



## 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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

**Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)**

---

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ**

*Mention : "Sciences de la Vie et de la Santé"*

par **Vincent MOROSINI**

**Pour une amélioration de la thérapie photodynamique  
appliquée à la cancérologie :**

**Potentialités des dendrimères poly(amidoamine) et  
des Quantum Dots CdTe adressés par l'acide folique**

le 15 novembre 2010

**Membres du jury :**

<b>Rapporteurs :</b>	Mr. Stéphane ROUX	Professeur, Université de Franche-Comté, Besançon.
	Mr. Marc VERELST	Professeur, CEMES, Toulouse.
<b>Examineurs :</b>	Mlle Céline FROCHOT	Chargée de Recherche (HDR), CNRS, Nancy.
	Mr. Jean Olivier DURAND	Chargé de Recherche (HDR), CNRS, Montpellier
	Mme Muriel BARBERI-HEYOB	Chargée de Recherche (HDR), CAV, Nancy, directrice de thèse
	Mr. Raphaël SCHNEIDER	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy, co-directeur de thèse



*«Ce n'est pas dans la science qu'est le bonheur, mais dans l'acquisition de la science.»*

Edgar Allan Poe - *Le Pouvoir des mots*

*«On mesure l'intelligence d'un individu à la quantité d'incertitudes qu'il est capable de  
supporter.»*

Emmanuel Kant



## **Avant-Propos**

Ce rapport présente mon activité de recherche en tant que doctorant au sein du Centre Alexis Vautrin (CAV) à Vandœuvre-lès-Nancy. Ce laboratoire fait partie du groupe Ingénierie Pour la Santé (IPS), sous la responsabilité du Pr Didier Wolf, au sein du Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), Unité Mixte de Recherche (UMR) 7039 CNRS-UHP-INPL, dirigé par le Pr Alain Richard.

Ce travail pluridisciplinaire est le résultat d'une collaboration entre le CAV-CRAN et l'École Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC) à Nancy, avec le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), Unité Propre de Recherche (UPR) 3349 CNRS.

Cette étude a porté sur la synthèse de nouveaux composés d'intérêt et de leurs caractérisations chimiques et photophysiques, ainsi que leur évaluation *in vitro*. Si la majorité des expérimentations ont été réalisées au LRGP et au CAV, de nombreuses collaborations extérieures, avec des laboratoires experts du domaine concerné, ont été nécessaires. Ces équipes sont dûment citées dans les travaux publiés correspondants.

Certains résultats de ce travail de thèse ont fait l'objet de publications incluses dans le présent document en tant que telles dans les chapitres correspondants, précédées par une brève introduction.

Nancy, janvier 2010



## Remerciements

Je voudrais d'abord remercier

**Madame le Docteur Muriel Barberi-Heyob**, pour m'avoir accordé la chance de participer à ce projet, cela a été un réel plaisir de travailler avec toi. Merci beaucoup pour ton encadrement et ta présence tout au long de ces quatre années de travail.

**Monsieur le Professeur Raphaël Schneider**, pour ta présence, ton suivi et ton soutien depuis mes débuts dans le monde de la chimie. Merci pour tes conseils concernant tous les aspects "chimiques" de ce travail.

**Madame le docteur Céline Frochot**, pour ton aide sur les aspects photophysiques bien sûr, mais aussi pour ton dynamisme communicatif, ta présence et ton soutien. Tu as toujours été là pour me soutenir, même dans les moments plus difficiles.

**Messieurs les professeurs Stéphane Roux et Marc Verelst**. Je suis honoré et très reconnaissant pour l'enthousiasme avec lequel vous avez accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

**Monsieur Jean-Olivier Durand**, pour votre bienveillance et votre sympathie. Cela a été un réel plaisir de vous rencontrer, de travailler avec vous et de vous compter parmi les membres de ce jury de thèse

**Igor Clarot**, pour ton intérêt et ta disponibilité envers notre collaboration qui fut fructueuse.

**Thierry Bastogne**. Ton enthousiasme et ton sérieux ont permis de travailler efficacement dans la bonne humeur. Merci pour tout le travail que tu as fourni. Sans toi, il m'aurait été difficile de conclure efficacement ce travail de thèse.

**Aurélie**, pour m'avoir introduit dans le monde de la culture cellulaire *in vitro*. Tu as toujours été disponible en cas de besoin, et ce quelle que soit l'heure de mes manipulations.

**Noémie, Denise et Emilie**, pour votre bonne humeur et votre accueil.

**Sébastien Hupont**, pour ta disponibilité et ta sympathie. Tes explications théoriques et pratiques m'ont permis d'être autonome en spectroscopie.

**Docteur Jacques Didelon**, pour votre disponibilité lorsque j'avais besoin du laser jusqu'à des heures tardives.

**Julien, Pierre, Fadi, Marc**, pour les échanges scientifiques, l'amitié et le partage. Cela a été un réel plaisir de côtoyer des gens comme vous.

**L'équipe du CAV**. Je vous remercie tous pour votre sympathie et votre accueil. Les moments passés en votre présence ont été très plaisants.

**L'équipe du LRGP**, pour votre accueil au sein de votre laboratoire. **Nathalie Petitjean**, cela a été un réel plaisir de côtoyer une personne aussi dévouée et sérieuse que toi.

**L'équipe du CRAN**. Monsieur le **Pr Alain Richard**, ainsi que votre équipe administrative, je vous serais toujours reconnaissant pour votre disponibilité et de votre réactivité à chaque fois que je vous ai sollicité.

**L'Institut National du Cancer (INCa), l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) et le laboratoire du CRAN**. Un grand merci à tous ses acteurs qui ont soutenu matériellement et financièrement la réalisation de ce travail.

**Mes amis**, pour être toujours là malgré les années et les distances.

**Mes parents et ma soeur**, pour avoir toujours cru en moi. Votre soutien m'as été d'une grande aide pour aller au bout de cette aventure.

**Leslie**, pour avoir su être là même dans les moments les moins faciles de ces quatre années de travail prenant. Un grand merci pour tout ce que tu m'apportes.





## Table des matières

Liste des figures .....	15
Liste des tableaux .....	20
Introduction Générale & objectifs.....	25
<b>Chapitre I: La thérapie photodynamique; synthèse bibliographique.....</b>	<b>31</b>
<b>I. Rappel historique .....</b>	<b>31</b>
<b>II. Définition et principe .....</b>	<b>34</b>
<b>III. Mécanismes et réactions photochimiques .....</b>	<b>36</b>
III.1 Principe photophysique .....	39
III.2 Type I .....	40
III.3 Type II.....	41
III.4 Les mécanismes d'éradication tumorale après thérapie photodynamique .....	42
III.4.1 Effets directs.....	44
III.4.2 Effets indirects.....	45
III.4.2.1 Effets anti-vasculaires .....	45
III.4.2.2 Effets immunitaires et inflammatoires .....	46
<b>IV. Les photosensibilisateurs .....</b>	<b>47</b>
IV.1 Les dérivés de 1 <sup>ère</sup> génération et le PS idéal.....	47
IV.2 PS de 2 <sup>ème</sup> génération .....	50
IV.3 3 <sup>ème</sup> génération.....	51
IV.3.1 Ciblage actif : l'adressage .....	51
IV.3.2 Ciblage passif : la vectorisation .....	53
<b>V. Intérêts des nano-objets en PDT .....</b>	<b>55</b>
V.1 Les transporteurs incorporants .....	56
V.2 Les Quantum Dots.....	58
V.3 Les transporteurs non-incorporants : les dendrimères.....	58
<b>Chapitre II. Dendrimères et thérapie photodynamique .....</b>	<b>61</b>
<b>I. Introduction sur dendrimères .....</b>	<b>61</b>
I.1 Généralités.....	61
I.2 Structure .....	62
<b>II. Les différentes approches de synthèses des dendrimères .....</b>	<b>64</b>
II.1 Méthode divergente.....	64
II.2 Méthode convergente .....	65
II.3 Autres approches .....	66
II.3.1 Approche hypercore/branched monomers .....	66
II.3.2 Croissance exponentielle double .....	67
II.3.3 Chimie « lego » .....	67
II.3.4 Chimie « click » .....	68
<b>III. Propriétés des dendrimères .....</b>	<b>68</b>
III.1 Monodispersité .....	68
III.2 Multivalence et effet dendritique .....	69
III.3 Structure tridimensionnelle et taille nanométrique : « dendrimère hôte » .....	69
III.4 Propriétés mécaniques.....	71
III.5 Solubilité .....	72
III.6 Propriétés biologiques .....	72
<b>IV. Applications des dendrimères en PDT : état de l'art.....</b>	<b>73</b>
<b>V. Nouveaux assemblages photosensibilisants/dendrimères pour la PDT ciblée.....</b>	<b>76</b>

V.1	Objectifs .....	76
V.2	Choix du dendrimère, du PS et stratégie de synthèse .....	77
V.2.1	Choix du dendrimère .....	77
V.2.2	Choix du PS .....	78
V.3	Synthèse des dendrimères et des porphyrines .....	78
V.3.1	Synthèse du dendrimère PAMAM .....	78
V.3.2	Synthèse de la 4-carboxyphénylporphyrine. ....	79
V.3.3	Fonctionnalisation complète de dendrimères PAMAM par la 4-carboxy- phénylporphyrine. ....	81
V.4	Synthèse de dendrimères fonctionnalisés sélectivement par des photosensibilisateurs selon la stratégie "divergente/divergente" .....	83
V.4.1	Stratégie de synthèse. ....	83
V.4.2	Synthèse de composés dissymétriques PAMAM/PS .....	84
<b>VI.</b>	<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>85</b>
<b>VII.</b>	<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>87</b>
<b>VIII.</b>	<b>"Divergent synthesis of novel unsymmetrical dendrons containing photosensitizing units" .....</b>	<b>90</b>
<b>Chapitre III :</b>	<b>Nanoscience, nanotechnologies et nano-objets : Synthèse bibliographiques.....</b>	<b>99</b>
<b>I.</b>	<b>Nanoscience et nanotechnologie :.....</b>	<b>99</b>
I.1	Définition et principe .....	99
I.2	Historique .....	100
<b>II.</b>	<b>Les nano-objets.....</b>	<b>102</b>
II.1	Rappels sur la structure de la matière et les propriétés des matériaux : l'atome et l'électron .....	103
II.2	Les cristaux .....	104
II.3	Le cas des semi-conducteurs .....	105
II.4	Les nanocristaux (NCx) et les Quantum Dots (QDs).....	106
II.5	Les nano-objets et leurs propriétés .....	107
II.6	Les différents types de nano-objets. ....	109
II.6.1	Les puits quantiques .....	110
II.6.2	Les nanofils .....	110
II.6.3	Les QDs.....	110
II.7	Propriétés optiques des quantum dots .....	111
II.7.1	Absorption.....	111
II.7.2	Photoluminescence.....	112
II.7.3	Rendement quantique de fluorescence et scintillement .....	113
II.8	Synthèses et croissance d'un QD .....	114
II.8.1	Nucléation, croissance cristalline et maturation d'Oswald .....	114
II.8.1.1	Croissance .....	115
II.8.1.2	Stabilisation.....	116
II.8.1.3	Uniformité des tailles de particules .....	117
II.8.2	Voies de synthèses des QDs.....	118
II.8.2.1	Physiques.....	119
II.8.2.2	Chimiques.....	119
II.8.2.2.1	En milieu organique.....	119
II.8.2.2.2	En milieu aqueux .....	121
II.8.3	Fonctionnalisation .....	123

<b>Chapitre IV : Potentialité des quantum dots comme photosensibilisateurs pour la thérapie photodynamique.....</b>	<b>127</b>
<b>I. Cahier des charges .....</b>	<b>127</b>
I.1 Hydrosolubilité.....	127
I.2 Modularité des propriétés spectrales : Absorption IR.....	127
I.3 Fonctionnalisation .....	128
I.4 Avantages des QDs par rapport aux PS organiques classiques.....	128
<b>II. Choix de la composition du QD : le tellure de cadmium CdTe.....</b>	<b>129</b>
<b>III. Synthèse.....</b>	<b>130</b>
III.1 Choix du type de synthèse.....	130
III.2 Les éléments fondamentaux à une synthèse de QDs en phase liquide.....	131
III.2.1 Les cadmium " $Cd^{2+}$ " .....	132
III.2.2 Les précurseurs de tellures " $Te^{2-}$ " .....	132
III.2.3 L'agent stabilisateur des NPs : le ligand.....	132
III.2.4 Le contrôle post-synthétique de QDs : absorption/fluorescence.....	133
III.3 Synthèse en milieu organique .....	134
III.3.1 Synthèse du précurseurs " $Te^{2-}$ ": TOP-Te .....	135
III.3.2 Injection et croissance des QDs .....	137
III.3.3 Echange de ligand .....	142
III.4 Synthèse en milieu aqueux.....	146
III.4.1 Synthèse du précurseur " $Te^{2-}$ " .....	147
III.4.2 Injection et croissance des QDs .....	149
III.4.2.1 Synthèse hydrophile standard.....	149
III.4.2.2 Irradiation micro-onde.....	152
III.4.2.3 Autoclave : .....	153
III.4.2.4 Hydrothermale :.....	154
III.4.3 Purification .....	155
III.4.4 Caractérisation.....	156
III.4.5 Electrophorèse capillaire de zone.....	157
III.4.5.1 Principe: .....	157
III.4.5.2 Résultats: .....	158
<b>IV. Conclusions .....</b>	<b>159</b>
<b>V. Matériels et méthodes .....</b>	<b>160</b>
<b>VI. "Optimization of CDTE Quantum Dots Synthesis Using Capillary Zone Electrophoresis".....</b>	<b>161</b>
<b>Chapitre V : L'acide folique.....</b>	<b>171</b>
<b>I. Généralités .....</b>	<b>171</b>
<b>II. Rôle de l'acide folique .....</b>	<b>172</b>
<b>III. Récepteurs.....</b>	<b>173</b>
III.1 L'isoforme $\alpha$ (RAF- $\alpha$ ) .....	174
III.2 L'isoforme $\beta$ (RAF- $\beta$ ).....	175
III.3 L'isoforme $\gamma/\gamma'$ (RAF- $\gamma$ ).....	176
<b>IV. Récepteurs à l'acide folique comme cible thérapeutique.....</b>	<b>176</b>
<b>V. Méthodes d'imagerie basées sur l'adressage par l'acide folique .....</b>	<b>178</b>
V.1 La radio-imagerie .....	178
V.2 L'imagerie par résonance magnétique (IRM) .....	180
V.3 L'imagerie par fluorescence.....	181
<b>VI. Thérapies adressées par l'acide folique.....</b>	<b>183</b>
VI.1 Chimiothérapie adressée .....	184

VI.2	Thérapie photodynamique.....	185
VI.3	Adressage de macromolécules .....	186
VI.4	Adressage de vecteurs moléculaires.....	188
<b>Chapitre VI : Fonctionnalisation des quantum dots pour un adressage via l'acide folique.....</b>		<b>193</b>
<b>I.</b>	<b>Choix du bras espaceur.....</b>	<b>193</b>
<b>II.</b>	<b>Couplage QD/AF .....</b>	<b>194</b>
II.1	Purification et caractérisation du conjugué QD/AF.....	194
II.1.1	Purification.....	194
II.1.2	Caractérisations photophysiques .....	195
II.1.3	Electrophorèse sur acétate de cellulose (EAC) .....	196
II.2	Protocoles de synthèse .....	196
II.2.1	Couplage direct QD/AF. ....	197
II.2.2	Couplage <i>via</i> un bras espaceur .....	197
II.2.2.1	Couplage "CdTeS@ATG + bras-AF" .....	198
II.2.2.2	Couplage CdTeS@ATG-bras + AF .....	200
<b>III.</b>	<b>Validation de l'efficacité photodynamique des QDs "Quantum Dot-folic acid conjugates as potential photosensitizers in photodynamic therapy of cancer".....</b>	<b>203</b>
<b>Conclusions &amp; Perspectives.....</b>		<b>219</b>
<b>Références .....</b>		<b>227</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1. Principe de la PDT</b>	<b>35</b>
<b>Figure 2. Représentation des transitions électroniques au sein d'un PS en fonction de son état de multiplicité.</b>	<b>39</b>
<b>Figure 3. Diagramme simplifié de Perrin-Jablonski.</b>	<b>39</b>
<b>Figure 4. Mécanisme de destruction tumorale après PDT.</b>	<b>43</b>
<b>Figure 5. Structure du Photofrin®.</b>	<b>48</b>
<b>Figure 6. Spectre d'absorption des principales molécules biologiques endogènes des tissus.</b>	<b>49</b>
<b>Figure 7. Profondeur de pénétration des rayonnements lumineux dans les tissus en fonction de leur longueur d'onde (nm).</b>	<b>49</b>
<b>Figure 8. Structures chimiques du (a) Foscan® et de la Verteporfin® (b).</b>	<b>51</b>
<b>Figure 9. Nomenclature des dendrimères : A : Dendrimère de polypropylène imine (PPI) de 5<sup>ème</sup> génération (G5), B : dendrimère de polyamidoamine (PAMAM) de 3<sup>ème</sup> génération (G3). Chaque génération est représentée par un cercle.</b>	<b>62</b>
<b>Figure 10. Exemples de dendrimères. A : à base de poly(aryl) éther, B : à base de sucre, C : à base de silice.</b>	<b>64</b>
<b>Figure 11. Principe de l'approche divergente.</b>	<b>65</b>
<b>Figure 12. Principe de l'approche convergente.</b>	<b>66</b>
<b>Figure 13. Principe de l'approche <i>hypercore/branched monomers</i>.</b>	<b>67</b>
<b>Figure 14. Principe de la synthèse à croissance exponentielle double.</b>	<b>67</b>
<b>Figure 15. Principe de la stratégie « lego ».</b>	<b>67</b>
<b>Figure 16. Principe de la stratégie « click ».</b>	<b>68</b>
<b>Figure 17. Sites d'encapsulation d'un dendrimère PPI G4.</b>	<b>71</b>
<b>Figure 18. Agrégation de PS conventionnels à concentration élevée, induisant une modification des propriétés photophysiques.</b>	<b>75</b>
<b>Figure 19. Exemple de structures dendrimériques à base de porphyrine (A) et de phtalocyanine (B).</b>	<b>75</b>

<b>Figure 20. m-THPC conjuguée à l'acide folique via un espaceur de type PEG.</b>	<b>77</b>
<b>Figure 21. Schéma de synthèse d'un dendrimère de 1ère génération de type PAMAM par voie divergente.</b>	<b>78</b>
<b>Figure 22. Dendrimère de type PAMAM de génération 1.5 et 2.</b>	<b>79</b>
<b>Figure 23. Structures et rendements des produits secondaires de synthèse de la 4-carboxyméthylphénylporphyrine.</b>	<b>81</b>
<b>Figure 24. Activation de la fonction carboxyle de la 4-carboxyméthylphénylporphyrine par la N-hydroxysuccinimide (NHS).</b>	<b>82</b>
<b>Figure 25. Schéma de fonctionnalisation d'un dendrimère PAMAM G1 par 4 4-carboxyméthylphénylporphyrine.</b>	<b>83</b>
<b>Figure 26. Principe de la synthèse de dendrimère par la voie divergente/divergente.</b>	<b>84</b>
<b>Figure 27. Vase de Lycurgue en lumière directe (gauche) et transmise (droite).</b>	<b>100</b>
<b>Figure 28. Image microscopie électronique à transmission (MET) d'une particule d'alliage or-argent de la coupe de Lycurgue.</b>	<b>101</b>
<b>Figure 29. Diagramme énergétique des couches électroniques d'un atome.</b>	<b>104</b>
<b>Figure 30. Diagramme énergétique des bandes d'un cristal.</b>	<b>104</b>
<b>Figure 31. Schéma d'excitation d'un semi-conducteur par irradiation lumineuse.</b>	<b>105</b>
<b>Figure 32. Diagramme en bande: A : conducteur, B : semi-conducteur, C : isolant.</b>	<b>106</b>
<b>Figure 33. Evolution du bandgap en fonction de la taille du QD.</b>	<b>108</b>
<b>Figure 34. Puits de potentiel (A), nanofil (B), QD (C).</b>	<b>109</b>
<b>Figure 35 : Spectre d'absorption (ligne bleue) et de fluorescence (ligne rouge) typique de quantum dots. Le premier pic excitonique est indiqué par une flèche.</b>	<b>112</b>
<b>Figure 36. Variation de l'enthalpie libre <math>\Delta G</math> en fonction du rayon du quantum dot.</b>	<b>114</b>
<b>Figure 37. Exemple de QDs type CdTe stabilisés : (A) par un lien covalent entre le QD et l'acide thioglycolique (ATG), (B) par une interaction électrostatique entre le QD et l'oxyde de trioctylphosphine (TOPO).</b>	<b>117</b>
<b>Figure 38. Structure typique d'un QD type CdTe fonctionnalisé par l'acide folique via un bras espaceur type PEG.</b>	<b>128</b>

<b>Figure 39. Exemples de ligands stabilisateurs couramment utilisés en synthèse en phase aqueuse : A : acide thioglycolique, B : acide mercaptopropanoïque, C : L-cystéine; et en phase organique : D : trioctylphosphine, E : oxyde de trioctylphosphine, F : acide oléique.</b>	<b>133</b>
<b>Figure 40. Ligands et solvant utilisés lors de la préparation du complexe de Te : A : trioctylphosphine TOP, B : tributylphosphine TBP C : octadécène ODE.</b>	<b>136</b>
<b>Figure 41. Adjuvants testés lors de la synthèse de QDs CdTe en milieu coordinant : A : acide oléique (OA), B : octadécène (ODE), C : n-dodécylamine (DDA).</b>	<b>138</b>
<b>Figure 42. Spectre d'absorbance de QDs synthétisés par les protocoles permettant une absorption dans la région rouge-proche infrarouge : CdTe@TOPO/DDA (en bleu : protocole n°5, <math>\lambda_{\max}</math>=660 nm; en rouge : protocole n°6, <math>\lambda_{\max}</math>=655 nm), et CdTe@TBP/AO (en vert : protocole n°7, <math>\lambda_{\max}</math>=660 nm).</b>	<b>142</b>
<b>Figure 43. Exemple d'échange de ligand entre un QD CdTe@TOPO et l'acide mercaptopropanoïque (MPA).</b>	<b>143</b>
<b>Figure 44. Spectres d'absorbance (lignes pleines) et de fluorescence (en pointillés) de QDs CdTe. En bleu : CdTe@TOPO/DDA avant échange de ligand ; en rouge : après échange de ligand (CdTe@ATG).</b>	<b>145</b>
<b>Figure 45. Ligands utilisés lors des synthèses de QDs hydrophiles : acide thioglycolique (ATG); acide mercaptopropanoïque (AMP); cystéamine (Cys); L-cystéine (L-cyst); mercaptoéthanol (MEtOH).</b>	<b>149</b>
<b>Figure 46. Spectres d'absorption (lignes pleines) et de fluorescence (en pointillés) de QDs CdTe@ATG obtenus par voie standard (essai n°1, en bleu) et par irradiation micro-onde (essai n°2, en rouge).</b>	<b>153</b>
<b>Figure 47. Spectre d'absorption de QDs CdTe(S)@ATG obtenu par la méthode de chauffage en autoclave (<math>\lambda_{\max}</math>=625-635 nm).</b>	<b>154</b>
<b>Figure 48. Spectre d'absorption de QDs CdTe(S)@ATG obtenu par la méthode hydrothermale (<math>\lambda_{\max}</math>=625-635 nm).</b>	<b>154</b>
<b>Figure 49. Processus de précipitation sélective de QDs hydrophiles : a) ajout d'<i>iso</i>-propanol puis centrifugation; b) isolation du surnageant. <b>B</b> : Spectres d'absorption d'une solution brute de QDs après synthèse (en noir) et de la première (en rouge), seconde (en vert) et troisième (en bleu) fraction précipitée.</b>	<b>155</b>
<b>Figure 50. Exemples d'évaluation du diamètre de QDs absorbant à 650 nm. A : méthode empirique,<sup>346</sup> B : MET, C : AFM.</b>	<b>156</b>
<b>Figure 51. Schéma de principe de composition d'une électrophorèse capillaire de zone.</b>	<b>157</b>
<b>Figure 52. Principe de séparation de particules chargées par ECZ.</b>	<b>158</b>

<b>Figure 53. Ordre d'éluion des particules en fonction de leur charge et de leur taille.</b>	<b>158</b>
<b>Figure 54. Structure de l'acide folique (A), du tétrahydrofolate (B) et du N5-méthyl-tétrahydrofolate.</b>	<b>172</b>
<b>Figure 55. Niveau d'expression du RAF-<math>\alpha</math> pour des tissus ovariens, utérins et cérébraux selon qu'ils soient sains (bleu), ou tumoraux, (orange).</b>	<b>175</b>
<b>Figure 56. Illustration de la stratégie de vectorisation par l'acide folique : après reconnaissance de l'acide folique par les récepteurs spécifiques, les molécules thérapeutiques vont être internalisées puis acheminées vers le pré-endosome avant d'être relâchées après acidification de la vésicule. Les récepteurs à l'acide folique sont ensuite recyclés vers la surface membranaire.</b>	<b>177</b>
<b>Figure 57. Radioimagerie des mains (à gauche) et des pieds (à droite) d'un patient atteint d'une arthrite rhumatoïde (A) où le composé AF-EC20-<sup>99m</sup>Tc s'accumule au niveau des articulations enflammées, et d'un patient sain (B) dans les mêmes conditions.</b>	<b>179</b>
<b>Figure 58. Images en tomographie d'émission monophotonique couplée tomодensitométrie (TEM/TDM) de souris porteuses de tumeurs KB (RAF+) au niveau des épaules. A : souris de contrôle, B : souris ayant reçue une injection de PMX avant celle du radiofolate.</b>	<b>180</b>
<b>Figure 59. IRM d'une souris porteuse d'une tumeur IGROV-1 (indiqué par une flèche blanche). A : liposomes adressés par l'AF, B : liposomes contrôles non-adressés.</b>	<b>181</b>
<b>Figure 60. Image par microscopie confocale de l'internalisation des nanoparticules d'or. (en vert). A : lignée HeLa (RAF+); B : lignée A549 (RAF-).</b>	<b>182</b>
<b>Figure 61. Imagerie confocale laser de A : NS non adressées et MCF-7 (RAF+), B : NS-AF et MCF-7, C : NS non adressées et NIH 3T3 (RAF-), D : NS-AF et NIH 3T3.</b>	<b>183</b>
<b>Figure 62. A : Image IRM pré- et post-injection du Resovist® et de YCC-DOX-AF dans un rat porteur d'une tumeur du foie. B : Images IRM avant et après effet antitumoral du Doxil et de YCC-DOX.</b>	<b>185</b>
<b>Figure 63. Structure de la molécule cible de l'étude préliminaire. A : structure générale de la molécule cible ; B : en haut : espaceur hexane ; en bas : espaceur 2,2'-éthylènedioxy-bis-éthylamine.</b>	<b>185</b>
<b>Figure 64. La chlorine m-THPC couplée à l'AF via un bras 2,2'-(éthylènedioxy)-bis-éthylamine (PEG).</b>	<b>186</b>
<b>Figure 65. Survivance de cellules tumorales HeLa (RAF+) en fonction du rapport AF/TiO<sub>2</sub>.</b>	<b>187</b>

<b>Figure 66. Structure du dithiol couplé à l'acide folique par un espaceur PEG et greffé à la surface d'un nanocylindre d'or.</b>	<b>188</b>
<b>Figure 67. Structure des cyclodextrines : à gauche, l'<math>\alpha</math>-cyclodextrine ; au centre, la <math>\beta</math>-cyclodextrine ; à droite, la <math>\gamma</math>-cyclodextrine.</b>	<b>189</b>
<b>Figure 68. La 2,2'-éthylènedioxy-bis-éthylamine (PEG<sub>2</sub>) et la polyoxypropylène diamine Jeffamine (Jeff).</b>	<b>194</b>
<b>Figure 69. Structure de l'acétate de cellulose.</b>	<b>196</b>
<b>Figure 70. A : Réaction entre le Qd CdTe(S)@ATG et l'amine primaire du noyau ptéroïle de l'AF; B : Structure du n-hydroxysuccinimide (NHS) et du l-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC).</b>	<b>197</b>
<b>Figure 71. Schéma de la voie de couplage "QD + espaceur-AF".</b>	<b>198</b>
<b>Figure 72. Préparation des espaceurs PEG<sub>2</sub> et Jeff monoprotégés.</b>	<b>198</b>
<b>Figure 73. Synthèse du composé AF-PEG<sub>2</sub>-Boc.</b>	<b>199</b>
<b>Figure 74. Déprotection du composé AF-PEG<sub>2</sub>-Boc.</b>	<b>199</b>
<b>Figure 75. Couplage entre le QD CdTe(S)@ATG et le composé AF-PEG<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>.</b>	<b>200</b>
<b>Figure 76. Schéma de la voie de couplage "QD- espaceur + AF".</b>	<b>201</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1. Photosensibilisateurs utilisé cliniquement et leurs principales indications thérapeutiques</b>	<b>33</b>
<b>Tableau 2. Arrangements électroniques et valeurs globales de spin possibles en fonction de la multiplicité des états considérés</b>	<b>38</b>
<b>Tableau 3. Tendances généralisées de la toxicité <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>, de la bioperméabilité et des propriétés immunogènes en fonction des fonctionnalités de surface des dendrimères</b>	<b>73</b>
<b>Tableau 4. Synthèse de la 4-carboxyphénylporphyrine ou de son ester méthylique</b>	<b>80</b>
<b>Tableau 5. Exemples de <math>E_g^{\text{massif}}</math> de quelques SC et leur <math>\lambda_{\text{abs,max}}</math> théorique</b>	<b>130</b>
<b>Tableau 6. Protocoles testés pour la préparation de la source de Te</b>	<b>136</b>
<b>Tableau 7. Conditions expérimentales des différentes synthèses de QDs CdTe en milieu organique</b>	<b>141</b>
<b>Tableau 8. Récapitulatif des essais d'échange de ligands. Comparaison entre les <math>\Phi_{\text{fluo}}</math> initiaux et les <math>\Phi_{\text{fluo}}</math> après échange</b>	<b>144</b>
<b>Tableau 9. Récapitulatif des synthèses du précurseur de « <math>\text{Te}^{2-}</math> » NaHTe</b>	<b>148</b>
<b>Tableau 10. Protocoles utilisés pour la synthèse de QDs type CdTe hydrophiles adaptés à la PDT</b>	<b>150</b>
<b>Tableau 11. Comparaison de la méthode de chauffage standard et par micro-onde.</b>	<b>152</b>

## Liste des abbréviations

$^1\text{O}_2$	Oxygène singulet	DO	Densité optique
ADHL	Acide <b>d</b> ihydroliipoïque	DOTA	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-
ADN	Acide <b>d</b> ésoxyribonucléique		1,4,7,10-tétraacétique
AF	Acide <b>f</b> olique	DOX	Doxorubicine
ALA	<i>5-Aminolévulinique acid</i>	DPPC	1,2- <b>d</b> ipalmitoyl-3- <i>sn</i> -
Ala (A)	Alanine	dTMP	<b>p</b> hosphatidylcholine
AlAs	Arséniure d'aluminium	DTPA	<b>D</b> ésoxy <b>t</b> hymidine
AMM	Autorisation de <b>m</b> ise sur le <b>m</b> arché		<b>m</b> on <b>p</b> hosphate
AMP	Acide <b>m</b> ercap <b>p</b> ropanoïque	dUMP	<b>D</b> ésoxy <b>u</b> ridine <b>m</b> on <b>p</b> hosphate
AMU	Acide <b>m</b> ercap <b>u</b> ndécanoïque	EAC	Electrophorèse sur <b>a</b> cétate de
AO	Acide <b>o</b> léique	ECZ	cellulose
Arg (R)	Arginine	EDC	Electrophorèse <b>c</b> apillaire de
ARNm	Acide <b>r</b> ibonucléique <b>m</b> essenger		<b>z</b> one
Asp (D)	Asparagine	EROs	1-éthyl-3-(3-
ATG	Acide <b>t</b> hioglycolique	FITC	<b>d</b> iméthylaminopropyl)
BC	<b>B</b> ande de <b>c</b> onduction	FRET	<b>c</b> arbodiimide
BF <sub>3</sub> .OEt <sub>2</sub>	Trifluorure de bore étherate		<b>E</b> spèces <b>r</b> éactives de l' <b>o</b> xygène
Boc <sub>2</sub> O	Di-ter-butylidicarbonate	FWHM	<b>F</b> luorescéine <b>i</b> sothiocyante
BV	<b>B</b> ande de <b>v</b> alence	GaAs	<i>Förster resonance energy</i>
Cd	Cadmium	Gly (G)	<i>transfer</i>
CD	<b>C</b> yclod <b>e</b> xtrine	GN	<i>Full width at half maximum</i>
Cd(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Perchlorure de cadmium	HDA	Arséniure de gallium
CdAc <sub>2</sub>	Acétate de cadmium	HOBt	Glycine
CdCl <sub>2</sub>	Chlorure de cadmium	HOMO	Génération N
CdMe <sub>2</sub>	Diméthyle cadmium		<b>H</b> exadécylamine
CdO	Oxyde de cadmium		<b>H</b> ydroxybenzotriazole
CdS	Sulfure de cadmium		<i>Highest occupied molecular</i>
CdSe	Séléniure de cadmium	Hp	<i>orbital</i>
CdTe	Tellurure de cadmium	HpD	<b>H</b> ématoporphyrine
CI	<b>C</b> onversion <b>i</b> nterne	HPLC	<i>Hematoporphyrin derivative</i>
Cu(I)	Cuivre (I)	HSABT	<i>High performance liquid</i>
Cys	Cystéamine		<i>chromatography</i>
DCC	<b>D</b> icyclohexylcarbodiimide		<i>Hard and soft acid and base</i>
DDA	<b>D</b> odécylamine	I	<i>theory</i>
DDT	<b>D</b> odécane-thiol	i.v.	Intensité de fluorescence
DHF	<b>D</b> ihydrofolate	IDL	Intra-veineuse
DMAc	<b>D</b> iméthylacétamide	InAs	Intervalle <b>d</b> rogue- <b>l</b> umière
DMAP	4- <b>D</b> iméthylaminopyridine	InP	Arséniure d'indium
DMLA	<b>D</b> égénérescence <b>m</b> aculaire liée à l' <b>â</b> ge	IRM	Phosphure d'indium
DMSO	<b>d</b> iméthylsulfoxyde		<b>I</b> magerie par <b>r</b> ésonance
		Jeff	<b>m</b> agnétique
		Kd	Jeffamine D-400
			Constante de dissociation

L-cys	L-cystéine	siRNA	<i>Small interfering ribonucleotide acid</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>	TBP	Tri-butylphosphine
Leu (W)	leucine	Te <sup>2-</sup>	Ion tellurure
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>	TEM	<i>Transmission electronic microscopy</i>
MeOH	Méthanol	THF	Tétrahydrofurane
MEtOH	Mercaptoéthanol	THF	Tétrahydrofolate
MS	<i>Mass Spectroscopy</i>	Thr (T)	Tyrosine
m-THPC	<i>m-tétrahydroxyphényl-chlorine</i>	TMP/TDM	Tomographie d'émission monophotonique couplée tomodensitométrie
NaBH <sub>4</sub>	Borohydrure de Sodium	TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis Factor <math>\alpha</math></i>
NaH	Hydrure de Sodium	TOP	Tri-octylphosphine
NCx	Nanocristaux	TOPO	Oxyde de tri-octylphosphine
NHS	<b>n</b> -hydroxysuccinimide	TPGS	Vitamine E D- $\alpha$ -tocophéryl polyéthylène glycol 1000 succinate
NO	Monoxyde d'azote	TPP	Tétraphénylporphyrine
NP	Nanoparticule	Trp (L)	Tryptophane
NS	Nanosphère	VEGF	Vascular endothelial growth factor
ODE	Octadécène	ZnO	Oxyde de zinc
ORMOSIL	Organically modified silica	ZnS	Sulfure de zinc
PA	Principe actif	ZnSe	Séléniure de zinc
PAMAM	Poly(amidoamine)	$\Phi_{\text{fluo}}$	Rendement quantique de fluorescence
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>	$\Phi_{\Delta}$	Rendement quantique de production 'oxygène singulet
PbSe	Séléniure de plomb		
PDT	<i>Photodynamic therapy</i>		
PEG	Polyéthylène glycol		
PEG <sub>2</sub>	2,2'-éthylènedioxy-bis-éthylamine		
PEI	Poly(éthylène imine)		
Ph <sub>2</sub> O	Diphényl éther		
PLA	Poly(DL-lactide)		
PLA-TPGS	Poly(lactide)-vitamine E D- $\alpha$ -tocophéryl polyéthylène glycol 1000 succinate		
PLGA	Poly(DL-lactide-co-glycolide)		
PMX	Pemetrexed		
PPI	Poly(propylène imine)		
PpIX	Protoporphyrine IX		
Pro (P)	Proline		
PS	Photosensibilisateur		
QDs	Quantum dots		
R <sub>3</sub> P	tri-alkylphosphine		
R <sub>3</sub> PO	oxyde de tri-alkylphosphine		
RAF	Récepteur à acide folique		
RMN	Résonance magnétique nucléaire		
SC	Semi-conducteur		
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i>		

*Introduction générale*  
&  
*Objectifs*



## **Introduction Générale & objectifs.**

En cancérologie, la thérapie photodynamique (PDT) représente une alternative par rapport aux traitements classiques que sont la chirurgie, la chimiothérapie ou la radiothérapie. Elle peut être utilisée pour traiter certaines petites tumeurs localisées et son principe repose sur l'action combinée au niveau tumoral de trois éléments : l'oxygène, la lumière et une molécule photoactivable non toxique à l'obscurité, le photosensibilisateur (PS). Le PS, suite à une irradiation lumineuse de longueur d'onde appropriée et en présence d'oxygène, va induire des réactions photochimiques qui vont aboutir à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) hautement toxiques pour les cellules, dont l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ). La nécessité de la présence de ces trois éléments pour la PDT rend ce traitement local, facile à mettre en place et présente des risques réduits pour le patient. Cependant, cette stratégie montre des limites, notamment dans certains cas la faible pénétration dans les tissus des rayonnements nécessaires à l'activation du PS, limitant ainsi la PDT à un traitement de tumeurs superficielles, le photoblanchiment des PSs utilisés qui diminue l'efficacité du traitement, ou encore la faible sélectivité des PSs envers les tissus à traiter. En effet, si les PSs s'accumulent dans la tumeur, ils s'incorporent également dans les tissus sains. Ceci génère des effets secondaires indésirables pour le patient, comme une photosensibilisation prolongée de la peau pouvant durer jusqu'à plusieurs semaines.

