



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse

pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

Mention : « Génie des Produits et des Procédés »

Présentée et soutenue publiquement par

Florence-Anaïs KAUFFER

le 22 janvier 2014

Synthèse, stabilité et toxicité de quantum dots à cœur CdSe

Composition du jury

Rapporteurs

- Marie-Pierre Fontaine-Aupart, Directrice de Recherche, CNRS, Orsay
- Fouzia Boulmedais, Chargé de Recherche, CNRS, Strasbourg

Directeurs de thèse

- Raphaël Schneider, Professeur, Université de Lorraine, Nancy
- Christophe Merlin, Maître de Conférences, Université de Lorraine, Nancy

Invités

- Lavinia Balan, Chargé de Recherche, CNRS, Mulhouse
- Patrick Billard, Maître de Conférences, Université de Lorraine, Nancy

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur Raphaël Schneider et Monsieur le Docteur Christophe Merlin pour avoir co-dirigé cette thèse et m'avoir permis de la réaliser dans des conditions privilégiées. Je leur exprime toute ma gratitude pour m'avoir accordé la chance de participer à ce projet et j'espère que le travail présenté dans ces quelques pages répond à leurs attentes. Je les remercie également pour leur dévouement, leur rigueur, leur patience, leurs conseils et leurs critiques toujours justes et constructives.

Je remercie également Messieurs les Directeurs de Recherche Gabriel Wild et Laurent Falk qui m'ont successivement accueillie au sein du Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, ainsi que Monsieur le Directeur de Recherche Alain Walcarius pour m'avoir ouvert les portes du Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement.

J'adresse à présent mes plus sincères remerciements à Madame la Directrice de Recherche Marie-Pierre Fontaine-Aupart et à Madame le Docteur Fouzia Boulmedais pour avoir accepté de rapporter ce manuscrit. Je remercie également Madame le Docteur Lavinia Balan et Monsieur le Docteur Patrick Billard pour leur présence à ma soutenance.

Je souhaiterais ensuite remercier les chefs d'équipe successifs de l'équipe Élaboration et Mise en forme de MATériaux Divisés, Véronique Falk et Hervé Muhr, pour leur gentillesse et leur accueil toujours chaleureux. J'en profite ici pour les remercier d'avoir contribué au bon déroulement de mon premier congrès scientifique.

J'adresse de nouveau mes plus sincères remerciements à Lavinia Balan pour la caractérisation structurale des nanoparticules par MET, à Ghouti Medjhadi pour les analyses DRX, à Serge Corbel pour avoir contribué à la réalisation des manipulations de photostabilité et à Patrick Billard et Xavier Bellanger pour m'avoir fourni les différentes souches utilisées.

Je remercie également tous les membres de mes deux laboratoires d'accueil. Je ne peux malheureusement citer tout le monde, les laboratoires étant grands et parce que « l'oubli » serait encore plus flagrant. Cependant j'adresse des remerciements particuliers à Hélène Guilloteau sans qui mes premiers pas, plutôt hésitants, dans l'univers de la microbiologie, l'auraient été encore plus, ainsi qu'à Philippe Arnoux pour son aide, tant au laboratoire de Chimie, qu'en photophysique.

J'adresse mes remerciements les plus vifs à Christophe Carpier, ainsi qu'à Monsieur et Madame Myint qui ont fait de mes trois années de « monitorat » une expérience extraordinaire où au-delà des enseignements je retiendrai les nombreux fous rires que nous avons partagés.

Je prends également le temps ici de remercier mes amis qui ont supporté mon manque de réactivité à leurs appels et sorties pendant ces trois années. Il est clair que je ne peux tous les mentionner (je ne veux pas dépasser deux pages) mais j'ai une pensée spéciale pour mes partenaires d'entraînement et de compétition du Tennis Club de Lunéville Marion G., Sophie D., Céline M., Catherine Z. et Carine P. Je pense aussi à Nicolas D. qui comme il aime à le penser est la personne qui m'a poussée à faire une thèse (c'est vrai mais Chut !) et Emily N. que j'ai quelques temps après très certainement convaincu de faire une thèse et à qui je souhaite une dernière année libératrice et enrichissante.

Le mot de la fin sera naturellement pour ma famille sans qui ce travail n'aurait jamais pu aboutir : ma maman Odile et mes oncles Edmond, Jean-François, Pascal, Denis et Hervé. Je remercie finalement mon compagnon Andreï qui m'a soutenue d'autant plus facilement qu'il vivait la même expérience.

Enfin, je dédie cette thèse à ma grand-mère adorée Paulette qui au-delà de ma réussite n'a jamais souhaité que mon épanouissement et mon bonheur.

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	5
Liste des abréviations	11
Résumé et mots-clés	17
Abstract and keywords	21
Introduction générale	25
 Chapitre I. Les Quantum Dots CdSe : Propriétés, synthèses, applications et toxicité	 33
I.1. Les Quantum Dots	35
I.1.1. Définition	35
I.1.2. Structure générale des QDs	38
I.1.3. Structure électronique des semi-conducteurs	40
I.1.3.1. Cas du sélénure de cadmium, CdSe	41
I.1.3.2. Cas des QDs : effet du confinement quantique	45
I.1.4. Propriétés photophysiques	47
I.1.4.1. Propriétés de fluorescence taille-dépendante	48
I.1.4.2. Spectres associés	50
I.1.4.2.1. Spectres d'absorption	50
I.1.4.2.2. Spectres d'émission de fluorescence	53
I.1.4.3. Rendement quantique de fluorescence	56
I.1.4.4. Intérêt des QDs par rapport aux fluorophores organiques	58
I.1.5. Structure cristalline	59
I.1.6. QDs à structure cœur/coquille	62
I.1.6.1. Types de structure cœur/coquille	63
I.1.6.2. Choix des semi-conducteurs	65
I.1.6.3. Structures cœur/double coquille	66
I.1.7. QDs à structure alliée	67
I.1.8. Stabilité physicochimique des QDs	68
I.1.8.1. Phénomène d'agrégation	68
I.1.8.2. Phénomène de la dissolution	71
I.1.8.3. Importance du ligand stabilisant	71
I.2. Synthèse des QDs de CdSe	72
I.2.1. Les différentes étapes de la synthèse de QDs CdSe	72
I.2.2. Synthèses organométalliques : obtention de QDs hydrophobes	74
I.2.3. Obtention de QDs hydrophiles	76
I.2.3.1. Modification de la surface de QDs hydrophobes : dispersion en milieu aqueux	76
I.2.3.1.1. Échange des ligands de surface	77
I.2.3.1.2. Interaction des ligands hydrophobes présents avec des molécules amphiphiles	80
I.2.3.1.3. Incorporation des QDs dans des sphères de silice	82
I. 2.3.2. Synthèses hydrothermales ou en milieux aqueux	83
I.2.4. Ancrage de biomolécules à la surface des QDs	85
I.2.5. Synthèse de QDs cœur/coquille(s)	88
I.2.6. Synthèse de QDs alliés	90
I.3. Utilisations majeures des Quantum Dots de CdSe	91
I.4. Origines de la toxicité des Quantum Dots CdSe	95
I.4.1. De la nécessité d'évaluer la toxicité des QDs à sa complexité	95
I.4.2. Réactivité des Quantum Dots : génération d'Espèces Réactives de l'Oxygène	101
I.4.2.1. Mécanismes de formation	101
I.4.2.2. Cibles cellulaires des EROs et stress oxydant	103

I.4.3. Instabilité des Quantum Dots : libération de métaux	110
I.4.3.1. Les mécanismes à la base de la toxicité des ions Cd^{2+}	110
I.4.3.2. Détection du cadmium biodisponible	112
I.4.3.3. Production d'espèces sélénées	114
Chapitre II. Matériels et Méthodes	115
II.1. Réactifs et produits	117
II.2. Synthèses de précurseurs et de QDs	118
II.2.1. Précurseurs de séléniure	118
II.2.1.1. Préparation de NaHSe	118
II.2.1.2. Préparation de Na_2SeSO_3	119
II.2.2. Synthèse de Quantum Dots de CdSe	119
II.2.2.1. Protocole de synthèse représentatif	119
II.2.2.2. Synthèse de Quantum Dots CdSe@MSA	120
II.2.2.3. Synthèse de Quantum Dots alliés CdSe(S)@MSA	121
II.3. Caractérisations des Quantum Dots	121
II.3.1. Propriétés optiques	121
II.3.1.1. Spectres d'absorption et d'émission	121
II.3.1.2. Photostabilité	122
II.3.2. Caractérisation structurale	122
II.3.2.1. Diffraction des Rayons X (DRX)	122
II.3.2.2. Microscopie Électronique en Transmission (MET) : modes images et diffraction	122
II.3.2.3. Diffusion dynamique de la lumière (DLS) et mobilité électrophorétique	123
II.3.3. Composition des suspensions colloïdales (ICP)	124
II.3.4. Dialyse des suspensions colloïdales	125
II.3.5. Détection de EROs produits par les QDs photoactivés	125
II.3.5.1. Quantification d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ à l'aide du NitroBlue Tetrazolium	125
II.3.5.2. Quantification d' $\text{OH}^{\cdot}$ à l'aide du disodium téréphtalate	126
II.4. Souches bactériennes et milieux de culture	128
II.4.1. Souches	128
II.4.2. Milieux de culture	129
II.4.2.1. Milieu de culture LB (Bertani 1951)	129
II.4.2.2. Milieu de culture RM (Corbisier <i>et al.</i> 1998)	129
II.4.2.3. Milieu minimum MOPS (Corbisier <i>et al.</i> 1998)	130
II.4.2.4. Milieu minimum M9 (Sambrook <i>et al.</i> 2001)	130
II.4.2.5. Milieu minimum Tris 284 (Mergeay <i>et al.</i> 1985)	131
II.5. Évaluation de la cytotoxicité	131
II.5.1. Test basé sur l'extinction de la luminescence.	131
II.5.2. Test basé sur la cinétique de croissance	132
II.6. Détection d'ions Cd^{2+} biodisponibles à l'aide du biosenseur <i>C. metallidurans</i> AE1433	133
II.7. Détection du stress oxydant chez <i>E. coli</i>	134
II.8. Interactions cellules – QDs : cytométrie en flux	135
Chapitre III. Synthèses et caractérisations de Quantum Dots à cœur CdSe	137
III.1. Synthèses de QDs CdSe	139
III.1.1. Synthèses de QDs CdSe@GSH	140
III.1.1.1. Synthèses à 100°C	141
III.1.1.1.1. Optimisation du pH de la solution de complexes	142
III.1.1.1.2. Diminution de la concentration en cadmium	143
III.1.1.2. Synthèses hydrothermales	144

III.1.2. Synthèses de QDs CdSe@TGA	145
III.1.2.1. Synthèses hydrothermales	146
III.1.2.1.1. Augmentation du temps de chauffage	147
III.1.2.1.2. Augmentation de la température et nouvel ajustement du temps de chauffage	148
III.1.2.1.3. Ajout d'une source supplémentaire de S ²⁻	150
III.1.2.1.4. Utilisation d'un autre précurseur de Se ²⁻	152
III.1.2.2. Synthèse à 100°C	152
III.1.3. Synthèses de QDs CdSe@MSA	153
III.1.3.1. Synthèses hydrothermales	154
III.1.3.2. Synthèses à 100°C	156
III.2. Caractérisation des QDs stabilisés par l'acide mercaptosuccinique	157
III.2.1. Taille, forme, structure cristalline et propriétés optiques des QDs CdSe et CdSe(S)	158
III.2.2. Photostabilité des QDs CdSe et CdSe(S)	165
III.2.3. Analyse ICP et stabilité des QDs	167
Chapitre IV. Cytotoxicité des QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA et libération de Cd²⁺	173
IV.1. Étude de la cytotoxicité des QDs par extinction de bioluminescence	176
IV.1.1. Cytotoxicité des QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA	176
IV.1.2. Perception cellulaire du Cd ²⁺ libéré par les QDs	178
IV.2. Cadmium biodisponible libéré par les QDs	181
Chapitre V. Cytotoxicité des QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA et génération d'EROs	185
V.1. Étude de la cytotoxicité des QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA par des cinétiques de croissance	187
V.1.1. Étude comparative des deux QDs	187
V.1.2. Toxicité exaltée sous illumination	188
V.2. Production d'EROs par les QDs photoactivés	189
V.2.1. Génération de radicaux superoxydes	189
V.2.2. Génération de radicaux hydroxyles	191
V.3. Détection du stress oxydant perçu par <i>E. coli</i>	196
Conclusion générale et perspectives	199
Références bibliographiques	207
Tables des illustrations	225
Annexe 1. Recensement des études évaluant la toxicité de Quantum Dots de CdSe	233
Annexe 2. Spectre RMN du 2-hydroxytéréphtalate	243
Annexe 3. Incidence of the surface chemistries on the stability, the ROS production and the toxicity of CdSe quantum dots	247

Liste des abréviations

A	Absorbance au seuil d'absorption
ACh	Neurotransmetteur Acétylcholine
AChE	Enzyme Acétylcholinestérase
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AO	Acide Oléique
ARN	Acide Ribonucléique
ATCh	Précurseur Acétylthiocholine
BC	Bande de Conduction
BV	Bande de Valence
c	Célérité
C ₀	Concentration initiale en précurseur de Cd
CSEO	Concentration maximale Sans Effets Observés
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CI ₅₀	Concentration Inhibitrice médiane
D	taille de la nanoparticule
DEL	Diode à Électroluminescence
DLS	Dynamic Light Scattering
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO ₆₀₀	Densité Optique à 600 m
DRX	Diffraction des Rayons X
DST	Disodium téréphtalate
ε	Coefficient d'extinction molaire
ε_0	Permittivité électrique statique du vide
ε_r	Permittivité électrique statique du matériau
e ⁻	électron
E	Énergie
E ₀	Extremum de la bande
E _c	Énergie minimum de la bande de conduction
E _g	Énergie de gap
EROs	Espèces Réactives de l'Oxygène
E _v	Énergie maximum de la bande de Valence
F	Intégration spectrale (Aire sous la courbe)
FI	Facteur d'induction
FWHM	Full-Width at Half-Maximum
g	Accélération de la pesanteur à la surface de la Terre

GFP	Green Fluorescent Protein
h	Constante de Planck
$\hbar$	Constante de Planck réduite
h	distance entre 2 QDs
h^+	trou
HDA	Hexadécylamine
HH	Heavy Hole : trou lourd
HTA	2-Hydroxytéréphtalate
$h\nu$	excitation lumineuse
ICP	Inductively Coupled Plasma
INRS	Institut National de Recherche et de Sécurité
<i>i</i> -PrOH	<i>Iso</i> -Propanol
J	moment cinétique angulaire
J_z	moment cinétique angulaire projeté selon la direction z
κ	Inverse de la longueur de Debye
k	constante de Boltzmann
kDa	kiloDalton
Km	Kanamycine
kT	énergie thermique
λ	Longueur d'onde d'émission de fluorescence
$\lambda_{\max}$	Longueur d'onde correspondant au 1 ^{er} maximum d'absorption (exciton)
l	Longueur du chemin optique
L	Nombre quantique associé au moment cinétique orbitaire
L_B	Longueur de Bjerrum
LB	Lysogeny Broth
LB/10	milieu Lysogeny Broth dilué au dixième
LH	Light Hole : trou léger
μ	Mobilité électrophorétique
m_e^*	Masse effective de l'électron
m_h^*	Masse effective du trou
m_{HH}	Masse effective des trous lourds
m_{LH}	Masse effective des trous légers
MPA	Acide 3-mercaptopropionique
MSA	Acide mercaptosuccinique
m_{SO}	Masse effective des trous de la bande de Split Off

MUA	Acide mercaptoundecanoïque
n	indice de réfraction du solvant
NBT	NitroBlue Tetrazolium
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health
ODA	Octadécylamine
ODE	Octadécène
PCN	Point de Charge Nulle
PEG	Polyéthylène glycol
PL	Émission de photoluminescence
QDs	Quantum Dots
r	Rayon de la nanoparticule
r_B	Rayon de Bohr
RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire
RQ	Rendement Quantique de fluorescence
S	moment cinétique total de spin
S_0	état fondamental non excité
S_1	1 ^{er} niveau excité
S_n	niveau excité n
SO	bande de Split Off
SSC	Side scatter
T_c	Température critique
Tc	Tétracycline
TDPA	Acide Tétradécylphosphonique
Tg	Temps de génération
TGA	Acide thioglycolique
TOP	Trioctylphosphine
TOPO	Oxyde de trioctylphosphine
U	Potentiel d'interaction
u.a.	Unité Arbitraire
W	Wurtzite
Z	Charge effective du colloïde
ZB	Zinc Blende

Résumé et mots-clés

Parce qu'ils présentent des propriétés remarquables par rapport à leurs équivalents massifs, les nanomatériaux occupent une place de plus en plus importante dans l'industrie et en médecine. Leur essor rapide a généré de nombreuses craintes dans l'opinion publique notamment au regard de certaines méconnaissances liées à leur toxicité. Notre projet vise l'utilisation du séléniure de cadmium (CdSe) comme matériau modèle afin d'établir une corrélation entre la structure chimique des nanoparticules, leur réactivité de surface, leur (photo)stabilité et leur toxicité.

Des quantum dots (QDs) CdSe et alliages CdSe(S) ont été préparés en milieu aqueux à 100°C ou par voie hydrothermale de manière à ne différer que par leur structure chimique de cœur (alliage ternaire vs semi-conducteur binaire) alors que d'autres paramètres comme la taille, la charge ou la nature du ligand de surface, ont été maintenus constants. Des études de cytotoxicité menées sur *Escherichia coli* ont montré que la libération de Cd^{2+} jouait un rôle important dans la toxicité pour les deux QDs. Nos résultats ont également mis en évidence que les QDs CdSe(S) alliés étaient plus stables et moins toxiques que les QDs CdSe. Sans négliger l'importance de la libération d'ion Cd^{2+} par les nanoparticules, une corrélation entre la stabilité et la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) a montré que la toxicité était en partie dépendante de la photostabilité des QDs. Notre étude met en perspective une relation entre la réactivité, la stabilité du cœur des nanoparticules, et la toxicité photo-induite.

Mots-clés : Quantum Dots CdSe, alliage ternaire CdSe(S), synthèse en milieu aqueux, photostabilité, cytotoxicité, Espèces Réactives de l'Oxygène.

Abstract and keywords

Due to their unique properties compared to their bulk counterparts, nanomaterials have gained considerable attention, especially in industry and medicine. Their fast development has generated many public concerns, especially because of a lack of knowledge regarding their toxicity. Our project aims to use cadmium selenide (CdSe) as a model material in order to initiate a research aiming at establishing a correlation between the nanoparticles chemical structure, their surface reactivity, their stability and their toxicity.

CdSe and alloyed CdSe(S) quantum dots (QDs) were prepared in aqueous phase either at 100°C or under hydrothermal conditions in order to differ solely by their core chemical structure (ternary alloy vs binary semiconductor), while other parameters such as the size, the surface charge or the surface ligand, have been kept constant. Cytotoxicity studies carried out on *Escherichia coli* have shown that release of Cd^{2+} played a key role in the toxicity for both QDs. However, alloyed CdSe(S) QDs were also found more stable and less toxic than CdSe nanocrystals. Without disregarding the importance of Cd^{2+} ions release by the nanoparticles, a correlation between the stability and the production of reactive oxygen species (ROS) showed that toxicity was dependent on QDs photostability. Our study highlights a relationship between the core reactivity, stability and the photo-induced toxicity QD nanoparticles.

Keywords : CdSe Quantum Dots, CdSe(S) ternary alloy, aqueous synthesis, photostability, cytotoxicity, Reactive Oxygen Species.

Introduction générale

Au cours des quinze dernières années, les Quantum Dots (QDs) ont émergé comme sondes fluorescentes, notamment dans le domaine de la bio-imagerie, en raison de leurs propriétés optiques uniques. Ces particules sont caractérisées par (i) une absorption couvrant une large gamme spectrale associée à des spectres d'émission de photoluminescence (PL) présentant une émission étroite et ajustable sur tout le spectre visible jusqu'au proche infra-rouge, (ii) une résistance au photoblanchiment importante, (iii) des rendements quantiques de fluorescence (RQ) élevés, et par (iv) une meilleure résistance à la dégradation chimique si on les compare aux fluorophores organiques (Medintz *et al.* 2005, Hild *et al.* 2008, Rogach 2008, Michalet *et al.* 2005).

Cependant, au cours de leur développement, l'utilisation de ces nanomatériaux a soulevé d'importantes préoccupations en termes de toxicité et de sécurité, car les QDs les plus populaires, CdSe et CdTe, tant en termes d'études de développement que d'utilisations, contiennent des éléments hautement toxiques et cancérigènes. Notons que ces préoccupations sont à prendre en compte à la fois à court terme dans des contextes comme la bioimagerie où l'intégrité du matériel biologique exposé aux QDs peut être compromise, mais aussi à plus longue échéance si l'on considère des aspects liés à la gestion des déchets.

Les études de toxicité déjà réalisées sur les QDs CdSe ont montré que cette dernière est complexe et multiparamétrique. Les premières études ont tout d'abord associé la toxicité aux ions métalliques libérés par les QDs dans les systèmes biologiques (Derfus *et al.* 2004, Kirchner *et al.* 2005, Chen *et al.* 2012). Pour limiter cette cytotoxicité, il a alors été envisagé d'ajouter une coquille protectrice (généralement de ZnS) en périphérie du cœur CdSe (Su *et al.* 2009, Su *et al.* 2010). Cependant, cette coquille ne limite que momentanément la dissolution du cœur CdSe (Derfus *et al.* 2004, Hardmann 2006). D'autres études ont démontré l'influence du ligand de surface, et de la charge de surface sur la cytotoxicité. Les QDs chargés positivement sont généralement plus toxiques que des QDs équivalents, en terme de

taille ou de composition, chargés négativement (Hoshino *et al.* 2004, Tang *et al.* 2013, Aboulaich *et al.* 2012). Le rôle joué par la réactivité de surface et/ou la très petite taille des QDs sur leur capacité à induire des effets cytotoxiques a également été étudié (Shiohara *et al.* 2004, Schneider *et al.* 2009). Dans de nombreux cas, les QDs à base de Cd se sont révélés être plus toxiques pour les cellules que l'équivalent de leur contenu en Cd, ce qui a permis de confirmer que le relargage d'ions métalliques du cœur photoactif ne pouvait être la seule source de toxicité (Schneider *et al.* 2009, Priester *et al.* 2009). Dans ce contexte, la littérature montre qu'une partie de la cytotoxicité des QDs trouve son origine dans leur capacité à générer des EROs après photoactivation par une source lumineuse. Lors de la photo-excitation, des électrons de la bande de valence peuvent être promus à la bande de conduction et des trous, correspondant à des lacunes positives, apparaissent dans la bande de valence. Les électrons peuvent alors être piégés par l'oxygène moléculaire pour former des radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet-}$), alors que les trous peuvent oxyder les molécules d'eau chimisorbées à la surface des QDs pour générer des radicaux hydroxyles ($OH^{\bullet}$). En milieu acide, le radical superoxyde peut être protoné en hydroperoxy ($HO_2^{\bullet}$) puis en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La qualité de la passivation de surface des QDs, qui détermine le nombre de défauts de surface (Alivisatos *et al.* 2005), affecte directement la production d'EROs à partir de la surface des QDs, dans la mesure où les électrons et les trous sont alors fortement délocalisés en périphérie des QDs. Cependant, même si les QDs CdSe (Kim *et al.* 2010), CdTe (Cho *et al.* 2007), ou même des structures de type cœur/coquille comme les QDs CdSe/ZnS (Cooper *et al.* 2010), sont connus pour produire des EROs sous irradiation lumineuse, les différences structurales trop importantes entre ces différents types de QDs, impliquant des réactivités différentes, ne permettent pas d'établir une tendance générale quant à leur capacité à générer des EROs.

Ces différentes études soulignent à la fois le fait que la libération de Cd^{2+} et la réactivité

des QDs, qui dépendent de leurs propriétés physico-chimiques (taille, composition du cœur, chimie de surface, propriétés redox), peuvent influencer la cytotoxicité des QDs envers le matériel biologique et qu'une étude multiparamétrique est nécessaire pour l'évaluer. À ce stade, il convient de noter que les études de toxicité sont généralement réalisées indépendamment, chacune dans des conditions expérimentales particulières. Toute comparaison en vue d'identifier une relation liant les caractéristiques structurales des QDs à une tendance concernant leur cytotoxicité n'est donc que difficilement possible. Ainsi en l'absence de tests normalisés, l'influence de la structure des QDs sur leur toxicité ne pourra être déterminée que par la réalisation d'études comparatives.

Des QDs CdSe de grande qualité peuvent être synthétisés par voie organométallique, procédé basé sur l'injection à haute température du précurseur de séléniure sur des précurseurs de cadmium solubilisés dans des solvants coordinants, tels que la trioctylphosphine (TOP), l'oxyde de trioctylphosphine (TOPO) ou l'acide oléique (AO), utilisés aussi comme ligands stabilisants (Murray *et al.* 1993, Peng *et al.* 2001, Qu *et al.* 2002). Toutefois, afin de répondre aux exigences des bioapplications, ces QDs hydrophobes doivent être transférés de la phase organique dans laquelle ils se trouvent après synthèse vers une phase aqueuse. L'échange des ligands hydrophobes comme le TOP, le TOPO ou l'AO, par des ligands hydrophiles tels que les thioacides permet la dispersion des QDs en milieu aqueux. Cependant, cette étape s'accompagne généralement d'une diminution significative du rendement quantique de fluorescence et de la stabilité des nanocristaux (Wuister *et al.* 2003). La synthèse directe en milieu aqueux de QDs hydrophiles porteurs de ligands thiols a donc été développée et représente une alternative intéressante à la synthèse en phase organique. Ce type de synthèse offre, de plus, de nombreux avantages comme l'utilisation de réactifs moins toxiques, une mise en œuvre plus facile et moins onéreuse, l'utilisation de températures réactionnelles plus basses (100-180°C vs. 300°C) et la fonctionnalisation de surface des QDs

par un ligand hydrophile dès leur synthèse. Cependant, la synthèse en milieu aqueux conduit généralement à des QDs avec des rendements quantiques de fluorescence (RQ) modestes (moins de 10%) (Schneider *et al.* 2012).

Ces dernières années, beaucoup d'efforts ont donc été consacrés à l'amélioration des propriétés optiques des QDs préparés directement en milieu aqueux. Notre équipe a récemment développé des synthèses hydrothermales permettant la production de QDs de CdS (Aboulaich *et al.* 2012), CdSe (Aldeek *et al.* 2011) et CdTe (Aldeek *et al.* 2009) hautement fluorescents et hydrodispersables. Cette stratégie a également été étendue avec succès aux hétérostructures de types CdSe/ZnO ou CdTe/CdS/ZnO.

La première partie du travail de cette thèse s'intéresse à la synthèse, en milieu aqueux à 100°C ou par voie hydrothermale, de QDs à cœur CdSe. Notre objectif est d'obtenir des QDs ne différant que par leur composition (CdSe vs l'alliage CdSe(S)) et donc leur chimie de surface. Ces QDs seront caractérisés de manière approfondie, et notamment par microscopie électronique en transmission (MET), diffraction des rayons X (DRX), ou spectroscopies UV-visible et de fluorescence, avant que leurs stabilités et toxicités respectives ne soient évaluées. Par la suite, la toxicité des QDs sera corrélée à leur stabilité, à leur capacité à générer des EROs, ainsi qu'à la quantité de Cd²⁺ libérés en milieu biologique. Notre objectif est de comprendre l'impact que peut avoir la structure d'un QD sur la contribution relative des différents mécanismes impliqués dans leur toxicité.

Ce manuscrit est divisé en cinq grandes parties :

- Le chapitre I présente une synthèse bibliographique en deux parties, respectivement relatives aux QDs et à l'évaluation de leur toxicité. Les propriétés, les synthèses, et les applications des QDs sont tout d'abord décrites. La seconde partie introduit la nécessité d'évaluer la toxicité des QDs avant de s'attacher à décrire les mécanismes de celle-ci, liés d'une part à la réactivité des QDs et leur capacité à générer des EROs et d'autre

part à leur stabilité influençant la libération d'ions métalliques à partir du cœur photoactif.

- Le chapitre II résume les méthodes et techniques expérimentales utilisées.
- Le chapitre III traite des différentes optimisations de synthèse réalisées en vue d'obtenir des QDs CdSe hydrodispersables ne différant que par la composition du coeur, ainsi que de leurs caractérisations optiques et structurales.
- Le chapitre IV présente les résultats obtenus lors de l'évaluation de la toxicité des QDs sélectionnés, à l'obscurité, à l'aide de biosenseurs exprimant une bioluminescence constitutive. La libération d'ions Cd^{2+} à partir des nanoparticules est également évaluée afin d'estimer la contribution du cadmium à la cytotoxicité observée.
- Enfin, le chapitre V décrit les résultats obtenus lors de l'évaluation de la toxicité, à l'obscurité et à la lumière, des QDs sélectionnés via les cinétiques de croissance de la bactérie *E. coli* en présence et en absence de QDs. En parallèle à l'observation d'une cytotoxicité partiellement photo-induite, nous avons comparé la capacité de chaque QD à générer des EROs et à favoriser l'apparition d'un stress oxydant.

Chapitre I

Les Quantum Dots CdSe :

Propriétés, synthèses, applications et toxicité

Ce chapitre bibliographique va tout d'abord nous permettre de définir les Quantum Dots (QDs) et leurs propriétés photophysiques très spécifiques découlant directement de leur structure électronique. Nous aborderons ainsi les différents types de structure, comme les matériaux cœur/coquille, puis les méthodes de synthèse des QDs CdSe, matériau modèle couramment utilisé pour ses propriétés de fluorescence taille-dépendante ajustables sur toute la gamme du visible et pour les grandes avancées déjà effectuées concernant la préparation de QDs de ce matériau.

Nous présenterons ensuite un bref aperçu des applications possibles des QDs CdSe qui souligneront l'importance de réaliser des études de toxicité sur les QDs préparés. La toxicité des QDs CdSe sera alors discutée en abordant, dans un premier temps, les difficultés liées à l'évaluation de leurs effets délétères, puis dans un second temps, en explicitant les mécanismes impliqués.

I.1. Les Quantum Dots

I.1.1. Définition

Lorsque l'on s'intéresse aux propriétés de conductivité électrique, les nanomatériaux peuvent être classifiés, tout comme les matériaux massifs, en trois catégories : les isolants, les semi-conducteurs et les conducteurs. Pour chaque type de matériau, la possibilité ou non d'observer une conduction électrique sous l'effet d'un champ électrique, c'est-à-dire un déplacement d'électrons ayant acquis une énergie cinétique, s'explique par la théorie des bandes, issue de la théorie des orbitales moléculaires.

Cette théorie quantique de la physique des solides permet de représenter schématiquement les valeurs d'énergie que les électrons peuvent occuper. Les niveaux d'énergie des électrons dans un cristal se répartissent alors en bandes permises séparées par une bande interdite et la conduction électrique dépend alors directement de la configuration

des bandes d'énergie et de l'énergie de gap, E_g (Figure 1). Pour mémoire, les deux bandes permises sont la bande de valence et la bande de conduction. La bande de valence correspond à la bande de plus haute énergie occupée par des électrons et la bande de conduction à la bande de plus basse énergie non occupée. La distance séparant ces deux bandes est appelée la bande interdite, ou « band gap », et est caractérisée par une énergie de gap E_g bien définie.

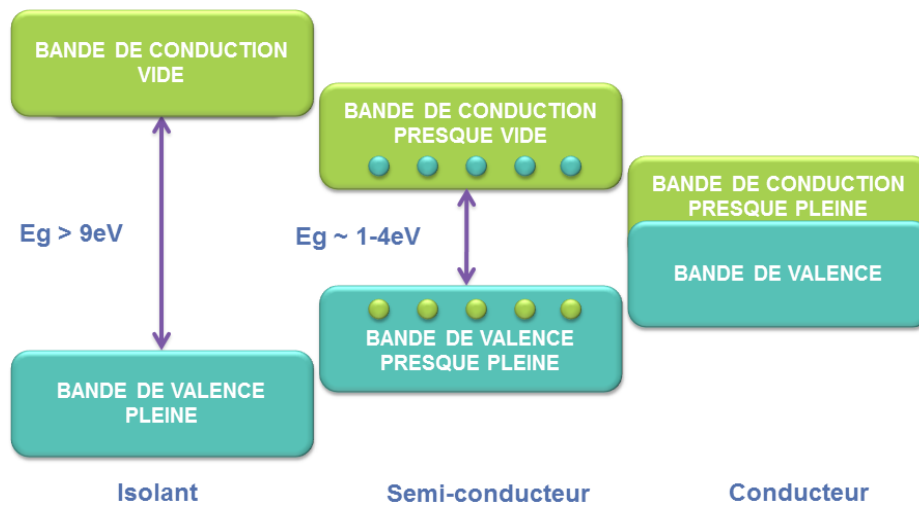


Figure 1. Représentation schématique des bandes d'énergie pour les différents types de matériaux.

Ainsi dans un matériau caractérisé par une énergie de gap supérieure à 9 eV, les électrons de la bande de valence ne peuvent atteindre la bande de conduction. Les bandes d'énergie sont alors, respectivement, entièrement pleines ou entièrement vides et l'on parle de matériau isolant, aucune conductivité électrique ne pouvant être observée. L'énergie à fournir pour qu'un électron franchisse la bande interdite et soit propulsé de la bande de valence à la bande de conduction est en effet trop importante.

A contrario les matériaux dits conducteurs sont caractérisés par une interpénétration des bandes d'énergie. La bande de conduction est alors toujours partiellement pleine et il n'existe pas de bande interdite, ce qui rend la conduction beaucoup plus aisée.

Ce sont les semi-conducteurs qui vont plus spécifiquement nous intéresser car ils présentent une énergie de gap intermédiaire, comprise entre 1 et 4 eV, ce qui permet d'induire une conduction à façon. La bande de valence est alors presque pleine et la bande de conduction presque vide. Après excitation, un électron peut acquérir une énergie suffisante pour passer de la bande de valence à la bande de conduction. Un trou est alors généré dans la bande de valence. La paire électron-trou créée est nommée l'exciton et est caractérisée par le rayon de Bohr (r_B) de l'exciton, fonction du matériau (Tableau 1, Chandezon *et al.* 2004, Landolt *et al.* 1982) et correspondant à la distance entre les deux porteurs de charge de la quasi-particule. Les deux porteurs de charge ne pouvant se déplacer indépendamment l'un de l'autre, du fait de l'interaction coulombienne, sont toujours associés en un exciton.

Tableau 1. Valeurs du rayon de Bohr, r_B , et de l'énergie de gap, E_g , du solide massif, de quelques semi-conducteurs de type II-VI classiquement utilisés.

Matériau	r_B (nm)	E_g du solide massif (eV)
CdS	3,0	2,52
CdSe	5,3	1,74
CdTe	4,8	1,45
ZnO	2,4	3,30
ZnS	3,6	3,60
ZnSe	2,5	2,70

Les matériaux massifs présentent toujours des diamètres supérieurs à ce rayon de Bohr. Par contre, dans le cas plus spécifique des nanomatériaux, le diamètre des particules peut être inférieur. Les déplacements des porteurs de charge sont alors limités et une situation dite de confinement quantique est observée (Figure 2).

Lorsque ces déplacements sont limités selon une ou deux dimensions, on parle respectivement de puits ou de fils quantiques. Dans le cas d'un confinement dans les trois dimensions, on obtient des boîtes quantiques, ou Quantum Dots (QDs) (Bawendi *et al.* 1990).

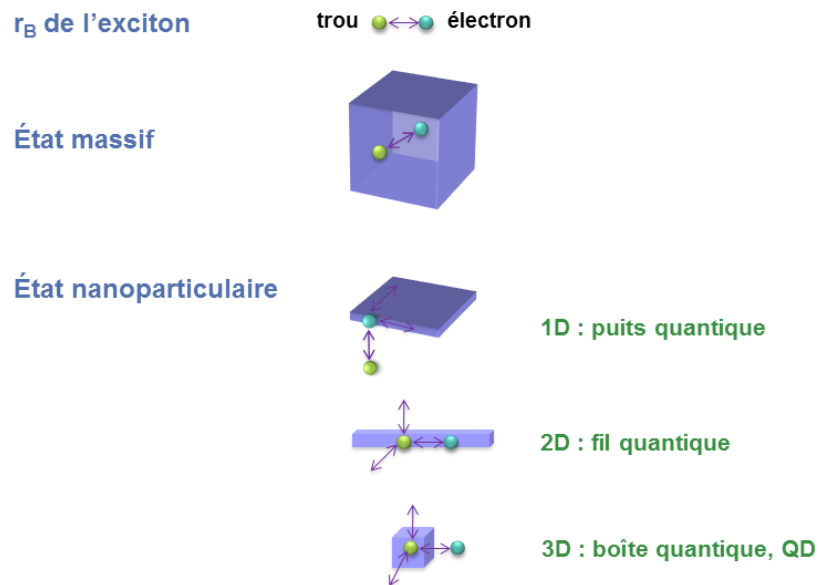


Figure 2. Représentation schématique des possibilités de confinement dans un semi-conducteur.

I.1.2. Structure générale des QDs

Les QDs sont des nanocristaux sphériques fluorescents de semi-conducteurs ou de métaux. Le nombre d'atomes par nanoparticule peut varier de quelques centaines à des dizaines de milliers d'atomes arrangés selon un réseau cristallin et le pourcentage d'atomes de surface évolue avec la taille des nanoparticules (Tableau 2, Affset 2006).

Tableau 2. Évolution du pourcentage d'atomes de surface en fonction du nombre d'atomes constituant la nanoparticule.

Nombre total d'atomes	Atomes de surface (%)
13	92
55	76
147	63
309	52
561	45
1415	35

Au niveau de la structure, les QDs sont constitués d'un noyau inorganique de semi-conducteur, appelé cœur photoactif, sur lequel sont ancrés des molécules organiques, les ligands de surface dont la fonction est de stabiliser les nanoparticules et d'empêcher leur agrégation. Dans le cas des QDs de type cœur/coquille, le cœur photo-actif est recouvert d'une ou plusieurs coquilles de matériaux semi-conducteurs visant à le protéger et à améliorer les propriétés photophysiques (Figure 3).

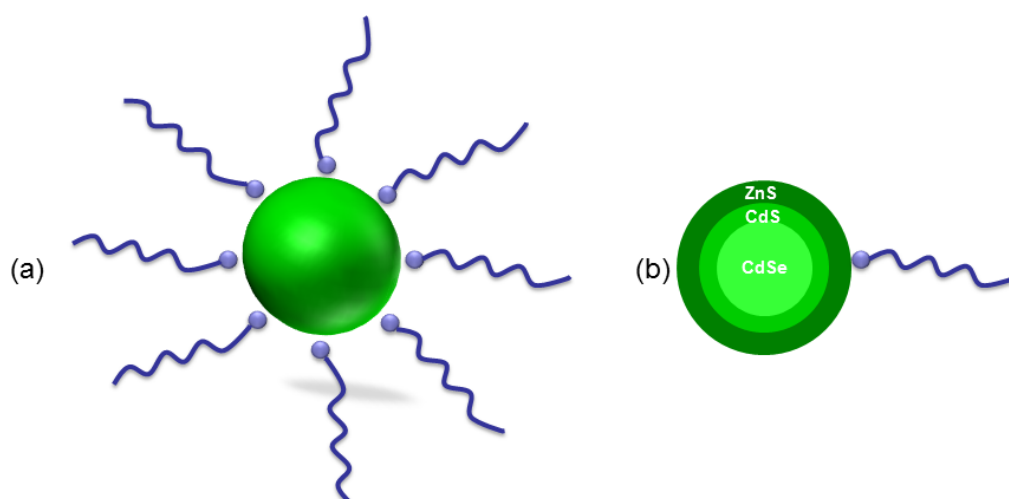


Figure 3. Représentation schématique d'un QD cœur/coquille stabilisé par un ligand hydrophobe comme l'oleylamine : CdSe/CdS/ZnS@oleylamine; (a) vue 3D, (b) coupe.

I.1.3. Structure électronique des semi-conducteurs

Dans le modèle quantique des atomes, les électrons sont délocalisés. Les orbitales atomiques, définies par des fonctions d'onde, correspondent à un volume, limité par une surface d'équiprobabilité, et décrivent les zones de l'espace où les électrons ont une forte probabilité de se trouver. Lorsque deux atomes interagissent entre eux, une combinaison linéaire de ces orbitales atomiques, par mise en commun des électrons de valence de chaque atome, donne naissance aux orbitales moléculaires, liantes et antiliantes. On appelle cela le recouvrement atomique (Yu *et al.* 2005).

Dans le cas simple de la molécule d'hydrogène H_2 , deux orbitales moléculaires sont, par exemple, obtenues par combinaison de deux orbitales $1s$ provenant l'une et l'autre d'un des deux atomes d'hydrogène. Deux fonctions d'onde correspondantes sont obtenues, une fonction symétrique Ψ^+ et une fonction antisymétrique Ψ^- . L'orbitale « Ψ^+ » est dite liante et correspond à une forte probabilité de présence des électrons de liaison dans l'espace défini par la fonction d'onde associée. *A contrario* l'orbitale « Ψ^- », dite antiliante, correspond à une faible probabilité de présence des électrons.

À l'échelle des cristaux, une multitude d'atomes vont interagir entre eux et l'interaction des orbitales moléculaires, donnera alors lieu aux bandes d'énergies, la bande de valence et la bande de covalence, séparées par la bande interdite (Figure 4).

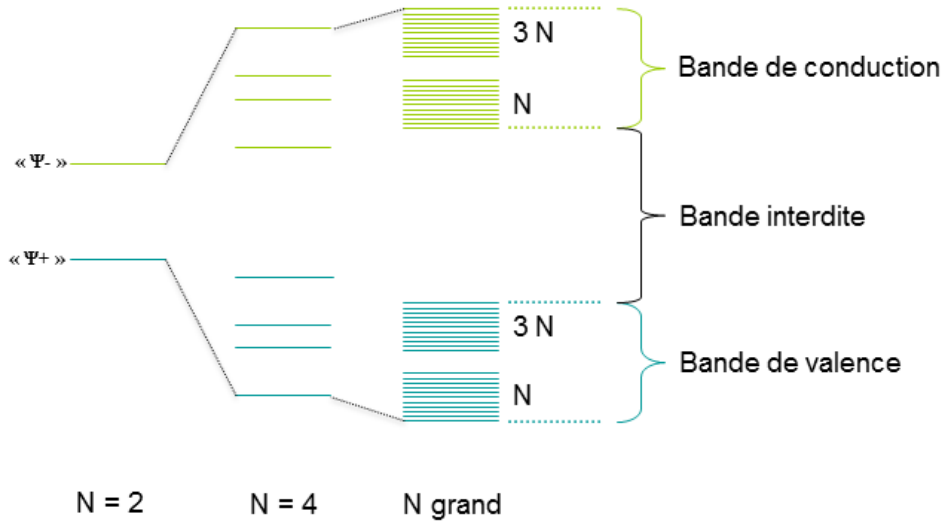


Figure 4. Couplage des orbitales ns et np dans le cas de N atomes : formation des bandes d'énergie.

Cette structure de bande est définie par un ensemble de courbes, les fonctions de Bloch $\Psi_n(\vec{k})$ (Équation 1), produits d'une onde plane, $e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}}$ par une fonction représentant la périodicité du réseau cristallin, $u_{n\vec{k}}(\vec{r})$, où n est un indice discret ($n = 1, 2, 3 \dots$), $\vec{r}$ la variable de coordonnées dans l'espace direct et $\vec{k}$ le vecteur d'onde, défini dans l'espace réciproque, indiquant la propagation des électrons. Ces fonctions définissent la dispersion des électrons dans le cristal (Kittel 1983, Mathieu 1998, Fishman 2010).

$$\psi_n(\vec{k}) = e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} \cdot u_{n\vec{k}}(\vec{r})$$

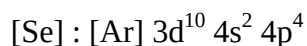
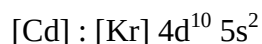
Équation 1. Fonction de Bloch.

À ces fonctions peuvent être associées des énergies propres $E_n(\vec{k})$ dont la représentation dans l'espace réciproque donne la structure de bandes.

I.1.3.1. Cas du sélénure de cadmium, CdSe

Le semi-conducteur sélénure de cadmium, CdSe, du groupe II-VI, est issu de l'interaction d'atomes de cadmium, élément de la colonne II de la classification périodique

des éléments de Mendeleïev, et d'atomes de sélénium, chalcogène de la colonne VI. Les configurations électroniques des deux atomes sont respectivement :



Le cadmium présente donc deux électrons de valence situés sur une orbitale s et le sélénium six électrons de valence répartis sur des orbitales s et p. La construction du diagramme d'orbitales moléculaires (Figure 5) de CdSe peut être schématisée de la manière suivante :

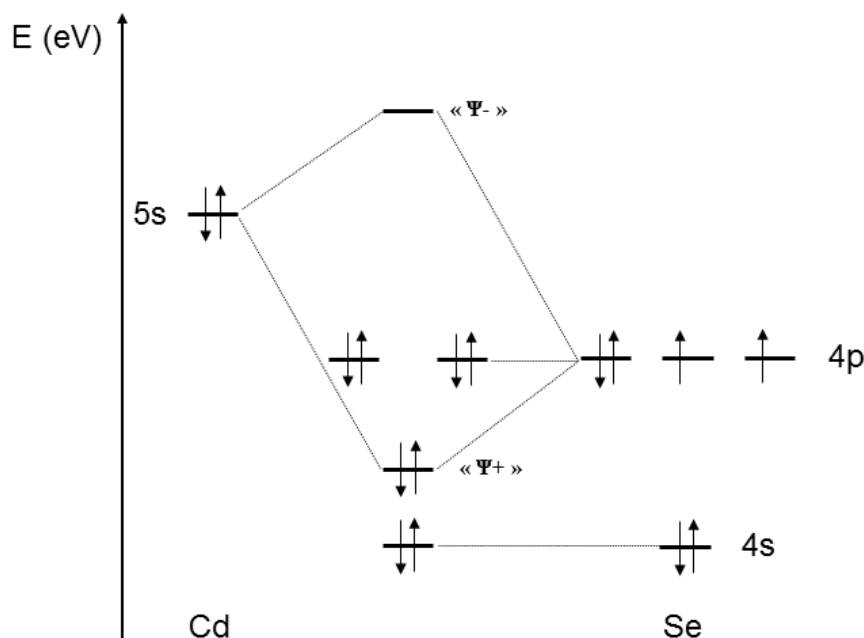


Figure 5. Diagramme d'orbitales moléculaires combinant le cadmium et le sélénium ne tenant compte que des niveaux s et p.

On constate clairement que l'interaction des orbitales moléculaires dans un cristal de CdSe conduit à une bande de valence constituée des électrons des couches 4p des atomes de sélénium, auxquels viennent s'ajouter les électrons des couches 5s des atomes de cadmium. La bande de conduction est, quant à elle, constituée des couches 5s des atomes de cadmium vidées de leurs électrons. La bande interdite est caractérisée par une énergie E_g de 1,74 eV (valeur pour CdSe massif, Tableau 1, § I.1.1.).

Pour décrire plus précisément la structure de bandes de CdSe (Figure 6, Bastard 1988, Norris *et al.* 1996), et notamment au voisinage du gap, où $\vec{k} = 0$, il convient maintenant d'introduire L , nombre quantique associé au moment cinétique orbitaire, lié aux sous-couches électroniques, et S , moment cinétique total de spin, lié à l'orientation possible des électrons. Ces deux termes vont nous permettre d'observer la dégénérescence des bandes.

La bande de conduction étant constituée de couches s , sa dégénérescence orbitale, égale à $2L + 1$ avec $L = 0$, est de un. Sa dégénérescence de spin est par contre de $2S + 1$, avec $S = 1/2$, soit deux. Le spin de l'électron qui pourra être propulsé dans la bande de conduction peut en effet être parallèle ou antiparallèle. La bande de conduction est donc dégénérée deux fois, la dégénérescence totale correspondant à la dégénérescence orbitale multipliée par la dégénérescence de spin. La bande de valence, constituée de couches p , est dégénérée six fois. En effet, L étant égal à un, la dégénérescence orbitaire est trois. La dégénérescence de spin étant toujours de deux, la dégénérescence totale est de six. La description de la bande de valence en termes de courbes de dispersion est donc dès lors plus compliquée.

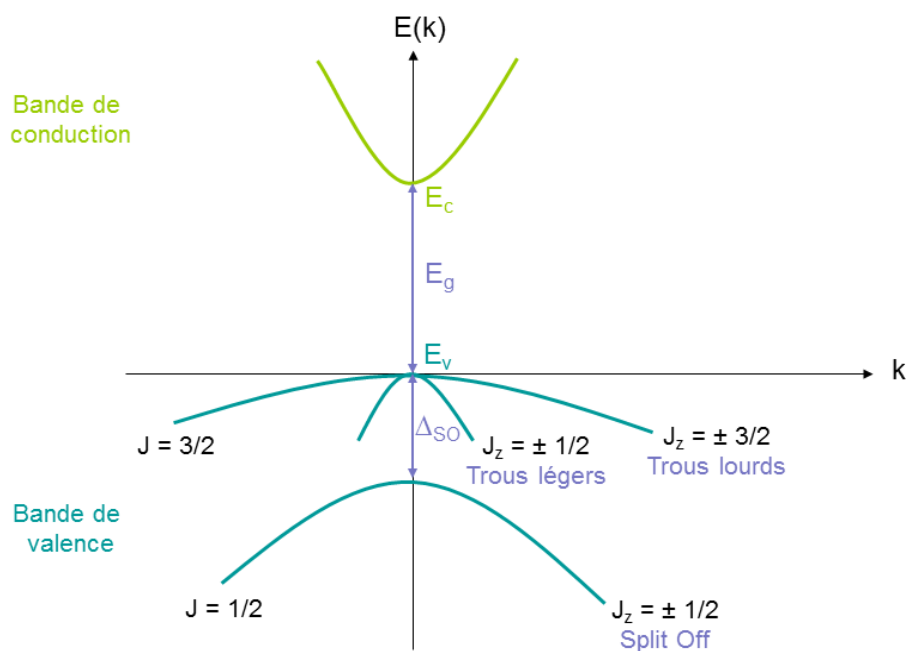


Figure 6. Représentation schématique de la structure de bande de CdSe massif, ne tenant compte que des niveaux s et p .

Du fait de l'interaction spin-orbite, une partie de la dégénérescence des bandes est levée. Si la bande de conduction peut alors être décrite par une unique courbe de dispersion, considérée comme parfaitement parabolique, la bande de valence est, quant à elle, décrite à l'aide de trois courbes de dispersion bien distinctes.

La description de ces courbes fait ensuite intervenir le nombre quantique J , moment cinétique angulaire qui correspond à la somme des moments cinétiques orbitaire L et de spin s . L étant égal à 1 et s pouvant prendre les valeurs $1/2$ et $-1/2$, la bande de valence du semi-conducteur est constituée de deux courbes caractérisées par $J = 3/2$ ou $J = 1/2$. En $k = 0$, ces deux courbes sont séparées par la constante de couplage spin-orbite Δ_{SO} qui est ici de 420 meV et la courbe correspondant aux états $J = 1/2$ est appelée la bande de Split Off, SO.

La courbe correspondant aux états $J = 3/2$ est, par contre, dégénérée en $k = 0$ ce qui provoque un dédoublement de la courbe pour $\vec{k} \neq 0$. Ces deux courbes s'expliquent grâce à la projection du moment angulaire total J sur une direction spécifique du cristal. On a alors $J_z = \pm 1/2$ pour la courbe de plus forte courbure et $J = \pm 3/2$ pour celle de plus faible courbure. Elles sont respectivement décrites comme les bandes de trous légers (« light holes », LH) et de trous lourds (« heavy holes », HH) (Dib 1999, Aldeek 2010).

Les porteurs de charge introduits précédemment sont respectivement situés aux voisinages du minimum E_c de la bande de conduction et au maximum E_v de la bande de valence.

La structure de bande au voisinage du gap ainsi décrite, les énergies, $E(\vec{k})$, des quatre courbes de dispersion, approximées paraboliques, peuvent être exprimées par l'équation 2 :

$$E(\vec{k}) = E_0 + \frac{\hbar^2 \vec{k}^2}{2m^*}$$

Équation 2. Énergie des courbes de dispersion.

Avec $\hbar = \frac{h}{2\pi}$, h étant la constante de Planck, $\vec{k}$ la valeur du vecteur d'onde, E_0 l'extremum de la bande et m^* la masse effective du porteur de charge.

En prenant l'origine au sommet E_v , les énergies pour les quatre courbes s'expriment donc par les équations 3 à 6 :

$$E_{BC} = E_c + \frac{\hbar^2 \vec{k}^2}{2m_e}$$

Équation 3. Énergie de la courbe de dispersion de la bande de conduction.

$$E_{HH} = -\frac{\hbar^2 \vec{k}^2}{2m_{HH}}$$

Équation 4. Énergie de la courbe de dispersion $J = 3/2$, $J_z = \pm 3/2$.

$$E_{LH} = -\frac{\hbar^2 \vec{k}^2}{2m_{LH}}$$

Équation 5. Énergie de la courbe de dispersion $J = 3/2$, $J_z = \pm 1/2$.

$$E_{SO} = -\Delta_{SO} - \frac{\hbar^2 \vec{k}^2}{2m_{SO}}$$

Équation 6. Énergie de la courbe de dispersion $J = 1/2$.

où m_e , m_{HH} , m_{LH} et m_{SO} sont respectivement les masses effectives des électrons de conduction, des trous lourds, des trous légers et des trous de la bande de Split Off.

I.1.3.2. Cas des QDs : effet du confinement quantique

Lorsqu'un QD est excité, l'exciton créé subit les contraintes dimensionnelles imposées par le confinement. L'électron et le trou formé acceptent alors une énergie cinétique E_c plus élevée, ce qui conduit à une augmentation du band gap et donc à une énergie de gap E_g plus importante. Plus le diamètre des QDs est petit, plus l'exciton aura d'énergie cinétique, et plus le band gap, assimilable à la différence d'énergie entre le dernier niveau occupé et le premier niveau vide, sera grand.

Parallèlement à l'évolution de l'énergie cinétique, les niveaux énergétiques possibles sont confinés en valeurs discrètes. Lorsque la taille d'un matériau est diminuée à l'échelle nanométrique, les propriétés du matériau deviennent intermédiaires entre celles de l'atome isolé, aux niveaux d'énergie discrets, et celles du solide massif, où les niveaux d'énergie se recouvrent en bandes d'énergie. Les QDs sont assimilables à un état intermédiaire entre le cas du cristal décrit ci-avant et celui de l'atome isolé. Une discrétisation des niveaux d'énergie liée à la diminution de la taille des nanoparticules est donc observée (Figure 7, Brokmann *et al.* 2005).

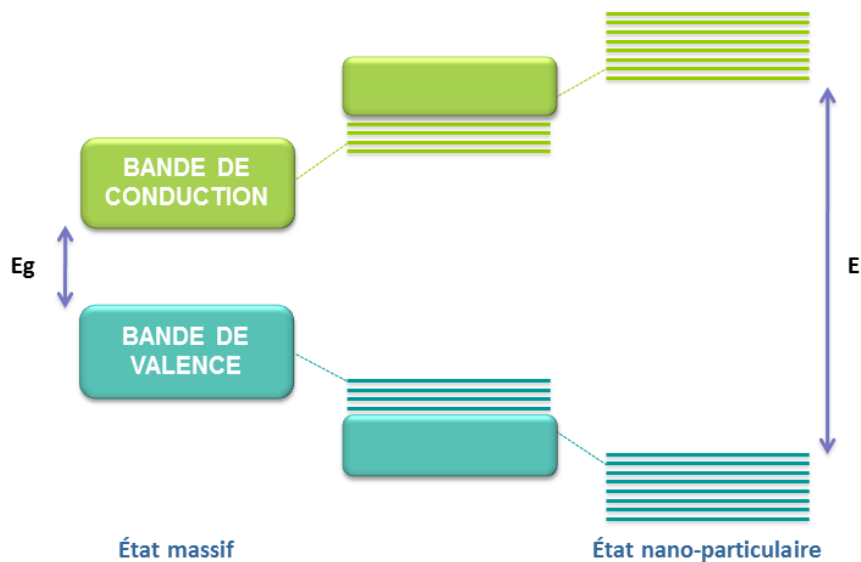


Figure 7. Représentation schématique du passage de l'état massif à l'état nanoparticulaire.

La relation entre le diamètre des QDs formés, supposés sphériques, et l'énergie E_g du band gap a été développée par Louis Brus et est donnée par l'équation 7 (Brus 1986) :

$$E_g = E_g^{solide} + \frac{\hbar^2 \pi^2}{2r^2} \left(\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) - \frac{1.786e^2}{\epsilon_r \epsilon_0 r}$$

Équation 7. Équation de Brus permettant le calcul de l'énergie de gap E_g de QDs supposés sphériques.

où E_g massif correspond au gap du solide massif, r au rayon de la nanoparticule, m_e^* et m_h^* aux masses effectives de l'électron et du trou, $\hbar$ à la constante de Planck réduite et ϵ_r et ϵ_0 aux permittivités électriques statiques du matériau et du vide. Le second terme de l'équation permet de tenir compte du « confinement quantique », alors que le troisième terme est relatif à l'attraction coulombienne entre l'électron et le trou. Si r tend de celui des nanoparticules à celui du matériau massif, E_g tendra alors vers E_g^{solide} .

Il est ensuite possible d'exprimer le rayon de Bohr de l'exciton à partir du modèle de Bohr de l'atome d'hydrogène et en se servant des paramètres associés au semi-conducteur utilisé (Équation 8) :

$$r_B = 0,053 \cdot \epsilon_r \cdot m_e \left(\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right)$$

Équation 8. Expression du rayon de Bohr de l'exciton.

L'expression de l'énergie de gap en fonction du rayon de Bohr permet alors d'obtenir l'équation 9 :

$$E_g = E_g^{solide} + \frac{2,6}{\epsilon_r \cdot r} \left(2,74 \frac{r_B}{r} - 1 \right)$$

Équation 9. Équation permettant le calcul de l'énergie de gap E_g et utilisant le rayon de Bohr de l'exciton.

I.1.4. Propriétés photophysiques

Comme expliqué précédemment, lorsque l'apport d'énergie est suffisant, un électron peut être promu de son état fondamental S_0 à un état excité, ce qui conduit à la formation de l'exciton (Viriot 2003). L'électron ne sera pas forcément propulsé au niveau S_1 le plus proche, mais peut, si l'énergie fournie est suffisante, être propulsé à tout niveau S_n excité. Le retour de l'électron à son état fondamental par recombinaison radiative, précédée d'éventuelles

reconversions énergétiques internes, permettra ensuite l'émission de fluorescence. L'énergie rétrocedée pourra alors être moins importante que l'énergie excitatrice du fait des possibles reconversions énergétiques internes (Figure 8).

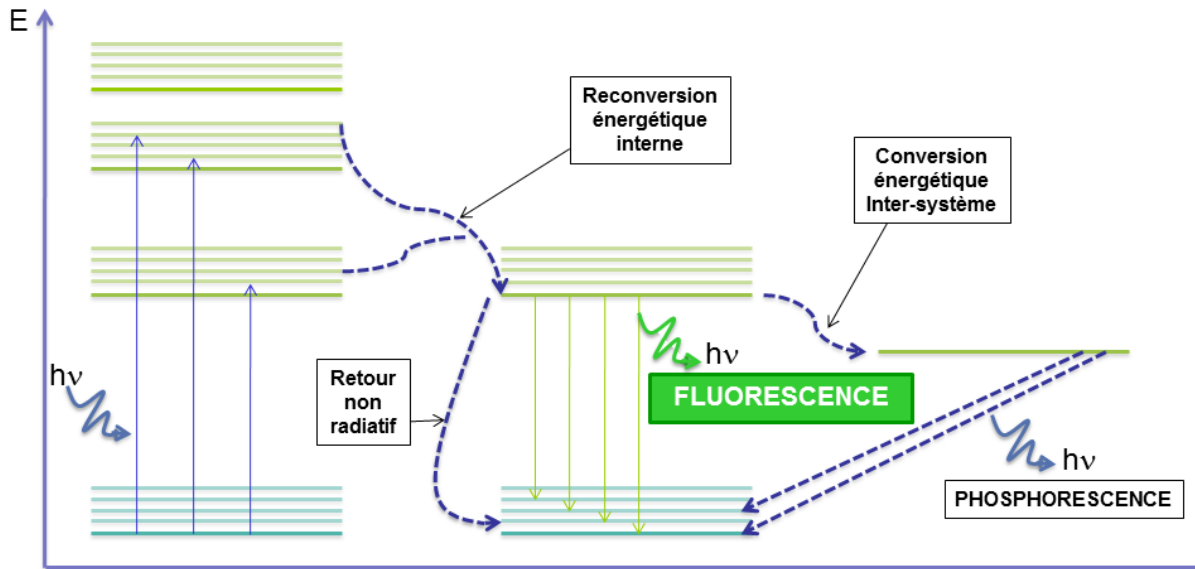


Figure 8. Diagramme simplifié de Perrin-Jablonski représentant les différentes transitions électroniques possibles.

I.1.4.1. Propriétés de fluorescence taille-dépendante

Dans le cas de semi-conducteurs massifs, la recombinaison électron-trou radiative donnera lieu à l'émission d'un photon d'énergie fixe à une longueur d'émission de fluorescence déterminée. En effet, considérant l'énergie E transportée par un photon (Équation 10) et c la célérité correspondant à son déplacement dans le vide (Équation 11) :

$$E = h\nu$$

Équation 10. Expression de l'énergie transportée par un photon.

$$c = \lambda\nu$$

Équation 11. Expression de la célérité : déplacement d'un photon dans le vide.

il est possible d'exprimer la longueur d'onde d'émission de fluorescence λ , en fonction de E assimilable à E_g , l'énergie rétrocedée lors de l'émission du photon (Équation 12). h correspond à la constante de Planck, et ν à la fréquence de l'onde lumineuse.

$$\lambda = \frac{ch}{E}$$

Équation 12. Expression de la longueur d'onde d'émission de fluorescence.

Une longueur d'onde théorique d'émission de fluorescence de 688 nm pourra donc être associée aux matériaux massifs de CdSe, pour lesquels l'énergie de gap est de 1,74 eV.

L'équation de Brus, introduite précédemment, permet ensuite de montrer que la longueur d'onde d'émission de fluorescence est taille-dépendante, l'énergie rétrocedée étant inversement proportionnelle au rayon des particules au carré. Ainsi plus le diamètre des QDs diminue, plus l'énergie rétrocedée lors de l'émission de fluorescence augmente et plus la longueur d'onde d'émission de fluorescence diminue. Une diminution du diamètre des QDs entraîne donc une évolution des propriétés de fluorescence du rouge vers le bleu (Figure 9).

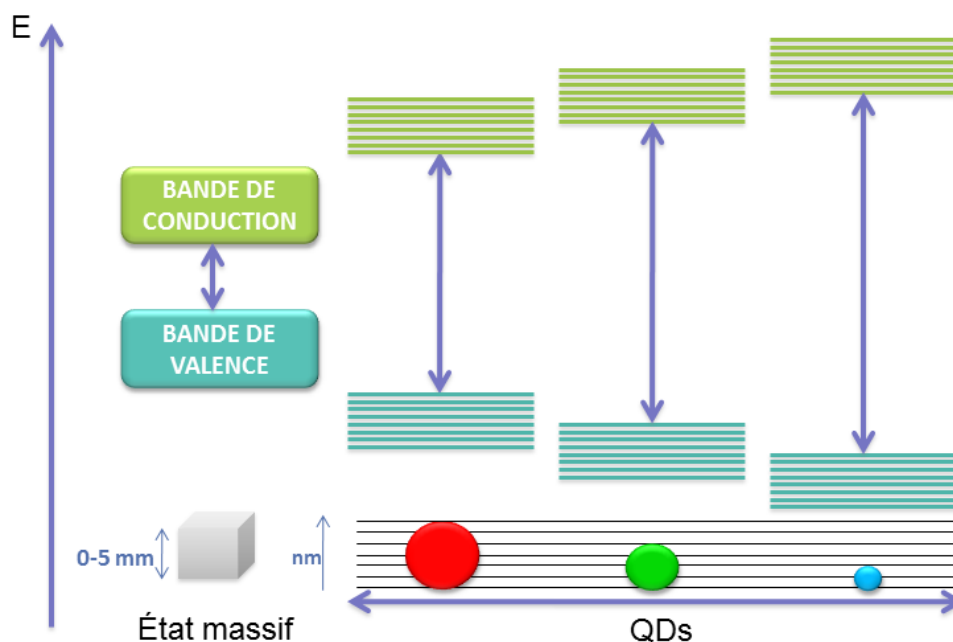


Figure 9. Évolution des propriétés de fluorescence pour des tailles décroissantes de QDs.

I.1.4.2. Spectres associés

I.1.4.2.1. Spectres d'absorption

Lors de l'excitation d'un QD, si l'énergie excitatrice est supérieure ou égale à l'énergie de gap, un photon peut être absorbé et un spectre d'absorption peut alors être enregistré.

Dans le cas des QDs CdSe, les spectres d'absorption peuvent couvrir toute la gamme du visible selon la taille des nanocristaux. En effet, en raison du phénomène de confinement quantique, une diminution du diamètre des nanocristaux entraîne un déplacement hypsochrome, c'est-à-dire vers des énergies plus élevées et donc vers des longueurs d'onde plus faibles au seuil d'absorption.

Le seuil d'absorption, lié au gap, est le premier maximum d'absorption et est aussi appelé premier pic excitonique, car représentatif de la transition optique correspondant à la formation du premier exciton (Figure 10). Il est visualisable sur le spectre par un épaulement bien défini auquel correspond une longueur d'onde λ_{max} . La distribution en taille des nanoparticules a une influence sur la forme et la largeur de ce pic. Une forte polydispersité des échantillons étudiés se traduisant par la présence de « plusieurs » λ_{max} , l'épaulement sera moins bien marqué car élargi. Un continuum d'absorption est ensuite observable pour les longueurs d'onde inférieures à celle de ce premier pic excitonique. D'autres bandes d'absorption, dues par exemple aux ligands de surface, peuvent aussi apparaître dans la région des hautes énergies.

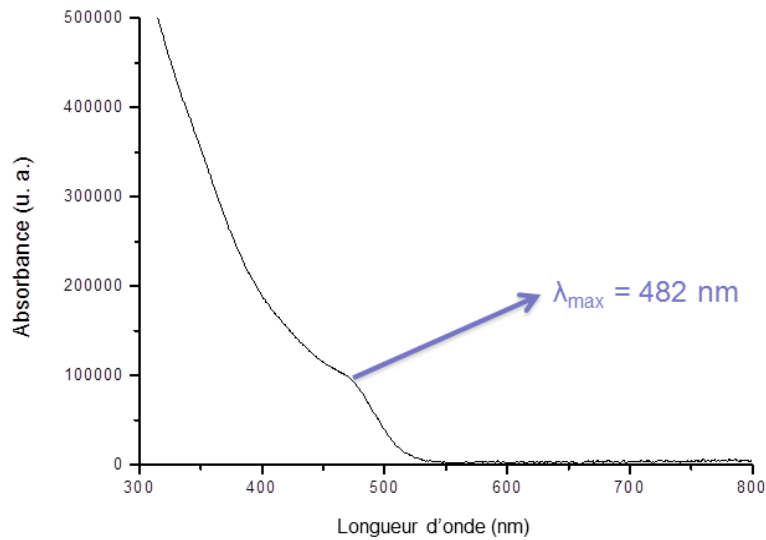


Figure 10. Spectre d'absorption d'une suspension colloïdale de QDs CdSe@MPA (§ III.1.).

La longueur d'onde $\lambda_{\max}$ obtenue lors de l'enregistrement du spectre d'absorption d'une suspension colloïdale de nanoparticules permet le calcul du diamètre des QDs synthétisés. En effet, d'après la littérature (Yu *et al.* 2003), la courbe représentant $\lambda_{\max}$, en nm, en fonction de la taille de nanoparticules de CdSe, D, en nm, peut être décrite (Équation 13) par la fonction polynomiale suivante :

$$D = (1,6122 \cdot 10^{-9})\lambda_{\max}^4 - (2,6575 \cdot 10^{-6})\lambda_{\max}^3 + (1,6242 \cdot 10^{-3})\lambda_{\max}^2 - (0,4277)\lambda_{\max} + 41,57$$

Équation 13. Équation permettant le calcul du diamètre de nanoparticules de CdSe à partir de $\lambda_{\max}$.

Cette fonction provenant de l'ajustement d'une courbe construite à partir de données expérimentales, sa validité n'a de sens que pour la gamme de diamètres étudiés. Le domaine de validité de cette fonction correspond ici à des QDs CdSe de 1 à 9 nm.

Les auteurs ont ensuite montré que le coefficient d'extinction molaire, ϵ , des suspensions au seuil d'absorption est fortement dépendant de la taille des nanocristaux.

L'ajustement de la courbe décrivant la taille des nanoparticules en fonction de ε , en $\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, sur une gamme allant de 1 à 7 nm, donne l'équation 14 :

$$\varepsilon = 5857 D^{2.65}$$

Équation 14. Équation permettant le calcul du coefficient d'extinction molaire au seuil d'absorption.

De ce paramètre ε , il est ensuite possible d'obtenir la concentration en nanoparticules d'une suspension colloïdale, donnée essentielle pour leur étude. Le calcul se fait en appliquant simplement la loi de Lambert-Beer, avec A l'absorbance au seuil d'absorption, C la concentration molaire en mol/L et l la longueur du chemin optique parcouru lors de la mesure, en cm (Équation 15, Lambert 1760, Beer 1852).

$$C = \frac{A_{\lambda_{max}}}{\varepsilon l}$$

Équation 15. Équation permettant le calcul de la concentration en nanoparticules.

Yu *et al.* (2003) ont également montré que la nature des ligands de surface, l'indice de réfraction du solvant utilisé, le rendement quantique de fluorescence des nanoparticules, les méthodes de synthèse utilisées ainsi que la température à laquelle le spectre d'absorption est enregistré, n'influencent pas notablement le coefficient d'extinction molaire et donc le calcul de la concentration en nanoparticules. La concentration calculée ne tient compte que du cœur inorganique et en aucun cas des éventuels résidus de synthèse, de type complexes Cd^{2+} -ligand, qui peuvent être chimisorbés à la surface du cœur inorganique. La quantité de cadmium réellement présente dans une suspension colloïdale de QDs peut dès lors être sous-estimée.

I.1.4.2.2. Spectres d'émission de fluorescence

Après l'absorption du photon, la formation de l'exciton a lieu. Lors du retour de l'électron à son état fondamental, un photon est émis et de la fluorescence est alors générée par un phénomène dit de recombinaison radiative, correspondant au réappariement de l'électron et du trou. Le spectre de fluorescence associé présente une raie fine et symétrique dont la longueur d'onde au maximum d'émission est fonction de la taille des nanoparticules.

