin Y, Weissleder R, Tung C-H. Novel Near-Infrared Cyanine Fluorochromes: Synthesis, Properties, and Bioconjugation. *Bioconjugate Chem*. 1 mai 2002;13(3):605-10.

13. Klymchenko AS, Pivovarenko VG, Demchenko AP. Elimination of the Hydrogen Bonding Effect on the Solvatochromism of 3-Hydroxyflavones. *J Phys Chem A*. 1 mai 2003;107(21):4211-6.
14. Rizzo MA, Springer GH, Granada B, Piston DW. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol*. avr 2004;22(4):445-9.
15. Klymchenko AS. Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications. *Acc Chem Res*. 21 févr 2017;50(2):366-75.
16. Martínez-Máñez R, Sancenón F. Fluorogenic and Chromogenic Chemosensors and Reagents for Anions. *Chem Rev*. 1 nov 2003;103(11):4419-76.
17. Demchenko AP. Introduction to Fluorescence Sensing [Internet]. 2^e éd. Springer International Publishing; 2015 [cité 25 sept 2018]. Disponible sur: [//www.springer.com/us/book/9783319207797](http://www.springer.com/us/book/9783319207797)
18. Kobayashi H, Ogawa M, Alford R, Choyke PL, Urano Y. New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. *Chem Rev*. 12 mai 2010;110(5):2620-40.
19. Irvine DJ, Purbhoo MA, Krosgaard M, Davis MM. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature*. 24 oct 2002;419(6909):845-9.
20. Pansare VJ, Hejazi S, Faenza WJ, Prud'homme RK. Review of Long-Wavelength Optical and NIR Imaging Materials: Contrast Agents, Fluorophores, and Multifunctional Nano Carriers. *Chem Mater*. 13 mars 2012;24(5):812-27.
21. Geiger MW, Turro NJ. Pyrene fluorescence lifetime as a probe for oxygen penetration of micelles. *Photochem Photobiol*. déc 1975;22(6):273-6.
22. Aitken CE, Marshall RA, Puglisi JD. An oxygen scavenging system for improvement of dye stability in single-molecule fluorescence experiments. *Biophys J*. 1 mars 2008;94(5):1826-35.
23. Altman RB, Zheng Q, Zhou Z, Terry DS, Warren JD, Blanchard SC. Enhanced photostability of cyanine fluorophores across the visible spectrum. *Nat Methods*. 27 avr 2012;9(5):428-9.
24. JETP Letters: issues online [Internet]. [cité 27 sept 2018]. Disponible sur: http://www.jetpletters.ac.ru/ps/1517/article_23187.shtml
25. Alivisatos AP. Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. *Science*. 16 févr 1996;271(5251):933-7.
26. Poznyak SK, Talapin DV, Shevchenko EV, Weller H. Quantum Dot Chemiluminescence. *Nano Lett*. 1 avr 2004;4(4):693-8.

27. Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, et al. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science*. 28 janv 2005;307(5709):538-44.
28. Hardman R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ Health Perspect*. févr 2006;114(2):165-72.
29. Liu H, Ye T, Mao C. Fluorescent carbon nanoparticles derived from candle soot. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2007;46(34):6473-5.
30. Zhai X, Zhang P, Liu C, Bai T, Li W, Dai L, et al. Highly luminescent carbon nanodots by microwave-assisted pyrolysis. *Chem Commun*. 16 juill 2012;48(64):7955-7.
31. Dong Y, Wang R, Li H, Shao J, Chi Y, Lin X, et al. Polyamine-functionalized carbon quantum dots for chemical sensing. *Carbon*. 1 juill 2012;50(8):2810-5.
32. Sun Y-P, Zhou B, Lin Y, Wang W, Fernando KAS, Pathak P, et al. Quantum-Sized Carbon Dots for Bright and Colorful Photoluminescence. *J Am Chem Soc*. 1 juin 2006;128(24):7756-7.
33. Lim SY, Shen W, Gao Z. Carbon quantum dots and their applications. *Chem Soc Rev*. 8 déc 2014;44(1):362-81.
34. Chen G, Qiu H, Prasad PN, Chen X. Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics. *Chem Rev*. 28 mai 2014;114(10):5161-214.
35. Zhou B, Shi B, Jin D, Liu X. Controlling upconversion nanocrystals for emerging applications. *Nature Nanotechnology*. nov 2015;10(11):924-36.
36. Daniel M-C, Astruc D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem Rev*. 1 janv 2004;104(1):293-346.
37. Ahmad R, Griffete N, Lamouri A, Felidj N, Chehimi MM, Mangeney C. Nanocomposites of Gold Nanoparticles@Molecularly Imprinted Polymers: Chemistry, Processing, and Applications in Sensors. *Chem Mater*. 25 août 2015;27(16):5464-78.
38. Nikoobakht B, El-Sayed MA. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chem Mater*. 1 mai 2003;15(10):1957-62.
39. Rio-Echevarria IM, Tavano R, Causin V, Papini E, Mancin F, Moretto A. Water-Soluble Peptide-Coated Nanoparticles: Control of the Helix Structure and Enhanced Differential Binding to Immune Cells. *J Am Chem Soc*. 12 janv 2011;133(1):8-11.