Depuis les débuts de la PDT, de nombreux travaux portent sur le développement de PS ayant des longueurs d'onde d'absorption proches de l'infrarouge et une distribution cellulaire spécifique. Dans le but d'une amélioration de la PDT anticancéreuse, nos travaux ont abordé différents aspects : dans une première partie, la vectorisation par le développement de la fonctionnalisation asymétrique de vecteur de type dendrimère par des PSs de type porphyrine ; dans une seconde partie, l'utilisation (synthèse, caractérisation chimique, photophysique et validation *in vitro*) d'une nouvelle classe de PSs potentiels encore assez peu exploités, les quantum dots (QDs) ; l'adressage, par la conjugaison de ces QDs à l'acide folique (AF).

Ce manuscrit comprend, dans un premier chapitre, la synthèse bibliographique concernant la PDT. Son historique, sa définition ainsi que son principe y sont successivement abordés avant de décrire ses mécanismes d'actions. Ces aspects sont ensuite complétés par une vue

générale des différentes générations de PS utilisés, ainsi que les différentes stratégies d'adressage et de vectorisation décrites dans la littérature. Ce chapitre s'achève sur la description de l'intérêt de l'utilisation de nano-objets en PDT.

Un second chapitre aborde la vectorisation de PS par des dendrimères. Des généralités sur la structure, les différentes voies de synthèse ainsi que les propriétés des dendrimères y sont déjà décrites dans un premier temps, avant d'aborder nos travaux sur la synthèse de composés PS/dendrimères. La fonctionnalisation asymétrique de dendrimères de type PAMAM par des PS de type porphyrines est présentée sous forme de résultats publiés (Morosini *et al.* Tetrahedron Lett., 2006), suivie par l'étude des propriétés photophysiques des structures obtenues.

Un troisième chapitre est consacré à une revue bibliographique des QDs, où nous présentons le concept de nanoscience ainsi que son historique. Par la suite, nous décrivons la composition chimique des QDs, leurs propriétés photophysiques et les différents principes régissant leur synthèse ainsi que leur croissance. Ce chapitre illustre également les différentes voies de synthèses possibles utilisées dans la littérature de QDs ainsi que leurs différentes méthodes de fonctionnalisation.

Le quatrième chapitre relate les résultats sur la synthèse de QDs adaptés à une utilisation en PDT anticancéreuse, c'est-à-dire ayant une absorption située dans les rayonnements rouges ou proche infrarouge. Au cours de ce chapitre, nous présentons les résultats des différentes méthodes de synthèses expérimentées ainsi que les différents outils de caractérisation à notre disposition. La présentation de l'électrophorèse capillaire de zone (ECZ), technique que nous avons développée dans le cadre de son application à la caractérisation de QDs, est également décrite. L'article présentant ces résultats (Clarot *et al.* Current Nanoscience, 2009), est inclus en fin de chapitre.

Dans un cinquième chapitre, nous abordons l'adressage de principes actifs par l'acide folique (AF). Nous y présentons l'AF, sa structure ainsi que son rôle biologique. Par une description des différents récepteurs à l'acide folique (RF) identifiés, nous établissons l'intérêt d'un adressage de molécules par l'AF. Nous citons par la suite plusieurs exemples d'utilisation de cet adressage par l'AF, aussi bien en imagerie médicale qu'en traitement anticancéreux.

Après avoir évoqué l'intérêt que suscite un adressage par l'AF, nous présentons dans un sixième chapitre nos résultats issus des différentes stratégies de conjugaison employées lors du couplage de QDs à l'AF *via* deux bras espaceurs différents de type polyéthylène glycol. L'étude des propriétés photosensibilisatrices des QDs couplés à l'AF a été réalisée en suivant une méthodologie des plans d'expérience, où nous avons pu évaluer l'activité photodynamique des QDs ainsi que l'impact des différents facteurs expérimentaux (adressage par l'AF, concentration en QD, fluence, temps d'incubation, longueur d'onde d'excitation et lignée cellulaire) sur la photocytotoxicité. Ces résultats originaux sont soumis à publication.

Un septième chapitre présente la conclusion générale, qui reprend les résultats essentiels de nos travaux, ainsi que les perspectives de développement de ce travail.



***La thérapie photodynamique  
(PDT) :***  
***Synthèse bibliographique***



# **Chapitre I: La thérapie photodynamique; synthèse bibliographique**

## **I. Rappel historique**

Les vertus thérapeutiques de la lumière sont connues depuis l'Antiquité. En effet, il y a quelques 6000 années, les malades d'Egypte antique, d'Inde et de Chine recouraient à l'exposition au soleil. Les Egyptiens utilisaient déjà à l'époque la lumière combinée à des substances naturelles pour traiter des maladies de peau. La pratique des bains de soleil s'est perpétuée à travers l'Histoire de la Grèce antique jusqu'au XIX<sup>ème</sup> siècle, aussi bien pour traiter des affections cutanées que le scorbut, le rachitisme ou la psychose. C'est à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle que le médecin danois Niels Finsen fit la première description scientifique d'un traitement utilisant de la lumière avec succès dans le cadre d'une maladie : il découvrit que l'application d'une lumière de couleur rouge pouvait avoir des effets bénéfiques sur la variole en empêchant la suppuration des pustules.<sup>1</sup>

Le concept de photosensibilisation apparaît en 1898 quand Oscar Raab, alors étudiant en thèse à Munich sous la direction du professeur Tappeiner, décrit pour la première fois ce qui sera connu plus tard sous le nom d'effet photodynamique. Il mit en effet en évidence que l'association d'un colorant (l'acridine) et de lumière, qui pris séparément n'ont pas d'action toxique, entraîne la mort de paramécies de type *Infusoria*.<sup>2</sup> Il postula alors que cet effet était certainement dû à un produit résultant du transfert d'énergie de la lumière au composé chimique. La grande particularité de cette approche est qu'elle reposait non pas sur l'utilisation d'un effet direct de la lumière, mais sur la transformation de l'énergie lumineuse en « énergie chimique » par l'intermédiaire d'une molécule photosensibilisatrice.

En 1903, Tappeiner en collaboration avec Jesionek, un dermatologue, traitèrent avec succès un cancer cutané par utilisation conjointe d'une application topique d'éosine Y et d'une exposition à la lumière blanche.<sup>3</sup> En 1904, Tappeiner supposa que l'oxygène était essentiel pour ce processus, et poursuivant ses travaux par la suite avec Jodlbauer, ils démontrèrent l'importance de l'oxygène dans ce nouveau traitement.<sup>4</sup> Tappeiner introduisit alors pour la première fois le terme « d'action photodynamique ». Ces résultats seront confirmés par Hasselbach en 1909.<sup>5</sup> Il fut en effet le premier à rapporter le caractère phototoxique de l'hématoporphyrine (Hp), un dérivé de l'hème (l'un des constituants du sang) en travaillant sur des souris.<sup>6</sup> En 1912, Meyer-Betz se livra à une expérience sur lui-même en

s'injectant 200 mg d'hématoporphyrine afin de prouver que les résultats de phototoxicité observés chez la souris pouvaient s'appliquer à l'homme. Il constata que tant qu'il ne s'exposait pas au soleil, rien ne se produisait. En revanche, consécutivement à une exposition à la lumière solaire, une réaction spectaculaire eut lieu, entraînant une hyperpigmentation de la peau et un œdème généralisé, symptômes qui persistèrent plusieurs semaines et qui témoignèrent d'une hypersensibilisation à la lumière. En 1924, Policard mit en évidence la fluorescence spontanée de tumeurs exposées à une lumière ultraviolette, phénomène interprété comme résultant de l'accumulation d'hématoporphyrine endogène (biosynthétisée par l'organisme) dans les cellules tumorales.<sup>7</sup> En s'appuyant sur les travaux de Policard, Auler et Banzer furent en 1942 les premiers à étudier l'accumulation et son action sensibilisatrice au sein de tumeurs d'hématoporphyrine injectée.<sup>8</sup> Figge confirma l'affinité de cette molécule pour les tissus tumoraux et suggéra la possibilité d'utiliser l'hématoporphyrine pour localiser les zones tumorales chez l'homme.<sup>9</sup>

En 1955, Schwartz prouva par une série d'expériences que l'hématoporphyrine commerciale n'était pas pure et la purifia. Il constata que le produit pur était moins sélectif vis-à-vis des cellules tumorales que le produit commercial.<sup>10</sup> En 1961, Lipson proposa de purifier l'hématoporphyrine par un lavage avec un mélange d'acide acétique et d'acide sulfurique. Le produit obtenu, appelé HpD (« Hematoporphyrin Derivative ») qui est en fait un mélange complexe de porphyrines, sera utilisé pour traiter des patients atteints de tumeurs cancéreuses du poumon.<sup>11</sup>

Ce n'est qu'au cours des années 1970 que la PDT (pour « PhotoDynamic Therapy ») connaîtra un véritable essor avec les expérimentations de Dougherty, qui fonda un groupe de recherche sur la PDT. Il utilisa en 1975 avec succès l'HpD couplée à une lampe à arc à xénon dans le traitement de tumeurs mammaires chez les souris.<sup>12</sup> En 1978, il réalisa les premiers essais chez l'homme et obtint des résultats encourageants.<sup>13</sup> Il remplaça, par la suite, la lampe à arc à xénon par le laser, qui permet de se focaliser sélectivement sur la zone à irradier. Toujours pionnier dans le domaine, il identifia entre 1983 et 1985 les fractions actives de l'HpD conférant les propriétés photosensibilisatrices au mélange (l'éther et l'ester de dihématoporphyrine).<sup>14</sup>

En 1985, une fraction enrichie en composés les plus actifs de l'HpD, le porfimer sodium ou Photofrin<sup>®</sup> constitué d'un mélange de porphyrines dans différents états (monomères, dimères et oligomères) ou présentant des liaisons chimiques différentes (éthers et esters),<sup>15</sup> est

commercialisée. Entre 1986 et 2000, le Photofrin® sera le seul photosensibilisateur utilisé en clinique humaine, ayant reçu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) dans plusieurs pays (USA, France, Japon...). En 2006, il est toujours utilisé dans le traitement des tumeurs obstructives de l'œsophage (œsophage de Barrett) ou des bronches. D'autres molécules ont également obtenu une AMM et sont présentées dans le tableau 1.<sup>16</sup>

**Tableau 1. Photosensibilisateurs utilisés cliniquement et leurs principales indications thérapeutiques.**

Nom commercial	Photosensibilisateur	$\lambda_{\text{max}}$ absorption (nm)	Indication thérapeutique	AMM
<i>Photofrin</i> ®	HpD, Porfimère de sodium	630	Cancer du poumon non à petites cellules et de l'œsophage (palliatif)	Oui <sup>a</sup>
<i>Levulan</i> ®	Acide 5-aminolévulinique (ALA), précurseur de la Protoporphyrine IX	635 (PpIX)	Kératoses actiniques	Oui <sup>b</sup>
<i>Metvix</i> ®	Ester d'ALA, précurseur de la Protoporphyrine IX	635	Kératoses actiniques Carcinomes basocellulaires	Oui <sup>c</sup>
<i>Foscan</i> ®	Tempofrin, <i>mé</i> -tétrahydroxyphénylchlorine	652	Cancer de la tête et du cou (palliatif)	Oui <sup>d</sup>
<i>Hexvix</i> ®	Hexyl $\delta$ -aminolévulinic acid	635 (PpIX)	Cancer de la vessie	Oui <sup>e</sup>
<i>Visudyne</i> ®	Verteoporphin, Dérivé monoacide de la Benzoporphyrine	690	DMLA exsudative	Non
<i>Photosense</i> ®	Phtalocyanine aluminium	670	Cancer de la tête et du cou	Oui <sup>f</sup>
<i>SnET2</i> ®	Etiopurpurine étain	660	Cancer du sein, prostate et sarcome de Kaposi	Non
<i>Xcytrin</i> ®	Texaphyrine	732	Cancer de la prostate, DMLA	Oui <sup>g</sup>
<i>Photoditazine</i> ®	Chlorine e6	662	Cancer du poumon et de la prostate	Oui <sup>f</sup>
<i>Benzvix</i>	Acide benzyl $\delta$ -aminolévulinique	635	Tumeurs gastro-intestinales	Non
<i>BOPP</i>	Protoporphyrine borée	630	Tumeurs cérébrales	Non
<i>Lu-Tex</i>	Texaphyrine lutetium	720-760	Tumeurs cérébrales, cancer de la prostate et du col de l'utérus	Non
<i>Pc-4</i>	Phthalocyanine-4	670	Lésions cutanées/sous-cutanées de tumeurs solides de diverses origines	Non
<i>Photochlor</i>	2-(1-Hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheo-phorbide-alpha	650	Carcinome des cellules basales	Non

<sup>a</sup> : Canada, Etats-Unis (USA), Royaume Uni (RU) et Union Européenne (UE) ; <sup>b</sup> : UE et USA ; <sup>c</sup> : UE et Australie ; <sup>d</sup> : UE, Islande et Norvège ; <sup>e</sup> : UE ; <sup>f</sup> : Russie ; <sup>g</sup> : USA.

## **II. Définition et principe**

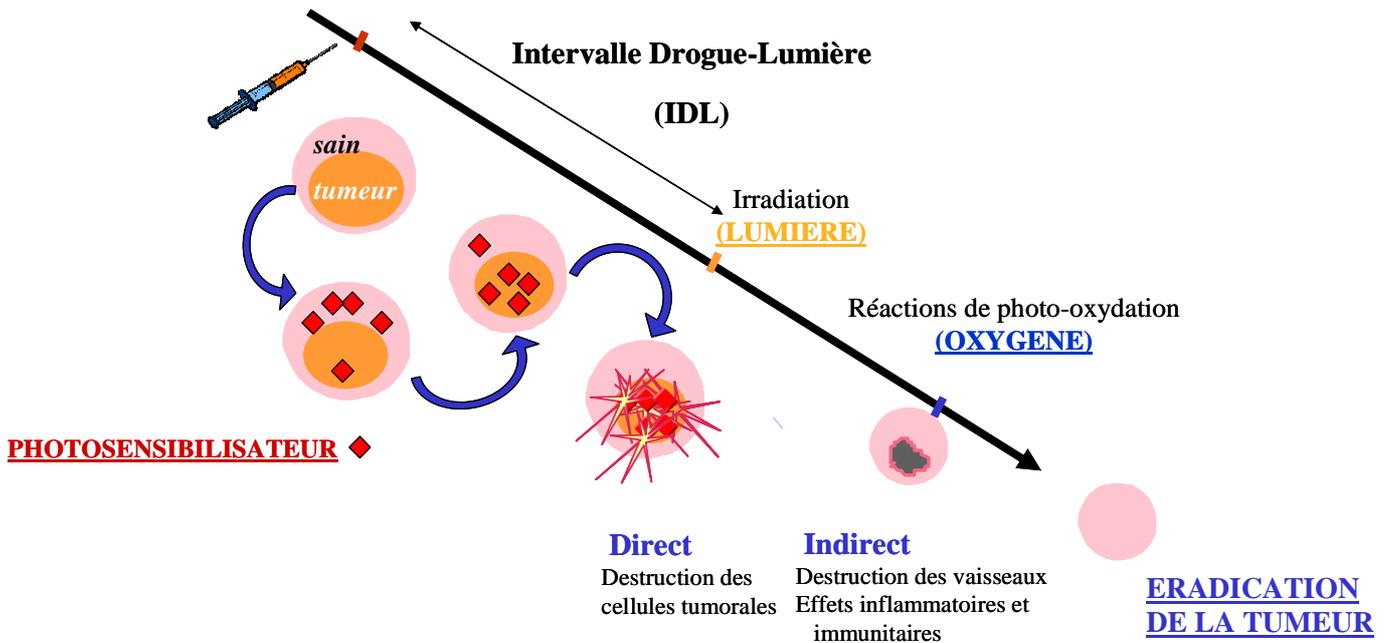
La PDT est une technique de traitement basée sur l'utilisation de molécules photosensibilisatrices (PS), non cytotoxiques à l'obscurité, et qui vont être activées par une irradiation lumineuse, de longueur d'onde appropriée (dépendante du PS). L'activation du PS va aboutir à la génération d'espèces fortement cytotoxiques (le plus souvent l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$ , mais aussi des espèces réactives de l'oxygène (EROs)) pour les cellules hôtes des PS.

La PDT anti-tumorale est un traitement local ou locorégional utilisé pour réduire le volume d'une tumeur massive, obtenir une cure radicale d'une petite tumeur superficielle, ou après échec d'une thérapie standard par chimiothérapie ou radiothérapie. Cette technique est utilisée pour traiter certains cancers (poumon,<sup>17</sup> tête et cou,<sup>18</sup> peau,<sup>19</sup> prostate,<sup>20</sup> vessie,<sup>21-22</sup> des kératoses actiniques<sup>23</sup>). La PDT est également préconisée dans le traitement de certaines maladies en dermatologie,<sup>24</sup> également en ophtalmologie dans le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA, une maladie ophtalmique engendrée par l'apparition et la croissance anarchique de néo-vaisseaux sanguins au niveau de la rétine<sup>25</sup>). Des travaux sont toujours en cours sur une utilisation de la PDT en tant qu'alternative aux antibiotiques dans la désinfection des plaies<sup>26</sup> ou encore le traitement de caries.<sup>27</sup> L'axe principal de recherche reste cependant le développement de son potentiel antitumoral. En effet, la plupart des PS montre une affinité relative envers les tissus tumoraux, qui reste toutefois très variable en fonction de l'étude, du PS et du modèle utilisé.

Dans le cas d'un traitement anticancéreux, le PS est administré dans un premier temps à un patient, le plus souvent par voie intra-veineuse (i.v.), mais aussi de manière topique pour un traitement de lésions superficielles, notamment cutanées. Une fois dans le sang, le PS va se lier à certaines protéines plasmatiques (lipoprotéine, albumine, globuline) en fonction de ses caractéristiques physico-chimiques, qui vont ensuite l'acheminer vers les différents tissus. Dans le cas idéal, cette distribution tendra à se faire, idéalement, préférentiellement vers les tissus néoplasiques.

Dans un second temps, la tumeur va être illuminée localement par une lumière visible si possible monochromatique, dont la longueur d'onde va correspondre à un maximum d'absorption du PS.<sup>28</sup> On utilise généralement un rayonnement laser, guidé jusqu'à la tumeur *via* une fibre optique et un diffuseur de lumière. Cette irradiation du PS en présence

d'oxygène va induire des réactions de photo-oxydation, qui vont aboutir à la destruction des cellules tumorales ciblées. Un délai devra être respecté entre l'administration et l'irradiation, pouvant aller de quelques minutes à plusieurs jours. Ce délai, appelé Intervalle-Drogue Lumière (IDL) et qui est fonction de la pharmacocinétique du PS et de l'application clinique, correspond à la durée nécessaire pour une localisation du PS en faveur de la tumeur par comparaison aux tissus sains.<sup>29</sup> Le principe de la PDT est illustré Figure 1.



**Figure 1. Principe de la PDT.**

Comparé à la radiothérapie, le rayonnement utilisé pour la PDT, situé dans le visible donc de moindre énergie, est inoffensif en tant que tel et non mutagène.<sup>15</sup> La sélectivité de la PDT pour les tissus cibles va résulter :

- du caractère localisé de l'irradiation lumineuse au niveau du site tumoral,
- de la localisation souvent préférentielle du PS dans les tissus tumoraux,
- de la faible durée de vie de l'oxygène singulet : celui-ci est en effet désactivé avant de pouvoir diffuser hors de la cellule dans laquelle il a été produit.<sup>15</sup>

Toutefois, du fait de l'utilisation d'une lumière peu pénétrante dans les tissus, la PDT est surtout appliquée pour des tumeurs accessibles directement (tumeurs cutanées) ou par voie

endoscopique (œsophage, vessie), ou certaines tumeurs solides en y insérant directement les fibres optiques (PDT interstitielle pour la prostate, le pancréas ou le foie par exemple<sup>30</sup>).

De plus, certains problèmes, comme le calcul d'une dosimétrie adéquate, limitent la standardisation de la PDT en clinique. La faible sélectivité des espèces photosensibilisatrices vis-à-vis des tissus tumoraux reste également un facteur limitant. Il en résulte souvent une accumulation des PS dans les tissus sains, pour des durées pouvant aller de deux semaines à deux mois, ce qui peut aboutir à une sensibilisation cutanée rémanente ou à l'apparition de lésions lors du traitement de cavités internes complexes où il est difficile de bien délimiter l'irradiation. C'est pour cela que la PDT est actuellement utilisée en traitement curatif des cancers superficiels à des stades précoces ou en traitement palliatif (après échec de la radiothérapie et de la chirurgie).

### **III.Mécanismes et réactions photochimiques**

L'activité photodynamique d'un PS est basée sur les principes photophysiques d'interaction onde/matière entre la lumière d'excitation et l'agent photosensibilisateur et de divers processus de transferts d'énergie ou d'électrons entre le PS excité et son environnement.

Lorsqu'un photon entre en collision avec de la matière, l'énergie  $E$  de celui-ci, qui est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde (équation 1), peut être absorbée par un atome ou une molécule.

$$E(J) = h.c/\lambda \quad (1)$$

$h$  : constante de Planck  $\approx 6,626.10^{-34}$  J.s

$c$  : célérité de la lumière dans le vide = 299 792 458 m.s<sup>-1</sup>

$\lambda$  : longueur d'onde du photon en mètre.

Cette énergie absorbée par la matière va alors permettre à un des électrons se trouvant sur l'orbitale moléculaire occupée de plus haute énergie (HOMO pour *Highest Occupied Molecular Orbital*), de passer à l'orbitale moléculaire inoccupée de plus basse énergie (LUMO pour *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*). Ce phénomène, nommé processus d'excitation, ne va cependant pouvoir se produire que si l'énergie apportée par le photon incident correspond au minimum à l'écart énergétique séparant l'orbitale HOMO de l'orbitale LUMO. Ainsi, la répartition des niveaux d'énergie des HOMO et LUMO au sein de la

matière, va définir les longueurs d'onde susceptibles d'engendrer ce processus d'excitation. Il est donc primordial pour une action efficace en PDT, d'utiliser une lumière adaptée au PS utilisé.

Le PS ainsi excité va ensuite retourner à son état fondamental par divers processus que l'on sépare en deux catégories : les désexcitations non-radiatives ou radiatives.

Les désexcitations non-radiatives font intervenir des chocs intermoléculaires ou la génération de vibrations moléculaires, l'énergie étant alors restituée sous forme de chaleur ou dans certains cas, est transformée en énergie chimique par transfert vers les molécules avoisinantes. Dans le cas des phénomènes de relaxation radiative, l'énergie absorbée par le composé va être restituée sous la forme d'émission d'un photon moins énergétique que celui reçu. Les désexcitations radiatives sont connues sous le nom de fluorescence (désexcitation à partir de l'état singulet excité) ou de phosphorescence (désexcitation à partir de l'état triplet excité). Ces deux événements radiatifs se distinguent par la multiplicité des niveaux d'énergie mis en jeu, cette multiplicité dépend de la valeur de spin maximum au sein du niveau (Tableau 2). Selon le principe d'exclusion de Pauli, deux électrons ne peuvent avoir les mêmes valeurs de spin au sein d'une même orbitale, vont alors prendre des valeurs opposées (+1/2 et -1/2), et selon la règle de Hund, les électrons vont s'apparier selon la règle du spin global maximum (S), c'est-à-dire en évitant l'appariement. Lorsque tous les électrons du plus haut niveau d'énergie occupé d'une molécule sont appariés, la valeur globale de spin ne peut être que de 0, la multiplicité est de 1, la molécule M considérée est donc dans un état singulet que l'on notera ici  $^1M$ . Inversement, dans le cas où deux électrons d'un même niveau ne seraient pas appariés, la valeur globale de spin peut prendre trois valeurs différentes : 1 (+1/2 et +1/2), 0 (+1/2 et -1/2) ou -1 (-1/2 et -1/2), la multiplicité est de 3, c'est un état triplet que l'on note  $^3M$  (Tableau 2). De façon générale, la multiplicité d'un état se définit par la formule  $2S+1$  où S est la valeur maximale du spin global du niveau.<sup>31</sup>

**Tableau 2.** Arrangements électroniques et valeurs globales de spin possibles en fonction de la multiplicité des états considérés.

Valeur globale du spin	Etat singulet	Etat triplet
+1		$\uparrow \quad \uparrow$
0	$\uparrow \downarrow$	$\uparrow \quad \downarrow$
-1		$\downarrow \quad \downarrow$

La probabilité de transition entre deux niveaux électroniques dépend de plusieurs facteurs, l'un des plus importants étant leur multiplicité. En effet, si la transition entre deux états de même multiplicité est une configuration favorable avec une forte probabilité d'occurrence (généralement d'un état singulet vers un autre état singulet), les transitions entre deux états dont les valeurs globales de spin global sont différentes ont, au contraire, peu de chances de se produire, elle est dite « interdite » (Figure 2). Si une désexcitation radiative se produit entre deux niveaux de même multiplicité, généralement entre deux états singulets, elle a une forte probabilité d'occurrence, ce qui est le cas de la fluorescence. Comme la probabilité de transition est grande, le temps écoulé entre l'absorption d'un photon incident et l'émission d'un photon de fluorescence est relativement court (de l'ordre de la nanoseconde). En revanche, les transitions entre deux niveaux de multiplicités différentes ayant de faibles chances de se produire, les temps mis en jeu lors de relaxations radiatives sont plus longs (de l'ordre de la seconde à plusieurs heures). C'est le cas de la phosphorescence, avec passage d'un état triplet excité vers un état singulet fondamental.

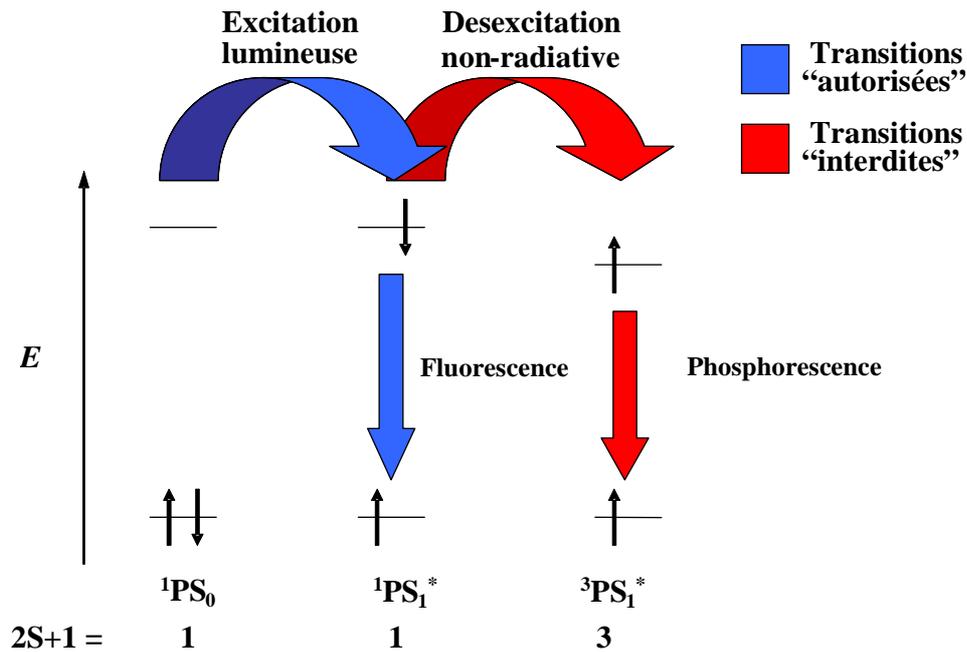


Figure 2. Représentation des transitions électroniques au sein d'un PS en fonction de son état de multiplicité.

### III.1 Principe photophysique

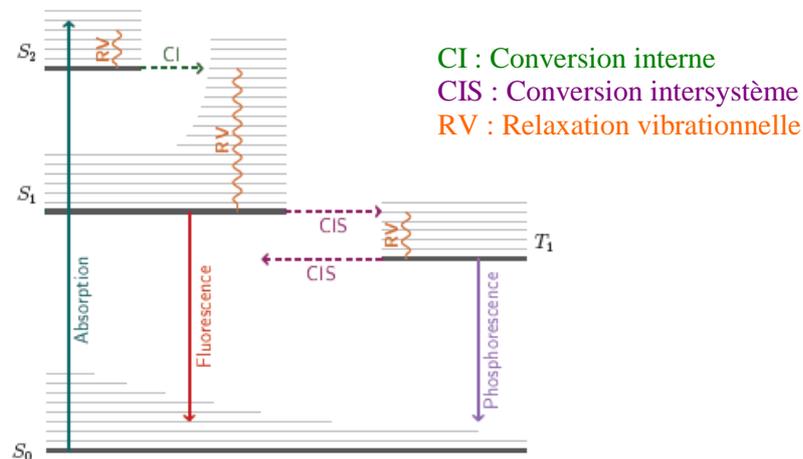
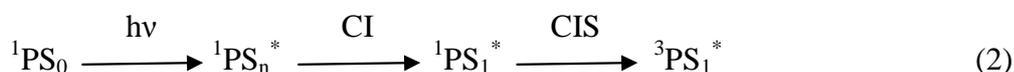


Figure 3. Diagramme simplifié de Perrin-Jablonski.

D'après le diagramme simplifié de Perrin-Jablonski (Figure 3), le PS, initialement à son état énergétique fondamental singulet ( $1PS_0$ , orbitale HOMO), va passer après absorption d'un photon d'énergie  $h\nu$  appropriée, à un état singulet excité ( $1PS_1^*$ ,  $1PS_2^*$  ...  $1PS_n^*$ ) qui correspond à un état d'énergie supérieure. Par une succession de relaxations vibrationnelles

(qui sont des conversions internes, CI), le PS va revenir à son état excité de plus basse énergie ( $^1\text{PS}_1^*$ , LUMO). Par conversion inter-système (CIS), le PS peut aussi passer à un état triplet excité ( $^3\text{PS}_1^*$ , équation 2) :

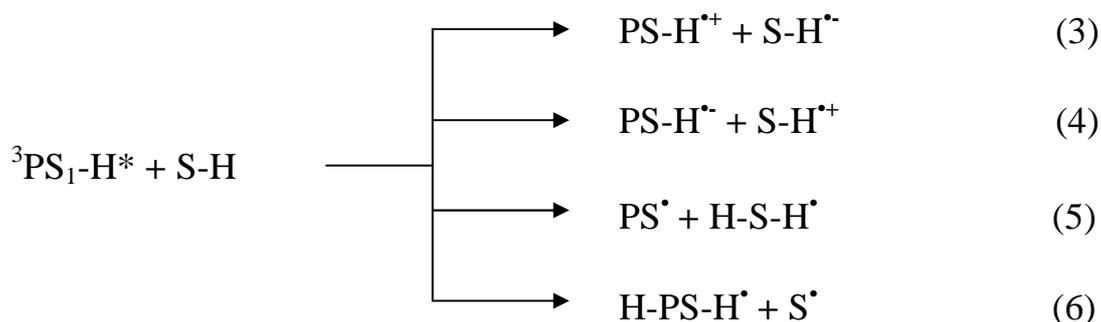


La durée de vie de cet état triplet excité va alors être longue (de quelques  $\mu\text{s}$  à 1s, en fonction de l'environnement du PS), et va alors permettre au PS de générer des espèces photo-actives à partir des deux voies principales de photo-oxydation de type I et II.