En théorie, l'énergie émise lors de l'émission de fluorescence est égale à l'énergie de gap E_g . Cependant, on peut observer un décalage du maximum d'émission de fluorescence de quelques nanomètres vers les hautes longueurs d'onde, par rapport au seuil d'absorption relevé sur les spectres d'absorption (Figure 11). Cet effet bathochrome, dû à la structure particulière des niveaux énergétiques des QDs, correspond au décalage de Stokes (Gispert 2008, Camassel *et al.* 1991, Yu *et al.* 2003). D'abord attribué au piégeage des excitons par des défauts, de surface principalement, mais aussi de volume, il a ensuite été montré que le décalage de Stokes trouve son origine dans l'explication des transitions fondamentales de l'électron. Le premier état excité atteint par l'électron est subdivisé en cinq sous-niveaux, correspondant aux différents états vibrationnels. L'électron atteint d'abord le cinquième sous-niveau du premier état excité, appelé « état brillant », puis subit une relaxation non radiative vers le troisième état vibrationnel, correspondant à « l'état noir », état fondamental le moins brillant, avant de retomber à l'état fondamental ce qui permet l'émission de fluorescence. La relaxation non radiative nécessitant de l'énergie fait alors que l'énergie de l'émission de fluorescence est moins importante que celle de l'absorbance du premier exciton. Cette perte d'énergie par relaxation non radiative explique le décalage bathochrome de la longueur d'onde d'émission de fluorescence, λ augmentant lorsque l'énergie rétrocedée lors de l'émission de fluorescence diminue.

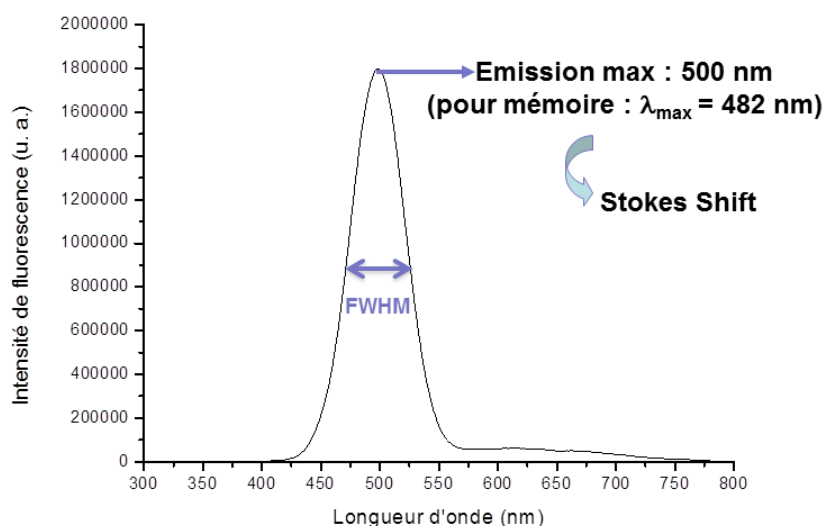


Figure 11. Spectre d'émission de fluorescence d'une suspension colloïdale de QDs CdSe@MPA (§ III.1.).

La finesse de la raie du spectre d'émission de fluorescence est caractérisée par la largeur à mi-hauteur, abrégée FWHM, pour « full-width at half-maximum ». Cette valeur est fortement influencée par la polydispersité de l'échantillon étudié. Typiquement, un échantillon ayant une faible polydispersité présentera une FWHM de l'ordre de 20 à 30 nm, alors qu'un échantillon fortement polydispersé présentera une FWHM d'environ 50 à 60 nm. L'analyse de la largeur à mi-hauteur n'a, par contre, que peu d'intérêt si l'émission de fluorescence est due aux défauts et non à la recombinaison radiative de l'exciton.

En effet, des défauts, de surface principalement (les atomes de surface subissant des contraintes plus fortes que les atomes plus centraux) mais aussi de volume, peuvent apparaître et les propriétés de fluorescence ne répondent alors plus aux règles décrites précédemment. Comme tout cristal, les nanocristaux sont imparfaits et présentent certaines irrégularités dans leur réseau, appelées défauts cristallins. Ces défauts peuvent être des lacunes, des substitutions ou bien correspondre à un atome dit interstitiel. Il y a alors, respectivement, un nœud inoccupé dans la maille cristalline, un atome ayant pris la place d'un autre, ou un atome excédentaire n'occupant pas la position d'un nœud classique de la maille. Les différents types de défauts peuvent coexister. La composition chimique des nanocristaux peut ne pas être

modifiée par la présence de ces défauts ponctuels, tout comme elle peut l'être s'il y a substitution par un atome étranger au réseau. La modification de la composition chimique des nanocristaux peut alors être accidentelle, du fait d'impuretés, ou voulue, l'ajout de quelques pourcents d'un autre élément pouvant apporter des modifications utiles aux propriétés des nanocristaux. On parle alors de dopage. Dans le cas d'un nombre de défauts élevé, notamment du fait d'une mauvaise passivation de surface, les spectres de fluorescence peuvent être fortement impactés (Figure 12).

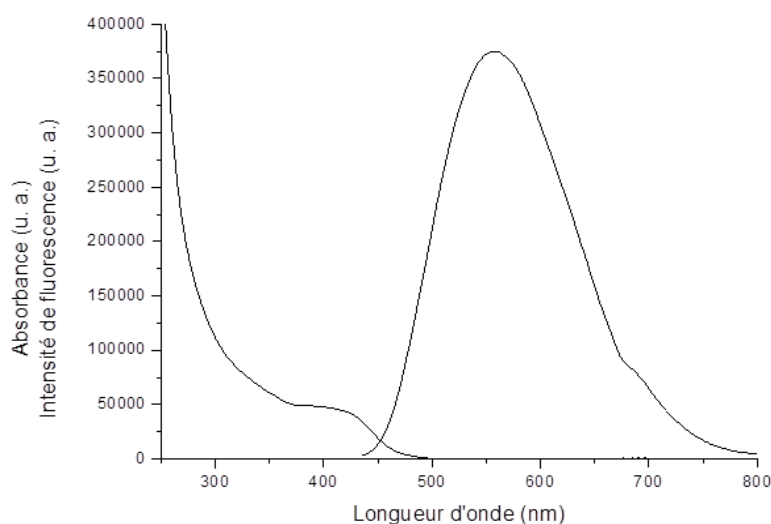


Figure 12. Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de QDs CdSe@GSH caractéristiques d'une émission de défauts (§ III.1.1.).

Dans le cas des QDs issus de semi-conducteurs du groupe II-VI, comme les QDs CdSe, les défauts correspondent principalement à des sites vacants, anioniques ou cationiques, à la surface des nanoparticules. Les spectres de fluorescence liés à une émission de défauts sont beaucoup plus larges, la FWHM pouvant atteindre 180 nm et ne présentent pas de lien réel avec la taille des nanocristaux. Ces QDs présentent généralement des rendements quantiques de fluorescence plus modestes que les QDs « sans défauts ». En effet, la présence de ces défauts entraîne l'apparition de niveaux énergétiques intermédiaires au niveau le plus bas

inoccupé et au niveau le plus haut occupé. L'énergie rétrocedée est alors moindre, ce qui a pour effet d'augmenter la longueur d'onde d'émission de fluorescence (Figure 13).

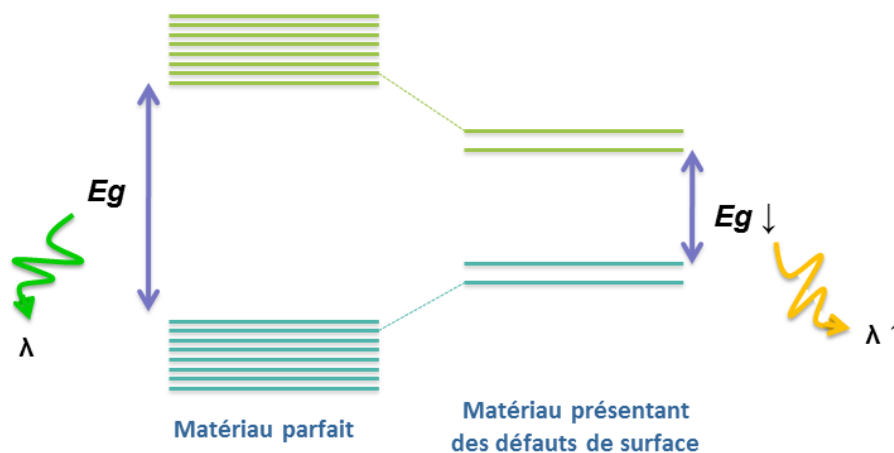


Figure 13. Apparition de niveaux énergétiques intermédiaires dans le cas de matériau présentant des défauts de surface.

Il est aussi possible d'observer des spectres intermédiaires présentant une émission de fluorescence excitonique, accompagnée de bandes de fluorescence de faibles énergies situées à des longueurs d'onde plus élevées.

1.1.4.3. Rendement quantique de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence de l'échantillon, $RQ_{\text{éch}}$, permet de quantifier l'émission de fluorescence et correspond au rapport du nombre de photons émis par le QD lors de l'émission de fluorescence sur le nombre de photons absorbés. Plus les QDs présenteront de défauts de surface, plus le rendement quantique de fluorescence sera susceptible d'être faible. Les nombreux niveaux énergétiques intermédiaires, susceptibles de faire augmenter le nombre de désexcitations via des recombinaisons non radiatives, et comparables à un « piégeage » des électrons, sont responsables de cette baisse du rendement quantique. Ce RQ (Équation 16) est calculé à partir des spectres d'absorption et d'émission de l'échantillon et d'un fluorophore organique bien connu, en utilisant la formule suivante :

$$RQ_{éch} = RQ_{réf} \frac{A_{éch} F_{réf} n_{éch}^2}{A_{réf} F_{éch} n_{réf}^2}$$

Équation 16. Équation permettant le calcul du rendement quantique de fluorescence.

où $RQ_{réf}$ est le rendement quantique du fluorophore de référence, A , l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation, F , l'intégration spectrale du flux de photons collecté par le détecteur (Aire sous la courbe) et n , l'indice de réfraction du solvant utilisé pour la mesure.

Bien que le calcul semble simple, certaines précautions, résumées dans une publication de Grabolle *et al.* (2009), doivent être prises pour une bonne détermination du rendement quantique de fluorescence d'une suspension colloïdale. Les réglages des appareils de mesure, telles que l'ouverture des fentes ou la vitesse d'acquisition, doivent être les mêmes pour l'échantillon et la référence. Dans une optique comparative, ces réglages sont, autant que faire se peut, conservés d'un échantillon à un autre. Le standard de référence doit présenter une zone d'absorption commune avec le composé étudié pour que les deux échantillons puissent être excités à la même longueur d'onde, et autant que possible une zone d'émission de fluorescence commune à la zone d'émission de fluorescence de la suspension colloïdale étudiée. Il est préférable d'utiliser une longueur d'onde d'excitation où l'incertitude de mesure sur l'absorbance sera la plus faible possible, c'est-à-dire dans une région où l'absorbance évolue peu (exemple : premier pic excitonique ou observation d'un plateau). L'absorbance des solutions étudiées doit idéalement être comprise entre 0,1 et 0,2. Aux trop faibles concentrations, la courbe fluorescence = $f(\text{concentration})$ n'est pas linéaire, du fait, par exemple, dans le cas des QDs, de la désorption des ligands de surface entraînant la destruction des nanomatériaux. À trop fortes concentrations, une auto-inhibition de la fluorescence peut apparaître du fait de l'augmentation du nombre de collisions qui dissipent l'énergie reçue, de la formation d'agrégats non fluorescents ou bien encore de l'effet de filtre interne (effet de peau). Seule une faible partie de la lumière d'excitation atteint alors les fluorophores du fait

de l'inconstance de l'intensité de la lumière excitatrice au travers de la solution. L'intégration des spectres de fluorescence, dans le but d'obtenir les aires sous les courbes, doit être réalisée sur les spectres « corrigés » pour lesquels l'intensité de fluorescence mesurée tient compte de l'intensité de la source lumineuse et de l'efficacité du photodétecteur.

I.1.4.4. Intérêt des QDs par rapport aux fluorophores organiques

Les propriétés de fluorescence particulières des QDs font que ces nanocristaux présentent des avantages très intéressants par rapport aux sondes organiques fluorescentes classiques, telles que la fluorescéine, la rhodamine, ou bien encore les protéines fluorescentes comme la GFP (Green Fluorescent Protein). Leur intérêt majeur est d'être photophysiquement plus stables et donc plus résistants au photoblanchiment. Lorsqu'une molécule est excitée, elle peut soit émettre un photon, soit être engagée dans une réaction parallèle, mettant en jeu l'eau ou l'oxygène chimisorbés à sa surface, et générant notamment des Espèces Réactives de l'Oxygène (EROs). Cette réaction du fluorophore avec les radicaux libres issus de l'oxygène, de l'eau ou avec des molécules présentes dans le milieu, aboutit en règle générale à sa dégradation. C'est le photoblanchiment.

Un rendement quantique moindre a longtemps été la contrepartie à cette meilleure stabilité photophysique. Cependant, au vu des avancées effectuées ces dernières années, ceci n'est plus tout à fait vrai. En effet, même si certains fluorophores présentent des rendements quantiques très élevés, telle que la rhodamine 6G (95 % dans l'éthanol), il est aisé d'atteindre les valeurs de rendement quantique du Rose Bengale (11 % dans l'éthanol) ou même de la coumarine 53 (56 % dans l'éthanol) avec les QDs.

En termes d'absorption et d'émission, les QDs présentent l'avantage de pouvoir absorber un photon sur une large gamme spectrale, de l'ordre de 300 nm pour des QDs dont le seuil d'absorption est aux alentours de 550 nm, contre seulement 100 nm exploitables pour la

rhodamine 6G. De plus, la réémission du photon se fait sur une plage de longueurs d'onde relativement restreinte. Les QDs émettent la plupart du temps dans une seule couleur, la FWHM avoisinant rarement plus de 30 nm lorsque la polydispersité est bien contrôlée, contrairement aux fluorophores organiques. La rhodamine 6G, avec une FWHM d'environ 50 nm et une asymétrie de pic importante, émet légèrement dans le vert et le rouge et fortement dans le jaune et l'orange. Les QDs offriront, par exemple, l'avantage de pouvoir construire des sondes à façon où l'ajustement des longueurs d'ondes d'émission autorisera l'utilisation simultanée de plusieurs sondes, sans recouvrement spectral (Smith *et al.* 2004, Kobayashi *et al.* 2007).

I.1.5. Structure cristalline

Rapidement évoquée dans la partie I.1.4.2.2. traitant des spectres d'émission de fluorescence, la structure cristalline d'un matériau correspond à l'arrangement périodique des atomes dans l'espace tridimensionnel. Un solide cristallin est défini par la répétition périodique, selon les trois dimensions de l'espace, d'un motif moléculaire appelé la maille cristalline. La périodicité de cette structure est représentée par le réseau cristallin dont les points particuliers le composant et représentant les atomes sont appelés nœuds du réseau. Un réseau peut être décrit à l'aide de six paramètres : 3 longueurs axiales a , b et c , et 3 angles inter-axiaux α , β et γ . Dans certains cas, les longueurs des arêtes a , b et c sont égales et une seule constante de réseau est alors utilisée pour la description du réseau tridimensionnel (Tableau 3, Chandezon *et al.* 2004, Landolt *et al.* 1982).

Tableau 3. Structures cristallines, et paramètres de maille associés, de quelques semi-conducteurs du groupe II-VI.

QDs de semi-conducteur de	Structure (Figure 14)	Paramètre de maille (Å)
CdS	Zinc blende	5,83
CdS	Wurtzite	a = 4,16 c = 6,75
CdSe	Zinc blende	6,08
CdSe	Wurtzite	a = 4,31 c = 7,02
CdTe	Zinc blende	6,48
ZnS	Zinc blende	5,42
ZnS	Wurtzite	a = 3,82 c = 6,26

Les semi-conducteurs du groupe II-VI, et plus particulièrement CdSe, ont la particularité de cristalliser dans les structures zinc blende (ZB) ou wurtzite (W). Ces deux structures sont respectivement définies comme une structure cubique, présentant un empilement de type ABCABC suivant la direction 111 (avec $a = b = c$), ou comme une structure hexagonale, présentant un empilement de type ABABAB suivant la direction 001 (avec $a = b \neq c$). Les deux mailles ne diffèrent donc l'une de l'autre que par une rotation de 60° d'un tétraèdre sur deux autour de la liaison entre l'élément de la colonne II et l'élément de la colonne VI (Figure 14, Yeh *et al.* 1992).

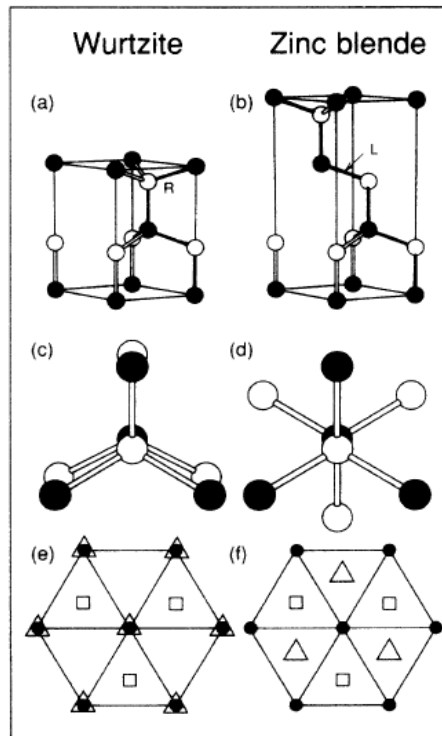


Figure 14. Structures cristallines Wurtzite et Zinc Blende. (a) et (b) : représentations classiques des mailles élémentaires ; (c) et (d) : conformations respectivement décalée et éclipsee ; (e) et (f) : empilement des couches sur le plan (111).

La connaissance de la structure cristalline des nanomatériaux synthétisés, bien que semblant de prime abord négligeable du fait des similitudes entre ces deux structures, est très importante puisqu'il a été montré qu'elle a une grande influence sur les propriétés optiques et électroniques des QDs. Ainsi des QDs CdSe cristallisant en structure zinc blende peuvent présenter des rendements quantiques de fluorescence jusqu'à 2,5 fois ceux de QDs cristallisant en structure wurtzite (Xia *et al.* 2010). Les facteurs influençant l'empilement préférentiel selon l'une ou l'autre des deux structures ont donc été étudiés de près. L'étude préliminaire du diagramme de phase de CdSe massif montre que la structure ZB est la plus stable à basse température. La phase W devient la phase la plus stable au-dessus de la température critique T_c de 95 ± 5 °C (Fedorov *et al.* 1991).

Lors de la synthèse de QDs, un facteur va avoir une forte influence sur la structure finale du nanocristal, la nature du ligand de surface. La synthèse organométallique historique

des QDs, à une température $T > T_c > 300\text{ °C}$, et utilisant l'oxyde de trioctylphosphine (TOPO) comme ligand, conduit classiquement à une structure majoritairement de type W (Nag *et al.* 2011). Au début de la phase de croissance, l'empilement se fait selon une structure ZB, puis une taille critique des nanoparticules est atteinte et une transition de la structure ZB à la structure W a alors lieu. Différents travaux ont cependant montré qu'il est possible d'obtenir des nanocristaux possédant une structure de type ZB, plus intéressante en termes de propriétés optiques, à haute température. L'ajout d'un acide phosphonique, tel que l'acide tétradécylphosphonique (TDPA) ou d'une amine primaire, comme l'octadécylamine (ODA), au TOPO permet en effet d'obtenir des nanocristaux présentant une structure ZB (Yu *et al.* 2003, Qu *et al.* 2002). Des nanoparticules de structure ZB ont également été obtenues en milieu aqueux par Rogach *et al.* (1999) en utilisant des ligands de type thioalcools ou thioacides.

I.1.6. QDs à structure cœur/coquille

Plusieurs raisons justifient l'ajout d'une ou plusieurs coquilles à la surface d'un cœur photoactif (Reiss *et al.* 2009) :

- L'amélioration des propriétés de fluorescence par gommage des défauts de surface résiduels ou obtention de l'émission excitonique par passivation d'une surface présentant de nombreux défauts de surface.
- La protection du cœur photoactif vis-à-vis du milieu environnant et notamment de la photo-oxydation.
- La possibilité d'obtenir des structures présentant une gamme d'émission de fluorescence élargie par rapport à celles des matériaux pris séparément.

I.1.6.1. Types de structure cœur/coquille

Les structures cœur/coquille peuvent être de trois types selon les positions énergétiques, des bandes de valence et de conduction des matériaux de cœur et de coquille (Figure 15).

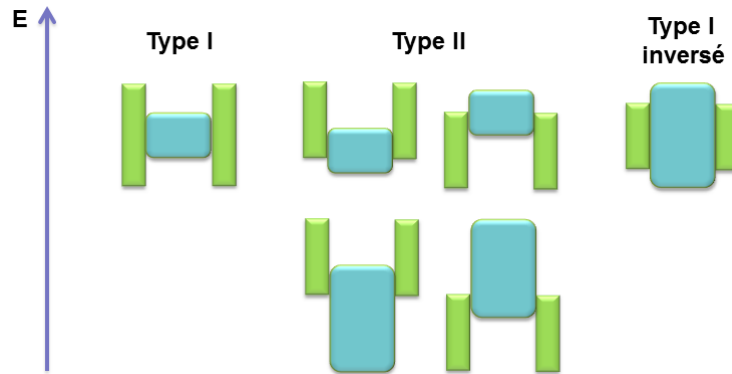


Figure 15. Représentation schématique des band gap des différents types de QDs cœur-coquille (band gap du cœur en bleu et band gap de la coquille en vert).

Les QDs cœur/coquille de type I sont conçus en utilisant, pour la construction de la coquille, un semi-conducteur ayant une énergie de band gap plus élevée que celle du cœur. CdSe/ZnS (Dabbousi *et al.* 1997) ou CdSe/CdS (Lin *et al.* 2005) sont des exemples typiques de ce genre de QDs où la bande de conduction de la coquille a une énergie plus élevée que celle du cœur, alors que la bande de valence a au contraire une énergie plus faible (Figure 16).

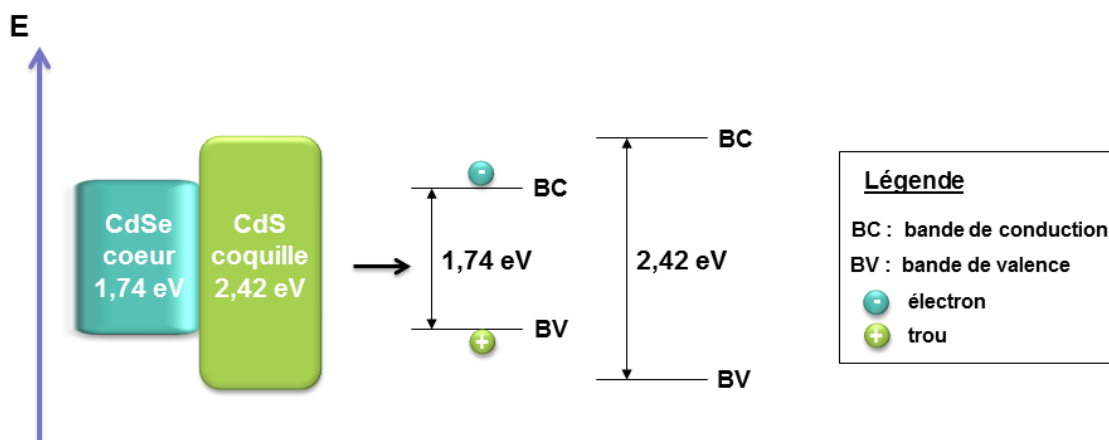


Figure 16. Représentation schématique de la structure de bandes d'un QD CdSe/CdS.

Les porteurs de charge sont confinés dans le cœur du QD et la longueur d'onde d'émission de fluorescence ne présente alors qu'un faible effet bathochrome de quelques nanomètres par rapport à l'émission du cœur seul. Cet effet bathochrome, observable lors de la croissance de la coquille, est attribuable à une délocalisation partielle de l'exciton dans la coquille, ce qui a pour effet de légèrement réduire l'effet du confinement quantique. La fuite de l'exciton dans la coquille est par contre plus importante pour les nanocristaux de petites tailles, l'énergie de confinement étant automatiquement plus impactée.

À l'opposé, les QDs cœur/coquille de type I inversé sont conçus en se basant sur l'utilisation d'un semi-conducteur de coquille ayant une énergie de band gap plus faible que celle du cœur. La bande de conduction de la coquille présente une énergie plus basse que celle du cœur et la bande de valence une énergie plus élevée. L'exciton est alors en partie délocalisé dans la coquille, conduisant à des propriétés photophysiques plus médiocres, et c'est l'épaisseur de la coquille qui permet alors de moduler la longueur d'onde d'émission de fluorescence. Au vu de l'exemple décrit précédemment, CdS/CdSe s'impose ici (Figure 17, Tian *et al.* 2012).

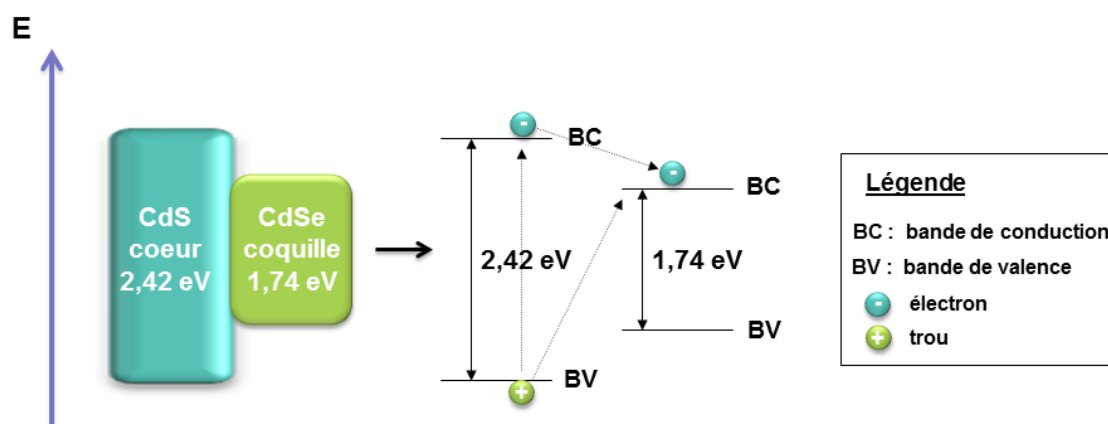


Figure 17. Représentation schématique de la structure de bandes d'un QD CdS/CdSe.

Le dernier cas de figure, subdivisable en deux structures dites de type II, est actuellement le plus étudié car il est possible d'obtenir des QDs émettant jusqu'au proche

infra-rouge et possédant des durées de vie de l'exciton plus importantes que pour les QDs de type I. Ces phénomènes trouvent leur origine dans une délocalisation possible d'un des deux porteurs de charge dans la coquille. La première structure de type II (CdS/ZnSe, Li *et al.* 2009) correspond à des bandes de valence et de conduction du cœur respectivement plus basses que celle de la coquille, alors que la seconde structure (ZnTe/CdSe, Xie *et al.* 2005) correspond à des bandes de valence et de conduction du cœur respectivement plus énergétiques que celle de la coquille (Figure 18).

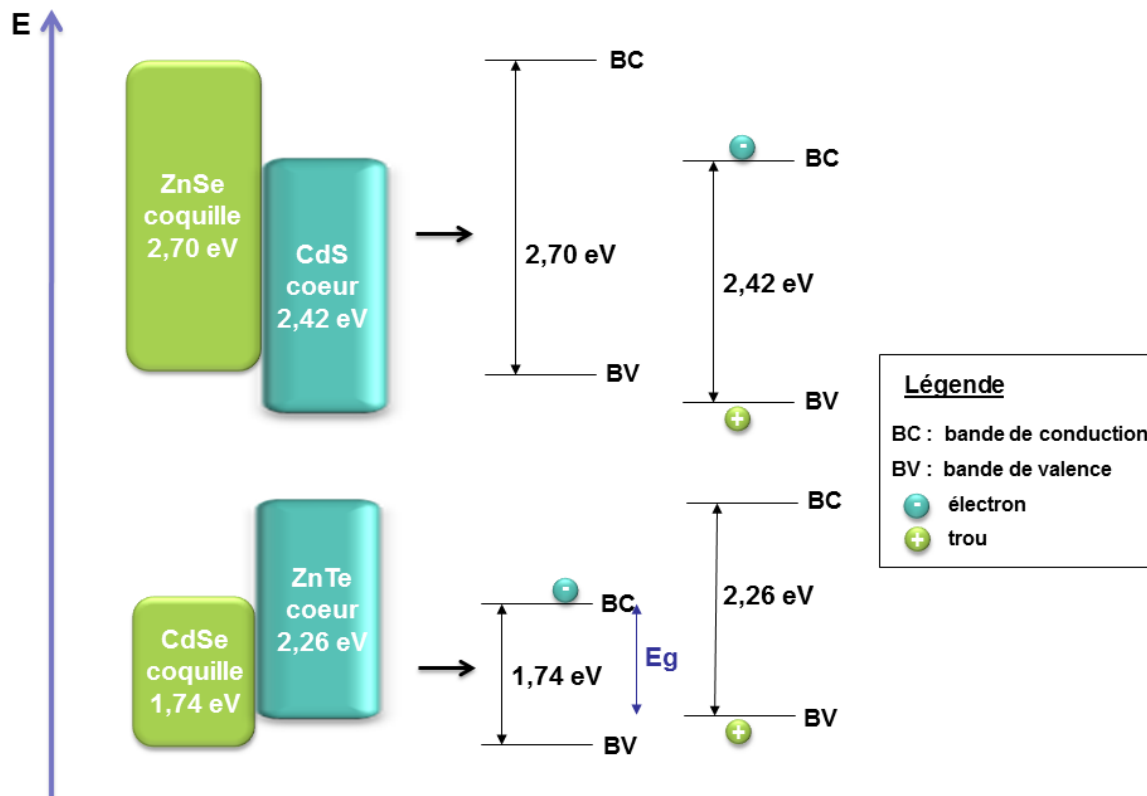


Figure 18. Représentations schématiques des structures de bandes de QDs de CdS/ZnSe et de ZnTe/CdSe.

I.1.6.2. Choix des semi-conducteurs

La synthèse de QDs cœur/coquille présentant de bonnes propriétés photophysiques passe par un dépôt épitaxial de la coquille, c'est-à-dire monocouche par monocouche. Les bandes d'énergies du semi-conducteur du cœur et celles de celui de la coquille doivent avoir

un alignement approprié comme expliqué précédemment. Les deux semi-conducteurs doivent, dans l'idéal, présenter la même structure cristalline et présenter un faible désaccord de maille (Reiss *et al.* 2009). Ce paramètre, assimilable à une contrainte, est calculé, à l'aide des paramètres de maille élémentaire « a » de chaque réseau cristallin associé, selon la formule $\Delta a/a$. Plus ce désaccord est important, plus le risque de destruction du matériau construit est grand. La coquille va en effet compresser le cœur et le cœur lui-même pourra provoquer une dislocation de la coquille.

Un désaccord de maille élevé conduit également à une perte plus rapide des propriétés de fluorescence. Dabbousi *et al.* (1997) ont, par exemple, observé que le rendement quantique de fluorescence d'un système CdSe/ZnS, possédant un désaccord de maille de 12 %, chute dès la croissance de deux monocouches de ZnS. Zajicek *et al.* (1993) ont observé la diminution du rendement quantique de fluorescence d'un système CdSe/ZnSe, dont le désaccord de maille est de 7 % après l'introduction de quatre monocouches de ZnSe. Le rendement quantique chute du fait de l'apparition de défauts qui favorisent les recombinaisons non radiatives et l'apparition de niveaux énergétiques intermédiaires.

I.1.6.3. Structures cœur/double coquille

L'ajout d'une coquille supplémentaire à band gap plus élevé, suivant le schéma des systèmes de type I, permet d'améliorer les propriétés photophysiques des systèmes type I inversé ainsi que des systèmes à fort désaccord de maille.

Le matériau de la coquille intermédiaire doit préférentiellement être choisi pour avoir un faible désaccord de maille, à la fois avec le matériau du cœur et celui de la coquille extérieure. Il joue généralement le rôle d'adaptateur. Les systèmes cœur/coquille/coquille, comme les QDs CdSe/CdS/ZnS ou CdSe/ZnSe/CdS, présentent généralement des rendements quantiques plus élevés que les systèmes cœur/coquille simples, le nombre de défauts de surface étant

significativement réduit. Reiss *et al.* (2003) ont, par exemple, montré que des QDs CdSe/ZnSe/ZnS présentent un RQ 1,4 fois supérieur aux QDs CdSe/ZnSe (Figure 19).

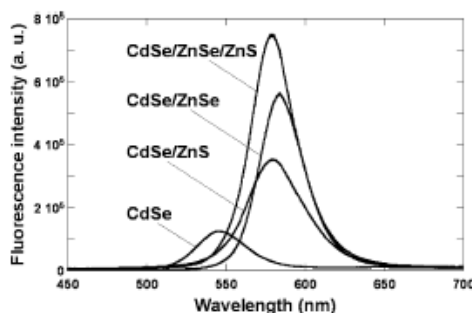


Figure 19. Spectres d'émission de fluorescence de QDs à cœur CdSe, avant et après ajout de différentes coquilles.

I.1.7. QDs à structure alliée

Suite à la mise au point de nombreuses structures de type cœur/coquille présentant des propriétés photophysiques grandement améliorées par rapport aux structures simple cœur, la course à l'innovation dans ce domaine a fait émerger une nouvelle génération de structures hautement luminescentes. Souvent cités comme étant une structure quasi cœur/coquille, les « alliages » sont généralement considérés comme des QDs ternaires. En plus de posséder d'excellentes propriétés photophysiques, les alliages présentent des propriétés d'émission dont les longueurs d'onde peuvent être modulées/déplacées, notamment vers le proche-infrarouge. Ainsi Bailey *et al.* (2003) ont réussi à obtenir des QDs possédant des tailles identiques de 5,9 nm mais présentant des longueurs d'onde d'émission différentes. Les structures CdTe/CdSe, CdSeTe homogène et CdSeTe avec un gradient de Se du cœur vers la surface des nanoparticules, présentent respectivement des émissions de fluorescence centrées aux environs de 700, 735 et 765 nm (Figure 20). Ces structures émettant dans le proche-infrarouge sont particulièrement intéressantes pour des applications de bio-imagerie dans la

mesure où les tissus biologiques présentent une faible absorbance et n'émettent qu'un faible bruit de fond dans la zone allant de 650 à 900 nm.

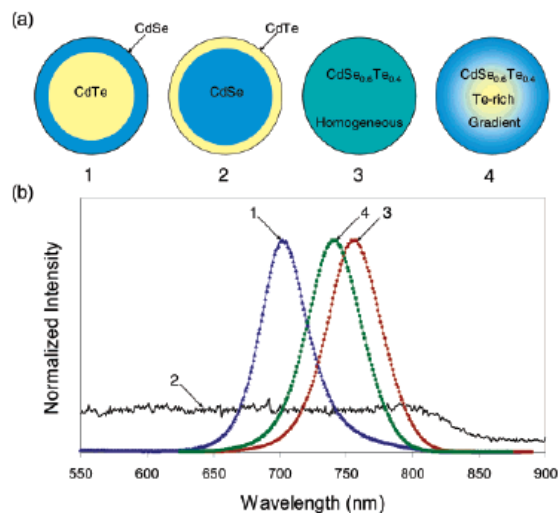


Figure 20. Structures et spectres d'émission de fluorescence de structures cœur/coquille et alliages (Bailey *et al.* 2003).

I.1.8. Stabilité physicochimique des QDs

La stabilité des dispersions colloïdales de QDs est un facteur important pouvant influencer la toxicité de ces nanomatériaux. Les interactions entre les QDs et le matériel biologique utilisé pour les études de toxicité pourront en effet différer notablement selon la stabilité des QDs. Deux phénomènes majeurs sont susceptibles d'influencer la stabilité de tels systèmes, l'agrégation et la dissolution des QDs (Zeyons 2008).

I.1.8.1. Phénomène d'agrégation

L'observation de possibles phénomènes d'agrégation des dispersions colloïdales avant leur utilisation est un point important dans la mesure où l'agrégation engendre un effet « nano » atténué. Deux types d'interactions faibles, les forces de Van der Waals et les forces électrostatiques, régissent l'agrégation des particules d'un système colloïdal. Les forces de

Van der Waals proviennent de l'interaction entre deux dipôles induits ou permanents, et sont définies par l'équation 17 :

$$U_{vdw}(h) = - \frac{rA}{12(h - 2r)}$$

Équation 17. Relation exprimant les forces de Van der Waals.

où r correspond au rayon des QDs, A à la constante d'Hamaker et h à la distance entre les QDs, de centre à centre. Ainsi à la suite d'une fluctuation de sa densité électronique, un QD peut acquérir un dipôle temporaire qui induira à son tour un dipôle induit dans un QD voisin. Ces deux dipôles s'attireront l'un l'autre par interactions attractives de Van der Waals. Les forces électrostatiques résultent, quant à elles, de la présence de charges présentes sur les ligands adsorbés à la surface des QDs et sont définies par l'équation 18 :

$$U_{rep}(h) = \frac{Z^2 L_B}{h} \frac{e^{-\kappa(h-2r)}}{(1 + \kappa r)^2}$$

Équation 18. Relation exprimant les forces électrostatiques.

où r correspond au rayon des QDs, h à la distance entre les QDs, de centre à centre, κ à l'inverse de la longueur de Debye, Z à la charge effective du colloïde et L_B à la longueur de Bjerrum, longueur pour laquelle l'interaction électrostatique entre deux QDs est égale à kT (énergie thermique avec k la constante de Boltzmann et T la température absolue), soit 7,1 Å pour des dispersions aqueuses à température ambiante. Dans le cas d'une suspension colloïdale de QDs portant tous le même type de groupement de surface, ces forces seront de type répulsif.

Le potentiel d'interaction U entre deux QDs, prenant en compte les contributions répulsives et attractives, est ensuite simplement défini par la somme des interactions de Van der Waals et des interactions électrostatiques précédemment décrites (Figure 21). Le potentiel

d'interaction U est défini par la théorie DLVO, mise au point par Derjaguin, Landau, Verwey, et Overbeek en 1948 (Derjaguin *et al.* 1941, Verwey *et al.* 1948).

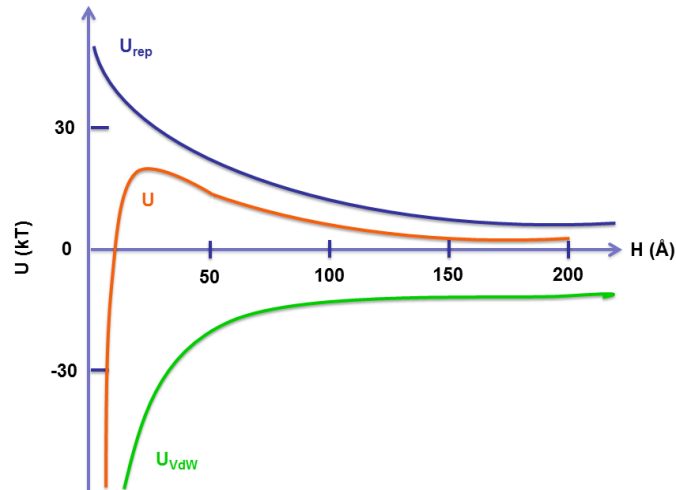


Figure 21. Potentiel d'interaction U entre particules sphériques chargées en fonction de H la distance entre les deux particules.

La théorie DLVO montre l'existence d'un puits attractif lorsque les particules sont à courtes distances les unes des autres et d'un maximum d'énergie à une distance intermédiaire. Une diminution du potentiel d'interaction en deçà de l'énergie thermique kT correspond à une chute du potentiel des QDs dans le puits qui s'agrègent alors. Verwey et Overbeek ont montré que pour éviter ce phénomène, le potentiel U doit être supérieur à 15 kT . Or, pour les QDs, particules nanométriques, la barrière de potentiel est de cet ordre de grandeur. Les QDs n'ont donc naturellement pas tendance à rester éloignés. Plus la surface spécifique de la particule est importante, ce qui est le cas avec les QDs, plus la tension de surface est élevée. L'agrégation des QDs permet donc une diminution de l'enthalpie libre de la dispersion colloïdale par abaissement de la tension de surface liée à la réduction de la surface spécifique. L'agrégation correspond à l'évolution naturelle d'une dispersion de QDs et ne peut être minimisée qu'à l'aide d'espèces ioniques, les ligands de surface, adsorbées à la surface des nanoparticules. Notons que la durabilité d'une dispersion de QDs dépend aussi de son pH. En effet, il existe

une valeur de pH, appelée point de charge nulle (PCN) pour laquelle les QDs ont une charge de surface nulle. Lorsque le pH approche de cette valeur, les forces de répulsion diminuent sensiblement jusqu'à devenir nulles, et l'agrégation est alors favorisée.

I.1.8.2. Phénomène de la dissolution

Le phénomène de dissolution engendre deux problèmes majeurs dans le cas des QDs. Plus les QDs se dissolvent, plus l'aspect « nano » est prononcé et plus certains ions constitutifs, tels que les ions Cd^{2+} , sont relargués sous forme libre. La cinétique de dissolution est propre à chaque type de QDs car elle est dépendante de nombreux paramètres tels que la composition chimique, le pH, le solvant et la concentration des ions en solution. De plus, comme nous l'avons expliqué dans le paragraphe précédent, une diminution du rayon des particules entraîne une augmentation de la tension de surface, ce qui augmente sensiblement le phénomène de dissolution.

I.1.8.3. Importance du ligand stabilisant

Afin de minimiser les phénomènes d'agrégation et de dissolution, la stabilisation stérique des QDs par la présence de ligand est nécessaire. Les ligands stabilisants créeront non seulement des forces de répulsion entre les QDs du fait de leurs charges ioniques, mais augmenteront aussi l'affinité des QDs avec le solvant, favorisant la dispersion colloïdale. La stabilité des QDs est alors clairement conditionnée par la force de la liaison ancrant le ligand aux QDs.

Les QDs CdSe sont stabilisés par des ligands organiques, comme décrit au paragraphe I.1.2. (Figure 3), porteurs d'au moins deux groupements fonctionnels, permettant pour l'un l'ancrage aux QDs et pour le(s) autre(s) la bonne dispersion des QDs dans le solvant. L'ancrage des ligands à la surface des QDs se fera via une liaison de coordination forte avec

le cadmium. L'utilisation de ligands porteurs de groupements thiols est de ce fait très répandue car la liaison Cd-S est l'une des plus stables. La nature du ou des autres groupements fonctionnels est ensuite choisie en fonction du solvant dans lequel la dispersion va être effectuée. Des chaînes apolaires de type alkyles seront choisies si le QD doit être dispersé en solvant peu polaire (hexane, toluène) alors que des groupements polaires et/ou chargés (carboxylate, ammonium, alcool,...) seront utilisés si le QD doit être dispersé en milieu aqueux. L'affinité du ligand avec le solvant est le paramètre clé de l'obtention d'une dispersion homogène.

I.2. Synthèse des QDs de CdSe

Comme pour toute structure cristalline, la synthèse de QDs répond à un processus où l'étape de nucléation est temporellement séparée de l'étape de croissance qui lui succède (LaMer *et al.* 1950). La formation de QDs CdSe se déroule donc en plusieurs étapes successives résumées ci-après (Figure 22).

I.2.1. Les différentes étapes de la synthèse de QDs CdSe

Initialement, le précurseur de cadmium est introduit à la concentration C_0 dans le milieu réactionnel. Le précurseur de sélénium est ensuite injecté, ce qui a pour effet d'augmenter la concentration totale en précurseurs. L'injection doit se faire le plus rapidement possible afin d'obtenir des particules présentant une faible polydispersité, la nucléation s'enclenchant quasi-instantanément. Dès que la concentration en précurseurs dépasse le seuil de nucléation, des germes de CdSe commencent à se former. Au fur et à mesure que les germes se forment, une diminution rapide de la concentration en précurseurs, liée à leurs consommations, est observée. Au cours de cette étape, la concentration globale finit par être inférieure au seuil de nucléation, ce qui provoque l'arrêt de la formation de germes. La nucléation étant alors finie,

la croissance homogène des germes commence par consommation des précurseurs restants. Lorsque la concentration en précurseurs est quasi nulle, la phase de maturation d'Ostwald débute (Ostwald *et al.* 1901, Voorhees *et al.* 1985). Durant ce processus spontané, les plus petites particules, présentant des énergies de surface plus élevées, vont se dissoudre au profit des plus grosses particules, jusqu'à ce qu'un équilibre soit atteint ou que la réaction soit stoppée. Au cours de la synthèse, les petites particules sont cinétiquement favorisées aux dépens des grandes. Cependant, les grandes particules étant thermodynamiquement favorisées, du fait d'une énergie plus faible, la maturation d'Ostwald entraîne leur formation pour minimiser l'énergie du système. Au cours de la maturation d'Ostwald, le nombre de particules diminue, alors que la taille des particules augmente.

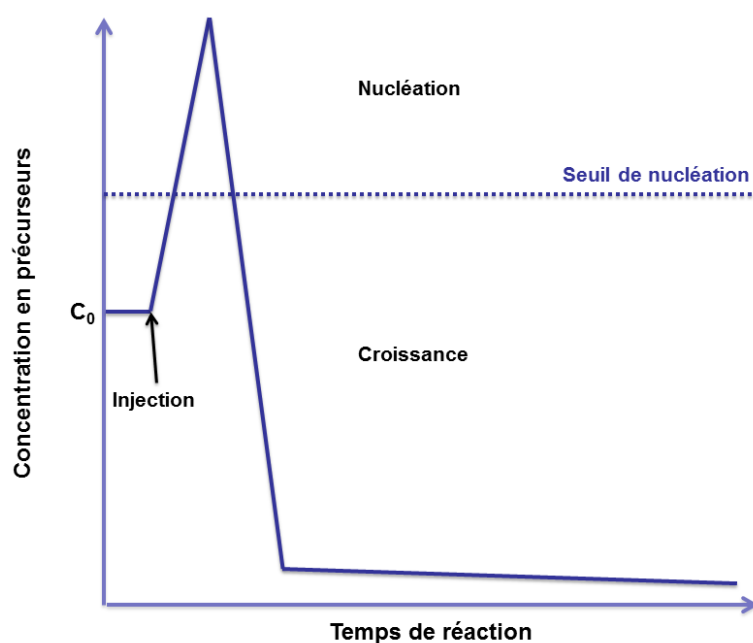


Figure 22. Schématisation graphique des différentes étapes de la synthèse de QDs.

Les QDs CdSe peuvent être synthétisés, suivant ce processus multi-étapes, selon deux voies de synthèse différentes, la synthèse organométallique et la synthèse hydrothermale ou en milieu aqueux.

I.2.2. Synthèses organométalliques : obtention de QDs hydrophobes

Historiquement, les premières recherches traitant de nanocristaux de semi-conducteur CdSe ont été réalisées au début des années 80. Ekimov *et al.* (1981 et 1982), en utilisant des matériaux semi-conducteur, dont CdSe, pour le dopage du verre, ont observé pour la première fois la précipitation de CdSe sous forme de nanocristaux. Ces derniers présentaient une bonne cristallinité, une taille contrôlable et une faible dispersion en taille. Cependant, les nanocristaux observés n'ont pas été isolés, puisque imbriqués dans la matrice de verre, et les propriétés optiques du composite étaient dominées par les défauts de surface du fait d'une interface matrice/nanocristaux mal définie. Des travaux d'Ekimov *et al.* et de Brus *et al.*, réalisés en 1984-85 ont ensuite marqué l'émergence des recherches portant sur les propriétés physiques des dispersions colloïdales de nanocristaux de semi-conducteur. Ces deux groupes sont notamment à l'origine de la découverte de la dépendance des propriétés optiques à la taille des nanocristaux.

Durant la décennie suivante, les protocoles de synthèse ont progressivement été améliorés dans le but d'obtenir des nanocristaux possédant une taille contrôlée, une faible dispersion en taille, une cristallinité élevée et une bonne passivation de surface. C'est à cette période que l'on voit apparaître l'utilisation des ligands de surface, pour stabiliser les nanocristaux qui ne sont alors plus figés dans des matrices.

La synthèse clé ayant permis d'obtenir les premiers QDs CdSe possédant de bonnes qualités photophysiques et répondant à l'ensemble des contraintes structurelles évoquées précédemment, a été développée par Murray *et al.* en 1993. Cette synthèse est de type organométallique et est basée sur l'injection rapide à haute température (jusqu'à 360°C) du précurseur de sélénium dans un milieu réactionnel où le précurseur de cadmium est dissous dans un solvant coordonnant, tel que l'oxyde de trioctylphosphine (TOPO), qui joue aussi le rôle de ligand stabilisant. Dans ce type de synthèse, l'étape de nucléation est très rapide, ce

qui entraîne une chute brutale de la concentration en précurseurs. La température chute de façon brutale également, du fait du volume injecté, arrêtant presque immédiatement la nucléation. La croissance des QDs est ensuite réalisée, par consommation des précurseurs restant en solution, en effectuant un recuit. La durée du recuit définit le temps de croissance des QDs et donc leur taille. Les QDs obtenus par Murray *et al.* (1993), et isolés par précipitation sélective d'une partie du milieu réactionnel à différents temps de croissance, présentent des propriétés de fluorescence taille-dépendante sur une gamme allant de 1,2 à 11,5 nm, ainsi qu'une faible polydispersité (diamètre = $x \pm y$ nm, $y < 5\%$ de x).

La synthèse organométallique a, par la suite, connu de nombreuses tentatives d'améliorations. Parmi les essais ayant eu un impact important sur le développement des protocoles de synthèse, certains ont permis d'améliorer la distribution en taille des QDs. Talapin *et al.* (2001) ont ainsi montré que l'ajout d'hexadécylamine (HDA), co-solvant coordonnant, au TOPO, permet un meilleur contrôle de la cinétique de croissance. D'autres essais ont plutôt visé à remplacer certains réactifs par des équivalents plus faciles à manipuler ou moins toxiques. Peng *et al.* (2001) ont par exemple réussi à remplacer le diméthylcadmium, précurseur de cadmium initialement utilisé mais qui s'avère sensible à l'air, pyrophorique et toxique, par de l'acétate de cadmium, moins toxique et plus facile à manipuler. Le TOPO et le HDA, cités précédemment, chers et toxiques, ont également été remplacés par des solvants non coordonnants de type alcanes ou alcènes à longues chaînes ne présentant pas ces inconvénients. L'usage d'1-octadécène (ODE) s'est ainsi développé au détriment du squalène peu pratique à utiliser car solide à température ambiante. Un ligand permettant le contrôle de la cinétique de croissance est alors ajouté au milieu réactionnel. Yu *et al.* (2002) ont, par exemple, synthétisé des QDs CdSe, en utilisant de l'ODE comme solvant et de l'acide oléique comme ligand stabilisant. L'introduction de l'acide oléique en proportions variables a permis l'obtention de nanoparticules présentant des diamètres de 1,5 à

20 nm. Certains travaux ont également essayé de s'affranchir de l'étape limitante, l'injection rapide du précurseur de sélénium, afin de simplifier le protocole de synthèse sans nuire à la monodispersité (Pradhan *et al.* 2003). Ainsi Talapin *et al.* (2001) ont obtenu des QDs de CdTe présentant une faible dispersion en taille, en favorisant la dissolution lente de poudre de tellurium, par rapport à une injection rapide à haute température.

En résumé, les multiples progrès réalisés lors des synthèses organométalliques permettent la préparation de QDs CdSe présentant d'excellentes propriétés optiques. Ces synthèses nécessitent l'emploi de composés chimiques coûteux et toxiques, ainsi que de technologies peu accessibles, tels que des boîtes à gants ou des rampes à vide permettant de limiter la destruction des précurseurs sensibles à l'air. De plus, les QDs obtenus sont stabilisés par des ligands organiques hydrophobes ne présentant aucune affinité pour les milieux aqueux. L'utilisation de QDs hydrophiles est cependant nécessaire à beaucoup d'applications, et notamment à celles touchant le domaine biologique.

I.2.3. Obtention de QDs hydrophiles

Deux options sont envisageables pour obtenir des QDs hydrodispersables : soit modifier la surface de QDs hydrophobes obtenus par synthèse organométallique pour les rendre hydrophiles, soit changer le procédé de synthèse et préparer les QDs directement en milieu aqueux en utilisant des ligands hydrophiles. Ces deux stratégies sont décrites dans les paragraphes suivants.

I.2.3.1. Modification de la surface de QDs hydrophobes : dispersion en milieu aqueux

Les QDs préparés par synthèse organométallique, hydrophobes du fait de leur stabilisation par des ligands tels que le TOPO ou l'HDA, peuvent être facilement dispersés

dans des solvants organiques peu polaires tels que l'hexane ou le toluène. Leur dispersion dans l'eau, ou dans un milieu biologique, nécessite par contre une modification préalable de leur surface. Trois stratégies sont envisageables : l'échange des ligands de surface, l'interaction des ligands hydrophobes avec des molécules amphiphiles, ou l'incorporation des QDs dans des sphères de silice.

I.2.3.1.1. Échange des ligands de surface

Cette méthode utilise des ligands hydrophiles, a minima bifonctionnels, qui vont déplacer les molécules hydrophobes présentes à la surface des QDs. Ils comportent une fonction d'ancrage qui interagit avec la surface des QDs, quasiment exclusivement de type thiol dans le cas des QDs contenant du cadmium ou du zinc, et une ou plusieurs tête(s) hydrophile(s) (alcool, acide, amine...) permettant la dispersion des QDs en milieu aqueux.

La réaction d'échange se fait facilement dans la mesure où une liaison « QD-ligand » énergétiquement plus stable est obtenue. En effet, dans le cas des QDs hydrophobes, seule une interaction covalente électrostatique entre le cadmium, acide de Lewis, et le ligand (TOPO ou HDA), base de Lewis, est établie. Par contre, l'interaction entre les QDs et les ligands hydrophiles qui seront ancrés via une fonction thiol sera de type covalent, le cadmium et le soufre mettant en commun deux électrons.

Les ligands utilisés dans la littérature peuvent présenter un ancrage sur les QDs, de type monodentate, tels que l'acide 3-mercaptopropionique, le 2-mercптоéthanol ou les thioamino-acides comme la cystéine, ou un ancrage de type bidentate ayant pour but d'améliorer la stabilité des nanocristaux, et donc de favoriser l'échange. Algar *et al.* (2007) ont ainsi montré une meilleure stabilité de QDs fonctionnalisés par l'acide dihydrolipoïque (DHLLA), comparés aux ligands monodentates thioacides comme l'acide 3-mercaptopropionique (Figure 23). L'amélioration de la stabilité, par l'utilisation du ligand bidentate DHLLA, peut aussi être

accompagnée de l'amélioration de la biocompatibilité des QDs. Uyeda *et al.* (2005) ont ainsi montré que la PEGylation de la surface des QDs, par couplage d'un polyéthylène glycol (PEG) à la fonction acide du DHLA, leur procure une meilleure stabilité en milieu salin chargé et au pH.

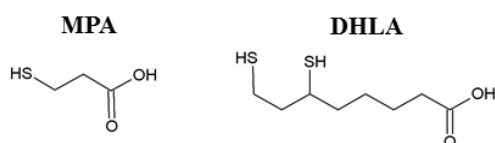


Figure 23. Exemples de ligands monodentate (MPA) et bidentate (DHLA).

D'autres ligands, tels que les oligomères de phosphine ou les dendrons peuvent aussi être utilisés pour stabiliser les QDs en milieu aqueux. Ces deux types de ligands présenteront l'avantage de protéger plus fortement le cœur photoactif du fait de leur encombrement stérique plus développé. Kim *et al.* (2003) ont ainsi développé des QDs porteurs d'oligomères de phosphine dans le but d'améliorer les propriétés photophysiques obtenues après l'échange de ligands (Figure 24). Ils ont alors montré le maintien du rendement quantique de fluorescence initialement observé sur les QDs hydrophobes pendant plusieurs semaines après l'échange. Notons qu'une perte immédiate d'environ 80 % des propriétés de fluorescence a été observée par ces auteurs lorsque l'échange est effectué avec l'acide mercaptoundecanoïque (MUA).

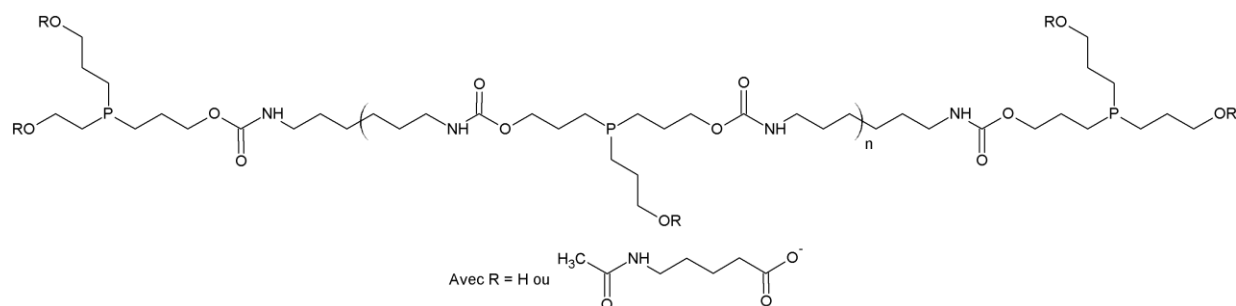


Figure 24. Structure des ligands de type oligomère de phosphine utilisés par Kim *et al.* (2003).

Wang *et al.* (2002) ont, quant à eux, stabilisé avec succès des QDs CdSe à l'aide de dendrons possédant un point focal thiol et des fonctions alcools comme groupements de périphérie terminaux (Figure 25). Ils ont montré que la photostabilité des QDs ligandés par des dendrons est améliorée au fur et à mesure que des dendrons de générations plus élevées sont utilisés.

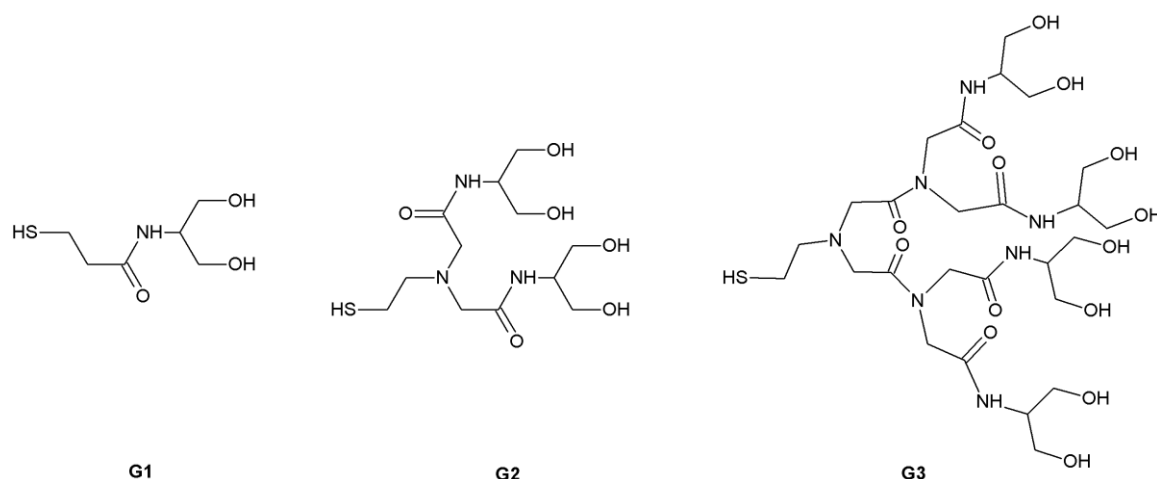


Figure 25. Différentes générations de dendrons utilisées par Wang *et al.* (2002).

Enfin, l'échange des ligands hydrophobes peut aussi être réalisé à l'aide de thiosilanes qui formeront une coquille protectrice en périphérie des QDs (Figure 26). Les liaisons siloxanes formées permettent une bonne dispersion en milieu aqueux, et ce même si le milieu est fortement salin, comme montré par Gerion *et al.* (2001). Bien que les coquilles de silanes présentent des épaisseurs pouvant aller jusqu'à 5 nm, augmentant donc sensiblement la taille des QDs finaux, les propriétés photophysiques ont été conservées.

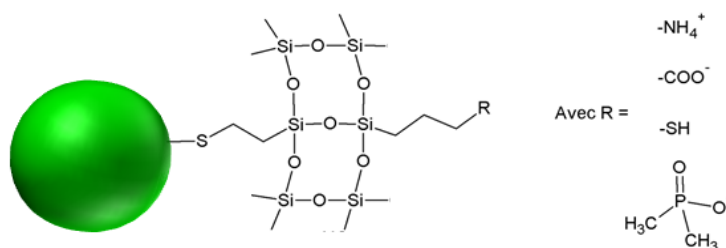


Figure 26. Structures de QDs porteurs de ligands thiosilanes.

I.2.3.1.2. Interaction des ligands hydrophobes présents avec des molécules amphiphiles

Dans certains cas, les ligands hydrophobes présents en fin de synthèse (TOP, TOPO, ...) sont conservés et la dispersion des QDs en milieu aqueux est obtenue par interaction de ceux-ci avec des molécules amphiphiles, comme des tensioactifs ou des oligomères. Les molécules amphiphiles présentent une partie hydrophobe qui fournira l'interaction hydrophobe/hydrophobe de type Van de Waals et une partie hydrophile assurant la dispersion dans les milieux aqueux. Les têtes polaires des tensioactifs, simples ou de type « gemini », sont généralement des fonctions ammoniums.

Li *et al.* (2007-2008) ont montré que les tensioactifs gemini bicaténaires assurent une meilleure stabilisation des QDs parce qu'ils ont la propriété de réduire la tension de surface de manière beaucoup plus significative que leurs équivalents monocaténaires (Figure 27). Ces auteurs ont également montré que les rendements quantiques de fluorescence sont améliorés après encapsulation et que l'utilisation de tensioactifs simples, comme le bromure de triméthylcétylammonium (CTAB), conduit à de fortes augmentations du diamètre des nanoparticules. Les assemblages QDs-tensioactifs simples peuvent en effet atteindre les 100 nm de diamètre, ce qui limite les applications en bio-imagerie.

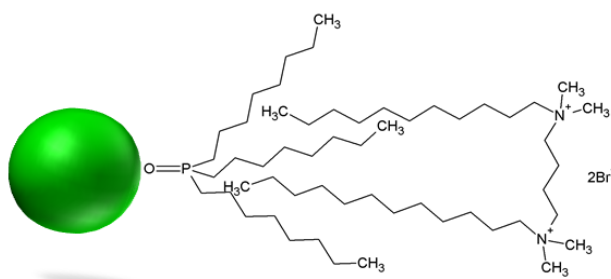


Figure 27. Hydrodispersion de QDs hydrophobes utilisant un tensioactif de type gemini.

Des molécules amphiphiles plus sophistiquées ont ensuite été utilisées dans le but d'améliorer la protection des QDs et/ou de limiter l'augmentation du diamètre des assemblages. Boulmedais *et al.* (2006) ont, par exemple, obtenu des systèmes présentant une taille de 25 nm en utilisant des gallates PEGylés. Mulder *et al.* (2006) ont quant à eux transféré avec succès des QDs CdSe@TOP en milieu aqueux à l'aide de phospholipides PEGylés PEG-DSPE₂₀₀₀ (Figure 28).

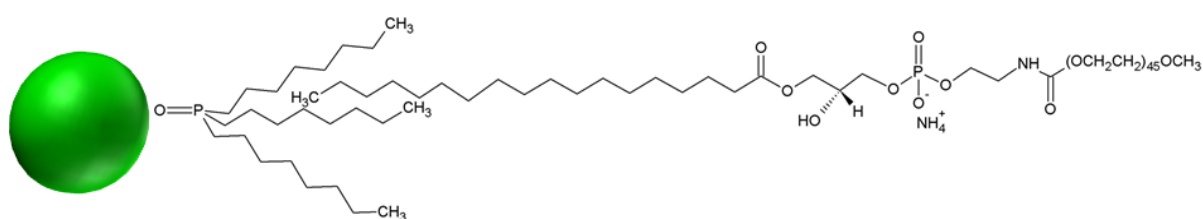


Figure 28. Hydrodispersion de QDs CdSe@TOP utilisant le phospholipide PEGylé PEG-DSPE₂₀₀₀.

La tête polaire des gallates ou des phospholipides est généralement constituée de fonctions polyéthylène glycol assurant une bonne dispersion dans les milieux aqueux. Une bonne stabilité n'est obtenue qu'à la condition que le rapport QDs / amphiphiles soit contrôlé. L'usage de phospholipides, notamment par Mulder *et al.* (2006) et Fan *et al.* (2005), a montré que l'encapsulation n'altère pas la surface des QDs et que leurs propriétés photophysiques restent inchangées.

Les QDs peuvent être encapsulés dans des polymères amphiphiles pour les rendre hydrodispersables avec une stratégie similaire sans altérer leur surface ou leurs propriétés photophysiques. Une augmentation du diamètre hydrodynamique (typiquement de 5 à 30 nm) est généralement observée. L'enveloppe polymérique, fortement réticulée, permet par contre d'obtenir une stabilité sur une gamme de pH plus importante (Shen *et al.* 2011). Les différents polymères susceptibles d'être utilisés sont les suivants :

- Dérivés de poly(maléique anhydride alt-1-tétradécène) qui génèrent des fonctions carboxylates promouvant la dispersion aqueuse, lorsqu'ils sont associés à la bis(6-aminohexyl)amine (Pellegrino *et al.* 2004).
- Acides polyacryliques modifiés par des alkylamines (Anderson *et al.* 2008).
- Copolymères à blocs comme ceux constitués de polybutylacrylate, polyéthylacrylate et d'acide polyéthylacrylique, modifiés à l'aide d'octylamine et de PEG (Smith *et al.* 2008).
- Copolymères de méthacrylate/acide méthylacrylique (Wu *et al.* 2009).
- Acides polymaléiques modifiés par des alcools aliphatiques (Zhou *et al.* 2010).

I.2.3.1.3. Incorporation des QDs dans des sphères de silice

Le dernier grand type de procédés développé pour disperser des QDs hydrophobes en milieu aqueux consiste à les incorporer dans des nanosphères de silice obtenues par hydrolyse douce de silicates. Zhou *et al.* (2005) ont ainsi obtenu des QDs CdSe incorporés dans des nanosphères de silice en hydrolysant du 3-mercaptopropyl triméthoxysilane, en présence de silicate de sodium, à pH 10,5 pendant 5 jours. Les QDs sont protégés du milieu environnant et présentent de bien meilleures propriétés photophysiques que les QDs de départ (Figure 29).

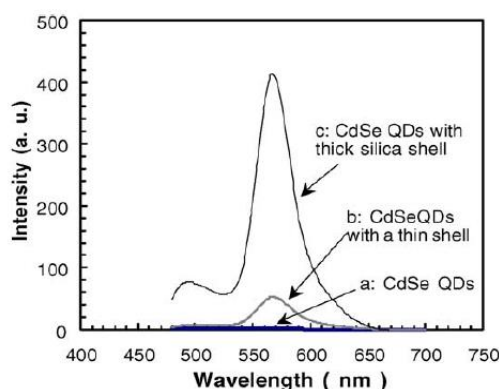


Figure 29. Amélioration des propriétés photophysiques par encapsulation des QDs dans des nanosphères de silice (Zhou *et al.* 2005).

On trouve environ 3 à 10 QDs par nanosphère, qui ont par contre l'inconvénient de présenter des diamètres généralement supérieurs à 25 nm (d'où une limitation du champ d'applications, Figure 30). Le nombre de QDs par nanosphère est fonction du rapport QDs / silicates.

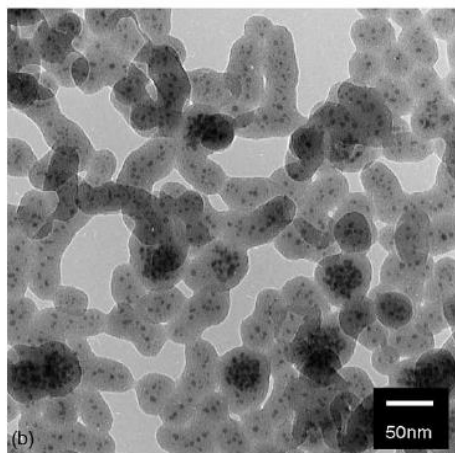


Figure 30. Images MET des QDs de CdSe incorporés par Zhou *et al.* (2005) dans des nanosphères de silice.

I.2.3.2. Synthèses hydrothermales ou en milieux aqueux

Les synthèses organométalliques présentent l'inconvénient de générer des QDs hydrophobes, et la mise en œuvre d'un échange de ligands permettant l'obtention de QDs hydrophiles peut constituer une étape fastidieuse. Pour contourner cette difficulté, des synthèses alternatives de type hydrothermale ou en milieu aqueux ont été développées en parallèle.

Les premiers QDs CdSe préparés en milieu aqueux ont été obtenus en 1999 par Rogach *et al.* via l'adaptation d'un de leurs précédents protocoles de synthèse de QDs CdTe en milieu aqueux (Rogach *et al.* 1996). La synthèse débute par la préparation d'une solution aqueuse contenant le précurseur de Cd^{2+} et un ligand stabilisant de type RSH (Rogach *et al.* 1999 : 2-mercaptoéthanol, 1-thioglycérol et acide thioglycolique) qui est ajusté à pH 11,2 dans le but de favoriser la formation de complexes $\text{Cd}^{2+}\text{-RS}^-$. Le précurseur de Se^{2-} est ensuite rapidement

injecté dans cette solution préalablement dégazée pour éviter toute oxydation. Les monomères de CdSe étant alors formés, la croissance des QDs CdSe débute en portant le milieu réactionnel à reflux pendant au moins 12 heures.

Plusieurs paramètres, tels que le ratio molaire Cd/ligand, la température de croissance, le pH ou la concentration initiale en cadmium, influencent la qualité des QDs CdSe produits. Les paramètres optimaux sont différents pour chaque type de QDs. Mao *et al.* (2007) ont ainsi utilisé un ratio Cd/Te/ligand de 1/0,5/1,8 avec des concentrations initiales en précurseurs de Cd et de Te de 20 et 10 mM et un pH de 9 pour obtenir des QDs CdTeS@MPA à une température de 180°C. Chen *et al.* (2011) utilisent un ratio Cd/Te/ligand de 1/0,25/1,03, avec des concentrations initiales en précurseurs de Cd et de Se de 1 et 250 mM et un pH de 10,06 pour obtenir des QDs CdTeS@MSA à une température de 90°C.

Le choix de certains ligands permet aussi d'améliorer la stabilité des QDs, ainsi que leur rendement quantique de fluorescence. Guo *et al.* (2005) et Gao *et al.* (1998) ont, par exemple, montré que les ligands acide thioglycolique (TGA) et MPA peuvent fournir une coordination supplémentaire via les atomes d'oxygène présents sur leurs fonctions acides carboxyliques, en formant alors des cycles à 5 ou 6 chaînons. Ceci conduit alors à une meilleure passivation de surface.