40. Pérez-Juste J, Pastoriza-Santos I, Liz-Marzán LM, Mulvaney P. Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications. *Coordination Chemistry Reviews*. 1 sept 2005;249(17):1870-901.
41. Liu M, Guyot-Sionnest P. Mechanism of Silver(I)-Assisted Growth of Gold Nanorods and Bipyramids. *J Phys Chem B*. 1 déc 2005;109(47):22192-200.
42. Dickerson EB, Dreaden EC, Huang X, El-Sayed IH, Chu H, Pushpanketh S, et al. Gold nanorod assisted near-infrared plasmonic photothermal therapy (PPTT) of squamous cell carcinoma in mice. *Cancer Lett*. 28 sept 2008;269(1):57-66.
43. Bonacchi S, Genovese D, Juris R, Montalti M, Prodi L, Rampazzo E, et al. Luminescent Silica Nanoparticles: Extending the Frontiers of Brightness. *Angewandte Chemie International Edition*. 26 avr 2011;50(18):4056-66.
44. Montalti M, Prodi L, Rampazzo E, Zaccheroni N. Dye-doped silica nanoparticles as luminescent organized systems for nanomedicine. *Chem Soc Rev*. 27 mai 2014;43(12):4243-68.
45. Yamauchi H, Ishikawa T, Kondo S. Surface characterization of ultramicro spherical particles of silica prepared by w/o microemulsion method. *Colloids and Surfaces*. 1 janv 1989;37:71-80.
46. Burns A, Sengupta P, Zedayko T, Baird B, Wiesner U. Core/Shell fluorescent silica nanoparticles for chemical sensing: towards single-particle laboratories. *Small*. juin 2006;2(6):723-6.
47. Teow HM, Zhou Z, Najlah M, Yusof SR, Abbott NJ, D'Emanuele A. Delivery of paclitaxel across cellular barriers using a dendrimer-based nanocarrier. *Int J Pharm*. 30 janv 2013;441(1-2):701-11.
48. Abbasi E, Aval SF, Akbarzadeh A, Milani M, Nasrabadi HT, Joo SW, et al. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Research Letters*. 21 mai 2014;9(1):247.
49. Singh U, maqbool dar mohammad, Hashmi AA. Dendrimers: Synthetic Strategies, Properties and Applications. *oriental journal of chemistry*. 4 août 2014;30:911-22.
50. Jevprasesphant R, Penny J, Jalal R, Attwood D, McKeown NB, D'Emanuele A. The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int J Pharm*. 18 févr 2003;252(1-2):263-6.
51. van Zuylen L, Karlsson MO, Verweij J, Brouwer E, de Bruijn P, Nooter K, et al. Pharmacokinetic modeling of paclitaxel encapsulation in Cremophor EL micelles. *Cancer Chemother Pharmacol*. avr 2001;47(4):309-18.
52. Jian W-H, Yu T-W, Chen C-J, Huang W-C, Chiu H-C, Chiang W-H. Indocyanine Green-Encapsulated Hybrid Polymeric Nanomicelles for Photothermal Cancer Therapy. *Langmuir*. 9 juin 2015;31(22):6202-10.