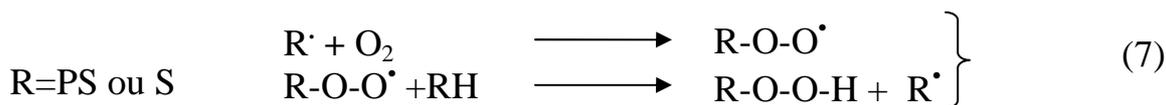
Pour le mécanisme de type I, le PS à l'état triplet va réagir directement avec le substrat cellulaire (S-H) pour former des espèces réactives de l'oxygène (EROs). En revanche, pour les réactions de type II, il va s'agir d'un transfert d'énergie entre l'état triplet du PS vers l'oxygène moléculaire tissulaire.<sup>32</sup>

### III.2 Type I

Dans les réactions photochimiques de type I, des radicaux libres ou des ions radicaux vont être générés, suite au transfert d'un électron (équations 3 et 4) entre le PS à l'état triplet ( $^3\text{PS}_1\text{-H}^*$ ) et des substrats biologiques (S-H), ou suite au transfert d'un atome d'hydrogène entre le PS et le substrat (équation 5 et 6).



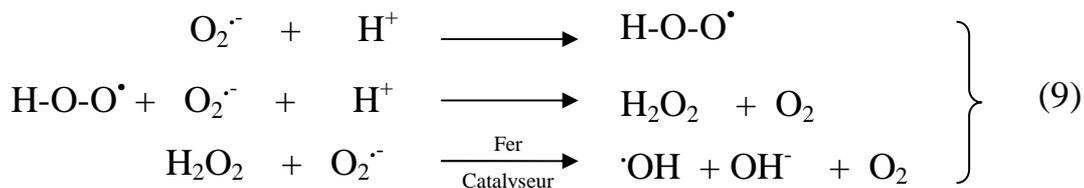
Les espèces radicalaires ainsi générées peuvent ensuite réagir rapidement avec l'oxygène moléculaire présent pour former des radicaux peroxydes, initiant ainsi une chaîne d'auto-oxydation (équation 7).



Les anions radicalux du PS et du S peuvent également réagir avec l'oxygène. Dans ce cas, le transfert d'électron qui se produit entre les deux réactifs aboutit à la formation de l'anion radical superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (équation 8).



L'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$  peut ensuite réagir directement avec différents substrats ou agir comme précurseur d'autres EROs (équation 9). Il intervient notamment dans la formation du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et du radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ). En conditions physiologiques,  $\text{H}_2\text{O}_2$  est produit par dismutation de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , qui repose sur la protonation de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  pour former son acide conjugué  $\text{HO}_2\cdot$ , suivie par la réaction de  $\text{HO}_2\cdot$  avec  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Le radical hydroxyle peut alors être produit au cours de la réaction de Fenton entre le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  et l'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .



Les différents EROs formées au cours des réactions photochimiques de type I ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OH}$ ) représentent des espèces oxydantes très puissantes pour une grande variété de biomolécules telles que le cholestérol ou encore les chaînes latérales de certains acides aminés (tryptophane, histidine et méthionine<sup>33</sup>).

### III.3 Type II

Les réactions photochimiques de type II ne reposent pas sur un transfert de matière (atome d'hydrogène ou électron) comme les réactions de type I, mais sur un transfert d'énergie. Ces réactions nécessitent la présence d'oxygène dès les premières étapes du processus, et que la différence d'énergie entre  $^3\text{PS}_1^*$  et  $^1\text{PS}_0$  soit supérieure à la différence d'énergie entre  $^1\text{O}_2^*$  et  $^3\text{O}_2$ , soit  $94 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .<sup>34</sup> Suite aux mêmes étapes initiatrices que pour les réactions de type I, le PS va se retrouver à l'état triplet excité  $^3\text{PS}_1^*$ . Du fait de la présence de deux électrons célibataires dans sa couche externe (HOMO), l'oxygène moléculaire à son état fondamental se

trouve à l'état triplet ( $^3\text{O}_2$ ). Un transfert d'énergie va alors être possible entre  $^3\text{PS}_1^*$  et  $^3\text{O}_2$  (transition permise car ce sont des états de même multiplicité), ce qui va aboutir à la formation d'oxygène singulet (état singulet excité,  $^1\text{O}_2^*$  ou  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ ) et au retour du PS à son état énergétique fondamental ( $^1\text{PS}_0$ , équation 10).



L'oxygène singulet  $^1\text{O}_2^*$  est une espèce très réactive et qui est susceptible de réagir avec des substrats cellulaires situés dans son proche environnement. Sa durée de vie est de 3  $\mu\text{s}$  en milieu aqueux et de 25-100  $\mu\text{s}$  dans les milieux organiques non polaires, qui constituent un modèle des régions lipidiques des cellules<sup>35</sup>). Dans le cytoplasme, sa durée de vie diminue jusqu'à 100 ns du fait de sa grande réactivité. Comme le coefficient de diffusion de  $^1\text{O}_2^*$  dans la cellule est de  $1,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ , son rayon maximal d'action est estimé à 30 nm avec l'équation 10.<sup>16</sup> Un grand nombre de substrats cellulaires tels que les acides aminés (cystéine, histidine, tryptophane, tyrosine et méthionine), les nucléosides (principalement la guanine) et les lipides insaturés peuvent réagir avec l'oxygène singulet.<sup>36</sup> L'oxygène singulet peut également réagir avec le PS à l'état fondamental pour former des produits d'oxydation dits photoproduits, lors d'un lors du processus de photoblanchiment ou de photomodification qui va aboutir à une extinction plus ou moins rapide de la fluorescence du PS. Certains de ces produits peuvent être eux-mêmes phototoxiques.

L'ensemble de ces processus va entraîner la dégradation d'un grand nombre de constituants cellulaires conduisant à la mort cellulaire par nécrose, apoptose, voire autophagie.<sup>37</sup>

La compétition entre ces deux mécanismes (type I et II) va être contrôlée par plusieurs paramètres, tels que la nature du photosensibilisateur et la concentration en oxygène.

#### **III.4 Les mécanismes d'éradication tumorale après thérapie photodynamique**

Comme nous l'avons décrit, la PDT repose sur l'administration (par voie topique ou systémique) d'un PS chez un patient, puis à l'irradiation de la partie à traiter afin d'y déclencher la cascade de réactions photochimiques décrites ci-dessus. Trois mécanismes ont été identifiés comme contribuant à la régression et/ou la destruction tumorale (Figure 4) :<sup>38</sup>

- un effet direct de destruction des cellules tumorales par nécrose, apoptose ou autophagie<sup>39</sup> ;
- un effet indirect par destruction de la vascularisation tumorale provoquant une privation de la tumeur en nutriments et oxygène et par conséquent la destruction tumorale ;
- un effet indirect dû à une réponse inflammatoire et immunitaire de l'hôte.

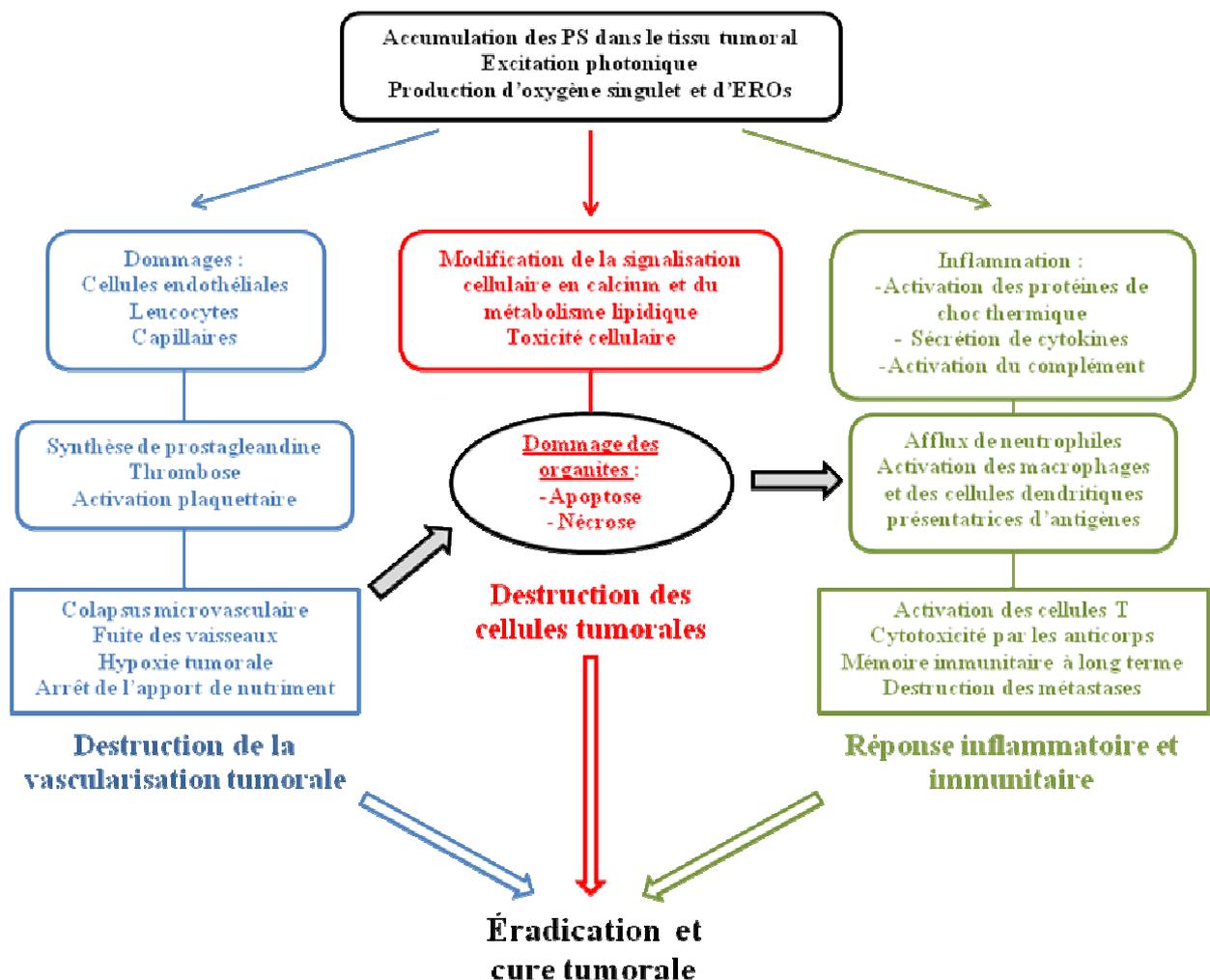


Figure 4. Mécanisme de destruction tumorale après PDT.

### III.4.1 Effets directs

Les dommages issus de l'irradiation et des réactions d'oxydation qui en découlent, vont se traduire par deux effets principaux : l'apoptose ou la nécrose des cellules tumorales.<sup>39</sup>

La nécrose est une forme rapide et violente de dégénération, un phénomène passif qui résulte le plus souvent d'une atteinte de la membrane cytoplasmique de la cellule. C'est une mort non programmée et accidentelle causée par des dommages physiques ou chimiques sévères. La cascade réactionnelle engendrée par un traitement PDT va aboutir à une destruction des organites ainsi qu'une peroxydation des lipides membranaires et ainsi causer la perte de l'intégrité membranaire. La cellule va alors gonfler à cause d'une entrée massive d'eau et d'électrolyte par pression osmotique, ce qui peut provoquer une rupture de la membrane. Le contenu du cytoplasme va alors se répandre à l'extérieur, et les enzymes cytoplasmiques et lysosomales ainsi libérées pouvant provoquer des réactions inflammatoires.<sup>40</sup>

L'apoptose ou mort cellulaire programmée, est une dégénérescence physiologique et génétiquement programmées, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Elle est régie à la fois par des signaux intra- et extra-cellulaires<sup>41</sup> (e.g. libération de cytochrome *c* et de TNF $\alpha$ , *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) conduisant à des modifications biochimiques et morphologiques. Ce type de mort cellulaire ne va pas engendrer d'inflammation, contrairement à la nécrose : les membranes plasmiques ne sont pas détruites<sup>42</sup> au cours de ce processus, et la cellule va émettre des signaux qui vont permettre sa phagocytose par des globules blancs, notamment les macrophages. Les mitochondries sont considérées comme l'organe clé de ce processus. Elles vont subir diverses modifications morphologiques et libérer le cytochrome *c*<sup>43</sup> dans le cytoplasme de la cellule. Le cytochrome va provoquer une cascade de réactions d'activation d'enzymes appelées les caspases effectrices.<sup>44</sup> Ces enzymes vont induire la mort cellulaire par la destruction d'éléments nécessaires à sa survie : la chromatine du noyau cellulaire, par exemple, sera découpée<sup>45</sup> de manière régulière (environ 180 paires de bases). Elles vont aussi participer au « bourgeonnement » de la cellule : il se forme des corpuscules qui, étant éliminés dans le milieu intercellulaire, emporteront des fractions du cytoplasme. Ces vésicules seront ensuite phagocytées par les cellules voisines ou les macrophages.

Des études plus récentes suggèrent une troisième voie de la destruction cellulaire qui pourrait être induite par la PDT : l'autophagie.<sup>46</sup> Si l'intégrité du lysosome est menacée, l'ensemble des enzymes lysosomales va se déverser dans le cytoplasme de la cellule. Une fois déversées, ces enzymes seront libres d'attaquer les organites de la cellule, provoquant par là même son « autodigestion ».

L'orientation vers l'un ou l'autre de ces trois phénomènes de destruction cellulaire va dépendre de la nature de la tumeur,<sup>37, 40</sup> de la dose de lumière (fluence, irradiance), mais aussi de la concentration, de la nature et surtout de la localisation intracellulaire du PS mais cela reste à définir. En revanche, il a été démontré que la combinaison de ces trois phénomènes est indispensable pour une éradication tumorale optimale à long terme<sup>29</sup>.

### III.4.2 Effets indirects

Le processus de cancérisation se produit en plusieurs étapes au cours desquelles les cellules malades vont progressivement modifier les tissus environnants. Dans un premier temps, l'ADN d'une ou plusieurs cellules va subir une dégradation qui conduit cette dernière à ne plus répondre aux signaux régulant la prolifération ou la mort cellulaire. Cette ou ces cellules vont ensuite se multiplier de manière anarchique, tout en perdant les caractéristiques structurales de la cellule d'origine. Par la sécrétion de diverses enzymes, les cellules cancéreuses modifient ensuite la matrice extracellulaire, favorisant l'invasion des tissus. Lorsque la taille dépasse quelques millimètres cubes, la tumeur, n'étant pas vascularisée, devient hypoxique, et ces cellules sécrètent alors une cascade de facteurs pro-angiogéniques, dont le VEGF est le chef de file.<sup>47-50</sup> Ces molécules vont provoquer le bourgeonnement des vaisseaux sanguins proches, puis la néo-vascularisation de la tumeur. La croissance tumorale peut ainsi reprendre, et le système vasculaire sanguin ou lymphatique peut disséminer des cellules cancéreuses dans l'organisme, provoquant l'apparition de nouveaux foyers métastatiques. Si la tumeur est autonome dans son comportement répliatif, elle n'en demeure pas moins dépendante de son environnement direct. Le traitement photodynamique peut agir indirectement sur la tumeur en influant sur cet environnement.

#### III.4.2.1 Effets anti-vasculaires

L'effet anti-vasculaire de la PDT consiste en des dommages vasculaires survenant après traitement et contribuant à long terme à l'éradication tumorale.<sup>51</sup> La PDT peut engendrer une

destruction du réseau vasculaire de la tumeur, soit par action sur les cellules endothéliales, soit par rupture de l'équilibre des facteurs de coagulation, engendrant la formation de thrombi et la stase vasculaire. Au niveau des cellules endothéliales, l'effet photodynamique peut engendrer la nécrose, l'apoptose ou la déformation du cytosquelette.<sup>52</sup> Ces modifications entraînent des fuites sanguines hors des vaisseaux, et l'adhésion de plaquettes, de globules rouges et de neutrophiles sur les parois. Ces adhésions contribuent à une réduction du diamètre interne des vaisseaux concernés, conduisant à des phénomènes de thromboses et de stases vasculaires. Lorsque le PS est circulant, les espèces oxydantes générées peuvent rompre l'équilibre des facteurs régulant la coagulation. Les espèces réactives interagiraient notamment avec le monoxyde d'azote (NO), une molécule vasodilatatrice et anticoagulante.<sup>53</sup> La PDT engendre donc des fuites vasculaires, des thromboses et des vasoconstrictions au niveau des tissus irradiés. Ces phénomènes provoquent « l'asphyxie » de la tumeur : n'étant plus suffisamment vascularisée, les déchets métaboliques s'accumulent dans les cellules et celles-ci deviennent hypoxiques. Les cellules tumorales sont éradiquées, conduisant à une réduction du volume tumoral.<sup>54</sup>

#### III.4.2.2 Effets immunitaires et inflammatoires

Les effets de la PDT anticancéreuse sur la réponse immunitaire se présentent sous deux aspects : un traitement PDT peut en effet induire soit une inflammation des cellules, soit une réponse antitumorale à long terme. Les modifications de la membrane plasmique ainsi que des membranes des organites cellulaires induites par la PDT sont issues d'une activation des phospholipases membranaires,<sup>55</sup> qui vont alors rapidement dégrader les phospholipides environnant, et des médiateurs de l'inflammation vont être déversés massivement dans le milieu extracellulaire.<sup>56</sup>

Les signaux inflammatoires post-PDT initient une invasion massive de neutrophiles, suivis par les mastocytes qui faciliteront à leur tour l'arrivée des monocytes et des macrophages.<sup>57</sup> Les épitopes présentés à la surface de ces macrophages<sup>58</sup> peuvent être reconnus par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Ces lymphocytes ainsi activés activent à leur tour des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques qui pourront détruire spécifiquement les cellules porteuses de ces épitopes.<sup>59-60</sup> Des études ont démontré une diminution de 70% de l'efficacité de la PDT par le Photofrin® chez des animaux déficients en neutrophiles,<sup>38</sup> ou encore l'impossibilité d'induire une seconde fois la même tumeur chez des rats traités avec succès par cette méthode. Ces résultats mettent en exergue l'importance de la réponse immunitaire dans le succès d'un

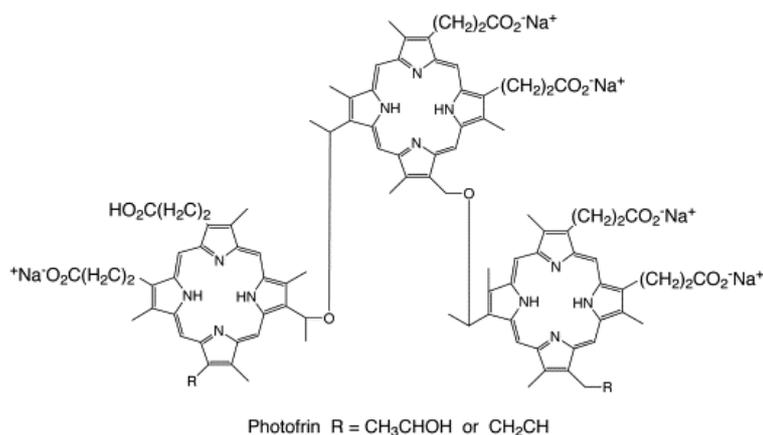
traitement photodynamique et surtout le rôle qu'elle peut jouer dans la prévention d'apparition des métastases. En effet, en stimulant le système immunitaire du patient par le mécanisme précédemment décrit, que l'on appelle vaccination *in situ*,<sup>61-63</sup> la PDT peut prévenir la dissémination des cellules malades et contribuer à la destruction de foyers métastatiques encore réduits.

#### **IV. Les photosensibilisateurs**

On peut définir la photosensibilisation comme le processus suivant lequel un changement photochimique ou photophysique se manifeste au niveau d'une entité moléculaire, comme conséquence de l'absorption initiale de radiations par une autre entité moléculaire appelée photosensibilisateur ou agent photosensibilisant (PS). La PDT se base sur la triple combinaison de la lumière, de l'oxygène moléculaire et d'un PS. Ces derniers, au même titre que l'oxygénation des tissus et les caractéristiques de la source de lumière, jouent donc un rôle déterminant dans le succès du traitement. Il existe des centaines de molécules naturelles ou synthétiques, des extraits de plantes aux macrocycles synthétiques, pouvant être utilisés en PDT. Dans ce paragraphe, nous allons décrire les différentes classes de PS utilisés en PDT ainsi que les propriétés requises pour un photosensibilisateur idéal.

##### **IV.1 Les dérivés de 1<sup>ère</sup> génération et le PS idéal**

Les photosensibilisateurs de première génération sont issus de l'hématoporphyrine (Hp) et de l'hématoporphyrine dérivée (HpD). La fraction purifiée de l'HpD qui possède l'action la plus efficace contre les tumeurs se compose d'oligomères de porphyrines (jusqu'à 8-9 unités). L'HpD et sa version commerciale Photofrin® (I et II, Figure 5) ont permis le développement de la PDT. En plus de son efficacité, cette molécule est obtenue par un procédé facile à mettre en œuvre<sup>64</sup> et possède un taux de pénétration dans les tissus élevé.<sup>65</sup>

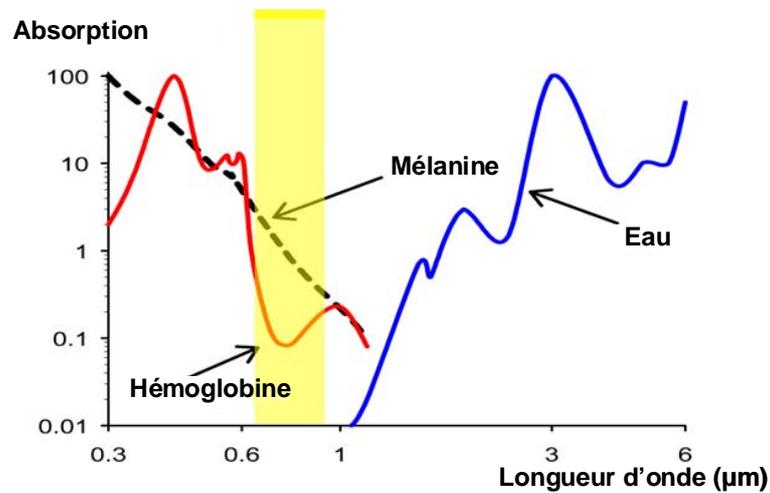


**Figure 5. Structure du Photofrin®**

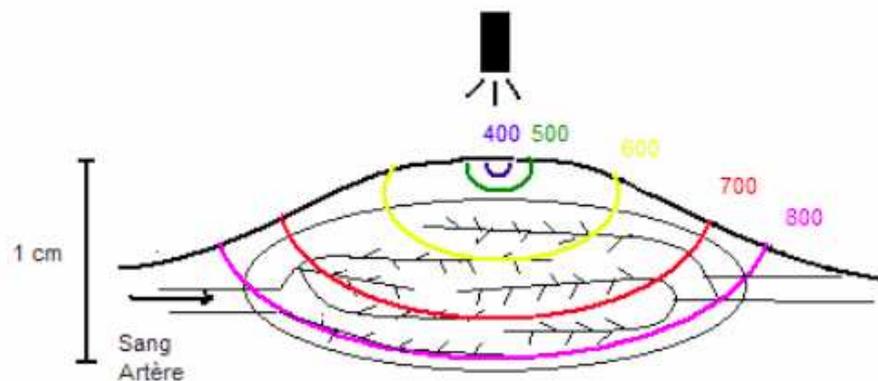
Cependant, l'utilisation du Photofrin® présente de nombreux inconvénients. Tout d'abord, ces dérivés de porphyrine, synthétisés dans les années 70, ne sont pas purs et sont en fait un mélange complexe mal défini dont la composition est difficile à reproduire,<sup>66</sup> ce qui complexifie les études mécanistiques de type pharmacocinétique/pharmacodynamie. Le Photofrin® possède également un faible coefficient d'extinction molaire dans le rouge, et sa durée de vie importante dans l'organisme (de 3 à 5 semaines) peut entraîner un risque de photosensibilisation généralisée,<sup>67-68</sup> d'autant plus que l'HpD présente une faible sélectivité pour les tissus cibles.<sup>14</sup> L'utilisation de PS de première génération présente donc de nombreux inconvénients qui ont conduit à la définition du PS idéal pour une utilisation en PDT.

Pour être optimal, un PS doit présenter, en termes de propriétés photophysiques, un fort coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde d'excitation, un rendement quantique en oxygène singulet élevé ainsi qu'une absorption dans les longueurs d'onde rouge voire proche infrarouge. Cette dernière propriété est importante pour une PDT efficace en profondeur, du fait de la présence de composés endogènes absorbants la lumière (principalement l'hémoglobine, Figure 6) et de la diffusion plus importante des rayonnements de plus haute énergie (donc de plus faible longueur d'onde) au sein des tissus organiques (Figure 7). Plus la longueur d'onde se rapproche de 800 nm, plus la lumière incidente est pénétrante et le traitement efficace (Figure 7).<sup>64</sup> Afin de s'assurer d'un traitement le plus en profondeur possible dans la tumeur, il est donc nécessaire d'utiliser un PS capable d'absorber dans ce domaine de grandes longueurs d'onde (rouge et proche infrarouge), et d'utiliser évidemment une source de lumière adaptée à ce PS. Du point de vue de l'intensité, le photosensibilisant

doit posséder des bandes ayant un coefficient d'extinction molaire maximal pour que la quantité de médicament requise soit minimale.<sup>69</sup>



**Figure 6. Spectre d'absorption des principales molécules biologiques endogènes des tissus.**



**Figure 7. Profondeur de pénétration des rayonnements lumineux dans les tissus en fonction de leur longueur d'onde (nm).**

Ce PS idéal devra répondre aux critères chimiques, photophysiques et biologiques suivants :

- Pureté chimique, composition constante et facilité de synthèse ;
- Toxicité à l'obscurité faible, voire nulle ;
- Caractéristiques photophysiques appropriées :
  - coefficient d'extinction molaire élevé, à des longueurs d'onde situées dans la « fenêtre thérapeutique », c'est-à-dire situé dans la région rouge/ proche infrarouge (600-850 nm) du spectre de la lumière visible,

afin de permettre une pénétration tissulaire et une absorption de lumière par le PS optimales (Figure 5 et 6) ;

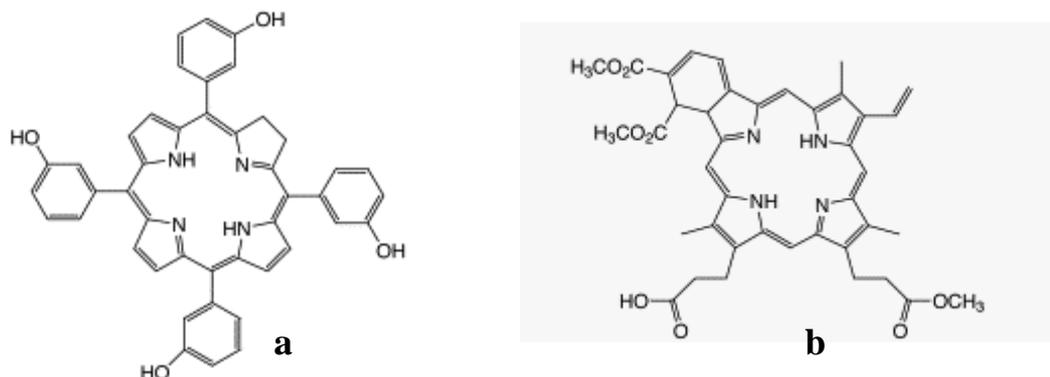
- rendement quantique en oxygène singulet élevé ( $\Phi_{\Delta}$ ). Pour ce faire, le rendement quantique en état triplet du PS doit être élevé ainsi que la durée de vie de l'état triplet  $^3\text{PS}_1^*$ , et son énergie suffisante pour permettre le transfert d'énergie à l'oxygène de façon la plus efficace possible ;
- Solubilité dans l'eau, afin de faciliter l'administration systémique et éviter l'agrégation qui ferait baisser le  $\Phi_{\Delta}$  ;
- Clairance rapide ;
- Sélectivité pour le tissu tumoral.

Afin de se rapprocher des caractéristiques de ce PS idéal, de nouveaux PS ont été développés.

## **IV.2 PS de 2<sup>ème</sup> génération**

Bien qu'il existe aujourd'hui d'autres classes de molécules présentant un réel intérêt en PDT, comme les phtalocyanines, les texaphyrines, l'acide aminolévulinique ou encore l'hypéricine, ce développement s'est surtout focalisé sur la famille des porphyrines. En effet, ce type de composé reste depuis les années 70 les plus intéressants pour des applications *in vivo*. Les porphyrines et les chlorines sont les PS les plus utilisés. Ces molécules sont caractérisées par une structure aromatique plane macrocyclique conjuguée, formées de quatre unités pyrroliques reliées entre elles par des ponts méthènes. Tous ces composés sont caractérisés par une bande d'absorption située à 400 nm appelée bande de Soret. Cette bande est peu utilisée en PDT car comme expliqué précédemment, la lumière bleue ne pénètre pas profondément dans les tissus. Toutefois, ces composés porphyriniques présentent également tous une bande d'absorption située entre 600 et 800 nm qui est utilisée (bande  $Q_1$ ). Cette bande est située aux alentours de 630 nm pour les porphyrines, alors qu'elle se trouve à 650 pour les chlorines et vers 690 nm pour les phtalocyanines. En plus de leurs propriétés de fluorescence, les dérivés de porphyrines montrent de bons rendements quantiques de production d'oxygène singulet. Ces molécules sont majoritairement des chlorines et des phtalocyanines, molécules absorbant plus efficacement dans le rouge que les porphyrines et possèdent des structures chimiques

constantes. Citons par exemple la chlorine *m*-tétrahydroxyphényl (Foscan®) ou un dérivé de benzoporphyrine, la verteporphine (Visudyne®) (Figure 8).



**Figure 8. Structures chimiques du (a) Foscan® et de la Verteporphin® (b).**

### **IV.3 3<sup>ème</sup> génération**

Bien que les PS de 2<sup>ème</sup> génération présentent de meilleures propriétés chimiques et photophysiques par rapport aux PS de 1<sup>ère</sup> génération, des progrès restent à faire pour améliorer leur sélectivité vis-à-vis des tissus cibles. Le développement de PS de 3<sup>ème</sup> génération consiste à élaborer des composés qui vont créer des dommages sélectifs des cellules tumorales. Des études précliniques démontrent que les PS actuels sont présents dans les tissus tumoraux en quantité beaucoup plus importante que dans les muscles et la peau.<sup>70</sup> Cependant, même s'ils montrent une préférence pour les tissus tumoraux, les PS souffrent d'un manque de sélectivité qui nuit à leur utilisation. Afin de résoudre ce problème, diverses techniques de ciblage des PS ont été et sont encore beaucoup étudiées. En effet, augmenter l'accumulation tumorale des molécules photosensibilisatrices tout en limitant leur incorporation dans les cellules saines permettrait de réduire les effets indésirables. Des recherches portent sur des photosensibilisateurs dits de 3<sup>ème</sup> génération. Le principe est de greffer sur des molécules de 2<sup>ème</sup> génération des groupements chimiques visant à induire un ciblage actif (adressage) ou de transporter le photosensibilisant dans une formulation qui induit un ciblage passif (vectorisation).

#### **IV.3.1 Ciblage actif : l'adressage**

Le ciblage actif consiste à s'appuyer non pas sur les différences de biodistribution, mais sur les particularités phénotypiques et fonctionnelles des cellules cancéreuses. Les tissus cancéreux sont caractérisés par une altération de l'expression des récepteurs, protéines et lipides de surface. Cette altération peut se manifester par une expression ou surexpression de

certain récepteurs ou marqueurs membranaires qui sont habituellement très peu présents, voire complètement absents de la surface des cellules.<sup>71</sup> Une croissance plus rapide et importante des cellules tumorales va également entraîner une surexpression de ces récepteurs. L'idée est donc de cibler ces changements biologiques pour augmenter la sélectivité du photosensibilisant vis-à-vis des tissus cancéreux et par là, l'efficacité de la PDT.

Ces récepteurs et/ou marqueurs surexprimés ne sont pas les mêmes selon le modèle tumoral étudié, mais tous forment des cibles potentielles dans le cadre de la recherche contre le cancer. C'est dans cette optique que des PS dits « de troisième génération » ont été synthétisés. Ces molécules sont composées d'un PS de seconde génération couplé à une molécule d'adressage *via* un « espaceur ». Si la molécule d'adressage est suffisamment accessible, l'assemblage sera reconnu par les récepteurs spécifiques, ou reconnaîtra les marqueurs, surexprimés à la surface des cellules tumorales, facilitant leur incorporation par ces dernières. Contrairement au ciblage passif qui améliore la biodistribution et la biodisponibilité, cette stratégie permet théoriquement d'augmenter l'accumulation du PS dans la zone à traiter sans pour autant augmenter sa concentration dans les tissus sains.

Dans cette approche d'adressage, deux stratégies sont à considérer : soit greffer des molécules ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses, soit des molécules ciblant les néovaisseaux (stratégie anti-angiogénique).

Dans le cadre d'un ciblage des cellules tumorales, les stratégies les plus développées sont :

- Adressage par des sucres : l'adjonction de sucres sur des PS de type cycles tétrapyrroliques permet de rendre le PS plus hydrophile.<sup>72</sup> De plus, cette stratégie permet d'exploiter une propriété particulière des cellules tumorales : l'activité de croissance accrue des cellules cancéreuses se traduit souvent par une glycolyse augmentée par rapport aux cellules saines,<sup>73</sup> et vont alors activement assimiler par endocytose les sucres présentés à leur surface par le PS en milieu aqueux.<sup>69, 74</sup>

- Utilisation d'anticorps monoclonaux : basée sur l'existence de marqueurs spécifiques, cette méthode consiste à produire un anticorps spécifique d'un antigène tumoral et à l'utiliser afin de détruire les cellules tumorales<sup>75</sup> ou à le faire produire par l'organisme du patient.<sup>76</sup>

- Adressage par des peptides : ce sont des séquences de moins de cinquante acides aminés et qui, selon la séquence peptidique, peuvent interagir de manière spécifique avec différentes protéines, notamment avec celles qui constituent les récepteurs. Leur petite taille offre l'avantage d'un contrôle plus facile du site de greffage d'une molécule thérapeutique, permettant d'éviter les éventuels problèmes de dénaturation. La structure tridimensionnelle des peptides est aussi moins bien définie que pour les protéines, ainsi les déformations éventuelles induites par le couplage avec un PS ne résultent pas forcément en une perte d'affinité avec le récepteur cible. Enfin, ils peuvent être synthétisés.<sup>77</sup> Il s'agit donc d'une alternative intéressante aux macromolécules de type hormones ou anticorps, plus complexes à obtenir et à manipuler. Les peptides ainsi utilisés en tant que molécules de ciblage peuvent alors servir à adresser un PS de manière spécifique, à modifier sa localisation intracellulaire, ou encore à s'assurer de son activation dans le stroma tumoral. Dans le cadre de cette stratégie, certaines séquences peptidiques, H-Arg-Gly-Asp-OH (RGD) et H-Ala-Thr-Leu-Trp-Pro-Pro-Arg-OH (ATWLPPR), qui permettent de cibler les néovaisseaux, ont été développées au sein du laboratoire. Cette stratégie vise à maximiser les effets anti-vasculaires de la PDT, en ciblant les récepteurs au VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) ou un de ces co-récepteurs (neuropiline 1<sup>78</sup>).