En parcourant les innovations de la synthèse en milieu aqueux, on constate que certains auteurs ont su tirer parti de l'utilisation d'autoclaves ou d'appareils à micro-ondes (Li *et al.* 2005). Ainsi la synthèse en milieu aqueux à haute température et sous pression, réalisable en plaçant le milieu réactionnel dans un autoclave scellé est appelée synthèse hydrothermale. L'utilisation de cette technique permet d'accélérer la phase de croissance, les QDs étant alors généralement obtenus en moins de 2 heures (Mao *et al.* 2007). Notre équipe a montré que de meilleures propriétés photophysiques étaient obtenues par la méthode hydrothermale (Aldeek *et al.* 2008) en comparant des QDs CdSe@MPA préparés à 100°C (15 heures) à d'autres

préparés à 150°C (1 heure). Les QDs obtenus après 1 heure à 150°C présentent en effet une émission excitonique pure contrairement aux QDs obtenus après 15 heures à 100°C dont l'émission est dominée par les défauts de surface. Nous avons aussi montré (Aldeek *et al.* 2011) que le RQ de fluorescence et la photostabilité des QDs préparés à 150°C, dont les analyses de diffraction des rayons X (DRX) montrent qu'il s'agit en fait de QDs alliés CdSe(S)@MPA, peuvent être améliorés par l'ajout d'une coquille ZnO. Le RQ des QDs CdSe(S)/ZnO est typiquement amélioré de 1,4 fois. De plus, alors que les QDs CdSe(S) voient leur RQ chuter de 60% après seulement 8 minutes d'irradiation, les QDs CdSe(S)/ZnO sont photo-stables pendant au moins 15 minutes.

I.2.4. Ancrage de biomolécules à la surface des QDs

Comme rapidement décrit précédemment, les QDs hydrodispersables obtenus, soit par modification de surface de QDs hydrophobes, soit par synthèse directe en milieu aqueux, présentent en surface des ligands porteurs de fonctions fortement hydrophiles, clés de la dispersion en milieu aqueux. Ces fonctions de surface permettent également le couplage de biomolécules aux QDs. Les biomolécules, assimilables à des modules d'adressage, améliorent fortement l'interaction sélective des QDs avec une cible cellulaire donnée. Les anticorps, les protéines, les peptides ou de petites molécules d'intérêt biologique peuvent donc être liés aux ligands présents à la surface des QDs, à la condition que leur ancrage n'altère pas leur activité et/ou leur reconnaissance par certaines cibles cellulaires. Deux grands procédés permettent l'ancrage des biomolécules aux QDs, la conjugaison par liaisons non-covalentes ou la conjugaison par couplage covalent.

Les QDs hydrophiles porteurs d'une charge de surface peuvent être conjugués à des biomolécules chargées via des interactions électrostatiques non-covalentes. Les QDs sont, dans ce cas, synthétisés de façon à présenter une charge complémentaire à celle de la

biomolécule. Goldman *et al.* (2002) ont, par exemple, utilisé cette technique basée sur des interactions électrostatiques pour conjuguer des QDs CdSe/ZnS, fonctionnalisés par des ligands DHLA chargés négativement, avec des motifs protéiques « leucine zipper » chargés positivement. Le domaine « leucine zipper » est associable à n'importe quelle protéine par génie génétique et sert alors de module d'ancrage au QD. Goldman *et al.* (2002) ont ainsi pu ancrer une protéine G streptococcique recombinante (domaine $\beta 2$) à des QDs. La protéine G recombinante a permis à son tour d'associer des immunoglobulines aux QDs par des interactions spécifiques, et ainsi développer un test de détection immunofluorescent (Figure 31). Les QDs obtenus après couplage conservent leurs propriétés photophysiques.

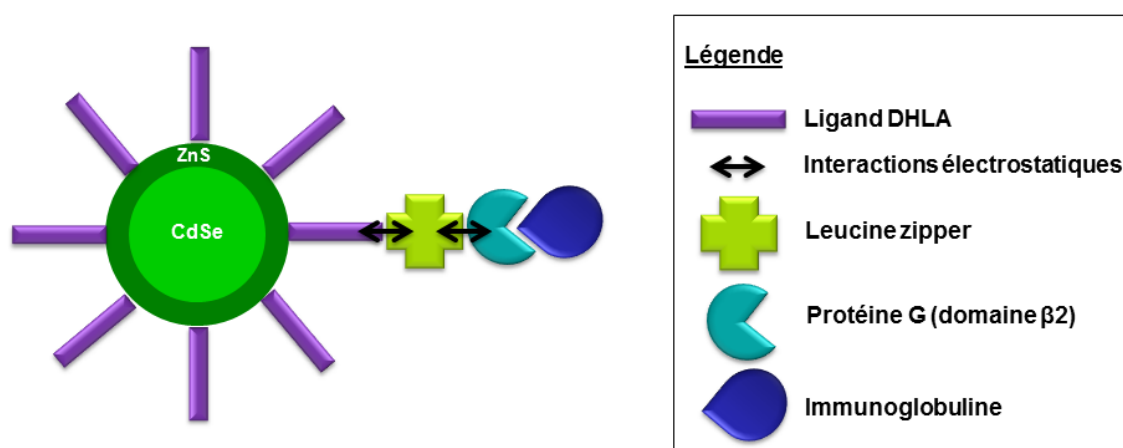


Figure 31. Ancrage de biomolécules d'intérêt via des interactions électrostatiques non-covalentes (stratégie développée par Goldman *et al.* 2002).

La conjugaison électrostatique des biomolécules peut également se faire via l'interaction avec le métal (Cd, Zn, ...) présent à la surface des QDs. Certaines séquences d'acides aminés de peptides ou de protéines présentent une affinité pour les métaux ou les cations métalliques. Slocik *et al.* (2002) ont montré l'interaction d'une région riche en histidines de la protéine II de *Plasmodium falciparum* avec l'élément zinc. Shang *et al.* (2007) ont montré qu'il est possible de décorer des QDs CdSe avec des ligands phénylalanines par le biais de leurs

fonctions carboxylates qui interagissent avec les atomes de cadmium présents à la surface de QDs CdSe.

La seconde méthode d'ancrage (conjugaison par couplage covalent) est généralement basée sur la réaction d'une fonction amine de la biomolécule avec une fonction acide carboxylique (carboxylate) du ligand stabilisant. Cette réaction, aboutissant à la formation d'un lien amide entre la biomolécule et le ligand, utilise généralement un agent de couplage, comme le chlorhydrate de *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N*-éthylcarbodiimide (EDC), et un agent d'activation, tel que le *N*-hydroxysuccinimide (NHS). L'acide carboxylique est préalablement activé par le NHS en un ester présentant un meilleur groupe partant. La réactivité du centre électrophile de la fonction carbonyle est alors grandement améliorée, ce qui permet l'attaque nucléophile de la fonction amine de la biomolécule.

Lorsque le couplage covalent se fait entre une fonction thiol de la biomolécule et une fonction amine portée par le ligand stabilisant, le sulfo-SMCC est utilisé comme agent de réticulation. Les QDs porteurs de fonctions amines réagissent préalablement avec le sulfo-SMCC pour donner lieu à des QDs porteurs de fonctions maléimides qui, par réaction radicalaire, forment des liaisons thioéthers avec les biomolécules. Il est aussi possible de coupler les QDs porteurs de fonctions amines au succinimydil 3[3'-(2-pyridyldithio)]propanoate, caractérisé par la présence d'un pont disulfure. La réduction du disulfure à l'aide du dithiothréitol (DTT) permet alors la création d'un nouveau pont disulfure entre le thiol de la biomolécule et le thiol présent à la surface du QDs.

Enfin, les biomolécules peuvent être ancrées de manière covalente à des QDs par leurs fonctions aldéhydes. Les QDs doivent alors être fonctionnalisés avec des fonctions acylhydrazines.

À titre d'exemple, Xing *et al.* (2007) ont utilisé avec succès ces trois types d'ancrage covalent décrits ci-dessus (Figure 32) pour obtenir des QDs modifiés avec des anticorps.

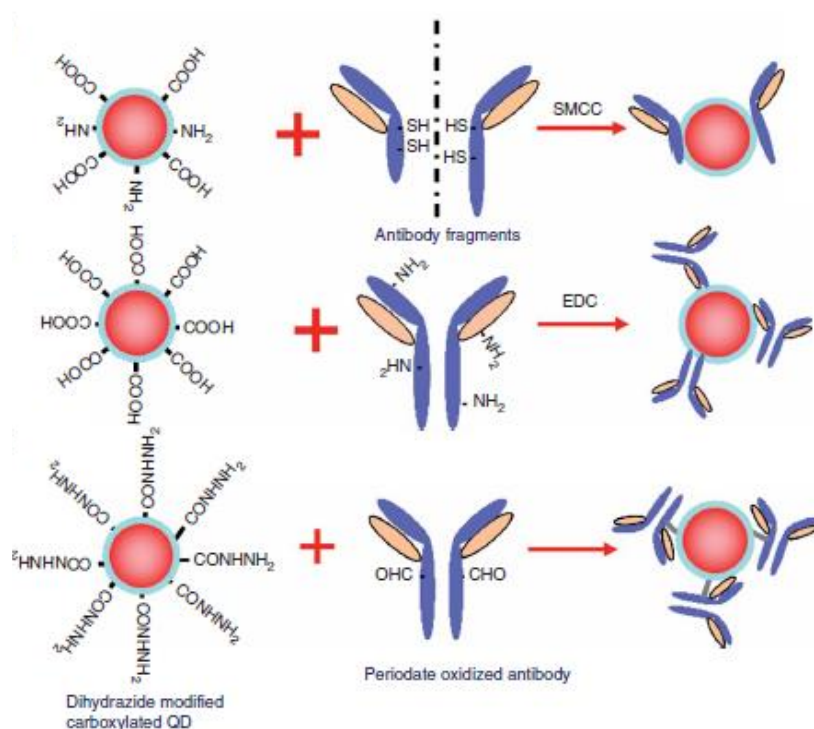


Figure 32. Représentation schématique des différents types de couplages covalents QDs-biomolécules (Xing *et al.* 2007).

I.2.5. Synthèse de QDs cœur/coquille(s)

La synthèse de QDs à cœur CdSe peut être suivie de la croissance d'une ou plusieurs coquille(s) d'un autre semi-conducteur (Figure 3, § I.1.2.), pour les raisons abordées au paragraphe I.1.6.. Les différentes structures, mettant en jeu un cœur CdSe, rapportées dans la littérature sont les suivantes :

- Structures cœur/coquille : CdSe/CdS, CdSe/ZnS, CdSe/ZnSe, CdSe/ZnTe, CdSe/CdZnS et CdSe/ZnO.
- Structures cœur/coquille/coquille : CdSe/CdS/ZnS, CdSe/ZnS/CdS, CdSe/ZnSe/ZnS, CdSe/ZnTe/ZnS, CdSe/CdTe/ZnSe, CdSe/CdTe/ZnTe.

L'ajout d'une coquille s'effectue dans des conditions proches de celles utilisées pour synthétiser le cœur. L'introduction de la coquille se fait cependant par injection goutte à goutte de ses précurseurs et la croissance est réalisée à une température plus basse que celle utilisée pour la formation du cœur afin de minimiser la nucléation de nanoparticules issues du

matériau utilisé pour créer la coquille. Hines *et al.* (1996) ont, pour la première fois, décrit la croissance d'une coquille de ZnS sur des QDs de CdSe obtenus par synthèse organométallique. Alors que la synthèse des QDs de CdSe est effectuée à 350°C, la croissance de la coquille est réalisée à 100°C. Ces auteurs ont montré qu'une coquille d'une épaisseur de $6 \pm 3 \text{ \AA}$ (soit 1 à 2 monocouche(s) de ZnS de 3,1 Å) est introduite à la périphérie des QDs. Les QDs CdSe/ZnS ont de meilleures propriétés photophysiques que les cœurs CdSe, le rendement quantique de fluorescence atteignant 50%, alors qu'il n'était que de 15% pour les QDs CdSe. L'émission due aux défauts de surface est totalement gommée après introduction de la coquille ZnS (Figure 33).

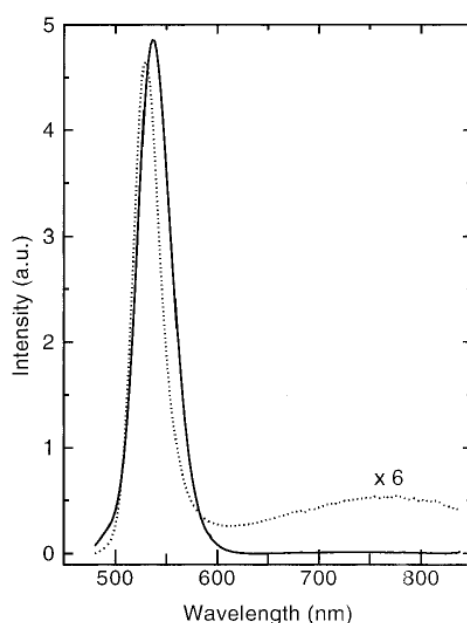


Figure 33. Spectres d'émission de fluorescence de QDs de CdSe (ligne brisée) et de CdSe/ZnS (ligne continue) obtenus par Hines *et al.*, normalisés par leur absorption à la longueur d'onde d'excitation (470 nm).

L'ajout d'une coquille dans le cadre d'une synthèse hydrothermale ou en milieu aqueux est aussi possible, même si les exemples en sont plus rares. Parmi les structures citées dans le tableau 4, seuls les QDs CdSe/CdS, CdSe/ZnS et CdSe/ZnO ont été préparés via une synthèse en milieu aqueux, toutes les autres hétérostructures étant synthétisées par voie

organométallique. Rogach *et al.* (2000) ont amélioré le RQ (de 0,15 à 4,2%) de QDs CdSe@citrate en leur ajoutant une coquille CdS. Le même groupe a, par la suite, montré que l'exposition de telles structures à une lumière naturelle permet d'améliorer le RQ jusqu'à 45% (Wang *et al.* 2004) du fait de phénomènes de photo-oxydation. Les électrons propulsés dans la bande de conduction, suite à l'activation lumineuse, réagissent avec l'oxygène présent pour donner des radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), tandis que les trous formés en surface oxyderont Se en SeO_2 . De ce phénomène résulte alors une érosion de la surface, compatible avec le déplacement hypsochrome observé sur les spectres d'émission de fluorescence, et une meilleure passivation de surface conduisant à une amélioration des propriétés optiques.

Ce procédé de photoactivation a également été utilisé par Lin *et al.* (2005) qui ont obtenu des QDs CdSe/CdS présentant une fluorescence taille-dépendante sur la gamme 3,7-6,3 nm et possédant des RQs de 60%. Han *et al.* (2010) ont obtenu des QDs CdSe préparés à 180°C par irradiation micro-ondes et présentant un RQ de 9,9%. Ces auteurs ont montré qu'il était possible d'améliorer le RQ jusqu'à 40% par introduction d'une coquille ZnS via la décomposition thermique de thioacétamide en présence de $Zn(ClO_4)_2$.

La synthèse de QDs CdSe(S)/ZnO, décrite dans le paragraphe précédent, a aussi été réalisée par voie hydrothermale. Elle permet d'obtenir des QDs présentant de meilleures propriétés photophysiques que les QDs CdSe(S) initiaux, le RQ initial de 11,5 % atteignant alors 15,6 %.

I.2.6. Synthèse de QDs alliés

Les QDs alliés, dérivés de cœur CdSe, sont principalement de type CdSeS (Aldeek *et al.* 2011), CdSeTe (Bailey *et al.* 2003) ou CdZnSe (Zhao *et al.* 2007). La formation d'alliage CdSeTe ou CdZnSe est basée sur l'utilisation de mélange des précurseurs de départ ($Se^{2-} +$

Te^{2-} ou $\text{Cd}^{2+} + \text{Zn}^{2+}$), alors que la formation de QDs CdSeS s'appuie sur la décomposition d'une partie du ligand à haute température ou par un chauffage prolongé.

Bailey *et al.* (2003) ont préparé des QDs CdSeTe en injectant dans le milieu réactionnel une solution contenant à la fois NaHTe et NaHSe, pré-mixés selon un ratio bien défini. Leurs expériences montrent aussi la possibilité d'obtenir des alliages CdSeTe homogène ou présentant un gradient, le cœur étant plus riche en tellure que la surface, en mettant respectivement le précurseur de Cd en excès ou en défaut par rapport aux précurseurs Se et Te.

Aldeek *et al.* (2011) ou, plus récemment, Zhan *et al.* (2013) ont obtenu des alliages CdSeS en utilisant l'acide 3-mercaptopropionique, à la fois comme ligand stabilisant et comme source de sulfure. Lors de la croissance des QDs par synthèse hydrothermale à haute température, les thioacides présents à la surface des particules, ou restant en solution, se décomposent, par hydrolyse basique, permettant la libération d'ions S^{2-} qui s'incorporent alors dans la maille élémentaire de CdSe ou viennent occuper les sites vacants Se^{2-} de surface pour conduire à des QDs alliés CdSe(S).

I.3. Utilisations majeures des Quantum Dots de CdSe

Les QDs trouvent des applications pratiques dans quatre grands domaines (Chandezon *et al.* 2004) :

- la biologie, où ils sont utilisés comme marqueurs fluorescents, soit pour de l'imagerie (imagerie de cellules *in vitro* et *in vivo*, pour le dépistage de biomolécules cibles ou pour l'étude de certains fonctionnement cellulaires), soit pour des applications de détection en biotechnologie (détection d'ADN ou de protéines).

- l'optoélectronique, particulièrement comme composants de cellules photovoltaïques ou de diodes à électroluminescence (DEL).
- la détection de composés, comme capteurs exprimant une variation de fluorescence en présence d'un gaz ou d'une espèce particulière (pesticides, métaux...).
- la catalyse (photocatalyse oxydante des alcools en aldéhydes [Li *et al.* 2013], vapocraquage de l'eau).

Les QDs CdSe, cœur ou cœur/coquille(s), sont très utilisés dans la plupart de ces domaines du fait de leurs propriétés de fluorescence taille-dépendante pouvant aisément couvrir toute la gamme du visible et des grandes avancées déjà effectuées concernant leurs préparations.

Le domaine de la biologie est le plus fourmillant d'exemples d'applications des QDs CdSe qui sont couramment utilisés par de nombreux groupes, après fonctionnalisation de surface, pour imager toutes sortes d'objets biologiques. Les QDs sont ici utilisés comme nanosondes dont la spécificité dépend de la molécule utilisée pour leur adressage. À titre d'exemple, Chen *et al.* (2008) ont spécifiquement imagé des carcinomes hépatocellulaires dans des souris vivantes, en utilisant des QDs de CdSe/ZnS fonctionnalisés avec des anticorps spécifiques de l'alpha-fœtoprotéine qui peut servir de marqueur tumoral (Smith *et al.* 1980). Wu *et al.* (2009) ont construit une sonde permettant la détection d'acide désoxyribonucléique (ADN) à des concentrations sub-nM en moins de dix minutes. Ces exemples utilisent les propriétés de fluorescence des QDs pour en faire des sondes passives. Les QDs peuvent aussi être utilisés comme sondes actives dans des applications telle que la thérapie photodynamique (PDT) qui vise à lutter contre le développement de tumeurs cancéreuses en utilisant la capacité qu'ont les QDs à produire des EROs (Qi *et al.* 2011).

Les matériaux utilisés dans le domaine de l'optoélectronique sont généralement des composites associant les QDs à des polymères conjugués. Les QDs CdSe sont maintenant couramment cités comme des éléments pouvant entrer dans la construction des cellules photovoltaïques. Leur capacité à couvrir tout le spectre UV-Visible permet d'optimiser l'absorption de la lumière. Ceci aura pour conséquence directe d'augmenter le nombre d'excitons photogénérés, et donc une génération d'électricité plus importante (Chandezon *et al.* 2004, Kamat *et al.* 2013). Certains des systèmes mettant en jeu les QDs atteignent maintenant des efficacités de 11% et concurrencent les systèmes polycristallins (Lee *et al.* 2012).

Les QDs CdSe peuvent également être utilisés dans les DEL où la pureté de leur couleur d'émission (FWHM faible) et le grand nombre de couleurs accessibles sont particulièrement recherchés. Ils permettent aussi l'obtention de dispositifs émettant une luminescence blanche présentant un rendement appréciable, comme l'ont, par exemple, montré Lin *et al.* (2013) en associant des QDs CdSe/CdS/ZnS émettant dans le vert et le rouge et des copeaux de GaN émettant dans le bleu. Des DEL utilisant des QDs sont déjà commercialisées par la société QD Vision (Lexington, MA, USA) et sont utilisées par certaines grandes marques du secteur de l'électronique, notamment dans les écrans plats.

Dans le domaine de la détection, deux exemples récents sont particulièrement intéressants du fait de la simplification des structures utilisées ou de l'amélioration de leur sensibilité. Bu *et al.* (2013) ont montré que des QDs CdSe pouvaient être utilisés pour détecter spécifiquement la présence d'ions Cu^{2+} , via une diminution de la fluorescence répondant à une courbe typique de Stern-Volmer, et ce avec une limite de détection de 5 nM. Cette limite de détection de 5 nM a déjà été rapportée par d'autres auteurs (Chan *et al.* 2010 et Zhang *et al.* 2008), mais en utilisant des QDs plus complexes comme les QDs CdSe/Ag ou CdSe/CdS. Thuy Ung *et al.* (2013) ont développé des QDs CdSe/ZnSe/ZnS couplés à

l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) qui permettent de détecter spécifiquement le parathion méthyl, substance active de produits phytosanitaires, à des concentrations supérieures ou égales à 0,05 ppm. La toxicité de pesticides, comme le parathion, réside dans leur capacité à se lier irréversiblement à l'enzyme AChE, essentielle à l'hydrolyse du précurseur acétylthiocholine (ATCh) en neurotransmetteur acétylcholine (ACh). L'inhibition de l'activité de l'AChE, en présence d'ATCh, s'accompagne d'une chute de pH. Les QDs porteurs d'AChE peuvent être utilisés comme capteur du parathion en présence d'ATCh, dans la mesure où la diminution de pH provoquée par le parathion entraîne une augmentation de l'émission de fluorescence des QDs, comme montrée figure 34.

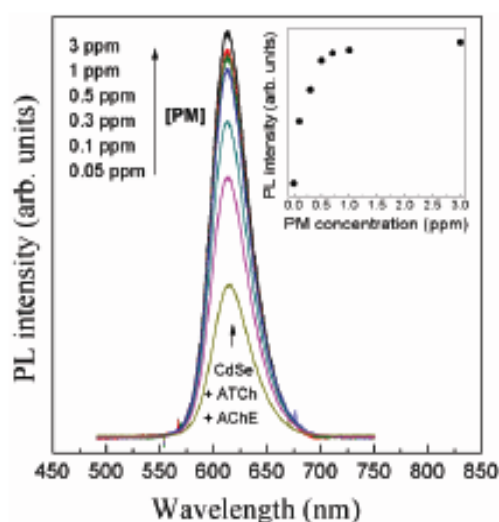


Figure 34. Évolution du RQ des QDs CdSe@AChE en présence d'ATCh et de parathion.

L'utilisation de QDs CdSe comme catalyseur est, par contre, moins répandue, même si l'on trouve quelques exemples dans la littérature. Biswal *et al.* (2013) ont récemment montré que la réaction de production d'hydrogène par craquage de l'eau peut être catalysée par la présence de QDs CdSe, associés ou non à des phosphates de zirconium et de titane.

D'autres applications plus en marge des domaines de recherche classiquement visés par l'étude des QDs apparaissent aussi dans la littérature et démontrent tout le potentiel de ces

nanomatériaux. En 2001, Han *et al.* (2001) ont utilisé des QDs CdSe/ZnS encapsulés dans des billes de polymères pour coder optiquement une série de fragments d'ADN. L'utilisation de seulement six couleurs présentant chacune dix niveaux d'intensité d'émission de fluorescence permettrait en théorie d'apposer un code barre fluorescent sur un million d'acides nucléiques ou de protéines.

Le brevet US 20080277626 A1, déposé par Yang *et al.* en 2005 porte, quant à lui, sur la formulation d'encre fluorescentes à partir de QDs, dont des QDs CdSe, utilisables dans les processus d'impression à jets d'encre, de sérigraphie ou de flexographie. Ces encres présentent divers avantages par rapport aux encres fluorescentes formulées avec des colorants fluorescents classiques, dont une meilleure résistance à l'eau et à la lumière. Elles sont aussi utilisées comme moyen de lutte contre la contrefaçon en marquant spécifiquement certains produits de luxe. À cet égard, une meilleure protection contre la reproduction est possible dans la mesure où les QDs utilisés ne sont que difficilement disponibles dans le commerce, contrairement aux colorants fluorescents organiques.

I.4. Origines de la toxicité des Quantum Dots CdSe

I.4.1. De la nécessité d'évaluer la toxicité des QDs à sa complexité

Qu'ils soient employés pour des applications à visées biomédicales ou non, la toxicité des QDs est un sujet qui a motivé nombre de recherches au cours de la décennie écoulée. Comme nous venons de l'évoquer, les applications utilisant les QDs sont nombreuses et très diverses, allant de la détection précoce de cellules cancéreuses (Gao *et al.* 2004) à la production d'énergie photovoltaïque (Lee *et al.* 2009). Globalement, les questions relatives à la toxicité des QDs et à leur utilisation, rejoignent déjà celles concernant les nanotechnologies en général dont la manipulation n'est encore régie par aucune réglementation spécifique en

Europe. Seule l'indication de la présence de nanomatériaux, dans les cosmétiques, l'alimentation et les pesticides est obligatoire (Fiche INRS ED 6050, Ricaud 2012).

Le manque de connaissances sur les dangers spécifiquement liés aux nanomatériaux a soulevé des inquiétudes légitimes en termes de santé publique et d'environnement. En effet, plus aucun domaine de la vie courante n'échappe à l'essor des nanomatériaux, de la cosmétique où des nanoparticules de TiO_2 sont utilisées comme filtre à UV (Beani 2012), à l'alimentation où ce même TiO_2 est utilisé comme agent blanchissant dans le cas du colorant E171 (Weir *et al.* 2012). Ceci va inévitablement conduire à l'apparition des nanomatériaux dans l'air, l'eau et le sol et donc à l'exposition des organismes avec des conséquences encore mal connues. Judy *et al.* (2011) pointent le transfert de nanoparticules d'or dans la chaîne alimentaire, des algues au zooplancton, dont les poissons se nourrissent. Les sources d'exposition se multiplient (lieu de travail, alimentation, environnement) alors même que nos connaissances concernant le traitement et/ou le stockage de nanomatériaux en fin de vie fait défaut (Wiesner *et al.* 2006). Ma *et al.*, dans une revue de 2013, décrivent l'écotoxicité de nanoparticules d'oxyde de zinc envers différentes espèces de l'environnement terrestre et aquatique, dont *D. magna*, pour laquelle une toxicité est observée dès 1 mg/L. Ils concluent que la multiplication des sources de relargage des nanomatériaux dans l'environnement risque de devenir problématique pour certaines plantes et animaux. Velzeboer *et al.* (2013) ont réalisé une étude montrant l'influence des nanotubes de carbone sur la structuration de communautés benthiques. Après 15 mois d'exposition aux nanomatériaux, la biodiversité est affectée, avec notamment une diminution d'environ 80% des insectes de type Cloeon dans le cas d'une exposition à 0,02 g/kg en nanotubes de carbone.

Parallèlement au nombre croissant de publications relatives à l'écotoxicité des nanomatériaux, différents organismes nationaux, comme le National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) aux États-Unis ou l'Institut National de Recherche

et de Sécurité (INRS) en France, multiplient leurs recommandations concernant la manipulation des nanomatériaux. Ainsi la fiche INRS ED 6050 (Ricaud 2012), traitant de l'exposition professionnelle aux nanomatériaux, pointe le fait qu'une diminution des temps d'exposition des travailleurs doit impérativement primer, dans la mesure où même si l'évaluation qualitative des risques permet de prioriser les actions de prévention, aucune valeur limite d'exposition professionnelle pour les nanomatériaux n'a été définie.

Dans un registre plus spécifique, les QDs se sont révélés être des matériaux de choix en bioimagerie comme nanosondes fluorescentes. Leurs propriétés de photoluminescence, ajustables à façon, permettent, par exemple, la synthèse de différentes nanosondes utilisables simultanément, car ne présentant pas de recouvrement spectral. Par exemple, Aldeek *et al.* (2011) ont utilisé deux types de QDs à cœur CdSe, l'un hydrophile émettant dans le rouge et l'autre hydrophobe émettant dans le vert, pour imager différents domaines d'un même biofilm bactérien. Les imageries des biofilms ont alors montré une répartition homogène des QDs hydrophiles, le biofilm contenant 90% d'eau, alors que les QDs hydrophobes ont permis d'imager spécifiquement des microdomaines hydrophobes.

Leur stabilité photophysique et leur rendement quantique de fluorescence élevé font que les QDs se sont également révélés être des sondes suffisamment sensibles pour imager le déplacement d'une seule macromolécule dans un système biologique. Sonesson *et al.* (2007) ont, pour la première fois, décrit la conjugaison de lipases à des QDs dans le but d'observer le déplacement des enzymes sur une surface de trimyristine. Sur le principe, de telles applications ne sont envisageables que si les QDs n'interfèrent pas avec la structure ou le fonctionnement du matériel biologique étudié. Il est donc primordial que les QDs utilisés n'altèrent pas le matériel biologique et présentent une toxicité nulle ou très limitée, au moins durant l'expérience.

Historiquement, la toxicité des QDs a d'abord été attribuée aux métaux susceptibles d'être relargués à partir du cœur photoactif. Derfus *et al.* (2004) ont montré que la cytotoxicité de QDs CdSe@MAA est directement corrélée à la libération d'ions Cd²⁺. Dans de nombreux cas, il a cependant été montré que la toxicité des QDs pouvait être supérieure à celle de leur contenu en métal, impliquant nécessairement au moins une autre source de cytotoxicité (Schneider *et al.* 2009). Dans ce contexte, Lu *et al.* (2008) ont établi un lien direct entre l'activité antibactérienne de QDs CdTe@MSA et la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (EROs). Lee *et al.* (2009) ont effectué des études de cytotoxicité sous différentes conditions d'éclairement (lumière naturelle, UV-B, fluorescence blanche, obscurité) qui ont montré que la toxicité des QDs pouvait augmenter d'un facteur 6 sous illumination, preuve d'une phototoxicité des QDs. Les auteurs ont avancé l'hypothèse d'une toxicité liée, au moins partiellement, à production d'EROs.

Au niveau du système bactérien, Schneider *et al.* (2009) ont également montré que les QDs CdTe@TGA, plus toxiques que les ions Cd²⁺ les constituant, présentaient une toxicité lumière-dépendante. Des expériences menées par l'équipe de Nadeau sur le système bactérien ont également montré qu'une souche d'*Escherichia coli* mutante pour *oxyR* (déficiente dans sa réponse au stress oxydant) présentait une plus grande sensibilité à des QDs CdTe que la souche parentale capable de lutter contre les EROs (Dumas *et al.* 2009).

Il est donc clair que la toxicité des QDs présente au moins deux origines, la libération de métaux et la génération d'EROs. Celles-ci sont respectivement liées à la dissolution du cœur photo-actif et à la réactivité des nanoparticules et sont toutes deux dépendantes de la structure des QDs. Il est donc légitime de se demander dans quelle mesure les différentes caractéristiques intrinsèques des QDs peuvent influencer leur toxicité. Pour avancer sur cette question, il faudrait pouvoir comparer et hiérarchiser les niveaux de toxicité des QDs en fonction de leur structure. Une recherche bibliographique compilant 62 publications portant

sur la cytotoxicité de QD à cœur CdSe montre qu'une telle comparaison n'est cependant pas possible à l'heure actuelle dans la mesure où les différentes études réalisées mettent en jeu trop de modèles d'étude, de cibles ou de méthodologies différents (Annexe 1). À titre d'exemple, Green *et al.* (2005) et Liang *et al.* (2007) ont, respectivement, observé les dommages créés par des QDs de CdSe@biotine et CdSe@MAA sur l'ADN, et plus particulièrement l'apparition de coupures simple brin, par des méthodologies différentes (respectivement par électrophorèse et par marquage de l'ADN double brin au Ru(biπ)₂dppx²⁺) et à des durées d'exposition différentes (respectivement 60 et 110 minutes). De telles différences méthodologiques, aussi petites soient-elles, rendent impossible une éventuelle comparaison des QDs au regard de leurs effets sur l'ADN. Cette comparaison est d'autant plus difficile/impossible que les modèles ou cibles biologiques diffèrent souvent de manière importante.

Les publications parues ces dix dernières années ont cependant permis d'accéder à des informations concernant l'influence de certains paramètres physico-chimiques (taille de la particule, ligand stabilisant utilisé ou sa charge) sur la cytotoxicité de la nanoparticule, lorsque différentes structures ont été comparées simultanément dans une même étude sur un même modèle biologique.

Ainsi Lovrić *et al.* (2005) ont montré que des QDs CdTe@cystéamine de diamètre égal à 2,2 nm présentaient une cytotoxicité plus importante que des QDs CdTe@cystéamine de 5,2 nm. L'utilisation de la microscopie confocale a permis aux auteurs de montrer que les QDs de 2,2 nm s'accumulent dans le noyau des cellules étudiées alors que les QDs de 5,2 nm s'accumulent en périphérie dans le cytoplasme. Lovrić *et al.* ont émis l'hypothèse selon laquelle la taille des particules peut influencer leur biodistribution et donc leur toxicité, au moins pour le système eucaryote (Figure 35).

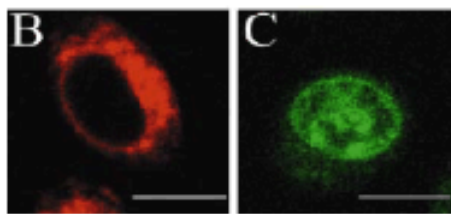


Figure 35. Distribution de QDs CdTe@cystéamine de (b) 5,2 nm et (c) 2,2 nm dans des cellules tumorales de rat (phéochromocytome).

Nagy *et al.* (2012) ont, quant à eux, montré qu'à cœur CdSe identique, des QDs ligandés par différentes espèces chimiques induisaient différents niveaux d'activité de lactate déshydrogénase chez des cellules pulmonaires, ce qui révèle des niveaux de nécrose cellulaire et donc des toxicités différentes. Les auteurs ont clairement établi un classement montrant que la charge des QDs est un facteur clé influençant la toxicité, si on le compare à la nature des ligands et à la taille. À taille et ligand comparables, les QDs chargés positivement se sont révélés plus toxiques que les QDs chargés négativement. À cœur équivalent (5 nm), des QDs porteurs de ligands cystéamines (chargés positivement) se sont révélés être nécrosants dès 3,5 $\mu\text{g/mL}$ alors que ceux porteurs du ligand MPA (chargés négativement) ne provoquent pas d'élévation notable de l'activité de l'enzyme lactate déshydrogénase. À cœur (3 nm) et charge égaux, les ligands les plus volumineux se sont montrés être les plus toxiques. En effet, alors que des QDs stabilisés avec des ligands cystéamines ne semblent pas nécrosants, une élévation de l'activité de l'enzyme lactate déshydrogénase est observée avec le ligand acide mercaptoundécanoïque (MUA). Parallèlement à la simple évaluation de la toxicité, les auteurs ont essayé de déterminer pourquoi un ligand aurait plus d'influence qu'un autre. Ils ont alors souligné le fait que l'augmentation de la cytotoxicité des QDs porteurs de ligands plus encombrants, et celle de QDs porteurs de ligands chargés positivement pourraient respectivement être due à une production d'EROs plus importante ou à des interactions avec des cibles cellulaires différentes. Les QDs CdSe@MPA, chargés négativement, semblent

préférentiellement cibler les membranes cytoplasmiques, alors que les QDs CdSe@cystéamine, chargés positivement, interagiraient plus avec les mitochondries.

La toxicité d'un QD apparaît donc dépendante de nombreux paramètres structuraux, sans pour autant que les cibles ou la contribution relative de chacune des origines de la toxicité ne soient clairement définies. En effet, même si certains paramètres structuraux influencent la production d'EROs, la contribution de la libération de métal vs la production d'EROs en fonction de la structure étudiée ne peut clairement être prédite. Dans les paragraphes qui suivent, nous nous attacherons à définir précisément les différents mécanismes afférents aux origines connues de la toxicité qui seront étudiées dans la suite de ce mémoire. Les mécanismes de formation d'EROs par les QDs, liés à la réactivité des structures, ainsi que leurs cibles cellulaires et les moyens permettant leur détection seront d'abord expliqués. Nous nous intéresserons ensuite aux effets possibles de la libération de métaux, liés à la dissolution des particules, sur le matériel biologique.

I.4.2. Réactivité des Quantum Dots : génération d'Espèces Réactives de l'Oxygène

I.4.2.1. Mécanismes de formation

Une partie de la toxicité des QDs CdSe est attribuée à la production EROs. Sur le principe, lorsque les QDs sont excités par une lumière UV ou visible, les électrons (e^-) de la bande de valence peuvent être promus à la bande de conduction et des trous (h^+) apparaissent dans la bande de valence (Figure 36).

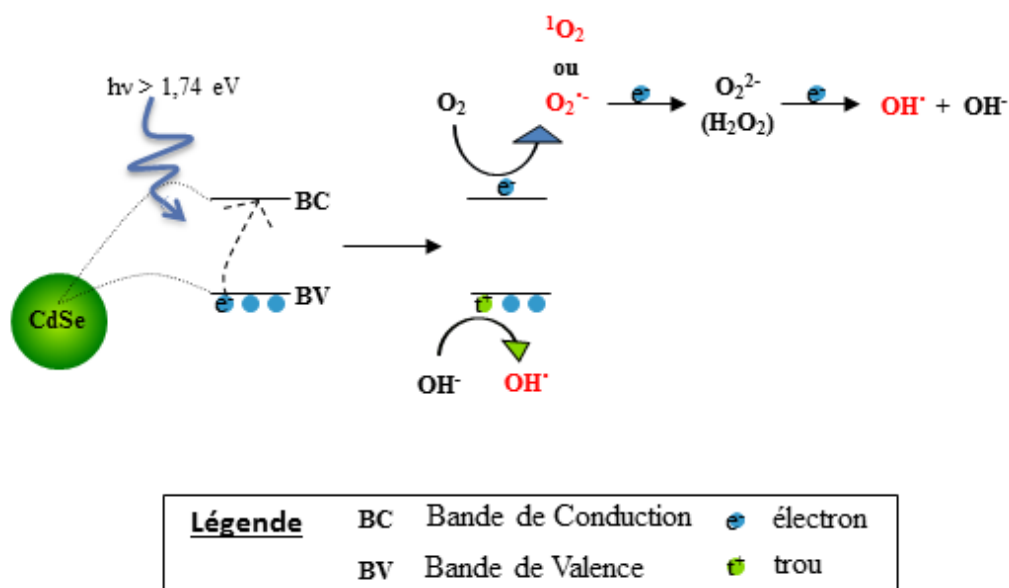


Figure 36. Production d'EROs par les QDs

L'oxygène moléculaire présent peut piéger les électrons passés dans la bande de conduction et former des radicaux superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet-}$), tandis que les trous peuvent oxyder des groupements hydroxyles ou de l'eau chimisorbée à la surface des particules pour donner naissance à des radicaux $\text{OH}^\bullet$ (Gardes-Albert *et al.* 2003). Il s'agit de réactions de formation d'EROs de type I.

Les QDs CdSe peuvent aussi générer de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) selon une réaction dite de type II, impliquant d'abord l'excitation du QD, puis la conversion intersystème de l'électron promu, de son état singulet à son état triplet. Un transfert d'énergie depuis cet état triplet à l'oxygène moléculaire présentant un état triplet, génère finalement l'oxygène singulet.

Le niveau d'EROs générés par des QDs photoactivés peut facilement être évalué à l'aide de sondes colorimétriques. Anas *et al.* (2008) ont montré que la production de radicaux superoxydes par des QDs CdSe/ZnS pouvait être quantifiée via la réduction du NitroBlue Tetrazolium (NBT), jaune pâle, en dérivés du formazan, violets. La production de radicaux hydroxyles peut, quant à elle, être spécifiquement évaluée à l'aide du téréphtalate de sodium

(DST) qui après réaction avec les radicaux hydroxyles est converti en 2-hydroxytéréphtalate (HTA) qui exprime une intense fluorescence centrée à 428 nm (Llopis *et al.* 2011).

I.4.2.2. Cibles cellulaires des EROs et stress oxydant

Les EROs formés par les QDs peuvent occasionner des effets délétères sur le matériel biologique, comme expliqué par Freinbichler *et al.* (2011), en endommageant des macromolécules biologiques (lipides membranaires, acide nucléiques (ADN ou ARN), protéines), et donc les structures biologiques auxquelles elles sont associées (membranes, machineries cellulaires,...). La relation entre nanoparticule, production d'EROs et dommage sur biomolécules a déjà été démontrée dans de nombreux cas.

Dutta *et al.* (2012) ont montré une élévation des niveaux de malondialdéhyde, sous-produit de la peroxydation des lipides, corrélée à une production d'EROs par les nanoparticules d'oxyde de zinc placées sous illumination. Cette production d'EROs serait à l'origine de l'activité antibactérienne de nanoparticules de ZnO.

Freinbichler *et al.* (2011) pointent aussi le fait que d'autres espèces radicalaires peuvent apparaître, les EROs pouvant réagir avec une variété de biomolécules et générer d'autres espèces radicalaires comme les peroxydes de lipides. Les radicaux hydroxyles, en particulier, présentent une réactivité élevée et ne parcourent que quelques angströms avant d'interagir avec d'autres molécules qui, à leur tour, auront des effets délétères dans la cellule. Les peroxydes de lipides formés par la réaction des radicaux hydroxyles avec les lipides insaturés peuvent ainsi mener à la destruction des fonctions diènes des acides gras insaturés avec des conséquences évidentes sur l'intégrité membranaire. De manière générale, une augmentation du niveau d'EROs va contribuer à une déstabilisation de la balance redox cellulaire qui se manifestera notamment par une déplétion en molécules antioxydantes. Au niveau cellulaire, cet état se définit comme un « stress oxydant » (Storz *et al.* 2000).

À l'état naturel, la principale source d'EROs susceptible de générer un stress oxydant est liée à la chaîne respiratoire (D'Autréaux *et al.* 2007). En état de fonctionnement normal, la chaîne respiratoire est définie comme une série de transporteurs d'électrons membranaires qui agissent de concert pour transférer les électrons du NADH (pouvoir réducteur produit par le métabolisme central) vers un accepteur terminal qui permettra de les dissiper. Dans le cas de la respiration aérobie, c'est l'oxygène moléculaire qui est utilisé comme accepteur terminal. Il est réduit en H₂O. Chez *E. coli*, mais aussi chez d'autres organismes, il a été montré que le radical O₂^{•-} est un sous-produit de la respiration aérobie. Il serait notamment généré par les NADH déshydrogénases qui permettent le transfert d'électrons du NADH vers l'ubiquinone (coenzyme Q) (D'Autréaux *et al.* 2007, Messner *et al.* 1999). L'O₂^{•-} est ensuite dismuté spontanément ou enzymatiquement (par une superoxyde dismutase) pour former de l'H₂O₂ qui est finalement réduit en OH[•] par réaction de Fenton. Ces EROs présentent une sélectivité variable pour différentes cibles cellulaires. Ainsi les radicaux O₂^{•-} présentent une sélectivité pour les centres Fe-S, alors que les radicaux OH[•] peuvent réagir avec tous types de biomolécules (Figure 37).

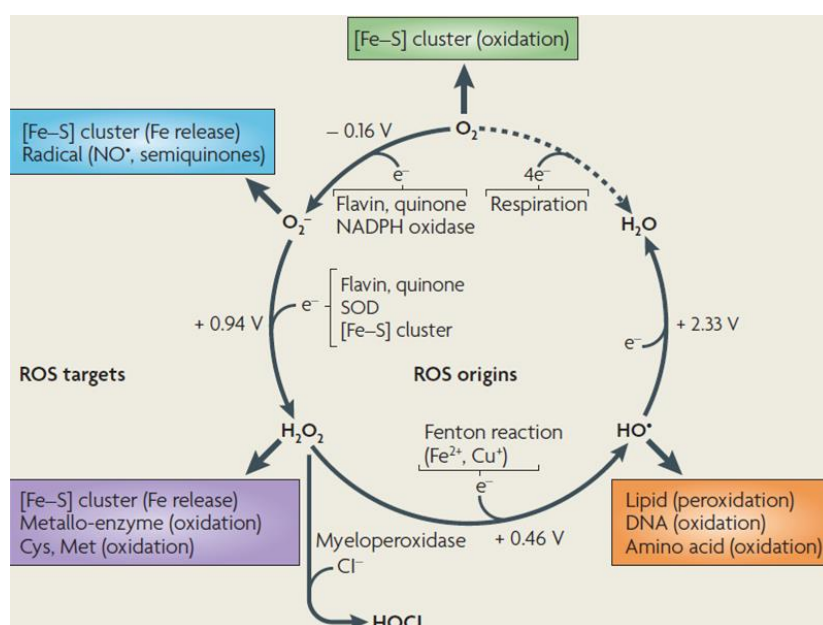


Figure 37. Sources et cibles des EROs dans la cellule (D'Autréaux *et al.* 2007) : Les EROs ($O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 , $HO^{\bullet}$) sont produits par différentes biomolécules (enzymes, co-enzymes, ... : présentées au centre du cercle). Chaque ERO réagit avec des cibles biologiques privilégiées (cases colorées à l'extérieur du cercle).

L'élévation de la concentration en EROs au niveau cellulaire est impliquée dans de nombreuses affections chez les organismes supérieurs, telles que les maladies neurodégénératives (Halliwell 2001), le développement de tumeurs cancéreuses (Xia *et al.* 2007) ou les pathogénies accompagnant l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (Pace *et al.* 1995). Il serait cependant erroné de ne voir les EROs que sous un angle négatif pour la cellule. Ces derniers jouent un rôle important dans le fonctionnement de certains organismes. Au niveau cellulaire par exemple, les macrophages sont capables de reconnaître des agents infectieux et de les internaliser dans des vésicules appelées phagosomes. Ces vésicules se maturent alors en phagolysosomes qui délivrent différents agents antimicrobiens accompagnés d'une production abondante d' $O_2^{\bullet -}$, selon un processus appelé « burst oxydatif », qui participe à la destruction des microbes phagocytés (Slauch, 2011). Selon un schéma similaire, la réponse dite « hypersensible » chez les plantes correspond à un mécanisme de défense contre l'agression de pathogènes impliquant la

production « programmée » d'EROs. La mise en place d'un « burst oxydatif » sur le site infectieux permet de lutter contre l'agent pathogène mais aussi de déclencher une mort cellulaire des tissus avoisinants, conduisant à une nécrose, et permettant de limiter la propagation de l'infection (Lamb *et al.* 1997).

Qu'elle soit impliquée dans des mécanismes de défense ou qu'elle résulte de la respiration, l'émission d'EROs se doit d'être encadrée/maîtrisée pour en limiter les effets délétères. À cet égard, de nombreux organismes sont munis de mécanismes de défenses permettant d'endiguer le stress oxydant lié à la présence d'EROs. Globalement, qu'il soit d'origine naturelle (respiration) ou exogène, le niveau d'EROs est activement contrôlé par des réactions de détoxification, aussi bien chez certaines bactéries, que chez des organismes supérieurs. Ainsi de nombreux schémas communs, tels que l'utilisation de composés antioxydants, d'enzymes de détoxification, et indirectement la mise en place de systèmes de réparations des dégâts, permettent de lutter contre le stress oxydant.

La réponse au stress oxydant a été particulièrement étudiée chez la bactérie *E. coli* qui est devenue le modèle bactérien d'où proviennent les bases de notre connaissance des mécanismes de défense contre l'exposition aux EROs (Storz *et al.* 2000). L'exposition d'*E. coli* à $O_2^{\bullet-}$ ou H_2O_2 , conduit à l'activation de différents gènes codant pour des fonctions permettant de lutter contre le stress oxydant. On recense ainsi pas moins d'une trentaine de gènes spécifiquement induits en présence d'un excès d' H_2O_2 (Tableau 4, Zheng *et al.* 2001), parmi lesquels des gènes codant pour l'expression d'enzymes de détoxification (i.e. *katG* et *sodA* codant pour l'hydroperoxidase I et la manganese superoxide dismutase, respectivement), ou encore des gènes permettant de limiter le niveau de fer libre intracellulaire (i.e. *fur* codant pour le « ferric uptake repressor ») (Storz *et al.* 2000).

Tableau 4. Les 30 gènes les plus induits chez *E. coli* en présence d'H₂O₂ et leurs fonctions (Zheng *et al.* 2001).

Gène	Facteur d'induction	Fonction
<i>dps</i>	180	Stress response DNA binding protein
<i>yaiA</i>	56	Inconnue
<i>katG</i>	44	Catalase hydrogen peroxidase I
<i>grxA</i>	37	Glutaredoxin I
<i>yfiA</i>	36	Inconnue
<i>ibpA</i>	29	Chaperone, heat-inducible protein of HSP20 family
<i>yjiD</i>	29	Inconnue
<i>ycfR</i>	26	Inconnue
<i>ahpF</i>	22	Alkyl hydroperoxide reductase large subunit
<i>trxC</i>	21	Thioredoxin II
<i>sufA</i>	21	Homology with IscA
<i>ymgB</i>	20	Inconnue
<i>ahpC</i>	20	Alkyl hydroperoxide reductase small subunit
<i>ibpB</i>	18	Chaperone, heat-inducible protein of HSP20 family
<i>yaaA</i>	18	Inconnue
<i>tnaA</i>	18	Tryptophanase
<i>fpr</i>	17	Ferredoxil NADP+ reductase
<i>cysK</i>	16	Cysteine synthase
<i>sufB</i>	16	Inconnue
<i>dsdX</i>	15	Homology with gluconate permease
<i>ybjM</i>	15	Inconnue
<i>yeeD</i>	14	Inconnue
<i>dsdA</i>	13	d-Serine deaminase
<i>soxS</i>	13	Regulatory protein of <i>soxRS</i> regulon
<i>sbp</i>	12	Periplasmic sulfate binding protein
<i>sufC</i>	12	Putative ABC transporter
<i>phoH</i>	12	Member of <i>pho</i> regulon
<i>hemH</i>	11	Ferrochelatase
<i>yliA</i>	11	Inconnue
<i>ycgZ</i>	11	Inconnue

Typiquement, les enzymes de détoxification favorisent l'élimination des EROs, alors que la répression des systèmes d'import du fer permet de limiter les réactions de Fenton et donc limite la formation de radicaux OH[•]. Les gènes de réponse au stress oxydant s'organisent en régulons pour permettre une expression coordonnée des différentes fonctions impliquées. Un régulon correspond à un groupe de gènes régulé de manière concertée par une même protéine régulatrice. Chez *E. coli*, la réponse au stress oxydant est organisée autour de deux grands régulons, *soxR* et *oxyR*, impliquant respectivement les protéines régulatrices SoxR (pour la réponse au O₂^{•-}) et OxyR (pour la réponse à H₂O₂). Ces deux protéines jouent le rôle de senseur et changent d'état en présence d'EROs spécifiques (Green *et al.* 2004). L'exposition de la protéine OxyR à H₂O₂ conduit à la formation d'un pont disulfure entre

deux cystéines, la rendant capable d'activer l'expression des gènes de son régulon en interagissant spécifiquement avec leur région promotrice (Figure 38).

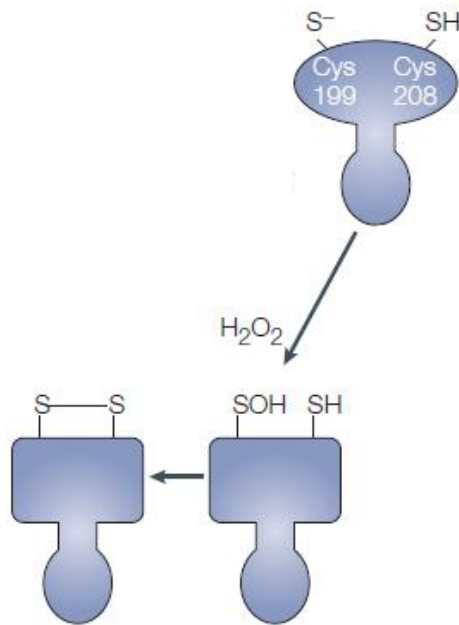


Figure 38. Représentation schématique du changement de conformation de la protéine OxyR conduisant à l'expression des gènes de son régulon. Les résidus 199 et 208 participent à la formation d'un pont disulfure en présence d' H_2O_2 .

De même, le régulateur SoxR devient actif après le changement du niveau redox de son centre Fe-S en présence d' O_2^- (Figure 39).

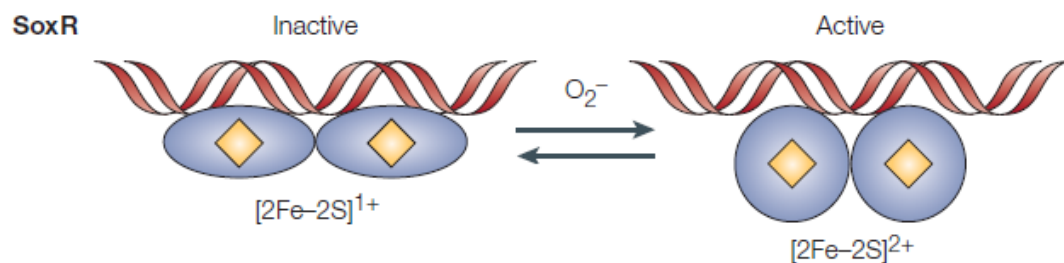


Figure 39. Représentation schématique du changement de conformation de la protéine SoxR conduisant à l'expression des gènes de son régulon.

Notons ici que si les bactéries, ou plus largement de nombreux organismes, déclenchent une réponse au stress oxydant en présence d'EROs. Être capable de détecter la mise en place d'une telle réponse permet d'évaluer la perception qu'à l'organisme de son environnement redox. En d'autres termes, détecter une activation de l'expression des gènes des régulons *oxyR* ou *soxR* revient à détecter la perception d'un stress oxydant par *E. coli*. Un tel système de détection est rendu possible par l'utilisation de biosenseurs bactériens, qui sont des microorganismes génétiquement modifiés pour exprimer un signal quantifiable (luminescence, fluorescence, activité enzymatique, ...) en réponse à un stress défini.

Les biosenseurs bactériens sont des détecteurs basés sur l'expression de gènes dans des conditions spécifiques. Pour qu'un gène soit exprimé, l'ADN correspondant doit d'abord être converti en ARN par le biais de l'ARN polymérase lors d'une étape appelée transcription. Cette étape commence par la fixation de l'ARN polymérase sur le promoteur situé en amont des gènes à transcrire, puis est suivie par la synthèse de l'ARN qui sera éventuellement traduit en protéines. La présence d'un régulateur transcriptionnel permet d'inhiber ou d'activer l'initialisation de la transcription. Chez *E. coli*, en présence d' H_2O_2 , le régulateur OxyR adopte une conformation qui lui permet de se lier spécifiquement au promoteur des gènes du régulon *oxyR* où il stabilise l'ARN polymérase et favorise donc l'expression des gènes concernés. Sur ce principe, si on remplace l'un des gènes du régulon *oxyR* par un gène rapporteur, comme le gène de la GFP (Green Fluorescent Protein), ce dernier sera sous le contrôle d'un promoteur régulé par le stress oxydant (Figure 40). En d'autres termes, la GFP sera produite en réponse à l'activation d'OxyR par H_2O_2 et la bactérie émettra une fluorescence verte quantifiable lorsque la bactérie percevra un stress oxydant. De tels biosenseurs ont été utilisés dans ce travail. Il s'agit de bactéries dérivées d'*E. coli* MG1655 où le gène de la GFP a été placé sous le contrôle du promoteur P_{oxyR} ou du promoteur P_{soxR} des régulons *oxyR* et *soxR* respectivement.

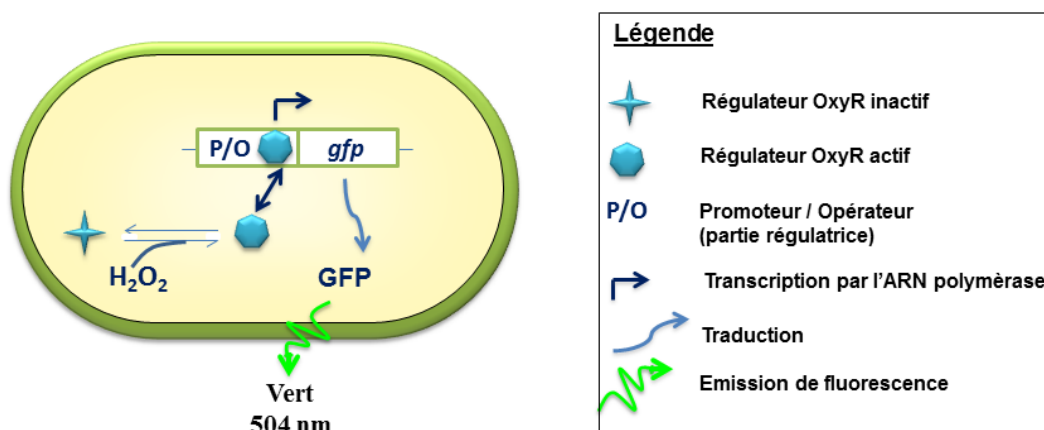


Figure 40. Structure d'un biosenseur bactérien répondant au stress oxydant.

I.4.3. Instabilité des Quantum Dots : libération de métaux

L'instabilité ou la biodégradation des nanoparticules de CdSe conduit à la libération d'ions métalliques toxiques Cd^{2+} (Bellavere *et al.* 1981). Les propriétés chimiques particulières des métaux, dont leur capacité à se lier à des atomes donneurs d'électrons (O, S, N), ou à participer à des réactions d'oxydo-réductions, peuvent conduire à des effets délétères sur la cellule avec notamment l'apparition de stress oxydant, des altérations structurales ou encore des dysfonctionnements physiologiques/enzymatiques. Les mécanismes impliqués dans la toxicité des métaux ont récemment été résumés dans une revue de Lemire *et al.* (2013).

I.4.3.1. Les mécanismes à la base de la toxicité des ions Cd^{2+}

- *Production d'EROs et déplétion en molécules antioxydantes* : de nombreuses études ont montré qu'à doses toxiques, la présence de certains ions métalliques tels que le Fe^{2+} (Touati *et al.* 1995) et le Cu^{2+} (Macomber *et al.* 2007) entraîne une élévation du niveau d'EROs intracellulaire. Les éléments traces métalliques, assimilables à des acides faibles ou intermédiaires, présentent une aptitude à former des liaisons covalentes avec l'élément soufre, que l'on rencontre notamment sur les groupements

thiols des protéines, ou sur des molécules antioxydantes comme le glutathion (GSH). En interagissant avec des molécules antioxydantes telles que le GSH, le métal contribue à une diminution du niveau de protection contre les EROs, ce qui génère alors un stress oxydant. Dans le cas particulier des ions Cd^{2+} , Harrison *et al.* (2009) ont montré que l'augmentation anormale du niveau d'EROs chez *E. coli* est corrélable à une diminution du niveau de glutathion sous sa forme réduite. Dans un autre registre, certains métaux comme le Fer sont impliqués dans des réactions de Fenton qui conduisent à la formation d'EROs très réactifs ($\text{OH}^\bullet$) à partir d' H_2O_2 . Si le Cd^{2+} n'est a priori pas impliqué dans des réactions de Fenton, certains auteurs mentionnent tout de même le fait qu'il peut déplacer le fer ou le cuivre de nombreuses biomolécules. Les ions Fe^{2+} ou Cu^{2+} , une fois libérés, peuvent enclencher des réactions de Fenton (Valko *et al.* 2005).

- *Dysfonctionnement des protéines et perte de l'activité enzymatique* : une partie de la toxicité des métaux est attribuable à des altérations du fonctionnement de protéines, conduisant parfois à des pertes d'activités enzymatiques. La substitution d'un métal par un autre est une source de dysfonctionnement enzymatique, en particulier quand le métal déplacé prenait part à l'activité catalytique. D'autre part, des travaux menés par Xu *et al.* (2012) ont montré que des métaux de type acide faible, comme les ions Cd^{2+} peuvent spécifiquement endommager les centres Fe-S de certaines protéines conduisant de fait à l'inactivation des activités catalytiques concernées.
- *Altération des fonctions membranaires* : les membranes cellulaires contiennent de nombreuses macromolécules (lipides, protéines, phospholipides,...), porteuses de groupements fortement électronégatifs qui peuvent servir de sites d'adsorption aux cations métalliques (Zhang *et al.* 2008). Du fait de cette capacité à coordonner les métaux, il a logiquement été envisagé que la membrane soit l'un des sièges

principaux de l'action des métaux. La relation de cause à effet entre la présence de métaux et la perte d'intégrité membranaire n'est cependant pas clairement établie. Howlett *et al.* (1997) ont montré une peroxydation des lipides membranaires chez la levure après exposition à des ions Cd^{2+} . Cette peroxydation serait indirectement liée à des réactions de Fenton. Notons que la membrane est aussi le siège d'activités physiologiques importantes, comme le transport de nutriments ou la respiration qui, par leur exposition, peuvent devenir des cibles préférentielles. L'interférence entre Cd^{2+} et chaîne respiratoire a été soulignée à plusieurs reprises (Surowitz *et al.* 1984) et serait d'ailleurs une cause du stress oxydant discuté précédemment (Pacheco *et al.* 2008).

- En inhibant l'apport en nutriments essentiels, par encombrement des sites d'interaction où les nutriments se fixent habituellement, certains métaux génèrent un état de carence nutritive qui provoque un arrêt de la croissance. À ce jour, aucune étude ne semble avoir montré que le cadmium pouvait générer un tel état de carence.
- *Génotoxicité* : de nombreux métaux sont connus pour altérer l'intégrité de l'ADN, au moins *in vitro*. Des essais de génotoxicité, effectués par Nishioka *et al.* (1975), et basés sur le test de Ames, ont montré que des ions métalliques, dont Cd^{2+} , pouvaient être mutagènes. Cependant, rien n'indique qu'aux doses utilisées *in vitro* pour démontrer des effets sur l'ADN, la cellule soit encore intègre dans des études *in vivo*.

I.4.3.2. Détection du cadmium biodisponible

Si une partie de la toxicité des QDs CdSe est liée à la libération de métal, il est utile de pouvoir déterminer la fraction de Cd entrant en contact avec la cellule. Comme pour la détection des EROs, il existe des biosenseurs utilisables pour quantifier les ions Cd^{2+} biodisponibles libérés par les QDs CdSe. Ce biosenseur bactérien est constitué d'un

promoteur, répondant spécifiquement aux ions Cd^{2+} , fusionné à un gène rapporteur (Figure 41). À cet égard, la bactérie du sol *Cupriavidus metallidurans* CH34 est connue pour ses nombreux gènes de résistance aux éléments traces métalliques (Mergeay *et al.* 1985). Certains de ces gènes présentent une régulation spécifique liée à la présence de métaux, dont le Cd, et ont permis d'élaborer une batterie de biosenseurs à métaux (Van der Lelie *et al.* 1997). *C. metallidurans* CH34 a ainsi été génétiquement modifiée pour obtenir le biosenseur AE1433, qui correspond à une fusion entre le gène *czcS* et le système rapporteur *luxCDABE*. Le gène *czcS* est impliqué dans la résistance au cadmium, au zinc et au cobalt, et se trouve sous le contrôle d'un promoteur régulé positivement en présence de Cd^{2+} biodisponibles. L'opéron *luxCDABE* (groupe de gènes exprimé à partir d'un même promoteur) code pour une luciférase (LuxAB) et une réductase d'acide gras (LuxCDE) qui, ensemble, permettent l'émission de luminescence chez *V. fischeri*. La fusion *czcS-luxCDABE* permet donc d'observer une émission de luminescence proportionnelle à la concentration en Cd^{2+} biodisponibles, tant que le métal n'atteint pas des doses toxiques (Corbisier *et al.* 1998).

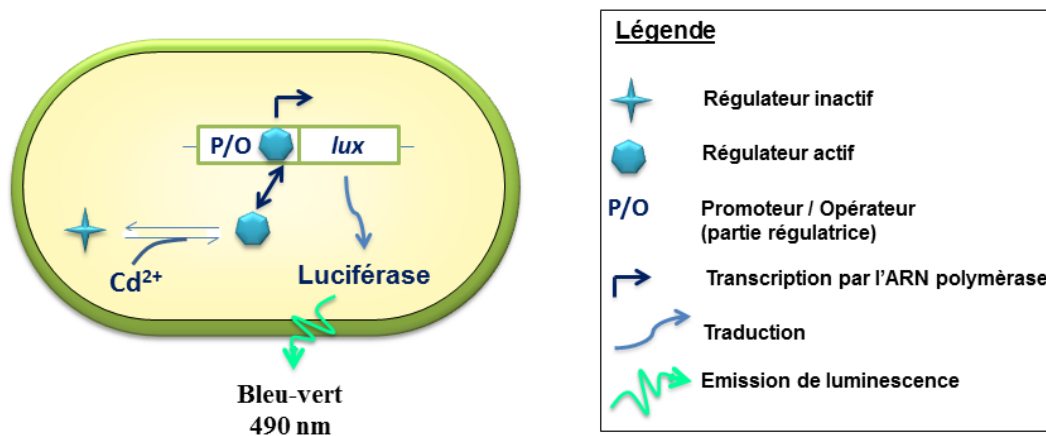


Figure 41. Structure d'un biosenseur bactérien répondant au Cd^{2+} biodisponibles.

I.4.3.3. Production d'espèces sélénées

La dégradation de QDs CdSe doit automatiquement entraîner la libération d'espèces sélénées, parallèlement à la libération d'ions Cd^{2+} . Mahendra *et al.* (2008) ont montré par chromatographie en phase gazeuse que la dissolution complète de QDs CdSe donne lieu à l'apparition de sélénite (SeO_3^{2-}) et de sélénate (SeO_4^{2-}). Or, l'espèce susceptible d'être majoritaire, le sélénite dans un ratio 99/1, est également celle qui présente la plus forte toxicité. Wiecinski *et al.* (2013) ont récemment montré qu'à doses égales, l'exposition d'embryons et de larves de poissons zèbres, organismes modèles de laboratoire, au sélénite et au sélénate, entraînaient, respectivement une forte mortalité et une absence de toxicité. Dans le cas des QD CdSe, une éventuelle toxicité du Se libéré par la nanoparticule dépendra donc d'abord de la spéciation du Se. Notons toutefois que dans une revue récente, Zwolak *et al.* (2012) expliquent que dans une certaine mesure l'action du sélénium, et principalement des sélénites, dans des organismes exposés au cadmium, peut contrecarrer le stress oxydant induit par celui-ci. Zhou *et al.* (2009) ont montré que la production d'EROs, dans des cellules rénales porcines exposées au cadmium, pouvait être diminuée par la co-exposition des cellules à différentes concentrations en sélénite de sodium.

Chapitre II

Matériels et Méthodes

II.1. Réactifs et produits

Le tripeptide glutathion réduit (GSH, 97%), le disodium téréphtalate (DST, 99%) et le β -glycérophosphate de sodium pentahydraté (99%) sont obtenus auprès de Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). Le chlorure d'ammonium (NH_4Cl), le gluconate de sodium (98%), le chlorure de nickel dihydraté ($\text{NiCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et l'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4) sont obtenus auprès d'Acros Organics (Geel, Belgique). L'iso-propanol (*i*-PrOH, HPLC grade), l'acétate d'éthyle (HPLC grade), le méthanol (MeOH, HPLC grade), le glycérol (ACS analysis grade 99,9 %) et le chlorure de magnésium hexahydraté ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 98%) sont obtenus auprès de Carlo Erba (Val de Reuil, France). Le diméthylsulfoxyde (DMSO, 99,7%), le sel de 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate et d'ammonium ferrique ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{NH}_4\cdot\text{citrate}$, 16,5-18,5% de fer, 9% NH_3 , 65% acide citrique hydraté) et le chlorure de cobalt hexahydraté ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 98%) sont obtenus auprès de Fisher Scientific (Elancourt, France). L'agar (Microbiology grade), le chlorure de potassium et le sulfate de sodium (Na_2SO_4 , analysis grade) sont obtenus auprès de Merck (Fontenay-sous-bois, France). Le chlorure de sodium (NaCl), l'acide chlorhydrique (HCl , 18%), l'acide borique (H_3BO_3), le chlorure de cuivre dihydraté ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et le molybdate de sodium dihydraté ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) proviennent de la gamme Rectapur de chez Prolabo (Paris, France). La poudre de sélénium (Se^0 , 99,5%), le borohydrure de sodium (NaBH_4 , 98%), l'acide mercaptosuccinique (MSA, 97%), l'acide 3-mercaptopropionique (MPA, 99%), l'acide thioglycolique (TGA, 98%), la thiourée (99%), le citrate de sodium dihydraté (99%), la L-cystéine (97%), le chlorure de cadmium hemipentahydraté ($\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, 99%), l'oxyde de sélénium (SeO_2 , 99,9%), le sélénite de sodium (Na_2SeO_3 , 99%), le Rose Bengale (95%), le chlorure de NitroBlueTetrazolium (NBT, 98%), le D-Mannitol (98%), le 2-bromoterephtalic acid (95%), l'hydroxyde de sodium (NaOH en pastilles), l'hydroxyde de potassium (KOH en pastilles), l'acétate de sodium (ReagentPlus, 99%), la tétracycline (Tc, bioreagent grade), la kanamycine (Km, bioreagent grade, forme A

majoritaire), l'acide 4-morpholinepropanesulfonique (MOPS, 99,5%), le 2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol (TRIS, 99,9%), le chlorure de calcium dihydraté ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99%), le chlorure de zinc (ZnCl_2 , 99,9%), le chlorure de manganèse tétrahydraté ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 99%), le phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4 , 99%) et le sulfate de magnésium heptahydraté ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 98%) sont obtenus auprès de Sigma-Adrich (Saint-Louis, MO, USA).

Les réactifs sont utilisés tels que réceptionnés et les solutions aqueuses sont préparées avec de l'eau Milli-Q ultrapure ($18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$, Millipore).

II.2. Synthèses de précurseurs et de QDs

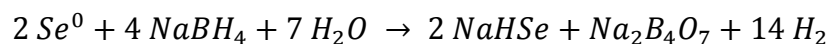
II.2.1. Précurseurs de séléniure

Quatre précurseurs de séléniure ont été utilisés pour effectuer les optimisations de synthèse des QDs de CdSe. Le séléniure de sodium et d'hydrogène, NaHSe, ainsi que le sélénosulfate de sodium, Na_2SeSO_3 , sont préparés préalablement, alors que l'oxyde de sélénium SeO_2 et le sélénite de sodium Na_2SeO_3 sont dissous directement dans le milieu réactionnel et réduits *in situ* par le borohydrure de sodium NaBH_4 en précurseur de séléniure.

II.2.1.1. Préparation de NaHSe

Le précurseur de séléniure, NaHSe, est préparé, selon le protocole de Klayman *et al.* (1973) adapté par l'équipe (Aldeek *et al.* 2008), en réduisant du Se^0 par NaBH_4 (Équation 19). 76 mg de NaBH_4 (2 mmol) sont introduits dans un réacteur de Schlenk, refroidi à l'aide d'un bain de glace et placé sous atmosphère inerte, contenant 1 mL d'eau ultrapure dégazée par N_2 . 79 mg de poudre de sélénium (1 mmol) sont ensuite ajoutés. Après 3 heures d'agitation à 0°C , la poudre noire de Se^0 disparaît au profit d'une solution limpide de NaHSe. Cette solution est

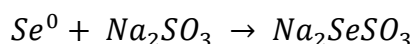
diluée par 19 mL d'eau ultrapure, dégazée par N₂, pour obtenir une solution de concentration 0,05 mol/L.