53. Movassaghian S, Merkel OM, Torchilin VP. Applications of polymer micelles for imaging and drug delivery. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* oct 2015;7(5):691-707.
54. Zheng X, Xing D, Zhou F, Wu B, Chen WR. Indocyanine Green-Containing Nanostructure as Near Infrared Dual-Functional Targeting Probes for Optical Imaging and Photothermal Therapy. *Mol Pharmaceutics.* 4 avr 2011;8(2):447-56.
55. Yoo J-W, Irvine DJ, Discher DE, Mitragotri S. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. *Nat Rev Drug Discov.* 1 juill 2011;10(7):521-35.
56. Lee D-E, Koo H, Sun I-C, Ryu JH, Kim K, Kwon IC. Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. *Chem Soc Rev.* 7 avr 2012;41(7):2656-72.
57. Bouchaala R, Mercier L, Andreiuk B, Mély Y, Vandamme T, Anton N, et al. Integrity of lipid nanocarriers in bloodstream and tumor quantified by near-infrared ratiometric FRET imaging in living mice. *J Control Release.* 28 2016;236:57-67.
58. Tuncel D, Demir HV. Conjugated polymer nanoparticles. *Nanoscale.* avr 2010;2(4):484-94.
59. Wu C, Chiu DT. Highly fluorescent semiconducting polymer dots for biology and medicine. *Angew Chem Int Ed Engl.* 11 mars 2013;52(11):3086-109.
60. Méallet-Renault R, Hérault A, Vachon J-J, Pansu RB, Amigoni-Gerbier S, Larpent C. Fluorescent nanoparticles as selective Cu(II) sensors. *Photochem Photobiol Sci.* 6 mars 2006;5(3):300-10.
61. Reisch A, Didier P, Richert L, Oncul S, Arntz Y, Mély Y, et al. Collective fluorescence switching of counterion-assembled dyes in polymer nanoparticles. *Nature Communications.* 9 juin 2014;5:4089.
62. Ma C, Zhang X, Yang L, Wu Y, Liu H, Zhang X, et al. Preparation of fluorescent organic nanoparticles from polyethylenimine and sucrose for cell imaging. *Materials Science and Engineering: C.* 1 nov 2016;68:37-42.
63. Wu C, Bull B, Szymanski C, Christensen K, McNeill J. Multicolor conjugated polymer dots for biological fluorescence imaging. *ACS Nano.* 25 nov 2008;2(11):2415-23.
64. Fery-Forgues S. Fluorescent organic nanocrystals and non-doped nanoparticles for biological applications. *Nanoscale.* 23 août 2013;5(18):8428-42.
65. Dang D, Wang X, Wang D, Yang Z, Hao D, Xu Y, et al. Fluorescent Organic Nanoparticles Constructed by a Facile "Self-Isolation Enhanced Emission" Strategy for Cell Imaging. *ACS Applied Nano Materials [Internet].* 27 avr 2018

[cité 10 oct 2018]; Disponible sur:
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsanm.8b00409>