- ciblage du récepteur à l'acide folique : L'acide folique, connu également sous le nom de vitamine B9, l'un des rôles principaux de l'acide folique est d'agir en tant que coenzyme dans le transfert de groupements méthyles, mais a aussi un rôle important dans la réplication de l'ADN. Le récepteur de l'acide folique (RAF) est surexprimé dans de nombreux cancers humains, notamment les tumeurs cérébrales ou pulmonaires.<sup>79</sup> Dans les cancers ovariens, il constitue un marqueur de choix. De plus, l'expression du RAF est très limitée au niveau des tissus humains non pathologiques. Ce type de stratégie que nous avons utilisé, sera développé ultérieurement (chapitre IV).

#### IV.3.2 Ciblage passif : la vectorisation

Les PS présentent une sélectivité relative envers les cellules cancéreuses. Plusieurs facteurs relatifs à la nature même des tumeurs et du stroma environnant ont été désignés

comme potentiellement responsables. Ainsi, la vascularisation plus dense et perméable, le drainage lymphatique plus faible, l'acidité relative du stroma tumoral causée par l'accumulation de métabolites, ou encore la vitesse de prolifération plus élevée des cellules tumorales pourraient expliquer cette sélectivité.<sup>70</sup> La structure chimique des PS pourrait aussi avoir son importance : la charge, la taille et la balance hydrophile/hydrophobe pourraient générer des interactions préférentielles entre l'agent thérapeutique et le milieu particulier que constitue le stroma tumoral. Il va être possible, par un choix adéquat de vecteurs appelés aussi transporteurs, d'augmenter la sélectivité du PS envers les tissus à traiter<sup>80</sup>. Généralement, il est considéré que les molécules les plus hydrophiles circulent avec le flux sanguin, ce qui favorise leur élimination.<sup>80</sup> Cela peut permettre d'éviter des problèmes de toxicité liés à de trop fortes concentrations du produit dans certains tissus, mais limite sa biodisponibilité pour le traitement. Au contraire, les plus hydrophobes se collent aux parois vasculaires ou les traversent et sont ensuite stockés dans les tissus.

Il existe deux types de transporteurs : les vecteurs incorporants qui englobent le photosensibilisant au sein de leur structure (liposomes, micelles, polymères) et les vecteurs non-incorporants (LDL, albumine) qui sont liés à la molécule d'intérêt de façon covalente. Un bon transporteur ne doit altérer ni l'efficacité, ni l'affinité du PS pour les cellules cancéreuses. Il doit être aussi biodégradable et sans immunogénicité.

Parmi les vecteurs non-incorporants, les lipoprotéines basse densité (ou LDL pour *Low Density Lipoproteins*) jouent un rôle important dans la sélectivité des PS hydrophobes. En effet, il a été démontré qu'après administration, les PS sont véhiculés dans le flux sanguin au sein d'agrégats de LDL. Ces agrégats présentent des apoprotéines à leurs pôles qui sont reconnus par des récepteurs spécifiques. Probablement en raison de leurs besoins accrus, les cellules tumorales surexpriment les récepteurs aux LDL.<sup>81</sup> Cette surexpression, couplée aux propriétés spécifiques du stroma tumoral, expliquent la meilleure rétention des PS hydrophobes au niveau de la tumeur.

Dans une stratégie de vectorisation par transporteur non-incorporant, on peut aussi noter l'intérêt de la protéine la plus abondante du sérum humain : l'albumine. Elle régule la pression osmotique sanguine, transporte les acides gras du foie aux tissus et lie de manière covalente et réversible un grand nombre de composés endogènes et exogènes. Un taux élevé d'albumine a été décelé dans les masses tumorales : ceci est vraisemblablement dû à l'augmentation du métabolisme et à la prolifération excessive des cellules cancéreuses. Ainsi,

une association liant le photosensibilisateur à l'albumine pourrait être réalisée. Cependant, de telles molécules possèdent par définition une solubilité médiocre dans les milieux aqueux, ce qui pose un problème évident quant à leur mode d'administration. La formulation du médicament prend alors un rôle essentiel. Une alternative réside dans l'incorporation de PS au sein de structures tels les liposomes ou les micelles.

Les liposomes sont des vésicules phospholipidiques submicroscopiques pouvant incorporer différentes molécules lipophiles ou hydrophiles. Du fait d'une incorporation non sélective, les PS peuvent s'agréger au sein d'un liposome, ce qui aboutit à une nette baisse de leur activité photodynamique.<sup>82-83</sup> Cependant cette stratégie de vectorisation rencontre un certain intérêt en PDT.<sup>84-88</sup> Les micelles ou les huiles de dispersion améliorent la solubilité du photosensibilisateur grâce à l'utilisation d'un agent émulsifiant qui favorise l'internalisation dans la cellule. Les huiles de dispersion ont été testées en premier. Le Cremophor représente actuellement l'huile la plus efficace. Malgré son efficacité, elle semble être à l'origine de réactions anaphylactiques.<sup>89-90</sup> L'utilisation de micelles a été envisagée, car celles-ci possèdent la même efficacité d'internalisation que les huiles en présentant peu d'effets secondaires.<sup>91-93</sup>

Les nano-objets tels que les particules polymériques représentent une alternative aux liposomes et autres micelles. Elles possèdent comme avantages un haut chargement en PS, un contrôle du relargage des PS, une grande variété de matériau utilisable et des procédés de fabrication industrielle. Plusieurs types de particules sont également utilisés : les nanoparticules, les nanosphères et les dendrimères. Elles se distinguent par leur taille et par la localisation du photosensibilisateur au sein de la structure polymérique.

## **V. Intérêts des nano-objets en PDT**

Dans le cadre d'une amélioration de la PDT, que ce soit une meilleure sélectivité, un adressage plus efficace ou encore, une action photodynamique accrue, les nano-objets que sont les nanoparticules (taille comprise entre 1 et 100 nm), représentent une approche prometteuse dans ce domaine thérapeutique, mais également dans le domaine de la détection tumorale. Elles présentent de nombreuses propriétés intéressantes qui vont être fonction de leurs dimensions nanométriques et de leurs compositions. Sous l'appellation nanoparticule, on retrouve différentes sortes de composés, dont la taille peut varier de 2 à plusieurs centaines de nanomètres. Elles peuvent être composées de métaux, de lipides, de céramiques ou de

polymères. Les dimensions vont leur permettre d'interagir de manière unique avec les systèmes biologiques à l'échelle moléculaire, et leurs différentes compositions vont pouvoir leur conférer une stabilité et une spécificité cruciale, que ce soit pour une encapsulation de principe actif ou même de biocompatibilité.

Le choix de composition et de dimension des nanoparticules va être directement lié à l'usage que l'on souhaite en faire. Parmi les différentes utilisations, on distingue trois grands types de nanoparticules :

- les transporteurs incorporants, qui vont permettre, suivant la fonctionnalisation de surface de la nanoparticule, un adressage ou une vectorisation du PS ;
- les transporteurs non-incorporant, principalement les dendrimères, qui vont quant à eux principalement permettre de rendre les PS moins hydrophobes, et ainsi limiter le problème lié à ce type d'adressage passif qu'est l'accumulation dans les tissus sains ;
- les quantum dots, qui en plus de leurs dimensions et de leurs potentiels de fonctionnalisation de surface très intéressants, présentent des propriétés photophysiques qui vont leur permettre d'être utilisé en imagerie comme fluorophore, mais également en PDT comme PS ou comme donneur d'énergie par mécanisme FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*).

## **V.1 Les transporteurs incorporants**

L'utilisation de nanoparticules comme transporteurs de PS émerge comme étant une approche très prometteuse, car leur dimension ainsi que leur composition offrent de nouvelles voies d'exploration en PDT. En effet, ces nano-objets peuvent satisfaire au cahier des charges de l'agent PDT idéal. Ces transporteurs vont encapsuler les PS en leur sein, et ainsi les protéger du milieu extérieur jusqu'au site d'action photodynamique.

En fonction du choix de leur composition ainsi que de la fonctionnalisation de leur surface, les nanoparticules peuvent être biodégradables, ou au contraire, peuvent résister à une dégradation enzymatique ou une attaque microbienne et ainsi préserver le PS transporté. La porosité de ces nanoparticules peut également être ajustée afin de contrôler le relargage du PS dans le milieu biologique, ou de limiter le contact PS/milieu extérieur dans le but de le

préservé. De plus, cette porosité permet une diffusion efficace de l'oxygène tissulaire, et permet ainsi au PS de produire son action photodynamique malgré son confinement au sein de la nanoparticule.<sup>94</sup> Ces nanoparticules présentent également un caractère non-immunogénique, et ne vont pas par conséquent engendrer de réponse immunitaire. De plus, elles peuvent être optiquement transparentes, ce qui va rendre toujours possible l'activation du PS. Enfin, une des propriétés les plus intéressantes est que ces nanoparticules peuvent fonctionner comme des plateformes multifonctionnelles, et ainsi permettre avec un seul type d'objet, de combiner à une stratégie d'adressage actif de l'imagerie et de la thérapie. On distingue deux grands types de transporteurs incorporants : les biodégradables et les non-biodégradables.<sup>95</sup>

- Les nanoparticules biodégradables sont constituées de polymères (généralement des polyesters) qui peuvent être dégradés en milieu biologique, permettant le relargage du PS. Les nanoparticules biodégradables les plus étudiées sont constituées de copolymère de poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) et de poly(DL-lactide) (PLA). L'intérêt de cette composition binaire est le contrôle de la balance hydrophile/hydrophobe de la particule, par un choix de la proportion de PLA/PLGA (PLA étant moins hydrophile que PLGA), et ainsi permettre un contrôle du taux de biodégradation.<sup>96</sup>

- Les nanoparticules non biodégradables peuvent être composées soit de polyacrylamide, soit de céramique (principalement de silice, ORMOSIL).<sup>94, 97</sup> L'avantage de ces nanoparticules par rapport aux nanoparticules biodégradables est qu'elles peuvent servir comme plateforme multifonctionnelle, ou l'on va pouvoir combiner imagerie et traitement<sup>98</sup>. Dans le cadre d'un diagnostic et d'un traitement d'une tumeur au cerveau, l'équipe de Kopelman a synthétisé une nanoparticule contenant un agent de contraste IRM (oxyde de fer), ainsi que du Photofrin® afin de permettre un traitement PDT. La surface de cette nanoparticule a été fonctionnalisée par un polyéthylène glycol (PEG) afin d'améliorer la solubilité de l'ensemble, mais aussi par un peptide RGD pour un adressage spécifique.<sup>99-100</sup>

Une revue a été publiée par notre équipe sur les travaux portant sur la vectorisation de PS incorporés dans des nanoparticules de silice.<sup>101</sup>

Il est également possible d'adresser les PS par l'intermédiaire de micelles polymères<sup>99</sup> ou encore par des molécules organiques (lipides,<sup>102</sup> cyclodextrines<sup>103</sup>). Si beaucoup de ces vecteurs sont à l'étude pour des applications en PDT, deux d'entre eux sont commercialisés : le Foslip® et le Fospeg®. Il s'agit en fait d'une formulation de *m*-tétrahydroxyphényl-chlorine

(*m*-THPC) dans des liposomes de 1,2-dipalmitoyl-3-*sn*-phosphatidylcholine (DPPC) pour le premier, et des liposomes composés de dipalmitoylphosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylglycérol, et de PEG-distéaroylphosphatidyléthanolamine pour le second. Il serait également possible de fonctionnaliser ces micelles ou liposomes à leur surface afin de permettre une sélectivité du traitement PDT envers les cellules tumorales.

## **V.2 Les Quantum Dots**

Les Quantum Dots (QDs), appelées également boîtes quantiques, sont des nanocristaux de semiconducteurs, dont la taille est généralement comprise entre 1,5 et 6 nm. Ces nanomatériaux possèdent des propriétés photophysiques uniques, car dépendantes de leur composition, mais surtout de leur taille. En effet, pour une même composition, leurs propriétés vont non seulement être différentes de celles du matériau massif, mais vont être ajustables par un contrôle de la taille de ces nanoparticules lors de leur synthèse.<sup>104</sup> Etant optiquement actives, elles vont pouvoir être utilisées comme fluorophores en imagerie, mais également comme PS (ou donneur d'énergie en FRET) dans le cadre d'un traitement PDT. De plus, ces QDs bénéficient d'un énorme potentiel en matière de fonctionnalisation de leur surface, permettant un adressage par divers ligands.

L'énoncé de leurs différentes propriétés, ainsi que leur intérêt pour une application en PDT seront plus amplement développés au chapitre III.

## **V.3 Les transporteurs non-incorporants : les dendrimères**

Les dendrimères sont des macromolécules synthétiques, de taille nanométrique dont la surface peut-être modifiée chimiquement selon l'application recherchée. Les poly(amidoamines) (PAMAMs) et les poly(éthylène imines) (PEIs)<sup>105</sup> sont les dendrimères les plus utilisés pour une application biologique. Leur solubilité en milieu aqueux et leur excellente biocompatibilité font de ces composés des outils de choix pour le transport de substances biologiquement actives utilisables à la fois en thérapeutique<sup>106</sup> et pour l'imagerie.<sup>107</sup> L'atout majeur de ces dendrimères réside dans le nombre, contrôlable et donc connu, d'entités fonctionnalisables à leur surface, permettant ainsi leur utilisation comme plate-forme multifonctionnelle. Les propriétés ainsi que l'utilisation de ces composés est développée au chapitre suivant.

*Dendrimères*

*&*

*Thérapie Photodynamique*



## **Chapitre II. Dendrimères et thérapie photodynamique**

L'objectif du travail décrit dans ce chapitre a été l'élaboration d'une structure vecteur/PSs dissymétrique. Ces travaux ont porté sur la fonctionnalisation périphérique de dendrimères de type poly(amidoamine) (PAMAM) par des photosensibilisateurs de type porphyrine.

### **I. Introduction sur dendrimères**

#### **I.1 Généralités**

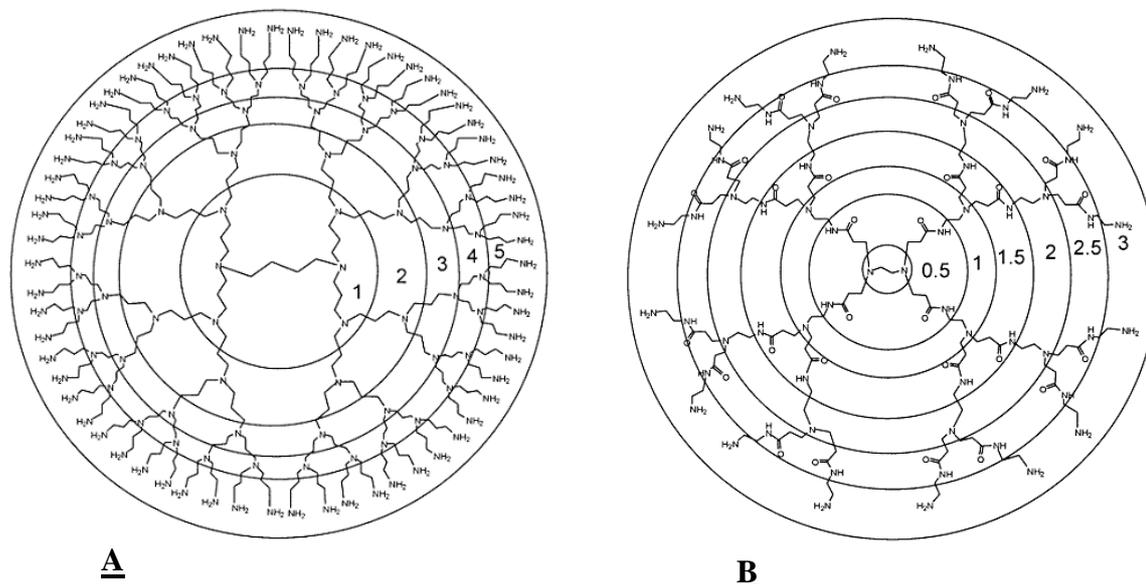
L'adressage spécifique d'agents thérapeutiques, appelé également vectorisation, vers un organe, un tissu ou des cellules malades par un véhicule reste un des challenges majeurs en recherche thérapeutique. En effet, beaucoup de principes actifs possèdent des caractéristiques physicochimiques qui ne sont pas favorables à une utilisation biologique, car ne permettant pas un franchissement optimal des barrières physiologiques séparant le site d'administration du site d'action. Certains PA vont se heurter aux mécanismes enzymatiques de l'organisme, aboutissant à leur dégradation et/ou métabolisation. Une distribution de ces PA vers les zones à traiter peut être par conséquent difficile. De plus, l'accumulation de PA dans les tissus sains peut engendrer de nombreux effets indésirables, pouvant aboutir à l'abandon de stratégies thérapeutiques malgré l'efficacité du PA. Deux des aspects les plus importants en vectorisation sont donc le contrôle de l'efficacité thérapeutique et la sécurité du traitement. Ils sont obtenus par la maîtrise de la quantité et de la cinétique de PA relargué et de l'adressage spécifique au site d'action. Le besoin croissant de systèmes d'adressage de principes actifs améliorant leur spécificité et leur activité tout en réduisant leur dégradation et leur toxicité intrinsèque a abouti au développement d'une grande variété de vecteurs. Ces dernières années, l'utilisation de dendrimères pour des applications telles que le diagnostic et la thérapeutique,<sup>108-112</sup> suscite, et de loin, beaucoup d'intérêts par rapport aux polymères et oligomères classiques. Ces composés sont en effet préparés avec un niveau de contrôle qui n'est pas atteignable avec la plupart des polymères linéaires, aboutissant à des structures globulaires monodisperses possédant un grand nombre de groupements périphériques fonctionnalisables. Ils sont, par conséquent, des candidats idéaux comme véhicules d'adressage de PA.

Le terme dendrimère, proposé pour la première fois par Tomalia<sup>113</sup> en 1984, est construit à partir de deux mots : dendrite et polymère, le premier évoquant la structure arborescente de

ces composés (« dendron » signifie arbre en grec) et le second la répétition d'un motif structural de base (« meros » signifie unité en grec). Ces structures sont généralement décrites comme étant des macromolécules caractérisées par une structure tridimensionnelle<sup>114</sup> hautement ramifiée qui leur confère un fort potentiel de fonctionnalisation pour des applications variées. Les propriétés uniques de ces composés, telles que leur structure uniforme, leur haut degré de ramification, leur hydrosolubilité, leur multivalence, leur masse moléculaire discrète, la présence de sites internes d'inclusion ainsi qu'une variabilité de composition chimique importante, en font des matériaux très attractifs pour des applications biologiques et d'adressage de principes actifs.<sup>115-119</sup>

## I.2 Structure

Une structure dendritique est caractérisée par des couches entre chaque point focal (ou point cascade) appelées génération. Un point focal est une fonction chimique qui va permettre une croissance du dendrimère par un couplage de monomères. C'est au niveau de ce point focal que l'on obtient une croissance exponentielle des fonctions périphériques. La génération d'un dendrimère est définie comme étant le nombre de points focaux en partant du cœur vers la périphérie de la structure (Figure 9).



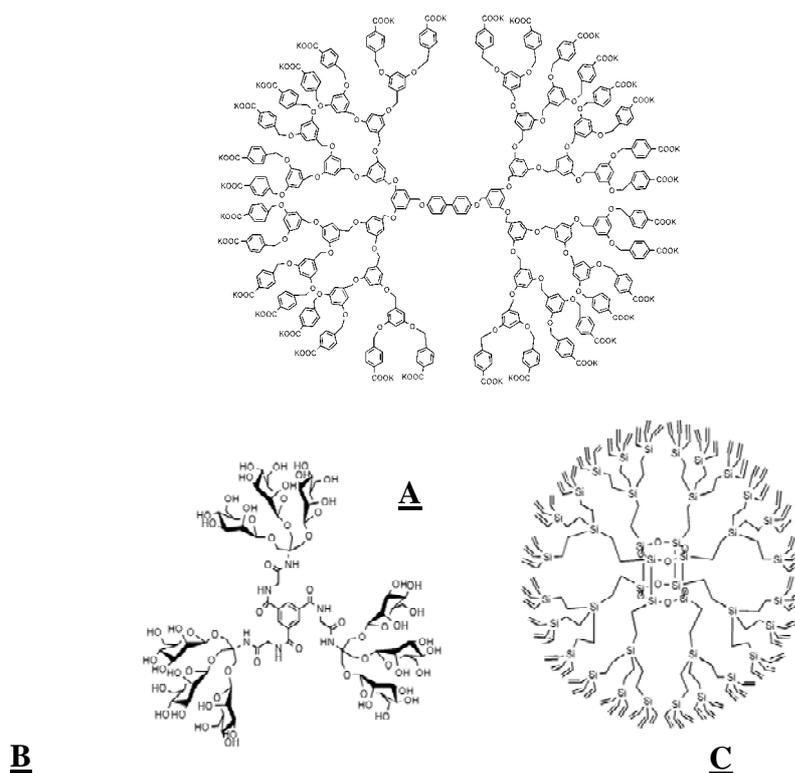
**Figure 9.** Nomenclature des dendrimères : **A** : Dendrimère de polypropylène imine (PPI) de 5<sup>ème</sup> génération (G5), **B** : dendrimère de polyamidoamine (PAMAM) de 3<sup>ème</sup> génération (G3). Chaque génération est représentée par un cercle.<sup>120</sup>

Il est possible de déterminer le nombre de fonctions d'amplification de surface (Z) (équation 11) ainsi que le nombre de liaisons covalentes formées par génération (BC) (équation 12) à partir de la multiplicité du cœur ( $N_c$ ), la multiplicité du monomère ( $N_b$ ) et la génération du dendrimère (G):

$$(Z) = N_c \cdot N_b^G \quad (11)$$

$$(BC) = N_c \cdot \left[ \frac{(N_b^G - 1)}{(N_b - 1)} \right] \quad (12)$$

Le cœur du dendrimère est appelé parfois génération 0 car il ne présente aucun point focal. Ce cœur est à la base de la structure arborescente des dendrimères car il va être le point d'ancrage de chaque dendron ou unité dendritique qui, regroupés, vont représenter les branches de cette structure. Le cœur peut être très variable : le 1,4-diaminobutane ( $N_c=4$ ) pour les dendrimère de type polypropylène imine (PPI,  $N_c=4$ ), l'ammoniaque ( $N_c=3$ ) ou l'éthylène diamine ( $N_c=4$ ) pour les dendrimères de type polyamidoamine (PAMAM) par exemple. Ces derniers présentent des intermédiaires possédant des groupes carboxyliques à leur surface est sont nommés dendrimères de demi-génération (ex : G0.5, G1.5...etc., figure 9). Les dendrons présentent eux aussi une grande variabilité de structure. Ils sont généralement à base de polyamine (PPI,<sup>114</sup> monomère :  $N_b=2$ ), d'un mélange de polyamides et d'amines (PAMAM,<sup>113</sup> monomère :  $N_b=2$ ) ou encore d'unités polyaryl éther<sup>121</sup> (monomère :  $N_b=2$ ). Plus récemment, des dendrimères basés sur des cœurs à base de sucres<sup>122</sup> ou de calixarènes<sup>123</sup> ont été développés, ainsi que des structures présentant des éléments tels que le silicium et le phosphore (Figure 10).<sup>124</sup>



**Figure 10.** Exemples de dendrimères. **A** : à base de poly(aryl) éther,<sup>125</sup> **B** : à base de sucre,<sup>122</sup> **C** : à base de silice.<sup>126</sup>

## **II. Les différentes approches de synthèses des dendrimères**

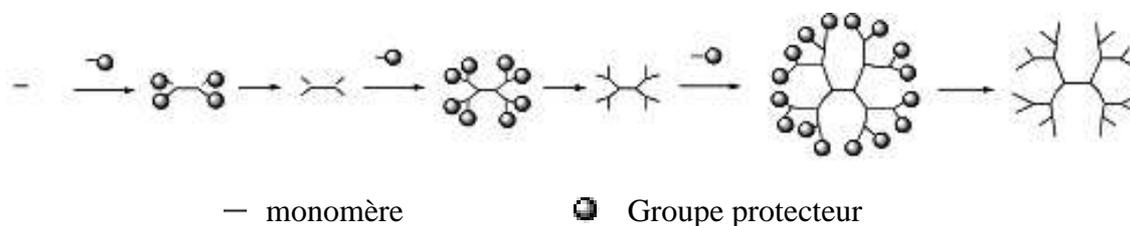
Depuis 1979 et la première description de ce type de molécules,<sup>114</sup> deux stratégies ont été principalement développées pour la synthèse de dendrimères. La première, nommée stratégie divergente, fut introduite par Tomalia<sup>113</sup> et consiste en une croissance du dendrimer à partir d'un cœur initial vers la périphérie. La seconde, développée par Hawker et Fréchet,<sup>125</sup> consiste en un processus de croissance convergente, où les unités dendritiques sont couplées à un cœur multifonctionnel pour obtenir le dendrimer final. Il est rapporté que plus de 100 dendrimères de compositions différentes avec plus de 1000 modifications de surface ont été synthétisés *via* ces deux méthodes.<sup>127-129</sup> Plus récemment, d'autres approches synthétiques ont également été développées afin d'avoir une croissance plus rapide de dendrimères ou de meilleurs rendements par une réduction du nombre d'étapes de synthèse et de purification.

### **II.1 Méthode divergente**

L'approche divergente a été introduite au début des années 1980 par Tomalia<sup>113</sup> et Newkome.<sup>130</sup> Elle consiste en une stratégie de synthèse progressive couche par couche, débutant au niveau du cœur focal, à la périphérie duquel sera construite la molécule par une

succession d'opérations de base consistant en : (1) couplage de *building block* (monomères), et (2) déprotection ou modification des fonctionnalités terminales de périphérie afin de créer une nouvelle fonctionnalité de surface. Cette succession de réactions est souvent nommée « croissance de génération ». L'obtention de dendrimères de première génération se fait simplement par un couplage entre le cœur et un monomère. Pour obtenir un dendrimère de seconde génération, les fonctions périphériques du dendrimère de première génération doivent pouvoir réagir avec les *building blocks* suivants (Figure 11).

Cette méthode présente l'intérêt d'être directe, mais certains problèmes de synthèse peuvent survenir, limitant ainsi la taille des structures pouvant être obtenues. En effet, au fur et à mesure que les dendrimères croissent en génération, le nombre de fonctions chimiques périphériques croît lui aussi de manière exponentielle. Cela engendre un nombre de réactions simultanées de plus en plus important sur une même molécule, augmentant alors la difficulté d'obtenir un dendrimère parfait, même avec des réactions d'excellents rendements. De plus, le nombre de produits secondaires va lui aussi considérablement augmenter, ces produits pouvant s'avérer difficilement séparables, car présentant des masses, tailles et des propriétés souvent très proches des dendrimères parfaits. Cette méthode de synthèse est principalement utilisée pour les dendrimères de types PAMAM et PPI.

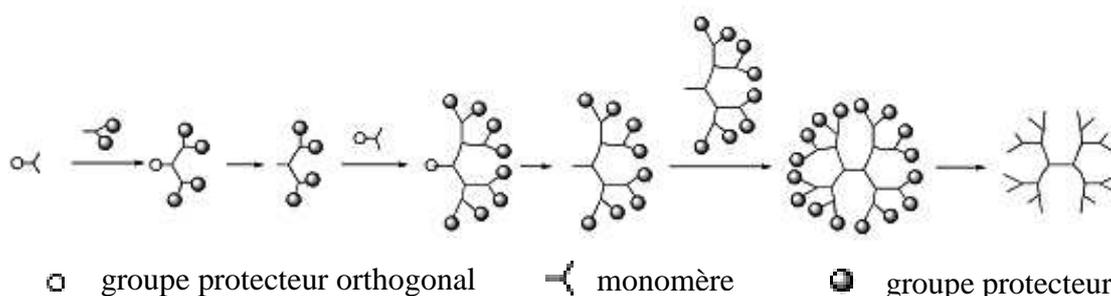


**Figure 11. Principe de l'approche divergente.**<sup>120</sup>

## **II.2 Méthode convergente**

La voie convergente de synthèse de dendrimères, qui a été développée par Hawker et Fréchet,<sup>125</sup> propose une approche alternative. Par cette méthode, le dendrimère va être construit de la périphérie vers le cœur. La première phase de cette approche consiste en la synthèse des dendrons qui vont, dans un deuxième temps, être couplés à l'unité centrale représentant le cœur du dendrimère. Les unités de surface vont être graduellement couplées à des monomères. Ces dendrons, une fois qu'ils ont atteint la taille adéquate, vont être ensuite attachés à un cœur adapté afin d'obtenir un dendrimère complet (Figure 12).<sup>131</sup> Ceci va

permettre de réduire le nombre de réactions se produisant à chaque étape. En effet, la stratégie de synthèse convergente ne fait intervenir qu'un petit nombre de fonctions à chaque étape, limitant ainsi le nombre de produits secondaires possibles par étape. Les purifications des produits intermédiaires sont donc plus simples à mener, aboutissant à une structure parfaite des dendrons. Cependant, ce type de synthèse est généralement limité à la construction de dendrimères de petite taille du fait des problèmes d'encombrement stérique rencontrés lors du couplage de dendrons nanométriques sur un cœur de dimension moléculaire.<sup>128</sup> Cette méthode va donc souffrir de faibles rendements dans la synthèse de grandes structures dendritiques.



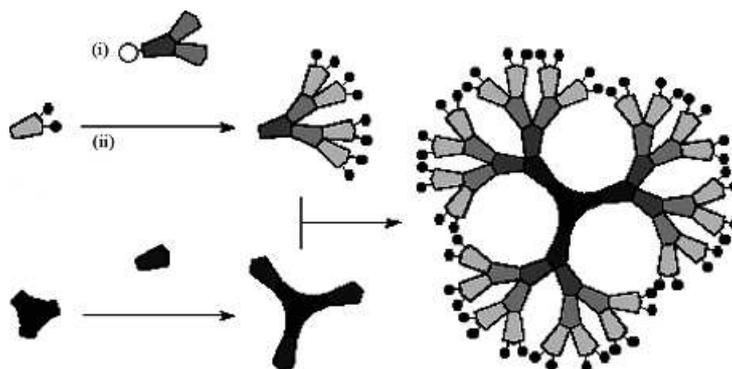
**Figure 12. Principe de l'approche convergente.**<sup>120</sup>

### II.3 Autres approches

Dernièrement, de nouvelles méthodes de synthèses ont été développées afin de minimiser les inconvénients des approches purement convergentes ou divergentes. Ces méthodes sont présentées ci-dessous.

#### II.3.1 Approche hypercore/branched monomers

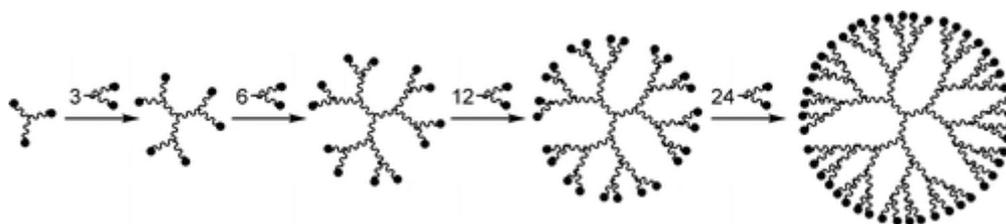
Suite au développement de l'approche convergente, Fréchet porte son attention sur le moyen d'accélérer une synthèse de dendrimères. Pour cela, il utilise une méthode dite *hypercore/branched monomers*,<sup>132</sup> qui est, en fait, une combinaison des approches convergentes et divergentes. Cette méthode s'appuie sur la construction en parallèle de deux types de structures oligomériques, l'une consistant en des fragments de dendrons (*branched monomers*) issus de la réaction entre monomères (synthèse convergente), l'autre consistant en un cœur déjà couplé avec une série de monomères (*hypercore*, approche divergente). La dernière étape de cette synthèse sera le couplage entre l'*hypercore* et les dendrons (Figure 13).



**Figure 13. Principe de l'approche hypercore/branched monomers.**<sup>133</sup>

### II.3.2 Croissance exponentielle double

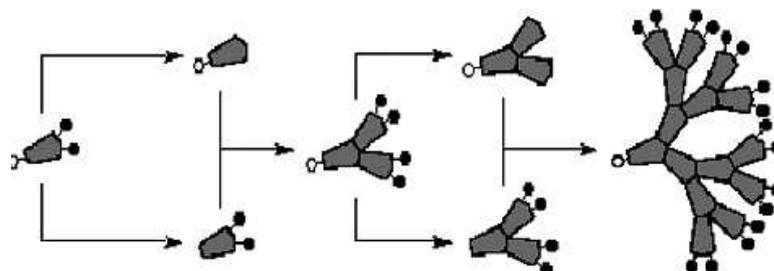
Cette approche est similaire à la technique de croissance rapide de polymères linéaires. Elle est basée sur la préparation de monomères utilisables pour une synthèse divergente et convergente à partir d'un unique monomère de départ (Figure 14).<sup>134</sup>



**Figure 14. Principe de la synthèse à croissance exponentielle double.**<sup>134</sup>

### II.3.3 Chimie « lego »

Cette approche implique l'utilisation de cœur et de monomères hautement fonctionnalisés pour une synthèse de dendrimères à base de phosphore. Cette voie de synthèse permet une multiplication de 48 à 250 du nombre de fonctions périphériques en une seule étape.<sup>135-136</sup> Cette stratégie requiert un minimum de solvant, permet une purification simple de produits et génère des produits secondaires non toxiques et biologiquement compatibles tels l'eau et le diazote.