Équation 19. Formation de NaHSe.

II.2.1.2. Préparation de Na₂SeSO₃

Le précurseur de sélénure, Na₂SeSO₃, est préparé, selon un protocole de Mansur *et al.* (2010) adapté à nos besoins (Équation 20). 197,5 mg de poudre de sélénium (2,5 mmol) sont introduits dans un tricol placé sous atmosphère inerte et contenant 50 mL d'eau ultrapure préalablement dégazés par N₂. 630 mg de Na₂SO₃ (5 mmol) sont ensuite ajoutés et le milieu réactionnel est porté à 80°C, sous agitation magnétique vigoureuse. L'agitation est maintenue 1 à 2 heures, le temps que la poudre noire de Se⁰ disparaisse au profit d'une solution limpide de Na₂SeSO₃. La solution obtenue présente une concentration de 0,05 mol/L.



Équation 20. Formation de Na₂SeSO₃

II.2.2. Synthèse de Quantum Dots de CdSe

II.2.2.1. Protocole de synthèse représentatif

Les QDs de CdSe sont préparés par réaction d'un des quatre précurseurs de sélénure précédemment introduits avec le précurseur de cadmium, CdCl₂·2,5H₂O, en présence d'un ligand stabilisant. Un complexe Cd²⁺-ligand est tout d'abord préparé en milieu aqueux basique dans un tricol. Le pH est ajusté avec une solution d'hydroxyde de sodium de manière à solubiliser le complexe. Le mélange obtenu est ensuite dégazé à l'argon et placé sous atmosphère inerte pour limiter l'oxydation du précurseur de sélénure, sensible à l'oxygène, lors de son introduction. Le précurseur de sélénure est injecté directement ou généré *in situ*

par réduction d'une espèce sélénée à l'aide de borohydrure de sodium. La solution colorée obtenue contenant les premiers germes de CdSe est alors chauffée à reflux, pour une synthèse dite en milieu aqueux, ou transférée dans un autoclave scellé en acier inoxydable (revêtement intérieur en téflon) qui est placé dans un four préalablement stabilisé à haute température, pour une synthèse dite hydrothermale. La croissance des QDs effectuée, ceux-ci sont précipités à l'aide d'un contre-solvant, typiquement l'*iso*-propanol, lavés 3 fois à l'aide d'un volume de contre-solvant, récupérés par centrifugation, puis séchés sous vide.

II.2.2.2. Synthèse de Quantum Dots CdSe@MSA

Les QDs de CdSe@MSA sont préparés par réaction du précurseur de séléniure, NaHSe, avec le précurseur de cadmium, $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, en présence du ligand stabilisant MSA, selon un protocole inspiré de Chen *et al.* (2011). 15,4 mg de $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ (67 μmol) et 10,5 mg de MSA (70 μmol) sont respectivement dissous dans 39 et 26 mL d'eau ultrapure. Les deux solutions sont ensuite mélangées dans un tricol et le pH est ajusté à 10 à l'aide de NaOH 0,1 M, pour former la solution de précurseur de cadmium incolore. Après 30 minutes de dégazage à l'argon, 320 μL de la solution de NaHSe à 0,05 M (16 μmol) sont rapidement injectés dans le milieu réactionnel qui prend alors une coloration jaune. Le milieu réactionnel est ensuite chauffé 20 minutes sous argon pour prévenir l'oxydation des ions séléniures et le reflux alors atteint est maintenu 5 minutes avant que la croissance des QDs ne soit stoppée à l'aide d'un bain de glace. Après refroidissement, la solution de QDs est concentrée dix fois à l'évaporateur rotatif, précipitée par deux volumes d'*i*-PrOH, centrifugée 15 minutes à 4000 tours/minute, puis les QDs sont lavés 3 fois à l'aide d'un volume d'*i*-PrOH, puis séchés sous vide.

II.2.2.3. Synthèse de Quantum Dots alliés CdSe(S)@MSA

Les QDs de CdSe(S)@MSA sont préparés par réaction du précurseur de sélénure, NaHSe, avec le précurseur de cadmium, $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, en présence du ligand stabilisant MSA, selon un protocole inspiré de Chen *et al.* (2011). 15,4 mg de $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ (57 μmol) et 10,5 mg de MSA (70 μmol) sont respectivement dissous dans 39 et 26 mL d'eau ultrapure. Les deux solutions sont ensuite mélangées dans un tricol et le pH est ajusté à 10 à l'aide de NaOH 0,1 M, pour former la solution de précurseur de cadmium incolore. Après 30 minutes de dégazage à l'argon, 320 μL de la solution de NaHSe à 0,05 M (16 μmol) sont rapidement injectés dans le milieu réactionnel qui prend alors une coloration jaune. Le milieu réactionnel est ensuite préchauffé 20 minutes sous argon pour prévenir l'oxydation des ions séléniures. Le milieu réactionnel est ensuite transféré dans un autoclave scellé en acier inoxydable (revêtement intérieur en téflon) qui est alors placé 1 heure dans un four stabilisé à 170°C. Après refroidissement, la solution de QDs est concentrée dix fois à l'évaporateur rotatif, précipitée par deux volumes d'*i*-PrOH, centrifugée 15 minutes à 4000 tours/minute, puis les QDs sont lavés 3 fois à l'aide d'un volume d'*i*-PrOH, puis séchés sous vide.

II.3. Caractérisations des Quantum Dots

II.3.1. Propriétés optiques

II.3.1.1. Spectres d'absorption et d'émission

Les spectres d'absorption sont enregistrés à température ambiante ($T = 22 \pm 2^\circ\text{C}$) à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible Thermo Scientific Evolution 220 utilisant une lampe xénon flash. Les spectres d'émission de fluorescence sont enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre Horiba Fluorolog 3 F222 Jobin Yvon équipé d'un porte-cuve thermostaté ($T = 22 \pm 2^\circ\text{C}$) et d'une lampe xénon de 450 W.

Les rendements quantiques de fluorescence sont déterminés à l'aide de l'équation 16 (introduite § I.1.4.3.) par rapport au Rose Bengale (11% dans l'éthanol) selon les indications de Grabolle *et al.* (2009).

Les concentrations en nanoparticules sont déterminées à l'aide de leur spectre d'absorption (Yu *et al.* 2003) (§ I.1.4.2.1.)

II.3.1.2. Photostabilité

La stabilité des propriétés photophysiques des QDs est évaluée en irradiant 2 mL d'une suspension colloïdale aqueuse de QDs à 5 μ M. L'utilisation d'une lampe Hg-Xe Hamamatsu LC5 lightingcure permet une irradiation intense (350 mW) et continue. La lampe est paramétrée de façon à obtenir une irradiation dont le spectre d'émission est centré à 365 nm. Les irradiations sont réalisées dans des cuvettes en polystyrène pendant différents temps, puis les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence sont enregistrés comme décrit précédemment.

II.3.2. Caractérisation structurale

II.3.2.1. Diffraction des Rayons X (DRX)

Les diffractogrammes des rayons X caractérisant les poudres obtenues, et plus précisément leurs structures cristallines, sont acquis à l'aide d'un diffractomètre Panalytical X'Pert Pro MPD utilisant une radiation Cu-K α .

II.3.2.2. Microscopie Électronique en Transmission (MET) : modes images et diffraction

La forme et le diamètre des nanoparticules sont étudiés par microscopie électronique en transmission (MET) à l'aide d'un instrument Philips CM20 muni d'une cathode LaB6 opérant

à 200 kV. Les poudres sont dispersées en milieu aqueux puis une goutte de la solution obtenue est déposée sur un film de carbone supporté par une grille de cuivre. Le diamètre des QDs est moyennant les diamètres de 100 nanoparticules (réalisation d'un histogramme de distribution en taille possible pour visualiser la polydispersité).

La structure cristalline est également confirmée par diffraction des électrons.

II.3.2.3. Diffusion dynamique de la lumière (DLS) et mobilité électrophorétique

Le diamètre hydrodynamique des particules est étudié par diffusion dynamique de la lumière (DLS pour Dynamic Light Scattering) à l'aide d'un Zetasizer NanoZS ZEN3600 Malvern (0,6 nm à 6 μ m) équipé d'un porte-cuve thermostaté ($T = 25 \pm 2^\circ\text{C}$), mesurant les fluctuations de l'intensité diffusée par des particules. Le mouvement brownien des petites et des grosses particules étant respectivement rapide et lent, les intensités diffusées correspondantes fluctuent rapidement et lentement. La taille des particules peut alors être déterminée par l'équation de Stokes-Einstein mettant en relation la vitesse de la particule et sa taille. Concrètement, une cuvette en plastique contenant 1 mL d'une suspension colloïdale aqueuse de QDs (1.10^{-6} M) est placée dans le porte-cuve et éclairée par un laser Ne-Ar (633 nm). L'intensité lumineuse ayant traversé l'échantillon de particules, uniquement soumises au mouvement brownien, est alors détectée selon un angle de 173° . La mesure effectuée, le logiciel DTS Nanosizer, couplé à l'appareil de mesure, utilise un algorithme extrayant les vitesses de déclin qui permet l'obtention directe d'une distribution en taille des particules. La distribution obtenue à partir d'une mesure utilisant la DLS est une distribution en intensité de diffusion des particules. En considérant que les particules sont sphériques, il en découle la distribution en nombre et en volume. Dans notre étude, nous nous sommes essentiellement intéressés à l'étude du pourcentage en nombre, dans la mesure où les grosses particules ont

une influence beaucoup plus importante que les petites sur le pourcentage en intensité. Chaque expérience est généralement issue de l'analyse de 10 à 20 mesures, et est au moins dupliquée.

La mobilité électrophorétique, proportionnelle à la charge ionique des échantillons, et classiquement utilisée en physico-chimie pour déterminer la stabilité d'une suspension colloïdale, peut également être mesurée à l'aide du Zetasizer NanoZS ZEN3600 Malvern (0,6 nm à 6 μ m) qui utilise alors la technique de vélocimétrie laser à effet Doppler. Cette technique permet de mesurer la vitesse de très petites particules dans un fluide. Les particules mises en mouvement sous l'action d'un champ électrique extérieur E sont à l'origine d'une onde lumineuse diffusée, décalée en fréquence par rapport à la lumière d'une source laser incidente. À partir de ce décalage en fréquence, l'appareil calcule la vitesse des particules en suspension et donne alors une distribution de mobilités électrophorétiques μ ($V^{-1}.s^{-1}$).

En pratique, une cellule de mesure en plastique (équipée d'électrodes) contenant 750 μ L d'une suspension colloïdale aqueuse de QDs (1.10^{-6} M) est placée dans le porte-cuve et éclairée par un laser Ne-Ar (633 nm). Les particules sont alors soumises à des inversions de courant électrique rapides puis lentes, permettant de s'affranchir respectivement de l'électro-osmose et de l'électrodéposition. L'intensité lumineuse ayant traversé l'échantillon de particules dispersées est détectée selon un angle de 17° , donnant lieu à un spectre de fréquence. Le logiciel DTS Nanosizer calcule finalement la mobilité électrophorétique à partir du spectre de fréquences.

II.3.3. Composition des suspensions colloïdales (ICP)

Les teneurs en cadmium et en sélénium de suspensions colloïdales aqueuses de QDs (5 μ M) sont estimées par spectrométrie par torche à plasma (ICP pour Inductively Coupled Plasma) en utilisant un ICP optique ICAP Duo Thermo Scientific (visée radiale). Les

Les dialyses sont réalisées en utilisant des membranes en acétate de cellulose présentant un cutoff (niveau de porosité) de 10 kDa (SpectraPor) et remplies par 10 mL de suspension de QDs (rétentat). La dialyse est effectuée, pendant 1 ou 5 heure(s), sous agitation magnétique, en plaçant les membranes dans des béchers contenant 250 mL d'eau ultrapure (dialysat).

II.3.5.1. Quantification d'O₂⁻ à l'aide du NitroBlue Tetrazolium

La production d'ions superoxydes $O_2^{\bullet-}$, par des QDs photoactivés, est estimée à l'aide d'un test colorimétrique au Nitroblue Tetrazolium (NBT), adapté du protocole de Anas *et al.* (2008). Le test est basé sur une quantification de la réduction du NBT (de couleur jaune) en dérivés du formazan (violets) par les EROs (Figure 42). La réduction du NBT en mono- et diformazan conduit à l'augmentation de l'absorbance dans la gamme 450-700 nm, facilement quantifiable par spectrométrie.



Typiquement, 2 mL d'une solution eau/DMSO (1/1) contenant des QDs (2500 nM) et du NBT (200 μ M) sont irradiés à l'aide d'une lampe Hg-Xe Hamamatsu LC5 lightingcure (P = 50 mW). La lampe est paramétrée de façon à obtenir une irradiation dont le spectre d'émission est centré à 365 nm. Les irradiations sont réalisées dans des cuvettes en plastique pendant différents temps, puis les spectres d'absorption sont enregistrés comme décrit précédemment (§ II.3.1.1). Un blanc, contenant le NBT sans QDs, ainsi que des contrôles correspondant aux QDs non photoactivés sont également enregistrés. Les concentrations en radicaux $O_2^{\cdot-}$ sont calculées à l'aide de l'équation de Lambert-Beer, en utilisant un coefficient d'extinction molaire de $15000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Stankovic *et al.* 2011).

II.3.5.2. Quantification d' $OH^{\cdot}$ à l'aide du disodium téréphthalate

La production de radicaux hydroxyles $OH^{\cdot}$, par des QDs photoactivés, est estimée à l'aide d'un test fluorimétrique au disodium téréphthalate (DST), adapté du protocole de Llopis *et al.* (2011). Le test au DST est basé sur l'oxydation spécifique (Figure 43), par les radicaux $OH^{\cdot}$, du téréphthalate de sodium en 2-hydroxytéréphthalate (HTA), molécule hautement fluorescente (exc : 300 nm ; em : 428 nm).

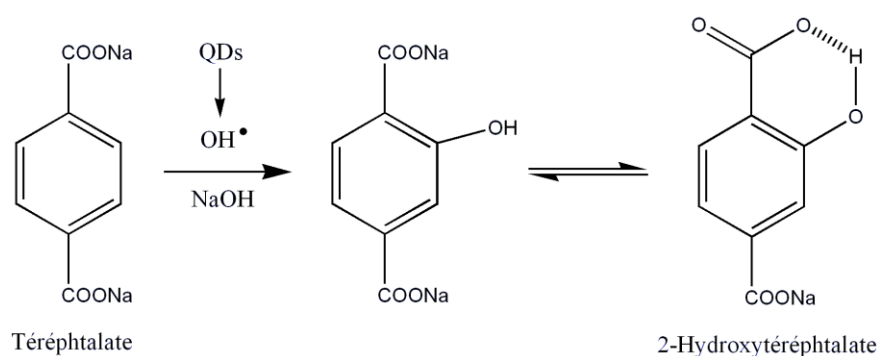


Figure 43. Réduction du DST en HTA hautement fluorescent.

Typiquement, 1 mL d'une suspension colloïdale aqueuse de QDs (10 μ M + éventuel antioxydant : solution mère à 1 M) est mélangé à 1 mL d'une solution de DST (1 mM), avant d'être irradié à l'aide d'une lampe Hg-Xe Hamamatsu LC5 lightingcure (P = 350 mW), paramétrée de façon à obtenir une irradiation dont le spectre d'émission est centré à 365 nm. Les irradiations sont réalisées dans des cuvettes en plastique pendant différents temps, puis le milieu réactionnel est traité par 1 mL de NaOH (1M) et incubé pendant 50 minutes à température ambiante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) dans le noir, avant d'être filtré (Filtre Acrodisc 0,2 μ m polyvinylidene fluoride PALL Corporation) pour s'affranchir des perturbations éventuelles dues à la précipitation des QDs en présence d'un excès de soude. Les spectres d'émission de fluorescence sont finalement enregistrés, comme décrit précédemment (§ II.3.1.1), de manière à quantifier le HTA formé. Un blanc, sans QDs, est enregistré et soustrait aux précédents essais pour éliminer la contribution de l'auto-fluorescence du DST. Les QDs n'apportent pas de contribution en termes de fluorescence aux longueurs d'onde pertinentes.

Une courbe de calibration Intensité de fluorescence (428 nm) = f([HTA]) est également construite pour convertir l'intensité de fluorescence mesurée à 428 nm en une concentration en HTA formé, puis en une concentration molaire en radicaux hydroxyles. L'équation trouvée est la suivante : $[\text{HTA}] = ((\text{Intensité de fluorescence à 428 nm}) - 1,64 \cdot 10^6) / (4,90 \cdot 10^{11})$. Les calculs sont effectués en prenant en compte le rendement de la réaction entre le DST et $\text{OH}^\bullet$. En effet, la conversion du DST en HTA, étudiée par Fang *et al.* (1996), est caractérisée par un rendement de 35% dans nos conditions (en présence d'oxygène).

Le HTA utilisé pour construire la courbe de calibration est synthétisé selon le protocole de Mason *et al.* (1994). 2,5 g d'acide 2-bromotéréphtalique (10,2 mmol) et 0,82 g de NaOH (20,4 mmol) sont dissous dans 47 mL d'eau ultrapure. Après addition de 1,84 g d'acétate de sodium (22,4 mmol), 13 mg de cuivre et quelques gouttes de phénolphthaléine, le milieu réactionnel est placé sous agitation magnétique et porté à reflux 10 heures. Une solution

aqueuse de KOH 1M est occasionnellement ajoutée pour conserver le caractère alcalin du milieu réactionnel (suivi colorimétrique). Après refroidissement, le milieu réactionnel est filtré sur Büchner et le filtrat est alors acidifié à l'aide d'HCl 2M. Les cristaux blancs obtenus sont collectés par filtration sur Büchner et séchés sous vide. Une plaque CCM (éluant acétate d'éthyle/méthanol 90/10) du réactif de départ et du produit est ensuite réalisée, confirmant l'obtention d'un produit fortement fluorescent (détection sous une lampe UV), différent du réactif initial. Un spectre RMN est également enregistré pour confirmer l'obtention du produit (Annexe 2).

II.4. Souches bactériennes et milieux de culture

Les souches bactériennes utilisées dans ce travail sont présentées dans le tableau 5. En routine, les bactéries sont cultivées à 30°C, sous agitation (160 tours/min, Innova 3100 water-bath New Brunswick Scientific) dans des erlenmeyers remplis au cinquième de leurs volumes, sauf si spécifié autrement. Pour les milieux solides, de l'agar à 15 g/L est ajouté. La sélection des souches est maintenue à l'aide d'antibiotiques : Kanamycine (Km, 50 µg/mL) et Tetracycline (Tc, 25 µg/mL) ou d'éléments traces métalliques (ZnCl₂, 0,8 mM) directement incorporés aux milieux.

II.4.1. Souches

Les caractéristiques des souches bactériennes utilisées sont décrites dans le tableau 5.

Tableau 5. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées.

Souche	Identifiant laboratoire	Caractéristiques	Sélection	Référence
<u><i>Escherichia coli</i></u>				
MG1655	CM53	Souche dérivée de K12 (sans plasmide F et sans phage λ)	$\emptyset$	Blattner <i>et al.</i> (1997)
MG1655(pUA66)	CM315	Souche contrôle : vecteur pUA66 avec <i>gfp</i> sans promoteur (pas d'insert)	Km ^R	Zaslaver <i>et al.</i> (2006)
MG1655(pUA66 :: P _{oxyR})	CM369	Biosenseur du stress oxydant, répondant à H ₂ O ₂	Km ^R	Zaslaver <i>et al.</i> (2006)
MG1655(pUA66 :: P _{soxR})	CM368	Biosenseur du stress oxydant, répondant à O ₂ ⁻	Km ^R	Zaslaver <i>et al.</i> (2006)
MG1655(pUCD607)	CM458	Expression d'une luciférase de manière constitutive	Km ^R	X. Bellanger (LCPME) *
<u><i>Cupriavidus metallidurans</i></u>				
AE1433	CM286	Biosenseur à Cd ²⁺ dérivé de CH34 (expression d'une luciférase [Cd] dépendante)	Tc ^R	Corbisier <i>et al.</i> (1998)
CH34	CM44	Bactérie du sol résistante aux éléments traces métalliques	Zn ^R	Mergeay <i>et al.</i> (1985)

* le plasmide pUCD607 utilisé pour la construction de la souche a été décrit par Rattray *et al.* (1990).

Km^R : résistance à la Kanamycine.

Tc^R : résistance à la Tétracycline.

Zn^R : résistance à ZnCl₂.

II.4.2. Milieux de culture

II.4.2.1. Milieu de culture LB (Bertani 1951)

Le milieu de culture LB (Lysogeny Broth) est obtenu auprès de BD Difco™ (LB Broth Miller, Becton, Dickinson and Company, Le Pont-de-Claix, France). Il contient 10 g/L de Tryptone, 5 g/L d'extrait de levure et 10 g/L de NaCl et est stérilisé à l'autoclave avant utilisation. Ce milieu est utilisé dilué au dixième pour la réalisation des cinétiques de croissance bactérienne.

II.4.2.2. Milieu de culture RM (Corbisier *et al.* 1998)

La composition du milieu minimum RM est la suivante : MOPS (20 mM), NaCl (80 mM), KCl (20 mM), NH₄Cl (20 mM), Na₂SO₄ (3 mM), MgCl₂·6H₂O (1 mM), CaCl₂·2H₂O

(0,2 mM), Na- β -glycérophosphate $\cdot$ 5H₂O (0,64 mM). Le pH est ajusté à 7 avec de l'HCl avant stérilisation à l'autoclave. Du gluconate est ajouté à 0,01 % (m/v) final avant emploi comme source de carbone. Ce milieu est utilisé pour la détection des ions Cd²⁺ biodisponibles à l'aide du biosenseur AE1433.

II.4.2.3. Milieu minimum MOPS (Corbisier *et al.* 1998)

La composition du milieu est identique au milieu RM qui est cependant amendé après autoclavage avec du Fe^{III}NH₄ citrate (5 mg/L final) et une solution d'éléments traces SL7 (Biebl *et al.* 1981) dont la composition avant dilution (1/1000) est : ZnCl₂ (0,5 mM), MnCl₂ $\cdot$ 4H₂O (0,5 mM), H₃BO₃ (1 mM), CoCl₂ $\cdot$ 6H₂O (0,8 mM), CuCl₂ $\cdot$ 2H₂O (0,1 mM), NiCl₂ $\cdot$ 6H₂O (0,1 mM), Na₂MoO₄ $\cdot$ 2H₂O (0,15 mM), HCl 25% (1,3 mL/L). Du gluconate est ajouté à 0,2 % (m/v) final avant emploi comme source de carbone. Ce milieu est utilisé pour l'évaluation de la toxicité des QDs par extinction de bioluminescence à l'aide des souches MG1655(pUCD607) et CH34(pUCD607).

II.4.2.4. Milieu minimum M9 (Sambrook *et al.* 2001)

La composition du milieu M9 est la suivante : Na₂HPO₄ $\cdot$ 7H₂O (48 mM), KH₂PO₄ (22 mM), NaCl (8,6 mM), NH₄Cl (18,8 mM), MgSO₄ (2 mM) et CaCl₂ (0,1 mM). Le pH est ajusté entre 7 et 7,4 avec de l'HCl avant stérilisation à l'autoclave. Du gluconate est ajouté à 0,4 % (m/v) final avant emploi comme source de carbone. Ce milieu est utilisé pour l'évaluation de stress oxydant par les biosenseurs MG1655 (pUA66 :: P_{oxyR}) et MG1655 (pUA66 :: P_{soxR}).

Remarque : Les solutions de MgSO₄ (1 M) et CaCl₂ (1 M) sont ajoutées juste avant utilisation pour limiter les risques de précipitation.

II.4.2.5. Milieu minimum Tris 284 (Mergeay *et al.* 1985)

La composition du milieu minimum Tris est la suivante : Tris (50 mM), NaCl (80 mM), KCl (20 mM), NH₄Cl (20 mM), Na₂SO₄ (3 mM), MgCl₂·6H₂O (1 mM), CaCl₂·2H₂O (0,2 mM), Na₂HPO₄ (0,64 mM). Le pH est ajusté à 7 avec de l'HCl avant stérilisation à l'autoclave. Avant utilisation, le milieu est amendé avec du Fe^{III}NH₄ citrate (5 mg/L final) et une solution d'éléments traces SL7 (précédemment décrite). Du gluconate est ajouté à 0,2 % (m/v) final avant emploi comme source de carbone. Ce milieu est utilisé pour la croissance des bactéries destinées aux analyses de cytométrie en flux (évaluation des interactions QDs-bactéries).

II.5. Évaluation de la cytotoxicité

II.5.1. Test basé sur l'extinction de la luminescence

La toxicité a d'abord été évaluée sur CM458 (*E. coli* MG1655(pUCD607)), une bactérie exprimant une bioluminescence constitutive. Pour cela, les bactéries sont cultivées en milieu LB sur la nuit (environ 16 heures) dans des erlenmeyers de 100 mL remplis au dixième de leur contenance. Le lendemain, les bactéries sont récupérées par centrifugation (5 minutes, 3000 g), puis lavées par 1 mL de milieu minimal MOPS supplémenté en gluconate (0,2 % final). Après centrifugation (2 minutes, 10.000 g), les bactéries sont resuspendues dans 10 mL de milieu MOPS-gluconate et réacclimatées pendant 1 heure à 30°C, sous agitation. La biomasse est ensuite ajustée à une concentration de travail de DO₆₀₀ = 0,3 (spectrophotomètre UV mc² Safas Monaco). La suspension bactérienne est finalement aliquotée par fractions de 180 µL en plaque de microtitration (plaque de 96 puits noires à fond transparent, Perkin Elmer) préalablement remplies avec 20 µL des solutions/suspensions à tester. Chaque essai est réalisé au minimum en triplicat. Les plaques de microtitration sont maintenues à 25°C dans un lecteur de plaque (VICTOR3 Multilabel Counter plate reader, Perkin-Elmer), où la

luminescence et la DO₆₀₀ sont mesurées toutes les 15 minutes pendant 4 heures, avec un temps de mesure de 5 et 1 sec respectivement précédé d'une agitation à double orbitale de 10 secondes avant chaque série de mesures. Pour chaque paramètre, le bruit de fond obtenu pour le milieu seul est retranché et la luminescence est normalisée à la DO₆₀₀ correspondante. Les triplicats sont finalement moyennés et les pourcentages d'activité de luminescence sont calculés par rapport au contrôle non traité.

Typiquement, le tracé de l'évolution de la luminescence en fonction de la concentration en suspension/solution testée, présente un aspect sigmoïdal et la CI₅₀ (« Concentration Inhibitrice médiane ») caractérisant la suspension/solution peut être déterminée. Elle est estimée en effectuant un ajustement des points à l'aide du logiciel Origin. L'ajustement est effectué à l'aide d'une sigmoïde de type Logistic (Équation 21) :

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p}$$

Équation 21. Équation de type Logistic permettant l'ajustement d'une sigmoïde.

où A₁ correspond à l'origine de la sigmoïde, A₂ à la fin de la sigmoïde, x₀ au point d'inflexion de la courbe et p à la pente de la courbe, puis la CI₅₀ est calculée en considérant y = 50.

II.5.2. Test basé sur la cinétique de croissance

La cytotoxicité des QDs a également été évaluée par comparaison des cinétiques de croissance de CM53 (*E. coli* MG1655) en présence ou en absence de QDs. Pour cela, les bactéries sont cultivées en milieu LB/10 dans des béchers de 600 mL remplis au sixième. Brièvement, les bactéries sont d'abord cultivées sans QDs jusqu'en milieu de phase exponentielle de croissance (DO_{600 nm} = 0,1). Les bactéries sont ensuite diluées (au quart) dans

des milieux préchauffés contenant différentes concentrations en QDs, exposés à la lumière ou non, et l'évolution de la DO_{600} est suivie au cours du temps. Les cinétiques de croissance en conditions d'éclairement (1250 lux) sont réalisées sous une lampe néon JBL Color Solar T8 (néon d'aquarium) présentant un spectre lumineux similaire à la lumière du soleil (Figure 44), alors que les cinétiques de croissance réalisées à l'obscurité nécessitent d'emballer la culture dans de l'aluminium. Pour chaque condition de culture, le temps de génération (T_g , temps de doublement de la biomasse) des cultures en phase exponentielle de croissance est calculé à partir de la pente de la courbe de régression exponentielle des cinétiques de croissance et est comparé aux cultures cellulaires sans QDs. Les régressions effectuées sont de type $y = b.e^{a.x}$, avec « a » correspondant à la pente de la courbe de régression qui permet de calculer T_g ($T_g = \ln(2)/a$).

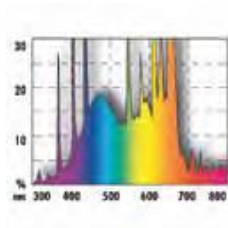


Figure 44. Spectre d'émission du néon JBL Solar Color T8.

II.6. Détection d'ions Cd^{2+} biodisponibles à l'aide du biosenseur *C. metallidurans* AE1433

Le cadmium biodisponible est évalué à l'aide du biosenseur CM286 (*C. metallidurans* AE1433), une bactérie génétiquement modifiée pour exprimer une bioluminescence proportionnelle à la présence de Cd^{2+} biodisponible. Le protocole utilisé est adapté de Tibazarwa *et al.* (2000). Les bactéries sont d'abord cultivées en milieu LB, dans un erlenmeyer de 250 mL, jusqu'en début de phase stationnaire ($DO_{600} = 1,5$). Les cellules sont alors lavées par deux cycles alternant centrifugation (3 minutes, 10.000 g) et remise en

suspension des culots cellulaires dans un volume de milieu RM gluconate (0,01%). La biomasse est ensuite ajustée à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,3. La suspension bactérienne est finalement aliquotée par fractions de 180 μL en plaque de microtitration (plaque de 96 puits noirs à fond transparent, Perkin Elmer) préalablement remplies avec 20 μL des solutions/suspensions à tester. Chaque essai est réalisé au minimum en triplicat. Les plaques de microtitration sont maintenues à 25°C dans un lecteur de plaque (VICTOR3 Multilabel Counter plate reader, Perkin-Elmer), où la luminescence et la DO_{600} sont mesurées toutes les 30 minutes pendant 16 heures, avec un temps de mesure de 5 et 1 sec respectivement précédé d'une agitation à double orbitale de 10 secondes avant chaque série de mesures. Pour chaque paramètre, le bruit de fond obtenu pour le milieu seul est retranché et la luminescence est normalisée à la DO_{600} correspondante et les triplicats sont finalement moyennés. Les facteurs d'induction obtenus, par rapport au contrôle non traité, pour les différentes concentrations en CdCl_2 permettent ensuite de tracer une courbe étalon d'induction en fonction de la concentration en Cd^{2+} , $\text{FI} = f([\text{CdCl}_2])$ pour les temps présentant un FI maximum. Une droite de régression est alors tracée pour le temps permettant d'obtenir le meilleur coefficient de corrélation possible ($R^2 > 0,99$; les points extrêmes sont exclus). L'équation de la droite de régression est utilisée pour calculer la concentration en Cd^{2+} biodisponibles à partir des niveaux d'induction obtenus pour les suspensions de QDs.

II.7. Détection du stress oxydant chez *E. coli*

L'éventualité d'un stress oxydant généré par les EROs émanant des QDs est évaluée en utilisant les souches biosenseurs CM368 (MG1655(pUA66 :: P_{soxR})) et CM369 (MG1655(pUA66 :: P_{oxyR})), qui correspondent à deux bactéries génétiquement modifiées pour émettre une fluorescence (production de GFP, « Green Fluorescent Protein ») lorsque leur régulon *soxR* ou *oxyR* est activé. Pour cela les bactéries sont cultivées en milieu M9 gluconate

(0,4%) à 37°C, dans des erlenmeyers de 250 mL, jusqu'en phase exponentielle de croissance ($DO_{600\text{ nm}} = 0,1$). Les cultures sont alors aliquotées par fractions de 100 μL en plaque de microtitration (plaque de 96 puits noires à fond transparent, Perkin Elmer) préalablement remplies avec 100 μL des solutions/suspensions à tester. Chaque essai est réalisé au minimum en triplicat et chaque plaque contient un contrôle positif (H_2O_2 5.10^{-6} M). Les plaques sont ensuite incubées 1 heure à 37°C selon deux conditions d'illumination : obscurité et illumination (1250 lux) avec un néon JBL Color Solar T8 présentant un spectre lumineux similaire à la lumière du soleil. Les plaques de microtitration sont ensuite maintenues à 37°C dans un lecteur de plaque (VICTOR3 Multilabel Counter plate reader, Perkin-Elmer), où la fluorescence (exc : 490 nm, em : 535 nm) et la DO_{600} sont mesurées avec un temps de mesure de 5 et 1 sec respectivement, après une agitation à double orbitale de 10 secondes. Pour chaque paramètre, le bruit de fond obtenu pour le milieu seul est retranché et la fluorescence est normalisée à la DO_{600} correspondante. Les triplicats sont finalement moyennés et les facteurs d'induction de fluorescence sont calculés par rapport au contrôle non traité.

II.8. Interaction cellules – QDs : cytométrie en flux

L'interaction entre les QDs et les souches CM44 (*C. metallidurans* CH34) et CM53 (*E. coli* MG1655) a été évaluée par cytométrie en flux. Les bactéries sont cultivées en milieu minimum TRIS 284 gluconate (0,2%), dans des erlenmeyers de 250 mL, jusqu'en phase stationnaire ($DO_{600} = 1,8$). Les cellules sont alors lavées par deux cycles alternant centrifugation (5 minutes, 2500 g) et remise en suspension des culots cellulaires dans un volume de tampon Tris-HCl (50 mM pH 7,4). La suspension est ensuite ajustée à $DO_{600} = 1,3$. Les cellules sont ensuite diluées à $DO_{600} = 0,003$ dans du tampon Tris-HCl puis exposées à différentes concentrations en QDs de manière à obtenir différents rapports [QD]/[cellules]. Les mélanges obtenus sont incubés à 30°C pendant 10 et 30 minutes avant d'être analysés à

l'aide d'un cytomètre FACSCalibur (Becton Dickinson). Le cytomètre est paramétré pour une acquisition de 30.000 événements (sur tout) en SSC (« side scatter » ou granulométrie relative), avec une mesure de fluorescence en FL1 (exc : 488 nm ; em : 515 nm) sans seuillage. Le gain octroyé au photomultiplicateur FL1 est de 700 mV de façon à détecter les cellules non marquées, et de 400 mV pour SSC.

Chapitre III

Synthèses et caractérisations de Quantum

Dots à cœur CdSe

III.1. Synthèses de QDs CdSe

Les synthèses décrites dans ce chapitre visent l'obtention de QDs hydrophiles aux propriétés physicochimiques voisines mais différant par leur composition de cœur, en vue d'étudier l'influence de la structure des QDs sur leur cytotoxicité. Dans ce dessein, les QDs synthétisés devront présenter des tailles de cœur proches, être porteurs des mêmes ligands et donc de la même charge de surface. Les cœurs des QDs obtenus devront, par contre, impérativement varier, et plus particulièrement de par leur degré d'alliage. Pour ce faire, la synthèse des QDs sera réalisée directement en milieu aqueux selon deux grands types de procédés, soit à 100°C soit via un procédé hydrothermal, c'est-à-dire sous pression et à haute température (120-180°C). En effet, la littérature montre que la synthèse à 100°C conduit à des QDs CdSe alors que la synthèse hydrothermale, tirant avantage de l'utilisation d'autoclaves scellés, permet l'obtention de QDs alliés CdSe(S) ou de types cœur/coquille CdSe/CdS du fait d'une décomposition partielle des ligands soufrés et de la génération de S^{2-} . Notre équipe (Aldeek *et al.* 2011) a ainsi obtenu des QDs de type CdSe(S)@MPA dont la structure alliée est confirmée par l'obtention de diffractogrammes des rayons X intermédiaires aux structures CdSe et CdS (Figure 45). La synthèse est réalisée dans un autoclave scellé contenant le milieu réactionnel qui est placé dans un four à 150°C pendant 1 h.

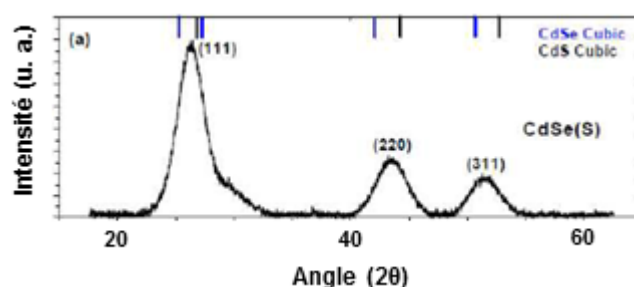


Figure 45. DRX confirmant l'obtention de QDs présentant une structure CdSe(S) (Aldeek *et al.* 2011).

L'utilisation de deux procédés de synthèse en vue d'obtenir deux structures chimiques distinctes étant définie, la compatibilité de plusieurs ligands avec l'objectif a alors été testée. Les ligands sélectionnés doivent être *a minima* bifonctionnels, pour pouvoir être ancrés aux QDs par l'une des deux fonctions et présenter une bonne hydrophilie, la seconde fonction étant choisie pour favoriser la dispersion en milieu aqueux. Au vu de nos objectifs, l'une des deux fonctions doit impérativement être une fonction thiol susceptible de fournir une source de sulfure. La fonction thiol est, de plus, une fonction d'ancrage du ligand sur les QDs intéressante, la liaison Cd-S présentant une bonne stabilité. Les ligands seront porteurs de fonctions acide carboxylique, déprotonées en carboxylate à pH supérieur à 5, comme fonctions assurant l'hydrodispersion. La suite de ce chapitre présente donc les essais de synthèse effectués en utilisant les ligands glutathion (tripeptide GSH), acide thioglycolique (TGA) et acide mercaptosuccinique (MSA).

III.1.1. Synthèses de QDs CdSe@GSH

Wang *et al.* (2011) ont récemment synthétisé des QDs CdSe@GSH en faisant réagir SeH_2 et CdCl_2 en présence de GSH pendant 20 minutes à 90°C . Ces QDs dispersés en milieu aqueux présentent une bonne stabilité, les propriétés photophysiques de dispersions conservées à l'obscurité n'évoluant pas pendant au moins 44 jours (Figure 46). La structure CdSe des QDs est confirmée par DRX et les auteurs ont également montré que le ratio optimal $\text{Cd}^{2+}/\text{GSH}$ est de 1/1,42. En effet, l'utilisation de sept ratios différents (variant de 1/0,85 à 1/2,28) leur a permis de montrer que le rapport 1/1,42 présente l'avantage d'introduire suffisamment de GSH pour stabiliser efficacement les QDs, tout en étant suffisamment faible pour conserver de bonnes propriétés optiques. Les meilleurs RQs sont obtenus pour les plus faibles proportions de GSH possibles (1/0,85) mais les suspensions colloïdales ne présentent alors qu'une stabilité médiocre.

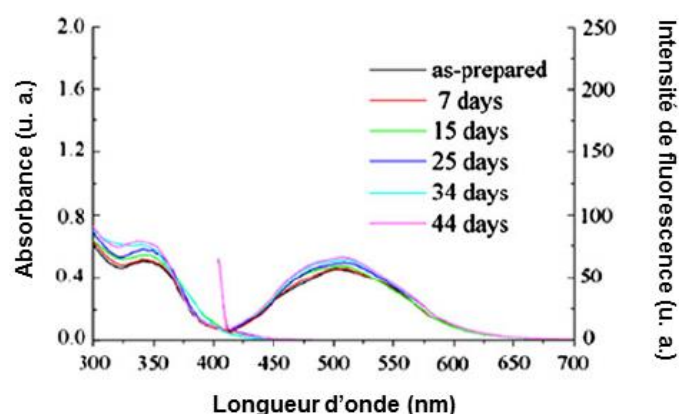


Figure 46. Évolution des propriétés photophysiques de QDs CdSe@GSH dispersés en milieu aqueux et conservés à l'obscurité (Wang *et al.* 2011)

La synthèse de QDs porteurs de ligands GSH par voie hydrothermale, qui seraient alors susceptibles de présenter une composition de cœur de type CdSe(S) n'est, quant à elle, pas décrite par la littérature. Une première série d'expériences a d'abord visé à obtenir les QDs CdSe@GSH selon le protocole de Wang *et al.* (2011), puis, dans une seconde série d'expériences, nous avons essayé de mettre au point une synthèse hydrothermale.

III.1.1.1. Synthèses à 100°C

La première synthèse, réalisée en injectant une solution de NaHSe dans le milieu réactionnel contenant les complexes Cd^{2+} -GSH solubilisés à pH 11,5 selon un ratio Cd/Se/ligand de 2/0,25/2,84, permet l'obtention de QDs CdSe@GSH présentant un RQ de 17,7 % après chauffage à reflux. Le temps de reflux est fixé à 10 minutes, un suivi par spectrométries d'absorption et de fluorescence ayant montré qu'à des temps plus longs, le RQ diminue (Figure 47). La dégradation des propriétés optiques est très certainement liée à la faible stabilité thermique du tripeptide GSH qui n'est plus présent en quantité suffisante pour assurer la stabilisation des QDs. Les QDs obtenus présentent des spectres de fluorescence

typiques d'une émission attribuable aux défauts de surface, ce qui est attendu puisque le temps de chauffage court ne permet pas une bonne passivation de surface.

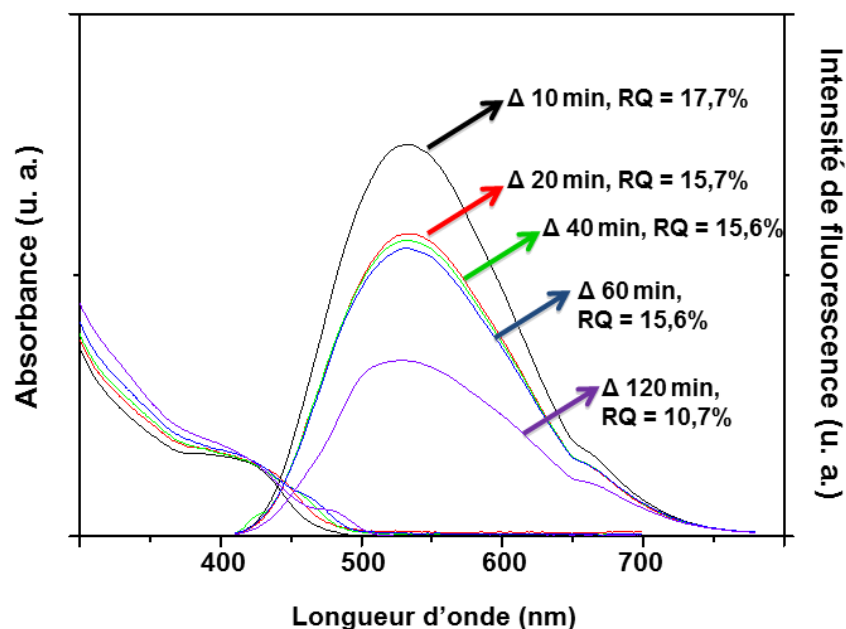


Figure 47. Évolution des propriétés optiques de QDs CdSe@GSH (pH initial de 11,5) en fonction du temps de reflux.

III.1.1.1.1. Optimisation du pH de la solution de complexes

Wang *et al.* (2011) ayant étudié l'influence du ratio Cd/GSH à pH = 11.5, nous avons ensuite voulu évaluer si la modification du pH pouvait permettre d'obtenir des QDs présentant de meilleures propriétés optiques. Le pH de la solution de complexes peut être ajusté de 7,5 à 11,5 sans que leur dissolution ne soit affectée et qu'aucune re-précipitation ne soit observée après injection de NaHSe. Nous avons donc répété les expériences pour des pH initiaux de 9 et 7,5 et mesuré des RQ, après 10 minutes de reflux de 20,5 et 23,5 %, respectivement (Figure 48). La diminution du pH initial permet une amélioration des propriétés optiques.

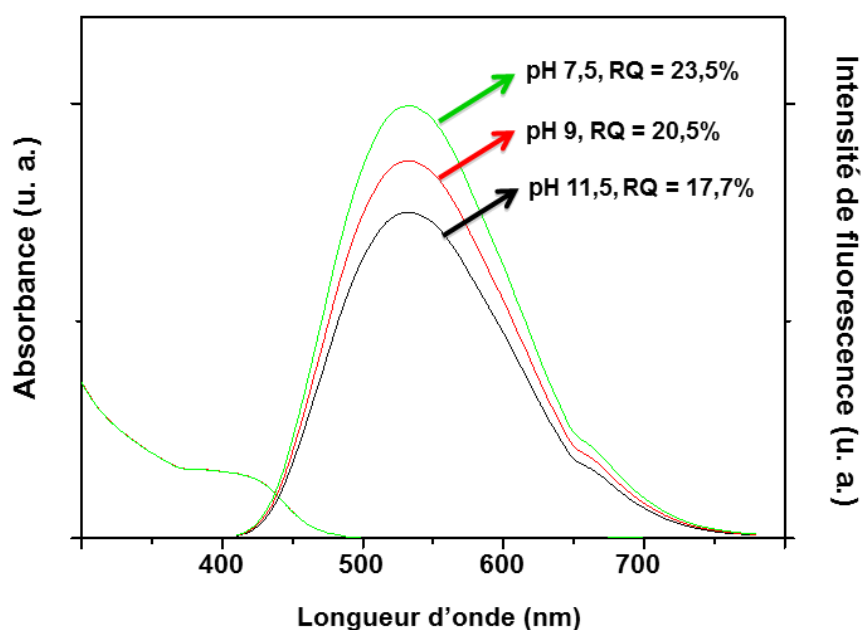


Figure 48. Évolution des propriétés optiques de QDs CdSe@GSH (temps de réaction : 10 minutes de reflux) en fonction du pH initial de la solution de complexes.

III.1.1.1.2. Diminution de la concentration en cadmium

La concentration initiale en ions Cd^{2+} étant connue pour influencer les propriétés optiques des QDs obtenus, sa modification a également été envisagée. En effet, la diminution de la concentration en précurseur de Cd^{2+} conduit à la formation d'une quantité de monomères CdSe dans le milieu réactionnel moins importante après injection de NaHSe. Dès lors, la croissance des QDs est susceptible d'être accélérée, chaque monomère pouvant plus facilement se développer et il est alors envisageable d'obtenir des QDs mieux cristallisés présentant de meilleures propriétés optiques. L'expérience a été réalisée en diminuant de moitié la concentration initiale en cadmium, tous les autres paramètres réactionnels étant maintenus constants. Les résultats obtenus présentés dans le tableau 6 montrent cependant que les QDs obtenus ne présentent pas de meilleures propriétés optiques que ceux qui sont obtenus pour une concentration en Cd de 6 mM.

Tableau 6. Évolution du RQ (%) de fluorescence des QDs CdSe@GSH au cours du temps pour chaque concentration initiale en Cd²⁺.

Temps de reflux (min)	RQ (%)	RQ (%)
	[Cd ²⁺] = 6 mM	[Cd ²⁺] = 3 mM
10	23,5	14
20	18,2	10,5
40	17,6	10,2
60	17,2	8,2

Les meilleurs QDs CdSe@GSH obtenus par synthèse en milieu aqueux sont donc caractérisés par un RQ de 23,5%, une émission de fluorescence due à la présence de défauts de surface centrée à 565 nm (FWHM = 187 nm) et un diamètre moyen de 1,8 nm.

III.1.1.2. Synthèses hydrothermales

La synthèse de QDs porteurs de ligands GSH à 100°C ayant été mise en place, nous avons ensuite essayé de développer une synthèse hydrothermale dans le but d'obtenir des QDs présentant une structure chimique de cœur différente. Les propriétés physico-chimiques devant par contre être conservées, les synthèses ont été réalisées en conservant le ratio Cd/Se/ligand, le pH et la concentration en Cd précédemment utilisés.

Les premiers essais ont été réalisés en adaptant les conditions de chauffage utilisées par Aldeek *et al.* (2011) pour synthétiser des QDs CdSe(S)@MPA. Après un court temps de chauffage à 100°C sous argon visant à limiter l'oxydation de NaHSe, le milieu réactionnel est transféré dans un autoclave qui est placé 1,5 h dans un four à 120°C. Malheureusement la suspension obtenue de QDs CdSe(S)@GSH ne présente aucune fluorescence et précipite rapidement, très certainement en raison de la dégradation trop importante du ligand GSH qui ne peut alors plus remplir ses fonctions stabilisantes.

Deux options ont ensuite été envisagées, diminuer le temps de chauffage en conservant la même température et/ou diminuer la température du four. Différents essais ont donc été effectués (120 ou 100°C, de 30 à 120 min). Cependant aucun des essais effectués n'a permis d'obtenir des QDs présentant une émission de fluorescence excitonique. De plus, les QDs obtenus ne présentent pas d'amélioration significative, en termes de RQ, par rapport aux QDs synthétisés à 100°C. Ces essais confirment cependant que le ligand GSH est trop peu résistant à la température et à la pression pour espérer obtenir des QDs bien passivés émettant une fluorescence purement excitonique.

III.1.2. Synthèses de QDs CdSe@TGA

La préparation par voie hydrothermale de QDs stabilisés par le TGA a plusieurs fois été décrite dans la littérature. Les synthèses ont principalement été développées pour des QDs de type CdTe, mais il est tout à fait possible d'envisager le transfert des conditions opératoires à la synthèse QDs CdSe en effectuant quelques ajustements. Récemment, Yu *et al.* (2012) ont synthétisé avec succès par voie hydrothermale des QDs CdTe@TGA et de CdTe@TGA-GSH qui présentent une émission de fluorescence liée à la recombinaison de l'électron et du trou, en utilisant un ratio Cd/Te/ligand de 1/0,25/1,2 et une concentration initiale en Cd de 2 mM. Ils ont également montré qu'un pH de 9, une température de 140°C et un temps réactionnel de 2 h permettent l'obtention des QDs présentant les meilleures propriétés optiques (Figure 49).

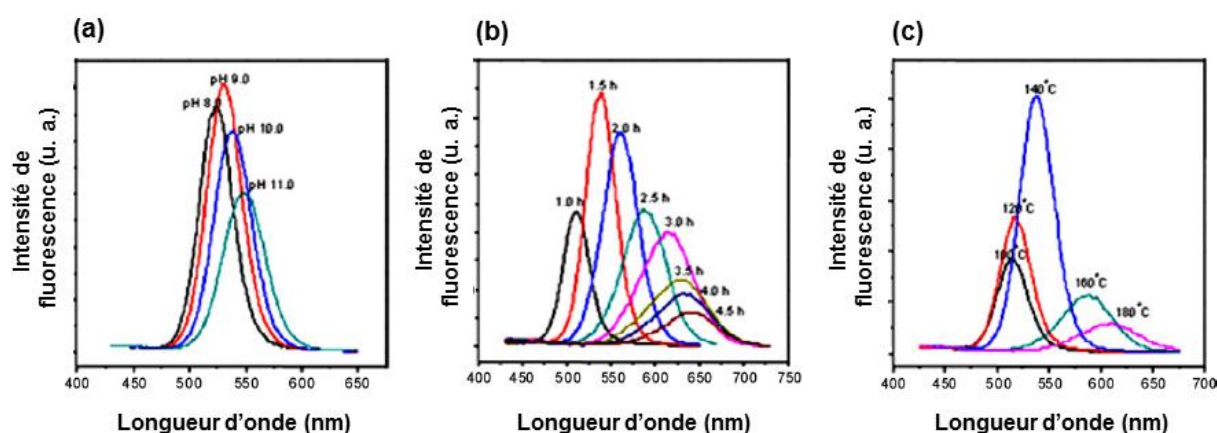


Figure 49. Optimisations de synthèse effectuées par Yu *et al.* (2012). Effets (a) du pH ($t = 1,5$ h) et (b) du temps de réaction ($\text{pH} = 9$) à 140°C . (c) Effets de la température à $\text{pH} = 9$ et $t = 1,5$ h.

III.1.2.1. Synthèses hydrothermales

L'utilisation des conditions de Yu *et al.* (2012) permet d'obtenir des QDs de CdSe(S) présentant une émission de fluorescence liée à la recombinaison de l'exciton, symétrique et fine, centrée à 570 nm (Figure 50). Cependant, le RQ de ces QDs est relativement médiocre, environ 1%. C'est pourquoi, nous avons effectué différentes améliorations qui ont conduit à l'obtention de QDs pouvant présenter des RQs allant jusque 11%. Le pH optimum a tout d'abord été confirmé être de 9, comme montré par Yu *et al.* (2012) et il a été noté que la modification de la concentration initiale en Cd engagée n'est pas possible, les complexes étant alors insolubles, même à pH élevé.

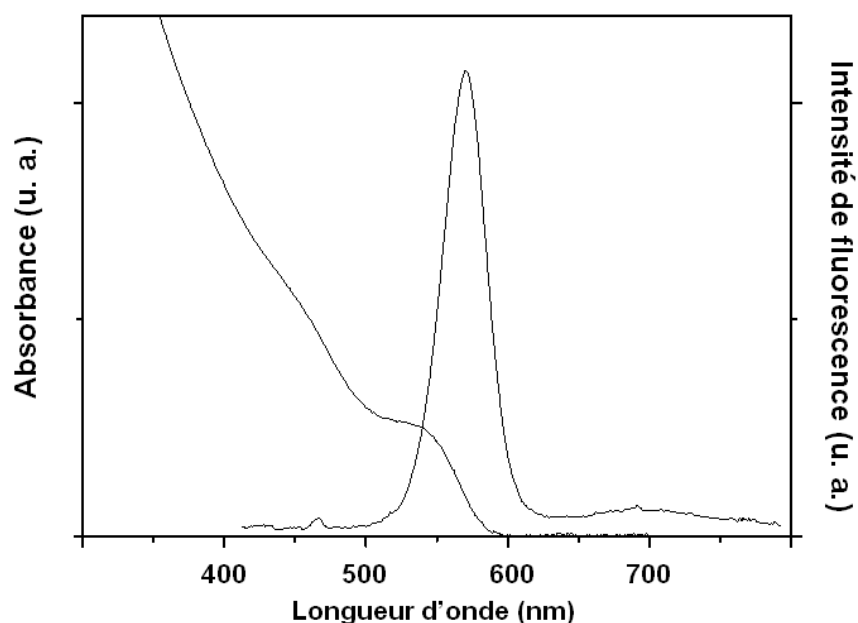


Figure 50. Spectres d'absorption et d'émission de QDs CdSe(S)@TGA obtenus après 2 h de chauffage à 140°C.

III.1.2.1.1. Augmentation du temps de chauffage

Dans l'optique d'observer une amélioration des propriétés photophysiques favorisée par une meilleure passivation de surface, le temps de chauffage a été augmenté. Ceci permet d'obtenir des QDs dont les longueurs d'onde d'absorption et d'émission de fluorescence sont sensiblement décalées vers le rouge (Figure 51). Pour un temps de chauffage de 2,5 h, un décalage bathochrome de 30 nm (570 à 600 nm) est observé. Ainsi il est possible de synthétiser des QDs présentant une fluorescence taille-dépendante, même si le RQ n'est pas amélioré. Les QDs obtenus après 2 h et 2,5 h de chauffage ont respectivement des diamètres moyens de 3,5 et 4,6 nm et présentent des fluorescences verte-jaune et jaune-orangée. Pour un temps de 3 h de chauffage, une agrégation des nanoparticules est, par contre, observée.

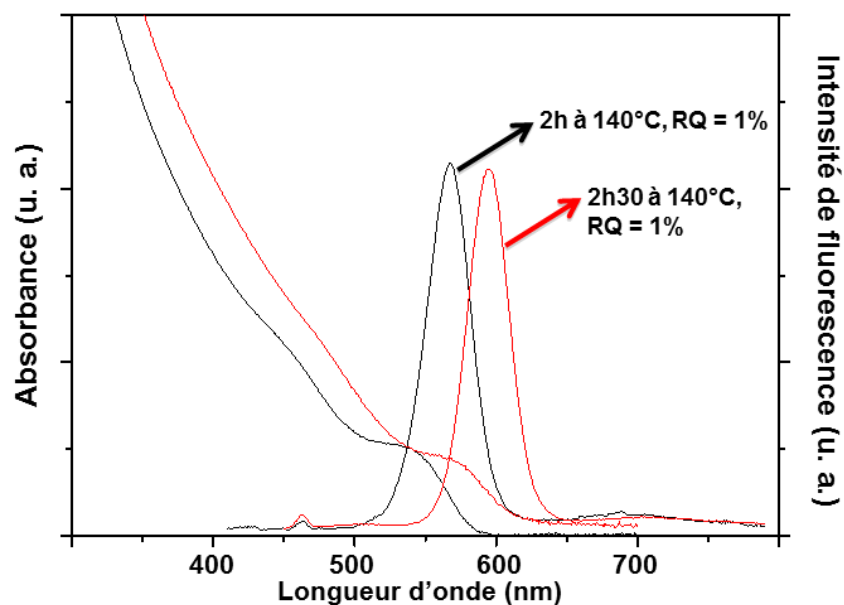


Figure 51. Évolution des propriétés optiques de QDs CdSe@TGA en fonction du temps de chauffage.

III.1.2.1.2. Augmentation de la température et nouvel ajustement du temps de chauffage

La modification du temps de chauffage n'ayant pas permis d'augmenter significativement le RQ, nous avons ensuite augmenté la température à 170°C. Un temps de chauffage de 2,5 h conduisant à l'obtention d'un précipité sans fluorescence apparente, la durée de la réaction a tout d'abord été réduite à 2 h pour observer les éventuels bénéfices de l'augmentation de la température, avant d'être à nouveau optimisée (Figure 52).

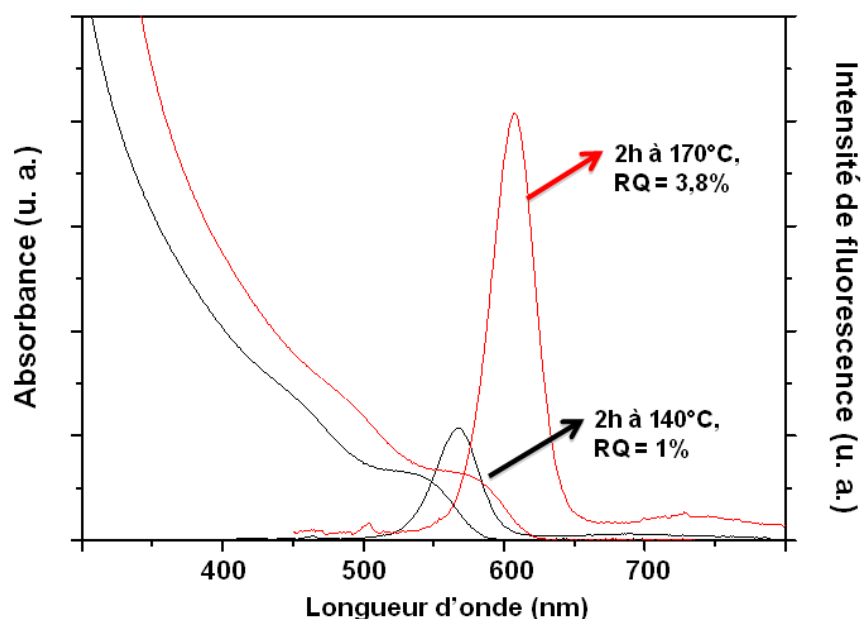


Figure 52. Évolution des propriétés optiques de QDs CdSe@TGA en fonction de la température (temps de chauffage 2 h)

La figure 52 montre clairement l'amélioration du RQ de fluorescence lorsque la température du four est augmentée. En effet, les QDs synthétisés à 170°C présentent un RQ de 3,8%, contre seulement 1% pour les QDs synthétisés à 140°C. Cette élévation du RQ est très certainement due à une meilleure passivation de surface liée à une décomposition plus rapide du ligand. En effet, plus la source de sulfure apparaît rapidement ou en quantité importante, plus le taux d'alliage (ou l'épaisseur de la coquille) est important, fournissant alors une meilleure passivation de surface et donc de meilleures propriétés optiques. La figure 53 confirme que le temps de chauffage optimal pour obtenir des QDs CdSe@TGA est de 2 h et montre à nouveau une fluorescence taille-dépendante (shift bathochromique en fonction du temps de chauffage). Notons également que l'émission résiduelle due aux défauts de surface diminue au cours du temps confirmant la meilleure passivation de surface.

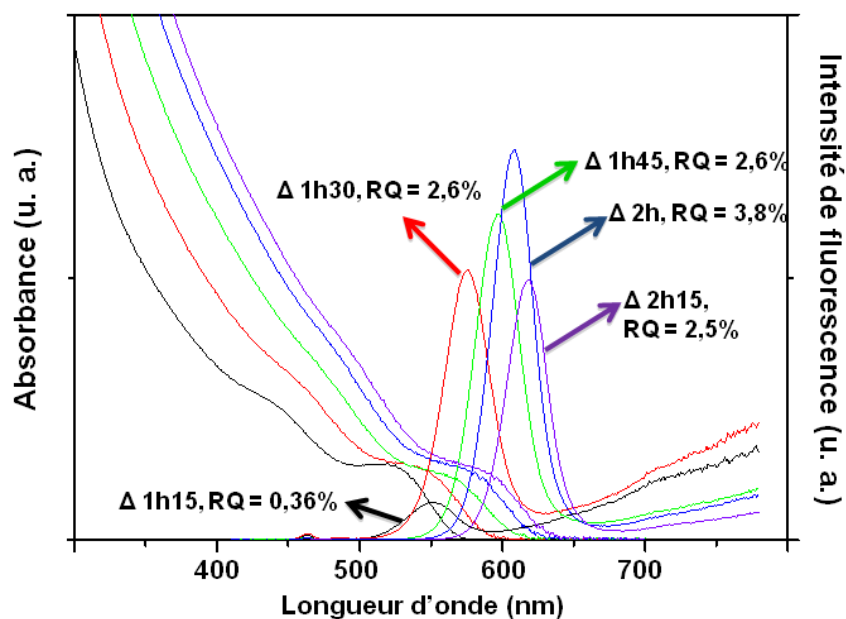
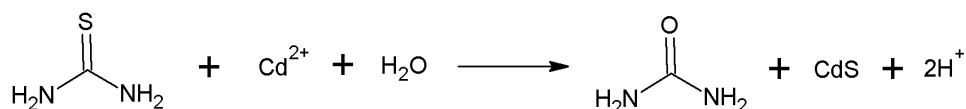


Figure 53. Évolution des propriétés optiques de QDs CdSe@TGA en fonction du temps de chauffage (à 170°C).

III.1.2.1.3. Ajout d'une source supplémentaire de S^{2-}

L'augmentation de la température réactionnelle, conduisant à une amélioration des propriétés optiques, permet de supposer qu'une augmentation de la concentration en sulfure favorise la passivation des QDs. Dans ce contexte, des essais mettant en jeu une source de sulfure supplémentaire, la thiourée, ont été réalisés (Figure 54). La thiourée en présence d'ions métalliques de type acide faible, comme les ions Cd^{2+} , permet la formation de complexes métal-thiourée qui conduiront à haute température à la formation de liaisons Cd-S (Équation 22, Mandal *et al.* 2009). L'ajout de thiourée comme source de S^{2-} devrait donc favoriser la formation d'alliages CdSe(S) ou d'une coquille CdS.



Équation 22. Équation de formation de CdS en présence de thiourée.

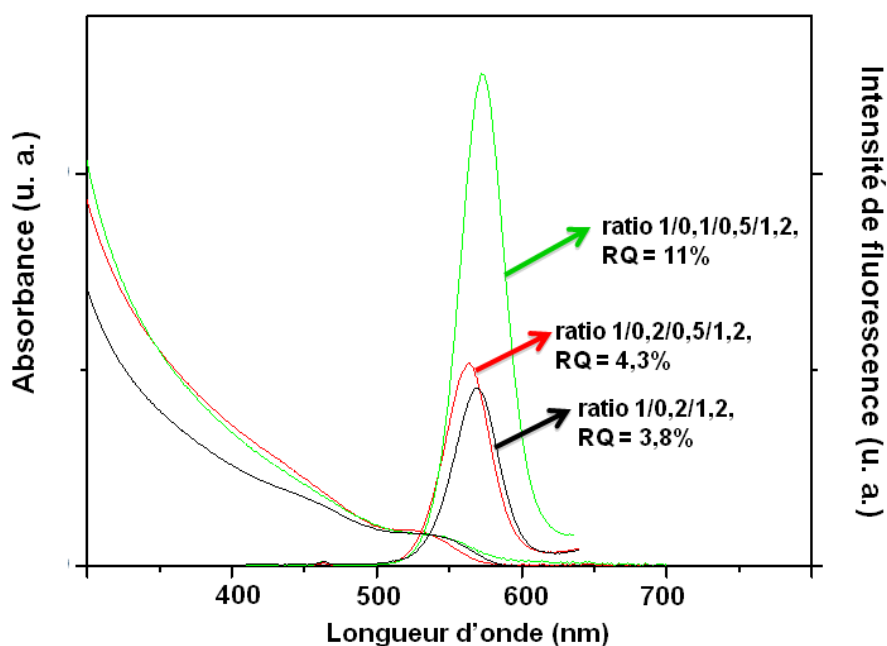


Figure 54. Amélioration des propriétés optiques de CdSe(S)@TGA par ajout de thiourée lors de la synthèse hydrothermale à 170°C.

Dans un premier temps, 0,5 équivalent de thiourée est ajouté à la solution de complexe Cd^{2+} -thiol, ce qui permet une très légère augmentation du RQ de 3,8% à 4,3%. Plusieurs études ayant montré que le ratio Cd/Se(S) doit rester relativement élevé pour que de bons RQs soient obtenus, nous avons ensuite diminué la proportion de Se, la thiourée entrant maintenant en jeu. L'utilisation d'un ratio Cd/Se/S/ligand de 1/0,1/0,5/1,2 (vs. 1/0,2/0,5/1,2) a ainsi permis d'obtenir un RQ de 11% sans que la longueur d'onde d'émission ne soit modifiée. Nos essais ont également montré que l'ajout de thiourée doit cependant rester faible (ratio Se/S 0,1/0,5), une quantité trop élevée conduisant à l'apparition d'une émission de fluorescence dominée par les défauts de surface (Figure 55).

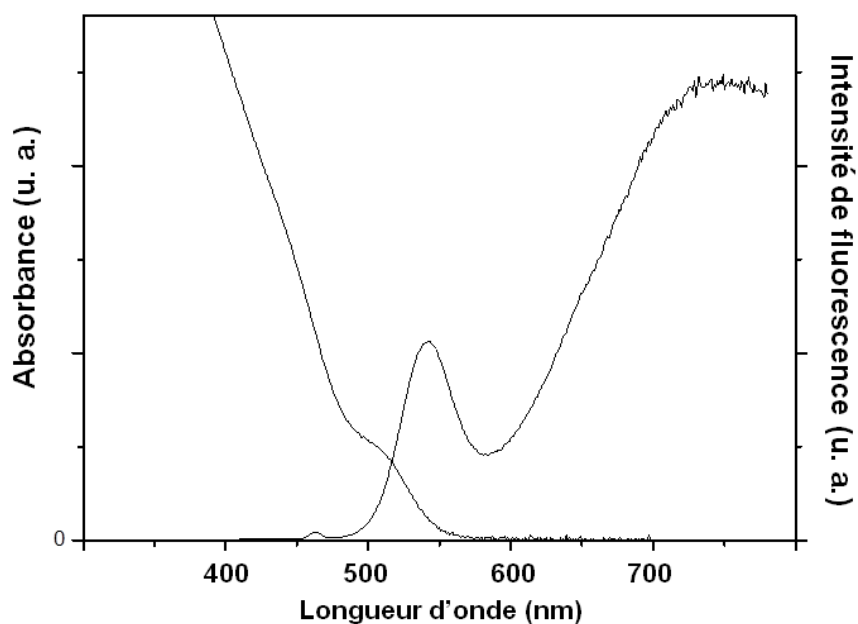


Figure 55. Augmentation de l'émission de défauts par utilisation d'un ratio Cd/Se/S/ligand de 1/0,1/1/2.

III.1.2.1.4. Utilisation d'un autre précurseur de Se²⁻

La littérature utilise couramment SeO_2 et Na_2SeSO_3 comme précurseurs de Se^{2-} . Nous avons souhaité évaluer si leur utilisation permettait d'améliorer les propriétés des QDs CdSe@TGA obtenus. L'utilisation de Na_2SeSO_3 et de SeO_2 (combiné à NaBH_4) dans des conditions réactionnelles similaires à celles décrites précédemment ont cependant respectivement conduit à l'observation d'un précipité non fluorescent et à des QDs peu fluorescents présentant une hydrodispersion médiocre.

III.1.2.2. Synthèses à 100°C

Les synthèses hydrothermales ayant conduit à l'obtention de QDs supposés de type CdSe(S) et présentant de bonnes propriétés optiques, liées à la recombinaison électron-trou, nous avons ensuite essayé d'obtenir des QDs CdSe via un procédé de synthèse en milieu aqueux. Les propriétés physicochimiques étant souhaitées proches de celles obtenus par synthèse hydrothermale, le ratio Cd/Se/ligand, le pH et la concentration en Cd sont conservés.

Le milieu réactionnel obtenu après injection du précurseur de Se^{2-} est analysé spectrophotométriquement au cours du temps (Figure 56).

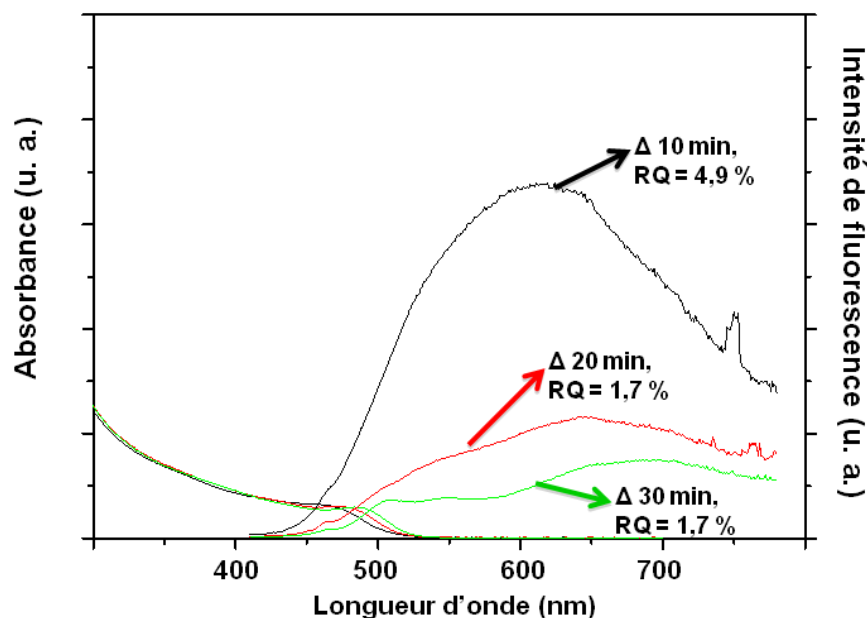


Figure 56. Évolution des propriétés optiques de QDs CdSe@TGA en fonction du temps de reflux.