66. Khemakhem K, Soulié M, Brousses R, Ammar H, Abid S, Fery-Forgues S. Small Iminocoumarin Derivatives as Red Emitters: From Biological Imaging to Highly Photoluminescent Non-doped Micro- and Nanofibres. *Chemistry – A European Journal*. 18 mai 2015;21(21):7927-37.
67. Faucon A, Benhelli-Mokrani H, Córdova LA, Brulin B, Heymann D, Hulin P, et al. Are Fluorescent Organic Nanoparticles Relevant Tools for Tracking Cancer Cells or Macrophages? *Advanced Healthcare Materials*. 1 déc 2015;4(17):2727-34.
68. Boucard J, Linot C, Blondy T, Nedellec S, Hulin P, Blanquart C, et al. Small Molecule-Based Fluorescent Organic Nanoassemblies with Strong Hydrogen Bonding Networks for Fine Tuning and Monitoring Drug Delivery in Cancer Cells. *Small*. 1 sept 2018;14(38):1802307.
69. Ishow E, Brosseau A, Clavier G, Nakatani K, Tauc P, Fiorini-Debuisschert C, et al. Multicolor Emission of Small Molecule-Based Amorphous Thin Films and Nanoparticles with a Single Excitation Wavelength. *Chemistry of Materials*. 11 nov 2008;20(21):6597-9.
70. Parthasarathy V, Fery-Forgues S, Campioli E, Recher G, Terenziani F, Blanchard-Desce M. Dipolar versus octupolar triphenylamine-based fluorescent organic nanoparticles as brilliant one- and two-photon emitters for (bio)imaging. *Small*. 18 nov 2011;7(22):3219-29.
71. Li K, Liu B. Polymer-encapsulated organic nanoparticles for fluorescence and photoacoustic imaging. *Chem Soc Rev*. 2014;43(18):6570-97.
72. Zhang X, Zhang X, Tao L, Chi Z, Xu J, Wei Y. Aggregation induced emission-based fluorescent nanoparticles: fabrication methodologies and biomedical applications. *J Mater Chem B*. 25 juin 2014;2(28):4398-414.
73. Hong Y, Lam JWY, Tang BZ. Aggregation-induced emission. *Chem Soc Rev*. nov 2011;40(11):5361-88.
74. An B-K, Kwon S-K, Jung S-D, Park SY. Enhanced Emission and Its Switching in Fluorescent Organic Nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 1 déc 2002;124(48):14410-5.
75. Shulov I, Oncul S, Reisch A, Arntz Y, Collot M, Mely Y, et al. Fluorinated counterion-enhanced emission of rhodamine aggregates: ultrabright nanoparticles for bioimaging and light-harvesting. *Nanoscale*. 21 nov 2015;7(43):18198-210.
76. Shulov I, Arntz Y, Mély Y, Pivovarenko VG, Klymchenko AS. Non-coordinating anions assemble cyanine amphiphiles into ultra-small fluorescent nanoparticles. *Chem Commun*. 16 juin 2016;52(51):7962-5.

77. Reisch A, Klymchenko AS. Fluorescent Polymer Nanoparticles Based on Dyes: Seeking Brighter Tools for Bioimaging. *Small*. 1 avr 2016;12(15):1968-92.
78. Rao JP, Geckeler KE. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science (Oxford)*. 2011;36(7):887-913.
79. Tian Z, Shaller AD, Li ADQ. Twisted perylene dyes enable highly fluorescent and photostable nanoparticles. *Chem Commun*. 14 janv 2009;0(2):180-2.
80. Chen J, Zhang P, Fang G, Yi P, Yu X, Li X, et al. Synthesis and Characterization of Novel Reversible Photoswitchable Fluorescent Polymeric Nanoparticles via One-Step Miniemulsion Polymerization. *J Phys Chem B*. 7 avr 2011;115(13):3354-62.
81. Candau F, Pabon M, Anquetil J-Y. Polymerizable microemulsions: some criteria to achieve an optimal formulation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 15 août 1999;153(1):47-59.
82. Geng J, Li K, Qin W, Ma L, Gurzadyan GG, Tang BZ, et al. Eccentric Loading of Fluorogen with Aggregation-Induced Emission in PLGA Matrix Increases Nanoparticle Fluorescence Quantum Yield for Targeted Cellular Imaging. *Small*. 10 juin 2013;9(11):2012-9.
83. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods: Critical comparison. *Advances in Colloid and Interface Science*. 14 avr 2011;163(2):90-122.
84. Kwon GS, Kataoka K. Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1 déc 2012;64:237-45.
85. Lince F, Marchisio DL, Barresi AA. Strategies to control the particle size distribution of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. *Journal of Colloid and Interface Science*. 15 juin 2008;322(2):505-15.
86. Khayata N, Abdelwahed W, Chehna MF, Charcosset C, Fessi H. Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: from laboratory scale to large scale using a membrane contactor. *Int J Pharm*. 28 févr 2012;423(2):419-27.
87. Beck-Broichsitter M, Nicolas J, Couvreur P. Solvent selection causes remarkable shifts of the “Ouzo region” for poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by nanoprecipitation. *Nanoscale*. 14 mai 2015;7(20):9215-21.
88. Saad WS, Prud’homme RK. Principles of nanoparticle formation by flash nanoprecipitation. *Nano Today*. 1 avr 2016;11(2):212-27.
89. Bally F, Garg D, Serra C, Hoarau Y, Anton N, Brochon C, et al. Improved size-tunable preparation of polymeric nanoparticles by microfluidic nanoprecipitation. *Polymer*. 12 oct 2012;53:5045–5051.