**Figure 15. Principe de la stratégie « lego ».**<sup>111</sup>

### II.3.4 Chimie « click »

Cette méthode repose sur la grande fiabilité de synthèse de 1,2,3-triazoles à partir d'azotures et d'alcynes, catalysé par du cuivre Cu(I) (Figure 16). Cette stratégie de synthèse permet d'obtenir des dendrimères possédant une grande variabilité de fonctions périphériques avec de très bons rendements et une grande pureté, le seul produit secondaire formé étant le chlorure de sodium.<sup>137</sup>

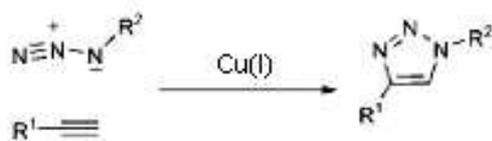


Figure 16. Principe de la stratégie « click ».<sup>111</sup>

## III. Propriétés des dendrimères

Les dendrimères présentent des propriétés physicochimiques uniques par rapport aux autres types de polymères, qu'ils soient linéaires ou ramifiés. Ces structures présentent en effet des propriétés de monodispersité remarquables pour des polymères, mais également des propriétés structurales telles que l'architecture interne tridimensionnelle et la multivalence périphérique qui vont directement influencer sur l'utilisation de ces dendrimères. Ces paramètres sont contrôlables et confèrent à ces structures arborescentes un potentiel d'application énorme en permettant une conception modulable en fonction de l'utilisation choisie.

### III.1 Monodispersité

Les dendrimères sont construits avec une structure moléculaire discrète et clairement définie. Ceci leur confère une masse moléculaire uniforme sans distribution de taille, garantissant une uniformité de leurs propriétés physicochimiques. Cette monodispersité est remarquable avec des valeurs de polydispersité  $M_w/M_n$  comprises entre 1.000002 et 1.005. Cette propriété peut être évaluée par chromatographie liquide à haute performance (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC)<sup>138</sup>, chromatographie à exclusion de taille (*Size Exclusion Chromatography*, SEC)<sup>139</sup>, spectrométrie de masse (*Mass Spectroscopy*, MS)<sup>140</sup>, électrophorèse capillaire,<sup>141</sup> électrophorèse sur gel,<sup>142</sup> ou encore par microscopie électronique à transmission (*Transmission Electron Microscopy*, TEM).<sup>143</sup>

### **III.2 Multivalence et effet dendritique**

Au cours de la croissance en génération d'un dendrimère, ce dernier voit son nombre total de fonctions périphériques augmenter de manière exponentielle. Cette profusion d'entités réactives donne au dendrimère un énorme potentiel de multifonctionnalisation, que ce soit par des biomolécules dans le cadre d'un adressage ou de fonctions réactives dans le cadre d'une catalyse. Les interactions multivalentes aboutissent à une forte augmentation d'activité comparée aux interactions monomériques.<sup>144</sup> Cette amélioration synergique d'activité, qu'elle soit catalytique<sup>145</sup> ou d'affinité de reconnaissance,<sup>146-147</sup> est généralement appelée effet *cluster*,<sup>122</sup> ou effet dendritique.<sup>148</sup> Cet effet est attribué à une coopération fonctionnelle au sein d'un système multivalent qui va conduire à une activité supérieure à celle attendue par la valence de ce système. Cet effet n'est cependant pas un simple effet additif qui augmenterait l'efficacité mole à mole d'une reconnaissance moléculaire donnée dû à un nombre élevé de fonction par molécule ( $n$  fonctions sur une même molécule augmenteraient  $n$  fois l'efficacité de la réaction). L'effet dendritique entre en jeu lorsque les  $n$  fonctions du dendrimère vont permettre une amélioration synergique de l'efficacité de la reconnaissance (efficacité effet dendritique = (efficacité<sub>monomérique</sub>) <sup>$n$</sup> ).

Cette particularité des dendrimères va permettre une amélioration de l'adressage de substances actives par une combinaison entre la structure dendrimère-principes actifs à un grand nombre de molécules d'adressage.

### **III.3 Structure tridimensionnelle et taille nanométrique : « dendrimère hôte »**

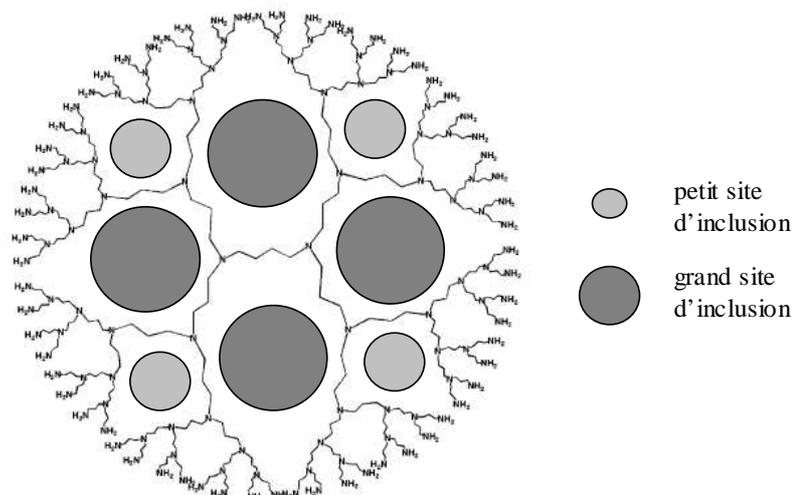
Les dendrimères, de par leur structure discrète, vont posséder une architecture tridimensionnelle définie et prévisible. Au fur et à mesure de la croissance en génération d'un dendrimère, trois différents compartiments vont apparaître :

- *la surface multivalente* qui est composée des fonctions périphériques libres des dendrons. Ce grand nombre de sites réactifs va conférer aux dendrimères un très grand potentiel de fonctionnalisation, établissant ces structures comme des plateformes multifonctionnelles ;
- *les couches externes*, situées sous la surface, qui vont posséder un microenvironnement physicochimique défini protégé du milieu extérieur par la surface périphérique ;

- *le cœur*, qui est le point d'attache des différents dendrons, complètement isolé du milieu extérieur, engendrant alors des propriétés de sites spécifiques au sein de la structure.

Plus spécifiquement, pour de grandes générations, la périphérie est composée d'un très grand nombre de fonctions chimiques périphériques, qui va rendre cette surface de plus en plus dense au fur et à mesure de la croissance en génération. C'est cette densité de surface qui va permettre une relative isolation du cœur et des couches externes du milieu environnant. Les gros dendrimères ( $G > 4$ ) possèdent une surface dense alors que l'intérieur présente des espaces libres qui vont permettre d'encapsuler une grande variété de molécules hôtes. Cette propriété classe les dendrimères comme « endo-récepteurs ».<sup>149</sup> Cette encapsulation est possible grâce à la relative flexibilité interne du dendrimère. Ce processus est fonction de l'affinité molécule hôte/fonctions internes du dendrimère et du volume des sites d'inclusion.

La synthèse pas-à-pas permet un choix et une fonctionnalisation spécifique de ces différents compartiments du dendrimère. En effet, le choix du cœur et des monomères constituant les branches internes permet de structurer les sites d'inclusion interne des dendrimères. Cela influence directement le nombre et la nature des molécules hôtes que le dendrimère va pouvoir intégrer. Des études portant sur l'effet de la taille et la nature du cœur et des dendrons, sur l'internalisation de petites molécules hydrophobes (*e.g.* acide benzoïque, acide naphthénique et acide 9-anthracénique) ont été menées.<sup>150-151</sup> Un effet de la taille du cœur sur les propriétés d'inclusion des dendrimères a été rapporté,<sup>152</sup> mettant en évidence son rôle dans le nombre de molécules pouvant être transportées. Les premières études d'endo-récepteur à base de dendrimères type PAMAM et PPI fut la « boîte dendritique » (Figure 17),<sup>153-155</sup> capable d'inclure 4 grands hôtes (Rose Bengale) et de 8 à 10 petits hôtes (acide *p*-nitrobenzoïque). Des études décrivent également des dendrimères (ici appelés *dendrophanes*) hydrophiles à cœur hydrophobe de type cyclophane, capables d'inclure et de transporter efficacement divers stéroïdes *via* des interactions  $\pi$ - $\pi$ .<sup>156-157</sup> La même équipe synthétisa des dendrimères (*dendroclefts*) capables d'inclure des molécules plus polaires comme des monosaccharides.<sup>158-159</sup>



**Figure 17. Sites d'encapsulation d'un dendrimère PPI G4.**<sup>153</sup>

Les choix des types de dendrons et des fonctions périphériques est également important pour contrôler le relargage des molécules hôtes. En effet, la taille des sites d'encapsulation et la densité de la surface est dépendante du pH,<sup>160-162</sup> de la polarité du solvant<sup>163-164</sup> et de la force ionique du milieu.<sup>165</sup> En incorporant des liaisons dégradables sous certaines conditions dans les couches externes du dendrimère, il est possible de « perforer » la surface du dendrimère par voie physiologique ou enzymologique et ainsi libérer la molécule hôte.<sup>153, 155, 165</sup>

Bien que l'approche de « boîte dendritique » soit très prometteuse, elle ne représente pas encore un moyen robuste pour un adressage et un relargage contrôlé de principes actifs en conditions physiologiques. En 2001, des études thermodynamiques approfondies ont été menées pour mieux comprendre les interactions molécule hôte/dendrimère et de résoudre ces problèmes.<sup>151</sup>

### **III.4 Propriétés mécaniques**

En fonction de leur génération, les dendrimères peuvent avoir une taille pouvant aller de quelques nanomètres à plusieurs dizaines de nanomètres, et grâce à leur densité de surface, ils ne vont présenter ni enchevêtrement ni interpénétration, à la différence des autres polymères linéaires. Ceci va leur permettre d'avoir un volume hydrodynamique plus petit et de former de solutions moins visqueuses que les polymères de masse équivalente.

### **III.5 Solubilité**

La solubilité des dendrimères va être directement contrôlable par le choix des fonctions périphériques. Les fonctions les plus couramment rencontrées à la surface des dendrimères sont des amines (primaires, secondaires ou tertiaires) ou des carboxylates, rendant ainsi les dendrimères hydrosolubles, donc facilement utilisables pour des applications biologiques.

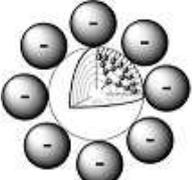
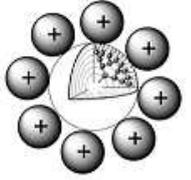
### **III.6 Propriétés biologiques**

Les dendrimères, afin de les utiliser comme plate-forme multifonctionnelle pour un adressage de principes actifs, doivent répondre à plusieurs critères biologiques importants de biocompatibilité. Ils doivent :

- présenter une très faible toxicité ;
- ne pas être immunogène ;
- et avoir une tolérance vis-à-vis des dégradations enzymatiques dans le flux sanguin.

De nombreuses études ont été menées sur la toxicité des dendrimères, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Malik établit par des tests *in vitro* sur différentes lignées (B16F10, CCRF et HepG2) que quelque soit leur structure interne, les dendrimères cationiques présentent une toxicité et une tendance à l'hémolyse accrue à faible concentration comparée à celle des dendrimères anioniques.<sup>166</sup> Les dendrimères cationiques ont en effet tendance à déstabiliser les membranes cellulaires et à provoquer une lyse cellulaire, due au fait que les membranes sont chargées négativement. Il a également été montré que le phénomène d'hémolyse est plus important pour les grandes générations de dendrimères.<sup>166</sup> Une autre étude démontre également que la toxicité *in vitro* de dendrimères type PAMAM est dépendante à la fois de leur dose et de leur génération, en mettant en évidence que les petites générations de dendrimères (G<5) ne sont pas toxiques et qu'aucune immunogénicité n'a été observée.<sup>167</sup>

**Tableau 3. Tendances généralisées de la toxicité *in vitro* et *in vivo*, de la bioperméabilité et des propriétés immunogènes en fonction des fonctionnalités de surface des dendrimères.**<sup>168</sup>

Type de dendrimère	 anionique	 polaire non-chargé	 apolaire	 cationique
Toxicité <i>in vitro</i>	-	-	+	+
Toxicité <i>in vivo</i>	-	-	-	+
Bioperméabilité	-/+	-	+	+
Immunogénicité	-	-	+/-	+/-

#### **IV. Applications des dendrimères en PDT : état de l'art**

Les propriétés structurales remarquables des dendrimères ont abouti à un grand nombre d'études sur leur emploi dans la formulation et la vectorisation de drogues antitumorales, antivirales et antibactériennes.<sup>120</sup> Les dendrimères sont principalement utilisés pour une application en cancérologie de la PDT. En effet, un des principaux challenges en PDT est d'élaborer des PS efficaces possédant une photocytotoxicité hautement sélective envers les tissus à traiter. Les PS sont généralement des molécules hautement conjuguées, comme les porphyrines par exemple, et forment facilement des agrégats en milieu aqueux par des interactions hydrophobes et des empilements  $\pi$ - $\pi$ . Cette agrégation peut conduire à une modification des propriétés photophysiques des PS et ainsi diminuer l'effet photodynamique du PS une fois accumulé dans les cellules ciblées (Figure 18). Divers systèmes de ciblage passif ou actif ont été développés, tels que des conjugués PS-polymères,<sup>169</sup> des liposomes,<sup>84</sup> des micelles<sup>170</sup> ou encore des nanoparticules<sup>95</sup> afin d'améliorer la sélectivité des PS et leur efficacité photodynamique.

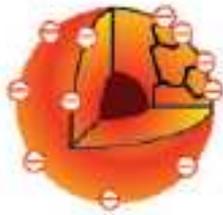
Plusieurs études ont porté sur le couplage de dendrimères à l'acide 5-aminolevulinique (ALA) afin d'améliorer l'accumulation intracellulaire de porphyrines. ALA est un précurseur dans la biosynthèse de l'hème, qui va être enzymatiquement convertit en un PS actif,<sup>171</sup> la protoporphyrine IX (PpIX), qui à son tour sera convertie en hème. Lorsqu'ALA est introduit en excès, PpIX s'accumule dans les tissus à cause de son taux de conversion en hème peu élevé. De plus, les tissus néoplasiques produisent une plus grande quantité de ALA que les

tissus sains, permettant ainsi une accumulation différentielle significative entre la tumeur et les tissus sains environnants.<sup>172</sup> Cependant, l'efficacité de ce traitement est limitée par la nature hydrophile de ALA, ce qui aboutit à une faible pénétration des tumeurs, d'où l'intérêt porté sur l'élaboration d'un nouveau vecteur. Les structures étudiées présentent chacune 3 ALA à la périphérie du dendrimère (de G0 à G2), qui est composé de différents cœur et bras espaceurs. La jonction dendrimère-ALA est quant à elle assurée par un pont ester, permettant ainsi un relargage de ALA au sein de la cellule *via* les estérases.<sup>173-175</sup>

D'autres types de structures ont été étudiés, notamment celles où le PS joue le rôle du cœur du dendrimère. Cette approche va permettre de solubiliser le PS hydrophobe par l'utilisation de dendrons hydrophiles et de groupes périphériques ioniques, mais aussi d'empêcher l'agrégation de ces PS grâce à l'enveloppe dendritique périphérique qui protège le cœur photosensibilisateur. En effet, dans le cas de molécules photoactives, tels que les PS ou les fluorophores, une concentration élevée en molécule aboutit à une agrégation qui engendre une modification de leurs propriétés photophysiques (Figure 18).

Concentration faible

Concentration élevée



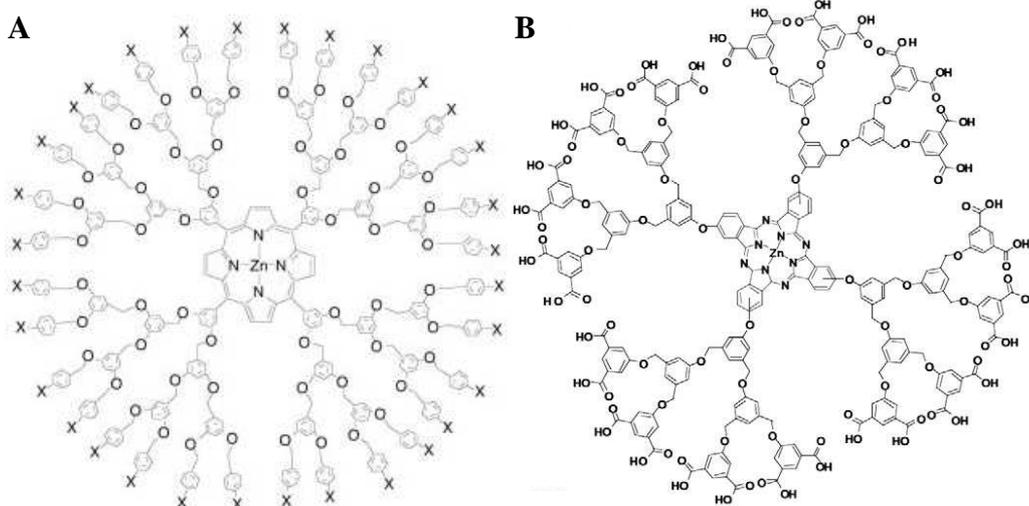
Structure « PS cœur de dendrimère » :  
**Fluorescence**



**Pas d'agrégation : conservation des propriétés photophysiques**

**Figure 18. Agrégation de PS conventionnels à concentration élevée, induisant une modification des propriétés photophysiques.**<sup>176</sup>

Les PS étudiés ont été des porphyrines,<sup>176-179</sup> des phthalocyanines,<sup>91, 176, 180</sup> ainsi que d'autres colorants photosensibles tel le Pheophorbide a.<sup>181</sup> Le PS joue ici le rôle du cœur du dendrimère, et est fonctionnalisé par la suite de la même manière qu'un dendrimère standard. La structure ainsi formée présente donc le PS au centre d'une structure hydrophile le protégeant du milieu extérieur (Figure 19).



**Figure 19. Exemple de structures dendrimériques à base de porphyrine<sup>178</sup> (A) et de phthalocyanine (B).**<sup>91</sup>

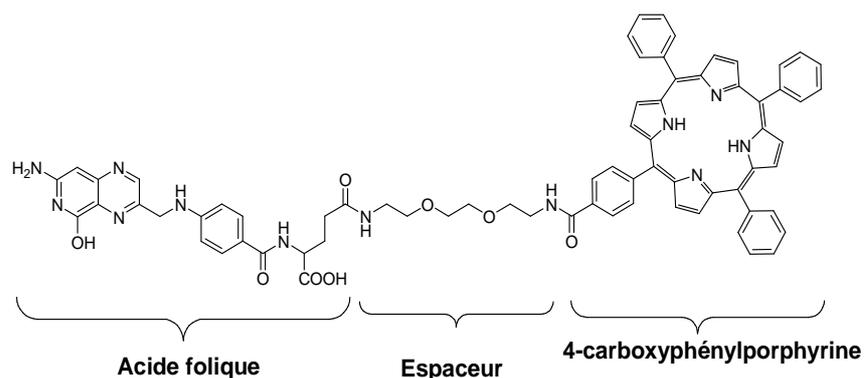
En plus des avantages liés à l'architecture tridimensionnelle des dendrimères, comme une amélioration de l'adressage par l'effet dendritique, l'utilisation de ce type de structure permet de rendre hydrophile les PSs organiques utilisés et donc de contourner les problèmes liés au caractère hydrophobe, comme l'accumulation non-sélective dans les tissus ainsi que les phénomènes d'agrégations susceptibles de détériorer leurs propriétés physicochimiques. De plus, les dimensions des structures obtenues vont permettre de bénéficier de l'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) des macromolécules envers les tissus tumoraux.<sup>182</sup>

## **V. Nouveaux assemblages photosensibilisants/dendrimères pour la PDT ciblée**

### **V.1 Objectifs**

La faible sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses des PS actuellement sur le marché provoque des effets indésirables, notamment une sensibilisation de la peau qui impose aux patients de ne pas s'exposer au soleil pendant plusieurs jours, voire plusieurs semaines, le temps que le PS soit éliminé.<sup>183</sup> Comme nous l'avons décrit dans le chapitre I, plusieurs groupes travaillent actuellement à une amélioration de la sélectivité de la PDT par un ciblage des néoplasiques à l'aide par exemple de conjugués photosensibilisateur/peptide ou photosensibilisateur/sucre.<sup>78, 184</sup>

Notre équipe a récemment montré que le récepteur  $\alpha$  de l'acide folique (RAF- $\alpha$ , détaillé au chapitre suivant) constituait également une cible privilégiée pour la vectorisation de photosensibilisateurs vers les cellules tumorales. En effet, le RAF- $\alpha$  est surexprimé à la surface de nombreuses cellules cancéreuses (ovaires, cou, poumon,...)<sup>185-186</sup> et sa densité à la surface augmente avec le stade du cancer. L'acide folique possède une très forte affinité pour son récepteur ( $K_d \approx 10^{-10}$ ).<sup>187</sup> Un conjugué acide folique/porphyrine avec un bras espaceur 2,2'-(éthylènedioxy)-bis-éthylamine (Figure 20) a récemment été préparé. Notre équipe a mis en évidence que ce composé s'incorporait jusqu'à 7 fois plus dans les cellules KB surexprimant le RAF que la tétraphénylporphyrine (TPP) utilisée comme référence.<sup>188</sup> Des expériences de compétitions par excès d'acide folique libre ont mis en évidence un mécanisme actif d'internalisation médié par le RAF- $\alpha$ . Des études de photocytotoxicité ont finalement montré que ce conjugué était actif en PDT et que la dose de lumière nécessaire à une inhibition de 50% de la croissance cellulaire était de 6,7 J/cm<sup>2</sup> alors que la TPP n'avait aucune activité dans ces conditions de doses de lumière et de concentration.



**Figure 20. m-THPC conjuguée à l'acide folique via un espaceur de type PEG.**

Afin d'accroître l'efficacité des PS vectorisés par l'acide folique, notre objectif était d'élaborer une structure proche de celle représentée figure 20, où un vecteur serait capable d'être associé à la fois à un PS et à l'AF. Ainsi, nous avons proposé la synthèse d'un assemblage à partir d'une plate-forme centrale polyfonctionnelle permettant l'ancrage de différents modules d'adressage et de photosensibilisation, et notre choix s'est porté vers un dendrimère. Comme cela a été montré précédemment, les dendrimères présentent de nombreuses propriétés permettant de répondre à ces différentes attentes :

- amélioration de la sélectivité par couplage d'un grand nombre de molécules d'adressage par l'effet dendritique ;
- amélioration du traitement par un couplage à un grand nombre de molécules photoactivables : adressage de plusieurs PS par une seule entité et prévention d'un quenching survenant lors d'une utilisation de solutions trop concentrées en PS ;
- hydrosolubilisation de PS hydrophobes.

L'objectif de cette étude a porté sur la fonctionnalisation sélective de dendrimères poly(amidoamine)s (PAMAMs) à l'aide de PS (porphyrine). Cette approche présentait l'intérêt de contrôler le nombre de PS couplés à la surface du dendrimère, c'est-à-dire le nombre de dendrons porteur de PS. Par conséquent, le nombre de fonctions périphériques laissées libres pouvant accueillir d'autres modules comme l'AF.

## **V.2 Choix du dendrimère, du PS et stratégie de synthèse**

### **V.2.1 Choix du dendrimère**

Notre choix s'est porté sur les polyamidoamines (PAMAMs)<sup>105</sup> qui sont les dendrimères les plus utilisés pour une application biologique. Leur solubilité en milieu aqueux et leur

biocompatibilité font de ces composés des vecteurs de choix pour le transport de fluorochromes ou de substances biologiquement actives utilisables à la fois en thérapeutique et pour l'imagerie.<sup>189</sup>

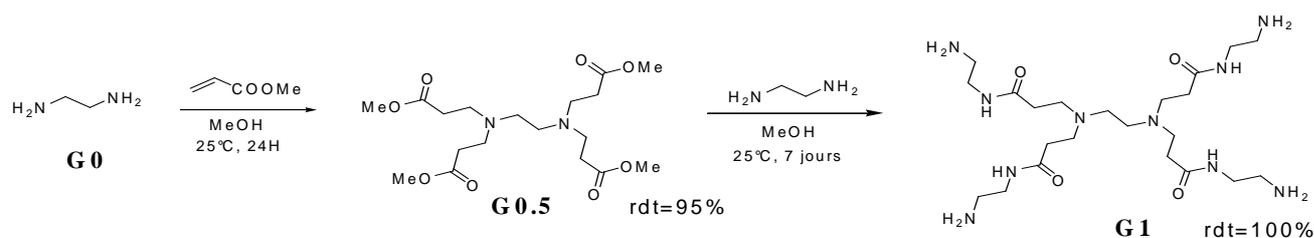
### V.2.2 Choix du PS.

Comme nous l'avons déjà mentionné, les PS les plus utilisés en PDT anticancéreuse sont les porphyrines et leurs dérivés. Le spectre d'absorption de ces molécules se présente classiquement par une forte bande d'absorption entre 400 et 430 nm (la bande de Soret) suivie de 4 autres bandes, dites bandes Q, dont les intensités sont de dix à vingt fois plus faibles et sont réparties entre 480 et 700 nm. Bien que l'utilisation de chlorines soit préconisée en PDT en raison de leur meilleure absorption dans les rayonnements rouge, notre choix s'est arrêté sur la 4-carboxyphénylporphyrine pour des raisons pratiques évidentes, la chlorine étant sujette à une réoxydation en porphyrine.

## V.3 Synthèse des dendrimères et des porphyrines

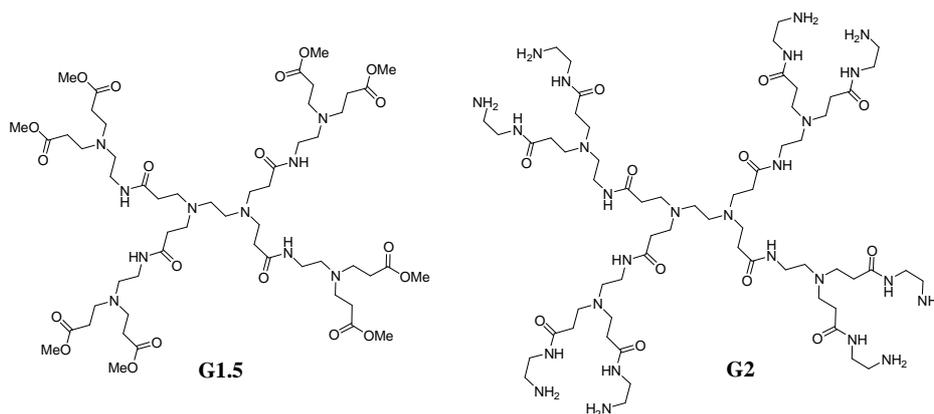
### V.3.1 Synthèse du dendrimère PAMAM

Les dendrimères PAMAMs sont aisément préparés par réaction de Michael entre l'éthylène diamine (cœur du dendrimère, G0) et l'acrylate de méthyle dans le MeOH à 25°C, suivi de l'amidation des quatre fonctions ester en périphérie à l'aide d'éthylène diamine (Figure 22).<sup>190</sup>



**Figure 21. Schéma de synthèse d'un dendrimère de 1ère génération de type PAMAM par voie divergente.**

Le diaminotétraester intermédiaire et la première génération avec 4 motifs amine en périphérie sont respectivement nommés G0.5 et G1. En répétant la même séquence réactionnelle, nous avons également obtenu les dendrimères PAMAM G1.5 et G2 représentés ci-dessous avec des rendements de 98 et 100 % (Figure 22).



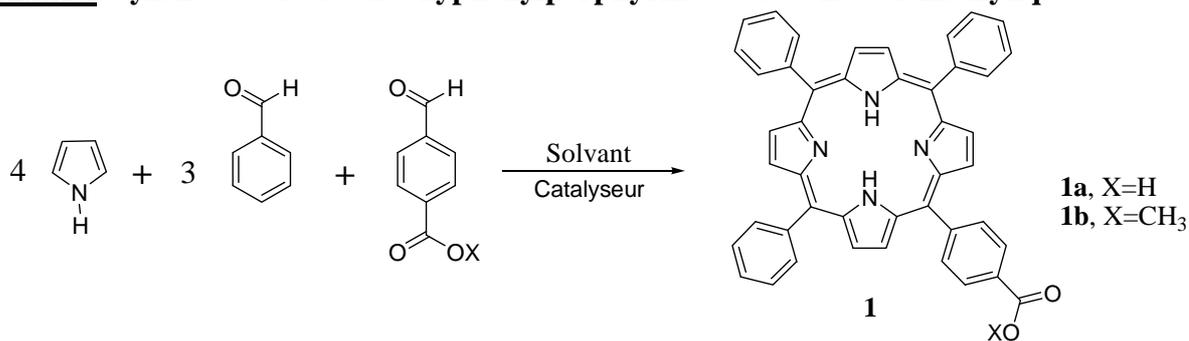
**Figure 22. Dendrimère de type PAMAM de génération 1.5 et 2.**

Les dendrimères ont été purifiés aux stades G0.5 et G1.5 par filtration sur colonne d'alumine. L'excès d'éthylène diamine utilisé pour l'étape d'amidation a été éliminé par de multiples évaporations en présence de *n*-BuOH. Ce solvant polaire permet, en effet, de casser les interactions entre les dendrimères G1 ou G2 et l'éthylène diamine et ainsi de faciliter son évaporation sous pression réduite. Il faut cependant noter que les dendrimères G1 et G2 contiennent des traces de *n*-BuOH (moins de 5%, déterminé par RMN  $^1\text{H}$ ) que nous n'avons pas pu éliminer par évaporation sous pression réduite

### V.3.2 Synthèse de la 4-carboxyphénylporphyrine.

Afin de permettre l'ancrage du photosensibilisateur à la surface des dendrimères G1 et G2, il nous a fallu préparer une porphyrine dissymétrique, la 4-carboxyphénylporphyrine **1a** (Tableau 4). Nous avons évalué l'efficacité de différents protocoles de la littérature afin d'optimiser la préparation du composé **1a**. Les résultats obtenus sont décrits dans le Tableau 4.

**Tableau 4. Synthèse de la 4-carboxyphénylporphyrine ou de son ester méthylique.**



Entrée	X	Solvant	Catalyseur	Température (°C)	Rendement (%)
1	H	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOH <sup>a</sup>	/	130	13
2	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOH <sup>a</sup>	/	130	12
3	H	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> <sup>b</sup>	BF <sub>3</sub> .OEt <sub>2</sub> <sup>c,e</sup>	25	9
4	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> <sup>b</sup>	BF <sub>3</sub> .OEt <sub>2</sub> <sup>c,e</sup>	25	12
5	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> <sup>b</sup>	BF <sub>3</sub> .OEt <sub>2</sub> <sup>d,e</sup>	25	26

<sup>a</sup> Condensation réalisée à l'air.

<sup>b</sup> Condensation réalisée sous courant d'azote.

<sup>c</sup> Addition de BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub> en une portion.

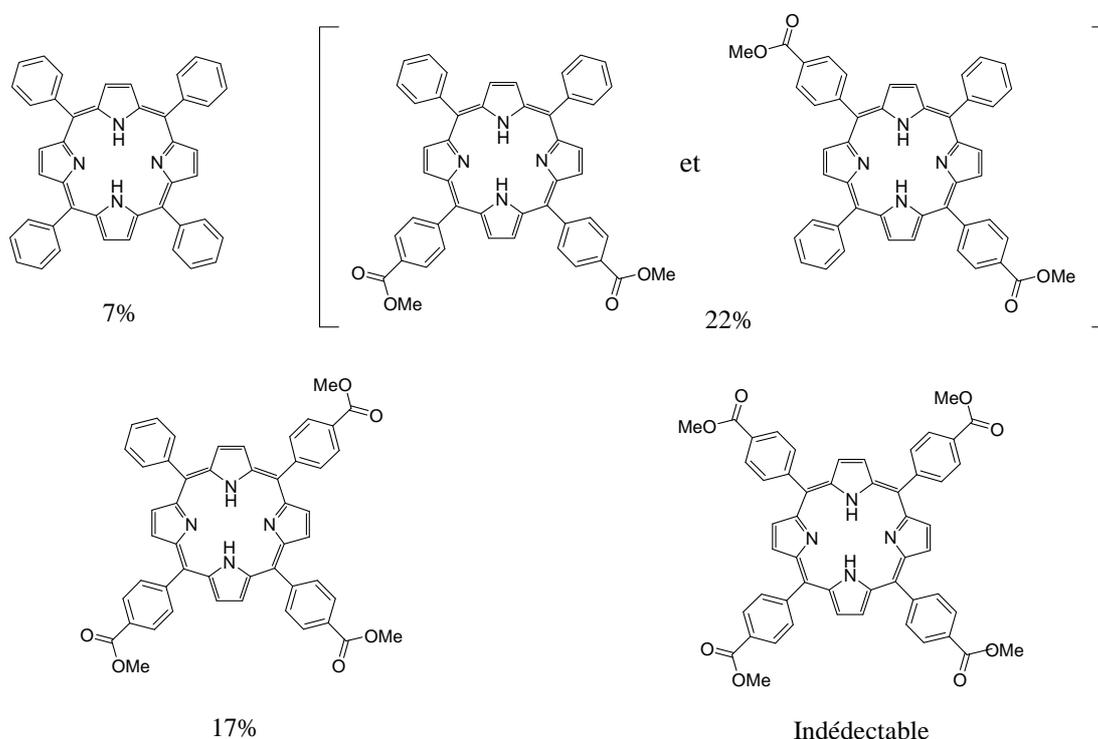
<sup>d</sup> Addition de BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub> en deux portions à t=0 et après 2h de réaction.

<sup>e</sup> L'aromatization du tétrapyrrole en porphyrine a été réalisée *in situ* à l'aide de *p*-chloranil.

Notons que ces réactions ont été réalisées en haute dilution à des concentrations en réactifs 0,2 mol/L afin de favoriser les couplages intramoléculaires au dépend des polymères. Le mode opératoire d'Alder-Longo,<sup>191</sup> c'est-à-dire le chauffage des 3 partenaires du couplage à reflux d'acide propanoïque pendant 2h et à l'air, donne directement accès aux porphyrines recherchées avec de bons rendements (entrées 1 et 2). La préparation de 400 mg de porphyrine par ce procédé nécessite cependant l'évaporation de 2 L d'acide propanoïque en fin de réaction, ce qui alourdit considérablement le traitement de ces couplages. Lorsque BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub> est utilisé comme catalyseur (entrées 3-5), la synthèse, réalisée sous N<sub>2</sub>, conduit à des tétrapyrroles qui sont aromatisés *in situ* en fin de réaction à l'aide du *p*-chloranil.<sup>192</sup>

Dans ces conditions, la préparation de la 4-carboxyphénylporphyrine **1a** peut-être réalisée à partir du 4-carboxybenzaldéhyde (X=H, entrée 3) mais la séparation par chromatographie du composé **1a** recherché des substrats issus des couplages ayant mis en jeu 2 ou 3 molécules de 4-carboxybenzaldéhyde est alors très compliquée. C'est pourquoi nous avons préféré travailler sur l'ester (entrées 4 et 5). Dans ce cas, le mode opératoire décrit par Laville<sup>192</sup> dans lequel BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub> est ajouté en 2 temps au milieu réactionnel a donné les meilleurs résultats

(entrée 5). Les produits secondaires de cette réaction ainsi que leurs rendements sont donnés figure 23.