L'obtention de QDs de type CdSe@TGA de bonne qualité n'a pas été possible, les spectres d'émission étant très bruités et les nanoparticules présentant, au maximum, un RQ de 4,9%.

III.1.3. Synthèses de QDs CdSe@MSA

Récemment, Chen *et al.* (2011) ont utilisé le ligand MSA comme alternative aux ligands thiols classiquement utilisés pour la synthèse de QDs de CdSe hydrophile. Le MSA, tout comme le TGA, est considéré comme un petit thioacide et peut de ce fait servir à « gommer » les défauts de surface par adsorption de complexes excédentaires Cd^{2+} /thiol à la surface des QDs. Il présente, de plus, l'avantage d'être porteur de deux têtes hydrophiles favorisant la dispersion aqueuse. Chen *et al.* (2011) ont obtenu des QDs de type CdSe (Figure 57)

hydrophiles et présentant un diamètre de 4,2 nm, en utilisant un ratio Cd/Se/ligand de 1/0,25/1,05, une concentration en cadmium initiale de 1 mM et un pH de 10 et en laissant la réaction 2 h à 90°C.

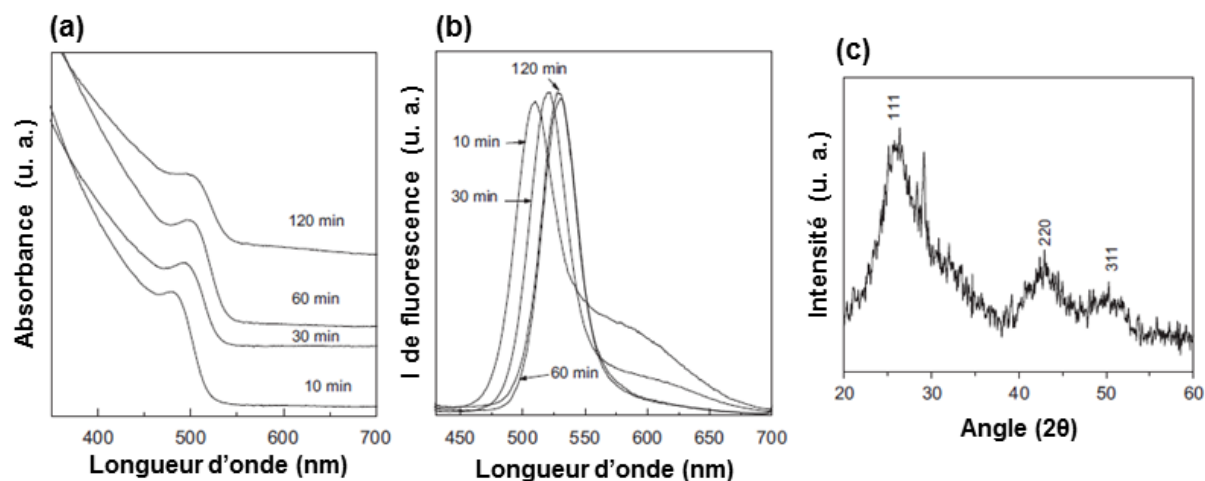


Figure 57. (a) Spectres d'absorption et (b) d'émission de QDs de CdSe@MSA obtenus par Chen *et al.* (2011). (c) Analyse DRX.

III.1.3.1. Synthèses hydrothermales

En vue d'obtenir des QDs de type CdSe(S), nous nous sommes placés dans les conditions décrites par Chen *et al.*. Afin de déterminer un temps de chauffage optimal, le milieu réactionnel a été placé à 170°C, comme pour les synthèses hydrothermales effectuées avec le TGA, pendant 30, 60 et 90 minutes (Figure 58).

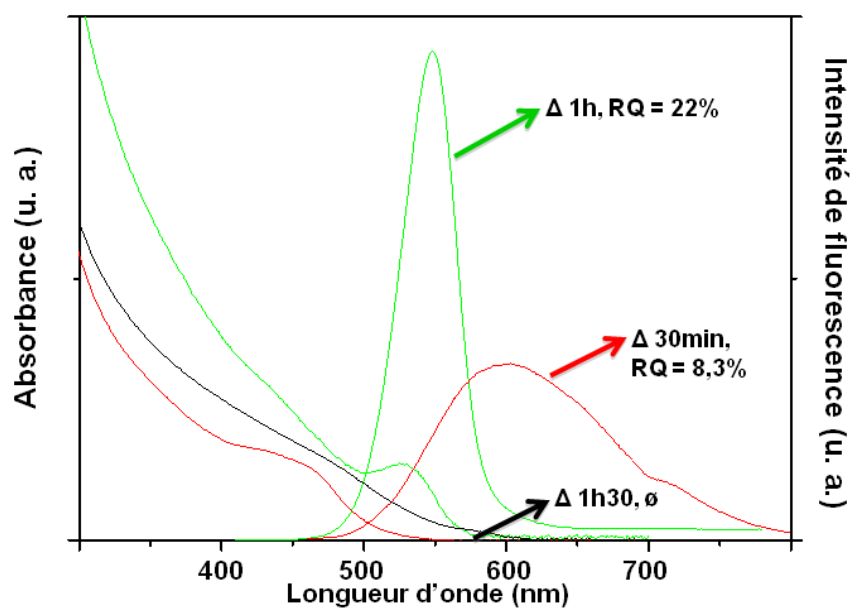


Figure 58. Évolution des propriétés optiques de QDs CdSe@MSA en fonction du temps de chauffage.

Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence montrent que le temps de chauffage optimal est de 1 h. En effet, le spectre d'émission de fluorescence correspondant au temps de chauffage de 30 min ne montre qu'une émission de défauts arguant pour une mauvaise passivation de surface peu compatible avec l'obtention de QDs de type CdSe(S). La synthèse effectuée en utilisant un temps de chauffage de 1,5 h ne conduit qu'à un précipité non fluorescent. Les QDs obtenus à $t = 1$ h présentent un RQ de 22 %, associé à une émission de fluorescence excitonique verte, centrée à 550 nm (FWHM = 38 nm). Leur diamètre est proche de 2,7 nm. Au vu de la qualité des QDs obtenus, peu d'améliorations ont été tentées. Nous avons tout de même essayé d'obtenir des QDs de tailles différentes qui présenteraient alors une fluorescence taille-dépendante. La modification du temps de chauffage à 170°C n'ayant pas permis d'obtenir ce résultat, nous avons décidé de diminuer la température du four à 140°C dans l'espoir de pouvoir allonger le temps de réaction et pouvoir ainsi plus facilement maîtriser l'obtention de différents QDs présentant une émission excitonique. Cependant, les essais n'ont conduit qu'à des QDs dont la fluorescence est gouvernée par les défauts de surface.

La concentration initiale en cadmium a également été augmentée de 1 mM à 5 mM dans le but d'augmenter la quantité de QDs produits. Cependant, comme observé sur la figure 59, le RQ est diminué de moitié, ce qui ne nous a pas incité à poursuivre ce type de modification du protocole.

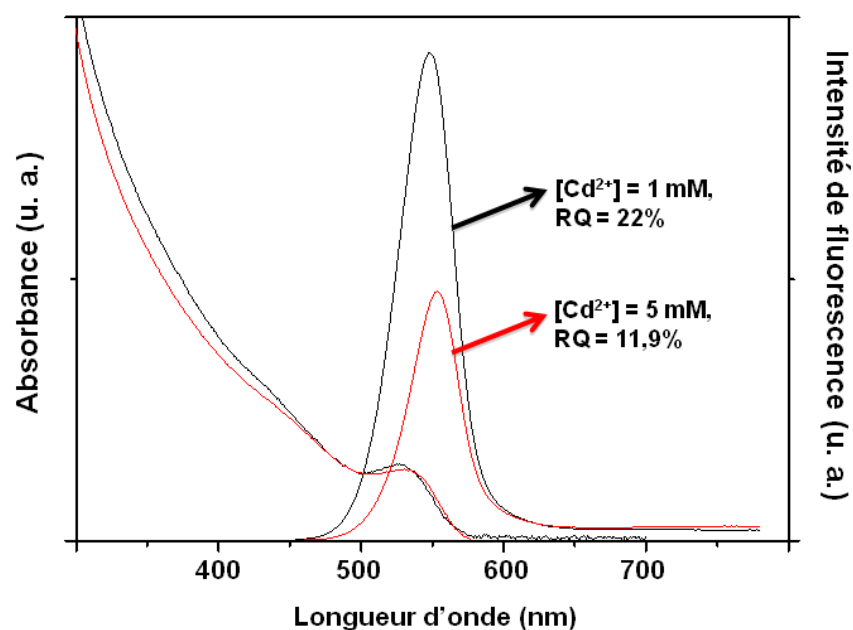


Figure 59. Effet de l'augmentation de la concentration initiale en Cd^{2+} sur les propriétés optiques de QDs CdSe@MSA.

III.1.3.2. Synthèses à 100°C

Les synthèses hydrothermales ayant conduit à l'obtention de QDs supposés être de type CdSe(S) et présentant de bonnes propriétés optiques, nous avons ensuite essayé d'obtenir des QDs CdSe@MSA stables par synthèse à 100°C.

Les synthèses de Chen *et al.* (2011) ayant conduit à l'obtention de QDs de 4,2 nm après 2 h de chauffage à 90°C et nos QDs de CdSe(S) présentant un diamètre de 2,7 nm, il est apparu évident qu'il nous était impossible d'utiliser un temps de chauffage aussi long, les tailles des deux types de QDs visés par nos synthèses devant être proches. Une synthèse en milieu aqueux, utilisant le ratio Cd/Se/ligand de 1/0,25/1,05, une concentration en Cd^{2+}

initiale de 1 mM et un pH de 10, a donc été conduite et des aliquots ont été prélevés et analysés dès les premiers instants de reflux (Figure 60).

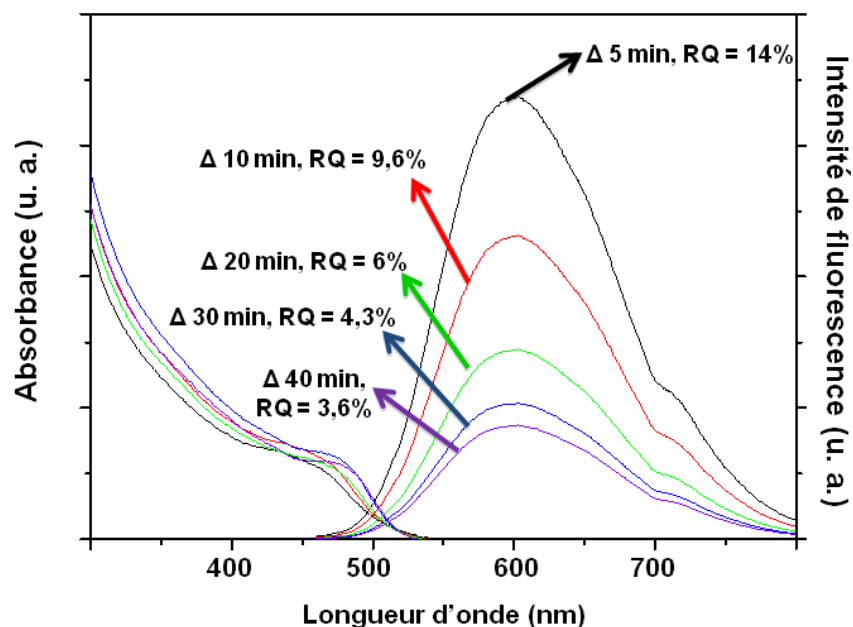


Figure 60. Évolution des propriétés optiques de QDs CdSe@MSA en fonction du temps de reflux.

La synthèse en milieu aqueux à temps court permet d'obtenir avec succès des QDs CdSe@MSA qui présentent un RQ de 14% et une taille de l'ordre de 2 nm.

III.2. Caractérisation des QDs stabilisés par l'acide mercaptosuccinique

Les QDs stabilisés par le ligand MSA ayant été synthétisés avec succès, à la fois en milieu aqueux à 100°C et par voie hydrothermale, ils ont été sélectionnés pour la suite de l'étude. En effet, l'utilisation de ces deux procédés de synthèse conduit à des QDs stabilisés par le même ligand et avec des tailles et des charges de surface proches. La différence majeure entre ces deux nanoparticules concernera donc leur structure, ce qui impliquera des réactivités de surface différentes que nous tenterons de corrélérer à la cytotoxicité observée sur la bactérie *E. coli*.

Les QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA ont d'abord été caractérisés de façon plus complète par différentes techniques d'analyses, et notamment par DRX, MET et DLS, puis leur stabilité a été évaluée par le biais d'études de photostabilité et par corrélation d'analyses ICP à des expériences de dialyse en milieu aqueux.

III.2.1. Taille, forme, structure cristalline et propriétés optiques des QDs CdSe et CdSe(S)

Les diffractogrammes des rayons X des QDs CdSe et CdSe(S), ainsi que les pics caractéristiques des matériaux de référence CdSe (JCPDS Card 19-0191, CdSe cubic) et CdS massifs (JCPDS Card 75-0581, CdS cubic), sont présentés en figure 61.

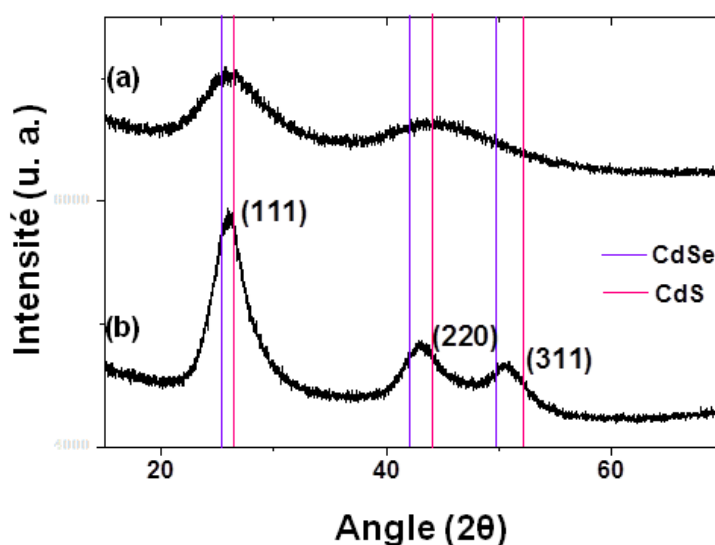


Figure 61. Diffractogrammes des rayons X des QDs (a) CdSe et (b) CdSe(S) (valeurs standard de CdSe et CdS massifs présentées comme références).

Les pics de diffraction, relativement larges et peu définis, confirment l'obtention de nanocristaux de petites tailles. Pour les QDs CdSe, les pics de diffraction apparaissant à 25,98° et 43,70° permettent d'identifier les plans de diffraction (111) et (220) correspondant à la structure CdSe cubique (zinc blende). Pour les QDs CdSe(S), l'apparition d'un troisième

pic de diffraction à $50,76^\circ$, correspondant au plan de diffraction (311) de la structure CdSe cubique, indique une meilleure cristallinité des nanocristaux produits. L'observation des pics de diffraction de CdSe(S) montre également un décalage de ceux-ci à des angles de Bragg plus élevés, indiquant une diminution du paramètre de maille. Ce phénomène s'explique par une augmentation du contenu en soufre dans la maille cristalline CdSe. La préparation de QDs par voie hydrothermale à 170°C permet donc bien la formation de QDs alliés de type CdSe(S). Les valeurs correspondant aux pics de diffraction des rayons X sont intermédiaires à celles des structures CdSe et CdS (Tableau 7).

Tableau 7. Valeurs associées aux pics de diffractions des plans (111), (220) et (311) des structures CdSe et CdS, ainsi que des QDs alliés CdSe(S).

Plan de diffraction	Structure CdSe de référence	QDs CdSe(S)	Structure CdS de référence
(111)	$25,37^\circ$	$25,98^\circ$	$26,55^\circ$
(220)	$42,04^\circ$	$43,70^\circ$	$44,04^\circ$
(311)	$49,74^\circ$	$50,76^\circ$	$52,17^\circ$

La figure 62 (a et d) montre les micrographies MET des QDs CdSe et CdSe(S). Dans les deux cas, les QDs sont bien individualisés et présentent des formes sphériques, ou légèrement ellipsoïdales, avec une faible dispersion en taille (Figure 62 c et f). Les tailles des nanocristaux, déterminées sur une moyenne de 100 nanoparticules, sont respectivement estimées à $1,8 \pm 0,2$ et $2,7 \pm 0,3$ nm pour les QDs CdSe et CdSe(S). Les analyses de diffraction des électrons (Figure 62 b et e) montrent clairement trois anneaux de diffraction, correspondant, du centre vers l'extérieur, aux plans de diffraction (111), (220) et (311). La structure cristalline des QDs est donc validée comme étant proche de celle du matériau CdSe, cristallisant selon le groupe d'espace $F43m$.

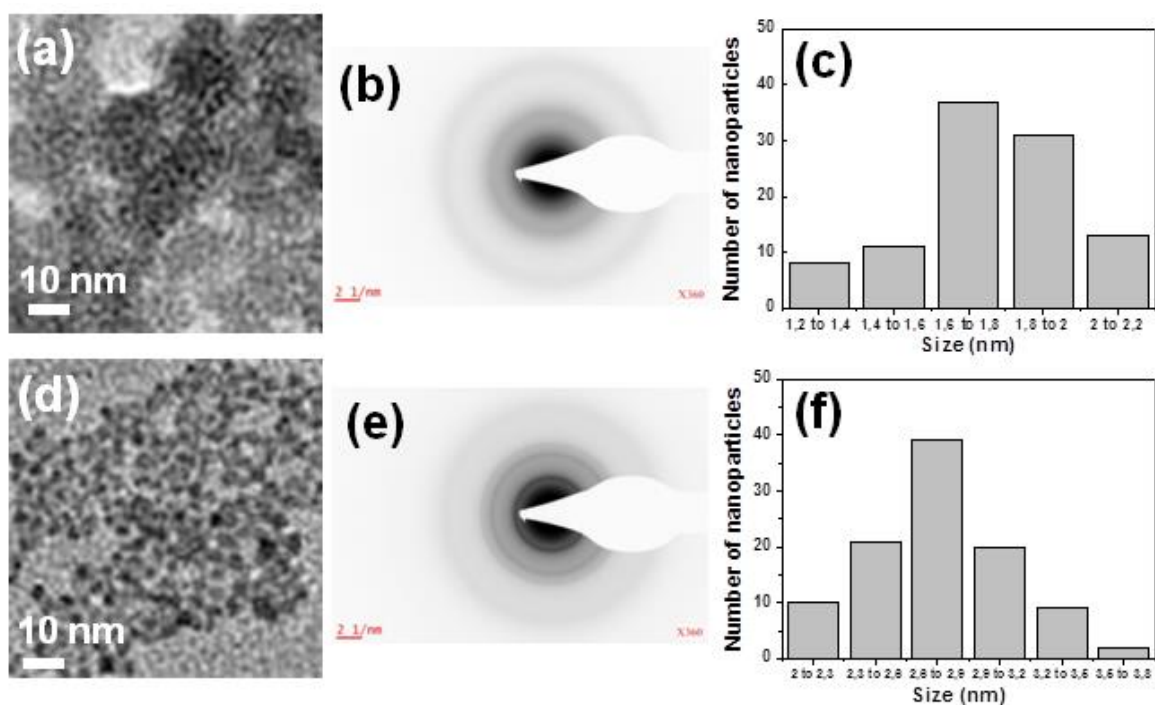


Figure 62. Images MET représentatives des QDs (a) CdSe et (b) CdSe(S). (c) et (d) sont les diffractogrammes des électrons correspondant et (e) et (f) les histogrammes présentant la distribution en taille.

Les diamètres hydrodynamiques des QDs, déterminés par DLS à partir de suspensions colloïdales fraîchement préparées (Jour 1), sont respectivement estimés à $4,3 \pm 0,7$ et $4,5 \pm 0,8$ nm pour les QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA (Figure 63). Ces diamètres hydrodynamiques, supérieurs aux diamètres des nanoparticules estimés par MET, montrent que les nanoparticules sont bien dispersées en milieu aqueux. Alors que les images MET ne permettent d'estimer que la taille du cœur inorganique, les analyses DLS donnent la taille de la nanoparticule entourée de sa sphère d'hydratation.

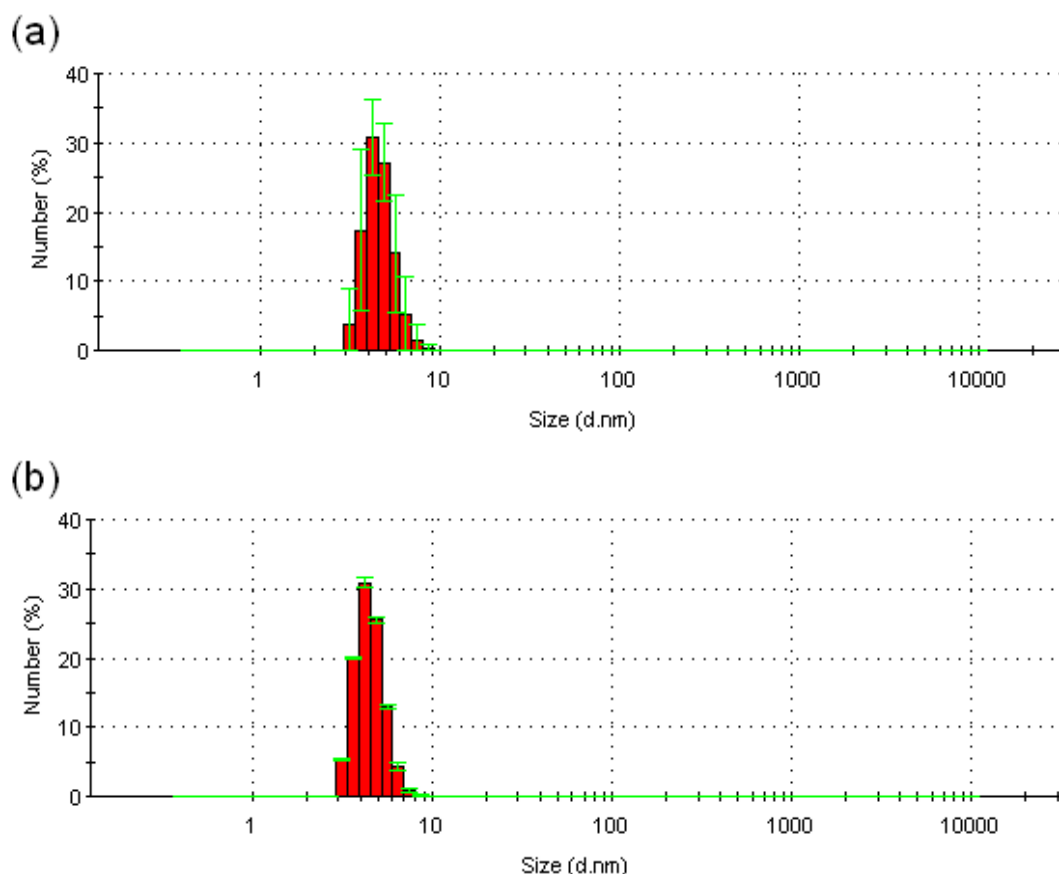


Figure 63. Histogrammes présentant les distributions en taille (diamètres hydrodynamiques) des QDs (a) CdSe et (b) CdSe(S) (Jour 1).

Les diamètres hydrodynamiques des QDs ont également été déterminés à partir de suspensions colloïdales 3 semaines après dispersion (Jour 21). Les résultats obtenus sont alors respectivement de $2,5 \pm 0,6$ et $4,3 \pm 0,9$ nm pour les QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA. Les résultats obtenus à Jour 1 et Jour 21 avec les QDs CdSe(S)@MSA montrent une bonne stabilité des dispersions au cours du temps. En raison de la diminution du diamètre hydrodynamique observé à Jour 21, les dispersions aqueuses des QDs CdSe semblent moins stables.

Cette diminution peut être due à deux phénomènes majeurs intrinsèquement liés, (i) la désorption d'une partie des ligands de surface menant à des sphères d'hydratation moins importante, ou (ii) à la dissolution partielle des QDs. Il faut cependant noter que le diamètre hydrodynamique des QDs CdSe@MSA à Jour 21 n'est donné qu'à titre indicatif. En effet,

pour qu'un diamètre hydrodynamique soit considéré comme acceptable, les corrélogrammes associés aux différentes répétitions doivent être compris entre 0,1 et 1 et quasiment superposables. Les corrélogrammes associés aux mesures faites à Jour 21 pour les QDs CdSe étant de qualité médiocre, il est uniquement possible de dire avec certitude que la suspension observée ne présente plus le même état qu'à Jour 1, contrairement à celle de QDs de CdSe(S) (Figure 64).

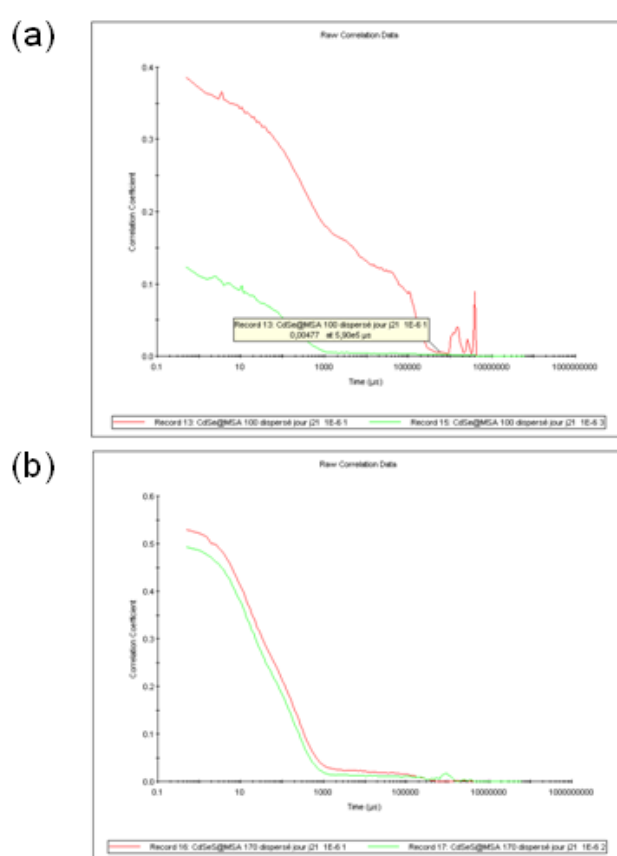


Figure 64. Corrélogrammes associés aux mesures du diamètre hydrodynamique des QDs (a) CdSe et (b) CdSe(S) (Jour 21).

La mobilité électrophorétique, proportionnelle à la charge ionique des échantillons, classiquement utilisée en physico-chimie pour déterminer la stabilité d'une suspension colloïdale, a également été mesurée. À pH = 7, les mesures effectuées sur les QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA, à Jour 1, donnent respectivement comme résultats $-3,3 \pm 0,4$

et $-4,7 \pm 0,4 \text{ V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, ce qui confirme la présence de charges négatives à la surface des QDs. Ce phénomène était attendu dans la mesure où les ligands de surface assurent la dispersion en milieu aqueux par le biais d'une fonction acide carboxylique, déprotonnée en carboxylate, à pH supérieur à 5. Il est également à noter que les valeurs obtenues pour les suspensions initiales laissent présager une meilleure stabilité dans le temps des suspensions de CdSe(S), les forces de répulsion pouvant être plus importantes du fait de la charge négative plus marquée.

La mobilité électrophorétique a également été évaluée sur des suspensions colloïdales à Jour 21. La bonne stabilité des QDs CdSe(S) est confirmée par l'obtention d'une mobilité électrophorétique de $-4,8 \pm 0,6 \text{ V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, proche de la valeur estimée à Jour 1. La désorption d'une partie des ligands stabilisant les QDs CdSe, menant à l'instabilité des suspensions colloïdales, est également confirmée par l'apparition de plusieurs populations peu chargées sur les graphiques présentant la distribution en mobilité électrophorétique. Une estimation des populations observées mène à conclure qu'environ 70% des particules ne présentent plus la même charge que celle qu'elles présentaient initialement (Figure 65).

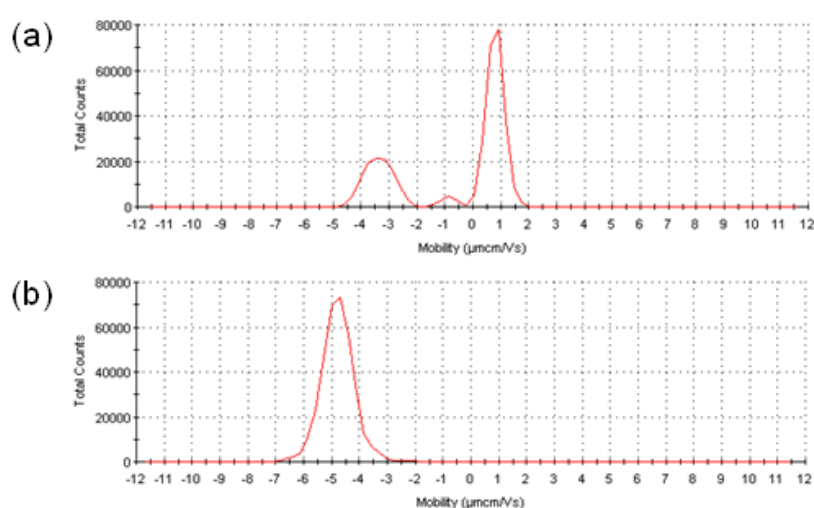


Figure 65. Graphiques présentant les distributions en mobilité électrophorétique des QDs (a) CdSe et (b) CdSe(S) (Jour 21).

La figure 66 décrit ensuite les propriétés optiques des QDs obtenus en montrant les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence brièvement présentés dans la partie concernant la synthèse des QDs CdSe et CdSe(S).

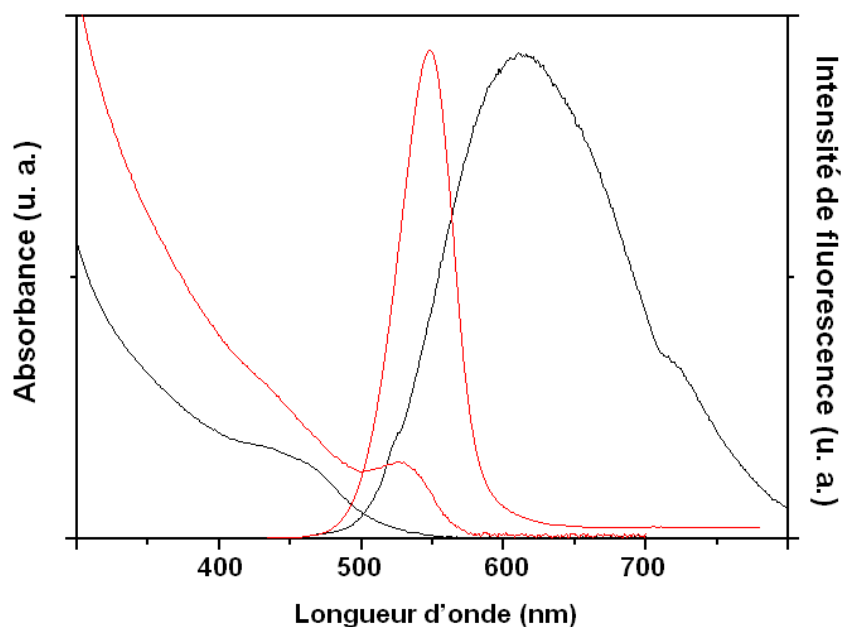


Figure 66. Spectres d'absorption et d'émission des QDs CdSe@MSA (en noir) et CdSe(S)@MSA (en rouge).

L'étroitesse du premier pic d'absorption excitonique, respectivement visualisable sur les spectres d'absorption à 440 et 528 nm pour les QDs CdSe et CdSe(S), indique que la taille des particules est uniforme, ce qui est en accord avec les images MET précédemment décrites. Les valeurs des coefficients d'extinction molaire, permettant le calcul des concentrations en nanoparticules, sont respectivement estimées à $31000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ($\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$) et $83000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ($\lambda_{\text{max}} = 528 \text{ nm}$), pour les QDs CdSe et CdSe(S).

Les spectres de fluorescence montrent deux comportements totalement différents selon le QD considéré. Les QDs CdSe@MSA ne présentent pas d'émission de fluorescence excitonique. L'émission de fluorescence est centrée à 612 nm et correspond à de l'émission de défauts. Les QDs CdSe(S)@MSA présentent des propriétés optiques de haute qualité par

rapport aux QDs CdSe@MSA en raison d'une cristallinité plus élevée et d'une meilleure passivation de surface. Le spectre d'émission de fluorescence, centré à 550 nm et uniquement attribuable à la recombinaison de l'exciton, est fin, symétrique et est caractérisé par une faible largeur à mi-hauteur (38 nm). Ce dernier paramètre confirme la faible polydispersité en taille des nanocristaux obtenus et est en accord avec les micrographies MET. À ce stade, il convient également de rappeler que lors de l'optimisation de la synthèse des QDs CdSe(S), une émission de fluorescence due aux défauts de surface a été observée pour des temps réactionnels courts (30 min). L'obtention de la fluorescence purement excitonique est donc bien due à la formation d'un alliage ainsi qu'à la croissance d'une « coquille » CdS qui permettent la réduction de l'émission de défauts au profit de l'émission due à la recombinaison de l'électron et du trou. Les RQ de fluorescence des QDs sont respectivement de 14 et 22 % pour les QDs CdSe et CdSe(S).

III.2.2. Photostabilité des QDs CdSe et CdSe(S)

La formation d'un matériau allié de type CdSe(S) permet également l'amélioration de la photostabilité des QDs. La figure 67 montre l'évolution, sur 1h30, des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de suspensions de QDs CdSe et CdSe(S) soumis à une irradiation forte et continue d'une lampe Hg-Xe ($P = 350$ mW). L'irradiation de QDs CdSe stabilisés par des ligands thioacides, comme le MSA, est connue comme étant un facteur favorisant l'oxydation des atomes de Se insaturés présents à la surface des QDs. Parallèlement à ce phénomène, la fonction thiol du ligand peut également être oxydée en disulfure. Cette oxydation conduit à la désorption du ligand, ce qui favorise la dégradation et l'agrégation des QDs et finalement leur photoblanchiment.

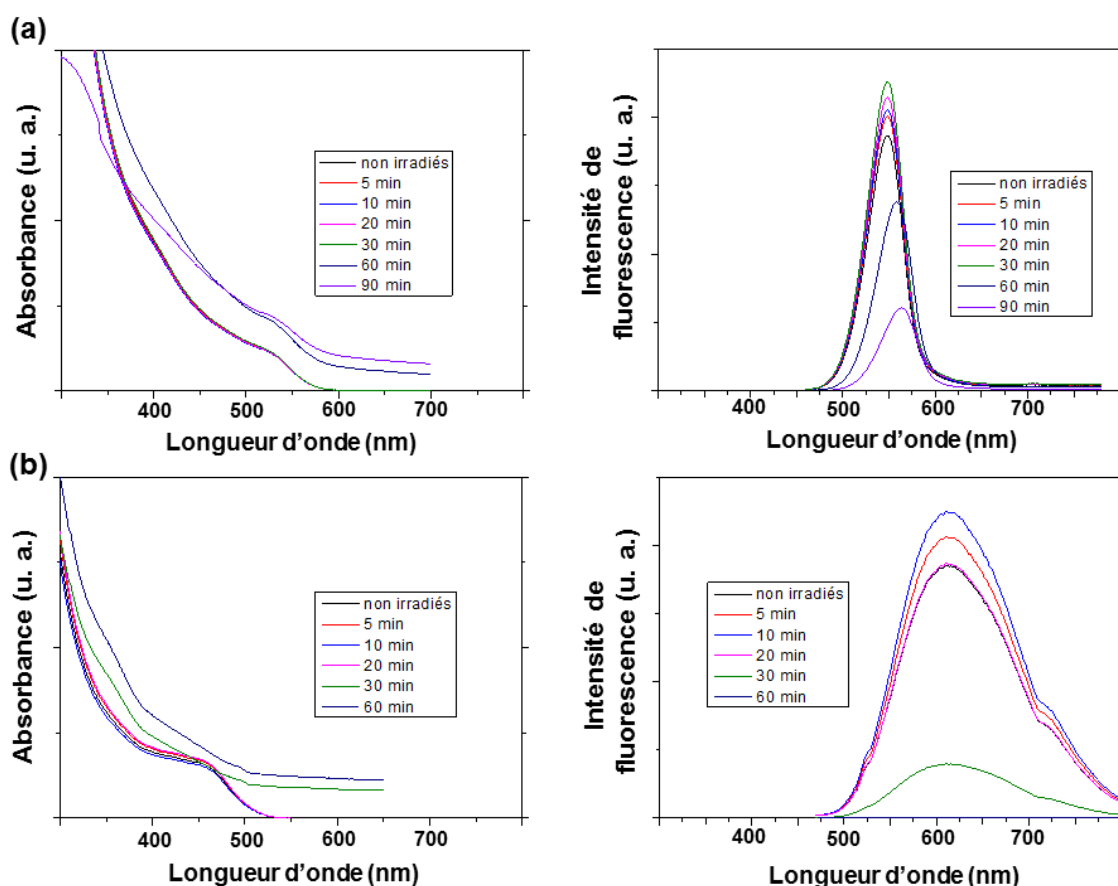


Figure 67. Évolutions des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence des QDs (a) CdSe(S) et (b) CdSe, irradiés par une lampe Hg-Xe (P = 350 mW).

Pour les deux types de QDs, l'intensité de fluorescence augmente pendant les premières minutes d'irradiation. Ce phénomène a lieu respectivement sur 10 et 30 min pour les QDs CdSe et CdSe(S), et s'explique par l'élimination progressive des défauts de surface. La photodégradation des ligands, générant des ions S^{2-} , permet la formation de structures cœur/coquille de type CdSe/CdS ou CdSe(S)/CdS, mieux passivées et présentant de meilleures propriétés optiques. Après 20 min d'irradiation, l'intensité de PL des QDs CdSe retombe à sa valeur initiale, puis chute rapidement à environ 80% de sa valeur initiale après 30 min. Finalement, la disparition complète des propriétés de photoluminescence est observée après une heure d'irradiation. Parallèlement, les spectres d'absorption montrent que la désorption ainsi que la décomposition progressive des ligands de surface conduisent d'abord à

une baisse de la dispersibilité en milieu aqueux, puis à l'agrégation et à la précipitation des QDs.

Soumis aux mêmes conditions d'irradiation, les QDs CdSe(S) alliés font preuve d'une meilleure résistance. En effet, aucun photoblanchiment, ni aucune trace d'agrégation ne sont observés avant au moins 45 min d'irradiation. La création de la coquille protectrice est confirmée par le décalage bathochrome (20 nm de 550 à 570 nm) observé sur les spectres d'émission de fluorescence. Les premiers signes d'agrégation n'apparaissent sur les spectres d'absorption qu'après 1 h d'irradiation, contre moins de 30 minutes pour les QDs CdSe. Parallèlement aux premiers signes d'agrégation, l'intensité de fluorescence des QDs CdSe(S) commence à diminuer progressivement jusqu'à atteindre environ 25% de sa valeur initiale après 1,5 h d'irradiation. Les QDs CdSe(S) sont donc environ 2 fois plus stables que les QDs CdSe en termes de résistance dans le temps au photoblanchiment.

III.2.3. Analyse ICP et stabilité des QDs

La composition élémentaire des QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA a été évaluée par dosage ICP à partir de dispersions colloïdales à 5 μM en QDs dans l'eau. Leur contenu brut respectif en Cd et Se est présenté dans le tableau 8.

Tableau 8. Analyses ICP de dispersions colloïdales à 5 μM de QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA : Analyse des rapports [Cd] / [Se].

	[Cd] (μM)	[Se] (μM)	[Cd] / [Se]
CdSe(S)@MSA	1531	520	2,95
CdSe@MSA	478	192	2,49

Un rapport $[Cd]/[Se]$ supérieur à 1 était attendu dans le cas des QDs CdSe(S)MSA puisque le procédé de synthèse à haute température permet l'obtention d'une structure où une partie des atomes de Se est remplacée par des atomes de S du fait de la décomposition partielle du ligand MSA en sulfure S^{2-} . De fait, c'est alors le ratio $[Cd]/([Se] + [S])$ qui devrait se rapprocher de 1. Toutefois, l'incorporation de S dans la structure cristalline, confirmée par les analyses DRX (§ III.2.1.), ne doit pas entraîner une élévation du rapport $[Cd] / [Se]$ aussi importante que celle observée. En effet, avec un rapport de $[Cd] / [Se] = 2,95$, le calcul montre qu'il y aurait 1,95 fois plus de S incorporé dans les QDs CdSe(S)MSA que de Se. Or, l'observation des diffractogrammes X montre une cristallisation intermédiaire entre les structures CdSe et CdS ce qui ne concorde pas avec une structure incorporant 1,9 fois plus de S que de Se. Combiné avec l'observation que les QDs de CdSe, présumés ne pas contenir de S, présentent également un rapport $[Cd] / [Se]$ élevé qui montre clairement que les teneurs en cadmium mesurées sont supérieures à celles attendues. Nous avons donc estimé la part de cadmium excédentaire dans les suspensions préparées à 5 μM en nanoparticules.

Tableau 9. Analyses ICP de dispersions colloïdales à 5 μM de QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA : Analyse de la teneur en Cd trouvée.

	[Cd] mesurée (μM)	[Cd] attendue (μM)	[Cd] excédentaire (μM)	Part de l'excédent (%)
CdSe(S)@MSA	1531	920	611	40
CdSe@MSA	478	375	103	21

La comparaison des $[Cd]$ attendues, d'après les estimations spectrophotométriques, aux $[Cd]$ mesurées par ICP, montre un excédent en Cd non négligeable dans nos préparations de QDs (Tableau 9) : 40 % (611 μM) et 21 % (103 μM) du cadmium introduit n'est, respectivement, pas pris en compte lorsque l'on estime spectrophotométriquement la

concentration en QDs CdSe(S) et CdSe. Le Cd excédentaire pourrait correspondre à des complexes Cd^{2+} -ligand, formés à partir de l'excès des précurseurs de départ, et chimisorbés à la surface des nanoparticules (§ I.1.4.2.1.). Dans le cas des QDs CdSe(S), la sous-estimation de la teneur en Cd pourrait aussi avoir une origine liée à un biais de calcul dans la méthode d'estimation de la concentration en nanoparticules à partir des données spectrophotométriques, la méthode étant normalement destinée aux QDs CdSe (Yu *et al.*, 2003). L'application de cette équation à nos nanoparticules de CdSe(S) constitue donc une approximation. Quoi qu'il en soit, il apparaît clairement que chaque préparation de QDs contient plus de cadmium qu'attendu.

Parallèlement à l'analyse élémentaire classique, nous avons utilisé l'ICP pour étudier la stabilité des QDs préparés. Pour cela, les dispersions aqueuses de QDs à 5 μM ont été dialysées pendant une heure contre de l'eau ultra-pure et la part de Cd^{2+} relargué en solution a été estimée par le calcul à partir des fractions en Cd retenu dans le rétentat (Tableau 10).

Tableau 10. Analyses ICP de dispersions colloïdales à 5 μM de QDs CdSe(S)@MSA et CdSe@MSA : Analyse de la libération en Cd après 1 heure de dialyse.

	CdSe(S)@MSA	CdSe@MSA
Cd (CdSe + Cd) dans A * à t = 0 (μmol)	15,31	14,38
Cd (CdSe + Cd) dans A à t = 1 h (μmol)	4,78	4,35
Cd (Cd) dans B à t = 1 h (μmol) **	0,93	0,43
Cd libre après 1 h de dialyse (μmol) ***	0,967	0,447
% de Cd libre à 1 h par rapport au total initialement engagé	6,3	9,4

* A : contenu de la membrane de dialyse (rétentat : 10 mL).

** le Cd présent dans B à t = 1 h est déduit de la perte en Cd dans A entre t = 0 et t = 1 h.

*** Considérant Cd^{2+} libre contenu par A et B et $n_{\text{Cd}^{2+} \text{ dans A}} = n_{\text{Cd}^{2+} \text{ dans B}} / (V_B / V_A)$.

Après une heure de dialyse, le pourcentage que représente la fraction « labile » en Cd, par rapport à la quantité totale en Cd engagée, est donc respectivement estimé à 6,3 et 9,4 % pour les QDs CdSe(S) et CdSe. Sans exclure la possibilité d'une faible dissolution d'une partie des QDs, la plus grande partie du Cd libéré est très certainement attribuable à la désorption de complexes de surface dans la mesure où l'intégrité des QDs semble conservée (Figure 68). En effet, les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence demeurent relativement inchangés, à la fois en termes d'intensité et de signal. À ce stade, les QDs montrent des stabilités dans l'eau environ équivalentes, avec moins d'un dixième de la teneur en Cd introduite relarguée.

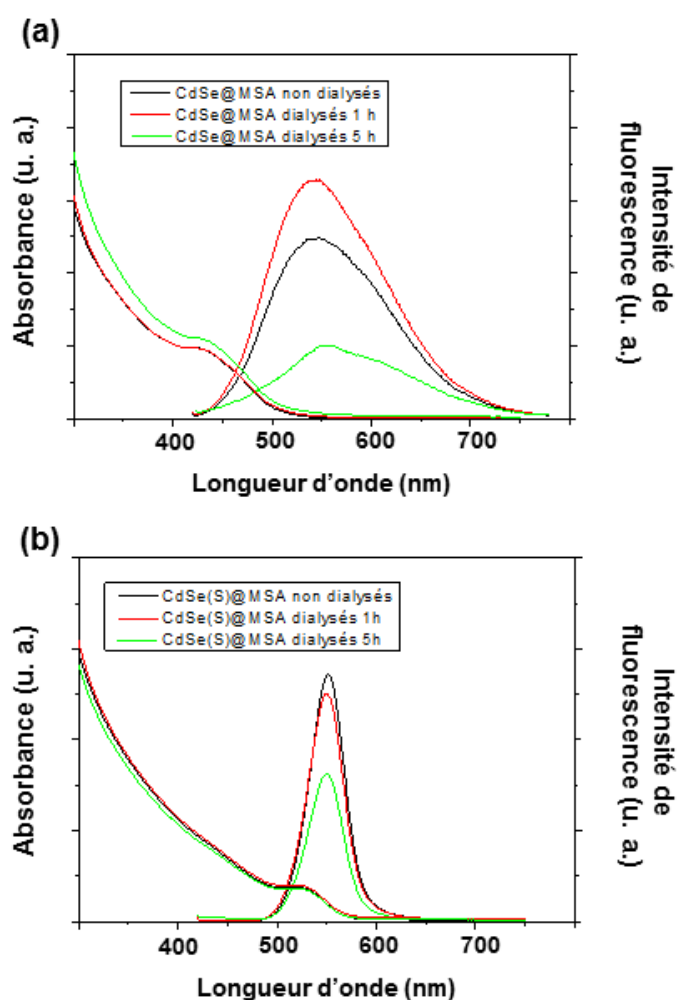


Figure 68. Évolution des propriétés photophysiques en fonction du temps de dialyse pour les QDs (a) CdSe@MSA et (b) CdSe(S)@MSA.

Une même expérience de dialyse mais menée sur des temps plus longs (5 h) a, par contre, montré une stabilité différente des deux QDs. En effet, alors que dans le cas des QDs CdSe(S), l'apparition de Cd libre semble être stabilisée après 1 heure de dialyse (6,3 et 6,7 % de Cd relargué à 1 et 5 h, respectivement), l'apparition de Cd libre est estimée à 15,2 %, après 5 heures de dialyse dans le cas des QDs CdSe. La stabilité moindre des QDs CdSe est confirmée par les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence enregistrés après 5 h de dialyse qui montrent respectivement l'apparition de phénomènes d'agrégation et une diminution notable des propriétés de photoluminescence due à une dégradation des QDs.

En conclusion, l'analyse élémentaire montre que les deux QDs présentent un excédent de Cd probablement lié à des complexes de surface. Les expériences de dialyse montrent que, sur un temps court, ces complexes contribuent à une libération non négligeable de Cd. Les deux préparations de QDs ne se comportent pas tout à fait de la même façon : (1) la préparation de QDs CdSe semble libérer plus de Cd en termes de pourcentage initialement engagé, alors que la préparation de QDs CdSe(S) semble libérer plus de Cd en termes de quantité, et (2) les altérations spectrales observées après 5 h de dialyse indiquent une plus grande fragilité des QDs CdSe par rapport aux QDs CdSe(S). Le Cd libéré et la fragilité des QDs seront à prendre en considération dans le cadre de l'étude des mécanismes impliqués dans la toxicité de ces nanoparticules.

Chapitre IV

Cytotoxicité

des QDs CdSe@MSA

et CdSe(S)@MSA et libération de Cd²⁺

La cytotoxicité des QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA a été évaluée sur la bactérie à gram négatif *Escherichia coli* MG1655, choisie au sein du laboratoire pour ses caractéristiques intrinsèques. Tout d'abord le choix d'un modèle biologique procaryote permet de s'affranchir de la possible internalisation des QDs par endocytose, mécanisme non pratiqué par la cellule bactérienne. De fait, les seules dégradations des QDs possibles sont extracellulaires et en cas de besoin, les nanoparticules, sont potentiellement récupérables pour être ré-analysées. Le choix de l'organisme *E. coli* comme modèle d'étude a ensuite été dicté par le fait qu'il s'agit du modèle bactérien le plus étudié et le mieux décrit dans la littérature. Son génome est entièrement séquencé et offre la possibilité de développer des approches moléculaires. De nombreux mutants sont disponibles et offrent l'opportunité d'étudier l'influence de différentes fonctions biologiques sur la stabilité et la toxicité des QDs. En outre, des variants génétiquement modifiés comme les biosenseurs permettent d'étudier la perception qu'a la bactérie de son environnement immédiat. C'est le cas, par exemple, des biosenseurs à EROs (§ I.4.2.2.), qui émettent un signal de fluorescence en présence de radicaux $O_2^{\bullet -}$ ou d' H_2O_2 , et nous renseignent donc sur une possible origine de la cytotoxicité des QDs.

La cytotoxicité a d'abord été évaluée à l'aide d'un test basé sur l'extinction d'une bioluminescence constitutive chez *E. coli* MG1655(pUCD607) lorsque celle-ci est confrontée à des doses toxiques de QDs. Les tests de bioluminescence, mis au point sur plaque de microtitration, permettent de cribler une grande variété de concentrations en QDs en un temps relativement court. De plus, utilisant des petits volumes de travail, cette approche limite la consommation excessive des nanoparticules synthétisées et permet la multiplication des tests réalisés.

IV.1. Étude de la cytotoxicité des QDs par extinction de bioluminescence

IV.1.1. Cytotoxicité des QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA

La toxicité des QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA a été évaluée à l'aide de la souche MG1655(pUCD607) construite par Xavier Bellanger au LCPME. Il s'agit d'une souche génétiquement modifiée par l'introduction du plasmide pUCD607 pour exprimer une bioluminescence constitutive. Sur le principe, toute altération dans la physiologie de la cellule doit se manifester par une extinction de sa bioluminescence. Concrètement, la cytotoxicité des QDs a été évaluée en exposant la souche à une large gamme de concentrations en QDs (1.10^{-12} à 1.10^{-5} M) dispersés en milieu MOPS-gluconate. Les cellules ont également été exposées à une même gamme de concentrations en CdCl₂ pour contrôle. La luminescence (activité physiologique) et la DO_{600 nm} (biomasse) ont ensuite été suivies à intervalle de temps régulier. L'analyse des données obtenues montre que pour une concentration donnée en QDs ou CdCl₂, les niveaux de luminescence mettent environ 2 à 3 h à se stabiliser à une valeur définitive. Un temps de 3 h a donc été retenu pour analyser les abattements de luminescence dans nos tests de cytotoxicité.

Typiquement, le tracé de l'évolution de la luminescence en fonction de la concentration en QDs, ou en CdCl₂, présente un aspect sigmoïdal à partir duquel deux concentrations remarquables peuvent être définies : la CSEO (« Concentration Maximale sans Effet Observé ») au-delà de laquelle les premiers effets sont visibles par une baisse de luminescence, et la CI₅₀ (« Concentration Inhibitrice médiane ») pour laquelle 50% d'inhibition de la luminescence est observée. Par ces variables, les QDs CdSe et CdSe(S) montrent des toxicités comparables, avec les premiers effets toxiques observables aux alentours de 1.10^{-10} M (CSEO) et des CI₅₀ calculées de $1,1.10^{-9}$ et 1.10^{-9} M, respectivement. Le CdCl₂ montre, quant à lui, une CSEO de 1.10^{-8} M et une CI₅₀ de $1,4.10^{-7}$ M (Figure 69).

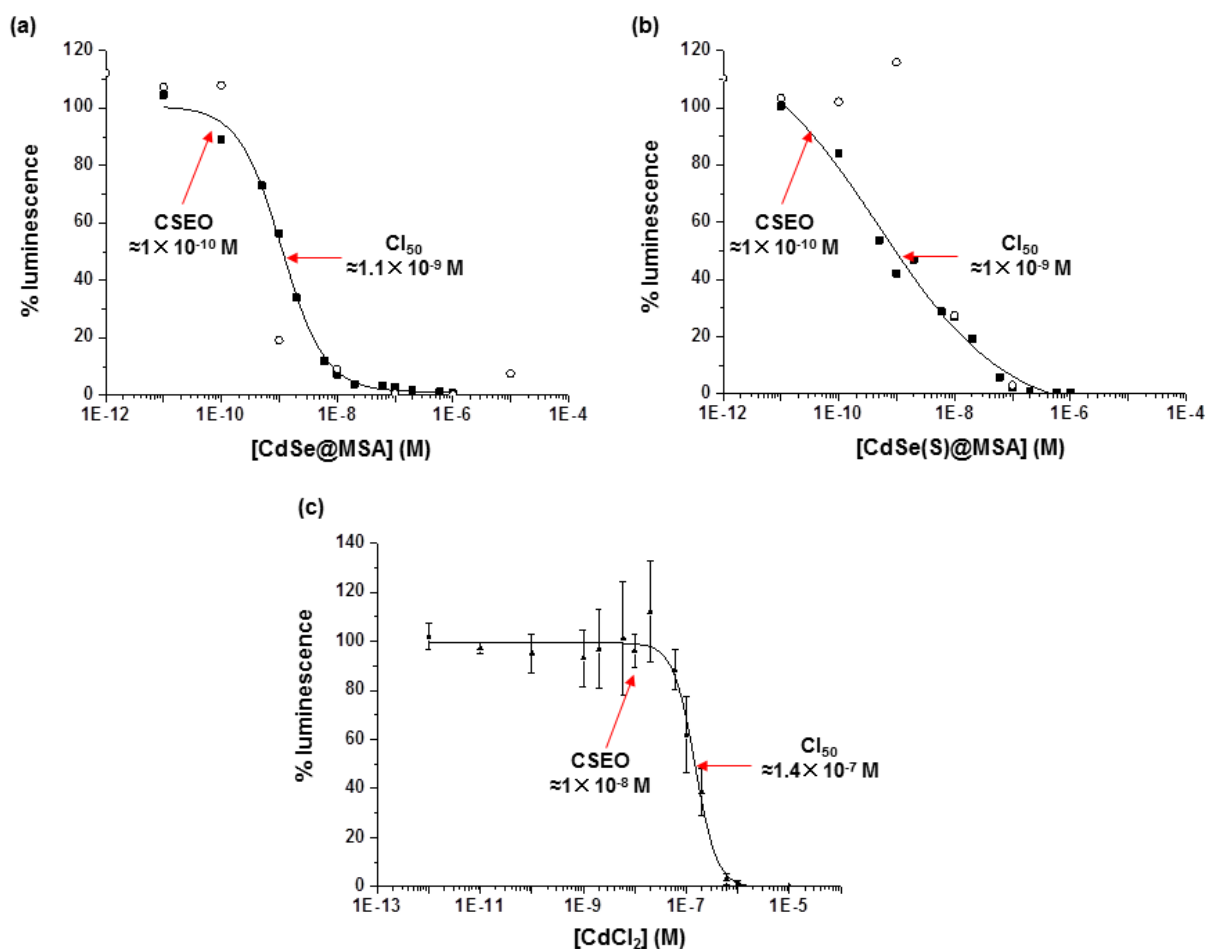


Figure 69. Toxicité à $t = 3$ h des QDs (a) CdSe@MSA, (b) CdSe(S)@MSA (duplicata : carrés noirs et ronds blancs) et (c) contrôle CdCl₂ (triplicata moyenné et présenté avec ses écarts-types). (Réplifications : manipulations indépendantes)

Les CI₅₀ obtenues ont ensuite été rapportées au contenu en cadmium pour chaque QD en tenant compte notamment de la correction à apporter d'après nos évaluations par ICP (Tableau 11).

Tableau 11. Calcul du contenu en Cd des QDs de CdSe et CdSe(S) à la concentration correspondante à la CI₅₀.

	QDs CdSe@MSA	QDs CdSe(S)@MSA
CI ₅₀ (M)	$1,1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-9}$
[éq Cd] théorique (M)	$8,2 \cdot 10^{-8}$	$1,8 \cdot 10^{-7}$
[éq Cd] corrigée par l'ICP (M)	$1 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-7}$

Ces calculs montrent que la toxicité des QDs CdSe et CdSe(S) est du même ordre de grandeur de celle qu'aurait présenté leur contenu en Cd respectif. Cependant, ne connaissant pas le niveau de dissolution des QDs dans les conditions de l'expérience, il paraît difficile de conclure quant à l'origine de la toxicité des QDs. En d'autres termes, si ces expériences ont eu le mérite de cerner les niveaux de toxicité des deux QDs, elles ne permettent pas de conclure quant à une contribution (ou non) du métal. Pour aller plus loin, la biodisponibilité en métal dans les conditions d'expériences doit donc être évaluée.

IV.1.2. Perception cellulaire du Cd^{2+} libéré par les QDs

Avant de poursuivre avec l'évaluation de la biodisponibilité en métal, nous avons souhaité approfondir des observations faites à partir des expériences précédentes d'extinction de luminescence sur la souche MG1655(pUCD607). Au cours de ces expériences, il est apparu que la bactérie présentait un signal de bioluminescence inattendu lorsqu'elle était exposée au CdCl_2 à des concentrations comprises entre la CSEO et l' CI_{50} . Dans cette zone de concentrations, une surexpression de la luminescence a souvent été observée avec un maximum ne survenant pas toujours exactement aux mêmes concentrations (Figure 70a). Sur une courbe de réponse moyenne, la surexpression de luminescence apparaît donc comme une zone de fluctuation entre la CSEO et l' CI_{50} (Figure 70b), avec des niveaux pouvant même atteindre 200 % pour des temps d'exposition courts (Figure 70c). Notons, par ailleurs, que ce phénomène est spécifique du Cd, des expériences menées en parallèle avec du ZnCl_2 n'ayant montré aucune surexpression de luminescence. Il semble donc s'agir d'une particularité due à l'interaction du Cd avec la cellule bactérienne. Une surexpression de luminescence similaire a été observée avec les QDs CdSe et CdSe(S), suggérant une possible cause commune (Figure 70 d et e).

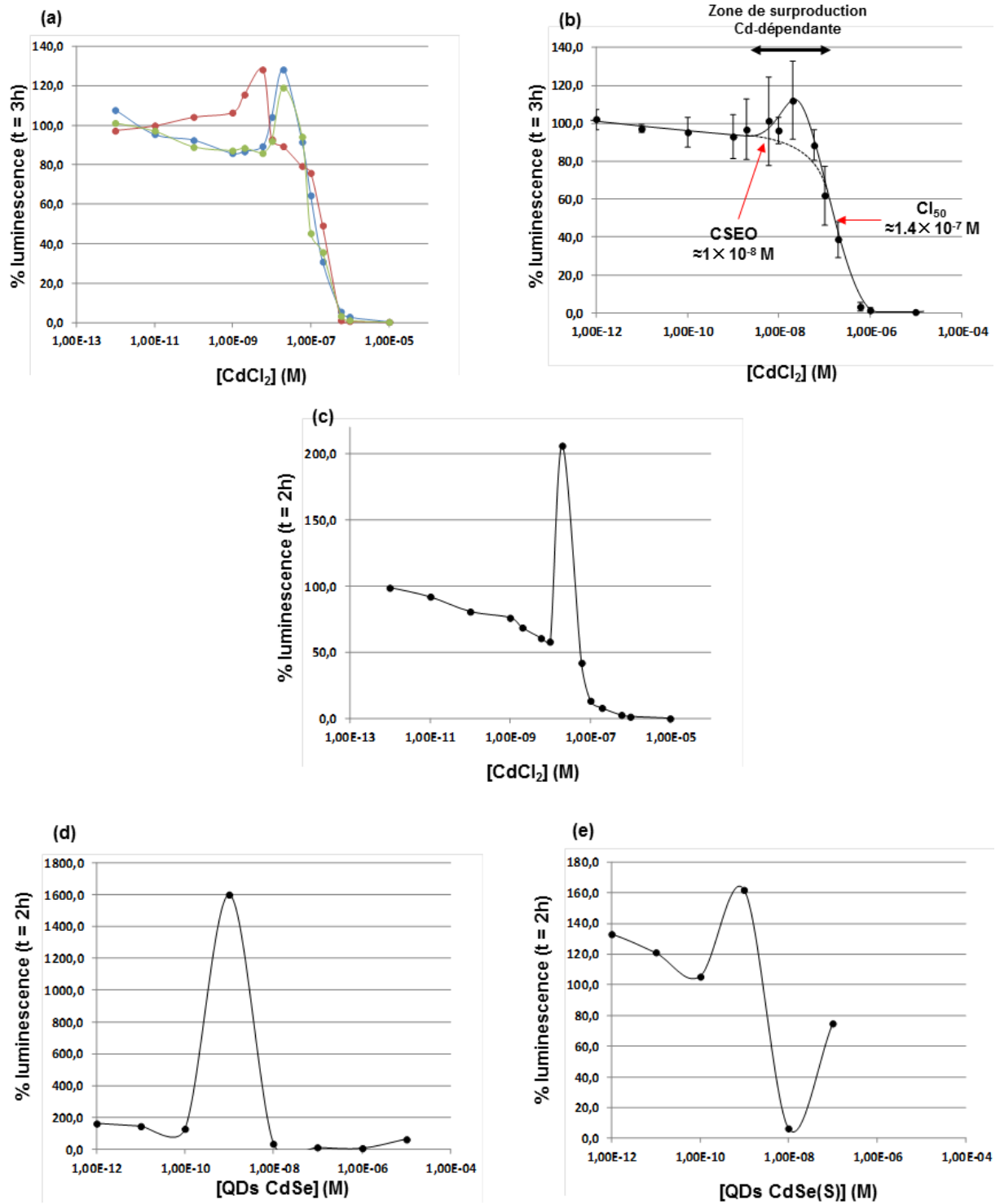


Figure 70. Surproduction de luminescence en présence de $CdCl_2$: (a) de trois expériences indépendantes ou (b) moyennées avec écarts-types de signaux obtenus à $t = 3$ h. (c) Exemple de surexpression de la luminescence à $t = 2$ h.

Exemple de surproduction de luminescence en présence de QDs de (d) CdSe et (e) CdSe(S) à $t = 2$ h.

D'un point de vue biochimique/physiologique, la bioluminescence est considérée par certains auteurs comme une dérivation du flux d'électrons qui alimente normalement la chaîne respiratoire (Dunn 2012). Nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle une légère inhibition de la chaîne respiratoire pourrait avoir pour conséquence l'augmentation du débit d'électrons vers la luciférase. Si tel est le cas, la surexpression de la luminescence en présence de Cd pourrait résulter d'une interaction particulière entre le métal et la chaîne respiratoire (Surowitz *et al.* 1984, Pacheco *et al.* 2008). Pour que cela soit possible, il faut toutefois que la perturbation soit limitée, à des concentrations qui ne sont pas trop toxiques, notamment à proximité de la CSEO. Pour confirmer notre hypothèse, nous avons utilisé l'azoture de sodium (NaN_3), connu comme inhibiteur du cytochrome terminal de la chaîne respiratoire (Borisov *et al.* 2013), et avons observé son influence sur l'émission de luminescence dans les mêmes conditions que précédemment (Figure 71).

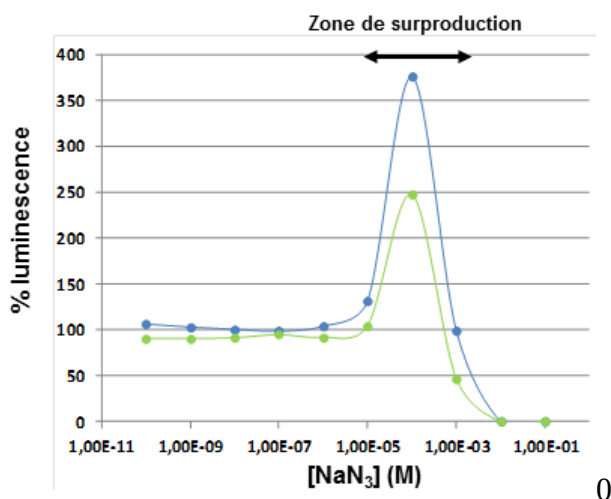


Figure 71. Surproduction de luminescence en présence de NaN_3 (duplicata, t = 3 heures, en vert et bleu).

Comme prévu, la présence de NaN_3 à des concentrations situées entre la CSEO et la CI_{50} provoque une surexpression de la luminescence confirmant donc l'interconnexion de son mécanisme de production avec la chaîne respiratoire. Ces observations tendent à montrer que

le Cd^{2+} interfère lui aussi directement avec la chaîne respiratoire puisqu'il induit également une surexpression de la luminescence. La spécificité de cette réponse pour le Cd, par rapport à d'autres métaux, est quelque peu étonnante puisqu'elle implique une cible spécifique. Une telle spécificité pourrait éventuellement s'expliquer par la théorie HSAB évoquée au paragraphe I.4.3.1.. En effet, le Cd^{2+} , assimilable à un acide faible, est plus susceptible d'interagir avec les centres Fe-S des protéines que d'autres métaux, comme le Zn^{2+} , ce qui pourrait expliquer la spécificité des cibles biologiques (Lemire *et al.* 2013). Quoi qu'il en soit, le fait que les QDs CdSe et CdSe(S) provoquent également une surexpression de luminescence à des concentrations proches de la CSEO semble indiquer une libération de Cd^{2+} à une concentration perceptible par la cellule. Le fait qu'elle survienne entre la CSEO et l' CI_{50} indique également que cette perception de Cd^{2+} est concomitante avec l'apparition de la toxicité. Il est cependant difficile à ce stade de préciser si le métal est la seule source de toxicité associée aux QDs.

IV.2. Cadmium biodisponible libéré par les QDs CdSe

Les expériences précédentes ont montré que les QDs CdSe libéraient une quantité non négligeable de Cd^{2+} , mais il restait encore à en préciser l'ampleur afin de définir si le métal libéré pouvait participer à la toxicité des QDs. Pour cela, les ions Cd^{2+} libérés par les QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA ont été quantifiés à l'aide du biosenseur bactérien *Cupriavidus metallidurans* AE1433, génétiquement modifié pour émettre une bioluminescence spécifiquement induite par les ions Cd^{2+} .

Les deux QDs, dispersés en milieu RM-gluconate, ont été exposés au biosenseur AE1433 sur une gamme de concentrations allant de 0,1 à 20 nM, et l'induction de la luminescence a été estimée. Le chlorure de cadmium CdCl_2 a été utilisé comme contrôle pour cette expérience. Les résultats obtenus montrent que le biosenseur fournit une réponse linéaire

pour des concentrations en Cd^{2+} comprises entre 0 à 2000 nM et correspondant à des facteurs d'induction allant de 1 à 10 (Figure 72 a). Ces plages de valeurs définissent les limites d'utilisation du biosenseur.

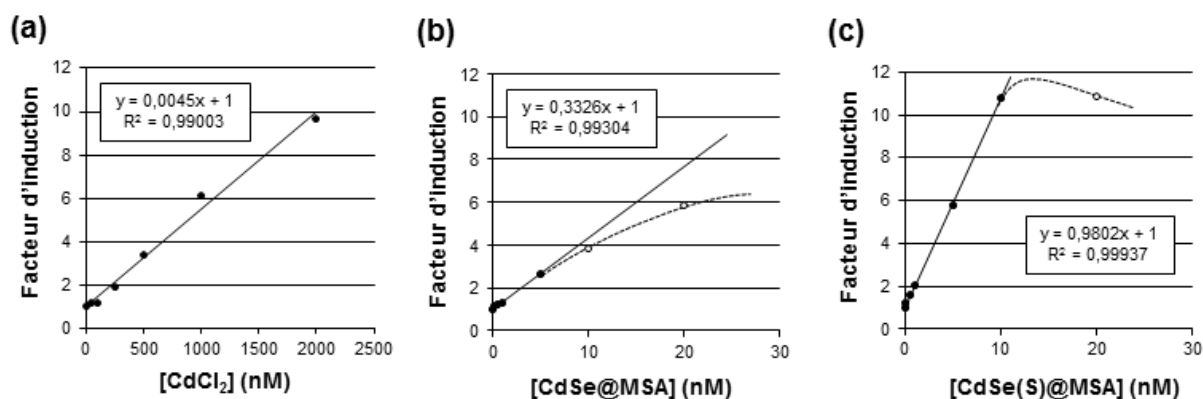


Figure 72. Bioluminescence induite par (a) CdCl_2 , (b) les QDs de CdSe@MSA et (c) les QDs de CdSe(S)@MSA , en fonction des concentrations initialement introduites.

Les réponses de bioluminescence des QDs CdSe et CdSe(S) se sont révélées linéaires respectivement jusqu'à 5 et 10 nM en nanoparticules, concentrations à partir desquelles les QDs deviennent toxiques (Figure 72 b et c). Notons ici que la perte de proportionnalité entre la réponse du biosenseur et la concentration en QDs CdSe@MSA survient avant que les limites d'utilisation du biosenseur ne soient atteintes en termes de facteur d'induction. Ceci démontre que les effets toxiques du QD CdSe@MSA sur le biosenseur sont visibles avant que la concentration maximale acceptable en Cd^{2+} ne soit atteinte, et donc que la toxicité a une autre origine que le métal. Par contre, pour le QD CdSe(S)@MSA , la perte de linéarité dans la réponse du biosenseur coïncide avec celle obtenue pour CdCl_2 , ce qui pourrait laisser supposer que le Cd^{2+} joue alors un rôle prépondérant dans la toxicité du QD vis-à-vis du biosenseur. À toutes fins utiles, une série d'expériences contrôles a été réalisée pour étudier l'influence d'espèces sélénées (SeO_4^{2-} et SeO_3^{2-}) et soufrées (S^{2-}), sur le fonctionnement du biosenseur. Pour cela, la souche AE1433 a été exposée à des gammes de concentrations en

Na₂SeO₄, Na₂SeO₃ et Na₂S allant de 10 à 1500 nM en présence d'une concentration fixe en CdCl₂ (250 nM). La réponse du biosenseur est inchangée quelle que soit l'espèce testée ou sa concentration, excluant donc leur implication dans les phénomènes de toxicité observés jusqu'alors.