90. Limayem Blouza I, Charcosset C, Sfar S, Fessi H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. *International Journal of Pharmaceutics*. 15 nov 2006;325(1):124-31.
91. Legrand P, Lesieur S, Bochot A, Gref R, Raatjes W, Barratt G, et al. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *Int J Pharm*. 1 nov 2007;344(1-2):33-43.
92. Li K, Pan J, Feng S-S, Wu AW, Pu K-Y, Liu Y, et al. Generic Strategy of Preparing Fluorescent Conjugated-Polymer-Loaded Poly(DL-lactide-co-Glycolide) Nanoparticles for Targeted Cell Imaging. *Advanced Functional Materials*. 23 nov 2009;19(22):3535-42.
93. Kandel PK, Fernando LP, Ackroyd PC, Christensen KA. Incorporating functionalized polyethylene glycol lipids into reprecipitated conjugated polymer nanoparticles for bioconjugation and targeted labeling of cells. *Nanoscale*. 10 mars 2011;3(3):1037-45.
94. Zeigler MB, Sun W, Rong Y, Chiu DT. Hybrid Semiconducting Polymer Nanoparticles as Polarization-Sensitive Fluorescent Probes. *J Am Chem Soc*. 7 août 2013;135(31):11453-6.
95. Reisch A, Runser A, Arntz Y, Mély Y, Klymchenko AS. Charge-Controlled Nanoprecipitation as a Modular Approach to Ultrasmall Polymer Nanocarriers: Making Bright and Stable Nanoparticles. *ACS Nano*. 26 mai 2015;9(5):5104-16.
96. Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*. 1 janv 1948;437(1-2):55-75.
97. Demchenko AP, éditeur. *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology II: Molecular Constructions, Polymers and Nanoparticles* [Internet]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2010 [cité 2 oct 2018]. (Springer Series on Fluorescence). Disponible sur: [//www.springer.com/us/book/9783642046995](http://www.springer.com/us/book/9783642046995)
98. Wang L, Tan W. Multicolor FRET Silica Nanoparticles by Single Wavelength Excitation. *Nano Lett*. 1 janv 2006;6(1):84-8.
99. Jin Y, Ye F, Zeigler M, Wu C, Chiu DT. Near-Infrared Fluorescent Dye-Doped Semiconducting Polymer Dots. *ACS Nano*. 22 févr 2011;5(2):1468-75.
100. Chen J, Zhang P, Yu X, Li X, Tao H, Yi P. Fabrication of Novel Polymer Nanoparticle-Based Fluorescence Resonance Energy Transfer Systems and their Tunable Fluorescence Properties. *Journal of Macromolecular Science, Part A*. 31 janv 2011;48(3):219-26.
101. Keyvan Rad J, Mahdavian AR, Salehi-Mobarakeh H, Abdollahi A. FRET Phenomenon in Photoreversible Dual-Color Fluorescent Polymeric Nanoparticles Based on Azocarbazole/Spiropyran Derivatives. *Macromolecules*. 12 janv 2016;49(1):141-52.