**Figure 23. Structures et rendements des produits secondaires de synthèse de la 4-carboxyméthylphénylporphyrine.**

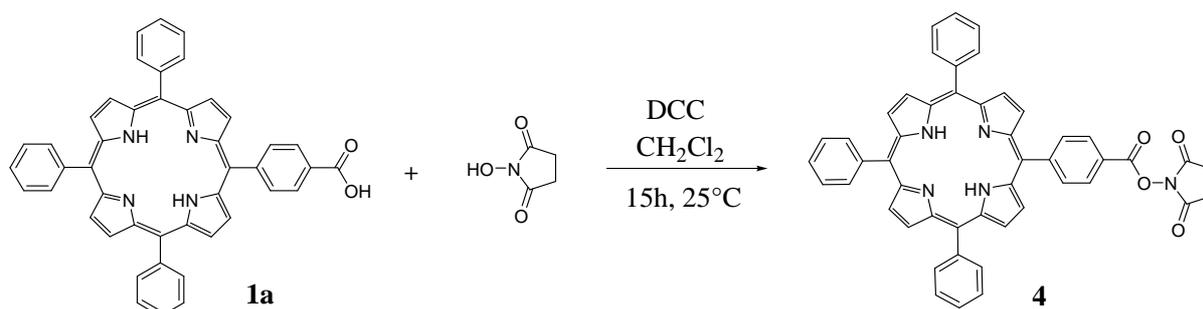
L'ester méthylique de la 4-carboxyphénylporphyrine **1b** a alors été saponifié par traitement à la soude dans un mélange THF/MeOH/Pyridine pendant 12 heures. Après acidification, le composé **1a** a été isolé avec un rendement de quantitatif.

### V.3.3 Fonctionnalisation complète de dendrimères PAMAM par la 4-carboxyphénylporphyrine.

La synthèse de structures dendrimériques totalement fonctionnalisées à leur périphérie par des PS est une réaction qui a fait l'objet de quelques études dans la littérature. Grossauer<sup>193</sup> et Shinkai<sup>194</sup> décrit la synthèse de "dendrimères étoiles" par réaction entre le 1,3,5-triiodobenzène avec un arénylporphyrine par un couplage de Sonogashira pallado-catalysé. Ce type d'édifice en forme d'étoile a également été préparé par Twyman par réaction entre la 4-aminophénylporphyrine et l'acide 1,3,5-benzène-tricarboxyrique.<sup>195</sup> La fonctionnalisation totale de la périphérie de dendrimères polypropylène imine (PPI) par une porphyrine activée sous forme d'ester de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) a également été

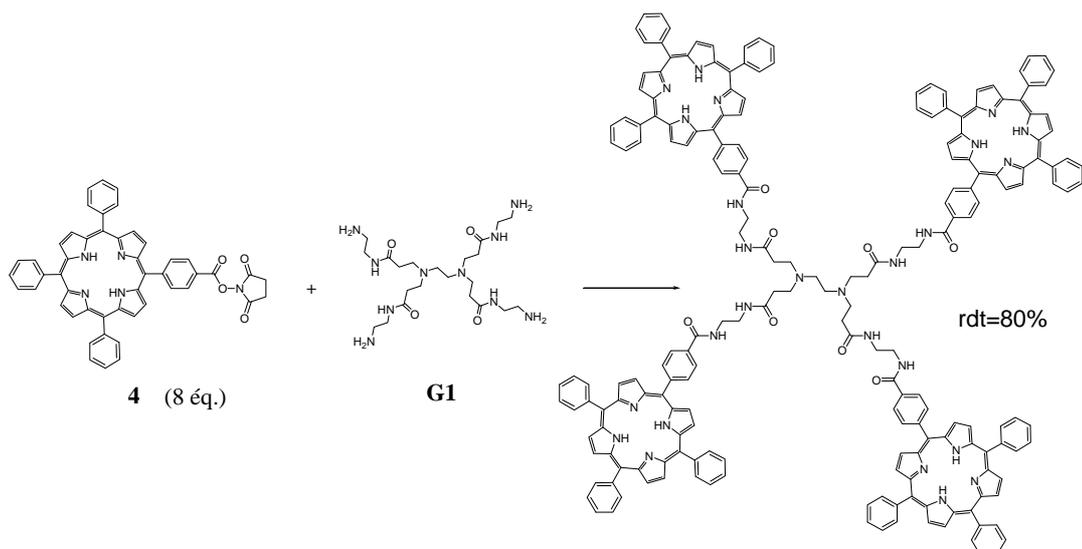
rapportée.<sup>196-197</sup> Cette voie de synthèse a notamment permis la préparation des dendrimères PPI de générations 1 et 5 substitués à leur périphérie respectivement par 4 et 64 noyaux porphyrines. Notons que cette fonctionnalisation totale des groupements amine de périphérie nécessite un excès de la porphyrine activée (de 1,1 à 2,0 éq. par groupe amine) pour être totale.

A notre connaissance, une couverture totale de dendrimères PAMAM par des porphyrines n'a jamais été décrite dans la littérature. L'équipe de Kim a décrit l'ancrage d'acides dérivés de la 2,2'-bipyridine sur le PAMAM G1.<sup>198</sup> La fonctionnalisation totale du dendrimère avait été directement réalisée à partir de l'acide par couplage en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et HOBt dans le DMAc (2,5 éq. par amine de périphérie ont été utilisés). Le 4-carboxyphénylporphyrine **1a** a tout d'abord été activée par le NHS à l'aide de DCC dans le dichlorométhane. Après purification par chromatographie sur gel de silice, l'ester **4** a été isolé avec un rendement quantitatif (Figure 24).



**Figure 24. Activation de la fonction carboxyle de la 4-carboxyméthylphénylporphyrine par la N-hydroxysuccinimide (NHS).**

Cet ester activé a ensuite été mis à réagir avec les générations G1 et G2 des dendrimères précédemment synthétisés. Lorsqu'un excès d'ester activé **4** (8 éq., soit 2 éq. par amine de surface) est utilisé pour le couplage, le dendrimère G1 portant 4 porphyrines à ses extrémités est obtenu majoritairement (Figure 25).



**Figure 25. Schéma de fonctionnalisation d'un dendrimère PAMAM G1 par 4 4-carboxyméthylphénylporphyrine.**

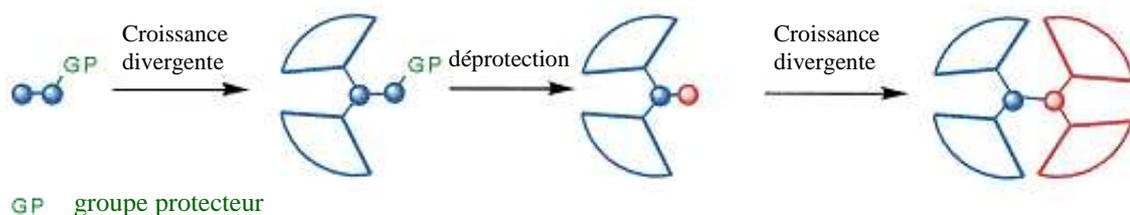
Dès que la porphyrine activée est utilisée en quantité stœchiométrique ou en défaut (0.9 éq. par amine périphérique) par rapport à G1, la distribution des produits est plus complexe. Le composé G1(PS)<sub>4</sub> reste majoritaire mais le principal produit secondaire est le dendrimère substitué par une seule porphyrine. Cette distribution ne subit quasiment pas de modification si la température du milieu réactionnelle est augmentée à 40°C. Ces résultats montrent que si la porphyrine activée est utilisée soit en quantité stœchiométrique soit en défaut par rapport aux fonctions amine de surface, des mélanges complexes de dendrimères PAMAM fonctionnalisés par 1 à 4 porphyrines sont obtenus. La forte polarité de ces composés rend leur purification très difficile même sur colonne d'alumine désactivée.

Nous avons donc décidé de revoir notre méthode de synthèse et d'adopter une stratégie appelée divergente/divergente<sup>199</sup> pour la construction du dendrimère.

#### **V.4 Synthèse de dendrimères fonctionnalisés sélectivement par des photosensibilisateurs selon la stratégie "divergente/divergente"**

##### **V.4.1 Stratégie de synthèse.**

La stratégie « divergente/divergente » repose sur une croissance en 2 temps du dendrimère à partir d'un cœur monoprotégé à une de ses extrémités (Figure 26).<sup>199</sup> Cette méthode de synthèse est la plus couramment employée pour la préparation de dendrimères dissymétriques.



**Figure 26. Principe de la synthèse de dendrimère par la voie divergente/divergente.**

Afin de faciliter la purification des différents intermédiaires de cette voie de synthèse, nous avons également choisi de ne pas travailler avec le dendrimère azoté à sa périphérie, mais avec la "demi-génération" c'est à dire le dendrimère terminé par les esters méthyliques. Cette voie de synthèse supposera donc la réaction d'un dérivé azoté de la porphyrine avec la demi-génération du dendrimère.

#### V.4.2 Synthèse de composés dissymétriques PAMAM/PS

La synthèse, ainsi que la caractérisation de dendrimères asymétriques fonctionnalisés par des unités photosensibilisatrices à leur périphérie est développée dans l'article inséré à la fin de ce chapitre :

Morosini V, Frochot C, Barberi-Heyob M, Schneider R. "Divergent synthesis of novel unsymmetrical dendrons containing photosensitizing units." **Tetrahedron Lett.** 2006; 47(49):8745-9.

## **VI. Conclusions et perspectives**

L'utilisation de dendrimères comme vecteur de PS dans le cadre de la PDT présente beaucoup d'avantages, notamment la capacité de solubiliser des PS hydrophobes dans l'eau et d'éviter également leur agrégation, phénomène qui engendre la modification de leurs propriétés photophysiques, en particulier la baisse du  $\Phi_{\Delta}$ , au détriment de l'efficacité du traitement PDT. De plus, leur surface multifonctionnelle permet le couplage de biomolécules d'adressage, augmentant ainsi la sélectivité, et donc l'efficacité du traitement PDT anticancéreux. Dans ce but, nous avons étudié le greffage sélectif de porphyrines activées par le NHS sur la surface polyazotée de dendrimères PAMAMs. Nous avons montré que si un excès de porphyrine était utilisé (2 éq. par fonction amine) lors du couplage, une couverture totale du dendrimère était réalisable avec de bons rendements. Dès que l'ester activé de la porphyrine est utilisé en quantité stœchiométrique ou en défaut par rapport aux fonctions amines, des mélanges complexes et difficilement séparables contenant majoritairement les dendrimères mono- et tétra-substitués sont obtenus. L'utilisation de la génération azotée d'un dendrimère PAMAM se prête donc très mal à une fonctionnalisation sélective et nous avons préféré développer une stratégie dite "divergente-divergente" pour accéder aux dendrimères sélectivement fonctionnalisés par des porphyrines. Cette stratégie est basée sur l'utilisation d'un cœur de dendrimère mono-protégé à partir duquel les groupements de périphérie sont greffés lors de deux croissances distinctes. En travaillant sur la demi-génération terminée par des fonctions esters et avec des porphyrines substituées par des amines nucléophiles, nous avons montré qu'il était possible de fonctionnaliser sélectivement des générations G0.5 à cœur éthylène diamine et PEG, tout en conservant les propriétés photophysiques du PS.

En utilisant cette stratégie de synthèse, il est possible de construire l'autre moitié du dendrimère en faisant appel à des dendrons présentant diverses fonctionnalités. Cette méthode pourrait donc permettre d'aboutir à la préparation de vecteurs nanométriques présentant à leurs périphéries des photosensibilisateurs et différentes molécules d'adressage. La multiplication de ces fonctionnalités permettrait, grâce à l'effet dendritique, d'améliorer l'activité photodynamique et la reconnaissance tumorale de telles structures. L'étude de cette multifonctionnalisation présenterait beaucoup d'intérêt, notamment en évaluant l'impact du taux de greffage des PSs et des molécules d'adressage sur l'efficacité du traitement PDT, et ainsi pouvoir développer des structures dendrimère/PS adressées optimisées pour la PDT.

Cette stratégie de synthèse pourrait être également développée pour la préparation de dendrimères asymétriques de générations supérieures. La multiplication des dendrons offrirait

la possibilité d'une fonctionnalisation plus poussée, que ce soit par le nombre ou par la répartition de ces différentes fonctionnalités à ajouter à la surface du dendrimère.

Cependant, bien que ce type d'édifice soit prometteur, l'utilisation de dérivés tétrapyrroliques comme la porphyrine ou la chlorine, ou des composés de type phtalocyanine peut poser des problèmes en PDT anticancéreuse. En effet, ce type de PS organique est sujet au photoblanchiment, qui témoigne de leur dégradation au cours de l'irradiation lumineuse, altérant ainsi l'efficacité du traitement. De plus, leur capacité à absorber dans la fenêtre thérapeutique idéale de la PDT, bien qu'améliorée dans le cas de chlorines ou phtalocyanines par rapport aux porphyrines, n'est pas optimale. Par conséquent, le développement de PS ne présentant pas ces inconvénients représente un champ de recherche attractif dans l'optique d'une amélioration de l'efficacité d'un traitement PDT anticancéreux.

Une alternative à l'emploi de ces types de PS organiques ainsi que de vecteurs de type dendrimère réside dans l'utilisation de Quantum Dots (QDs). En effet, ces nanoparticules, dont la taille est généralement comprise entre 2 et 200 nm, possèdent des propriétés photophysiques très intéressantes, et donc potentiellement devenir des PS adaptés à la PDT. De plus, de par leur structure et leurs fonctions de surface, ces nanoparticules peuvent jouer le rôle de vecteur sous la forme d'une plateforme multifonctionnelle permettant un ciblage de tissus cancéreux. Ainsi, nous avons développé des structures de type QDs adressés par l'AF, dont les propriétés photophysiques sont adaptées à un usage en PDT.

La synthèse, la caractérisation ainsi que l'efficacité de l'utilisation de ce type de structure en PDT est développée au chapitre suivant.

## VII. Matériels et méthodes

L'évolution des réactions est suivie qualitativement par chromatographie sur couche mince (ccm) réalisée sur plaques de silice Macherey-Nagel SIL G/UV<sub>254</sub>. L'identification des produits de réaction a été réalisée par analyse RMN <sup>1</sup>H et/ou <sup>13</sup>C, spectroscopie infrarouge et UV-visible.

Les spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C ont été enregistrés au laboratoire de méthodologie RMN sur des appareils BRUCKER AM 400 à 400.13 MHz et BRUCKER AM 200 à 200 MHz. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm (δ) par rapport au tétraméthylsilane (TMS) utilisé comme référence interne. La multiplicité des signaux est notée comme suit: s, singulet, d, doublet, t, triplet et m pour multiplet. Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil de Totoli. Les spectres IR réalisés en utilisant des pastilles de NaCl ou de KBr.

### VII.1 Synthèse des dendrimère G0,5, G1, G1,5 et G2,0.

#### VII.1.1 Synthèse du dendrimère PAMAM G0,5.

Sous atmosphère d'azote, de l'acrylate de méthyle (14,3 g, 0,166 mol) est additionné goutte à goutte à de l'éthylène diamine (2 g, 33,3 mmol) en solution dans 30 mL de méthanol. Le mélange est agité une nuit à température ambiante et l'excès d'acrylate de méthyle et le méthanol sont évaporés sous pression réduite. Le dendrimère obtenu est filtré sur alumine (éluant: MeOH/acétone: 50/50). Rendement = 95%; IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>)= 3320, 1667 (large) et 1642; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ = 3.83 (s, 12H); 2.95-2.47 (m, 20H); RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz): δ = 172,8, 51,85, 51,33, 49.41, 32,23.

#### VII.1.2 Synthèse du dendrimère PAMAM G1.

Sous atmosphère d'azote, le dendrimère PAMAM G0.5 (2 g, 7,95 mmol) en solution dans 20 mL de méthanol est additionné goutte à goutte à une solution d'éthylène diamine (22,3 g, 0,371 mol) dans 50 mL de méthanol. Le mélange est agité à température ambiante pendant 5 jours. L'excès d'éthylène diamine restant et le méthanol sont évaporés sous pression réduite. Les traces d'éthylène diamine restantes sont éliminées en mettant le produit en solution dans 50 mL de *n*-Butanol et en évaporant le mélange ainsi obtenu. Cette opération est répétée jusqu'à disparition totale de l'éthylène diamine résiduelle (contrôle par RMN <sup>1</sup>H). Le produit obtenu est utilisé sans purification ultérieure pour l'étape suivante. Rendement = 100%; IR

(NaCl,  $\text{cm}^{-1}$ )= 3337, 1656 (large) et 1645; RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  = 8,14 et 7,91 (4H, CONH); 3,22 (q,  $J$  = 5,6 Hz, 8H); 2.80-2.73 (q large, 8H); 2.67-2.59 (m, 12H); 1.71 (s, 8 H,  $\text{NH}_2$ ).

### VII.1.3 Synthèse du dendrimère PAMAM G1.5.

Le mode opératoire décrit au paragraphe 1.1 est répété sur le PAMAM G1. Le dendrimère obtenu est purifié par filtration sur colonne d'alumine (éluant: MeOH). Rendement = 98 %; IR (NaCl,  $\text{cm}^{-1}$ ) = 3311, 1674 (large), 1641; RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz):  $\delta$  = 3.83 (s, 2H); 2.93-2.47 (m, 68H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz):  $\delta$  = 173,1, 172,7, 52.7, 52,5, 51,6, 49,9, 49,3, 37,3, 33,7, 32,6.

### VII.1.4 Synthèse du dendrimère PAMAM G2.0.

Le mode opératoire décrit au paragraphe 1.2 est répété sur le PAMAM G1.5. Le dendrimère PAMAM G2.0 est utilisé sans purification ultérieure. Rendement = 100%; IR (NaCl,  $\text{cm}^{-1}$ )= 3335, 1659 (large) et 1642. RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  = 8,27 et 7,99 (NH, 12H); 3,22-3,06 (m, 28H); 2,73-2,55 (m, 44H); 2,48-2,41 (s, large, 16H,  $\text{NH}_2$ ); 2,27-2,18 (m, 28H).

## VII.2 Synthèse des photosensibilisateurs.

### VII.2.1 Synthèse de la 5,10,15-(triphényl)-20-(4-carbométhoxy)porphyrine.

Sous atmosphère inerte et à l'abri de la lumière, on place dans un réacteur de 2 L du pyrrole fraîchement distillé (0,933 g, 13,9 mmol), le benzaldéhyde (1,189 g, 11,25 mmol), le *p*-(carbométhoxy)benzaldéhyde (0,645 g, 3,93 mmol) et 1.7 L de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhydre. Après 30 min d'agitation, on additionne  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (45  $\mu\text{L}$ , 0,365 mmol). Après 2 h, la même quantité de  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  est à nouveau ajoutée. Le mélange réactionnel est agité 15 h à température ambiante. L'*o*-chloranil (2,698 g, 10,97 mmol) est alors additionnée et le milieu est porté à reflux pendant 2 h. Le solvant est alors évaporé sous pression réduite et la porphyrine est purifiée par chromatographie sur gel de silice. Une première filtration avec un éluant acétone/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1/99, v/v) permet l'élimination des polymères. Une seconde purification avec un éluant hexane/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (9/1, v/v) permet d'isoler la porphyrine **1a** avec un rendement de 26%. Solide pourpre; F( $^{\circ}\text{C}$ )= 266-270; IR (NaCl,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1747; RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  = 8,87-8,78 (m, 8H) ; 8,44 (d,  $J$  = 8,9 Hz, 2H) ; 8.31 (d,  $J$  = 8,9 Hz, 2H); 8,22-8,20

(m, 6H) ; 7,81-7,72 (m, 9H); 4,11 (s, 3H); -2,79 (s, 2H, NH); UV-visible (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\lambda_{\max}$  = 417, 511, 547, 590, 645 nm; R<sub>f</sub> = 0,84 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

#### VII.2.2 Synthèse de la 5,10,15-(triphényl)-20-(4-carboxyphényl)porphyrine.

Sous atmosphère inerte et à l'abri de la lumière, le composé **1a** (0,421 g, 0,624 mmol) est solubilisé dans 7 ml de THF et 1,7 ml de pyridine. De la potasse (8,7 g, 155 mmol) dans 65 mL de MeOH sont alors additionnés. Le mélange est porté à reflux pendant 22 h. Après retour à température ambiante, le milieu est neutralisé par addition d'une solution saturée d'acide citrique (150 mL) puis extrait à l'aide de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x75 mL). Les phases organiques combinées sont séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentrées sous pression réduite. Le composé est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : acétone/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = de 25/75 à 66/33, v/v). Rendement = 100%. Solide pourpre; F(°C) > 300°C; IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>) : 3300 à 2600 (large); RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 8,93-8,82 (m, 8H) ; 8,54 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H) ; 8,25 (dd, *J* = 6,4, 1,6 Hz, 6H); 7,84-7,76 (m, 9H); UV-visible (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\lambda_{\max}$  = 417, 513, 549, 588, 649 nm; R<sub>f</sub> = 0.43 (acétone/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 25/75, v/v).

## VIII. “Divergent synthesis of novel unsymmetrical dendrons containing photosensitizing units”

Morosini, V.; Frochot, C.; Barberi-Heyob, M.; Schneider, R.

**Tetrahedron Letters**, 2006, 47, 8745-8749.

Les résultats préliminaires de cette étude nous ont conduit à adopter une stratégie de synthèse dite "divergente/divergente". La synthèse et la caractérisation de photosensibilisateurs de type porphyrines conjugués à la périphérie de dendrimères asymétriques sont présentées dans l'article suivant.

Au cours de ce travail, différentes méthodes de couplages PS/dendrimères ont été décrites, ce qui a permis d'aboutir à des dendrimères PAMAM asymétriques comportant de 2 à 4 unités photosensibilisatrices ont été obtenus avec succès.

Il est cependant important de noter que les composés obtenus, du fait de l'emploi de petites générations de dendrimères (G1 et G2), présentent des rendements quantiques de production d'oxygène singulet ( $\Phi_{\Delta}$ ) des PS est altérés par des phénomènes de stacking et d'interactions entre les PS spatialement proches. Ce phénomène est cependant réversible par addition de tensio-actif au composé, ce qui permet de retrouver le  $\Phi_{\Delta}$  équivalent à des PS monomères.

## Divergent synthesis of novel unsymmetrical dendrons containing photosensitizing units

Vincent Morosini,<sup>a</sup> Céline Frochot,<sup>b</sup> Muriel Barberi-Heyob<sup>c</sup> and Raphaël Schneider<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>LCPME Groupe Thiols, UMR 7564 CNRS-UHP, Faculté de Pharmacie, Nancy-Université, BP 80403, 54501 Nancy Cedex, France

<sup>b</sup>DCPR, UMR 7630 CNRS-INPL, Groupe ENSIC, Nancy-Université, 1 Rue Grandville, 54000 Nancy, France

<sup>c</sup>Centre Alexis Vautrin-CRAN, UMR 7039 CNRS-INPL-UHP, Nancy-Université, 54511 Vandœuvre les Nancy, France

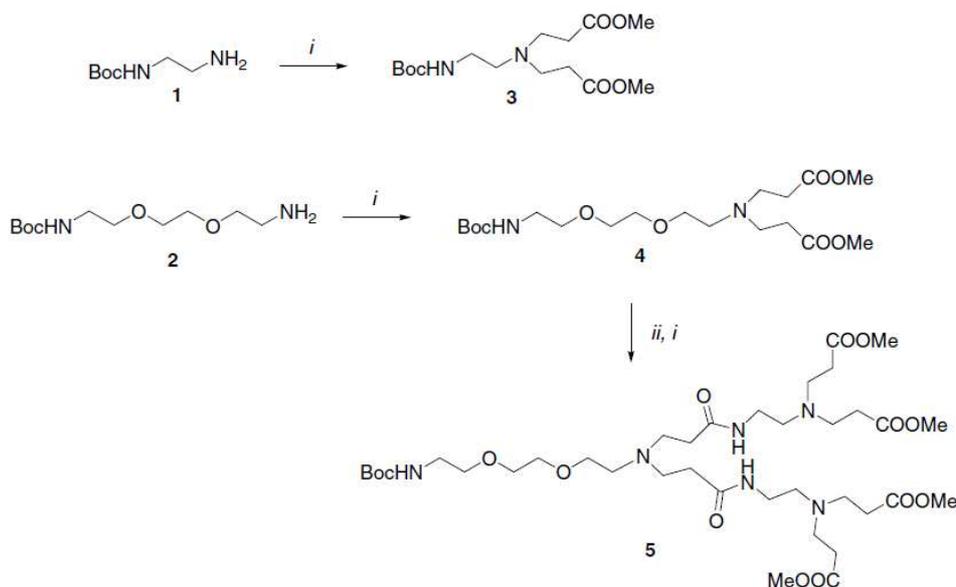
Received 6 September 2006; accepted 2 October 2006

**Abstract**—The synthesis, characterization and singlet oxygen quantum yield of novel unsymmetrical dendrons containing photosensitizing units at their periphery is reported. Boc-protected 2,2'-(ethylenedioxy)-bis-ethylamine reacted with methyl acrylate and ethylene diamine to give half-dendrimers **4** and **5** with 2 and 4 end groups, respectively. Amine-tethered porphyrins and compounds **4** and **5** were efficiently coupled in DMF at 100 °C to give the functionalized dendrons. UV–visible and fluorescence emission spectra showed that the photophysical properties of the porphyrins were retained in the dendrimers.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Many types of dendrimers have been designed and utilized in many applications, including chemistry and pharmaceuticals.<sup>1</sup> Among them, poly(amidoamine)

(PAMAM) dendrimers have demonstrated great promise for a variety of biomedical applications. This class of polymers has a great number of favourable properties



**Scheme 1.** Synthesis of the ester-terminated half dendrimers. Reagents and conditions: (i) methyl acrylate (3.0 equiv/NH<sub>2</sub>), MeOH, 24 h, rt and (ii) ethylene diamine (5.0 equiv/COOMe), MeOH, 5 days, rt.

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 68 21 56; fax: +33 3 83 68 21 54; e-mail: [raphael.schneider@pharma.uhp-nancy.fr](mailto:raphael.schneider@pharma.uhp-nancy.fr)

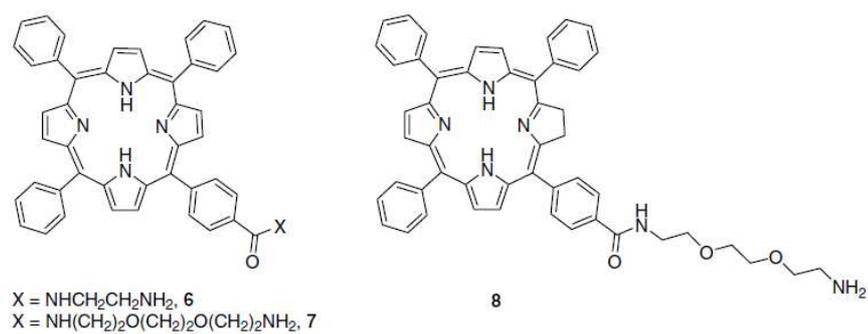


Figure 1.

Table 1. One-pot preparation of amine-functionalized porphyrins and chlorins<sup>a</sup>

Starting material	X	Amine <sup>b</sup>	Product	Yield <sup>c</sup> (%)
		H <sub>2</sub> N—CH <sub>2</sub> —NH <sub>2</sub>	<b>6</b>	93
		H <sub>2</sub> N—CH <sub>2</sub> —NH <sub>2</sub>	<b>6</b>	82
		H <sub>2</sub> N—CH <sub>2</sub> —NH <sub>2</sub>	<b>6</b>	29
		H <sub>2</sub> N—CH <sub>2</sub> —NH <sub>2</sub>	<b>6</b>	74
		H <sub>2</sub> N—CH <sub>2</sub> —O—CH <sub>2</sub> —O—CH <sub>2</sub> —NH <sub>2</sub>	<b>7</b>	95
		H <sub>2</sub> N—CH <sub>2</sub> —O—CH <sub>2</sub> —O—CH <sub>2</sub> —NH <sub>2</sub>	<b>8</b>	89

<sup>a</sup> Reactions were conducted in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> between 0 and 25 °C for 1 h.<sup>b</sup> 10 equiv of diamine were used.<sup>c</sup> Isolated yields after column chromatography.

including well-defined chemical structure, globular shape, low polydispersity index (close to 1.0), biocompatibility, and controlled terminal functional groups. Modification of the PAMAM dendrimer surface functional groups with targeting compounds, fluorescent dyes, and drugs is an interesting method to produce new imaging and therapeutic agents.<sup>1a,2</sup> However, for some applications, it would be advantageous to use an unsymmetrical dendrimer containing more than one terminal functional group.

Photodynamic therapy (PDT) is a relatively new cytotoxic treatment used mainly in anticancer approaches.<sup>3</sup> PDT requires a photosensitizer (PS), light of an appropriate wavelength and molecular oxygen. Upon photoactivation, the generation of cytotoxic species, such as singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ), induces the destruction of cancer cells. Nevertheless, one of the main drawbacks of the PS tested is their lack of selectivity with regard to uptake and retention by tumour cells versus normal ones, which leads to a prolonged skin photosensitization.<sup>4</sup>

We have initiated a programme of research aimed at developing dendrimers that contain PS's like porphyrins and chlorins on one surface, and cell recognition groups such as folic acid or peptides to generate delivery systems able to target specific cells.<sup>3b,c</sup> The produced macromolecules will be used for targeted PDT with the goal to selectively accumulate the PS within the diseased tissue with little or non-uptake by non-cancerous cells. Towards this end, a challenging target is the construction of PAMAM dendrimers possessing a well-defined number of photosensitizing units at their periphery.

We report herein, for the first time, the successful preparation of PAMAM dendrimers functionalized with PS using a divergent/divergent approach.<sup>5</sup> The ability of these dendrimers to produce  $^1\text{O}_2$  was investigated by monitoring  $^1\text{O}_2$  emission at 1272 nm after 418 nm excitation in toluene.

Boc-protected ethylene diamine **1** and 2,2'-(ethylenedioxy)-bis-ethylamine **2** used as cores for the divergent/divergent PAMAM synthesis were prepared according to published procedure.<sup>3b</sup> 2,2'-(ethylenedioxy)-bis-ethylamine was chosen as the core since block copolymers containing poly(ethylene glycol) (PEG) show high solubility in water, non-immunogenicity and improved biocompatibility.<sup>6</sup> Compounds **1** and **2** were subjected to a standard PAMAM synthesis<sup>7</sup> using ethylene diamine and methyl acrylate to afford the ester-terminated half dendrimers **3**, **4** and **5**, in overall yields of 62, 63 and 57%, respectively (Scheme 1).

Dendrimers **3**, **4** and **5** were purified by column chromatography on silica gel using MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/5) as the eluant. Their structures were confirmed by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, IR spectroscopy and HR-MS.

'Surface' functionalization of ester-terminated half dendrimers **3**, **4** and **5** with photoactive units was evaluated using ethylene diamine and 2,2'-(ethylenedioxy)-bis-ethylamine tethered 5,10,15-(triphenyl)-20-(4-carboxyphenyl)porphyrin (compounds **6** and **7**) and 5,10,15-(triphenyl)-20-(4-carboxyphenyl)chlorin (compound **8**) (Fig. 1).

Compound **6** was previously prepared using Boc-protected ethylene diamine<sup>8</sup> but, in our hands, degradation made the final purification procedure extremely difficult, resulting in a low yield (31%). A direct synthesis using an active ester of the 5,10,15-(triphenyl)-20-(4-carboxyphenyl)porphyrin or chlorin and an excess diamine was therefore developed since ethylene diamine and 2,2'-(ethylenedioxy)-bis-ethylamine are water-soluble and very easy to remove. Results obtained with the pentafluorophenol active ester<sup>9</sup> were found superior to *N*-hydroxysuccinimide,<sup>10</sup> 1,3-thiazoline-2-thione<sup>11</sup> or by activation of the carboxyl function using DCC and HOBt.<sup>12</sup> The results are summarized in Table 1.<sup>13</sup>

Amines **6** and **7** were subjected to amide bond formation with ester-terminated half dendrimers **3**, **4** and **5**. An examination of the literature shows that such functionalizations are very limited and required a high excess of amine (generally more than 12 equiv per ester function) and long reaction times (20 days at room temperature) to convert all the ester functions at the periphery.<sup>5</sup> The use of a large excess of amine tethered porphyrins for the amidation of dendrons **3**, **4** or **5** is not feasible. After some experimentation, we found that good results for the amidation step could be obtained using only a slight excess of **6** or **7** (1.3 equiv per ester function) in DMF at 100 °C.

Although several conditions were attempted (use of higher temperatures and/or extended reaction times), the coupling of **3** with aminoporphyrins **6** or **7** was unsatisfactory and yielded only monoamidation products **9** and **10** in 54% and 84% yields, respectively (Fig. 2).

Much better results were obtained using half dendrimers **4** and **5** and amine tethered porphyrin **7**. Complete func-

tion was achieved with half dendrimers **4** and **5** and amine tethered porphyrin **7**. Complete func-

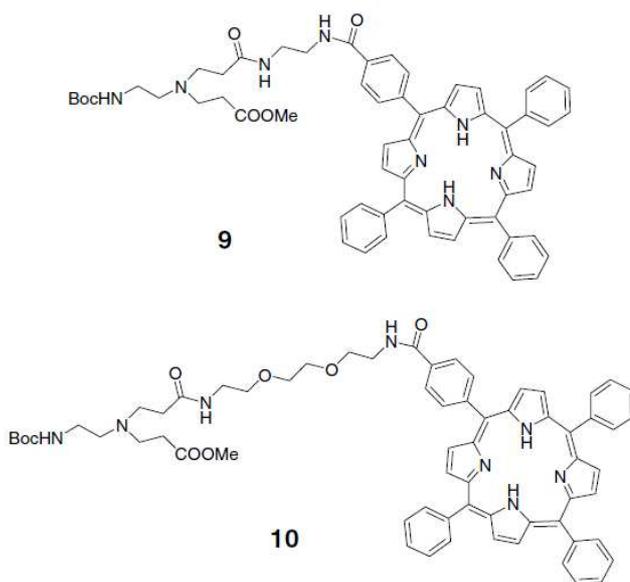


Figure 2.

tionalization of ester functions could be achieved and compounds **11** and **12** containing 2 and 4 porphyrin end groups were obtained in 42% and 37% yields, respectively (Fig. 3).<sup>14</sup> Monoamidation compound was obtained as the by-product in a 28% yield starting from **4**. FT-IR, <sup>1</sup>H NMR, UV–visible spectroscopy studies

and HR-MS analysis confirmed the chemical structure of final products for both generations.