En plus des renseignements acquis en observant les altérations des profils de réponse, le biosenseur AE1433 a également été utilisé pour évaluer la quantité de Cd²⁺ biodisponible libéré par les QDs. À cet effet, la courbe de réponse obtenue pour l'étalon CdCl₂ permet d'extraire une équation liant la concentration en Cd²⁺ au facteur d'induction ($y = 0,0045x + 1$; $R^2 = 0,99$). Cette équation a été utilisée pour calculer la concentration en Cd²⁺ biodisponible libéré par les QDs à partir de niveaux de luminescence mesurés pour une concentration non toxique en nanoparticules, soit ici 5 nM (Figure 72b et 71c). Les différentes étapes de calculs effectuées sont présentées dans le tableau 12.

Tableau 12. Exemple de calculs permettant d'obtenir le pourcentage de Cd biodisponible.

	QDs CdSe	QDs CdSe(S)
Facteur d'induction pour 5 nM théorique en QDs introduits (recalculé à partir de la régression)	2,6	5,9
[Cd ²⁺] relargué par 5 nM théorique de QDs *	368 nM	1088 nM
[Cd ²⁺] introduite (corrigée par l'ICP)	471 nM	1539 nM
% relargué (par rapport à la concentration réellement introduite)	78 %	71 %

* calcul utilisant l'équation $y = 0,0045x + 1$ (Figure 72).

Ces calculs indiquent qu'à 5 nM théorique en QDs, la libération en Cd²⁺ est élevée, puisque 78 et 71 % des QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA sont respectivement dissous (par rapport aux concentrations réellement introduites). Les pourcentages de dissolution obtenus peuvent maintenant être corrélés à la cytotoxicité précédemment observée, puisque la

dissolution des QDs est estimée à une concentration du même ordre de grandeur que les CI_{50} observées (≈ 5 vs. 1 et 1,1 nM). Les quantités de Cd relarguées par dissolution des QDs CdSe et CdSe(S) à l' CI_{50} seraient donc respectivement de $0,7 \cdot 10^{-7}$ et $2,1 \cdot 10^{-7}$ M. Le Cd libéré est alors sensiblement du même ordre de grandeur que la CI_{50} du CdCl₂ ($1,4 \cdot 10^{-7}$ M), ce qui implique que les QDs semblent bien présenter une toxicité due à la libération de Cd par les nanoparticules. Cependant, même si la libération de Cd semble être le moteur de la cytotoxicité observée, on ne peut exclure une contribution additionnelle de la production d'EROs sur la toxicité globale des QDs. Cette possible contribution ne pourra être évaluée qu'en comparant la toxicité des nanoparticules selon qu'elles soient photo-activées ou non.

Chapitre V

Cytotoxicité

des QDs CdSe@MSA

et CdSe(S)@MSA et génération d'EROs

Dans ce chapitre, nous nous attacherons à étudier la cytotoxicité des QDs sous différentes conditions d'illumination, avant d'évaluer leur capacité à générer des EROs. La production de radicaux superoxydes et hydroxyles par les QDs, a été évaluée et leurs significativités vis-à-vis du système biologique a finalement fait l'objet d'une étude mettant en œuvre des biosenseurs conçus pour révéler l'existence d'un stress oxydant chez *E. coli*.

V.1. Étude de la cytotoxicité des QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA par des cinétiques de croissance

Les expériences précédentes basées sur l'extinction de luminescence ne permettent pas de prendre en compte l'effet de la production d'EROs, les manipulations ne pouvant être réalisées sous illumination. L'implication de la production d'EROs, et donc de la réactivité des QDs, a alors été envisagée en étudiant l'effet des conditions d'illumination sur la cinétique de croissance d'*E. coli* MG1655. Cette approche met en jeu de plus grands volumes de culture (consommation de QDs plus élevée), mais présente l'avantage d'être beaucoup plus flexible en termes de conditions d'utilisation. Dans un premier temps, nous avons étudié la cytotoxicité des deux QDs sous illumination, avant de nous intéresser à l'influence de la production d'EROs en répétant certaines expériences à l'obscurité.

V.1.1. Étude comparative des deux QDs

La toxicité des QDs a d'abord été évaluée sous illumination (1250 lux, néon à spectre complet) en comparant les cinétiques de croissance d'*E. coli* MG1655, en milieu LB/10, en absence et en présence de QDs (100 à 4000 nM). Les temps de génération obtenus pour les différentes cultures réalisées sont présentés dans le tableau 13. Le temps de génération moyen d'une culture contrôle de MG1655, en LB/10 (30°C), est de 44 ± 2 minutes (21 répétitions).

Nous considérons donc comme significatif tout ralentissement de croissance pour lequel le temps de génération est supérieur à 46 minutes.

Tableau 13. Temps de génération (Tg) obtenus sous illumination.

[QDs] introduites (nM)	0	100	500	1000	2000	3000	4000
Tg en minutes QDs CdSe(S)@MSA (nb de répétitions)	44 ± 2 (21)	45 (1)	45-43 (2)	47 (1)	51-53 (2)	56 (1)	69 (1)
Tg en minutes QDs CdSe@MSA (nb de répétitions)	44 ± 2 (21)	51-49 (2)	54-55 (2)	57-59 (2)	65-66 (2)	70 (1)	Absence de croissance

Contrairement aux expériences basées sur l’extinction de la luminescence, les cinétiques de croissance montrent que les deux QDs ne présentent pas le même niveau de toxicité. L’augmentation des temps de génération est dose-dépendante pour les deux QDs. Alors que les premiers signes de toxicité n’apparaissent qu’à partir de 1 µM pour les QDs CdSe(S)@MSA, les QDs CdSe@MSA se montrent toxiques dès 100 nM avec un arrêt complet de la croissance pour 4 µM. Notons que les premiers signes de toxicité observés par cinétique de croissance apparaissent à des concentrations plus élevées que pour les tests basés sur l’extinction de luminescence. Cette différence peut s’expliquer par le fait que les milieux utilisés d’une série d’expériences à une autre ne sont pas les mêmes. En effet, l’utilisation, dans le cas présent, d’un milieu LB/10 riche peut favoriser certains phénomènes de complexation, notamment vis-à-vis des ions Cd²⁺ qui sont alors moins biodisponibles.

V.1.2. Toxicité exaltée sous illumination

L’influence de la production d’EROs par les QDs, et donc de leur réactivité, a été étudiée en comparant des cinétiques de croissance de cultures de *E. coli* MG1655 placées sous éclairage contrôlé et à l’obscurité. Pour cela, l’expérience a été conduite à une

concentration en QDs fixe de 2 μM , concentration pour laquelle les QDs montrent une toxicité sans que cela n'implique un arrêt total de la croissance des cellules.

La figure 73 montre que la toxicité des QDs CdSe(S)@MSA est identique quelles que soient les conditions d'éclairement, le temps de génération étant dans les deux cas de 51 minutes. En revanche, dans le cas des QDs CdSe@MSA, la toxicité est moindre à l'obscurité, ce qui indique qu'une partie de la toxicité observée est photo-induite.

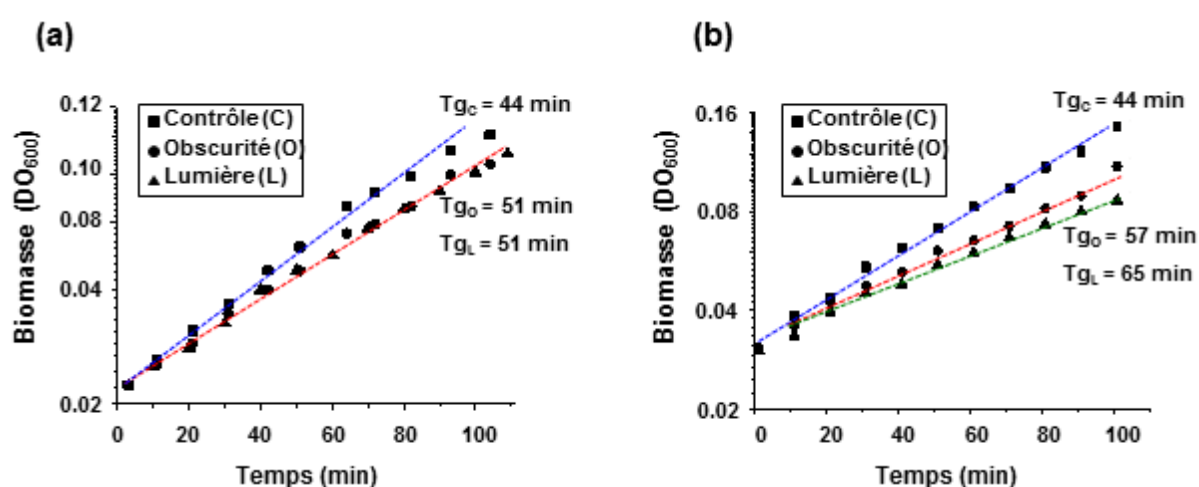


Figure 73. Cinétique de croissance en milieu LB/10 à l'obscurité et à la lumière en présence de QDs (a) CdSe(S)@MSA et (b) CdSe@MSA (illumination 1250 lux, [QDs = 2 μM], 2 répétitions par conditions). T_{g_O}(CdSe(S)) = 52 et 51 min, T_{g_L}(CdSe(S)) = 51 et 53 min T_{g_O}(CdSe) = 57 et 56 min, T_{g_L}(CdSe) = 66 et 65 min, avec T_{g_O}, temps de génération à l'obscurité et T_{g_L}, temps de génération à la lumière.

La cytotoxicité photo-induite étant maintenant démontrée pour le QD CdSe@MSA, il nous est apparu intéressant de vérifier si elle correspondait à une réelle différence entre les deux nanoparticules en termes de production d'EROs et donc de réactivité.

V.2. Production d'EROs par les QDs photoactivés

V.2.1. Génération de radicaux superoxydes

La production de radicaux superoxydes O₂^{•-} par les QDs CdSe@MSA et

CdSe(S)@MSA photoactivés a été évaluée en se basant sur leurs capacités à réduire le NitroBleu Tetrazolium (NBT) (jaune pâle) en dérivés du formazan (bleu foncé) absorbant notamment à 560 nm. Des expériences de photo-activation des QDs ont été menées sous UV (lampe centrée à 365 nm) à différents temps d'irradiation et en présence d'oxygène. Les résultats présentés sur la figure 74 montrent que quel que soit le QD, la photo-activation conduit à une augmentation de la production d' $O_2^{\bullet-}$, comme en témoigne la production de formazan. Des contrôles menés en parallèle montrent que sur la même base de temps, des QDs non photo-activés ne produisent pas d' $O_2^{\bullet-}$. Ces expériences témoins, menées à l'obscurité, confirment que la production de radicaux $O_2^{\bullet-}$ par transfert d'électrons des QDs de CdSe et CdSe(S) à l'oxygène moléculaire, est un phénomène photo-induit.

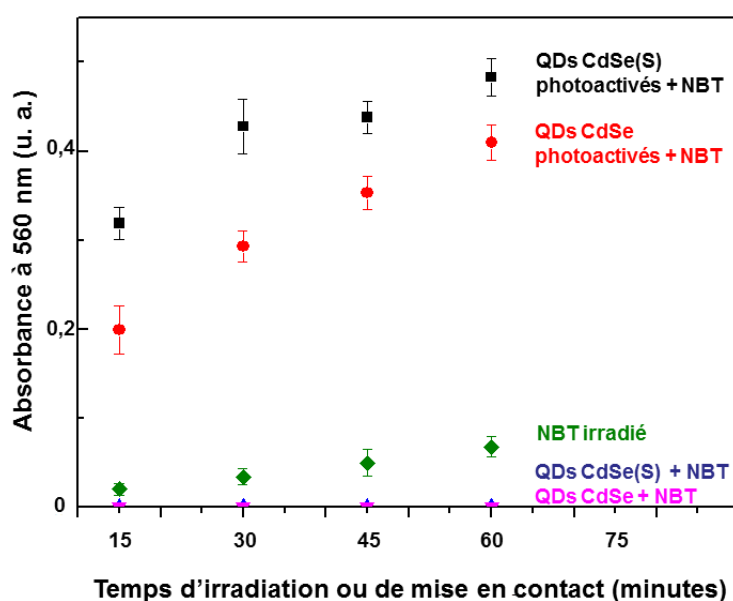


Figure 74. Évolution de l'absorbance relevée à 560 nm (*i. e.* formation d' $O_2^{\bullet-}$) dans le cas de dispersions de QDs photo-activés (CdSe, en rouge, et CdSe(S), en noir) ou non (CdSe, en violet, et CdSe(S), en bleu) en conditions saturées en O_2 . La stabilité de la sonde sous irradiation est présentée en vert.

Les QDs CdSe(S)@MSA génèrent légèrement plus de radicaux $O_2^{\bullet-}$ que les QDs CdSe. Après 60 minutes d'irradiation de suspension de QDs à 2500 nM (≈ 500 mg/L) dans des solutions saturées en oxygène, les concentrations en radicaux $O_2^{\bullet-}$ sont respectivement de 322

± 14 et $273 \pm 13 \mu\text{M}$. Ces valeurs sont relativement faibles si on les compare à celles obtenues pour des QDs ZnO, bien connus pour être fortement producteurs de radicaux $\text{O}_2^{\bullet-}$. Li *et al.* (2012) ont, par exemple, estimé à $167 \mu\text{M}$ la production en radicaux $\text{O}_2^{\bullet-}$ dans des dispersions contenant 5 mg/L de QDs ZnO. La faible capacité des QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA à produire des radicaux $\text{O}_2^{\bullet-}$ est également confirmée par les expériences réalisées avec des dispersions de QDs ayant préalablement été appauvries en oxygène par barbotage à l'azote. Les résultats présentés en figure 75 sont proches de ceux décrits en figure 74.

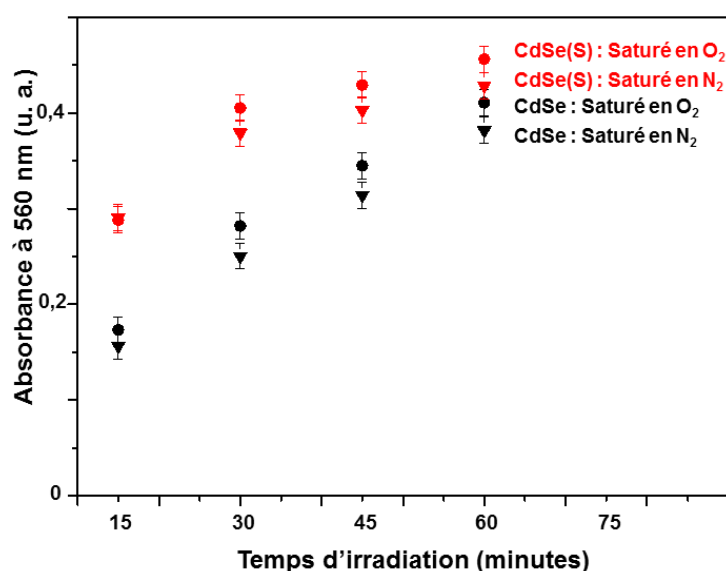


Figure 75. Évolution de l'absorbance relevée à 560 nm (*i. e.* formation d' $\text{O}_2^{\bullet-}$) dans le cas de dispersions de QDs CdSe (en noir) et CdSe(S) (en rouge) saturées en O_2 (ronds) ou en N_2 (carrés).

En conclusion, les quantités de radicaux $\text{O}_2^{\bullet-}$ détectées étant très faibles, par rapport aux quantités produites par des QDs de ZnO, leur impact sur la cytotoxicité est à mettre en question et la production d'autres types d'EROs est à envisager.

V.2.2. Génération de radicaux hydroxyles

La production de radicaux hydroxyles $\text{OH}^{\bullet}$ par les QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA

photoactivés a été évaluée à l'aide de disodium téréphthalate (DST), sonde spécifique à la détection de radicaux hydroxyles en milieu aqueux. Pour cela, des expériences ont été menées, en présence d'oxygène, en utilisant différents temps de photo-activation et les intensités de fluorescence à 428 nm ont été mesurées. La figure 76 montre que quel que soit le QD photo-activé, une augmentation de l'intensité de fluorescence, correspondant à la formation de l'anion 2-hydroxytéréphthalate HTA par oxydation du DST, est observée.

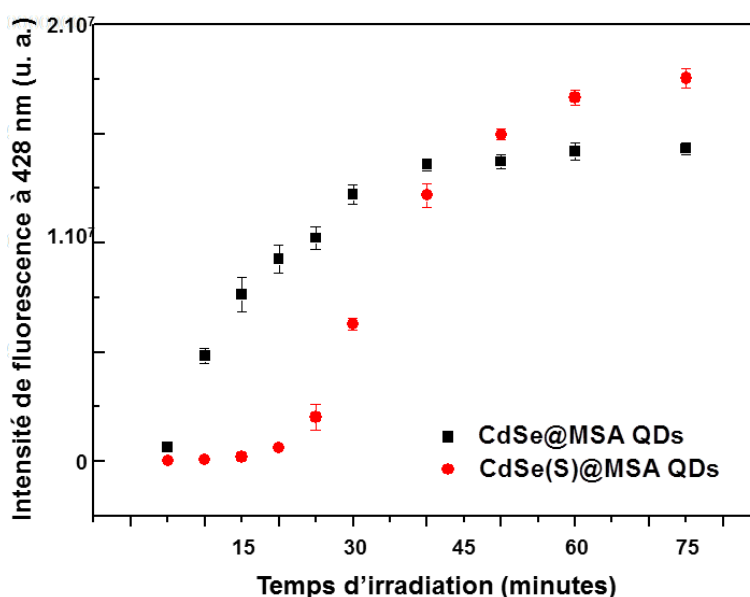


Figure 76. Évolution de l'intensité de fluorescence à 428 nm (*i. e.* formation d'OH•).

Les profils de production de radicaux hydroxyles sont par contre différents selon le QD étudié. Dans le cas des QDs CdSe@MSA, les échantillons correspondant aux temps d'irradiation de 5 à 25 min montrent une forte augmentation du signal de fluorescence, contrairement aux QDs alliés CdSe(S)@MSA. Après environ 30 à 40 min, la production de radicaux OH• par les QDs CdSe@MSA se stabilise à une valeur quasi-constante.

Dans le cas des QDs CdSe(S), une augmentation rapide de la production d'anions HTA est observée pour les échantillons irradiés au minimum 30 min et un plateau est atteint seulement après 1 heure de photoactivation. Les quantités finales de radicaux OH• produits

sont cependant du même ordre de grandeur que celles produites par les QDs CdSe après 75 min d'irradiation. En effet, 10 nmol de QDs CdSe et de CdSe(S) produisent respectivement 73 et 92 μM de radicaux $\text{OH}^\bullet$. Des expériences témoins ont également été effectuées, en plaçant des QDs en présence de DST afin d'exclure toute possibilité de faux positifs. Dans ces expériences de contrôle, la fluorescence observée à 430 nm est négligeable, montrant non seulement que la formation de HTA dans les expériences mettant en jeu les QDs ne provient que de la formation de radicaux $\text{OH}^\bullet$, mais aussi que la formation de radicaux $\text{OH}^\bullet$, tout comme celle des radicaux $\text{O}_2^{\bullet-}$, est photo-induite.

Enfin, nous avons confirmé que la génération de radicaux $\text{OH}^\bullet$ est bien due aux QDs en ajoutant du mannitol, piègeur de radicaux libres bien connu (Shen *et al.* 1997), dans le mélange réactionnel juste avant le début de l'irradiation. En présence de ce composé (10.000 équivalents introduits par rapport aux QDs) (Figure 77), l'oxydation du DST en HTA, en présence de QDs CdSe et CdSe(S), est respectivement réduite de 62 et 41 % par rapport aux expériences menées sans mannitol.

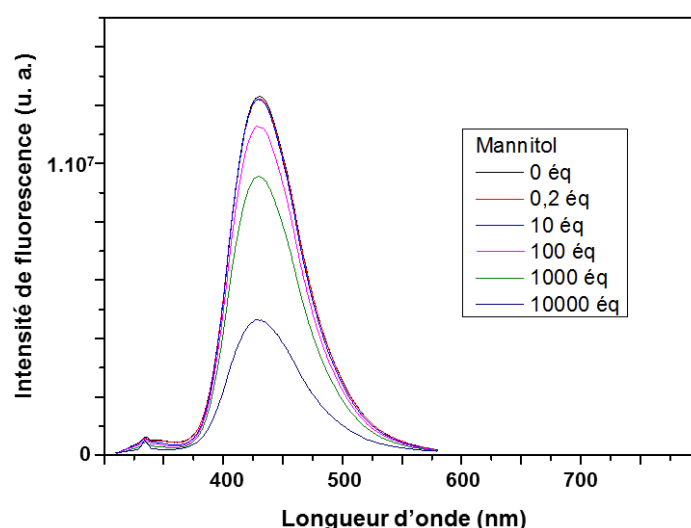


Figure 77. Réduction de la production de radicaux $\text{OH}^\bullet$ par les QDs CdSe après 30 minutes d'irradiation en présence de différentes concentrations en mannitol.

À ce stade, il est intéressant de corrélérer les résultats obtenus dans cette partie aux

expériences de photostabilité décrites au § III.2.2., et ce bien que l'intensité utilisée lors des irradiations ne soit pas exactement la même. Pour mémoire, les QDs de CdSe montraient clairement une photostabilité plus modeste que les QDs CdSe(S). Ils étaient progressivement photo-dégradés au cours de l'irradiation et un photoblanchiment notable apparaissait après environ 30 min d'irradiation, ce qui pourrait correspondre au plateau observé lors de la détection de la génération de radicaux OH[•]. *A contrario*, les QDs CdSe(S) présentent une photostabilité élevée et ne semblent générer des radicaux OH[•] qu'à partir du moment où ils commencent à se photo-dégrader.

En conclusion, il apparaît que les deux types de QDs sont susceptibles de produire des radicaux OH[•] après photo-activation, mais selon des profils de production différents apparemment liés à leurs photostabilités respectives. Les QDs CdSe sont les plus réactifs, générant des radicaux OH[•] dès les premières minutes d'irradiation, et les moins photostables. Ces mêmes QDs se sont également révélés être les plus toxiques et les seuls à présenter une toxicité photo-inductible, ce qui pourrait coïncider avec leur capacité à produire des OH[•].

Parce que les EROs ont une durée de vie relativement courte (inférieure à la microseconde, Gardès-Albert *et al.* 2003), leur toxicité est nécessairement liée à la proximité physique existant entre la source (QDs) et la cible (cellule). En d'autres termes, on pourra s'attendre à ce que la toxicité liée aux EROs soit d'autant plus importante que les interactions QDs-cellules sont fortes. Les interactions QDs-cellules ont ici été confirmée par cytométrie de flux selon un protocole mis au point par Slaveykova *et al.* (2013) sur *C. metallidurans*. Conformément au protocole proposé, notre étude a d'abord porté sur les interactions avec *C. metallidurans*, avant d'être transposée à *E. coli*. En pratique, les cellules ont été exposées à une gamme de concentrations en QDs (300 à 3000 nM) et analysées par cytométrie de flux. Les cytogrammes obtenus indiquent que, quel que soit le type de QD, leur mise en contact avec des cellules de *C. metallidurans* conduit à une interaction QDs-bactéries visible par une

augmentation de la fluorescence cellulaire (Figure 78). Les essais réalisés sur *E. coli* ont également montré une interaction QDs-bactéries. Ces expériences confirment donc l'existence d'une interaction nécessaire à l'implication des EROs dans la cytotoxicité photo-induite.

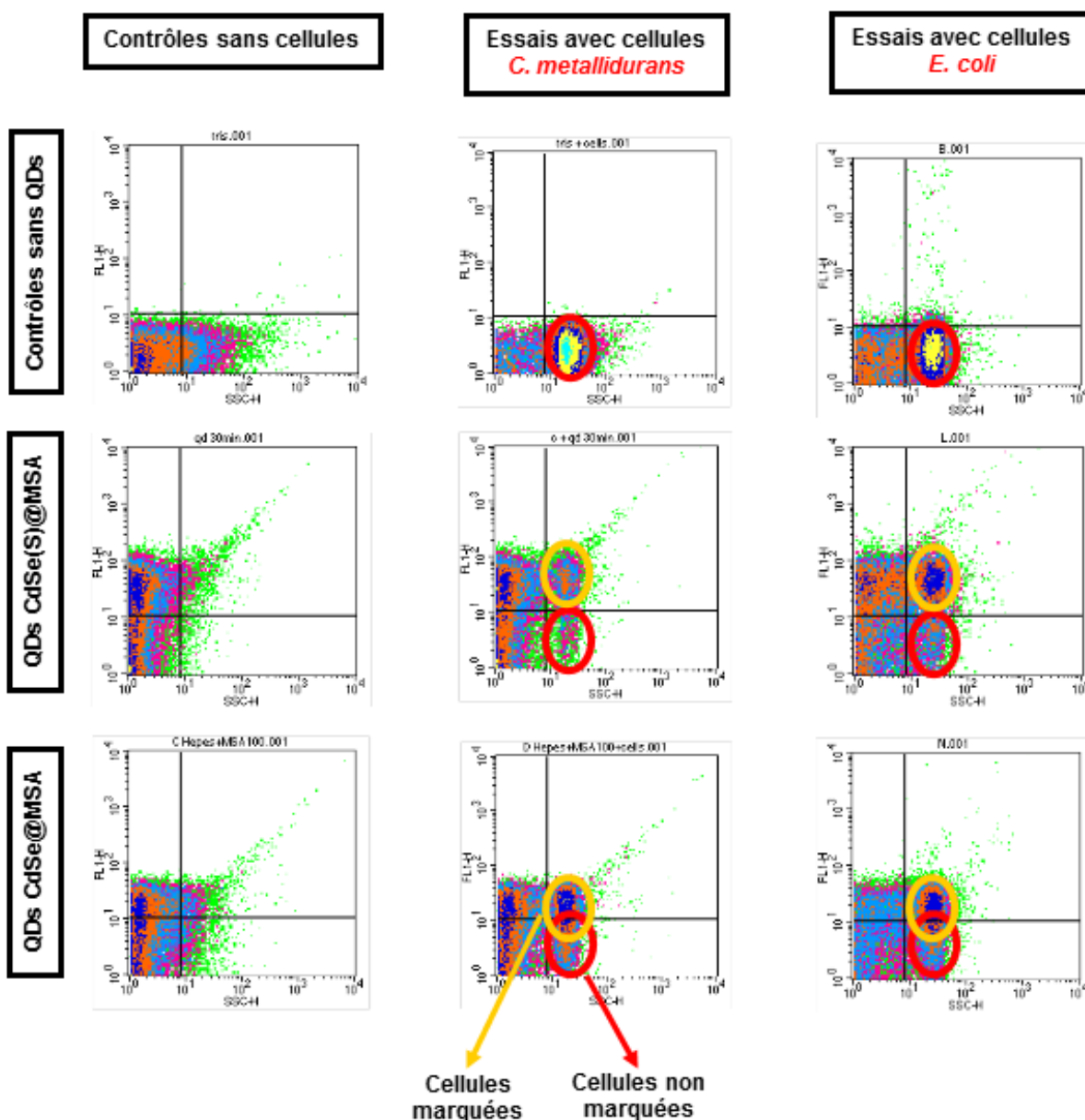


Figure 78. Cytogrammes présentant les interactions possibles entre *C. metallidurans* ou *E. coli* et les QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA.

V.3. Détection du stress oxydant perçu par *E. coli*

Nous venons de voir qu'une partie de la toxicité des QDs placés sous illumination est liée à la production d'EROs. Si sa contribution relative est suffisamment importante face à la toxicité due au Cd^{2+} libéré, nous avons émis l'hypothèse que des cellules d'*E. coli* sont susceptibles de percevoir un stress oxydant. Des biosenseurs répondant de manière spécifique au stress oxydant ont donc été utilisés. Pour cela, nous avons utilisé les souches recombinées *E. coli* MG1655(pUA66 :: P_{oxyR}) et MG1655(pUA66 :: P_{soxR}) contenant un gène *gfp* (codant pour la « Green Fluorescent Protein ») en aval de promoteurs répondant respectivement à H_2O_2 et à $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Le biosenseur répondant spécifiquement à $\text{O}_2^{\bullet-}$ n'a pas montré de réponse significative quel que soit le QD. Cette absence de stress oxydant $\text{O}_2^{\bullet-}$ -dépendant est concordante avec nos précédentes observations montrant une faible production de radicaux $\text{O}_2^{\bullet-}$ (§ V.2.1).

Par contre, l'utilisation du biosenseur MG1655(pUA66 :: P_{oxyR}) montre l'existence d'un stress oxydant H_2O_2 -dépendant pour les deux QDs. Seule une faible réponse a été observée pour les QDs $\text{CdSe(S)}@\text{MSA}$, avec un facteur d'induction maximum atteignant à peine 1,5, pour des concentrations en QDs de 10^{-11} M (Figure 79 a). Aucune différence significative n'a cependant été observée selon que l'expérience soit réalisée à l'obscurité ou à la lumière. En revanche, dans le cas des QDs $\text{CdSe}@\text{MSA}$, le biosenseur ne semble pas réagir lorsque l'expérience est conduite à l'obscurité. Un stress oxydant a par contre été observé pour des concentrations en QDs de l'ordre de $5 \cdot 10^{-9}$ M lorsque l'expérience a été réalisée à la lumière (Figure 79 b).

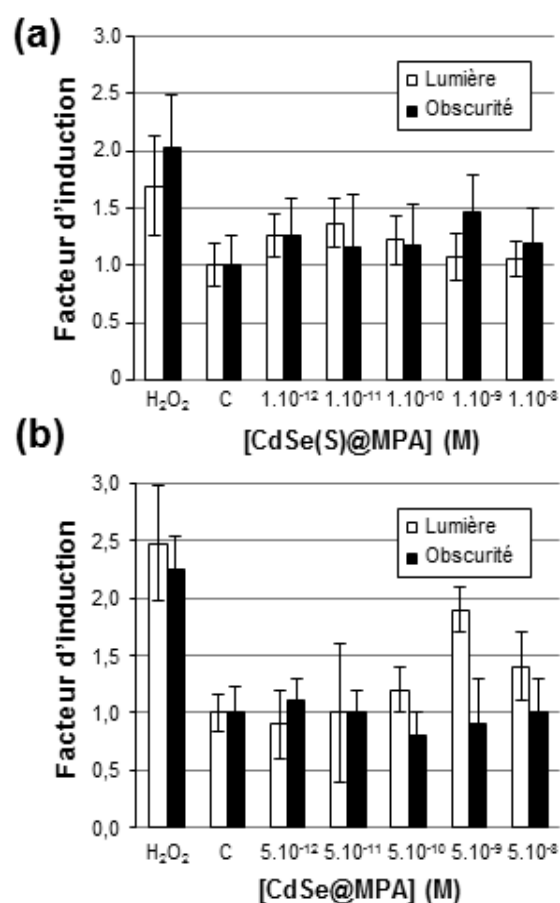


Figure 79. Réponse au stress oxydant induit par H₂O₂ en présence des QDs (a) CdSe@MSA et (b) CdSe(S)@MSA (Contrôle + : H₂O₂ (5.10⁻⁶ M); contrôle - : cellules seules).

Les résultats obtenus semblent montrer qu'*E. coli* ne perçoit pas le même stress oxydant selon les QDs utilisés. Les QDs CdSe@MSA qui se sont déjà révélés être plus réactifs, à la fois en termes de cytotoxicité photo-induite et de production de radicaux hydroxyles, sont visiblement également ceux qui génèrent le stress oxydant photo-induit le plus marqué.

Conclusion générale

et perspectives

Notre projet avait pour but d'utiliser le sélénure de cadmium (CdSe) comme matériau modèle afin d'initier un travail visant à établir une corrélation entre la structure chimique des nanoparticules, leur réactivité de surface, leur stabilité et leur toxicité.

L'utilisation de deux procédés de synthèse a permis d'obtenir des QDs CdSe hydrodispensables stabilisés par le ligand MSA, avec des propriétés physicochimiques voisines mais différant par la composition de leur cœur. Les synthèses en milieu aqueux à 100°C conduisent à des QDs CdSe alors que les synthèses hydrothermales à 170°C permettent d'obtenir des QDs alliés CdSe(S).

Les QDs CdSe(S) présentent une (photo)stabilité et une résistance au photoblanchiment nettement supérieure à celle des QDs CdSe. La libération de Cd^{2+} à partir des QDs CdSe(S) est sensiblement identique 1 h et 5h après dispersion en milieu aqueux. Par contre, pour les QDs CdSe, la libération de Cd^{2+} à 5 h est 1,7 fois plus importante qu'à 1 h, ce qui montre la plus grande fragilité de ces nanoparticules. Les mesures de diamètre hydrodynamique et de mobilité électrophorétique ont confirmé la meilleure stabilité à long terme des dispersions aqueuses de QDs CdSe(S)@MSA. Une désorption des ligands, menant à l'instabilité des nanoparticules, pourrait expliquer la plus grande instabilité des QDs CdSe par rapport aux QDs CdSe(S)@MSA.

L'étude de la cytotoxicité à l'obscurité (par suivi de la bioluminescence de *E. coli* MG1655(pUCD607)) montre que les QDs CdSe et CdSe(S) présentent des toxicités comparables et du même ordre de grandeur que celles de leur contenu en Cd^{2+} . L'évaluation du Cd^{2+} biodisponible libéré par les QDs montre que la dissolution des QDs CdSe et CdSe(S) à la CI_{50} (1 nM en nanoparticules) génère $0,7 \cdot 10^{-7}$ et $2,1 \cdot 10^{-7}$ M de Cd^{2+} alors que la CI_{50} du CdCl_2 est de $1,4 \cdot 10^{-7}$ M. Ces observations permettent de conclure, qu'à l'obscurité, la libération de Cd^{2+} est le facteur clé de la cytotoxicité des QDs étudiés.

Sous éclairage contrôlé (1250 lux), les QDs CdSe se sont avérés plus toxiques que les QDs CdSe(S). Les premiers présentent une toxicité exaltée sous illumination, contrairement aux QDs CdSe(S) dont la toxicité est similaire à l'obscurité et à la lumière. Cette toxicité photo-induite des QDs CdSe est corrélée à la production de radicaux $\text{OH}^\bullet$, elle-même associée à la dégradation des QDs. L'utilisation de biosenseurs à EROs *E. coli* MG1655(pUA66 :: P_{oxyR}) confirme que le stress oxydant le plus marqué est observé en présence des QDs CdSe sous illumination.

Globalement, nos résultats montrent une toxicité complexe dominée par le phénomène de dissolution des QDs, auquel peut s'ajouter une toxicité due à leur réactivité (Figure 80). La toxicité est intimement liée à la stabilité des nanoparticules où tout processus susceptible d'affecter leur équilibre de dissolution, comme l'environnement chimique (toxicité différente selon le milieu) ou la structure du QD, devrait jouer un rôle majeur. Une étude mettant en jeu d'autres types de QDs, et notamment des QDs de type cœur/coquille devrait permettre d'aller plus en avant sur cette relation stabilité-toxicité. On pourra notamment s'interroger sur la toxicité de QDs cœur/coquille CdSe/CdS@MSA tout en comparant leur stabilité aux QDs CdSe(S) et CdSe. Une étude comparative à plus grande échelle, mettant en jeu un plus grand nombre de variants devrait permettre d'établir une hiérarchisation des structures en termes de stabilité corrélable à leur cytotoxicité.

La nature des bactéries mises en jeu pourrait également avoir une importance sur la stabilité des QDs étudiés. Nos études de cytotoxicité ont principalement été réalisées avec le modèle bactérien *E. coli* qui n'est pas connu pour avoir un métabolisme particulier vis-à-vis de particules contenant des métaux. En revanche, certaines espèces comme *C. metallidurans* ou *Shewanella oneidensis* pourraient, par leurs propriétés intrinsèques, influencer la stabilité des nanoparticules. *C. metallidurans* CH34 est connue pour augmenter la biodisponibilité des ions métalliques en sécrétant des métallophores ou pour cristalliser le cadmium à sa surface

sous certaines conditions. On pourra s'interroger sur l'influence de telles propriétés sur la stabilité des QDs CdSe et donc leur toxicité (Diels *et al.* 2009).

Dans un autre registre, *Shewanella oneidensis* MR-1, isolée à partir de sédiments anoxiques du lac Oneida (Myers *et al.* 1988), se caractérise par une capacité à respirer sur un grand nombre de substrats dont certains métaux (Nealson *et al.* 2002). Cette propriété est liée notamment à la délocalisation d'une partie de sa chaîne respiratoire à la surface de la cellule (membrane externe), ce qui permet la réduction de substrats non dissous et non diffusibles. On pourra à nouveau s'interroger sur l'influence d'un tel métabolisme sur la stabilité des QDs CdSe. Finalement, l'influence de l'espèce bactérienne sur la dissolution des QDs pourrait être étudiée en évaluant le Cd^{2+} biodisponible libéré après une mise en contact avec différentes bactéries comme *C. metallidurans*, *E. coli* et *Shewanella oneidensis* MR-1. Pour ce faire, il serait par exemple envisageable de procéder à des dialyses de QDs en présence de suspensions bactériennes ou non et d'évaluer la quantité de Cd^{2+} présente dans le dialysat.

À ce stade, il apparaît que les interactions entre les QDs et les bactéries doivent jouer un rôle important dans la cytotoxicité observée. Si certaines bactéries altèrent les QDs par contact, des QDs présentant des interactions avec les bactéries plus fortes seraient alors plus susceptibles d'être dissous. Des expériences de cytométrie, combinées à des études de toxicité et de libération d'ion Cd^{2+} , pourraient permettre de corroborer ses hypothèses. Pour cela, des nanoparticules montrant des stabilités comparables en l'absence de matériel biologique, mais présentant des interactions plus ou moins fortes avec les bactéries devront être utilisées.

Dans ce travail, nous avons également estimé que la génération d'EROs et les éventuels dommages occasionnés étaient liés aux interactions cellules-QDs. En effet, en raison des durées de vie courtes des EROs, ces derniers doivent être produits à proximité immédiate des cellules pour avoir un effet délétère. L'analyse de différentes structures produisant des niveaux équivalents d'EROs mais présentant des interactions cellule-QDs différentes

(notamment par l'ancrage de biomolécules ciblant plus spécifiquement les cellules ou par l'utilisation de différents ligands) devrait permettre de montrer qu'à interaction cellule-QDs plus forte correspond une toxicité photo-induite plus importante. Celle-ci, dépendante de la photo-activation des QDs, est supposée être liée à la photo-stabilité des QDs et à leur structure chimique. Dans le but de confirmer nos premières observations, la cytotoxicité d'autres QDs (différant par la structure du cœur ou du ligand de surface), à la lumière et à l'obscurité, devrait être évaluée et corrélée à la capacité à générer des EROs. Notons également ici que les expériences de détection d'un stress oxydant, après exposition des cellules aux QDs, se sont montrées peu sensibles pour une raison que nous attribuons partiellement à l'utilisation du gène *gfp* comme gène rapporteur (production de GFP stable qui s'accumule). Ce point pourra être amélioré en envisageant de construire des biosenseurs utilisant le gène *lux* ne présentant pas d'accumulation de signal. La sensibilité des souches serait alors très certainement améliorée et de nouveaux tests mettant en jeu d'autres QDs pourraient rapidement être réalisés pour déterminer le type de structure favorisant l'apparition d'un stress oxydant.

Alternativement, l'évaluation du stress oxydant pourra aussi faire l'objet d'approches de biologie moléculaire. L'apparition d'un stress oxydant génère une réponse où divers gènes sont activés pour exprimer des fonctions (enzymes de détoxification, répression des systèmes d'import du fer...) permettant de lutter contre ce stress. L'activation de ces gènes provoque une synthèse des ARN correspondants qui pourront être dosés par RT-qPCR. On pourra choisir de doser des ARN connus pour être fortement produits en cas de stress oxydant, comme celui correspondant au gène *dps* (Stress response DNA binding protein), gène le plus induit chez *E. coli* en présence d'H₂O₂ (Zheng *et al.* 2001). Une fois encore, une telle approche permettra une étude comparative de divers QDs afin de déterminer lequel provoque le stress oxydant le plus élevé. L'étude de QDs générant différents niveaux d'EROs devrait alors permettre de montrer qu'une augmentation de la production d'EROs par les QDs

conduit à l'augmentation de la cytotoxicité photo-induite additionnelle. D'autre part, l'utilisation de QDs présentant des niveaux d'EROs similaires mais des niveaux d'interaction avec les cellules différents permettra très certainement de confirmer que la contribution de la production d'EROs à la cytotoxicité des QDs est intimement liée à la force d'interaction.

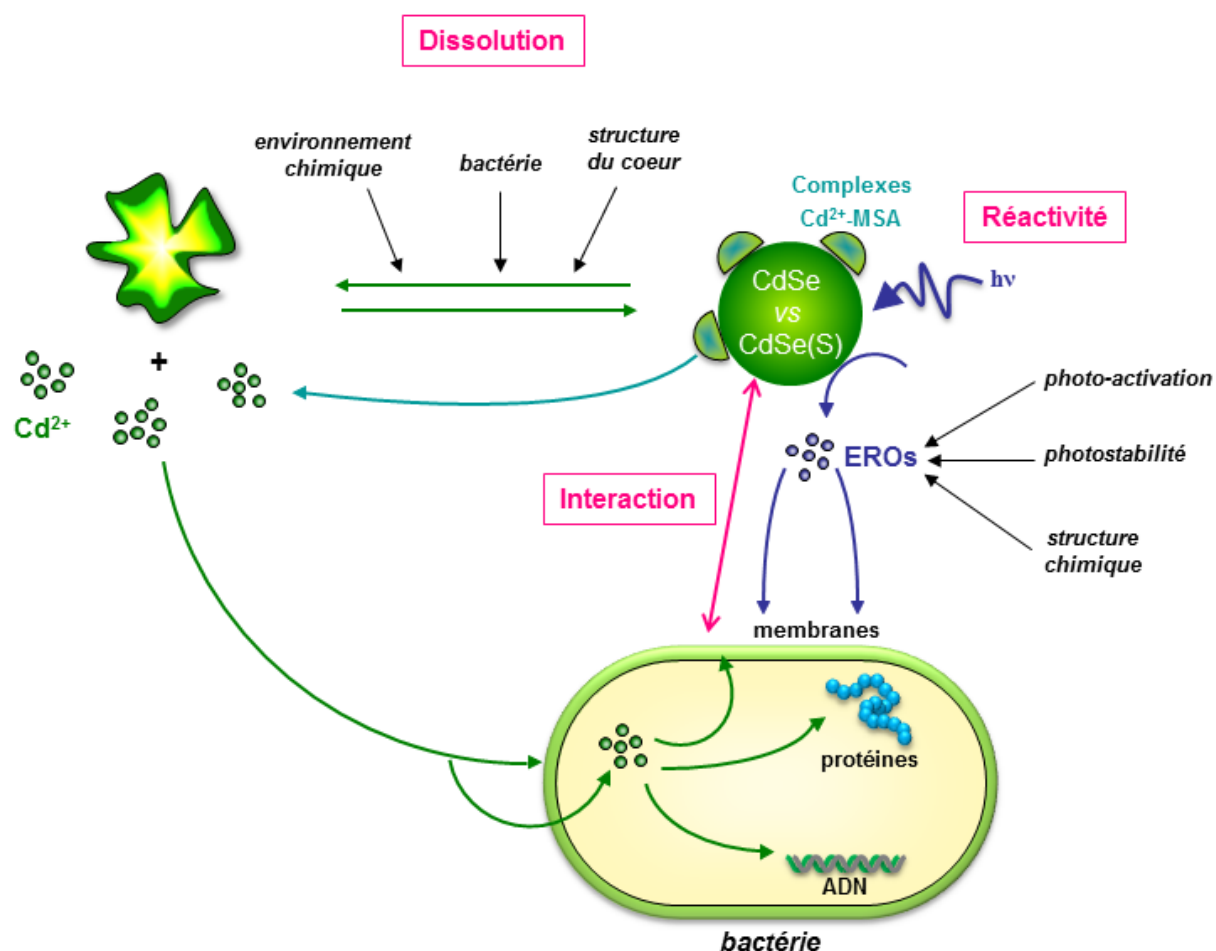


Figure 80. Structure-Réactivité-Stabilité des QDs CdSe

Ce travail a donc permis, d'une part, de montrer le côté multiparamétrique de la cytotoxicité et, d'autre part, de conclure à une contribution majoritaire de la libération d'ions Cd²⁺ des nanoparticules à la cytotoxicité, à laquelle peut s'ajouter la production d'EROs. La contribution relative de ces deux sources de toxicité n'a été étudiée que sur deux structures. L'utilisation d'autres nanoparticules et, éventuellement, dans des conditions où leur

dissolution serait limitée pourraient montrer une prédominance de l'effet des EROs, ou tout du moins, une contribution plus importante. Notons également ici qu'une plus forte toxicité n'est pas nécessairement liée à une plus forte teneur en Cd des QDs. En effet, rappelons que les QDs CdSe(S) présentent une toxicité moindre sous illumination que les QDs CdSe, alors même qu'ils contiennent 3,2 fois plus de Cd.

Enfin, il est possible d'envisager à terme de pouvoir préparer des QDs dont la cytotoxicité, liée à la stabilité et à la réactivité des nanoparticules, pourra être contrôlée lors de la synthèse, et ce en fabriquant des structures plus ou moins robustes et/ou produisant plus ou moins d'EROs. Le choix des QDs pourra alors être déterminé en fonction de l'application visée (faible production d'EROS et faible toxicité pour la bio-imagerie et la détection vs forte production d'EROS pour la thérapie par exemple).

Références bibliographiques

- A. Aboulaich, C.-M. Tilmaciu, C. Merlin, C. Mercier, H. Guilloteau, G. Medjahdi et R. Schneider, 2012, Physicochemical properties and cellular toxicity of (poly)aminoalkoxysilanes-functionalized ZnO quantum dots, *Nanotechnology*, 23, 335101 (9 pp).
- A. Aboulaich, D. Billaud, M. Abyan, L. Balan, J.-J. Gaumet, G. Medjahdi et R. Schneider, 2012, One-pot noninjection route to CdS quantum dots via hydrothermal synthesis, *ACS Applied Materials Interfaces*, 4, 2561-2569.
- Afsset 2006 (rapport d'expertise), Les nanomatériaux - Effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement, 253 pages.
- M. E. Åkerman, W. C. W. Chan, P. Laakkonen, S. N. Bhatia et E. Ruoslahti, 2002, Nanocrystal targeting *in vivo*, *Proceeding of the national academy of Sciences of the United States of America*, 99 (20), 12617-12621.
- F. Aldeek, L. Balan, J. Lambert et R. Schneider, 2008, The influence of capping thioalkyl acid on the growth and photoluminescence efficiency of CdTe and CdSe quantum dots, *Nanotechnology*, 19, 475401 (9 pages).
- F. Aldeek, L. Balan, G. Medjahdi, T. Roques-Carmes, J.-P. Malval, C. Mustin, J. Ghanbaja et R. Schneider, 2009, Enhanced optical properties of core/shell/shell CdTe/CdS/ZnO quantum dots prepared in aqueous solution, *The Journal Physical Chemistry C*, 113, 19458-19467.
- F. Aldeek, 2010, Synthèse et fonctionnalisation de nanocristaux fluorescents (Quantum Dots) pour l'imagerie et la caractérisation des propriétés hydrophobes/hydrophiles de biofilms bactériens, PhD thesis, Nancy-Université.
- F. Aldeek, C. Mustin, L. Balan, T. Roques-carmes, M.-P. Fontaine-Aupart et R. Schneider, 2011, Surface-engineered quantum dots for the labelling of hydrophobic microdomains in bacterial biofilms, *Biomaterials*, 32, 5459-5470.
- F. Aldeek, C. Mustin, L. Balan, G. Medjahdi, T. Roques-Carmes, P. Arnoux et R. Schneider, 2011, Enhanced photostability from CdSe(S)/ZnO core/shell quantum dots and their use in bio-labelling, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 794-801.
- W. R. Algar et U. J. Krull, 2007, Luminescence and Stability of Aqueous Thioalkyl Acid Capped CdSe/ZnS Quantum Dots Correlated to Ligand Ionization, *A European Journal of Chemical Physics and physical Chemistry*, 8 (4), 561-568.
- A. P. Alivisatos, W. Gu et C. Larabell, 2005, Quantum dots as cellular probes, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 7, 55-76.
- A. Anas, H. Akita, H. Harashima, T. Itoh, M. Ishikawa et V. Biju, 2008, Photosensitized breakage and damage of DNA by CdSe-ZnS Quantum Dots, *The Journal of Physical Chemistry B*, 112, 10005-10011.
- R. E. Anderson, W. W. C. Chan, 2008, Systematic investigation of preparing biocompatible, single, and small ZnS-Capped CdSe quantum dots with amphiphilic poly-mers, *ACS Nano*, 2, 1341-1352.
- Z. Arslan, M. Ates, W. McDuffy, M. Sabri Agachan, I.O. Farah, W.W. Yu et A.J. Bednar, 2011, Probing metabolic stability of CdSe nanoparticles : Alkaline extraction of free cadmium from liver and kidney samples of rats exposed to CdSe nanoparticles, *Journal of Hazardous Materials*, 192, 192-199.
- M. Aye, C. Di Giorgio, I. Berque-Bestel, A. Aime, B.P. Pichon, Y. Jammes, P. Barthélémy et M. De Méo, 2013, Genotoxic and mutagenic effects of lipid-coated CdSe/ZnS quantum dots, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 750, 129-138.

B

- R. E. Bailey et S. Nie, 2003, Alloyed Semiconductor Quantum Dots : Tuning the Optical Properties without Changing the Particle Size, *Journal of American Chemical Society*, 125, 7100-7106.
- B. Ballou, C. Langerholm, L. Ernst, M. Bruchez et A. Waggoner, 2004, Noninvasive imaging of quantum dots in mice, *Bioconjugate Chemistry*, 15, 79-86.
- G. Bastard, 1988, *Wave Mechanics Applied to Semiconductor Heterostructures*. Editions de Physique (Paris).
- M. G. Bawendi, M. L. Steigerwald et L. E. Brus, 1990, The quantum mechanics of larger semiconductor clusters (« Quantum Dots »), *Annual Revue of Physical Chemistry*, 41, 477-496.
- J. C. Beani, 2012, Produits de protection solaire : efficacité et risques, *Annales de dermatologie et vénérologie*, 139, 261-272.
- A. Beer, 1852, Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten », *Annalen der Physik und Chemie*, 86, 78-88.
- C. Bellavere et J. Gorbi, 1981, A comparative analysis of acute toxicity of chromium, copper and cadmium to *Daphnia magna*, *Biomphalaria glabrata*, and *Brachydanio rerio*, *Environmental Technology Letters*, 2, 119-128.
- G. Bertani, 1951, Studie on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenis *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 62, 293-300.
- H. Biebl et N. Pfennig, 1981, Isolation of members of the family *Rhodospirillaceae*. In *The Prokaryotes*, vol. 1, pp. 267-273. Édité par M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows et H. G. Schlegel. Springer (New York).
- N. Biswal et K. M. Parida, 2013, Enhanced hydrogen production over CdSe QD/ZTP composite under visible light irradiation without using co-catalyst, *International journal of hydrogen energy*, 38, 1267-1277.
- F. R. Blattner, G. Plunkett G, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau et Y. Shao, 1997, The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12, *Science*, 277, 1453-1462.
- V. B. Borisov, E. Forte, A. Davleshin, D. Mastronicola, P. Sarti et A. Giuffrè, 2013, Cytochrome *bd* oxidase from *Escherichia coli* displays high catalase activity: An additional defense against oxidative stress, *FEBS Letters*, 587, 2214-2218.
- F. Boulmedais, P. Bauchat, M. J. Brienne, I. Arnal, F. Artzner, T. Gacoin, M. Dahan et V. Marchi-Artzner, 2006, Water-soluble pegylated quantum dots: from a composite hexagonal phase to isolated micelles, *Langmuir*, 22, 9797-9803.
- X. Brockmann, J. P. Hermier, P. Desbiolles et M. Dahan, 2005, Des nanosources de lumière pour l'optique et la biologie, *Images de la Physique*, 126-132.
- V. Brunetti, H. Chibli, R. Fiammengio, A. Galeone, M.A. Malvindi, G. Vecchio, R. Cingolani, J.L. Nadeau et P.P. Pompa, 2013, InP/ZnS as a safer alternative to CdSe/Zn S core/shell quantum dots : *in vitro* and *in vivo* toxicity assessment, *Nanoscale*, 5 (1), 307-317.
- L. E. Brus, 1984, Electron-electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state, *Journal of Chemical Physics*, 80, 4403-4409.
- L. E. Brus, 1984, On the development of bulk optical properties in small semiconductor crystallites, *Journal of luminescence*, 31-32 (part1), 381-384.
- L. E. Brus, 1986, Electronic wave functions in semiconductor clusters: experiment and theory, *Journal of Physical Chemistry*, 90, 2555-2560.

X. Bu, Y. Zhou, M. He, Z. Chen et T. Zhang, 2013, Bioinspired direct synthesis of aqueous CdSe quantum dots for high-sensitive copper (II) ion detection, Dalton transactions, 6 sept 2013 (Epub ahead of print).

C

J. Camassel, J. P. Laurenti, S. Juillaguet, K. Wolter, M. Deschler, S. Ambross et K. Gruter, 1991, Investigation of residual impurity content in GaAs layers grown by VPE under very low pressure conditions, Journal of Electronic Materials, 20, 79.

K. V. Chakravarthy, B. A. Davidson, J. D. Helinski, H. Ding, W. C. Law, K. T. Yong, P. N. Prasad et P.R. Knight, 2011, Doxorubicin-conjugated quantum dots to target alveolar macrophages and inflammation, Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine, 7, 88-96.

Y. H. Chan, J. Chen, Q. Liu, S. E. Wark et J. D. Batteas, 2010, Ultrasensitive copper (II) detection using plasmon-enhanced and photo-brightened luminescence of CdSe quantum dots, Analytical Chemistry, 82, 3671-3678.

F. Chandezon et P. Reiss, Déc. 2004, Nanotechnologies pour l'électronique, l'optique et la photonique, Techniques de l'ingénieur (article NM2030).

E. Chang, N. Thekkekk, W.W. Yu, V.L. Colvin et R. Drezek, 2006, Evaluation of quantum dot cytotoxicity based on intracellular uptake, Small, 2, 1412-1417.

F. Chen et D. Gerion, 2004, Fluorescent CdSe/ZnS Nanocrystal-Peptide Conjugates for Long-term, Nontoxic Imaging and Nuclear Targeting in Living Cells, Nano Letters, 4, 1827-1832.

L. D. Chen, J. Liu, X.-F. Yu, M. He, X.-F. Pei, Z.-Y. Tang, Q.-Q. Wang, D.-W. Pang et Y. Li, 2008, The biocompatibility of quantum dot probes used for the targeted imaging of hepatocellular carcinoma metastasis, Biomaterials, 29, 4170-4176.

S. Chen, X. Zhang, Q. Zhang, X. Hou, Q. Zhou, J. Yan et W. Tan, 2011, CdSe quantum dots decorated by mercaptosuccinic acid as fluorescence probe for Cu^{2+} , Journal of Luminescence, 131, 947-951.

N. Chen, Y. He, Y. Su, X. Li, Q. Huang, H. Wang, X. Zheng, R. Ta et C. Fan, 2012, The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots, Biomaterials, 33, 1238-1244.

S. J. Cho, D. Maysinger, M. Jain, B. Röder, S. Hackbarth et F. M. Winnik, 2007, Long-term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells, Langmuir, 23, 1974-1980.

E. Q. Contreras, M. Cho, H. Zhu, H. L. Puppala, G. Escalera, W. Zhong et V. L. Colvin, 2012, Toxicity of quantum dots and cadmium salt to *Caenorhabditis elegans* after multigenerational exposure, Environmental Science and Technology, 47, 1148-1154.

D. R. Cooper, N. M. Dimitrijevic et J. L. Nadeau, 2010, Photosensitization of CdSe/ZnS QDs and reliability of assays for reactive oxygen species production, Nanoscale, 2, 114-121.

P. Corbisier, D. Van der Lelie, B. Borremansa, A. Provoosta, V. Lorenzo, N. Brown, J. Lloyd, J. Hobman, E. Csoeregi, G. Johansson et B. Mattiasson, 1998, Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples, Analytica Chimica Acta, 387, 235-244.

D

B. O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikules, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen et M. G. Bawendi, 1997, (CdSe)ZnS Core-shell quantum dots: Synthesis and characterization of the size series of highly luminescent nanocrystallites, Journal of Physical Chemistry B, 1001, 9463-9475.

B. D'Autréaux et M. B. Toledano, 2007, ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 813-824.

A. M. Derfus, C. W. Warren Chan et S. N. Bhatia, 2004, Probing the cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots, *Nano Letters*, 4, 11-18.

B. Derjaguin et L. Landau, 1941, Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes, *Acta Physico Chemica URSS*, 14, 633-662.

M. Dib, 1999, Structure électronique au voisinage de la bande interdite des nanocristaux de CdSe et CdS. PhD thesis, Université Paris VII.

L. Diels, S. Van Roy, S. Taghavi et R. Van Houdt, 2009, From industrial sites to environmental applications with *Cupriavidus metallidurans*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 96, 247-258.

P. Dua, S. Jeong, S.W. Hong, S. Kim et D.K. Lee, 2010, Evaluation of toxicity and gene expression changes triggered by quantum dots, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 31, 1555-1560.

E. M. Dumas, V. Ozenne, R. E. Mielke et J. L. Nadeau, 2009, Toxicity of CdTe quantum dots in bacterial strains, *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 8, 58-64.

A. K. Dunn, 2012, Chapter 2 - *Vibrio fischeri* metabolism: Symbiosis and beyond, *Advances in Microbial Physiology*, 61, 37-68.

R. Dunpall, A. A. Nejo, V. S. R. Pullabhotla, A. R. Opoku, N. Revaprasadu et A. Shonhai, 2012, An *in vitro* assessment of the interaction of cadmium selenide quantum dots with DNA, iron, and blood platelets, *IUBMB Life*, 64 (12), 995-1002.

R. K. Dutta, B. P. Nenavathu, M. K. Gangishetty et A. V. R. Reddy, 2012, Studies on antibacterial activity of ZnO nanoparticles by ROS induced lipid peroxidation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 94, 143-150.

E

A. I. Ekimov et A. A. Onushchenko, 1981, Quantum size effect in 3-dimensional microscopic semiconductor crystals, *JETP Letters*, 34, 345-349.

A. I. Ekimov et A. A. Onushchenko, 1982, Quantum size effect in the optical-spectra of semiconductor micro-crystals, *Soviet Physics Semiconductors-USSR*, 16, 775-778.

A. I. Ekimov et A. A. Onushchenko, 1984, Size quantization of the electron-energy spectrum in a microscopic semiconductor crystal, *JETP Letters*, 40, 1136-1139.

F

H. Fan, E. W. Leve, C. Scullin, J. Gabaldon, D. Tallant, S. Bunge, T. Boyle, M. C. Wilson et C. J. Brinker, 2005, Surfactant-assisted synthesis of water-soluble and biocompatible semiconductor quantum dot micelles, *Nano Letters*, 5, 645-648.

X. Fang, G. Mark et C. von Sonntag, 1996, OH radical formation by ultrasound in aqueous solutions. Part I: The chemistry underlying the terephthalate dosimeter, *Ultrasonics Sonochemistry*, 3, 57-63.

V. A. Fedorov, V. A. Ganshin et Y. N. Korkishko, 1991, Determination of the point of the zincblende-to-wurtzite structural phase transition in cadmium selenide crystals, *Physica Status Solidi (A)*, 126, K5-K.

G. Fishman, 2010, Semi-conducteurs : les bases de la théorie k.p; Les éditions de l'Ecole Polytechnique, Ellipses (Palaiseau), 716 pages.

W. Freinbichler, M. A. Colivicchi, C. Stefanini, L. Bianchi, C. Ballini, B. Misini, P. Weinberger, W. Linert, D. Varešlija, K. F. Tipton et L. Della Corte, 2011, Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 2067-2079.

G

T. P. S. Galindo, R. Pereira, A. C. Freitas, T. A. P. Santos-Rocha, M. G. Rasteiro, F. Antunes, D. Rodrigues, A. M. V. M. Soares, F. Goncalves, A. C. Duarte et I. Lopes, 2013, Toxicity of organic and inorganic nanoparticles to four species of white-rot fungi, *Science of the Total Environment*, 458-460, 290-297.

M. Y. Gao, S. Kirestein, H. Möhwald, A. L. Rogach, A. Eychmüller et H. Weller, 1998, Strongly Photoluminescent CdTe Nanocrystals by Proper Surface Modification, *Journal of Physical Chemistry B*, 102, 8360-8363.

X. Gao, L. yang, J. A. Petros, F. F. %arshall, J. W. Simons et S. Nie, 2004, *In vivo* molecular and cellular imaging with quantum dots, *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 63-72.

X. Gao, M. Tang, Z. Li, Y Zha, G. Cheng, S. Yin, J. Chen, D.Y. Ruan, L. Chen et M. Wang, 2013, Steptavidin-conjugated CdSe/ZnS quantum dots impaired synaptic plasticity and spatial memory process, *Journal of Nanoparticles Research*, 15:1575.

M. Gardes-Albert, D. Bonnefont-Rousselot, Z. Abedinzadeh et D. Jore, 2003, Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?, *L'actualité chimique*, nov-déc, 91-96.

D. Gerion, F. Pinaud, S. C. Williams, W. J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss et P. Alivisatos, 2001, Synthesis and Properties of Biocompatible Water-Soluble Silica-Coated CdSe/ZnS Semiconductor Quantum Dots, *Journal of Physical Chemistry B*, 105, 8861-8871.

J. R. Gispert, 2008, *Coordination Chemistry*, Wiley-VCH, 483 pages.

E. R. Goldman, G. P. Anderson, P. T. Tran, H. Mattoussi, P. T. Charles et J. M. Mauro, 2002, Conjugation of luminescent quantum dots with antibodies using an engineered adaptor protein to provide new reagents for fluoroimmunoassays, *Analytical Chemistry*, 74, 841-847.

M. Grabolle, M. Spieles, V. Lesnyak, N. Gaponik, A. Eychmüller et U. Resch-Genger, 2009, Determination of the fluorescence : Quantum Yield of Quantum Dots: Suitable Procedures and Achievable Uncertainties, *Analytical Chemistry*, 81, 6285-6294.

J. Green et M.S. Paget, 2004, Bacterial redox sensors, *Nature Reviews Microbiology*, 2, 954-966.

M. Green et E. Howman, 2005, Semiconductor quantum dots and free radical induced DNA nicking, *Chemical Communications*, 121-123.

J. Guo, W. Yang et C. Wang, 2005, Systematic Study of the Photoluminescence Dependence of thiol-Capped CdTe nanocrystal on the Reaction Conditions, *Journal of Physical chemistry B*, 109, 17467-17473.

G. Guo, W. Liu, J. Liang, Z. He, H. Xu et X. Yang, 2007, Probing the cytotoxicity of CdSe quantum dots with surface modification, *Materials letters*, 61 (8-9), 1641-1644.

H

B. Halliwell, 2001, Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment, *Drugs Aging*, 18, 685-716.

M. Han, X. Gao, J. Z. Su et S. Nie, 2001, Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules, *Nature Biotechnology*, 19, 631-635.

H. Han, G. Di Francesco et M. M. Maye, 2010, Size control and photophysical properties of quantum dots prepared via a novel tunable hydrothermal route, *Journal of Physical Chemistry C*, 114, 19270-19277.

K. Hanaki , A. Momo , T. Oku , A. Komoto , S. Maenosono, Y. Yamaguchi et K. Yamamoto, 2003, Semiconductor quantum dot/albumin complex is a long-life and highly photostable endosome marker, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 302 (3), 496-501.

R. A. Hardman, 2006, A toxicologic review of quantum dots : toxicity depends on physicochemical and environmental factors, *Environmental Health Perspectives*, 114, 165-172.

J. J. Harrison, V. Tremaroli, M. A. Stan, C. S. Chan, C. Vacchi-Suzzi, B. J. Heyne, M. R. Parsek, H. Ceri et R. J. Turner, 2009, Chromosomal antioxidant genes have metal ion-specific roles as determinants bacterial metal tolerance, *Environmental Microbiology*, 11, 2491-2509.

T. S. Hauck, R. E. Anderson, H. C. Fischer, S. Newbigging et W. C. W. Chan, 2010, *In vivo* quantum dot toxicity assessment, *Small*, 6 (1), 138-144.

W. A. Hild, M. Breunig et A. Goepferich, 2008, Quantum dots – nano-sized probes for the exploration of cellular and intracellular targeting, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68, 153-168.

M. A. Hines et P. Guyot-Sionnest, 1996, Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-capped CdSe nanocrystals, *The Journal of Physical Chemistry*, 100, 468-471.

A. Hoshino, K. Fujioka, T. Oku, M. Suga, Y. F. Sasaki, T. Ohta, M. Yasuhara, K. Suzuki et K. Yamamoto, 2004, Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification, *Nano Letters*, 4, 2163-2169.

N. G. Howlett et S. V. Avery, 1997, Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2971-2976.

S. C. Hsieh, F. F. Wang, C. S. Lin, Y. J. Chen, S. C. Hung et Y. J. Wang, 2006, The inhibition of osteogenesis with human bone marrow mesenchymal stem cells by CdSe/ZnS quantum dot labels, *Biomaterials*, 27 (8), 1656–1664.

M.S. Hsieh, N.H. Shiao et W.H. Chan, 2009, Cytotoxic effects of CdSe quantum dots on maturation of mouse oocytes, fertilization and fetal development, *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 2122-2135.

I

J

B. P. Jackson, H. E. Pace, A. Lanzirotti, R. Smith et J. F. Ranville, 2009, Synchrotron X-ray 2D and 3D elemental imaging of CdSe/ZnS quantum dots nanoparticles in *Daphnia magna*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394, 911-917.

B. P. Jackson, D. Bugged, J. F. Ranville et C. Y. Chen, 2012, Bioavailability, toxicity and bioaccumulation of quantum dots nanoparticles to the amphipod *Leptocheirus plumulosus*, *Environmental Science and Technology*, 46, 5550-5556.

J. Jaiswal, H. Mattoussi, J. Mauro et S. Simon, 2003, Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates, *Nature Biotechnology*, 21, 47–51.

J. D. Judy, J. M. Unrine et P. M. Bertsch, 2011, Evidence for biomagnification of gold nanoparticles within a terrestrial food chain, *Environmental Science & Technology*, 45, 776-781.

K

P. V. Kamat, 2013, Quantum dots solar cells. The next big thing in photovoltaics, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 4, 908-918.

W. K. B. Khalil, E. Girgis, A. N. Emam, M. B. Mohamed et K. V. Rao, 2011, Genotoxicity evaluation of nanomaterials : DNA damage, micronuclei, and 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine induced by magnetic doped CdSe quantum dots in male mice, *Chemical Research in Toxicology*, 24, 640-650.

S. Kim et M. G. Bawendi, 2003, Oligomeric Ligands for Luminescent and Stable Nanocrystal Quantum Dots, *Journal of American Chemical Society*, 125 (48), 14652-14653.

J. Kim, Y. Park, T.H. Yoon, C.S. Yoon et K. Choi, 2010, Phototoxicity of CdSe/ZnSe quantum dots with surface coatings of 3-mercaptopropionic acid or tri-n-octylphosphine oxide/gum arabic in *Daphnia magna* under environmentally relevant UV-B light, *Aquatic Toxicology*, 97, 116-124.

C. Kirchner, T. Liedl, S. Kudera, T. Pellegrino, A.E. Munoz Javier, H. Gaub, S. Stoilzle, N. Fertig et J. W. Parak, 2005, Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles, *Nano Letters*, 5, 331-338.

C. Kittel, 1983, *Physique de l'état solide*; Dunod Université, 5e édition, Bordas (Paris), 608 pages.

D. L. Klayman et T. S. Griffin, 1973, Reaction of selenium with sodium borohydride in protic solvent. A facile method for the introduction of selenium into organic molecules, *Journal of American Chemical Society*, 95, 197-199.

H. Kobayashi, Y. Hama, Y. Koyama, T. Barrett, C. A. S. Regino, Y. Urano et P. L. Choyke, 2007, Simultaneous multicolor imaging of five different lymphatic basins using quantum dots, *Nano Letters*, 7, 1711-1716.

L

C. Lamb et R. A. Dixon, 1997, The oxidative burst in plant disease resistance, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 251-275.

J. H. Lambert, 1760, *Photometria, sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae*, Sumptibus Vidae Eberhardi Klett.

V. K. La Mer et R. H. Dinegar, 1950, Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols, *Journal of American Chemical Society*, 72, 4847-4854.

H. H. Landolt, R. Börstein, K.H. Hellwege, O. Madelung, M. Schulz et D. Bimberg, 1982, *Crystal and solid state physics-physics of group IV elements and III-V compounds et physics of II-VI and I-VII compounds*, édité par O. Madelung, Springer (New York), 17, 642 pages.

D. Larson, W. Zipfel, R. Williams, S. Clark, M. Bruchez, F. Wise et W. Webb, 2003, Water-Soluble Quantum Dots for Multiphoton Fluorescence Imaging in Vivo, *Science*, 330, 1434-1436.

H. J. Lee, M. Wang, P. Chen, D. R. Gamelin, S. M. Zakeeruddin, M. Grätzel et M. K. Nazeeruddin, 2009, Efficient CdSe quantum dot-sensitized solar cells prepared by an improved successive ionic layer adsorption and reaction process, *Nano Letters*, 9, 4221-4227.

J. Lee, K. Ji, J. Kim, C. Park, K. Hee Lim, T. Hyun Yoon et K. Choi, 2009, Acute toxicity of two CdSe/ZnSe quantum dots with different surface coating in *Daphnia magna* under various light conditions, *Environmental Toxicology*, 25, 593-600.

C. M. Lee, D. Jang, S. J. Cheong, E. M. Kim, M. H. Jeong, S. H. Kim, D. W. Kim, S. T. Lim, M. H. Sohn et H. J. Jeong, 2010, Surface engineering of quantum dots for *in vivo* imaging, *Nanotechnology*, 21 (28) : 285102.