102. Wagh A, Qian SY, Law B. Development of Biocompatible Polymeric Nanoparticles for in Vivo NIR and FRET Imaging. *Bioconjugate Chem.* 16 mai 2012;23(5):981-92.
103. Wagh A, Jyoti F, Mallik S, Qian S, Leclerc E, Law B. Polymeric Nanoparticles with Sequential and Multiple FRET Cascade Mechanisms for Multicolor and Multiplexed Imaging. *Small.* 24 juin 2013;9(12):2129-39.
104. Frigoli M, Ouadahi K, Larpent C. A Cascade FRET-Mediated Ratiometric Sensor for Cu²⁺Ions Based on Dual Fluorescent Ligand-Coated Polymer Nanoparticles. *Chemistry – A European Journal.* 17 août 2009;15(33):8319-30.
105. Chen J, Zeng F, Wu S, Su J, Zhao J, Tong Z. A facile approach for cupric ion detection in aqueous media using polyethyleneimine/PMMA core-shell fluorescent nanoparticles. *Nanotechnology.* 9 sept 2009;20(36):365502.
106. Ma B, Wu S, Zeng F, Luo Y, Zhao J, Tong Z. Nanosized diblock copolymer micelles as a scaffold for constructing a ratiometric fluorescent sensor for metal ion detection in aqueous media. *Nanotechnology.* 14 mai 2010;21(19):195501.
107. Woo Hong S, Jo W. A fluorescence resonance energy transfer probe for sensing pH in aqueous solution. *Polymer.* 1 sept 2008;49:4180-7.
108. Wang D, Liu T, Yin J, Liu S. Stimuli-Responsive Fluorescent Poly(N-isopropylacrylamide) Microgels Labeled with Phenylboronic Acid Moieties as Multifunctional Ratiometric Probes for Glucose and Temperatures. *Macromolecules.* 12 avr 2011;44(7):2282-90.
109. Peng H, Stolwijk JA, Sun L-N, Wegener J, Wolfbeis OS. A Nanogel for Ratiometric Fluorescent Sensing of Intracellular pH Values. *Angewandte Chemie.* 7 juin 2010;122(25):4342-5.
110. Trofymchuk K, Reisch A, Didier P, Fras F, Gilliot P, Mely Y, et al. Giant light-harvesting nanoantenna for single-molecule detection in ambient light. *Nat Photonics.* oct 2017;11(10):657-63.
111. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev.* juin 2001;53(2):283-318.
112. Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Benoit J-P. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials.* août 2006;27(24):4356-73.
113. Gessner A, Waicz R, Lieske A, Paulke B, Mäder K, Müller RH. Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption. *Int J Pharm.* 10 mars 2000;196(2):245-9.
114. Yoon JY, Kim JH, Kim WS. Interpretation of protein adsorption phenomena onto functional microspheres. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces.* 15 oct 1998;12(1):15-22.

115. Harris JM, Martin NE, Modi M. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 2001;40(7):539-51.
116. Zhu M, Nie G, Meng H, Xia T, Nel A, Zhao Y. Physicochemical Properties Determine Nanomaterial Cellular Uptake, Transport, and Fate. *Acc Chem Res.* 19 mars 2013;46(3):622-31.
117. Zhu A, Lu P, Wu H. Immobilization of poly(ϵ -caprolactone)–poly(ethylene oxide)–poly(ϵ -caprolactone) triblock copolymer on poly(lactide-co-glycolide) surface and dual biofunctional effects. *Applied Surface Science.* 15 janv 2007;253(6):3247-53.
118. Gref null, Lück null, Quellec null, Marchand null, Dellacherie null, Harnisch null, et al. « Stealth » corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 oct 2000;18(3-4):301-13.
119. Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science.* 18 mars 1994;263(5153):1600-3.
120. Verrecchia T, Spenlehauer G, Bazile DV, Murry-Brelrier A, Archimbaud Y, Veillard M. Non-stealth (poly(lactic acid/albumin)) and stealth (poly(lactic acid-polyethylene glycol)) nanoparticles as injectable drug carriers. *Journal of Controlled Release.* sept 1995;36(1-2):49-61.
121. Jain NK, Nahar M. PEGylated nanocarriers for systemic delivery. *Methods Mol Biol.* 2010;624:221-34.
122. Yang M, Lai SK, Wang YY, Zhong W, Happe C, Zhang M, et al. Biodegradable nanoparticles composed entirely of safe materials that rapidly penetrate human mucus. *Angew Chem (Int Ed Engl), Angewandte Chemie (International ed in English), Angewandte Chemie (International Edition in English), Angewandte Chemie - International Edition in English, Angewandte Chemie International Edition in English, Angewandte Chemie, International Edition in English, Angewandte Chemie-International Edition, Extr with Supercritical Gases, Symp.* 7 mars 2011;50(11):2597-600.
123. Yang M, Yu T, Wang Y-Y, Lai SK, Zeng Q, Miao B, et al. Vaginal Delivery of Paclitaxel via Nanoparticles with Non-Mucoadhesive Surfaces Suppresses Cervical Tumor Growth. *Advanced Healthcare Materials.* 1 juill 2014;3(7):1044-52.
124. Illum L, Davis SS, Müller RH, Mak E, West P. The organ distribution and circulation time of intravenously injected colloidal carriers sterically stabilized with a block copolymer--poloxamine 908. *Life Sci.* janv 1987;40(4):367-74.

125. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 25 sept 2018]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8128245>
126. Wang D, Qian J, He S, Park JS, Lee KS, Han S, et al. Aggregation-enhanced fluorescence in PEGylated phospholipid nanomicelles for in vivo imaging. *Biomaterials*. sept 2011;32(25):5880-8.
127. Romberg B, Hennink WE, Storm G. Sheddable coatings for long-circulating nanoparticles. *Pharm Res*. janv 2008;25(1):55-71.
128. Howes PD, Chandrawati R, Stevens MM. Colloidal nanoparticles as advanced biological sensors. *Science*. 10 mars 2014;346(6205):1247390.
129. Krasia-Christoforou T, Georgiou TK. Polymeric theranostics: using polymer-based systems for simultaneous imaging and therapy. *J Mater Chem B*. 29 mai 2013;1(24):3002-25.
130. Wolfbeis OS. An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. *Chem Soc Rev*. 26 janv 2015;44:4743-68.
131. Garg T, Rath G, Goyal AK. Colloidal drug delivery systems: current status and future directions. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2015;32(2):89-147.
132. Stolnik S, Heald CR, Neal J, Garnett MC, Davis SS, Illum L, et al. Polylactide-poly(ethylene glycol) micellar-like particles as potential drug carriers: production, colloidal properties and biological performance. *J Drug Target*. 2001;9(5):361-78.
133. Peracchia MT, Fattal E, Desmaële D, Besnard M, Noël JP, Gomis JM, et al. Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *J Control Release*. 28 juin 1999;60(1):121-8.
134. Peppas NA, Langer R. New challenges in biomaterials. *Science*. 25 mars 1994;263(5154):1715-20.
135. Jokerst JV, Lobovkina T, Zare RN, Gambhir SS. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond)*. juin 2011;6(4):715-28.
136. Amoozgar Z, Yeo Y. Recent advances in stealth coating of nanoparticle drug delivery systems. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. avr 2012;4(2):219-33.
137. Schroen CGPH, Stuart MAC, van der Voort Maarschalk K, van der Padt A, van't Riet K. Influence of Preadsorbed Block Copolymers on Protein Adsorption: Surface Properties, Layer Thickness, and Surface Coverage. *Langmuir*. 1 août 1995;11(8):3068-74.
138. Dos Santos N, Allen C, Doppen A-M, Anantha M, Cox KAK, Gallagher RC, et al. Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on

- liposomes: relating plasma circulation lifetimes to protein binding. *Biochim Biophys Acta*. juin 2007;1768(6):1367-77.
139. Hatai J, Motiei L, Margulies D. Analyzing Amyloid Beta Aggregates with a Combinatorial Fluorescent Molecular Sensor. *J Am Chem Soc*. 15 févr 2017;139(6):2136-9.
 140. Lakowicz JR, éditeur. *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Principles* [Internet]. Springer US; 2002 [cité 4 nov 2018]. (Topics in Fluorescence Spectroscopy). Disponible sur: //www.springer.com/us/book/9780306438752
 141. Reisch A, Trofymchuk K, Runser A, Fleith G, Rawiso M, Klymchenko AS. Tailoring Fluorescence Brightness and Switching of Nanoparticles through Dye Organization in the Polymer Matrix. *ACS Appl Mater Interfaces*. 13 déc 2017;9(49):43030-42.
 142. Elson EL. Fluorescence Correlation Spectroscopy: Past, Present, Future. *Biophysical Journal*. 21 déc 2011;101(12):2855-70.
 143. Bazile D, Prud'homme C, Bassoullet M, Marlard M, Spenlehauer G, Veillard M. Stealth Me. PEG-PLA Nanoparticles Avoid Uptake by the Mononuclear Phagocytes System. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1 avr 1995;84(4):493-8.
 144. Xu Q, Boylan NJ, Cai S, Miao B, Patel H, Hanes J. Scalable method to produce biodegradable nanoparticles that rapidly penetrate human mucus. *J Control Release*. 10 sept 2013;170(2):279-86.
 145. Monopoli MP, Åberg C, Salvati A, Dawson KA. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nano*. déc 2012;7(12):779-86.
 146. Röcker C, Pötzl M, Zhang F, Parak WJ, Nienhaus GU. A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles. *Nature Nanotechnology*. sept 2009;4(9):577-80.
 147. Jeon SI, Lee JH, Andrade JD, De Gennes PG. Protein—surface interactions in the presence of polyethylene oxide: I. Simplified theory. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1 mars 1991;142(1):149-58.
 148. Peng X, Yang Z, Wang J, Fan J, He Y, Song F, et al. Fluorescence Ratiometry and Fluorescence Lifetime Imaging: Using a Single Molecular Sensor for Dual Mode Imaging of Cellular Viscosity. *J Am Chem Soc*. 4 mai 2011;133(17):6626-35.
 149. Andreiuk B, Reisch A, Lindecker M, Follain G, Peyriéras N, G. Goetz J, et al. Fluorescent Polymer Nanoparticles for Cell Barcoding In Vitro and In Vivo. *Small*. 9 août 2017;13:1701582.
 150. Udenfriend S. *Fluorescence assay in biology and medicine*. Academic Press; 1962. 530 p.