The removal of the Boc-protecting group of compounds **11** and **12** was finally achieved using CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/1) to give the free amine dendrons **13** and **14** in 64%

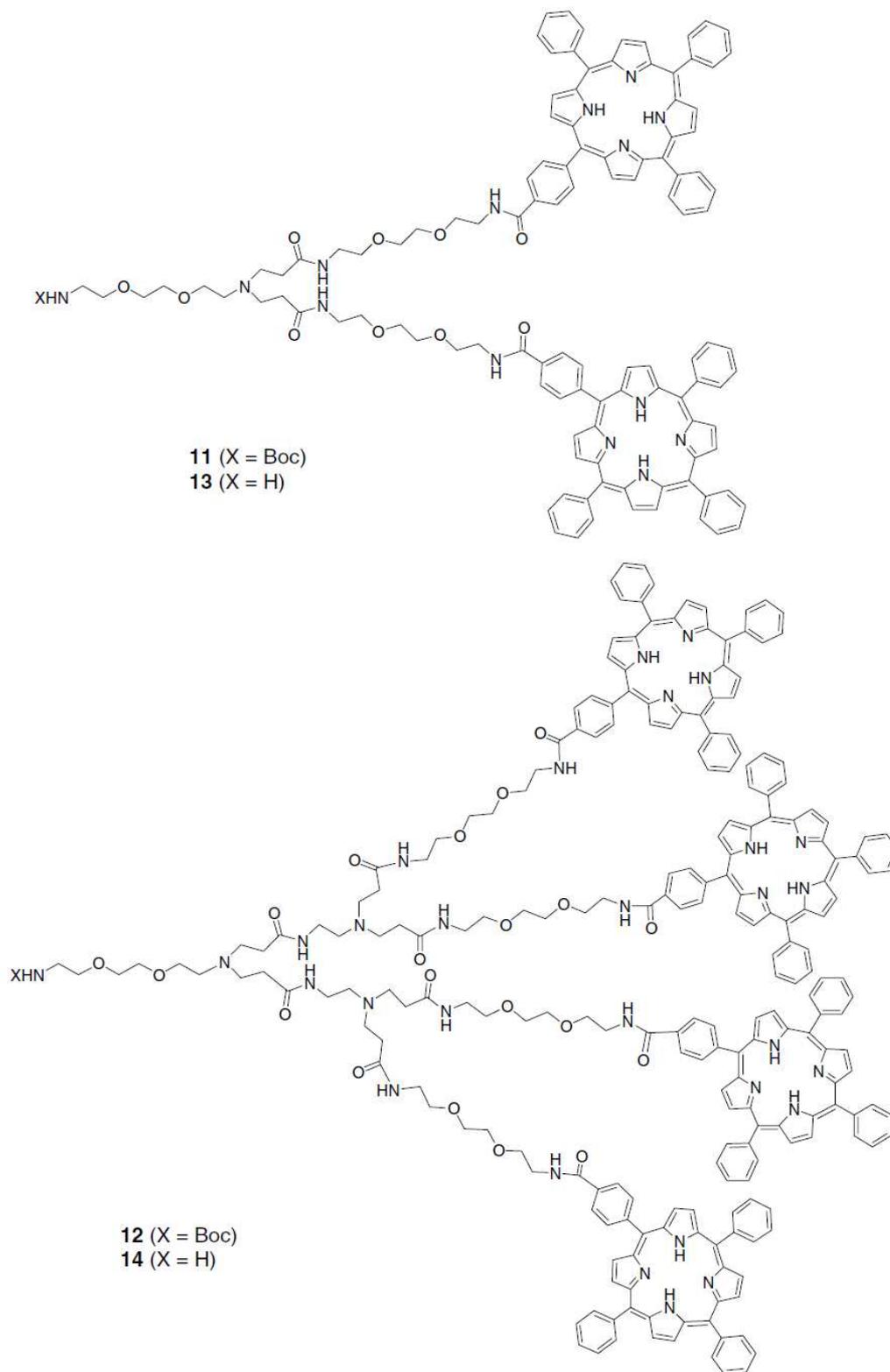


Figure 3.

and 58% yields, respectively. The use of HCl in Et<sub>2</sub>O did not lead to an improvement of the deprotection and larger amounts of by-products with concomitant lower isolated yield (31%) were observed.

Room temperature absorption and fluorescence emission spectra of half-dendrimers **11** and **12** were recorded in toluene. Compounds **11** and **12** show the Soret band ( $\lambda_{\text{max}} = 419$  nm) and the four Q bands at 515, 550, 590 and 650 nm common for porphyrins in the UV–visible region. The fluorescence emission spectra ( $\lambda_{\text{exc}} = 419$  nm) of **11** and **12** display two bands at 650 and 717 nm. The similarities of the absorption and the fluorescence spectra of 5,10,15-(triphenyl)-20-(4-carboxyphenyl)porphyrin and compounds **11** and **12** demonstrate that the photophysical properties of the porphyrin were preserved in the dendrimer. Singlet oxygen quantum yields  $\phi_{\Delta}$  for **11** and **12** were determined using tetraphenylporphyrin (TPP) as the reference solution ( $\phi_{\Delta}[\text{TPP}] = 0.70$ , in toluene) and were estimated from <sup>1</sup>O<sub>2</sub> luminescence at 1272 nm. For **11** and **12**,  $\phi_{\Delta}$  values are, respectively, equal to 0.21 and 0.23, pointing out aggregates the formation in toluene solution. Their dissociations could be achieved by the addition of cetyltrimethylammonium bromide in concentration as low as 0.2% (the concentrations of **11** and **12** were 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>) and a value of 0.68 for  $\phi_{\Delta}$  was then reached for both.

In conclusion, a novel series of unsymmetrical dendrons containing photosensitizing units at their periphery has been prepared in good yields using a divergent/divergent approach. The synthesis strategy was based on the polyamidation of ester-terminated half dendrimers **4** and **5** with amine-tethered porphyrins **6** or **7**. Subjecting the primary amine group at the focus of compounds **13** and **14** to a second PAMAM synthesis for constructing unsymmetrical dendrimers with terminal groups suitable for targeted PDT will be reported in due course.

#### Acknowledgements

The authors thankfully acknowledge Professor Jean-François Muller and Dr. Marc Dodeller for the MALDI-TOF mass spectrometry analysis. This work was supported by the research funds of the French 'Ligue Nationale Contre le Cancer, Comités Lorrains' and 'La Région Lorraine'.

#### References and notes

- (a) Liu, M.; Fréchet, J. M. J. *PSTT* **1999**, *2*, 393; (b) Patri, A. K.; Majoros, I. J.; Baker, J. R., Jr. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 466; (c) Esfand, R.; Tomalia, D. A. *Drug Discovery Today* **2001**, *6*, 427.
- (a) Quintana, A.; Raczka, E.; Piehler, L.; Lee, I.; Mye, A.; Majoros, I.; Patri, A. K.; Thomas, T.; Mulé, J.; Baker, J. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1310; (b) Gillies, E. R.; Fréchet, J. M. J. *Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14137; (c) Langer, R. *Nature* **1998**, *392*, 5; (d) Morgan, J. R.; Cloninger, M. J. *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2002**, *5*, 966.
- (a) Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korberlik, M.; Moan, J.; Peng, Q. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 889; (b) Schneider, R.; Schmitt, F.; Frochot, C.; Fort, Y.; Lourette, N.; Guillemin, F.; Muller, J.-F.; Barberi-Heyob, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2799; (c) Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Trinquet, E.; Pinel, S.; Viriot, M. L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. *J. Control. Rel.* **2006**, *111*, 153; (d) Schneider, R.; Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Gravier, J.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. *Anti-cancer Agents Med. Chem.* **2006**, *6*, 469.
- Jori, G. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1996**, *36*, 87.
- Martin, I. K.; Twyman, L. J. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1119.
- Kataoka, K.; Kwon, G. S.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y. *J. Control. Rel.* **1993**, *24*, 119.
- Hobson, L. J.; Feast, W. J. *Polymer* **1999**, *40*, 1279.
- Ni, Y.; Puthenkovilakom, R. R.; Huo, Q. *Langmuir* **2004**, *20*, 2765.
- (a) Wang, S.; Gaylord, B. S.; Bazan, G. C. *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 2127; (b) Coumbarides, G. C.; Dingjan, M.; Eames, J.; Flinn, A.; Northen, J.; Yohannes, Y. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2897.
- Kline, G. W.; Hanna, S. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3087.
- Zhang, Z.; Chaltin, P.; Van Aerschot, A.; Lacey, J.; Rozenski, J.; Busson, R.; Herdewijn, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3401.
- Storrier, G. D.; Takada, K.; Abruna, H. D. *Langmuir* **1999**, *15*, 872.
- Typical experimental procedure for the synthesis of 7.* Under a nitrogen atmosphere and in the darkness, the pentafluorophenol ester of 5,10,15-(triphenyl)-20-(4-carboxyphenyl)porphyrin (82 mg, 0.1 mmol) in 10 mL anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added dropwise over a period of 30 min to a solution of 2,2'-(ethylenedioxy)-bis-ethylamine (148 mg, 1 mmol) in 10 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> cooled to 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The organic layer was then washed with water (2 × 10 mL), dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and concentrated in vacuo. Column chromatography (Acetone/MeOH gradient, 1:0–7:3) afforded **7** as a purple film in a 95% yield.  $R_f = 0.58$  (Acetone/MeOH, 4:1); IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>): 3237, 3124 and 1691; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 8.89$ –8.77 (m, 8H), 8.27 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 8.24–8.17 (m, 8H), 7.79–7.70 (m, 9H), 7.47 (br t, NH), 3.88–3.53 (m, 10H), 2.92 (br td, 2H), 2.34 (br s, NH<sub>2</sub>), –2.78 (s, 2H, NH); UV/vis(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\lambda_{\text{max}} = 415, 514, 552, 590$  and 649 nm.
- Typical experimental procedure for the synthesis of 11.* Under a nitrogen atmosphere and in the darkness, to a solution of ester terminated half dendrimer **4** (10 mg, 0.024 mmol) in 1.5 mL DMF was added aminoporphyrin **7** (50 mg, 0.063 mmol) in 1.5 mL DMF and the reaction mixture was heated to 100 °C. After stirring for 15 h, the reaction mixture was concentrated to dryness. Column chromatography (Acetone/hexanes gradient: 1:10–7:3) afforded **11** as a purple film in 42% yield.  $R_f = 0.68$  (Acetone/hexanes, 7:3); IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>): 3117 and 1682; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 8.89$ –8.82 (m, 12H), 8.79 (d,  $J = 4.8$  Hz, 4H), 8.29 (d,  $J = 8.0$  Hz, 4H), 8.24–8.20 (m, 12H), 8.17 (d,  $J = 8.0$  Hz, 4H), 7.81–7.69 (m, 18H), 7.52 (br t, 1H, NH), 6.95 (br t, 1H, NH), 3.91–3.25 (m, 30H), 2.83 (t,  $J = 6.4$  Hz, 4H), 2.67 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 2.46 (t,  $J = 6.8$  Hz, 4H), 2.29 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 2.16 (t,  $J = 6.8$  Hz, 4H), 1.44 (s, 9H), –2.78 (s, 4H, NH); UV/vis(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\lambda_{\text{max}} = 417, 513, 549, 588$  and 649 nm. MALDI-TOF: found,  $m/z = 1134.491$ .



*Nanoscience,  
nanotechnologies  
& nano-objets :  
Synthèse bibliographique.*



# **Chapitre III : Nanoscience, nanotechnologies et nano-objets : Synthèse bibliographiques.**

## **I. Nanoscience et nanotechnologie**

### **I.1 Définition et principe**

Les nanosciences et les nanotechnologies forment un champ de recherche multidisciplinaire très prometteur, où converge physique, chimie et biologie. Elles sont communément définies comme l'ensemble des études et des procédés de fabrication et d'utilisation de structures, de dispositifs ou de systèmes à l'échelle nanométriques (généralement comprise entre 0,1 et une centaine de nanomètres). Dans ce contexte, les nanosciences sont l'étude des phénomènes et de la manipulation de la matière aux échelles atomique, moléculaire et macromoléculaire, où les propriétés diffèrent sensiblement de celles qui prévalent à une plus grande échelle. Les nanotechnologies, quant à elles, concernent la conception, la caractérisation, la production et l'application de structures, dispositifs et systèmes par le contrôle de la forme et de la taille à une échelle nanométrique.<sup>200</sup> Malgré la relative précision de ces définitions, les nanotechnologies présentent plusieurs acceptions liées à la nature transversale des domaines scientifiques concernés. En effet, elles regroupent, tout en permettant de nouvelles possibilités, des disciplines telles que l'optique, la biologie, la mécanique, la chimie, ou encore la microtechnologie.

Les nanobiotechnologies sont apparues suite à l'application de la nanoscience et des nanotechnologies en biologie et biotechnologie. Elles sont actuellement très en vue par l'accès qu'elles donnent à de nouveaux outils d'analyse et d'action ouvrant la voie à la résolution de nombreux problèmes biologiques et médicaux. Les nanoparticules (NPs), produits des nanotechnologies, se présentent comme un des champs de recherche les plus en vue ces dix dernières années de la part de la communauté scientifique. En effet, elles offrent de nouvelles perspectives, car leurs propriétés physiques et chimiques ne vont dépendre non plus de leur masse, mais de leur taille et de leur surface.<sup>201</sup>

## I.2 Historique

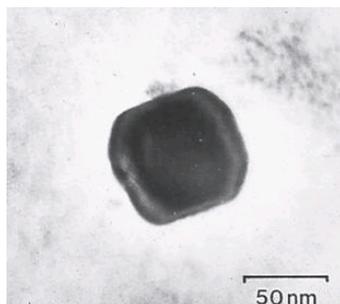
Le plus ancien exemple connu d'utilisation de NPs par l'homme est sans doute la coupe de Lycurgue datée du IV<sup>ème</sup> siècle de notre ère. Ce type d'ouvrage, appelé *diatrete*, consiste en un vase ou une coupe à boire de cristal taillé ou de pierres précieuses, travaillées au tour de telle sorte que les dessins qu'elles portent non sont seulement en relief, mais également complètement détachés du corps, et forment une broderie à jour, comme un réseau. Outre la remarquable facture de cette coupe de Lycurgue, un des aspects les plus surprenants en est la couleur. En effet, elle possède un caractère dichroïque : en l'éclairant directement, elle présente une coloration opaque aux tonalités jaune/verte tel du jade, mais lorsque la lumière passe au travers (lumière transmise), elle se dote d'une coloration rubis (Figure 27).



**Figure 27. Vase de Lycurgue en lumière directe (gauche) et transmise (droite).<sup>202</sup>**

Ce n'est qu'en 1959, après que la coupe ait été confiée au British Museum, que les premières études ont montré par diffraction de rayons X que cette coupe était faite de verre et non de jade ou d'opale comme cela avait été longtemps avancé.<sup>203</sup> L'analyse chimique a permis de mettre en évidence la présence de traces d'argent (environ 300 ppm) et d'or (environ 40 ppm).<sup>204-205</sup> Cependant, l'ajout de la même quantité de ces deux métaux à un verre ne produit pas ce type de coloration unique. C'est à ce moment que l'on considéra que le facteur prépondérant dans la couleur de la coupe fut la présence de métaux sous forme colloïdale au sein du verre. Ce n'est que bien plus tard, lorsque la technologie le permit (microscopie électronique à transmission), que cette hypothèse fut confirmée par une identification au sein de la structure vitreuse de nanocristaux d'un alliage or-argent d'un diamètre compris entre 50 et 100 nm (Figure 28).<sup>206</sup> Cette coupe de Lycurgue se pose donc non seulement comme un témoin de techniques remarquables de manufacture verrière, mais

surtout comme la première utilisation historique (IV<sup>ème</sup> siècle de notre ère), et sans doute involontaire, des propriétés particulières des nanoparticules par l'homme.



**Figure 28. Image microscopie électronique à transmission (MET) d'une particule d'alliage or-argent de la coupe de Lycurgue.<sup>206</sup>**

Depuis, les propriétés particulières des NPs, bien qu'encore incomprises, ont largement été utilisées depuis le XVII<sup>ème</sup> siècle. Que ce soit pour donner une couleur allant du rose éclatant au rubis à des vitraux en Europe ou à des vases en Chine afin de les colorer, le « Pourpre de Cassius », dont on a également longtemps présumé qu'il possédait également des vertus médicales (appelé dans ce cas « l'Elixir de Vie »), consiste en une solution colloïdale de particules d'or de diamètres variables, de l'ordre du nanomètre.

Le célèbre physicien Michael Faraday, reconnu principalement pour ses travaux sur l'électromagnétisme, réalisa en 1857 les premiers travaux sur des NPs d'or sous forme de solutions colloïdales et initia ainsi le champ de recherche des nanosciences et des nanotechnologies. L'« Or de Faraday », comme la communauté scientifique la nommait alors, est en fait un colloïde, c'est-à-dire un matériau qui est un mélange d'au moins deux phases solides, liquides ou gazeuses. Les colloïdes sur lesquels Faraday porta son intérêt étaient des dispersions de particules très fines d'or en suspension dans un liquide. Ce type de préparation connu sous le nom de suspension colloïdale, Faraday le nommait lui-même un « sol » d'or,<sup>207</sup> le terme colloïde n'étant introduit que 4 ans plus tard, en 1861 par Thomas Graham, considéré comme le père de la chimie des colloïdes.<sup>208</sup>

Les travaux que Faraday exposa en 1857 consistaient en une vaste collection d'expériences sur des hydrosols métalliques, des films ultrafins de métaux ainsi que des aérosols. Ces investigations portaient principalement sur l'or, mais également sur l'argent, le cuivre, le platine, l'étain, le fer, le plomb, le zinc, le palladium, l'aluminium, le rhodium, l'irridium, le mercure et l'arsenic. Les sols d'or préparés avaient l'aspect de solutions limpides couleur rubis, et il conclut que l'or était dispersé dans le liquide sous une forme

extrêmement divisée si bien qu'il nota que « *le degré de division de ces particules doit être extrême ; elles n'ont pas encore pu être observées à aucune puissance du microscope* ». Ce qui l'étonna cependant le plus fut que par ajout de sels, la solution tournait du rouge rubis au bleu. Il supposa que « *ce phénomène semble indiquer qu'une simple variation de la taille de ces particules [d'or] donne naissance à une variété de couleurs* ». <sup>207</sup>

Il faudra cependant attendre le XX<sup>ème</sup> siècle et l'émergence de technologies permettant l'observation de l'infiniment petit. La première évocation du concept de nanotechnologies et d'un « nanomonde » n'a cependant été évoqué qu'à partir de 1959 par le physicien Richard Feynman, <sup>209</sup> où il envisageât qu'il serait prochainement possible de manipuler les matériaux à l'échelle moléculaire, en opérant atome par atome, définissant ainsi une ingénierie nanométrique. Le terme de nanotechnologie n'a lui été défini et employé qu'en 1974 par le professeur Taniguchi de l'Université de Tokyo. <sup>210</sup> Les nanotechnologies et les nanosciences ont débuté à proprement parler au début des années 1980 avec l'avènement des sciences étudiant les architectures de types clusters et l'invention du microscope à effet tunnel (STM pour Scanning Tunneling Microscope) par Gerd Binnig et Heinrich Rohrer (Nobel de Physique en 1986). Ces développements ont permis la découverte des premiers nanoparticules de carbone de type fullerènes, les buckminsterfullerènes C<sub>60</sub>, <sup>211</sup> par Robert Curl, Harold Kroto et Richard Smalley en 1985 et qui leur valut le prix Nobel de Chimie en 1996, et des nanotubes de carbone quelques années plus tard. <sup>212</sup>

La découverte des différences de comportement physico-chimique des matériaux en fonction de leur dimension <sup>213</sup> aboutit également à la découverte et la synthèse de nanocristaux (NCs) de semi-conducteurs (SCs). Tout un pan du domaine de recherche en nanotechnologie est en effet consacré à l'étude de ces nanocristaux de semi-conducteurs, que ce soit sous forme de puits de potentiels, de nanoparticules sphériques ou de nanofilaments.

## **II. Les nano-objets**

La théorie atomiste est née en Grèce antique, sur les bords de la mer Egée, il y a 2 500 ans. Le philosophe grec Leucippe et son disciple Démocrite ont, les premiers, suggéré que toute matière est composée de « grains » indivisibles contre l'idée d'une matière indéfiniment sécable. C'est ainsi que Démocrite utilisa le terme grec *atomos*, signifiant « que l'on ne peut couper », pour désigner ces grains ultimes constituant toute matière. Cependant, à la même époque, Aristote proposa que toute matière fût composée de quatre éléments fondamentaux :

l'eau, l'air, la terre et le feu. Cette conception perdura jusqu'au début du XIX<sup>ème</sup> siècle, quand le chimiste anglais Joseph Dalton reprit en 1808 l'idée grecque que la matière est constituée de petites particules indivisibles. Selon lui, à chaque élément chimique correspond un seul et unique type d'atome avec un poids défini. En 1809, le chimiste français Louis Joseph Gay Lussac renforça cette hypothèse. A partir de ce moment, beaucoup de théorie virent le jour afin de déterminer la structure exacte d'un atome, du premier modèle de Bohr jusqu'à l'approche bien plus récente de la mécanique quantique.

Malgré les interrogations de Faraday sur les variations de couleur de ses sols d'or en fonction de la taille des nanoparticules en suspension, on pensa longtemps qu'un matériau à structure définie possédait des propriétés physiques constantes. Les propriétés étaient en effet toujours rapportées à la structure (composition chimique et allotropie) du matériau quelles que soient ses dimensions.

## **II.1 Rappels sur la structure de la matière et les propriétés des matériaux : l'atome et l'électron**

L'atome est constitué en son centre d'un noyau, composé de nucléons (les neutrons (non chargés) et les protons (chargés positivement,  $+q=1.6.10^{-19}$  Coulomb)) à la périphérie duquel gravitent des électrons  $e^-$  de charge électrique  $q$  négative ( $-q$ ). Un atome est électriquement neutre, car il possède exactement le même nombre de protons que d'électrons. Le nombre d'électrons (ou de protons) dans un atome détermine ses propriétés physiques et chimiques, et va donc déterminer toutes les différentes interactions atome-atome ainsi que la façon dont ces atomes vont pouvoir se lier entre eux.

Tous les électrons d'un atome donné sont répartis dans les couches  $n$  selon le principe de Pauli, indiquant qu'une couche  $n$  ne peut accueillir plus de  $2n^2$  électrons (K : 2 électrons, L : 8 électrons, M : 18...etc.). Ces électrons sont répartis ensuite en sous-couches, nommées  $s$ ,  $p$ ,  $d$ , et  $f$ , qui sont en fait les différentes orbitales qu'un électron peut occuper. Les électrons d'un atome gravitant autour d'un noyau sont assujettis à occuper des niveaux d'énergie discrets  $E_1$ ,  $E_2, \dots E_n$ , correspondant chacun à une orbitale électronique. En définissant les niveaux énergétiques de ces couches par rapport à celui d'un électron qui serait soustrait à toute influence du noyau (électron placé à une distance infinie de celui-ci avec un niveau énergétique  $E=0$  eV,  $1 \text{ eV}=1.6.10^{-19}$  J), tous les niveaux d'énergie  $E_n$  sont négatifs, ce qui traduit le travail à fournir pour éloigner un électron du noyau (Figure 29). De manière

générale, les électrons des couches  $n_{\max}-1$  seront appelés électrons de cœur, car étant proche du noyau, ils vont être fortement liés à ce dernier et avoir un niveau énergétique  $E$  très bas. Les électrons de la couche  $n$ , si celle-ci n'est pas complètement remplie, seront appelés électrons de valence, car ils vont pouvoir participer à la création de liaisons chimiques entre deux atomes.

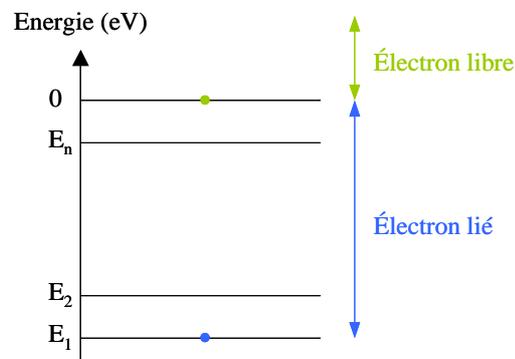


Figure 29. Diagramme énergétique des couches électroniques d'un atome.

## II.2 Les cristaux :

Un cristal est constitué d'un empilement ordonné d'un grand nombre d'atomes, de molécules ou d'ions qui sont répartis dans l'espace de façon régulière et périodique. La cohésion des atomes est assurée par la mise en commun des électrons de valence pour former des liaisons de covalence. Les états énergétiques possibles des électrons du cristal sont représentés par un diagramme énergétique analogue à celui de l'atome. Du fait de l'interaction des atomes, les niveaux discrets d'énergie se transforment en bandes d'énergie permises, séparées par des bandes interdites (Figure 30).

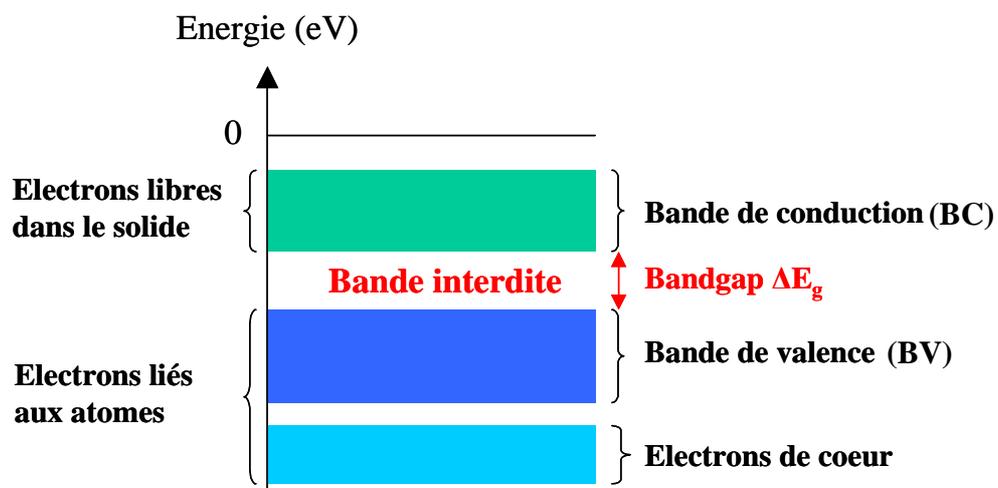
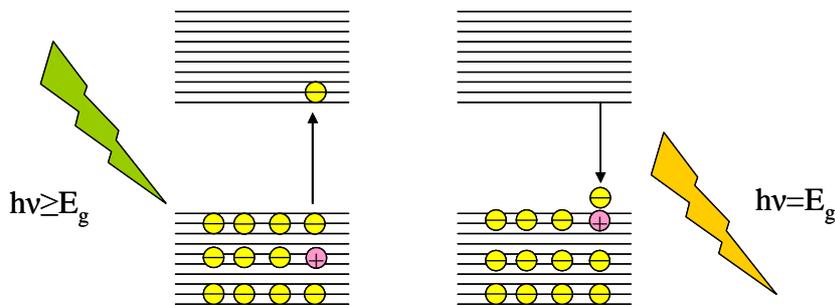


Figure 30. Diagramme énergétique des bandes d'un cristal.

La bande la plus basse en énergie contient les électrons de cœur qui vont être liés à un atome donné du solide. La bande de valence (BV), légèrement plus haute en énergie que la première, contient les électrons de valence qui vont permettre les liaisons entre les atomes. Ces électrons sont communs à plusieurs atomes. Au-dessus de la bande interdite se trouve la bande de conduction (BC), haute en énergie. Un électron situé dans cette bande circule librement dans le solide. Il joue alors le rôle de porteur de charges qui participe à l'écoulement du courant dans le solide lorsque ce dernier est soumis à une différence de potentiel. Chaque type de matériau présente une hauteur de bande interdite qui lui est propre. Cette différence d'énergie, appelé *bandgap*, joue un rôle fondamental dans les propriétés physiques du cristal, et permet de distinguer les matériaux isolants, semi-conducteurs et conducteurs.

### II.3 Le cas des semi-conducteurs

Pour obtenir le phénomène de conduction, il faut que le matériau possède un porteur de charges mobiles, qui peut soit être un électron dans la bande de conduction qui sera délocalisé sur l'ensemble du matériau, soit une paire électron/trou générée par la promotion d'un électron de la bande de valence à la bande de conduction (ce départ générera la formation d'un trou de charge positive dans la bande de valence, figure 31).



**Figure 31. Schéma d'excitation d'un semi-conducteur par irradiation lumineuse**

Un corps est qualifié d'isolant quand il ne contient pas d'électrons mobiles (pas de porteurs de charges mobiles). A l'opposé, un conducteur possède toujours des électrons mobiles. Un semi-conducteur, quant à lui, aura des caractéristiques intermédiaires. Ces différentes propriétés sont directement liées aux valeurs du *bandgap*. La répartition des électrons dans les niveaux d'énergie obéit aux lois de la thermodynamique statistique : au zéro absolu, seuls sont peuplés les niveaux de plus basse énergie.

Dans les isolants, les bandes d'énergie les plus faibles sont entièrement pleines. La hauteur de la bande interdite est grande, et il est donc impossible d'apporter assez d'énergie pour qu'un électron de la bande de valence passe à la bande de conduction et ainsi créer de la conduction. Par exemple, le diamant, qui est un isolant, possède un  $\Delta E_g$  de 5eV (résistivité  $r = 1,1012 \Omega.m$ ).

Dans les conducteurs, soit la bande de valence est partiellement remplie, soit il y a un chevauchement entre la bande de valence et la bande de conduction : il existe donc beaucoup de niveaux disponibles pour la création de porteurs de charges et la conduction est grande.

Le cas des semi-conducteurs est intermédiaire entre l'isolant et le conducteur. La BV est complètement remplie. En revanche, la hauteur de la bande interdite est faible ( $\sim 1 \text{ eV}$ ), donc franchissable. Un apport d'énergie, par exemple par absorption d'un photon d'énergie appropriée ( $h\nu \geq E_g$ ), permet de faire passer un électron de la bande de valence jusque dans la bande de conduction, créant un trou de charge positive ( $h^+$  pour *hole*) dans la bande de valence. Chez les semi-conducteurs, c'est cette paire électron/trou ( $e^-/h^+$ ), appelé exciton, qui va jouer le rôle de porteur de charges dans le matériau et ainsi permettre la conductivité électronique (Figure 32).

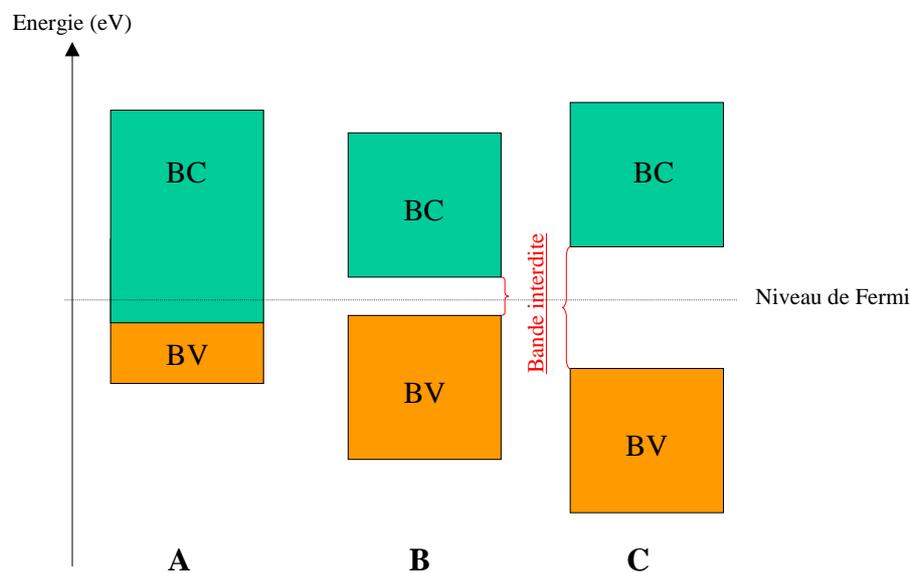


Figure 32. Diagramme en bande: A : conducteur, B : semi-conducteur, C : isolant.

#### II.4 Les nanocristaux (NCx) et les Quantum Dots (QDs)

Les NCx sont, comme leur nom l'indique, des particules cristallines d'un diamètre généralement compris entre deux et quelques dizaines de nanomètres. Elles sont composées

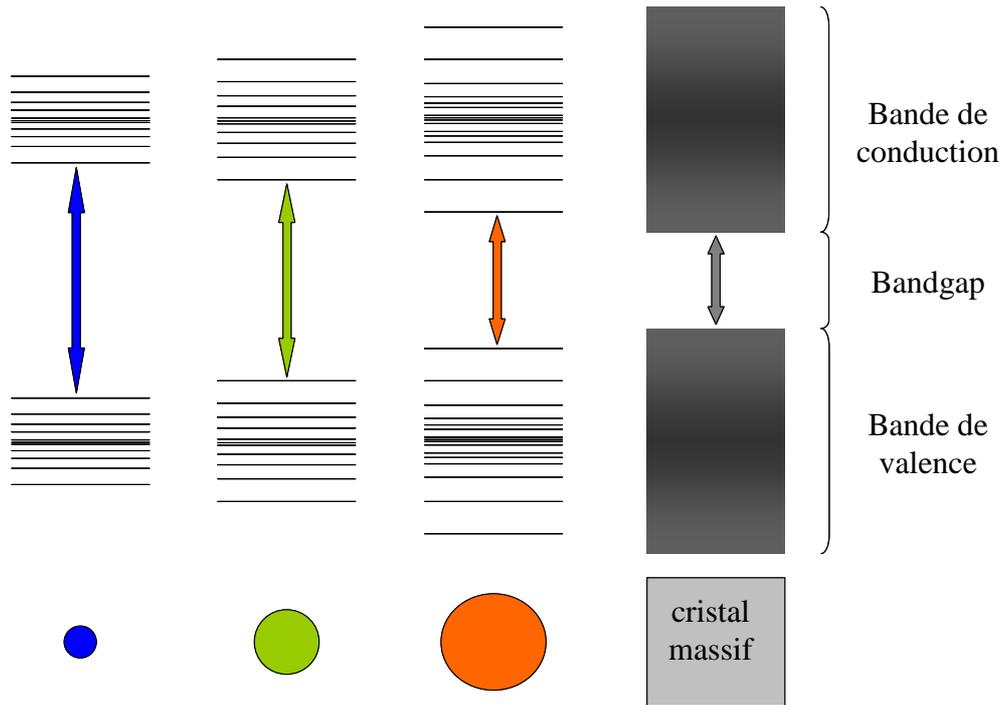
d'un cœur cristallin recouvert d'une couche de molécules organiques, les ligands, qui sont généralement des surfactants contenant une tête polaire liée à la surface des NCx et une queue apolaire, par exemple une ou plusieurs chaînes alkyles. Cette couche de ligand est nécessaire pour stabiliser les NCx individuels sous forme de particules colloïdales et éviter leur coalescence. Les NCx à base de semi-conducteurs sont appelés Quantum Dots (QDs), ou encore boîtes quantiques. Ce type de particules possède un cœur qui contient une quantité dénombrable d'atomes, typiquement quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers. De plus, la fraction d'atomes constitutifs du QD se trouvant à sa surface augmente quand la taille du NC diminue.<sup>214</sup>

## **II.5 Les nano-objets et leurs propriétés**

L'intérêt principal des nanomatériaux réside dans le fait que de nouvelles propriétés vont apparaître, et que ces propriétés vont varier en fonction de la taille et de la forme de ces nano-objets. Pour les nano-objets à base de semi-conducteur, ces variations trouvent leur explication dans un effet de taille nommé le confinement quantique. Dans un cristal massif, les propriétés du matériau sont indépendantes de la taille et ne vont être fonction que de sa composition chimique. Dans le cas d'un semi-conducteur massif, on peut exciter un électron de la bande de valence et le faire passer dans la bande de conduction par un apport d'énergie au moins égal au *bandgap* du matériau.