- M. M. Lee, J. Teuscher, T. Miyasaka, T. N. Murakami et H. J. Snaith, 2012, Hybrid solar cells based on meso-structured organometal halide perovskites, *Science*, 338, 643-647.
- J. A. Lemire, J. J. Harrison et R. J. Turner, 2013, Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications, *Nature Reviews Microbiology*, 11, 371-384.
- N. A. Lewinski, H. Zhu, H. J. Jo, D. Pham, R. R. Kamath, C. R. Ouyang, C. D. Vulpe, V. L. Colvin et R. A. Drezek, 2010, Quantification of Water Solubilized CdSe/ZnS quantum dots in *Daphnia magna*, *Environmental Science and Technology*, 44, 1841-1846.
- L. Li, H. Qian et J. Ren, 2005, Rapid Synthesis of Highly Luminescent CdTe Nanocrystals in the Aqueous Phase by Microwave Irradiation with Controllable Temperature, *Chemical Communications*, 4, 528-530.
- H. Li, W. Wang, Z. Gao et Z. He, 2007, Gemini surfactant for fluorescent and stable quantum dots in aqueous solution, *Nanotechnology*, 18 (20), 205603.
- H. Li et X. Wang, 2008, Single quantum dot-micelles coated with Gemini surfactant for selective recognition of a cation and an anion in aqueous solutions, *Sensors and Actuators B*, 134 (1), 238-244.
- F. Li, D. Ick Son, T. Whan Kim, E. Ryu, S. Wook Kim, S. Kyun Lee et Y. Hoon Cho, 2009, Photovoltaic cells fabricated utilizing core-shell CdSe/ZnSe quantum dot/multiwalled carbon nanotube heterostructures, *Applied Physics Letters*, 95, 061911 (3 pages).
- Y. Li, W. Zhang, J. Niu, Y. Chen, 2012, Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles, *ACS Nano*, 6, 5164-5173.
- H. Li, R. Liu, S. Lian, Y. Liu, H. Huang et Z. Kang, 2013, Near-infrared light controlled photocatalytic activity of carbon quantum dots for highly selective oxidation reaction, *Nanoscale*, 5, 3289-3297.
- J. Liang, Z. He, S. Zhang, S. Huang, X. Ai, H. Yang et H. Han, 2007, Study on DNA damage induced by CdSe quantum dots using nucleic acid molecular "light switches" as probe, *Talanta*, 71, 1675-1678.
- Y.-W. Lin, M.-M. Hsieh, C.-P. Liu et H.-T. Chang, 2005, Photoassisted synthesis of CdSe and core-shell CdSe/CdS quantum dots, *Langmuir*, 21, 728-734.
- Y. Lin, Y. Zhang, J. Zhao, P. Gu, K. Bi, Q., Zhang, H. Chu, T. Zhang, T. Cui, Y. Wang, J. Zhao et W. W. Yu, 2013, White-light-emitting diodes using GaN-excited CdSe/CdS/ZnS quantum dots, *Particuology* (Available online 15 June 2013).
- W. Liu, S. Zhang, L. Wang, C. Qu, C. Zhang, L. Hong, L. Yuan, Z. Huang, Z. Wang, S. Liu et G. Jiang, 2011, CdSe quantum dots (QD)-induced morphological and functional impairments to liver in mice, *PLoS One*, 6, e24406.
- J. Liu, W.C. Law, J.W. Liu, R. Hu, L.W. Liu, J. Zhu, H.Y. Chen, J.H. Wang, Y.Z. Hu, L. Ye et K.T. Yong, 2013, Toxicity assessment of phospholipid micelle-encapsulated cadmium-based quantum dots using Kunming mice, *RSC Advances*, 3 (6), 1768-1773.
- M. V. Llopis, J. C. Rodriguez, F. J. Martin, A. M. Coto, M. T. Fernandez-Argüelles, J. M. Costa-Fernandez et A. Sanz-Medel, 2011, Dynamic analysis of the photoenhancement process of colloidal quantum dots with different surface modifications, *Nanotechnology*, 22, 385703.
- L. Lopes, R. Ribeiro, F. E. Antunes, T. A. P. Rocha-Santos, M. G. Rasteiro, A. M. V. M. Soares, F. Gonçalves et R. Pereira, 2012, Toxicity and genotoxicity of organic and inorganic nanoparticles to the bacteria *Vibrio fischeri* and *Salmonella typhimurium*, *Ecotoxicology*, 21, 637-648.
- J. Lovrić, H. S. Bazzi, Y. Cuie, G. R. A. Fortin, F. M. Winnik et D. Maysinger, 2005, Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots, *Journal of Molecular Medicine*, 83, 377-385.

Z. Lu, L. Chang Ming, B. Haifeng, Q. Yan, T. Yinghui et Y. Xu, 2008, Mechanism of Antimicrobial Activity of CdTe Quantum Dots, *Langmuir*, 24, 5445-5452.

M

B. Ma, L. Phillip, P. L. Williams et S. A. Diamond, 2013, Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles, *Environmental Pollution*, 172, 76-85.

L. Macomber, C. Rensing et J. A. Imlay, 2007, Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 189, 1616-1626.

L. A. McConnachie, D. Botta, C. C. White, C. S. Weldy, H. W. Wilkerson, J. Yu, R. Dills, X. Yu, W. C. Griffith, E. M. Faustman, F. M. Farin, S. E. Gill, W. C. Parks, X. H. Gao, D. L. Eaton et T.J. Kavanagh, 2013, The glutathione synthesis gene *Gclm* modulates amphiphilic polymer-coated CdSe/ZnS quantum dot-induced Lung inflammation in Mice, *PLOS*, 8 (5), e64165.

S. Mahendra, H. Zhu, V. L. Colvin et P. J. Alvarez, 2008, Quantum dot weathering results in microbial toxicity, *Environmental Science & Technology*, 42, 9424-9430.

S. K. Mahto, C. Park, T. H. Yoon et S. W. Rhee, 2010, Assessment of cytocompatibility of surface-modified CdSe/ZnSe quantum dots for BALB/3T3 fibroblast cells, *Toxicology in Vitro*, 24, 1070-1077.

T. Mandal, V. Stavila, I. Rusakova, S. Ghosh et K.H. Whitmire, 2009, Molecular Precursors for CdS Nanoparticles: Synthesis and Characterization of Carboxylate-Thiourea or -Thiosemicarbazide Cadmium Complexes and Their Decomposition, *Chemistry of Materials*, 21, 5617-5626.

H. S. Mansur et A. P. Mansur, 2010, CdSe quantum dots stabilized by carboxylic-functionalized PVA : Synthesis and UV-Vis spectroscopy characterization, *Materials Chemistry and Physics*, 125, 709-717.

W. Mao, J. Guo, W. Yang, C. Wang, J. He et J. Chen, 2007, Synthesis of high-quality near-infrared-emitting CdTeS alloyed quantum dots via the hydrothermal method, *Nanotechnology*, 18, 85611 (7 pages).

T. J. Mason, J. P. Lorimer, D. M. Bates et Y. Zhao, 1994, Dosimetry in sonochemistry : the use of aqueous terephthalate ion as a fluorescent monitor, *Ultrasonics Sonochemistry*, 1, S91-S95.

H. Mathieu, 1998, *Physique des semiconducteurs et des composants électroniques*, 4e édition, Masson (Paris), 724 pages.

I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman et H. Mattoussi, 2005, Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing, *Nature Materials*, 4, 435-446.

M. Mergeay, D. Nies, S. H. Schlegel, J. Gerits, P. Charles et F. Van Gijsegem, 1985, *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals, *Journal of Bacteriology*, 162, 328-334.

K. R. Messner et J. A. Imlay, 1999, The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*, *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 10119-10128.

X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir et S. Weiss, 2005, Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics, *Science*, 307, 538-544.

E. Morelli, P. Cioni, M. Posarelli et E. Gabellieri, 2012, Chemical stability of CdSe quantum dots in seawater and their effects on a marine microalga, *Aquatic Toxicology*, 122-123, 153-162.

W. J. M. Mulder, R. Koole, R. J. Brandwijk, G. Storm, P. T. K. Chin, G. J. Strijkers, C. M. Donega, K. Nicolay et A. W. Griffioen, 2006, Quantum dots with a paramagnetic coating as a bimodal molecular imaging probe, *Nano Letters*, 6, 1-6.

C. B. Murray, D. J. Norris et M. G. Bawendi, 1993, Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites, *Journal of American Chemical Society*, 115, 8706-8715.

C. R. Myers et K. H. Nealson, 1988, Microbial reduction of manganese oxides. Interaction with iron and sulfur, *Geochimica and Cosmochimica Acta*, 52, 2727-2732.

N

A. Nag, A. Hazarika, K. V. Shanavas, S. M. Sharma, I. Dasgupta et D. D. Sarma, 2011, Crystal structure engineering by fine-tuning the surface energy: the case of CdE (E = S/Se) nanocrystals, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2, 706–712.

A. Nagy, A. Steinbrück, J. Gao, N. Doggett, J. A. Hollingsworth et R. Iyer, 2012, Comprehensive analysis of the effects of CdSe quantum dot size, surface, charge, and functionalization on primary human lung cells, *ACS Nano*, 6, 4748-4762.

K. H. Nealson, A. Belz et B. McKee, 2002, Breathing metals as a way of life: geobiology in action, *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 215-222.

H. Nishioka, 1975, Mutagenic activities of metal compounds in bacteria, *Mutation Research*, 31, 185-189.

D. J. Norris et M. G. Bawendi, 1996, Measurement and assignment of the size-dependent optical spectrum in CdSe quantum dots, *Physical Review B: Condensed Matter*, 53, 16338-16346.

O

W. Ostwald, 1901, *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 37, 385.

P

G. W. Pace et C. D. Leaf, 1995, The role of oxidative stress in HIV disease, *Free Radical Biology and Medicine*, 19, 523-528.

H. E. Pace, E. K. Leshner et J. F. Ranville, 2010, Influence of stability on the acute toxicity of CdSe/ZnS nanocrystals to *Daphnia magna*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29 (6), 1338-1344.

C. C. Pacheco, J. F. Passos, A. R. Castro, P. Moradas-Ferreira et P. De Marco, 2008, Role of respiration and glutathione in cadmium-induced oxidative stress in *Escherichia coli* K-12, *Archives of Microbiology*, 189, 271-278.

T. Pellegrino, L. Manna, S. Kudera, T. Liedl, D. Koktysh, A. L. Rogach, S. Keller, J. Rädler, G. Natile et W. J. Parak, 2004, Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell: a general route to water soluble nanocrystals, *Nano Letters*, 4, 703-707.

Z. A. Peng et X. Peng, 2001, Formation of high-quality CdTe, CdSe and CdS nanocrystals using CdO as precursor, *Journal of American Chemical Society*, 123, 183-184.

N. Pradhan et S. Efrima, 2003, Single-precursor, one-pot versatile synthesis under near ambient conditions of tunable, single and dual band fluorescing metal sulfide nanopaticles, *Journal of the American Chemical Society*, 125, 2050-2051.

J. H. Priester, P. K. Stoimenov, R. E. Mielke, S. M. Webb, C. Ehrhardt, J. P. Zhang, G. D. Stucky et P. A. Holden, 2009, Effects of soluble cadmium salts *versus* CdSe quantum dots on the growth of planktonic *Pseudomonas aeruginosa*, *Environmental Science & Technology*, 43, 2589-2594.

Q

Z. D Qi, D. W. Li, P. Jiang, F. L. Jiang, Y. S. Li, Y. Liu, W. K. Wong et K. W. Cheah, 2011, Biocompatible CdSe quantum dot-based photosensitizer under two-photon exciton for photodynamic therapy, *Journal of Materials Chemistry*, 21, 2455-2458.

L. Qu et X. Peng, 2002, Control of Photoluminescence Properties of CdSe Nanocrystals in Growth, *Journal of American Chemical Society*, 124 (9), 2049-2055.

A. Quarta, A. Ragusa, S. Deka, C. Tortiglione, A. Tino, R. Cingolani et T. Pellegrino, 2009, Bioconjugation of Rod-Shaped Fluorescent Nanocrystals for efficient targeted cell labeling, *Lagmuir*, 25 (21), 12614-12622.

R

A. S. Rattray, J. I. Prosser, K. Killham et L. A. Grover, 1990, Luminescent-based nonextractive technique for *in situ* detection of *Escherichia coli* in soil, *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3368-3374.

P. Reiss, S. Carayon, J. Bleuse et A. Pron, 2003, Low Polydispersity Core/Shell Nanocrystals of CdSe/ZnSe and CdSe/ZnSe/ZnS Type: Preparation and Optical Studies, *Synthetic Metals*, 139 (3), 649-652.

P. Reiss, M. Protière et L. Li, 2009, Core/Shell semiconductor nanocrystals, *Small*, 5, 154-168.

M. Ricaud et O. Witschger, 2012, Les nanomatériaux : définitions, risques toxicologiques, caractérisation de l'exposition professionnelle et mesures de prévention, Fiche INRS ED 6050.

A. L. Rogach, L. Katsikas, A. Kornowski, D. Su, A. Eyhmüller et H. Weller, 1996, Synthesis and Characterization of Thiol-Stabilized CdTe Nanocrystals, *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, 100, 1772-1778.

A. L. Rogach, A. Kornowski, M. Gao, A. Eychmüller et H. Weller, 1999, Synthesis and characterization of a size series of extremely small thiol-stabilized CdSe nanocrystals, *The Journal of Physical Chemistry B*, 103, 3065-3069.

L. Rogach, D. Nagesha, J. W. Ostrander, M. Giersig et N. A. Kotov, 2000, Raisin bun-type Composite spheres of silica and semiconductor nanocrystals, *Chemistry of Materials*, 12, 2676-2685.

A. Rogach, 2008, *Semiconductor Nanocrystal Quantum Dots; Synthesis, Assembly, Spectroscopy and Applications*, Springer Verlag (Vienna, Austria).

J. P. Ryman-Rasmussen, J. E. Riviere et N. A. Monteiro-Riviere, 2007, Surface coatings determine cytotoxicity and irritation potential of quantum dot nanoparticles in epidermal keratinocytes, *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 143-153.

S

J. Sambrook et D. W. Russell, 2001, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press (New York).

A. R. Santos, A. S. Miguel, R. Malho, C. Maycock, M. C. Vaz Patto, P. Fevereiro et A. Oliva, 2010, The impact of CdSe/ZnS quantum dots in cells of *Medicago sativa* in suspension culture, *Journal of Nanobiotechnology*, 8:24.

R. Schneider, C. Wolpert, H. Guilloteau, L. Balan, J. Lambert et Christophe Merlin, 2009, The exposure of bacteria to CdTe-core quantum dots: the importance of surface chemistry on cytotoxicity, *Nanotechnology*, 20, 225101 (10 pages).

- R. Schneider et L. Balan, 2012, Hydrothermal routes for the synthesis of CdSe core quantum dots, state-of-the-art of quantum dot system fabrications, in *State-of-the-Art of Quantum Dot System Fabrications*, édité par A. Al-Ahmadi, InTech.
- S. T. Selvan, T. T. Tanet et J. Y. Ying, 2005, Robust, Non-Cytotoxic, Silica-Coated CdSe Quantum Dots with Efficient Photoluminescence, *Advanced Materials*, 17, 1620-1625.
- W. Senevirathna, R. Kiro, R. Rosen, I. Popov, S. Belkin et M. Wells, 2009, CdSe quantum dots induce superoxide stress in engineered biosensor bacteria, *Nanotoxicology*, 3, 98-108.
- Q. Shang, H. Wang, H. Yu, G. Shanand et R. Yan, 2007, Effect of phenylalanine on photoluminescence and stability of CdTe nanocrystals accped with thioglycolic acid, *Colloids and surface A*, 294, 86-91.
- B. Shen, R. G. Jensen et H. J. Bohnert, 1997, Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals, *Plant Physiology*, 115, 527-532.
- L. Shen, 2011, Biocompatible Polymer/Quantum Dots Hybrid Materials: Current Status and Future Developments, *Journal of Functional Biomaterials*, 2, 355-372.
- A. Shiohara, A. Hoshino, K. Hanaki, K. Suzuk et K. Yamamoto, 2004, On the cyto-toxicity caused by quantum dots, *Microbiology and Immunology*, 48, 669-675.
- J. M. Slauch, 2011, How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question, *Molecular Microbiology*, 80, 580-583.
- V. I. Slaveykova, J. P. Pinheiro, M. Floriani et M. Garcia, 2013, Interactions of core-shell quantum dots with metal resistant bacterium *Cupriavidus metallidurans*: Consequences for Cu and Pb removal, *Journal of Hazardous Materials*, 261, 123-129.
- J. M. Slocik, J. T. Moore et D. W. Wright, 2002, Monoclonal antibody recognition of histidine-rich peptide encapsulated nanoclusters, *Nano letters*, 2, 169-173.
- C. J. Smith et P. C. Kelleher, 1980, Alpha-fetoprotein molecular heterogeneity. Physiologic correlations with normal growth, carcinogenesis and tumor growth. *Biochimica et Biophysica Acta*, 605, 1-32.
- A. M. Smith, X. Gao et S. Nie, 2004, Quantum Dot nanocrystals for *in vivo* molecular and cellular imaging, *Photochemistry and Photobiology*, 80, 377-385.
- A. M. Smith et S. Nie, 2008, Nanocrystal synthesis in an amphibious bath: spontaneous generation of hydrophilic and hydrophobic surface coatings, *Angewandte Chemie International Edition*, 47, 9916-9921.
- W. E. Smith, J. Brownell, C. C. White, Z. Afsharinejad, J. Tsai, X. Hu, S. J. Polyak, X. Gao, T. J. Kavanagh et D. L. Eaton, 2012, *In vitro* toxicity assessment of amphiphilic polymer-coated CdSe/ZnS quantum dots in two human liver cells models, *ACS Nano*, 6 (11), 9475-9484.
- A. W. Sonesson, U. M. Elofsson, T. H. Callisenet et H. Brismar, 2007, Tracking Single Lipase Molecules on a Trimyristin Substrate Surface Using Quantum Dots, *Langmuir*, 23, 8352-8356.
- M. S. Stankovic, M. G. Curcic, J. B. Zizic, M. D. Topuzovic, S. R. Solujic et S. D. Markovic, 2011, Teucrium plant species as natural sources of novel anticancer compounds : antiproliferative, proapoptotic and antioxydant properties, *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 4190-4205.
- S. T. Stern, B. S. Zolnick, C. B. McLeland, J. Clogston, J. Zheng et S. E. McNeil, 2008, Induction of autophagy in porcine kidney cells by quantum dots : A common cellular response to nanomaterials?, *Toxicology Sciences*, 106, 140-152.
- G. Storz et M. Zheng, 2000, Chapter 4 "Oxydative stress" in *Bacterial stress response*, édité G. Storz et R. Hengge Aronis, 47-59.

Y. Su, Y. He, H. Lu, L. Sai, Q. Li, W. Li, L. Wang, P. Shen, Q. Huang et C. Fan, 2009, The cytotoxicity of cadmium based, aqueous phase – Synthesized, quantum dots and its modulation by surface coating, *Biomaterials*, 30, 19-25.

Y. Su, M. Hu, C. Fan, Y. He, Q. Li, W. Li, L.-H. Wang, P. She et Q. Huang, 2010, The cytotoxicity of CdTe quantum dots and the relative contributions from released cadmium ions and nanoparticle properties, *Biomaterials*, 31, 4829-4834.

K. G. Surowitz, J. A Titus et R. M. Pfister, 1984, Effects of cadmium accumulation on growth and respiration of a cadmium-sensitive strain of *Bacillus subtilis* and a selected cadmium resistant mutant, *Archives of Microbiology*, 140, 107-112.

T

Y. Tang, S. Han, H. Liu, X. Chen, L. Huang, X. Li et J. Zhang, 2013, The role of surface chemistry in determining in vivo biodistribution and toxicity of CdSe/ZnS core-shell quantum dots, *Biomaterials*, 34, 8741-8755.

D. V. Talapin, A. L. Rogach, A. Kornowski, M. Haase et H. Weller, 2001, Monodisperse CdSe and CdSe/ZnS Nanocrystals Synthesized in a Hexadecylamine- Trioctylphosphine Oxide -Trioctylphosphine Mixture, *Nano Letters*, 1, 207-211.

J. Tian, R. Gao, Q. Zhang, S. Zhang, Y. Li, J. Lan, X. Qu et G. Cao, 2012, Enhanced performance of CdS/CdSe quantum dot cosensitized solar cells via homogeneous distribution of quantum dots in TiO₂ film, *The Journal of Physical Chemistry C*, 116, 18655–18662.

T. D. Thuy Ung, T. K. Chi Tran¹, T. Nga Pham, D. Nghia Nguyen, D. Khang Dinh et Q. Liem Nguyen, 2013, CdTe and CdSe quantum dots: synthesis, characterizations and applications in agriculture, *Advanced Nature Sciences : Nanosciences and Nanotechnologies*, 3, 043001 (11 pages).

D. Touati, M. Jacques, B. Tardat, L. Bouchard et S. Despied, 1995, Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta fur mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase, *Journal of Bacteriology*, 177, 2305-2314.

U

H. T. Uyeda, I. L. Medintz, J. K. Jaiswal, S. M. Simon et H. Mattoussi, 2005, Synthesis of compact multidentate ligands to prepare stable hydrophilic quantum dot fluorophores, *Journal of American Chemical Society*, 127, 3870-3878.

V

M. Valko, H. Morris et M. T. D. Cronin, 2005, Metals, toxicity and oxydative stress, *Curretn Medicinal Chemistry*, 12, 1161-1208.

A. Valipoor, K. Parivar, M. Modaresi, G.R. Amiri et M. Messripour, 2013, Cytotoxicity effects of CdSe quantum dots on testis development of laboratory mice, *Optoelectronics and Advanced Materials*, 7 (3-4), 252-257.

D. Van der Lelie, T. Schwuchow, U. Schwidetzky, S. Wuertz, W. Baeyens, M. Mergeay et D. H. Nies, 1997, Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homoeostasis in *Alcaligenes eutrophus*, *Molecular microbiology*, 23, 493-503.

E. T. Velzeboer, H. M. Peeters et A. A. Koelmand, 2013, Multiwalled carbon nanotubes at environmentally relevant concentrations affect the composition of benthic communities, *Environmental Science & Technology*, 47, 7475-7482.

E. J. W. Verwey et J. T. G. Overbeek, 1948, *Theory of the stability of lyophobic colloids*, Elsevier (Amsterdam).

M. Vibin, R. Vinayakan, A. John, V. Raji, C.S. Rejiya, N.S. Vinesh et A. Abraham, 2011, Cytotoxicity and fluorescence studies of silica-coated CdSe quantum dots for bioimaging applications, *Journal of Nanoparticles Research*, 13, 2587-2596.

M. L. Viriot, 2003, Fluorescence : Origine, caractéristiques, influence des paramètres d'environnement, *Actas of Biochemica*, 6, 7-19.

P. W. Voorhees, 1985, The theory of Ostwald ripening, *Journal of Statistical Physics*, 38, 231-252.

E. Voura, J. Jaiswal, H. Mattoussi et S. Simon, 2004, Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy, *Nature Medecine*, 10, 993-998.

W

Y. A. Wang, J. J. Li, H. Chen et X. Peng, Stabilization of Inorganic Nanocrystals by Organic Dendrons, 2002, *Journal of American Chemical Society*, 124, 2293-2298.

Y. Wang, Z. Tang, M.A. Correa-Duarte, I. Pastoriza-Santos, M. Giersig, N.A. Kotov et L. M. Liz-Marzan, 2004, Mechanism of strong luminescence photoactivation of citrate-stabilized water-soluble nanoparticles with CdSe cores, *The Journal of Physical chemistry B*, 108, 15461-15469.

L. Wang, H. Zheng, Y. Long, M. Gao, J. Hao, J. Du, X. Mao et D. Zhou, 2010, Rapid determination of the toxicity of quantum dots with luminous bacteria, *Journal of Hazardous Materials*, 177, 1134-1137.

L. L. Wang et J. S. Jiang, 2011, Optical performance evolutions of reductive glutathione coated CdSe quantum dots in different environments, *Journal of Nanoparticles Research*, 13, 1301-1309.

A. Weir, P. Westerhoff, L. Fabricius, K. Hritovski et N. von Goetz, 2012, Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products, *Environmental Science & Technology*, 46, 2242-2250.

R. Werlin, J. H. Priester, R. E. Mielke, S. Krämer, S. Jackson, P. K. Stoimenov, G. D. Stucky, G. N. Cherr, E. Orias et P. A. Holden, 2011, Biomagnification of cadmium selenide quantum dots in a simple experimental microbial food chain, *Nature nanotechnology*, 6, 65-71

P. N. Wicinski, K. M. Metz, T. C. King Heiden, K. M. Louis, A. N. Mangham, R. J. Hamers, W. Heideman et R. E. Peterson, 2013, Toxicity of oxidatively degraded quantum dots to developing zebrafish (*Danio rerio*), *Environmental Science & Technology*, 47, 9132-9139.

M. R. Wiesner, G. V. Lowry, P. Alvarez, D. Dionysiou et P. Biswas, 2006, Assessing the risks of manufactured nanomaterials, *Environmental Science & Technology*, 40, 4336-4345.

C.-S. Wu, J. M. Cupps et X. Fan, 2009, Compact quantum dot probes for rapid and sensitive DNA detection using highly efficient fluorescence resonant energy transfer, *Nanotechnology*, 20, 305502 (7 pages).

Z. Wu, Y. Zhao, F. Qiu, Y. Li, S. Wang, B. Yang, L. Chen, J. Sun et J. Wang, 2009, Forming water-soluble CdSe/ZnS QDs using amphiphilic polymers, stearyl ethacrylate/methylacrylate copolymers with different hydrophobic moiety ratios and their optical properties and stability, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 350, 121-129.

S. F. Wuister, I. Swart, F. V. Driel, S. G. Hickey et C. D. M. Donega, 2003, Highly luminescent water-soluble CdTe quantum dots, *Nano Letters*, 3, 503-507.

X

- C. Xia, Q. Meng, L.-Z. Liu, Y. Rojanasakul, X.-R. Wang et B.-H. Jiang, 2007, Reactive Oxygen Species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor, *Cancer Research*, 67, 10823-10830.
- X. Xia, Z. Liu, G. Du, Y. Li et M. Ma, 2010, Wurtzite et zinc-blende CdSe based core/shell semiconductor nanocrystals : Structure, morphology and photoluminescence, *Journal of Luminescence*, 130 (7), 1282-1291.
- Q. Xiao, S. Huang, J. Ma, W. Su, P. Li, J. Cui et Y. Liu, 2012, Systematically investigation of interactions between BSA and different charge-capped CdSe/ZnS quantum dots, *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, 249, 53-60.
- Q. Xiao, S. Huang, W. Su, P. Li, Z. Liang, J. Ou, J. Ma et Y. Liu, 2012, Evaluate the potentiel environmental toxicity of quantum dots on ciliated protozoa by microcalorimetry, *Thermochimica Acta*, 547, 62-69.
- R. Xie, X. Zhong et T. Basché, 2005, Synthesis, characterization, and spectroscopy of type-II core/shell semiconductor nanocrystals with ZnTe cores, *Advanced Materials*, 17, 2741-2745.
- Y. Xing, Q. Chaudry et C. Shen, 2007, Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry, *Nature Protocols*, 2 (5), 1152-1165.
- F. F. Xu et J. A. Imlay, 2012, Silver(I), Mercury(II), Cadmium(II), and Zinc(II) target exposed enzymatic Iron-Sulfur clusters when they toxify *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 3614-3621.

Y

- S. M. Yang, L. Sanchez et J. Hayes, 2005, Quantum dots fluorescent inks, brevet US 20080277626 A1.
- L. Ye, K. T. Yong, L. Liu, I. Roy, R. Hu, J. Zhu, H. Cai, W. C. Law, J. Liu, K. Wang, J. Liu, Y. Hu, X. Zhang, M. T. Swihart et P. N. Prasad, 2012, A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots, *Nature Nanotechnology*, 7, 453-458.
- C. Y. Yeh, Z. W. Lu, S. Froyenet et A. Zunger, 1992, Zinc-blende–wurtzite polytypism in semiconductors, *Physical Review B*, 46, 10086-10087.
- W. W. Yu et X. Peng, 2002, Formation of high-quality CdS and other (II–VI) semiconductor nanocrystals in noncoordinating solvents: tunable reactivity of monomers, *Angewandte Chemie International Edition*, 41, 2368-2371.
- W. W. Yu , L. Qu , W. Guo et X. Peng, 2003, Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals, *Chemistry of Materials*, 15, 2854-2860.
- W. W. Yu, Y. A. Wang et X. Peng, 2003, Formation and stability of size-, shape-, and structure-controlled CdTe nanocrystals: ligand effects on monomers and nanocrystals, *Chemistry of Materials*, 15, 4300-4308.
- Z. H. Yu, J. B. Li, D. B. O'Connor, L. W. Wang et P. F. Barbara, 2003, Large Resonant Stokes Shift in CdS Nanocrystals, *Journal of Physical Chemistry B*, 107 (24), 5670-5674.
- P. Y. Yu et M. Cardona, 2005, Fundamentals of semiconductors: physics and materials properties, Springer (New York), 355 pages.
- Y. Yu, L. Xu, J. Chen, H. Gao, S. Wang, J. Fang et S. Xu, 2012, Hydrothermal synthesis of GSH-TGA co-capped CdTe quantum dots and their application in labeling colorectal cancer cells, *Colloids and surfaces B : Biointerfaces*, 95, 247-253.

- H. Zajicek, P. Juza, E. Abramof, O. Pankratov, H. Sitter, H. Helm, G. Brunthaler, W. Faschinger et K. Lischka, 1993, Photoluminescence from ultrathin ZnSe/CdSe quantum wells, *Applied Physical Letters*, 62, 717-719.
- A. Zaslaver, A. Bren, M. Ronen, S. Itzkovitz, I. Kikoin, S. Shavit, W. Liebermeister, M. G. Surette et U. Alon, 2006, A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*, *Nature Methods*, 3, 623-628.
- O. Zeyons, 2008, Études des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement, PhD thesis, Ecole doctorale physique et chimie des matériaux, Spécialité Physicochimie, Paris VI - Pierre et Marie Curie.
- H. J. Zhan, P. J. Zhou, L. Ding, Z. Y. He et R. Ma, 2012, Multi-spectroscopic techniques to evaluate the toxicity of alloyed CdSeS quantum dots, *Journal of Luminescence*, 132, 2769-2774.
- H.-J. Zhan, P.-J. Zhou, R. Ma, X.-J. Liu, Y.-N. He et C.-Y. Zhou, 2013, Enhanced oxidation stability of quasi core-shell alloyed CdSeS quantum dots prepared through aqueous microwave synthesis technique, *Journal of Fluorescence*, published online july 2013.
- T. Zhang, J. L. Stilwell, D. Gerion, L. Ding, O. Elboudwarej, P. A. Cooke, J. W. Gray, A. P. Alivisatos et F. F. Chen, 2006, Cellular effect of high doses of Silica-coated quantum dots profiled with high throughput gene expression analysis and high content celloomics measurements, *Nano letters*, 6, 800-808.
- Y.-H. Zhang, H.-S. Zhang, X.-F. Guo et H. Wang, 2008, L-cysteine-coated CdSe/Cd Se-core-shell quantum dots as selective fluorescence probe for copper (II) determination, *Microchemical Journal*, 89, 142-147.
- Y. M. Zhang et C. O. Rock, 2008, Membrane lipid homeostasis in bacteria, *Nature Review Microbiology*, 6, 222-233.
- W. Zhang, X. Sue, L. Chen, K. F. Lin, Q. X. Dong, C. J. Huang, R. B. Fu et J. Zhu, 2012, Toxicological effect of joint cadmium selenium quantum dots and copper ion exposure on Zebrafish, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31 (9), 2117-2123.
- Z. Zhao, J. Zeng, D. Zejun, X. Wang, H. Jianguo et Z. Zengming, 2007, High pressure photoluminescence of CdZnSe quantum dots: Alloying effect, *Journal of Applied Physics*, 102, 053509 (3 pages).
- M. Zheng, X. Wang, L. J. Templeton, D. R. Smulski, R. A. LaRossa et G. Storz, 2001, DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide, *Journal of Bacteriology*, 183, 4562-4570.
- H. Zheng, G. C. Chen, F. M. Song, L. A. DeLouise et Z. Y. Lou, 2011, The cytotoxicity of OPA-modified CdSe/ZnS core/shell quantum dots and its modulation by Silibinin in human skin cells, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 7 (5), 648-658.
- X. Zhou, Y. Kobayashib, V. Romanyuka, N. Ochuchic, M. Takedac, S. Tsunekawad et A. Kasuya, 2005, Preparation of silica encapsulated CdSe quantum dots in aqueous solution with the improved optical properties, *Applied Surface Science*, 242, 281-286.
- Y. J. Zhou, S. P. Zhang, C. W. Liu et Y. Q. Cai, 2009, The protection of selenium on ROS mediated-apoptosis by mitochondria dysfunction in cadmium-induced LLC-PK1 cells, *Toxicology in Vitro*, 23, 288-294.
- C. Zhou, H. Shen, Y. Guo, L. Xu, J. Niu, Z. Zhang, Z. Du, J. Chen et L. S. Li, 2010, A versatile method for the preparation of water-soluble amphiphilic oligomer-coated semiconductor quantum dots with high fluorescence and stability, *Journal of Colloid and Interface Science*, 344, 279-285.
- I. Zwolak et H. Zaporowska, 2012, Selenium interactions and toxicity: a review, *Selenium interactions and toxicity, Cell Biology and Toxicology*, 28, 31-46.

Table des illustrations

Figure 1. Représentation schématique des bandes d'énergie pour les différents types de matériaux.	36
Tableau 1. Valeurs du rayon de Bohr, r_B , et de l'énergie de gap, E_g , du solide massif, de quelques semi-conducteurs de type II-VI classiquement utilisés.	37
Figure 2. Représentation schématique des possibilités de confinement dans un semi-conducteur.	38
Tableau 2. Évolution du pourcentage d'atomes de surface en fonction du nombre d'atomes constituant la nanoparticule.	39
Figure 3. Représentation schématique d'un QD cœur/coquille stabilisé par un ligand hydrophobe comme l'oleylamine : CdSe/CdS/ZnS@oleylamine; (a) vue 3D, (b) coupe.	39
Figure 4. Couplage des orbitales ns et np dans le cas de N atomes : formation des bandes d'énergie.	41
Équation 1. Fonction de Bloch.	41
Figure 5. Diagramme d'orbitales moléculaires combinant le cadmium et le sélénium ne tenant compte que des niveaux s et p.	42
Figure 6. Représentation schématique de la structure de bande de CdSe massif ne tenant compte que des niveaux s et p.	43
Équation 2. Énergie des courbes de dispersion.	44
Équation 3. Énergie de la courbe de dispersion de la bande de conduction.	45
Équation 4. Énergie de la courbe de dispersion $J = 3/2$, $J_z = \pm 3/2$.	45
Équation 5. Énergie de la courbe de dispersion $J = 3/2$, $J_z = \pm 1/2$.	45
Équation 6. Énergie de la courbe de dispersion $J = 1/2$.	45
Figure 7. Représentation schématique du passage de l'état massif à l'état nanoparticulaire.	46
Équation 7. Équation de Brus permettant le calcul de l'énergie de gap E_g de QDs supposés sphériques.	46
Équation 8. Expression du rayon de Bohr de l'exciton.	47
Équation 9. Équation permettant le calcul de l'énergie de gap E_g et utilisant le rayon de Bohr de l'exciton.	47
Figure 8. Diagramme simplifié de Perrin-Jablonski représentant les différentes transitions électroniques possibles.	48
Équation 10. Expression de l'énergie transportée par un photon.	48
Équation 11. Expression de la célérité : déplacement d'un photon dans le vide.	48
Équation 12. Expression de la longueur d'onde d'émission de fluorescence.	49

Figure 9. Évolution des propriétés de fluorescence pour des tailles décroissantes de QDs.	49
Figure 10. Spectre d'absorption d'une suspension colloïdale de QDs CdSe@MPA (§ III.1.).	51
Équation 13. Équation permettant le calcul du diamètre de nanoparticules de CdSe à partir de $\lambda_{\max}$.	51
Équation 14. Équation permettant le calcul du coefficient d'extinction molaire au seuil d'absorption.	52
Équation 15. Équation permettant le calcul de la concentration en nanoparticules.	52
Figure 11. Spectre d'émission de fluorescence d'une suspension colloïdale de QDs CdSe@MPA (§ III.1.).	54
Figure 12. Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de QDs CdSe@GSH caractéristiques d'une émission de défauts (§ III.1.1.).	55
Figure 13. Apparition de niveaux énergétiques intermédiaires dans le cas de matériau présentant des défauts de surface.	56
Équation 16. Équation permettant le calcul du rendement quantique de fluorescence.	57
Tableau 3. Structures cristallines, et paramètres de maille associés, de quelques semi-conducteurs du groupe II-VI.	60
Figure 14. Structures cristallines Wurtzite et Zinc Blende. (a) et (b) : représentations classiques des mailles élémentaires ; (c) et (d) : conformations respectivement décalée et éclipée ; (e) et (f) : empilement des couches sur le plan (111).	61
Figure 15. Représentation schématique des band gap des différents types de QDs cœur-coquille (band gap du cœur en bleu et band gap de la coquille en vert).	63
Figure 16. Représentation schématique de la structure de bandes d'un QD CdSe/CdS.	63
Figure 17. Représentation schématique de la structure de bandes d'un QD CdS/CdSe.	64
Figure 18. Représentations schématiques des structures de bandes de QDs de CdS/ZnSe et de ZnTe/CdSe.	65
Figure 19. Spectres d'émission de fluorescence de QDs à cœur CdSe, avant et après ajout de différentes coquilles.	67
Figure 20. Structures et spectres d'émission de fluorescence de structures cœur/coquille et alliages (Bailey <i>et al.</i> 2003).	68
Équation 17. Relation exprimant les forces de Van der Waals	69
Équation 18. Relation exprimant les forces électrostatiques	69
Figure 21. Potentiel d'interaction U entre particules sphériques chargées en fonction de H la distance entre les deux particules.	70
Figure 22. Schématisation graphique des différentes étapes de la synthèse de QDs.	73

Figure 23. Exemples de ligands monodentate (MPA) et bidentate (DHLLA).	78
Figure 24. Structure des ligands de type oligomère de phosphine utilisés par Kim <i>et al.</i> (2003).	78
Figure 25. Différentes générations de dendrons utilisées par Wang <i>et al.</i> (2002).	79
Figure 26. Structures de QDs porteurs de ligands thiosilanes.	79
Figure 27. Hydrodispersion de QDs hydrophobes utilisant un tensioactif de type gemini.	80
Figure 28. Hydrodispersion de QDs CdSe@TOP utilisant le phospholipide PEGylé PEG-DSPE ₂₀₀₀ .	81
Figure 29. Amélioration des propriétés photophysiques par encapsulation des QDs dans des nanosphères de silice (Zhou <i>et al.</i> 2005).	82
Figure 30. Images MET des QDs de CdSe incorporés par Zhou <i>et al.</i> (2005) dans des nanosphères de silice.	83
Figure 31. Ancrage de biomolécules d'intérêt via des interactions électrostatiques non-covalentes (stratégie développée par Goldman <i>et al.</i> 2002).	86
Figure 32. Représentation schématique des différents types de couplages covalents QDs-biomolécules (Xing <i>et al.</i> 2007).	88
Figure 33. Spectres d'émission de fluorescence de QDs de CdSe (ligne brisée) et de CdSe/ZnS (ligne continue), obtenus par Hines <i>et al.</i> , normalisés par leur absorption à la longueur d'onde d'excitation (470 nm).	89
Figure 34. Évolution du RQ des QDs CdSe@AChE en présence d'ATCh et de parathion.	94
Figure 35. Distribution de QDs CdTe@cystéamine de (b) 5,2 nm et (c) 2,2 nm dans des cellules tumorales de rat (phéochromocytome).	100
Figure 36. Production d'EROs par les QDs.	102
Figure 37. Sources et cibles des EROs dans la cellule (D'Autréaux <i>et al.</i>) : Les EROs(O ₂ •-, H ₂ O ₂ , OH•) sont produits par différentes biomolécules (enzymes, co-enzymes, ... : présentées au centre du cercle). Chaque ERO réagit avec des cibles biologiques privilégiées (cases colorées à l'extérieur du cercle).	105
Tableau 4. Les 30 gènes les plus induits chez <i>E. coli</i> en présence d'H ₂ O ₂ et leurs fonctions (Zheng <i>et al.</i> 2001).	107
Figure 38. Représentation schématique du changement de conformation de la protéine OxyR conduisant à l'expression des gènes de son régulon. Les résidus 199 et 208 participent à la formation d'un pont disulfure en présence d'H ₂ O ₂ .	108
Figure 39. Représentation schématique du changement de conformation de la protéine SoxR conduisant à l'expression des gènes de son régulon.	108
Figure 40. Structure d'un biosenseur bactérien répondant au stress oxydant.	110
Figure 41. Structure d'un biosenseur bactérien répondant au Cd ²⁺ biodisponibles.	113

Équation 19. Formation de NaHSe.	119
Équation 20. Formation de Na ₂ SeSO ₃ .	119
Figure 42. Réduction du NBT en formazan.	125
Figure 43. Réduction du DST en HTA hautement fluorescent.	126
Tableau 5. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées.	129
Équation 21. Équation de type Logistic permettant l'ajustement d'une sigmoïde.	132
Figure 44. Spectre d'émission du néon JBL Solar Color T8.	133
Figure 45. DRX confirmant l'obtention de QDs présentant une structure CdSe(S) (Aldeek <i>et al.</i> 2011).	139
Figure 46. Évolution des propriétés photophysiques de QDs CdSe@GSH dispersés en 2milieu aqueux et conservés à l'obscurité (Wang <i>et al.</i> 2011).	141
Figure 47. Évolution des propriétés optiques de QDs CdSe@GSH (pH initial de 11,5) en fonction du temps de reflux.	142
Figure 48. Évolution des propriétés optiques de QDs CdSe@GSH (temps de réaction : 10 minutes de reflux) en fonction du pH initial de la solution de complexes.	143
Tableau 6. Évolution du RQ (%) de fluorescence des QDs CdSe@GSH au cours du temps pour chaque concentration initiale en Cd ²⁺ .	144
Figure 49. Optimisations de synthèse effectuées par Yu <i>et al.</i> (2012). Effets (a) du pH (t = 1,5 h) et (b) du temps de réaction (pH = 9) à 140°C. (c) Effets de la température à pH = 9 et t = 1,5.	146
Figure 50. Spectres d'absorption et d'émission de QDs CdSe@TGA obtenus après 2 h de chauffage à 140°C.	147
Figure 51. Évolution des propriétés optiques de QDs CdSe@TGA en fonction du temps de chauffage.	148
Figure 52. Évolution des propriétés optiques de QDs CdSe@TGA en fonction de la température (temps de chauffage de 2h).	149
Figure 53. Évolution des propriétés optiques de QDs CdSe@TGA en fonction du temps de chauffage (à 170°C).	150
Équation 22. Équation de formation de CdS en présence de thiourée.	150
Figure 54. Amélioration des propriétés optiques de CdSe(S)@TGA par ajout de thiourée lors de la synthèse hydrothermale à 170°C.	151
Figure 55. Augmentation de l'émission de défauts par utilisation d'un ratio Cd/Se/S/ligand de 1/0,1/1/1,2.	152
Figure 56. Évolution des propriétés optiques de QDs CdSe@TGA en fonction du temps de reflux.	153

Figure 57. (a) Spectres d'absorption et (b) d'émission de fluorescence de QDs de CdSe@MSA obtenus par Chen <i>et al.</i> (2011). (c) Analyse DRX.	154
Figure 58. Évolution des propriétés optiques de QDs CdSe@MSA en fonction du temps de chauffage.	155
Figure 59. Effet de l'augmentation de la concentration initiale en Cd^{2+} sur les propriétés optiques de QDs CdSe@MSA.	156
Figure 60. Évolution des propriétés optiques de QDs CdSe@MSA en fonction du temps de reflux.	157
Figure 61. Diffractogrammes des rayons X des QDs (a) CdSe et (b) CdSe(S) (valeurs standard de CdSe et CdS massifs présentées comme références).	158
Tableau 7. Valeurs associées aux pics de diffractions des plans (111), (220) et (311) des structures CdSe et CdS, ainsi que des QDs alliés CdSe(S).	159
Figure 62. Images MET représentatives des QDs (a) CdSe et (b) CdSe(S). (c) et (d) sont les diffractogrammes des électrons correspondant et (e) et (f) les histogrammes présentant la distribution en taille.	160
Figure 63. Histogrammes présentant les distributions en taille (diamètres hydrodynamiques) des QDs (a) CdSe et (b) CdSe(S) (Jour 1).	161
Figure 64. Corrélogrammes associés aux mesures du diamètre hydrodynamique des QDs (a) CdSe et (b) CdSe(S) (Jour 21).	162
Figure 65. Graphiques présentant les distributions en mobilité électrophorétique des QDs (a) CdSe et (b) CdSe(S) (Jour 21).	163
Figure 66. Spectres d'absorption et d'émission des QDs CdSe@MSA (en noir) et CdSe(S)@MSA (en rouge).	164
Figure 67. Évolutions des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence des QDs (a) CdSe(S) et (b) CdSe, irradiés par une lampe Hg-Xe ($P = 350 \text{ mW}$).	166
Tableau 8. Analyses ICP de dispersions colloïdales à $5 \mu\text{M}$ de QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA : Analyse des rapport $[\text{Cd}^{2+}] / [\text{Se}^{2-}]$.	167
Tableau 9. Analyses ICP de dispersions colloïdales à $5 \mu\text{M}$ de QDs CdSe@MSA et CdSe(S)@MSA : Analyse de la teneur en Cd trouvée.	168
Tableau 10. Analyses ICP de dispersions colloïdales à $5 \mu\text{M}$ de QDs CdSe(S)@MSA et CdSe@MSA : Analyse de la libération en Cd^{2+} après 1 h de dialyse.	169
Figure 68. Évolution des propriétés photophysiques en fonction du temps de dialyse pour les QDs (a) CdSe@MSA et (b) CdSe(S)@MSA.	170
Figure 69. Toxicité à $t = 3$ heures des QDs (a) CdSe@MSA, (b) CdSe(S)@MSA (duplicata : carrés noirs et ronds blancs) et (c) contrôle CdCl_2 (triplicata moyenné et présenté avec ses écarts-types). (Réplifications : manipulations indépendantes)	177
Tableau 11. Calcul du contenu en Cd des QDs de CdSe et CdSe(S) à la concentration correspondante à la CI_{50} .	177

Figure 70. Surproduction de luminescence en présence de CdCl_2 : (a) de trois expériences indépendantes ou (b) moyennées avec écarts-types de signaux obtenus à $t = 3$ h. (c) Exemple de surexpression de la luminescence à $t = 2$ h. Exemple de surproduction de luminescence en présence de QDs de (d) CdSe et (e) CdSe(S) à $t = 2$ h.	179
Figure 71. Surproduction de luminescence en présence de NaN_3 (duplicata, $t = 3$ heures, en vert et bleu).	180
Figure 72. Bioluminescence induite par (a) CdCl_2 , (b) les QDs de CdSe@MSA et (c) les QDs de CdSe(S)@MSA, en fonction des concentrations initialement introduites.	182
Tableau 12. Exemple de calculs permettant d'obtenir le pourcentage de Cd biodisponible.	183
Tableau 13. Temps de génération (T_g) moyen obtenus sous illumination.	188
Figure 73. Cinétique de croissance en milieu LB/10 à l'obscurité et à la lumière en présence de QDs (a) CdSe(S)@MSA et (b) CdSe@MSA (illumination 1250 lux, [QDs = $2\mu\text{M}$], 2 répétitions par conditions). $T_{gO}(\text{CdSe(S)}) = 52$ et 51 min, $T_{gL}(\text{CdSe(S)}) = 51$ et 53 min $T_{gO}(\text{CdSe}) = 57$ et 56 min, $T_{gL}(\text{CdSe}) = 66$ et 65 min, avec : T_{gO} , temps de génération à l'obscurité et T_{gL} , temps de génération à la lumière.	189
Figure 74. Évolution de l'absorbance relevée à 560 nm (<i>i. e.</i> formation d' $\text{O}_2^{\bullet-}$) dans le cas de dispersions de QDs photo-activés (CdSe, en rouge, et CdSe(S), en noir) ou non (CdSe, en violet, et CdSe(S), en bleu) en conditions saturée en O_2 . L'auto-réduction de la sonde photo-activée est présentée en vert.	190
Figure 75. Évolution de l'absorbance relevée à 560 nm (<i>i. e.</i> formation d' $\text{O}_2^{\bullet-}$) dans le cas de dispersions de QDs CdSe (en noir) et CdSe(S) (en rouge) saturées en O_2 (ronds) ou en N_2 (carrés).	191
Figure 76. Évolution de l'intensité de fluorescence à 428 nm (<i>i. e.</i> formation d' $\text{OH}^{\bullet}$).	192
Figure 77. Réduction de la production de radicaux $\text{OH}^{\bullet}$ par les QDs CdSe après 30 minutes d'irradiation en présence de différentes concentrations en mannitol.	193
Figure 78. Cytogrammes présentant les interactions possibles entre <i>C. metallidurans</i> ou <i>E. coli</i> et les QDs CdSe@MSA et CdSe@MSA.	195
Figure 79. Réponse au stress oxydant induit par H_2O_2 en présence des QDs (a) CdSe@MSA et (b) CdSe(S)@MSA (Contrôle + : H_2O_2 ($5 \cdot 10^{-6}$ M); contrôle - : cellules seules).	197
Figure 80. Structure-Réactivité-Stabilité des QDs CdSe.	205

Annexe 1

Annexe 1. Recensement des études évaluant la toxicité de Quantum Dots de CdSe

L'annexe 1 présente un panel, que nous espérons représentatif, des différentes études menées sur la toxicité de QDs à cœur CdSe.

Matériel biologique	QDs (semi-conducteur et ligand)	Conditions d'expérience	Détection	Référence
Souris	CdSe/ZnS Peptides, PEG	Intraveineuse (1 µg/µL), 5 à 20 min d'exposition	Histologie ; localisation de points d'accumulation spécifiques par microscopie	Åkerman <i>et al.</i> (2002)
Cellules Vero	CdSe/ZnS MUA, SSA	2 heures d'exposition (0,24 mg/mL)	Suivi de la fluorescence des QDs <i>in vivo</i> et du maintien des cellules proches	Hanaki <i>et al.</i> (2003)
Cellules HeLa, souris, <i>Dictyostelium discoideum</i>	CdSe/ZnS DHLLA	45 à 60 min d'exposition (400-600 nM)	Observation du maintien de l'intégrité cellulaire par microscopie	Jaiswal <i>et al.</i> (2003)
Souris	CdSe/ZnS Micelles	Intraveineuse (20 nM)	Observation des animaux	Larson <i>et al.</i> (2003)
Souris	CdSe Polymères, PEG	Intraveineuse (50-500 pmol dans 50-200 µL), 1 à 3 heures d'exposition	Histologie des tissus, et observation par microscopie des tissus proches des QDs	Ballou <i>et al.</i> (2004)
Cellules HeLa	CdSe/ZnS Biotine, silane, STV, peptides, NLS	300 cellules / 100 mm, 2 heures d'exposition (1 à 100 nM)	Survie clonogénique	Chen <i>et al.</i> (2004)
Hépatocytes de rat	CdSe MAA, BSA, EGF	5.10 ⁵ cellules / 35 mm, 24 heures d'exposition (0,06 à 1 mg)	MTT *, microscopie : morphologie	Derfus <i>et al.</i> (2004)

Lymphoblastes humains	CdSe/ZnS MUA, cystéamine, thioglycérol	5.10 ⁴ cellules par puits, 12 heures d'exposition (0-2 µM)	MTT, évaluation de la mortalité par cytométrie en flux	Hoshino <i>et al.</i> (2004)
Cellules Vero, cellules HeLa, Hépatocytes humains	CdSe MUA, SSA	3.10 ⁴ cellules par puits, 24 heures d'exposition (0-4 mg/mL)	MTT, cytométrie en flux	Shiohara <i>et al.</i> (2004)
Cellules de mélanome	CdSe/ZnS TOPO, DHLA	5.10 ⁴ cellules par puits, 4 à 6 heures d'exposition (ND)	Microscopie : suivi des QDs et de l'intégrité cellulaire	Voura <i>et al.</i> (2004)
ADN	CdSe Biotine	0 à 60 minutes d'exposition aux UV ou à l'obscurité (ND)	Analyse par électrophorèse des coupures simple brin d'ADN	Green <i>et al.</i> (2005)
Fibroblastes, cellules cancéreuses, ovaires de hamster	CdSe, CdSe/ZnS MPA, acide mercaptocarbone	7.10 ⁴ cellules/mL, 18 à 48 heures d'exposition (2-10 µM)	DAPI **	Kirchner <i>et al.</i> (2005)
Carcinomes humains, cellules humaines	CdSe, CdSe/ZnS SiO ₂ , MAA, PA	2.10 ⁴ cellules/µL, 48 à 72 heures d'exposition (0-0,6 mM)	Alamar Blue ****	Selvan <i>et al.</i> (2005)
Carcinomes humains, cellules cancéreuses	CdSe PEG	22500 cellules par puit, 4 heures d'exposition (10-150 nM)	DAPI	Chang <i>et al.</i> (2006)
Carcinomes humains	CdSe/ZnS Peptide dérivé du virus HIV	7.10 ⁵ cellules par boîte de petri de 10 cm, 24 heures d'exposition (1,625 µg)	PCR, Cytométrie en flux (morphologie des colonies), microscopie : temps de rétention des QDs dans les cellules	Hsieh <i>et al.</i> (2006)
Fibroblastes humains	CdSe/ZnS PEG, Silane	48 heures d'exposition (8-80 nM)	Colorant de Hoechst *****	Zhang <i>et al.</i> (2006)
Cellules cancéreuses humaines	CdSe/ZnS MPA, Cystéine, NAC	1 heure d'exposition (10 µg/mL)	MTT	Cho <i>et al.</i> (2007)
Cellules	CdSe	6.10 ⁴ cellules par puit,	MTT	Guo <i>et al.</i>

cancéreuses humaines, souris	PLA, SDS, CTAB	12 à 72 heures d'exposition (10-400 ppm)		(2007)
ADN	CdSe MAA	5 µg/mL d'ADN, 110 min d'exposition ($3,6 \cdot 10^{-7}$ M)	Sonde à acides nucléiques Ru(biπ) ₂ dppx ²⁺ *** **	Liang <i>et al.</i> (2007)
Cellules embryonnaires humaines	CdSe/ZnS PAG, acide polyacrylique	$2 \cdot 10^4$ cellules/cm ² , 24 à 48 heures d'exposition (0.2-20 nM)	MTT	Ryma- Rasmussen <i>et al.</i> (2007)
Carcinomes hépatocellulaires humains	CdSe/ZnS TGA	$1 \cdot 10^4$ cellules par puit, 48 heures d'exposition ($1 \cdot 10^{-7}$ M)	MTT, Microscopie : interaction spécifique	Chen <i>et al.</i> (2008)
Cellules hépatiques porcines	CdSe/ZnS Lipides, PEG	$2,5 \cdot 10^5$ cellules/mL, 24 à 48 heures d'exposition (4-1000 nM)	MTT, microscopie : morphologie et internalisation	Stern <i>et al.</i> (2008)
Ovocytes de souris	CdSe, CdSe/ZnS MAA	24 heures d'exposition (0-500 nM)	Microscopie : morphologie et internalisation	Hsieh <i>et al.</i> (2009)
<i>Daphnia magna</i>	CdSe, CdSe/ZnS MUA	12 à 36 heures d'exposition (15 nM)	Imagerie synchrotron 2D et 3D : agregation	Jackson <i>et al.</i> (2009)
<i>Daphnia magna</i>	CdSe/ZnSe MPA, TOPO- gomme arabique	96 heures d'exposition (2,5 mg/L) à l'obscurité, sous fluorescence blanche, sous UV-B ou sous lumière naturelle	IC50, microscopie : interaction (particules chargées)	Lee <i>et al.</i> (2009)
Cellules HeLa	CdSe/CdS, CdSe/CdS/ZnS Biotine, acide folique	1 heure d'incubation (50 µM)	MTT, microscopie : morphologie)	Quarta <i>et al.</i> (2009)
<i>Escherichia coli</i>	CdSe MUA	$1 \cdot 10^{-7}$ à $1 \cdot 10^{-9}$ M	Biosenseurs à luminescence : dommages de l'ADN, stress oxydant, disponibilité des acides gras	Senevirathna <i>et al.</i> (2009)

Fibroblastes humains	CdSe, CdSe/ZnS Polymères	6.10 ³ cellules par puit, 4 à 24 heures d'exposition (0-200 nM)	Spectroscopie	Dua et al. (2010)
Rats	CdSe/ZnS Divers amines et acides carboxyliques	Exposition à court terme (7 jours) et à long terme (80 jours) (2,5-45 nM)	Biodistribution des QDs, survie des animaux, poids des animaux, analyses sanguines	Hauck <i>et al.</i> (2010)
<i>Daphnia magna</i>	CdSe/ZnSe MPA, TOPO- Gomme arabique	48 heures d'exposition (0-95 µg/L)	PCR : détection du cadmium	Kim <i>et al.</i> (2010)
Cellules ovariennes de hamster	CdSe/ZnS Cystéamine conjuguée par un acide gluconique	Intraveineuse (ND)	Biodistribution des QDs : analyse <i>ex</i> <i>vivo</i> des tissus par microscopie	Lee <i>et al.</i> (2010)
<i>Daphnia magna</i>	CdSe/ZnS Polymères amphiphiles	24 heures d'exposition (25,6 nM)	Microscopie : Biodistribution des QDs	Lewinski <i>et al.</i> (2010)
Fibroblastes provenant d'embryons de souris	CdSe/ZnSe MPA, Gomme arabique	4.10 ⁴ cellules par essai, 24 heures d'exposition (<1 nM)	Iodure de propidium *****, Microscopie : morphologie, détection du Cd ²⁺ et des ROS intracellulaires	Mahto <i>et al.</i> (2010)
<i>Daphnia magna</i>	CdSe/ZnS PEO, MUA	48 heures d'exposition (4,6.10 ¹³ -1,8.10 ¹⁶ particules/L)	IC50	Pace <i>et al.</i> (2010)
<i>Medicago sativa</i>	CdSe/ZnS MPA	48 heures d'exposition (10 nM)	Microscopie : détection des ROS intracellulaires, morphologie, viabilité cellulaire	Santos <i>et al.</i> (2010)
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	CdSe MAA	0,5 à 4 heures d'exposition (UV ou non)	Extinction de luminescence (IC50)	Wang <i>et al.</i> (2010)
Rats	CdSe	Intraveineuse, 15 jours d'exposition (1-5 mg,	Analyse <i>ex vivo</i> des tissus :	Arslan <i>et al.</i>

	Acide thioglycolique	exposés ou non aux UV)	accumulation de Cd ²⁺	(2011)
Macrophages	CdSe/CdS/ZnS Doxorubicine	2.10 ⁵ cellules par essai, 1 à 24 heures d'exposition (ND)	Microscopie : morphologie et accumulation	Chakravarthy <i>et al.</i> (2011)
Souris	CdSe, Co-CdSe MAA	Intraveineuse (5-2000 mg/kg), 2 semaines de suivi	survie des animaux, poids des animaux, analyse par électrophorèse (fragmentation de l'ADN), Sonde à stress oxydant	Khalil <i>et al.</i> (2011)
Souris	CdSe Pas de stabilisant	Intraveineuse (5-20 nM), 48 heures d'exposition	Cytométrie en flux, microscopie : morphologie, détection des ROS	Liu <i>et al.</i> (2011)
Cellules cancéreuses humaines	CdSe SiO ₂	24 à 72 heures d'exposition (250-1000 nM)	MTT, microscopie (morphologie), détection des niveaux de lactose dehydrogenase	Vibin <i>et al.</i> (2011)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CdSe (ND)	2 à 24 heures d'exposition (ND)	Cultures cellulaires : temps de génération, microscopie (morphologie, bioaccumulation)	Werlin <i>et al.</i> (2011)
Cellules épidermique humaines	CdSe/ZnS OPA	24 heures d'exposition (50-900 nM)	MTT, cytométrie en flux	Zheng <i>et al.</i> (2011)
<i>Caenorhabditis elegans</i> <i>Escherichia coli</i>	CdSe, CdSe/ZnS Copolymères amphiphiles	24 heures d'exposition (10-100 mg/L)	Boîte de Pétri : comptage des colonies, Microscopie (internalisation)	Contreras <i>et al.</i> (2012)
ADN, cellules sanguine	CdSe Cystéine	Dispersions colloïdales à 200 µg/mL	Électrophorèse, microscopie (agrégation des cellules)	Dunpall <i>et al.</i> (2012)
<i>Leptocheirus plumulosus</i>	CdSe/ZnS Polymères (acide	96 heures d'exposition (3,6 mg/L éq. Cd ²⁺)	Microscopie : comptage (immobile),	Jackson <i>et al.</i> (2012)

	carboxylique)		morphologie, accumulation	
<i>Vibrio fischeri</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	CdSe/ZnS HDA/TOPO	0 à 30 minutes d'exposition (0,5 mg/L)	Extinction de la bioluminescence (IC 50), test de Ames	Lopes <i>et al.</i> (2012)
Cellules pulmonaires humaines	CdSe MPA, cystéine, MUA, AUT	1,5.10 ⁴ cellules par puits, 24 heures d'exposition (0,5-160 µg/mL)	Analyse de l'activité de l'enzyme lactose dehydrogenase, test ELISA (fragmentation de l'ADN) microscope (morphologie)	Nagy <i>et al.</i> (2012)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	CdSe, CdSe/ZnS Polymères	5 heures à 3 jours d'exposition (20-500 nM éq Cd)	Absorbance 680 nm (biomasse), microscopie (comptage), fluorescence (Détection des ROS)	Morelli <i>et al.</i> (2012)
Cellules hépatiques humaines	CdSe/ZnS Polymères amphiphiles	24 à 72 heures d'exposition (5-50 nM)	MTT, PCR (stress oxydant), microscopie (morphologie)	Smith <i>et al.</i> (2012)
<i>Tetrahymena thermophila</i>	CdSe, CdSe/ZnS MAA	Croissance à 28°C sur 1 semaine (0-10 µM)	Croissance cellulaire : estimation de la biomasse avec un haematocytomètre	Xiao <i>et al.</i> (2012)
Albumine de sérum de bœuf (BSA)	CdSe/ZnS MAA, Cystéamine	2.10 ⁻⁶ M de BSA, excitation à 280 nm (0-3.10 ⁻⁷ M)	Extinction de la fluorescence de BSA	Xiao <i>et al.</i> (2012)
Primates	CdSe/CdS/ZnS Micelle phospholipidiques	Intraveineuse (25 mg/kg), suivi sur 90 jours	Analyses sanguines des divers indicateurs du système immunitaire, analyse histologique des tissus (microscopie)	Ye <i>et al.</i> (2012)
Albumine de sérum de bœuf	CdSeS MPA	1.10 ⁻⁶ M de BSA, excitation à 280 nm	Extinction de la fluorescence de	Zhan <i>et al.</i> (2012)

		(0-6.10 ⁻⁶ M)	BSA	
Embryons de poissons zèbres	CdSe MPA	6 à 24 heures d'exposition (500 µg/L)	Microscopie : comptage, morphologie : défauts de vascularisation	Zhang <i>et al.</i> (2012)
Cellules ovariennes de hamster	CdSe/ZnS Lipides	Exposition variable selon les test (0,002-0,5 µg/mL)	Microscopie (comptage colorimétrique WST-1), test de Ames, dommages de l'ADN	Aye <i>et al.</i> (2013)
Drosophiles	CdSe/ZnS MPA	Non trouvé (abstract)	Culture cellulaire et histologie des différents tissus (microscopie)	Brunetti <i>et al.</i> (2013)
Champignons	CdSe/ZnS (ND)	500 µL de suspension à 5 mg/mL par boîte de Petri de 7cm de diamètre. Suivi sur 8 jours.	Mesure des diamètres des colonies (analyse statistique)	Galindo <i>et al.</i> (2013)
Rats	CdSe/ZnS Streptavidine	Intraveineuse (0,5 mL entre 0,5 et 10 nM). Suivi sur 70 jours.	MTT, suivi de l'activité enzymatique	Gao <i>et al.</i> (2013)
Souris	CdSe/CdS/ZnS Micelle de phospholipides	Exposition de 16 semaines à des fortes concentrations (50 mg/kg)	Biodistribution des QDs, survie des animaux, poids des animaux, analyses sanguines	Liu <i>et al.</i> (2013)
Souris	CdSe/ZnS Polymères	Injection intrapéritonéale (1,5 µg/gm de solutions 5nM)	Cytométrie en flux, PCR (inflammation)	McConnachie <i>et al.</i> (2013)
Souris	CdSe ME	Intraveineuse (10-40 mg/kg), suivi à 1 mois	Histologie des tissus : microscopie (morphologie)	Valipoor <i>et al.</i> (2013)

Description de protocole évoqué dans le tableau

* : MTT : Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium). La succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives réduit le tetrazolium en formazan qui

forme un précipité de couleur violette dans la mitochondrie. Après incubation et éclatement des cellules et de leurs mitochondries, le précipité de formazan est dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et est dosé par simple lecture de la densité à 550 nm par spectroscopie, pour obtenir la quantité de cellules vivantes et actives métaboliquement.

**** DAPI :** 4',6'-diamidino-2-phénylindole. C'est une molécule qui fluoresce entre 450 et 490 nm (exc : 350 nm) et capable de se lier fortement aux bases adénine et thymine de l'ADN, ce qui permet de détecter et quantifier l'ADN grâce à un microscope à épifluorescence ou par cytométrie en flux.

***** Alamar Blue :** 7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide, résaruzine. C'est un colorant bleu, faiblement fluorescent, qui vire à la résorufine rose émettant une forte fluorescence rouge de manière proportionnelle à la respiration cellulaire. Il est utilisé comme un indicateur redox de la viabilité cellulaire.

****** Colorant de Hoechst :** Les sondes de Hoechst sont une famille de bis-benzinides fluorescents dans le bleu qui permettent de détecter l'ADN du fait de leurs capacités à se fixer aux séquences riches en adénine et en thymine.

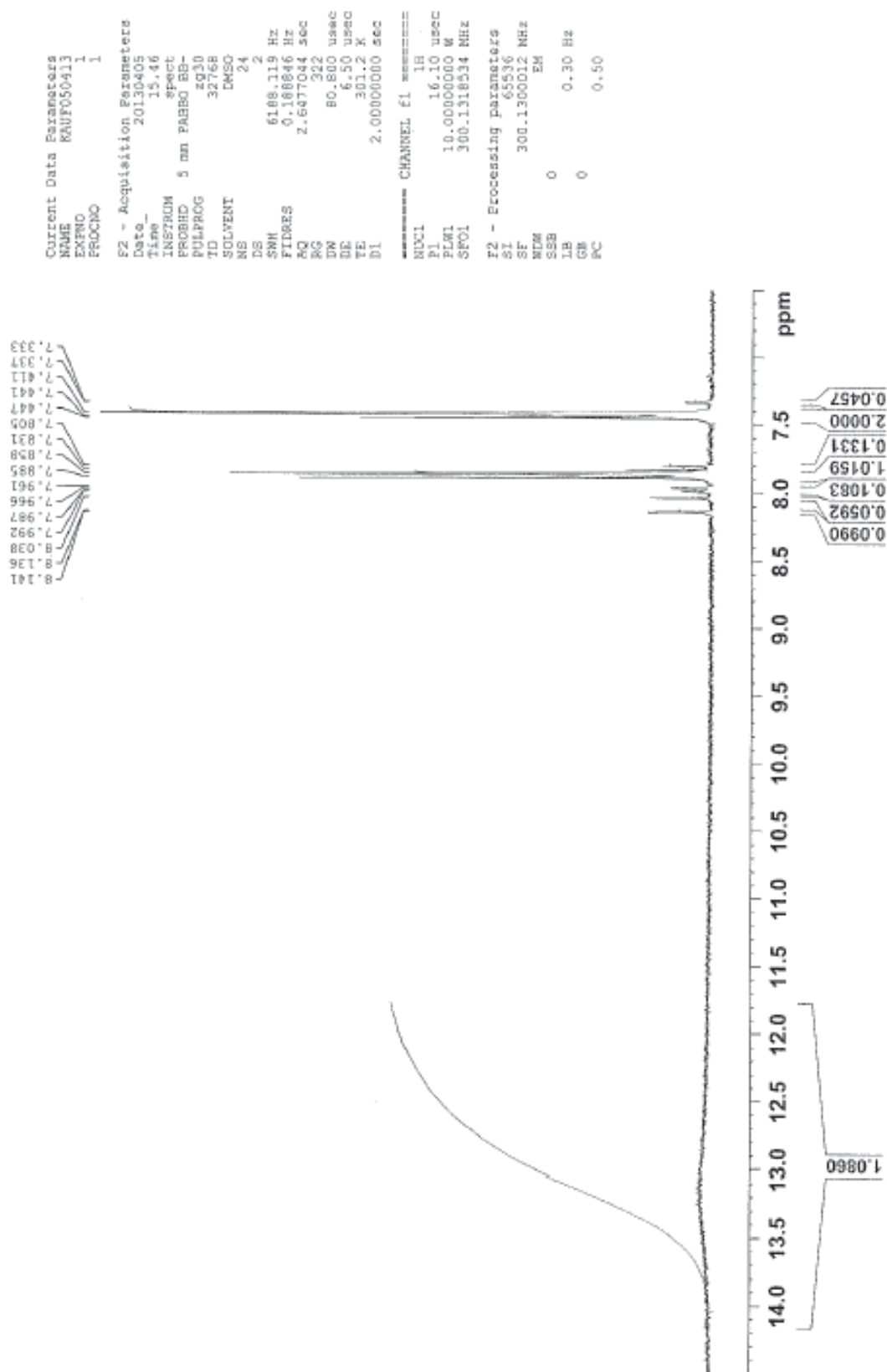
******* $\text{Ru}(\text{bip})_2\text{dppx}^{2+}$:** c'est une sonde à acides nucléiques qui émet une forte fluorescence intense et stable pendant au moins trois heures en présence de l'ADN double brin, suite à une forte complexation. Ainsi une diminution de l'intensité de fluorescence de la sonde est observée en présence d'ADN endommagé.

******* Iodure de propidium :** C'est un agent d'intercalation utilisé comme marqueur des acides nucléiques, sans spécificité particulière, mais qui a par contre l'inconvénient de pouvoir aussi se lier à l'ARN. L'usage de nucléases est donc nécessaire afin d'éviter tous faux positifs. Sa lipophobie fait qu'il ne peut pénétrer une cellule viable et se lier à l'ADN qu'elle contient. Il permet donc de détecter les noyaux des cellules ayant perdu leur viabilité par détection d'une fluorescence rouge.

Annexe 2

Annexe 2. Spectre RMN du 2-hydroxytéréphthalate.

KAUFFER FAKITA DMSO 300MHz 300K 05/04/2013
Proton
Spectre 13/1088



Annexe 3

Incidence of the surface chemistries on the stability, the ROS production and the toxicity of CdSe quantum dots

Florence-Anaïs Kauffer ^{a,b}, Christophe Merlin ^b, Lavinia Balan ^c, Raphaël Schneider ^{a,*}

^a *Université de Lorraine, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), UMR 7274, CNRS, 1 rue Grandville, BP 20451, 54001 Nancy Cedex, France*

^b *Université de Lorraine, Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), UMR 7564, CNRS, 15 Avenue du Charmois, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.*

^c *Institut de Science des Matériaux de Mulhouse (IS2M), LRC 7228, 15 rue Jean Starcky, 68093 Mulhouse, France.*

Corresponding author. Tel : +33 3 83 17 50 53.