151. Harris JM, Martin NE, Modi M. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(7):539-51.
152. Melnychuk N, Klymchenko AS. DNA-Functionalized Dye-Loaded Polymeric Nanoparticles: Ultrabright FRET Platform for Amplified Detection of Nucleic Acids. *J Am Chem Soc*. 29 août 2018;140(34):10856-65.

Synthesis of small and ultrabright fluorescent polymer nanoparticles for molecular and cellular imaging

Résumé

Les nanoparticules polymériques fluorescentes apparaissent comme des outils importants pour l'imagerie en temps réel des processus biologiques au niveau moléculaire et cellulaire. L'objectif de mon projet de doctorat a été d'optimiser les nanoparticules polymériques fluorescentes pour l'imagerie biologique. Premièrement, nous avons pu, en faisant varier la chimie des polymères, obtenir un très bon contrôle de leur taille. Ceci a permis de mettre en évidence l'importance de la taille des NPs pour des applications intracellulaires avec une taille maximale de 23 nm pour une distribution dans tout le cytosol. Deuxièmement, nous avons pu montrer que la simple adsorption d'un amphiphile PEGylé de type Pluronic permet la stabilisation des nanoparticules dans des milieux biologiques. Le nombre de molécules incorporées et leur stabilité ont été étudiés en combinant des techniques de FRET et de FCS. Les meilleures formulations résultent en une stabilité des nanoparticules *in vivo*, ce qui a permis leur imagerie en tant que particules individuelles dans les vaisseaux sanguins du cerveau de souris. Troisièmement, le transfert d'énergie entre différents fluorophores encapsulés dans les NPs a été étudié et optimisé.

Mots clefs : Nanoparticules polymériques fluorescentes, encapsulation de fluorophore, transfert d'énergie d'excitation, bio-imagerie.

Résumé en anglais

Fluorescent polymeric nanoparticles appear as important tools for real-time imaging of biological processes at the molecular and cellular level. The objective of my PhD project was to optimize fluorescent polymeric nanoparticles for biological imaging. First, by varying the chemistry of the polymers, we have been able to obtain a very good control of their size. This made it possible to highlight the importance of NPs size for intracellular applications with a maximum size of 23 nm for optimal distribution throughout the cytosol. Secondly, we have shown that simple adsorption of a PEGylated amphiphiles pluronic family allows the stabilization of nanoparticles in biological media. The number of incorporated molecules and their stability has been studied by combining FRET and FCS techniques. The best formulations result in nanoparticle stability *in vivo*, which allowed their imaging as individual particles in the blood vessels of the mouse brain. Third, energy transfer among different fluorophores encapsulated in NPs has been studied and optimized.

Key words: Fluorescent polymeric nanoparticles, fluorophore encapsulation, excitation energy transfer, bio-imaging.