E-mail address: raphael.schneider@univ-lorraine.fr

ABSTRACT

Mercaptosuccinic acid-capped CdSe and alloyed CdSe(S) QDs were prepared in aqueous solution at 100 and 170°C, respectively. These dots were characterized by transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD), and UV-visible and photoluminescence spectroscopies. The dots were found to be of similar size (ca. 2 nm) but differ in their crystallinity, surface chemistry and optical properties (surface trap site emission for CdSe vs. band edge emission for CdSe(S)). The photostability of the QDs was found to correlate with their ability to produce reactive oxygen species (ROS) upon light activation. CdSe QDs produce hydroxyl radicals immediately after irradiation due to their modest

photostability, while CdSe(S) QDs start to generate the hydroxyl radicals only once they start to be bleached (ca. 30 min). Cytotoxicity experiments conducted on *Escherichia coli* cells revealed that CdSe QDs were the more toxic despite being the least loaded in cadmium. In addition, consistent with ROS assays, the cytotoxicity of the CdSe QDs appeared light-dependent and is in accordance with a light-dependent oxidative stress observed with an *oxyR*-based whole cell biosensor. Our results demonstrate the crucial role played by nanoparticles synthesis process on their PL properties, on their stability and their toxicity towards biological material.

Keywords: CdSe quantum dots; aqueous synthesis; photostability; reactive oxygen species; cytotoxicity.

.

1. Introduction

Over the last fifteen years, quantum dots (QDs) have been increasingly used as biological imaging and labelling probes due to their unique optical properties, including broad absorption with narrow photoluminescence (PL) spectra, low photobleaching, high quantum yield, tunable emission from visible to infrared wavelengths, and better resistance to chemical degradation in comparison with organic fluorophores [1-4]. However, it has been discovered early in their development that the use of these nanomaterials poses serious concerns about toxicity and safety, especially because the most popular and well-studied QDs like CdSe or CdTe contain highly toxic and carcinogenic elements. This raised an issue in the short term regarding the integrity of the studied biological material labelled using the dots, but also in the long term with the management of waste material. Reported studies utilizing CdSe core QDs have presented conflicting results. Early studies ascribed the toxicity to metal ions release in biological systems [5,6], with subsequent generation of reactive oxygen species (ROS) [7,8]. This cytotoxicity could strongly be reduced by capping CdSe cores with a ZnS shell that prevents QD breakdown in solution [9,10], but there are concerns about cap loss and the subsequent toxicity of bare QDs and dissolved cadmium [5,11]. Other studies demonstrated that the capping ligand, and therefore the surface charge, could determine the cytotoxicity of QDs with positively-charged QDs being more toxic than negative ones [12-14]. Some reports also highlighted the roles played by surface properties and/or the very small size of these nanocrystals on QDs induced bio-effects [15,16]. In several instances, Cd-based QDs have been presented as more toxic to cells than their equivalent content in Cd^{2+} salts, implying that metal leaking is not the sole source of toxicity [16,17]. With this respect, another key factor affecting QDs-induced toxicity is their ability to generate ROS after light activation. Upon photoexcitation, the electrons can be scavenged by the adsorbed molecular oxygen to yield the superoxide radical anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), whereas the holes oxidize chemisorbed water to generate hydroxyl radicals ($\text{OH}^\bullet$). In acidic media, the superoxide radical anion is protonated yielding the hydroperoxy radical ($\text{HO}_2^\bullet$), and ultimately hydrogen peroxide. The nature/quality of the QD surface determines the number of trap states [18], which in turn affects electron-hole recombination and thus the charge transfer between photoexcited electrons and holes and adsorbed molecules. Bare CdSe [19] and CdTe [20] QDs, and even core/shell CdSe/ZnS QDs [21], are known to produce ROS under light irradiation but there are huge structural differences between these dots, leading to different level of reactivity, and it is therefore difficult to establish a general trend on the ability to produce ROS.

In fact, both the released Cd^{2+} and the QDs reactivity, which depend on their physicochemical properties such as size, core composition, surface chemistry, and redox properties, may influence the QD-biological interactions individually or collectively, thereby necessitating a multimodal approach to evaluate QDs toxicity. At this point, it should be noted that because most toxicity studies have been carried out independently, each one under specific experimental conditions, any comparison to identify a particular relationship between a QD structural features and a particular trend in its toxicity is quite impossible. Thus, in the absence of normalized tests adapted to QD toxicity, the influence of QD structures on their own toxicity would only be elucidated in comparative studies run simultaneously.

High quality CdSe QDs can be synthesized via the hot-injection approach conducted in coordinating solvents/ligands such as tri-n-octylphosphine (TOP), tri-n-octylphosphine oxide (TOPO), or oleic acid (OA) [22-24]. However, in order to meet the requirement of bioapplications, such hydrophobic QDs need to be transferred from the organic phase to aqueous solution. The exchange of the hydrophobic TOP, TOPO, or OA ligands with hydrophilic ones such as thioacids, and subsequent transfer of QDs from oil to aqueous solution can significantly reduce the PL quantum yield (PL QY) and the stability of the nanocrystals [25]. Direct synthesis of hydrophilic thiol-capped QDs in water is a valuable alternative to the organic phase synthesis and offers the following advantages: (1) it uses less toxic reagents, (2) it is cheaper and simpler, (3) it uses low temperatures (100-150°C) to obtain QDs with size-tunable fluorescence, and (4) the surface functionalization with water-soluble ligand occurs during the synthesis. However, the direct synthesis of QDs in aqueous phase generally affords QDs with modest PL QYs (less than 10%) [26]. In recent years, much effort has therefore been devoted to improve the optical properties of aqueous-phase prepared QDs. We recently developed hydrothermal methods that enable the production of highly fluorescent and water-dispersible CdS [27], CdSe [28], and CdTe [29] QDs and this strategy was successfully extended to core/shell heterostructures like CdSe/ZnO or CdTe/CdS/ZnO.

This work describes the aqueous-phase synthesis, the characterization and the photostability of mercaptosuccinic acid (MSA)-capped CdSe and ternary alloyed CdSe(S) QDs. The ability of these dots to generate ROS in aqueous solution was investigated and correlated with cytotoxicity studies on bacteria cells performed either in the dark or under visible light irradiation. The main differences between the two investigated types of QDs are their chemical nature (CdSe vs CdSe(S)) and their surface chemistries, while other properties that may affect cellular responses like surface ligand, charge and size are kept almost constant,

and should therefore provide a direct comparison of the impact of the QD core material on toxicity towards bacteria cells.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis of CdSe QDs

The full list of chemicals used in this work and the preparation of NaHSe [30] is described in the supplementary information.

The CdSe(S)@MSA and CdSe@MSA QDs were prepared by reaction between CdCl₂·2.5H₂O and NaHSe in the presence of MSA as stabilizer, using a protocol inspired from Chen *et al.* [31]. Briefly, 15.4 mg of CdCl₂·2.5H₂O (67 μmol) and 10.5 mg of MSA (70 μmol) were dissolved in 39 mL and 26 mL of water, respectively. Both solutions were mixed and the pH was adjusted to 10 with 0.1 M NaOH. After 30 min of Ar-degassing, 320 μL of the 0.05 M NaHSe solution were injected in the precursor solution. The solution turned yellow immediately. CdSe@MSA QDs were obtained by refluxing the solution for 5 min. CdSe(S)@MSA QDs were prepared by heating the solution for 20 min at 100°C before transfer into a Teflon-lined stainless steel autoclave at 170°C for 1 h. In both case, reaction mixtures were cooled down, one-tenth concentrated using a rotary evaporator, and QDs were precipitated with *i*-PrOH. QDs were then collected by centrifugation (4000 rpm), washed 3 times with *i*-PrOH, and dried at room temperature under dynamic vacuum.

2.2. QDs characterization

All the optical measurements were performed at room temperature (20 ± 2°C). Absorption spectra were recorded on a Thermo Scientific Evolution 220 UV-Visible spectrophotometer. Photoluminescence (PL) spectra were recorded on a Horiba Fluorolog 3 F222 Jobin Yvon spectrofluorimeter using a 450 W xenon lamp.

The Quantum Yield (QY) values were determined from the following equation: $QY_{\text{sample}} = (F_{\text{sample}}/F_{\text{ref}})(A_{\text{ref}}/A_{\text{sample}})(n_{\text{sample}}^2/n_{\text{ref}}^2)(QY_{\text{ref}})$, where *F*, *A* and *n* are the measured fluorescence, the absorbance at the excitation wavelength, and the refractive index of the solvent, respectively. Fluorescence emission spectra were spectrally corrected and the PL QYs were determined relative to Rose Bengal in ethanol (QY = 11%) [32].

Nanoparticles concentrations were determined using Beer-Lambert formula. The concentration is linked to the molar extinction coefficient (ϵ), determined as described by Yu *et al.* [33]. Photostability of QDs colloidal water-dispersion was evaluated by irradiating 2 mL of 5 μ M QDs dispersions in water with a Hg-Xe lamp ($P = 350$ mW).

TEM images were taken by placing a droplet of the QDs colloidal water-dispersion onto a carbon film deposited on a copper grid. Samples were studied using a Philips CM20 instrument with a LaB6 cathode operating at 200 kV. Diameters of nanoparticles were estimated by counting 100 nanoparticles. X-ray diffraction (XRD) analyses were conducted on a Panalytical X'pert Pro MPD diffractometer by using a Cu K_{α} radiation. Dynamic light scattering (DLS) and zeta potential measurements were performed at 25°C using a Zetasizer NanoZS ZEN3600 Malvern instrument equipped with a thermostated cell compartment and using an He-Ne laser (4×10^{-3} W) at a wavelength of 633 nm. The QDs aqueous solutions were filtered through Millipore membranes (0.2 μ m pore size). The hydrodynamic diameter (d_H) and the size distribution of each aqueous dispersion of nanoparticles were obtained by using the Stokes-Einstein relation. A VARIAN 720-ES [Inductively Coupled Plasma](#)-Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) was used for multielemental analyses.

2.3. Cytotoxicity assays

Growth inhibition tests were carried out on *Escherichia coli* MG1655 in one-tenth diluted LB medium (1/10th LB) at 30°C under agitation (160 rpm) in 600 mL beakers filled with 100 mL of medium. First, overnight cultures of *E. coli* MG1655 were one-hundredth diluted in QDs-free 1/10th LB medium and allow growing until mid-log phase ($OD_{600\text{ nm}} = 0.1$). Cultures were then one-fourth diluted in pre-warmed 1/10th LB medium supplemented with the desired concentration of QDs and the $OD_{600\text{ nm}}$ was measured at intervals. A growth control in the same medium without QDs supplement was always performed in parallel, while possible absorbance linked to the QDs was considered by using controls containing bacteria-free medium with QDs. For each growth condition, the generation times of exponential growing cultures (T_g) were calculated from the slope of an exponential trend curve. For the experiments carried out under illumination, cultures were exposed to 1250 lux delivered by a full spectrum neon lighting (T8 Solar Color JBL), while for cultures in the dark, flasks were wrapped in aluminium foil.

2.5. Quantification of bioavailable Cd^{2+} produced by CdSe and CdSe(S) QDs

Bioavailable Cd^{2+} resulting from the QDs dissolution was quantified using the whole cell biosensor *Cupriavidus metallidurans* AE1433, a genetically engineered bacteria emitting light when sensing bioavailable Cd^{2+} [37]. [The full synthetic protocol used is described in the supplementary information.](#) For each series, luminescence induction factor (IF) were plotted against CdCl_2 (standard curve) or QD (test) concentrations, where equations were obtained from linear regressions of the non-toxic part of the curve: equation #1 (CdCl_2 standard curve): $\text{IF} = a [\text{Cd}^{2+}] + 1$ and equation #2 (QD test curve): $\text{IF} = b [\text{QD}] + 1$, with “a” and “b” corresponding to the slopes of both curves.

Thus, for a same IF, $a [\text{Cd}^{2+}] + 1 = b [\text{QD}] + 1 \Leftrightarrow [\text{Cd}^{2+}]/[\text{QD}] = b/a$, and knowing the estimated amount of Cd atoms per QD (75 for CdSe@MSA and 184 for CdSe(S)@MSA, respectively) it is then possible to calculate the relative amount of Cd that leaked from the QDs.

2.6. ROS evaluation

2.6.1. Chemical detection

2.6.1.1. NBT assays

The production of $\text{O}_2^{\bullet-}$ radicals by photoactivated QDs was estimated using the NBT assay, adapted from Anas *et al.* [34]. NBT assay is based on spectrophotometric measurements quantifying the reduction of yellowish NBT into purple formazan derivatives. This reduction into mono- and diformazan derivatives results in an increase of absorbance between 450 and 700 nm. Typically, a solution of QDs (2.5 μM) and NBT (200 μM) was prepared in a 1:1 water/DMSO mixture (2 mL) and was irradiated by a Hg-Xe lamp ($P = 50 \text{ mW}$) for various times. Then, the absorbance spectra were recorded to quantify formazan derivatives formed. Reference samples were (i) NBT irradiated in water/DMSO in the absence of QDs and (ii) NBT + QDs in water/DMSO without light activation.

2.6.1.2. DST assays

The production of hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) by photoactivated QDs was estimated using disodium terephthalate (DST), which turns into fluorescent hydroxyterephthalate (HTA; excitation: 300 nm; emission: 428 nm) upon reaction with $\cdot\text{OH}$ radicals. Briefly, 1 mL of QDs colloidal water dispersion (10 μM , 10 nmol) was mixed with 1 mL of DST (1 mM in water, 1 μmol) before being irradiated ($P = 350 \text{ mW}$) for various times. The mixture was treated with 1 mL of 1M NaOH and incubated for 50 min at r.t. before filtration on 0.2 μm polyvinylidene fluoride Acrodisc Syringe Filter to avoid disturbance generated by precipitates. The PL spectra were recorded to quantify 2-OH-DST formed. A blank, containing water instead of QDs, was also recorded and subtracted to the previous PL spectra in order to eliminate the auto fluorescence of DST.

A 2-OH-DST calibration curve was also constructed in order to convert fluorescence intensity measured in a molar concentration of hydroxyl radicals. Calculations were made considering a 1:1 stoichiometry for the reaction between DST and $\cdot\text{OH}$. Indeed, the transition from DST to 2-OH-DST, studied by Fang *et al.* [35], was characterized by a 35% yield under our conditions. 2-OH-DST used as reference was synthesized as previously described by Mason *et al.* [36].

2.6.2. Detection of QD-generated oxidative stress

H_2O_2 -generated oxidative stress was evaluated using the biosensor *E. coli* MG1655(pUA66::P_{oxyR}) resulting from the fusion of the H_2O_2 -regulated oxyR promoter with the *gfp* reporter gene [38]. [A full description of the use of the biosensor is provided in the supplementary information.](#)

3. Results and discussion

3.1. Synthesis, size, shape, crystal structure and PL properties of CdSe and CdSe(S) nanocrystals

MSA-capped CdSe and CdSe(S) QDs were prepared by reaction of Cd-MSA complexes with NaHSe at pH = 10. Cadmium monomers react with selenide ions to form a CdSe core at low temperature (100°C). At high temperature and under pressure (170°C, hydrothermal synthesis), the excess cadmium monomers react with sulfide ions released from MSA to form

CdS which deposits onto the surface of CdSe resulting in alloyed CdSe(S) QDs (Fig.1) [28]. The XRD patterns of CdSe@MSA and CdSe(S)@MPA QDs prepared under these reaction conditions are shown in Fig. 2, together with those of bulk CdSe and CdS for reference. Broadening of the diffraction peaks indicates the small size of the obtained nanocrystals. For CdSe QDs, the diffraction features appearing at 25.98° and 43.70° correspond to the (111) and (220) planes for cubic CdSe (JCPDS No 19.191). For CdSe(S) QDs, a third peak corresponding to the (311) plane appears at 50.76° , indicating the higher crystallinity of nanocrystals produced, and (111) and (220) diffraction peaks shift to the diffraction of large Bragg angles, which is indicative of a decrease in the lattice parameters. This originates from an increase in S content into the CdSe lattice and shows the formation of alloyed CdSe(S) QDs under hydrothermal conditions.

Fig. 3a and 3d show the typical TEM images of CdSe and CdSe(S) QDs, respectively. QDs exhibit good monodispersity and nearly spherical/ellipsoidal shape with a narrow size distribution (Fig. 3c and f). The average crystalline sizes of CdSe and CdSe(S) QDs were estimated to be 1.8 ± 0.2 and 2.7 ± 0.3 nm, respectively. The selected area electron diffraction (SAED, Fig. 3b and e) clearly gives three diffraction rings of (111), (220) and (311) planes from inner to the outer, which confirm the cubic phase CdSe and symmetry spatial group $F43m$. The average hydrodynamic sizes determined from DLS data were respectively of 4.3 ± 0.7 and 4.5 ± 0.8 nm for MSA-stabilized CdSe and CdSe(S) QDs, showing that the nanoparticles dispersed well in water. For both particles, the hydrodynamic diameters were larger than the diameters of the inorganic cores due to the solvation layer around the QDs in the buffer solution. The electrical potential, referred to as the zeta ζ potential, which controls the colloidal stability and interparticle interactions, was also measured. At pH = 7.0, the ζ values measured for CdSe@MSA (-41 ± 5 mV) and CdSe(S)@MSA (-60 ± 5 mV) QDs confirmed the presence of negative charges on the surface of QDs, due to the carboxylate end group of the MSA ligand.

Fig. 4 shows UV-vis absorption and PL spectra of CdSe and CdSe(S) QDs prepared at 100 and 170°C and after growth times of 5 min and 1 h, respectively. The sharp excitonic absorption peaks located at 440 and 528 nm for CdSe and CdSe(S), respectively, indicate that the particles size and shape are nearly uniform, which is in good agreement with Fig. 3. For CdSe@MSA nanocrystals, no excitonic PL emission was observed and the dots exhibited only trap states emission centered at 612 nm (Fig. 4a). The prepared CdSe(S)@MSA QDs exhibit higher spectral quality as compared to that of CdSe QDs. The PL emission is sharp and symmetric, and the full-width at half-maximum (fwhm) was less than 50 nm (Fig. 4b).

This spectral feature can be ascribed to the high crystallinity of CdSe(S) QDs. It is worth to mention that the low energy trap state luminescence peak was also observed during the preparation of CdSe(S) after short reaction times (30 min), but this peak became gradually weaker upon extending reaction time and finally disappeared after 1 h reaction. This can be explained by the alloying and the growth of the CdS shell which can effectively reduce the non-radiative trap and thus increase the pure band edge emission. Finally, PL QYs of CdSe and CdSe(S) QDs were found to be 14 and 22 %, respectively.

3.2. Photostability of CdSe@MSA and CdSe(S)@MSA

Besides the PL QY enhancement, the alloying also leads to improvement in photostability. Fig. 5 shows the time-course curves of absorption and PL intensity of CdSe and CdSe(S) QDs under a continuous excitation with a Hg-Xe lamp ($P = 350$ mW) for 1.5 h. The irradiation of CdSe QDs capped by thioacids like MSA is well-known to promote oxidation of unsaturated Se atoms. In the meanwhile, the thioacid is oxidized into disulfide and detaches from QD surface, resulting in photobleaching and aggregation of QDs [28,29,40,41]. For both QDs, the PL intensity increased the first minutes of irradiation (10 min for CdSe and 30 min for CdSe(S)) because surface traps were gradually eliminated by photocorrosion which generates core/shell CdSe/CdS or CdSe(S)/CdS QDs (Fig. 5b and d). After 20 min of irradiation, the PL intensity of CdSe QDs returned to its initial value, then dropped rapidly, and was reduced to ca. 20% after 30 min, and finally disappeared after 1 h. As can also be observed on absorption spectra, the decomposition/detachment of the MSA ligand reduces QDs dispersibility in water, and leads to aggregation and precipitation of the nanocrystals. Alloyed CdSe(S) QDs possess much better performance under the same experimental conditions. Notably, there was nearly no photobleaching/aggregation observed for these dots until 45 min of irradiation. Aggregates appeared in solution only after 1 h of irradiation and the PL intensity gradually decreased (65%) and ultimately went down to ca. 25% of the original after 1.5 h.

3.3. Cytotoxicity studies

3.3.1. Cadmium releasable by CdSe@MSA and CdSe(S)@MSA QDs

The toxicity of Cd-based QDs has often been attributed, at least partially, to the release of toxic Cd^{2+} ions [5,6]. Bioavailable Cd^{2+} ions released from CdSe@MSA and CdSe(S)@MSA

QDs were quantified using the whole cell biosensor AE1433, for which a bioluminescence is specifically induced by intracellular Cd^{2+} ions. The recombinant *Cupriavidus metallidurans* AE1433 contains the *luxCDABE* bioluminescent genes downstream of a Cd^{2+} -responding promoter. The response of the biosensor to bioavailable Cd^{2+} was expressed as increased induction (induction factor) of luminescence compared to the background values without metal. Cd^{2+} from CdCl_2 was considered 100% bioavailable and used as standards (Fig. 6). As shown on Fig. 6a, the biosensor provided a linear response for Cd^{2+} concentrations ranging from 0 to 2000 nM, indicating its usability for the corresponding range of induction factors (IF from 1 to 10). Exposure of AE1433 to known concentrations of CdSe@MSA and CdSe(S)@MSA QDs, estimated using UV-vis absorption spectra [33], provided linear responses the biosensor until 5 and 10 nM of nanoparticles, respectively (Fig. 6b and 6c). Calculation made within this range of QD concentrations indicates a surprisingly high leakage of Cd^{2+} , going beyond the theoretical complete dissolution of the QD, with an average of $110 \pm 10\%$ and $123 \pm 9\%$ (3 repeats each) of the estimated Cd content for QD CdSe@MSA and CdSe(S)@MSA QDs, respectively. On the other hand, ICP-MS analyses carried out on 5 μM QD suspensions confirmed that both QDs dispersions contained more Cd than anticipated, with a 27% excess for CdSe@MSA (i.e. 104 μM of Cd in addition to the 375 μM expected) and a 66% excess for CdSe(S)@MSA (i.e. 612 μM of Cd in addition to the 920 μM expected). Although it does not fully explain the high level of dissolved Cd^{2+} ions observed while carrying the biosensing essays, this suggests that the metal released after dispersion does not solely come from the nanoparticles dissolution, but may also originate from Cd-MSA complexes adsorbed at the surface of the dots [42] and co-purified with the QDs, thus rendering more complex our current perception of QDs toxicity. It also shows that the CdSe QDs dispersion carries ca. 3 times less cadmium than CdSe(S) one, which should be put in perspective while discussing the toxicity of these dots.

3.3.2. Superoxide radical production by CdSe@MSA and CdSe(S)@MSA QDs

The production of superoxide $\text{O}_2^{\bullet-}$ radicals by CdSe@MSA and CdSe(S)@MSA QDs was evaluated with a scavenging assay based on their ability to reduce nitroblue tetrazolium chloride (NBT) in a 1:1 water/DMSO mixture into dark blue formazan derivatives [34]. The reduction of NBT, principally into monoformazan, and to a lesser extent into diformazan derivatives, results in an increase of the absorbance in the 450-700 nm range. Experiments were conducted during various time of photoactivation in the presence of oxygen, and

absorptions at 560 nm were measured. As can be seen in Fig. 7a, the $O_2^{\bullet-}$ radical anion sensor showed a signal for both QDs (increase of the formazan derivatives optical density over time). CdSe(S) QDs generated slightly more $O_2^{\bullet-}$ radicals than CdSe and a plateau was reached for both dots after ca. 30 min. irradiation. The concentrations of $O_2^{\bullet-}$ radicals after 60 min irradiation in O_2 -saturated solutions were estimated using the molar extinction coefficient of monoformazan at 560 nm ($\epsilon = 15000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) and found to be 273 ± 13 and $322 \pm 14 \text{ }\mu\text{M}$ for CdSe@MSA and CdSe(S)@MSA QDs, respectively. These values are in good accordance with those determined by Cooper et al. from aqueous dispersions of CdSe/ZnS QDs [21], but they remain weak compared to results obtained with metal oxide nanocrystals like ZnO which are well-known to be strong $O_2^{\bullet-}$ radicals producers [43]. Quite similar results to those described in Fig. 7a were obtained when QDs solutions were bubbled with nitrogen, further confirming the poor capability of CdSe and CdSe(S) QDs to generate $O_2^{\bullet-}$ radicals. Finally, control experiments conducted in the dark showed no reduction of NBT, thus confirming the photo-induced generation of $O_2^{\bullet-}$ radicals through electron transfer from CdSe and CdSe(S) to surrounding O_2 molecules.

3.3.3. Photocatalytic generation of hydroxyl radical by CdSe@MSA and CdSe(S)@MSA QDs

The formation of hydroxyl $OH^{\bullet}$ radicals by photoreduction of oxygen upon irradiation with a lamp Hg–Xe lamp (200 mW) was monitored by trapping the radicals with disodium terephthalate (DST), a water-soluble and hydroxyl radical-specific probe. In this assay, non-fluorescent DST reacts with $OH^{\bullet}$ radicals to form 2-hydroxyterephthalate (2-OH-DST), which forms a highly fluorescent anion emitting at ca. 430 nm in basic medium [44-46]. To this end, 1 mL of CdSe@MSA and CdSe(S)@MSA QDs (10 μM) was irradiated in the presence of 1 mL DST (1 mM) for various time. Samples were then treated with 1 mL NaOH (1 M), and the fluorescence intensity at 428 nm was measured. We first carried out studies where DST was incubated with QDs in the absence of light and adding or without adding NaOH to exclude the possibility of false positive due to dye interactions with the particle surface. In these control experiments, the fluorescence observed at 430 nm was found to be negligible, thus showing that $OH^{\bullet}$ radicals formation was photo-induced. During the first 25 min of irradiation, we found a significant signal from 2-OH-DST with CdSe but not with CdSe(S) QDs (Fig. 7b). After ca. 30-40 min of irradiation, $OH^{\bullet}$ radicals produced from CdSe@MSA QDs levelled off to a constant value. With CdSe(S) QDs, a rapid increase in 2-OH-DST production was observed only after 30 min irradiation, and a plateau was reached only after 1

h. Although the kinetics of the reactions differed, the final amounts of OH[•] radicals produced were very similar after the 75 min. period (73 and 92 μM for CdSe and CdSe(S) QDs, respectively). Finally, we confirmed the QD-dependent generation of OH[•] radicals by adding mannitol, a well-known radical scavenger, in the reaction mixture during irradiation. In the presence of this compound, the oxidations of DST mediated by CdSe and CdSe(S) QDs were reduced by ca. 62 and 41%, respectively, compared to the experiments conducted without mannitol. At this point, it is also informative to relate the results of the DST assays to photostability experiments described in Fig. 5 although the intensity of the irradiation is not exactly the same. CdSe QDs were found to be of modest photostability, gradually decomposed during the irradiation and were quite totally bleached after ca. 30 min, which probably corresponds to the plateau observed for OH[•] radicals production (Fig 7b). Turning now to data recorded with CdSe(S)@MSA QDs, these dots were found to be of higher photostability and seem to generate OH[•] radicals only once the QDs start to degrade under photoirradiation.

3.3.4. Cytotoxicity of CdSe@MSA and CdSe(S)@MSA QDs on *Escherichia coli* bacterial cells

The global toxicity of both QDs was evaluated by exposing exponentially growing MG1655 *E. coli* cells to various concentrations of nanoparticles and monitoring growth kinetics in LB 1/10th medium at 30°C. A first set of experiments, carried out under illumination (1250 lux of full spectrum neon lighting), shows that the two QDs do not display the same level of toxicity (Fig. 8a). The toxicity of QD CdSe(S)@MSA started to be visible at 1 μM with an increase of the generation time that was found to be dose-dependent. CdSe@MSA QDs appeared more toxic with the first sign of toxicity already observable at 100 nM and a complete growth arrest was visible at 4 μM. Such difference in QDs cytotoxicity implies that it cannot only originate from the complete dissolution of the nanoparticle, leading to the release of their full toxic metal content, since the least toxic CdSe(S)@MSA QDs contain 3.2 times more Cd than CdSe@MSA QDs according to ICP-MS analyses. Having detected ROS production from both QDs, we investigated the effect of suppressing light illumination at 2 μM of QDs, a concentration showing toxicity without preventing the cells from growing. Fig. 8b and 8c show that the toxicity of the alloyed CdSe(S)@MSA QDs remained unchanged regardless of the illumination conditions. In contrast, CdSe@MSA QDs were found to be less toxic in the darkness, thus indicating that a part of the toxicity was photo-induced.

If QDs toxicity is linked to ROS production, we hypothesized that *E. coli* cells should perceive an oxidative stress. An oxidative stress response biosensor, genetically modified to express the green fluorescent protein in the presence of H₂O₂, was exposed to both QDs at concentrations ranging from 1.10⁻¹² to 1.10⁻⁸ M, under illumination or in the darkness. Fig. 9a shows that only a slight response was observed for CdSe(S)@MSA QDs with a maximum at 10⁻¹¹ M and without real difference between the two illumination conditions. In contrast, with CdSe@MSA QDs, the biosensor did not seem to respond in the dark while a weak oxidative stress could be observed around 5.10⁻⁹ M (Fig. 9b). These results confirm that each QD exert a different and specific oxidative stress towards *E. coli* cells, CdSe QDs being more reactive to illumination both in terms of cytotoxicity and hydroxyl radical production.

4. Conclusions

The mechanisms involved in the toxicity of the widely used Cd-based QDs are still subject to debate. This probably lies in the fact that the relative contributions of the two main sources of toxicity, i.e. Cd²⁺ ions release and ROS production, are difficult to establish on a technical point of view, and also because it probably varies from one QD to another according to their synthesis methods, structures, or even simply through batch-to-batch variations. Herein, we demonstrated that two MSA-capped CdSe-based QDs of ca. 2 nm in diameter, but differing in their core compositions and surface chemistries, CdSe vs CdSe(S), differ markedly in their toxicity. Although displaying a higher content of cadmium, the alloyed CdSe(S) QDs appeared less toxic than the non-alloyed CdSe ones.

CdSe and CdSe(S) QDs were analyzed for their light-induced ROS production, which were found to depend on the QD core material and on the irradiation time. Both CdSe and CdSe(S) QDs produced O₂^{•-} radicals. However, CdSe QDs produced [•]OH radicals quite immediately after light activation, whereas CdSe(S) required extensive irradiation and partial photobleaching to generate an equivalent amount of [•]OH radicals. The toxicity observed for CdSe QDs may be directly linked to [•]OH radicals produced. Without ruling out the importance of Cd²⁺ ions release, our results demonstrate that for such nanocrystals, the reactivity of the core plays a crucial role on QDs-induced phototoxicity. Our data also suggest that [•]OH radical formation, which is known among others to mediate membrane damage and subsequent cell death [47], can be circumvented or controlled by the choice of appropriate QD material and/or irradiation conditions. Our results should provide new insights into

potential safety risks for the use of semiconductor nanoparticles in aerobic environment and under light exposition.

Acknowledgements

This work is supported by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR CESA 2011, project NanoZnOTox). We thank Ghouti Medjahdi (IJL, Université de Lorraine) and Hélène Poirot (LRGP, Université de Lorraine) for XRD and ICP-MS analyses, respectively, and are grateful to Hélène Guilloteau (LCPME, Université de Lorraine) for technical support. We thank Dr. Serge Corbel (LRGP, Université de Lorraine) for facilitating photostability experiments.

References

- [1] I.L. Medintz, H.T. Uyeda, E.R. Goldman, H. Mattoussi, Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing, *Nat. Mater.* 4 (2005) 435-446.
- [2] W.A. Hild, M. Breunig, A. Goepferich, Quantum Dots – Nano-sized probes for the exploration of cellular and intracellular targeting, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 (2008) 153-168.
- [3] A. Rogach, Semiconductor Nanocrystal Quantum Dots; Synthesis, Assembly, Spectroscopy, and Applications. Springer Verlag, Vienna, Austria, 2008.
- [4] 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, Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics, *Science* 307 (2005) 538-544.
- [5] A.M. Derfus, W.C.W. Chan, S.N. Bhatia, Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots, *Nano Lett.* 4 (2004) 11-18.
- [6] C. Kirchner, T. Liedl, S. Kudera, T. Pellegrino, A. Munoz Javier, H.E. Gaud, S. Stölzle, N. Fertig, Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles, W.J. Parak, *Nano Lett.* 5 (2005) 331-338.
- [7] N. Chen, Y. He, Y. Su, X. Li, Q. Huang, H. Wang, X. Zheng, R. Tai, C. Fan, The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots, *Biomaterials* 33 (2012) 1238-1244.
- [8] W. Liu, S. Zhang, L. Wang, C. Qu, C. Zhang, L. Hong, L. Yuan, Z. Huang, Z. Wang, S. Liu, G. Jiang, CdSe quantum dots (QD)-induced morphological and functional impairments to liver in mice, *PLoS One* 6 (2011) e24406.

- [9] Y. Su, Y. He, H. Lu, L. Sai, Q. Li, W. Li, L. Wang, P. Shen, Q. Huang, C. Fan, The cytotoxicity of cadmium based, aqueous phase – Synthesized, quantum dots and its modulation by surface coating, *Biomaterials* 30 (2009) 19-25.
- [10] Y. Su, M. Hu, C. Fan, Y. He, Q. Li, W. Li, L.-H. Wang, P. Shen, Q. Huang, The cytotoxicity of CdTe quantum dots and the relative contributions from released cadmium ions and nanoparticle properties, *Biomaterials* 31 (2010) 4829-4834.
- [11] R.A. Hardman, A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors, *Environ. Health Perspect.* 114 (2006) 165-172.
- [12] A. Hoshino, K. Fujioka, T. Oku, M. Suga, Y.F. Sasaki, T. Ohta, M. Yasuhara, K. Suzuki, K. Yamamoto, Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification, *Nano Lett.* 4 (2004) 2163-2169.
- [13] Y. Tang, S. Han, H. Liu, X. Chen, L. Huang, X. Li, J. Zhang, The role of surface chemistry in determining in vivo biodistribution and toxicity of CdSe/ZnS core-shell quantum dots, *Biomaterials* 34 (2013) 8741-8755.
- [14] A. Aboulaich, C.-M. Tilmaciu, C. Merlin, C. Mercier, H. Guilloteau, G. Medjahdi, R. Schneider, Physicochemical properties and cellular toxicity of (poly)aminoalkoxysilanes-functionalized ZnO quantum dots, *Nanotechnology* 23 (2012) 335101 (9 pp).
- [15] A. Shiohara, A. Hoshino, K. Hanaki, K. Suzuki, K. Yamamoto, On the cyto-toxicity caused by quantum dots, *Microbiol. Immunol.* 48 (2004) 669-675.
- [16] R. Schneider, C. Wolpert, H. Guilloteau, L. Balan, J. Lambert, C. Merlin, Exposure of bacteria to CdTe quantum dots: the importance of surface chemistry on cytotoxicity, *Nanotechnology* 20 (2009) 225101 (10 pp).
- [17] J.H. Priester, P.K. Stoimenov, R.E. Mielke, S.M. Webb, C. Ehrhardt, J.P. Zhang, G.D. Stucky, P.A. Holden, Effects of soluble cadmium salts versus CdSe quantum dots on the growth of planktonic *Pseudomonas aeruginosa* *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 2589-2594.
- [18] A.P. Alivisatos, W. Gu, C. Larabell, Quantum dots as cellular probes, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 7 (2005) 55-76.
- [19] J. Kim, Y. Park, T.H. Yoon, C.S. Yoon, K. Choi, Phototoxicity of CdSe/ZnSe quantum dots with surface coatings of 3-mercaptopropionic acid or tri-n-octylphosphine oxide/gum arabic in *Daphnia magna* under environmentally relevant UV-B light, *Aquatic Tox.* 97 (2010) 116-124.
- [20] S.J. Cho, D. Maysinger, M. Jain, B. Röder, S. Hackbarth, F.M. Winnik, Long-term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells, *Langmuir* 23 (2007) 1974-1980.

- [21] D.R. Cooper, N.M. Dimitrijevic, J.L. Nadeau, Photosensitization of CdSe/ZnS QDs and reliability of assays for reactive oxygen species production, *Nanoscale* 2 (2010) 114-121.
- [22] C.B. Murray, D.J. Norris, M.G. Bawendi, Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 8706-8715.
- [23] Z.A. Peng, X.G. Peng, Formation of high-quality CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals using CdO as precursor, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 183-184.
- [24] L. Qu, X. Peng, Control of photoluminescence properties of CdSe nanocrystals in growth *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 2049-2055.
- [25] S.F. Wuister, I. Swart, F.V. Driel, S.G. Hickey, C.D.M. Donega, Highly luminescent water-soluble CdTe quantum dots, *Nano Lett.* 3 (2003) 503-507.
- [26] R. Schneider, L. Balan, Hydrothermal Routes for the Synthesis of CdSe Core Quantum Dots, State-of-the-Art of Quantum Dot System Fabrications, in *State-of-the-Art of Quantum Dot System Fabrications*, A. Al-Ahmadi (Ed.), InTech, 2012.
- [27] A. Aboulaich, D. Billaud, M. Abyan, L. Balan, J.-J. Gaumet, G. Medjahdi, R. Schneider, One-pot noninjection route to CdS quantum dots via hydrothermal synthesis, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 4 (2012) 2561-2569.
- [28] F. Aldeek, C. Mustin, L. Balan, G. Medjahdi, T. Roques-Carmes, P. Arnoux, R. Schneider, Enhanced photostability from CdSe(S)/ZnO core/shell quantum dots and their use in bio-labelling, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2011) 794-801.
- [29] F. Aldeek, L. Balan, G. Medjahdi, T. Roques-Carmes, J.-P. Malval, C. Mustin, J. Ghanbaja, R. Schneider, Enhanced optical properties of core/shell/shell CdTe/CdS/ZnO quantum dots prepared in aqueous solution, *J. Phys. Chem. C* 113 (2009) 19458-19467.
- [30] D.L. Klayman, T.S. Griffin, Reaction of selenium with sodium borohydride in protic solvent. A facile method for the introduction of selenium into organic molecules, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 197-199.
- [31] S. Chen, X. Zhang, Q. Zhang, X. Hou, Q. Zhou, J. Yan, W. Tan, CdSe quantum dots decorated by mercaptosuccinic acid as fluorescent probe for Cu^{2+} , *J. Lumin.* 131 (2011) 947-951.
- [32] M. Grabolle, M. Spieles, V. Lesnyak, N. Gaponik, A. Eychmüller, U. Resch-Genger, Determination of the fluorescence quantum yield of quantum dots: suitable procedures and achievable uncertainties, *Anal. Chem.* 81 (2009) 6285-6294.
- [33] W.W. Yu, L.H. Qu, W.Z. Guo, X.G. Peng, Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals, *Chem. Mater.* 15 (2003) 2854-2860.

- [34] A. Anas , H. Akita, H. Harashima, T. Itoh, M. Ishikawa, V. Biju, Photosensitized breakage and damage of DNA by CdSe-ZnS Quantum Dots, *J. Phys. Chem. B*, 112 (2008) 10005-10011.
- [35] X. Fang, G. Mark, C. von Sonntag, OH radical formation by ultrasound in aqueous solutions. Part I: the chemistry underlying the terephthalate dosimeter, *Ultrasonics Sonochem.* 3 (1996) 57-63.
- [36] T.J. Mason, J.P. Lorimer, D.M. Bates, Y. Zhao, Dosimetry in sonochemistry : the use of aqueous terephthalate ion as a fluorescent monitor, *Ultrasonics Sonochem.* 1 (1994) S91-S95.
- [37] P. Corbisier, D. van der Lelie, B. Borremans, A. Provoost, V. de Lorenzo, N.L. Brown, J.R. Loyd, J.L. Hobamn, E. Csöregi, G. Johansson, B. Mattiasson, Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples. *Anal. Chim. Acta* 387 (1999) 235-244.
- [38] A. Zaslaver, A. Bren, M. Ronen, S. Itzkovitz, I. Kikoin, S. Shavit, W. Liebermeister, M.G. Surette, U. Alon, A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nat. Methods* 3 (2006) 623-628.
- [39] J. Sambrook, D.W. Russell, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press (2001).
- [40] L. Xu, K. Chen, H.M. El-Khair, M. Li, X. Huang, Enhancement of band-edge luminescence and photo-stability in colloidal CdSe quantum dots by various surface passivation technologies, *Appl. Surf. Sci.* 172 (2001) 84-88.
- [41] W.R. Algar, U.J. Krull, Luminescence and stability of aqueous thioalkyl acid capped CdSe/ZnS quantum dots correlated to ligand ionization, *ChemPhysChem* 8 (2007) 561-568.
- [42] H. Zhang, Z. Zhou, B. Yang, M. Gao, The influence of carboxyl groups on the photoluminescence of mercaptocarboxylic acid-stabilized CdTe nanoparticles, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 8-13.
- [43] Y. Li, W. Zhang, J. Niu, Y. Chen, Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles, *ACS Nano* 6 (2012) 5164-5173.
- [44] B.I. Ipe, M. Lehnig, C.M. Niemeyer, On the generation of free radical species from quantum dots *Small* 1 (2005) 706-709.
- [45] C. Böhne, K. Faulhaber, B. Giese, A. Hafner, A. Hofmann, H. Ihmels, A.-K. Kohler, S. Pera, F. Schneider, M.A.L. Sheepwash, Studies on the mechanism of the photo-induced DAN damage in the presence of acridizinium salts involvement of singlet oxygen and an unusual source for hydroxyl radicals, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 76-85.

- [46] Y. Iida, K. Yasui, T. Tuziuti, M. Sivakumar, Y. Endo, Ultrasonic cavitation in microspace, Chem. Commun. (2004) 2280-2281.
- [47] H. Sies, Oxidative stress: oxidants and antioxydants, Experimental Physiol. 82 (1997) 291-295.

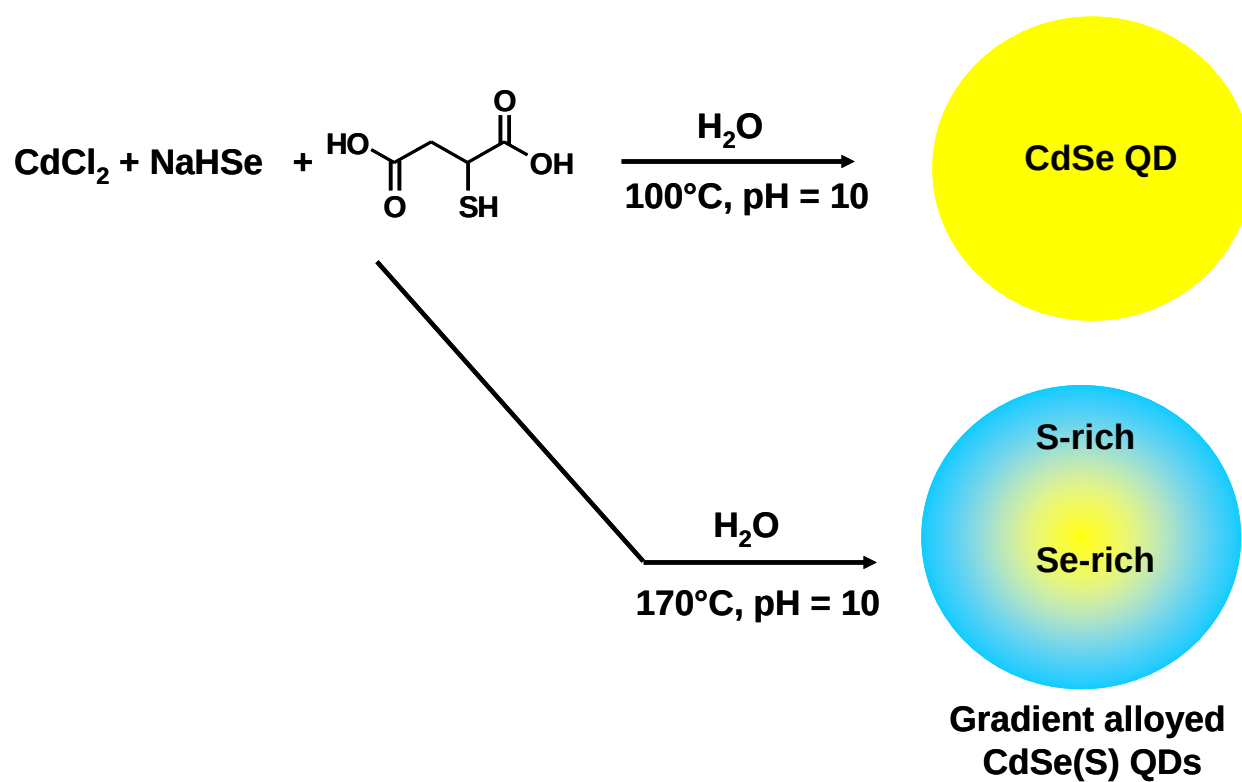


Fig. 1. Schematic illustration of the synthetic routes used for the preparation of CdSe@MSA and CdSe(S)@MSA QDs.

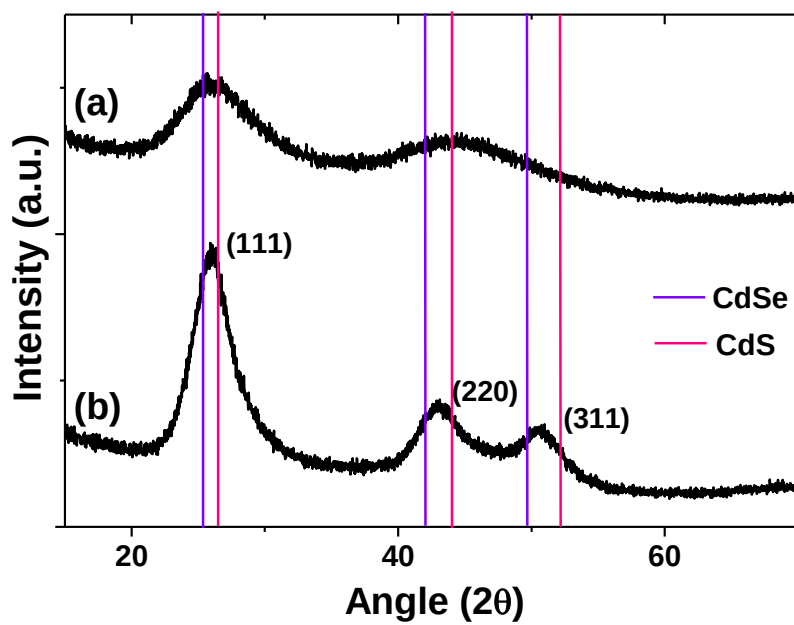


Fig. 2. X ray diffraction patterns of (a) CdSe and (b) CdSe(S) QDs. The standard patterns of bulk CdSe and CdS are present as references.

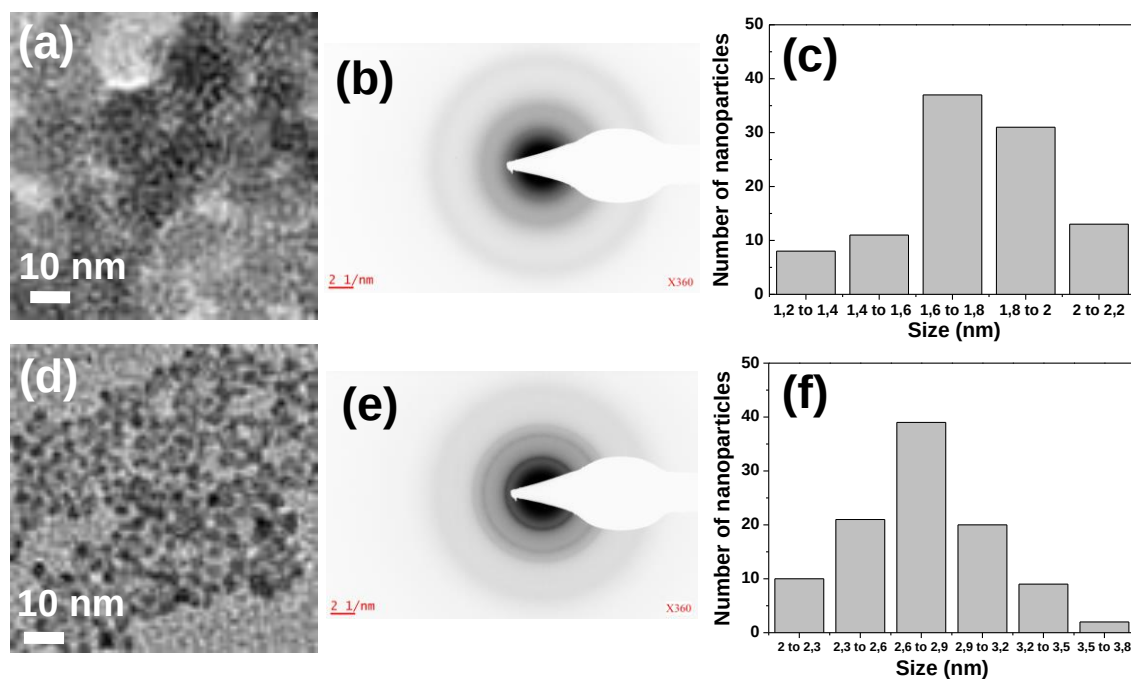


Fig. 3. Representative TEM images of (a) CdSe and (d) CdSe(S) QDs. (b) and (e) are the corresponding electron diffraction patterns and (c) and (f) the histograms of particle size distributions.

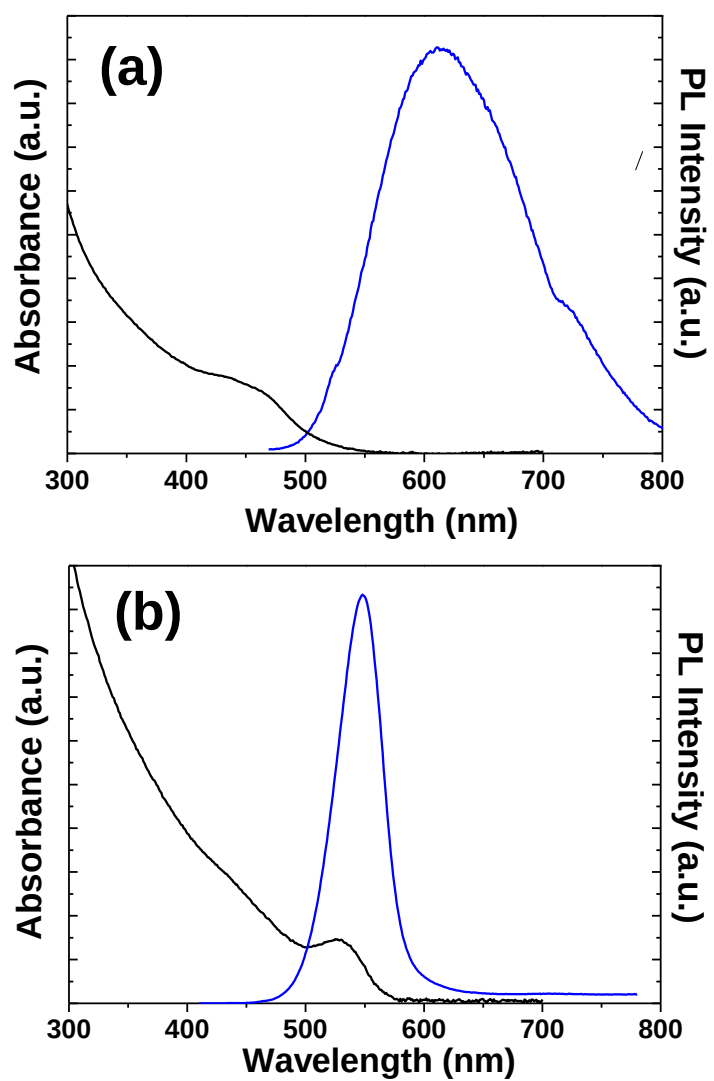


Fig. 4. UV-vis absorption spectra (black) and fluorescence spectra (blue) of (a) CdSe@MSA and (b) CdSe(S)@MSA QDs.

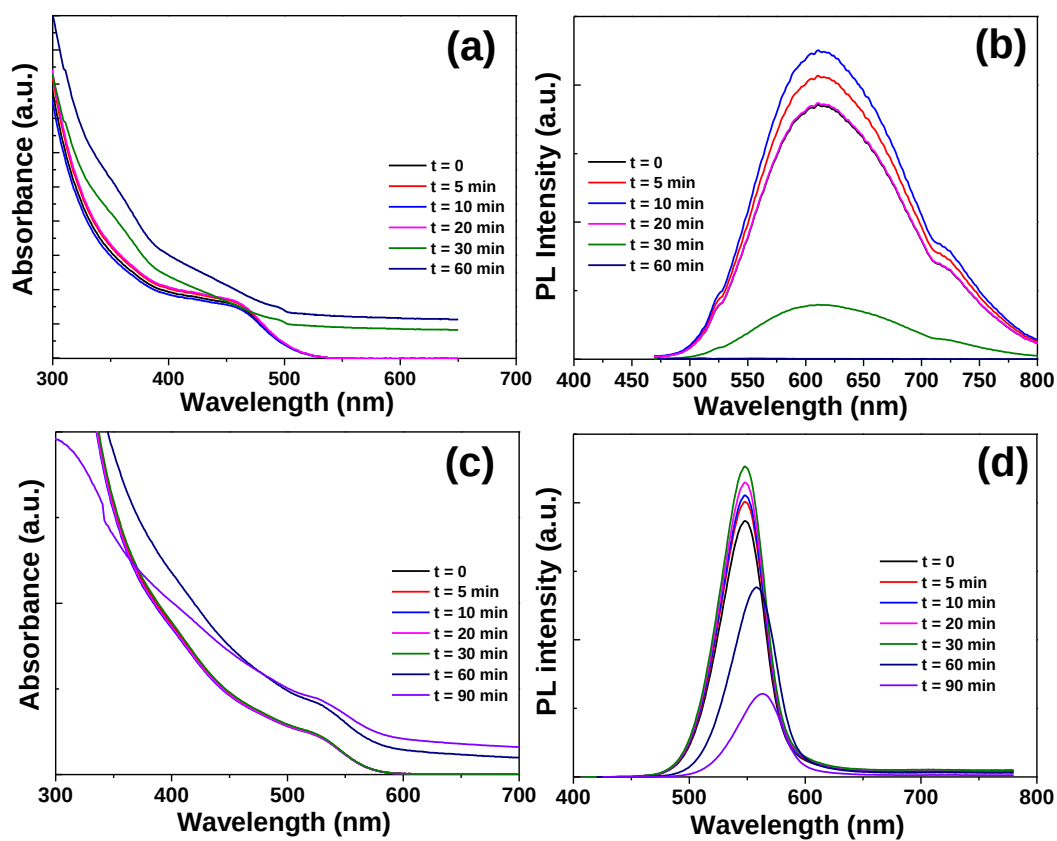


Fig. 5. Time evolutions of (a) and (c) absorption spectra and (b) and (d) PL emission spectra of CdSe(S) and CdSe(S) QDs, respectively, during irradiation with a Hg-Xe lamp.

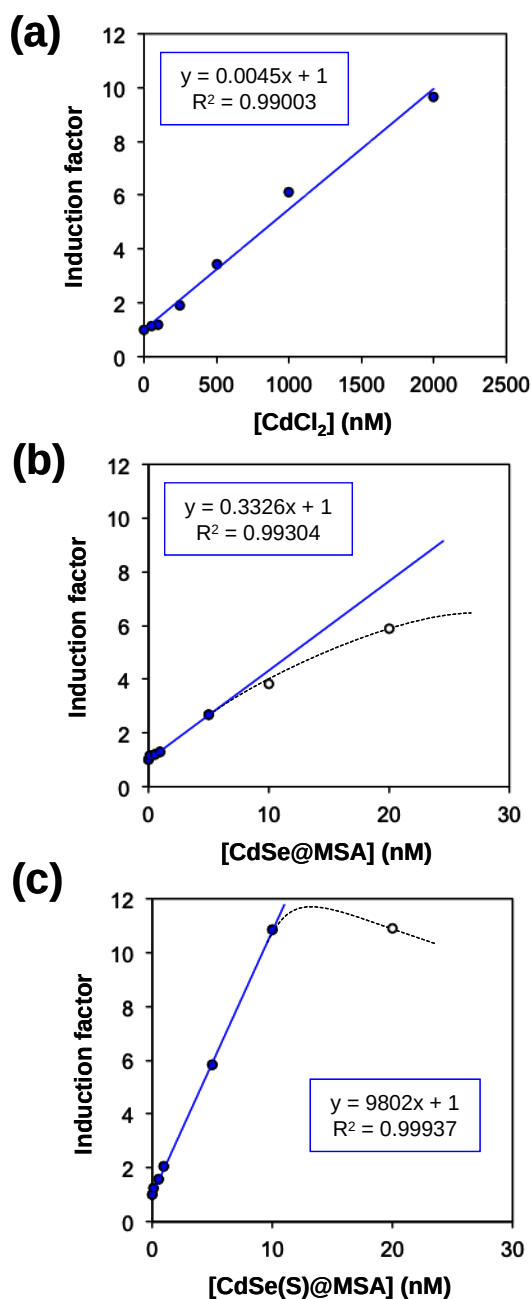


Fig. 6. Bioavailable Cd^{2+} released by CdSe@MSA and CdSe(S)@MSA QDs measured with biosensor AE1433. (a) Calibration curve used to determine the correspondence between the induction of bioluminescence and the concentration of bioavailable Cd^{2+} . (b) and (c) bioluminescence induced by CdSe@MSA and CdSe(S)@MSA QDs, respectively. The equations obtained from linear fits were used to determine the amount of Cd^{2+} released by each QD. The experiment, carried out in triplicate gave an average Cd^{2+} release of $110 \pm 10\%$ and $123 \pm 9\%$ with respect to the expected Cd-content of CdSe@MSA and CdSe(S)@MSA QDs, respectively (as estimated using the absorption spectra).

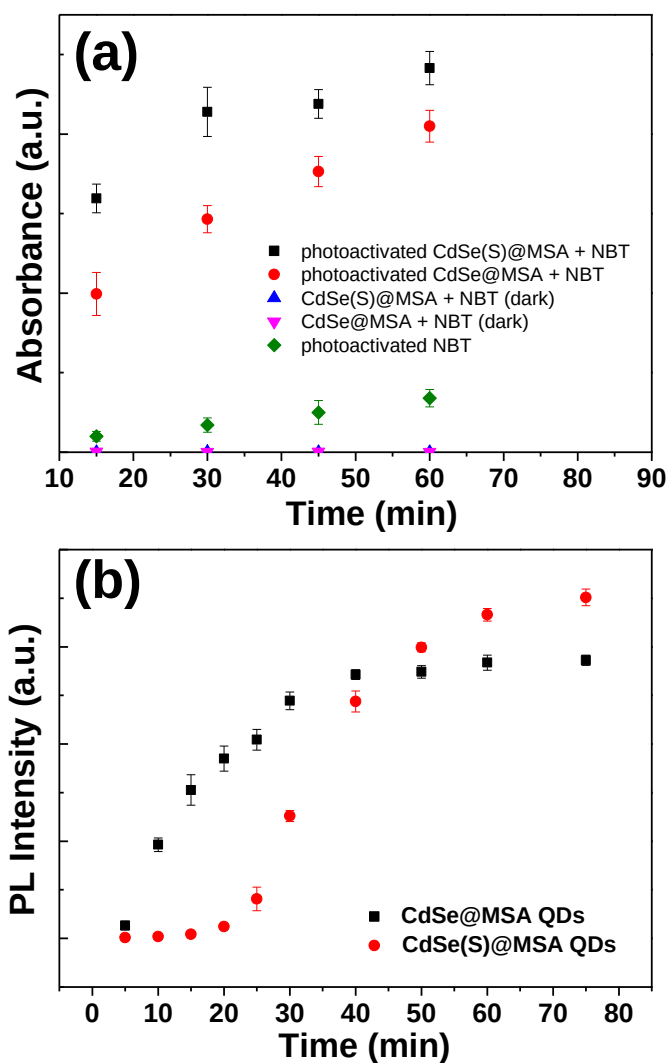
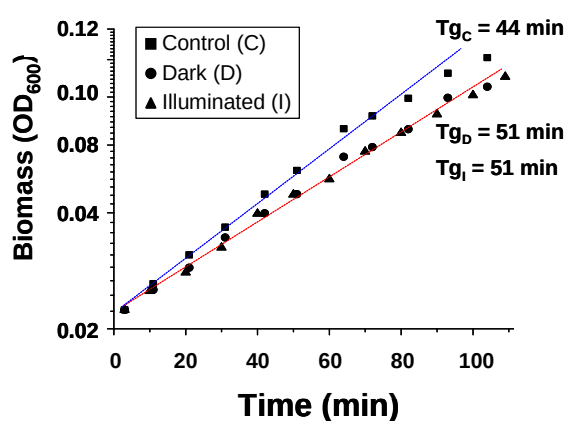


Fig. 7. (a) Absorption intensity of mono- and diformazan (i.e. $O_2^{\bullet-}$ formation) in O_2 -purged solutions, and (b) PL emission of 2-OH-DST (i.e. $OH^{\bullet}$ formation), generated by CdSe and CdSe(S) QDs after different irradiation time at $\lambda = 365$ nm.

(a) Generation times (T_g) obtained under light illumination

[QD] introduced (nM)	0	100	500	1000	2000	3000	4000
Generation time (min) for CdSe(S)@MSA QDs	44	45	45-43	47	51-53	56	69
Generation time (min) for CdSe@MSA QDs	44	51-49	54-55	57-59	66-65	70	no growth

(b) Light effect for QDs CdSe(S)@MSA



(c) Light effect for QDs CdSe@MSA

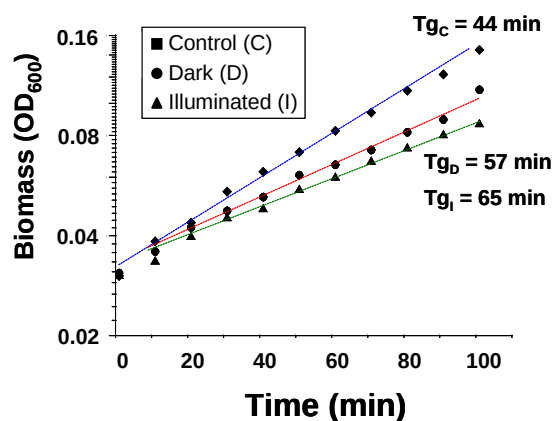


Fig. 8. Cytotoxicity of CdSe@MSA and CdSe(S)@MSA QDs. (a) Generation times (T_g) calculated for growth kinetics of *E. coli* MG1655 under illumination in presence of different concentrations of QDs. Growth was considered as inhibited when the generation time differs significantly from the control culture (44 ± 2 min; 21 repeats). Some tests were repeated twice for QDs concentrations presenting an effect. (b) and (c) Typical growth curves of *E. coli* MG1655 in absence (control) in presence of 2 μ M of either CdSe(S)@MSA or CdSe@MSA QDs. Duplicate experiments provided similar results: $T_{gD} = 53$ and 51 min, $T_{gI} = 51$ and 53 min for CdSe(S)@MSA, and $T_{gD} = 57$ and 55 min, $T_{gI} = 66$ and 65 min for CdSe(S)@MSA.

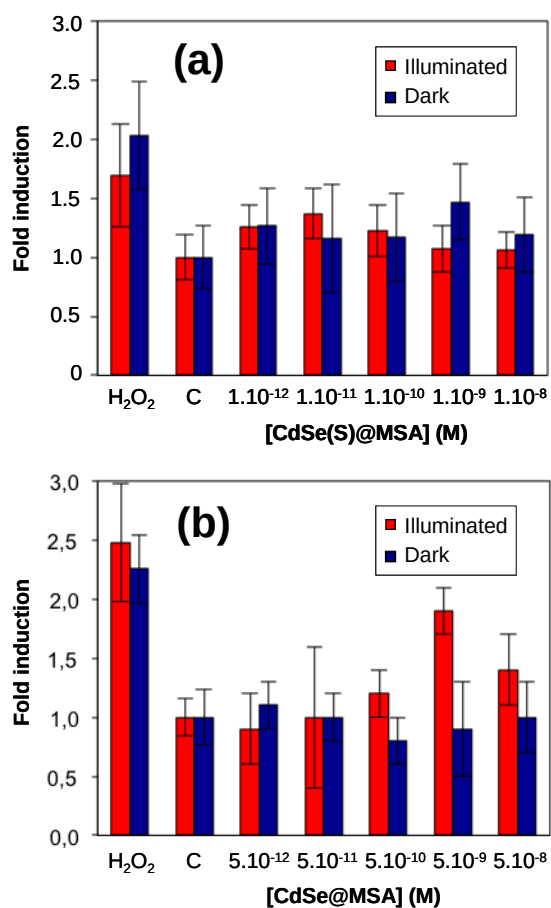


Fig. 9. H₂O₂-mediated oxidative stress response generated by CdSe@MSA (a) and CdSe(S)@MSA (b) QDs. H₂O₂: positive control providing a maximum response of biosensor MG1655(pUA66::P_{oxyR}) for [H₂O₂] = 5.10⁻⁶ M; C: non induced control.

Supplementary Information

2.1. Chemicals

Selenium powder (Se, 99.5%), sodium borohydride (NaBH_4 , 98%), mercaptosuccinic acid (MSA, 97%), $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (99%), Rose Bengal (95%), NitroBlueTetrazolium chloride (NBT, 98%) and sodium hydroxide (NaOH pellets) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Disodium terephthalate (DST, 99%) was purchased from Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA) and *iso*-propanol (*i*-PrOH, HPLC grade) from Carlo Erba (Val de Reuil, France). LB Broth Miller was obtained from DifcoTM (Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France). All reagents were used as received without further purification. Ultrapure water was used in all experiments ($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$, Millipore).

2.2.1. Preparation of sodium hydrogen selenide

NaHSe was prepared according to Klayman *et al.* [30] with some modifications. Briefly, 76 mg of NaBH_4 (2 mmol) were added to an ice cooled Schlenk reactor containing 1 mL of N_2 -degassed water maintained under argon. Then, 79 mg of selenium powder (1 mmol) were added, the mixture was stirred for 3 h until the black selenium powder disappeared and a clear NaHSe solution was obtained. This solution was diluted with 19 mL of N_2 -degassed water to reach 0.05 M.

2.5. Quantification of bioavailable Cd^{2+} produced by CdSe and CdSe(S) QDs

Under non-toxic conditions, the bioluminescence of strain AE1433 increases proportionally with the concentrations of bioavailable Cd^{2+} in the test medium. For biosensing, strain AE1433 was first cultured in LB medium until stationary phase ($\text{OD}_{600} = 1.5$). Bacterial cells were then washed twice by alternating centrifugation (10,000 g for 2 min at 20°C) and cell pellets dispersion in RM medium (MOPS mineral medium) supplemented with 0.01% gluconate. AE1433 cell suspension was adjusted to $\text{OD}_{600} = 0.3$ in the same medium, and aliquoted (180 μL) in black microtiter plates with clear bottom, previously filled with various dilutions (20 μL) of either CdCl_2 for calibration curves, or QDs for testing. Microtiter plates were maintained at 25°C in a VICTOR3 Multilabel Counter plate reader (Perkin-Elmer), where light emission and OD_{600} were recorded every 30 min, with a 5 s and 1 s measurement

time, respectively, preceded by a 10 s double orbital shaking. For both parameters, background provided by RM-gluconate medium was subtracted, and luminescence was normalized to the corresponding OD₆₀₀. Normalized luminescence values were averaged among triplicates and induction factors were calculated by dividing the normalized luminescence values by those obtained for the untreated control.

2.6.2. Detection of QD-generated oxidative stress

The biosensor strain was cultured at 37°C in standard M9 medium [39] supplemented with gluconate 0.4% as carbone source, until mid-log phase (i.e. DO₆₀₀ = 0.1). Cells were then aliquoted (100 µl) in black microtiter plates with clear bottom, previously filled with various dilutions (100 µl) of either of QDs. Microtiter plates were incubated 1 hour at 37°C in either dark or illuminated condition (1250 lux delivered by a full spectrum neon lighting Solar Color JBL) under agitation (100 rpm). Fluorescence (exc: 490 nm, em: 535 nm) and OD₆₀₀ were recorded with a VICTOR3 Multilabel Counter plate reader (Perkin-Elmer) set at 37°C, with a 5 s and 1 s measurement time respectively, preceded by a 10 s double orbital shaking. For each parameter, background value (obtained for M9-gluconate without cell) was subtracted and fluorescence was normalized to OD₆₀₀. A positive control was carried out in presence 5.10⁻⁶ M H₂O₂ for which the biosensor response is maximum (2.0 to 2.5 folds increase of fluorescence in our test conditions). Each experiment was run in triplicate simultaneously.

Synthèse, stabilité et toxicité de quantum dots à cœur CdSe

Résumé : Parce qu'ils présentent des propriétés remarquables par rapport à leurs équivalents massifs, les nanomatériaux occupent une place de plus en plus importante dans l'industrie et en médecine. Leur essor rapide a généré de nombreuses craintes dans l'opinion publique notamment au regard de certaines méconnaissances liées à leur toxicité. Notre projet vise l'utilisation du séléniure de cadmium (CdSe) comme matériau modèle afin d'établir une corrélation entre la structure chimique des nanoparticules, leur réactivité de surface, leur (photo)stabilité et leur toxicité. Des quantum dots (QDs) CdSe et alliages CdSe(S) ont été préparés en milieu aqueux à 100°C ou par voie hydrothermale de manière à ne différer que par leur structure chimique de cœur (alliage ternaire vs semi-conducteur binaire) alors que d'autres paramètres comme la taille, la charge ou la nature du ligand de surface, ont été maintenus constants. Des études de cytotoxicité menées sur *Escherichia coli* ont montré que la libération de Cd^{2+} jouait un rôle important dans la toxicité pour les deux QDs. Nos résultats ont également mis en évidence que les QDs CdSe(S) alliés étaient plus stables et moins toxiques que les QDs CdSe. Sans négliger l'importance de la libération d'ion Cd^{2+} par les nanoparticules, une corrélation entre la stabilité et la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) a montré que la toxicité était en partie dépendante de la photostabilité des QDs. Notre étude met en perspective une relation entre la réactivité, la stabilité du cœur des nanoparticules, et la toxicité photo-induite.

Mots-clés : Quantum Dots CdSe, alliage ternaire CdSe(S), synthèse en milieu aqueux, photostabilité, cytotoxicité, Espèces Réactives de l'Oxygène.

Abstract: Due to their unique properties compared to their bulk counterparts, nanomaterials have gained considerable attention, especially in industry and medicine. Their fast development has generated many public concerns, especially because of a lack of knowledge regarding their toxicity. Our project aims to use cadmium selenide (CdSe) as a model material in order to initiate a research aiming at establishing a correlation between the nanoparticles chemical structure, their surface reactivity, their stability and their toxicity.

CdSe and alloyed CdSe(S) quantum dots (QDs) were prepared in aqueous phase either at 100°C or under hydrothermal conditions in order to differ solely by their core chemical structure (ternary alloy vs binary semiconductor), while other parameters such as the size, the surface charge or the surface ligand, have been kept constant. Cytotoxicity studies carried out on *Escherichia coli* have shown that release of Cd^{2+} played a key role in the toxicity for both QDs. However, alloyed CdSe(S) QDs were also found more stable and less toxic than CdSe nanocrystals. Without disregarding the importance of Cd^{2+} ions release by the nanoparticles, a correlation between the stability and the production of reactive oxygen species (ROS) showed that toxicity was dependent on QDs photostability. Our study highlights a relationship between the core reactivity, stability and the photo-induced toxicity QD nanoparticles.

Keywords : CdSe Quantum Dots, CdSe(S) ternary alloy, aqueous synthesis, photostability, cytotoxicity, Reactive Oxygen Species.