La caractéristique principale des QDs est que leurs propriétés physiques dépendent de leur taille. La propriété qui suscite le plus grand intérêt de la part de la communauté scientifique est la possibilité de changer la valeur de l'énergie  $E_g$  du *bandgap* séparant la bande de valence de la bande de conduction, par changement de la taille de la particule.

Tout d'abord, les QDs ont la particularité d'avoir un profil énergétique intermédiaire entre l'atome et le cristal (décrit précédemment). Les bandes d'énergie vont se discrétiser au fur et à mesure de la diminution de la taille du QD (Figure 33).



**Figure 33. Evolution du bandgap en fonction de la taille du QD.**

Consécutivement à un apport suffisant en énergie ( $\geq E_g$ ), un exciton se forme et va permettre par exemple la conduction électrique. Cependant, l'électron et le trou ne peuvent pas se déplacer indépendamment en raison de l'interaction coulombienne. La distance physique séparant l'électron du trou, appelé rayon de Bohr, va avoir une valeur discrète fonction de la nature du matériau, et qui va déterminer l'énergie du *bandgap* à franchir pour obtenir cet exciton. Cela induit que, pour un semi-conducteur massif, la recombinaison  $e^-/h^+$  radiative va résulter en l'émission d'un photon d'énergie fixe, donc de longueur d'onde fixe. La diminution de la taille de la particule à quelques nanomètres conduit à la situation atypique où le rayon de Bohr de l'exciton est plus grand que les dimensions du cristal. Ainsi l'exciton formé, pour pouvoir être inclus dans la NP, subit des contraintes dimensionnelles imposées par les dimensions du matériau. Les porteurs de charge  $e^-/h^+$  doivent alors accepter une énergie cinétique plus élevée, ce qui conduit à une augmentation du *bandgap* et à un confinement des niveaux énergétiques en valeurs discrètes. On parle de confinement quantique (en anglais *quantum size effect*)<sup>215</sup> lorsque les déplacements des électrons ou des trous d'un semi-conducteur sont limités dans une ou plusieurs dimensions. Par conséquent, plus un QD est petit et plus le rayon de Bohr subira de contraintes spatiales, plus l'exciton aura d'énergie, donc plus le *bandgap* sera élevé.

Dans l'hypothèse de QDs sphériques, la valeur de l'énergie  $E_g$  du *bandgap* (en eV) d'un QD de rayon  $r$  est donné par l'équation 13<sup>216-217</sup> :

$$E_g = E_g^{massif} + \frac{\hbar^2 \pi^2}{2r^2} \left( \frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) - \frac{1.786e^2}{\epsilon_r \epsilon_0 r} \quad (13)$$

Où  $E_g^{massif}$  correspond au *bandgap* du cristal massif vers lequel  $E_g$  tend quand  $r$  croît indéfiniment, le terme  $1/r^2$  ( $r$  en nm) est le terme de « confinement quantique » calculé dans l'hypothèse d'un puits de potentiel sphérique dans lequel sont confinés un électron et un trou de masses effectives  $m_e^*$  et  $m_h^*$  (sans dimension),  $m_e$  étant la masse de l'électron ( $m_e = 9,1.10^{-31}$  kg),  $\hbar$  la constante de Planck réduite ( $\hbar = 1,0546.10^{-34}$  J.s) et  $\epsilon_r$  (sans dimension) étant la permittivité diélectrique statique du matériau relative à celle du vide  $\epsilon_0$  ( $\epsilon_0 = 8,854.10^{-12}$  F/m). L'équation (13) montre qu'une diminution de la taille augmente la composante confinement quantique, et par conséquent la valeur de l'énergie  $E_g$  du *bandgap*. Le rayon de Bohr de l'exciton  $r_B$  correspond à la distance moyenne entre l'électron et le trou. Il peut être calculé dans le cadre du modèle « planétaire » de Bohr de l'atome d'hydrogène avec les paramètres du matériau semi-conducteur constitutif du NC selon l'équation 14<sup>.218-219</sup>

$$r_B = 0,053. \epsilon_r m_e \left( \frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) \quad (14)$$

En introduisant  $r_B$  dans l'équation (1), il est possible d'exprimer la valeur du *bandgap* de manière plus précise en fonction du rayon de Bohr  $r_B$  du matériau et du diamètre  $r$  de la NP (équation 15) :

$$E_g (eV) = E_g^{massif} (eV) + \frac{2,6}{\epsilon_r r (nm)} \left( 2,74 \frac{r_B (nm)}{r (nm)} - 1 \right) \quad (15)$$

## II.6 Les différents types de nano-objets.

Selon que l'on a confinement dans une, deux ou trois dimensions on obtient un puits quantique, un fil quantique ou une boîte quantique (Figure 34).

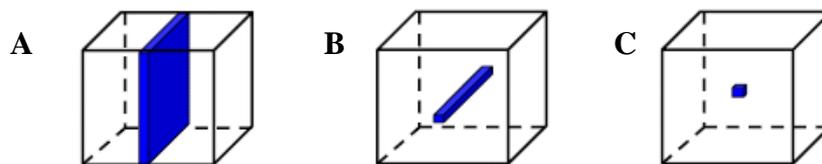


Figure 34. Puits de potentiel (A), nanofil (B), QD (C).

### II.6.1 Les puits quantiques

Les puits quantiques sont à la base de nombreux dispositifs semi-conducteurs, tels des diodes électroluminescentes, des diodes laser, des transistors à électrons de grande mobilité... Ils consistent en une structure type « sandwich », où une couche de semi-conducteur de quelques nanomètres d'épaisseur, *e.g.* l'arséniure de gallium (GaAs), est comprise entre deux couches plus épaisses d'un matériau ayant une  $E_g$  plus importante, *e.g.* l'arséniure d'aluminium (AlAs).

Dans le GaAs, les électrons ont une énergie potentielle plus basse que dans le AlAs. Ainsi, un électron dans la couche de GaAs sera confiné et ne pourra pas en sortir si son énergie est suffisamment petite. On parle donc d'un puits quantique.

### II.6.2 Les nanofils

Les nanofils sont des cylindres de quelques dizaines de nanomètres de diamètres et de quelques centaines de nanomètres de longueur. De part leurs structures, le confinement des excitons est à deux dimensions.

### II.6.3 Les QDs

Les QDs sont des nanocristaux sphéroïdes de semi-conducteurs. Leurs diamètres sont de l'ordre de quelques nanomètres (typiquement entre 1 et 20 nm), ce qui implique que dans de telles structures, les excitons seront confinés dans les trois dimensions.

Ce type de particule se présente comme un outil très prometteur dans de nombreux domaines, que ce soit l'électronique, l'optique ou le médical. Leur nature, leurs propriétés ainsi que les synthèses et les applications de QDs sont développées au paragraphe suivant.

Les quantum dots :

Les propriétés particulières de ce que l'on nomme à l'époque « petites particules cristallines », le terme "Quantum Dot" n'étant introduit qu'en 1986 par Mark Reed<sup>220</sup>, ont été étudiées par Louis E. Brus des laboratoires Bell en 1983. Il remarqua en effet des différences de comportement de particules nanométriques de CdS par rapport au matériau massif.<sup>217</sup>

Depuis leur découverte, beaucoup d'études ont porté sur l'utilisation de QDs dans des domaines aussi variés que la fabrication de transistors pour l'électronique, de cellules solaires, de LEDs et autres diodes lasers, mais surtout dans le domaine médical, comme l'imagerie, et sur ce qui nous a intéressé dans ce travail de thèse : la thérapie photodynamique appliquée à la cancérologie.

## **II.7 Propriétés optiques des quantum dots**

Comme nous l'avons expliqué précédemment, les QDs sont des semi-conducteurs dont les propriétés physico-chimiques vont être directement dépendantes de leur forme et de leur taille du NC. Le phénomène de confinement quantique de l'exciton dans les trois dimensions va conférer aux propriétés, principalement photophysiques, une modularité qui sera fonction de la taille du QD. Le principal avantage de l'utilisation de QDs va résider dans le contrôle des propriétés photophysiques par le choix de la taille des QDs.

### **II.7.1 Absorption**

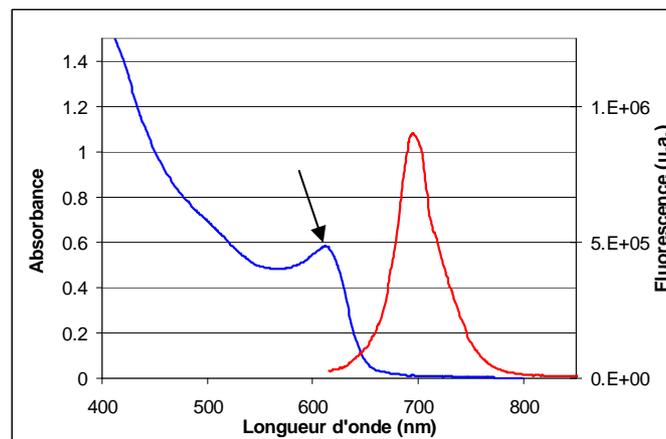
La longueur d'onde d'un photon peut être exprimée en fonction de son énergie selon la relation 16 :

$$\lambda = \frac{hc}{E_{\text{photon}}} \quad (16)$$

Où  $h$  est la constante de Planck ( $h = 6,626068 \cdot 10^{-34}$  J.s),  $c$  la vitesse de la lumière dans le vide ( $c = 299\,792\,458$  m/s) et  $E_{\text{photon}}$  l'énergie du photon. Cette relation nous montre que plus un photon sera énergétique, plus sa longueur d'onde sera courte. Comme nous l'avons expliqué précédemment, un photon absorbé par le QD doit avoir son énergie au moins égale à l'énergie  $E_g$  du *bandgap*. Un photon absorbé aura donc une longueur d'onde (équation 17) :

$$\lambda_{\text{abs}} = \frac{hc}{E_g} \quad (17)$$

Ceci implique qu'une diminution de la taille du QD entraîne un déplacement hypsochrome du seuil d'absorption dû à l'augmentation de  $E_g$  à cause du phénomène de confinement quantique.<sup>221-222</sup> Un maximum d'absorption bien défini apparaît au niveau du seuil énergétique qui correspond au premier pic excitonique, c'est-à-dire la transition optique du premier état excitonique (Figure 35). La position de ce pic dépend de  $E_g$  et donc de la taille des QDs, mais un continuum d'absorption pour les longueurs d'ondes inférieures à celle de ce premier pic excitonique est observable quelque soit la taille ou la nature du QD. Des bandes d'absorption peuvent parfois apparaître dans cette région du spectre.<sup>223</sup>



**Figure 35 : Spectre d'absorption (ligne bleue) et de fluorescence (ligne rouge) typique de quantum dots. Le premier pic excitonique est indiqué par une flèche.**

### II.7.2 Photoluminescence

Suite à la formation d'un exciton consécutive à l'absorption d'un électron d'énergie suffisante, le QD tend à retourner à son état énergétique fondamental, notamment par émission de fluorescence d'un photon dont l'énergie va correspondre au bandgap du QD. Ce processus radiatif est en fait une recombinaison de la paire électron-trou.  $E_g$  étant fonction de la taille du QD, le spectre de fluorescence correspondant se présente sous la forme d'une raie fine et symétrique qui se décalera selon la taille des NCx. Cette émission de fluorescence, qui correspond à l'émission d'un photon d'énergie strictement égale à  $E_g$ , est cependant déplacée de quelques nanomètres vers les grandes longueurs d'onde par rapport au pic excitonique du spectre d'absorption. Ce décalage, appelé décalage de Stokes, trouve son origine dans la structure particulière des niveaux énergétiques limites des bandes de conduction et de valence des QDs qui sont dégénérées.<sup>224-225</sup>

### II.7.3 Rendement quantique de fluorescence et scintillement

L'émission de fluorescence peut être quantifiée par le rendement quantique de fluorescence ( $\Phi_{\text{fluo}}$ ) des QDs. Ce  $\Phi_{\text{fluo}}$  est le rapport entre le nombre de photons absorbés et le nombre de photons émis par le QD. La capacité du QD à avoir un bon  $\Phi_{\text{fluo}}$  va dépendre de sa structure. En effet, des défauts de surface peuvent induire des phénomènes de désexcitation *via* des canaux non radiatifs. Ainsi, un QD présentant des défauts de surface, une mauvaise stabilisation par ses ligands ou encore une dégradation au cours du temps présentera une chute de son  $\Phi_{\text{fluo}}$ .

En 1996, l'équipe de Brus observa pour la première fois que l'émission de photons par les QDs était intermittente.<sup>226</sup> En effet, les QDs passaient successivement d'un état "allumé" (*on*) à un état "éteint" (*off*). Ce phénomène appelé scintillement (ou *blinking*)<sup>227-228</sup> trouve également son origine dans les défauts de surface et est attribué au piégeage d'un électron ou d'un trou photoexcité dans un état de surface, le QD chargé passant ainsi dans un état *off*. Le NC revient à l'état *on* lorsqu'il retourne à l'état neutre par perte de la charge excédentaire par un processus d'ionisation d'Auger (c'est-à-dire un transfert d'énergie de l'exciton créé au porteur de charge délocalisé).<sup>229</sup> Ce phénomène peut être gênant dans des applications telles que des interrupteurs électroniques à QD unique, ou lors de la corrélation microscopie électronique/optique, où la population "éteinte" de QDs serait indétectable par la voie optique.<sup>230-231</sup> Ainsi, de nombreux travaux ont porté sur l'étude de la suppression de ce scintillement, que ce soit un contrôle de l'impact du milieu environnant le QD<sup>232-234</sup> ou des espèces qui lui sont associées (matrices ou films),<sup>235-237</sup> ainsi que de la structure même du QD, par l'ajout d'une ou plusieurs coquilles inorganiques,<sup>238-242</sup> le choix du ligand stabilisateur<sup>238, 243</sup> ou encore par dopage du QD.<sup>244</sup>

Toutefois, cet effet est moyenné pour des populations de QDs, et se traduit seulement par une diminution du rendement quantique de fluorescence observé. Ce scintillement devient donc indécélable et ne biaise pas les résultats.

## II.8 Synthèses et croissance d'un QD

Comme pour tous les types de cristaux, la synthèse de QDs va devoir obéir à des principes de nucléation et de croissance que nous allons décrire ici. Ensuite, nous aborderons les différentes voies de synthèse possibles pour ce type de nanomatériaux.

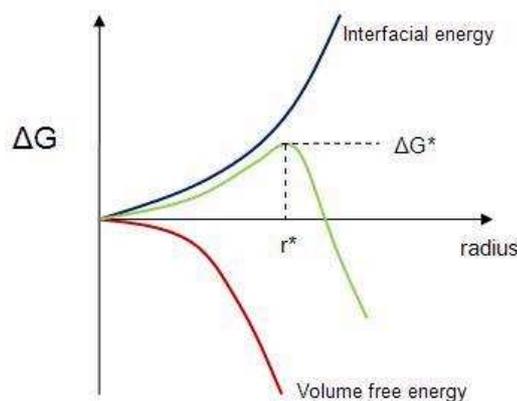
### II.8.1 Nucléation, croissance cristalline et maturation d'Oswald

La croissance chimique de cristaux, qu'ils soient massifs ou de dimensions nanométriques, implique inévitablement un processus de précipitation d'une phase solide au sein d'une solution. Dans un solvant, chaque soluté a une solubilité de saturation définie, au-delà de laquelle une addition d'un excès de ce soluté aboutit à une précipitation de ce dernier et à la formation de nanocristaux. Ce processus de précipitation consiste typiquement en une étape de nucléation suivie par différentes étapes de croissance des particules.

#### II.8.1.1 Nucléation

Pour obtenir des nanoparticules, il faut que la solution soit sursaturée, soit par une dissolution à température élevée des réactifs suivie d'un refroidissement, soit par addition suffisante de réactifs durant le procédé pour obtenir la sursaturation.

Il existe 3 types de nucléation : homogène, hétérogène et secondaire. La nucléation homogène intervient quand il n'y a pas d'interface solide/liquide. Elle va résulter de la combinaison de précurseurs solubles. La force motrice de cette nucléation est thermodynamique : une solution sursaturée est métastable. En effet, la variation d'enthalpie libre  $\Delta G$  est la somme des énergies libres de formation d'un volume et de création d'une surface (Figure 36)



**Figure 36. Variation de l'enthalpie libre  $\Delta G$  en fonction du rayon du quantum dot.**

Pour des particules sphériques, l'enthalpie libre  $\Delta G$  s'exprime selon l'équation 18:

$$\Delta G = \underbrace{-\frac{4}{3}\pi r^3 k_B T \ln(S)}_{\text{Composante volumique}} + \underbrace{4\pi r^2 \gamma}_{\text{Composante de surface}} \quad (18)$$

où  $V$  est le volume moléculaire des espèces précipitées,  $r$  le rayon du nucléus formé,  $k_b$  est la constante de Boltzmann,  $S$  le coefficient de saturation et  $\gamma$  l'enthalpie libre de surface par unité de surface.

Lorsque  $S > 1$ , c'est à dire dans le cas d'une solution sursaturée,  $\Delta G$  a un maximum positif à la taille critique  $r^*$  (Figure 36). Ce maximum d'énergie correspond à l'énergie d'activation de la nucléation. Un nucléus dont  $r > r^*$  verra son énergie libre  $\Delta G$  décroître au fur et à mesure de sa croissance pour aboutir à la création de particules stables ( $\Delta G > 0$ ). Ce rayon critique  $r^*$  peut être obtenu en posant  $d\Delta G/dr = 0$ , ce qui permet d'obtenir l'équation 19 :

$$r^* = \frac{2V\gamma}{3k_B T \ln(S)} \quad (19)$$

D'après la Figure 36, on constate que pour une valeur de  $S$  donnée, toutes particules avec  $r > r^*$  croîtront, alors que celles ayant  $r < r^*$  ne seront pas stables et se redissolvent. L'équation (19) nous montre quant à elle que ce rayon critique  $r^*$  est fonction du coefficient de saturation  $S$ ,  $r^*$  étant inversement proportionnel à  $\ln(S)$ .

### II.8.1.2 Croissance

La croissance proprement dite des particules va pouvoir se dérouler une fois les *nuclei* formés. Cette croissance consiste en différentes étapes qui vont être fonction des conditions du milieu. Dans un premier temps, la solution est encore sursaturée ( $S > 1$ ), et les nucléi formés vont croître par additions moléculaires des précurseurs. Une fois que la concentration des précurseurs passe sous le niveau critique de la concentration de sursaturation, la nucléation s'arrête et les particules continuent à croître par addition moléculaire jusqu'à ce que l'équilibre des concentrations des espèces précipitées soit atteint. Au cours de la croissance des cristaux, les réactifs sont consommés jusqu'à atteindre une concentration inférieure à celle des conditions de solution sursaturée et ne vont plus participer à cette croissance cristalline. Cependant, on observe que les particules les plus grosses vont continuer à croître au détriment des plus petites, qui à terme vont se redissoudre. Cette dernière phase de croissance cristalline

a lieu quand il n'y a plus assez de précurseurs en solution pour permettre une croissance homogène. Au cours de cette phase, les petites particules se dissolvent au profit des grosses, ce qui a souvent pour conséquence une augmentation de la dispersion en taille. Ce phénomène, connu sous le nom de maturation d'Ostwald,<sup>245-248</sup> est un processus spontané car thermodynamiquement favorable. En effet, bien que la formation de beaucoup de petites particules soit cinétiquement favorable (étape de nucléation), les grosses particules sont thermodynamiquement avantagées. Ceci est dû au fait que les petits cristaux ont un rapport surface/volume beaucoup plus important que les plus gros cristaux. Les molécules et/ou atomes de surface moins stables que ceux ordonnés et confinés à l'intérieur du cristal, vont déstabiliser de manière importante la structure, qui sera très haute en énergie. Par conséquent, les petits cristaux tendent à minimiser leur état énergétique en devenant plus gros afin de baisser leur rapport surface/volume. De plus, le coefficient de saturation  $S$  décroît au cours de la croissance cristalline à cause de la consommation de réactifs. On constate que d'après l'équation (7), plus  $S$  diminue, plus  $r^*$  augmente, et toutes particules ayant son rayon inférieur à ce nouveau rayon critique se dissolvent. Cette déstabilisation supplémentaire des petites particules accentue l'effet de la maturation d'Ostwald.

En plus de ces différents procédés de croissance par addition moléculaire où des espèces en solution vont se déposer à la surface du solide, les cristaux vont pouvoir croître par agrégation d'autres particules. Cette croissance est appelée croissance secondaire, et se produit par combinaison entre une particule stable et un *nucleus* instable.

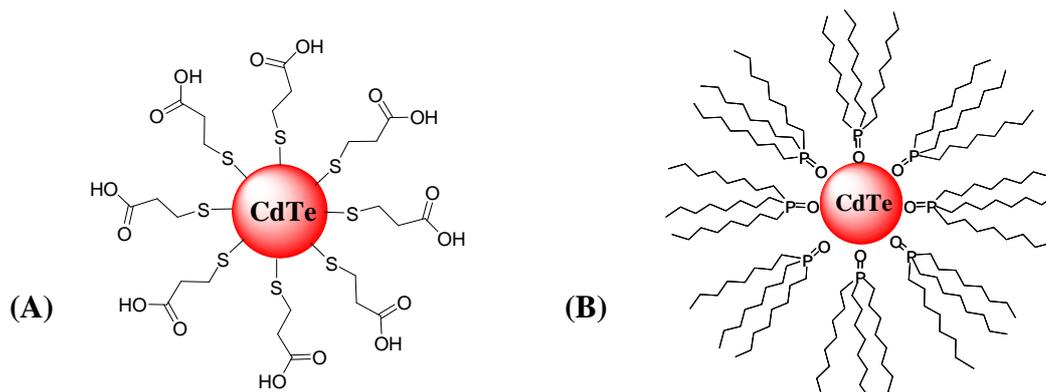
### II.8.1.3 Stabilisation

De par leurs dimensions, les nanoparticules seront stables cinétiquement et non thermodynamiquement. Afin de remédier à ce problème, les nanoparticules doivent être stabilisées soit par l'addition d'agents de protection de surface, typiquement des ligands organiques ou une couche de matériau inorganique stable, soit en les plaçant dans un environnement inerte tel qu'un polymère ou une matrice inorganique. L'utilisation d'agents de protection de surface est primordiale pour la synthèse de NPs. Une dispersion de NPs est stable si l'interaction entre les ligands de surface et le solvant est favorable. Cela contribue ainsi à la création d'une barrière énergétique qui empêche les attractions de van der Waals et/ou magnétiques entre les NPs, qui aboutiraient à leur agglomération.

L'interaction ligand/NP peut être de deux types :

- Forte : il y a création d'une interaction forte entre le ligand et la surface de la NP. Typiquement, le ligand a une extrémité soufrée (fonction thiol), car la grande affinité du soufre pour les métaux lourds tel que le cadmium va permettre la formation d'une liaison forte "acide mou"/"base molle" Cd-S d'après la HSABT (*Hard and Soft Acid and Bases Theory*, Figure 37A). Cela va fortement stabiliser la nanoparticule et engendrer une très faible labilité du ligand en solution.

- Faible : dans ce cas, l'interaction créée fait intervenir une base plus dure que le soufre, comme par exemple l'oxygène des ligands de type oxyde de phosphine (Figure 37B). Il en résulte alors une interaction ligand/NP moins forte, où le ligand est bien plus labile que dans le cas d'une interaction Cd-S, ce qui peut engendrer une déstabilisation de la NP. Cependant, cette propriété est intéressante car elle ouvre la voie à des traitements post-synthétiques d'échange de ligands, dans le cadre d'une fonctionnalisation de la NP ou d'une modification de ses propriétés de solubilité.



**Figure 37. Exemple de QDs type CdTe stabilisés : (A) par un lien covalent entre le QD et l'acide thioglycolique (ATG), (B) par une interaction électrostatique entre le QD et l'oxyde de trioctylphosphine (TOPO).**

En fonction des voies de synthèse choisies (en milieu hydrophile ou hydrophobe, définies ci-après), le ligand de surface contrôlera la dispersion des NPs. Typiquement, des NPs hydrosolubles auront des ligands soufrés avec une extrémité hydrophile, tandis que les NPs hydrophobes présenteront des chaînes ou cycles carbonés hydrophobes.

#### II.8.1.4 Uniformité des tailles de particules

Au cours de la croissance des NCx, différents paramètres vont intervenir dans l'obtention d'une population monodisperse en taille. Une uniformité de la taille des NCx requiert une

période de nucléation temporellement discrète suivie par un phénomène de croissance plus lent et contrôlé à partir des nucléi formés. Un schéma général de préparation de nanostructures monodisperses implique une phase unique et très brève de nucléation où tous les nucléi seront obtenus simultanément (nombre de nucléi fini), suivi par une croissance de ces nucléi existants.<sup>249</sup> Ceci peut être obtenu par une addition rapide des réactifs dans un milieu réactionnel chaud contenant un solvant coordinant. L'injection rapide des réactifs va porter la concentration des précurseurs au dessus du seuil requis pour la nucléation. La température de la solution est suffisamment élevée pour décomposer les réactifs, et va mener à une sursaturation des particules en solution. Suite à cette poussée très brève de nucléation, la concentration des espèces en solution va passer en dessous des valeurs de concentration critique pour la nucléation. Tant que la consommation des réactifs en solution au cours de la croissance des NPs n'est pas dépassée par l'addition d'une quantité de précurseur, aucun nouveau nucleus n'est formé et les produits ajoutés ne vont que servir à la croissance des NPs. Etant donné que la croissance d'une NP est similaire à une autre, la distribution initiale de taille est largement déterminée par la durée au cours de laquelle les nucléi sont formés et commencent à croître. En effet, si la durée de croissance nanoparticulaire pendant la période de nucléation est courte comparée au processus de croissance proprement dit, alors les NPs obtenues vont devenir plus uniformes.<sup>249-251</sup>

Il est très intéressant de pouvoir contrôler ces paramètres. Les propriétés physico-chimiques des NPs étant intimement liées à leurs dimensions, il est important que leur synthèse aboutisse à une population de taille homogène, afin d'obtenir un échantillon aux propriétés homogènes, et donc plus facilement identifiables.

## II.8.2 Voies de synthèses des QDs

Afin de synthétiser des QDs, deux approches peuvent être envisagées : l'approche *top-down* (du haut vers le bas), qui regroupe les procédés qui permettent une réduction des structures jusqu'à l'échelle nanométrique. Cette méthode englobe à la fois les procédés techniques permettant une réduction toujours plus grande des éléments construits (*i.e.* les puces électroniques à base de silicium) et la stratégie permettant de passer du matériau macroscopique aux composés nanométriques. Ces méthodes sont majoritairement physiques. L'approche *bottom-up* (du bas vers le haut) est basée sur la construction « atome par atome » de structures nanométriques. Cette méthode regroupe plutôt les techniques de chimie colloïdale en solution.

Les techniques de chimie colloïdale en solution ont été largement développées dans le cadre de la préparation de QDs utilisables en biologie, et sont ainsi plus amplement développées dans la partie qui suit.

#### II.8.2.1 Physiques

Les synthèses de QDs par voie physique peuvent se faire par des techniques lithographiques<sup>252-254</sup> ou épitaxiales.<sup>255-260</sup> Ces méthodes permettent la production de grandes quantités de NCx. Cependant, la synthèse de QDs monodisperses est difficile par cette approche. De plus, ces techniques ne permettent pas une synthèse directe de QDs discrets stabilisé par un ligand en solution, indépendants d'un support quelconque. Par conséquent, ces techniques sont peu adaptées à la fabrication de QDs applicables en biologie, et ne seront donc pas développées dans cet exposé.

#### II.8.2.2 Chimiques

Les synthèses de QDs en solution ont largement été développées dans le cadre de leur utilisation potentielle en biologie. Ces synthèses en phase liquide monophasique peuvent être divisées en deux catégories : les synthèses en milieu organique et celles en milieu aqueux. Ces techniques en phase liquide sont utilisées pour obtenir des QDs monodisperses, et l'ajustement des différents paramètres réactionnels (*e.g.* choix du ligand et des précurseurs, température et temps de contact, pH, solvant) permet un bon contrôle de la taille des QDs obtenus ainsi que de leur fonctionnalisation.

##### II.8.2.2.1 En milieu organique

###### *- Techniques à solvant coordinant*

Les premières synthèses de QDs développées ont été réalisées en milieu organique coordinant. Le choix du solvant a une importance cruciale car il influence la réactivité des précurseurs ainsi que la cinétique de croissance des QDs. A l'origine, la synthèse de QDs monodisperses de type chalcogénure de cadmium (CdS, CdSe et CdTe) relatait la réaction entre un précurseur organométallique comme le diméthylcadmium ( $\text{CdMe}_2$ ) et un précurseur du chalcogène approprié (en général un chalcogénure de trialkylphosphine), dans un solvant coordinant à haut point d'ébullition à haute température (jusqu'à 300°C).<sup>249</sup> Ces synthèses

menaient généralement à des QDs ayant une dispersion en taille de 8-10% pour CdSe et 10-15% pour CdS et CdTe.<sup>249</sup>

Le solvant coordinant utilisé va à la fois jouer le rôle de solvant réactionnel et de ligand stabilisateur du QD. Généralement les solvants coordinants utilisés sont un mélange d'alkylphosphines  $R_3P$  et d'oxyde d'alkylphosphines  $R_3PO$  (où R est une chaîne alkyle à 4 ou 8 atomes de carbone, majoritairement la trioctylphosphine TOP ou l'oxyde de trioctylphosphine TOPO). L'utilisation d'oxyde d'alkylphosphine avec une chaîne plus courte comme solvant coordinant entraîne une croissance plus rapide, qui devient incontrôlable à des températures élevées (230°C pour l'oxyde de tributylphosphine).<sup>249</sup> Le solvant coordinant va également conditionner la dispersion des NCx et la stabilité de la dispersion colloïdale. La croissance lente à relativement haute température donne généralement des particules avec une très bonne cristallinité (structure würtzite).<sup>261</sup>

Cependant, ce type de synthèse présente l'inconvénient d'utiliser des précurseurs de métaux pyrophoriques, difficiles à manipuler, chers et limitant les quantités à l'échelle du laboratoire. Pour cette raison, l'utilisation de composés inorganiques tels que les oxydes ou les sels de métaux semble plus intéressante.

Dans le but de remédier à ce problème, de nouvelles synthèses ont été développées préconisant l'utilisation de précurseurs inorganiques.<sup>250</sup> Dans le cadre de la synthèse de CdS, CdSe et CdTe, le diméthylcadmium peut être remplacé par l'oxyde de cadmium ou des sels de cadmium (acétate de cadmium, carbonate de cadmium, ...) qui, après complexation par des acides phosphoniques à longue chaîne ou des acides carboxyliques, vont jouer le rôle de source de Cd, sous la forme d'un complexe de phosphonate de Cd. Ce complexe va alors pouvoir réagir avec le sélénure ou le tellure de trialkylphosphine et ainsi conduire à l'obtention QDs monodisperses de 2,5 à 5 nm de diamètre.

L'introduction de cosurfactants comme les alkylamines ont permis une amélioration de la dispersion en taille des QDs<sup>262-264</sup> notamment grâce à l'activation des précurseurs métalliques de type carboxylate.<sup>265</sup> De nombreuses alkylamines ont été utilisés, comme la dodécylamine,<sup>266-267</sup> l'hexadécylamine,<sup>263-264, 268</sup> ou encore l'oléylamine.<sup>269</sup> La passivation de surface a été fortement améliorée grâce à l'encombrement stérique réduit de ces surfactants, augmentant le rendement quantique de fluorescence ( $\Phi_{\text{fluo}}$ ) jusqu'à des valeurs de 0,30-0,40.<sup>266, 269</sup> La distribution de taille des QDs va également être améliorée. Des QDs de taille plus importante peuvent être préparés en utilisant des acides carboxyliques pour la

complexation du cadmium.<sup>251</sup> Dans ce cas, la vitesse de croissance des QD est inversement proportionnelle à la longueur de chaîne de l'acide carboxylique.<sup>251</sup>

#### - Techniques à solvants non-coordinants

Les travaux employant les techniques à solvant coordinants relatent l'emploi de produits toxiques, chers, nocifs, pyrophoriques et explosifs.<sup>251</sup> Des méthodes alternatives ont donc logiquement été développées afin de restreindre l'emploi de tels composés, principalement par l'emploi de solvants non-coordinants, typiquement des alcanes ou alcènes à longue chaîne tels que le 1-octadécène (ODE)<sup>267, 270-271</sup> ou des mélanges plus complexes comme les paraffines liquides,<sup>272-275</sup> et même de l'huile d'olive.<sup>276-277</sup> Le contrôle de la cinétique de croissance et de la taille des QDs se fait par changement de la nature et la quantité de ligand (par exemple phosphines, acides carboxyliques ou phosphoniques) introduite dans le milieu,<sup>278</sup> ce qui a permis de développer des voies de synthèses sans phosphine.<sup>270, 273, 279-280</sup> Ces méthodes de synthèse utilisant des solvants non-coordinants, outre les avantages pratiques qu'elles apportent, induisent une modification de la réactivité. En effet, non seulement la cinétique de croissance va dépendre de la solubilité du ligand dans le solvant, mais il a également été montré que la dissolution du chalcogène dans l'ODE aboutissait à la formation d'un précurseur jusqu'à deux fois plus réactif que les chalcogénures de trioctylphosphine utilisés habituellement.<sup>270</sup>

Il est donc possible, par le large choix des précurseurs, des solvants organiques coordinants ou non, d'obtenir les paramètres de synthèse optimaux pour chaque type de QDs par voie en milieu organique. Cette méthode est très polyvalente, et est encore largement répandue et développée actuellement. Cependant, les QDs obtenus sont stabilisés par des ligands hydrophobes, ne permettant alors pas leur utilisation directe en biologie.

#### *II.8.2.2.2 En milieu aqueux*

De nombreuses méthodes de synthèses ont été développées afin de synthétiser des QDs de type II-VI directement hydrosolubles, comme CdS, ZnS, CdSe et CdTe. Les ligands utilisés peuvent se lier à la surface du QD soit par interaction électrostatique, soit par création d'une liaison covalente avec les atomes métalliques de surface, comme dans le cas des dérivés des thiols, qui sont les ligands principalement utilisés car le soufre présentant une forte affinité de liaison envers les métaux. Un grand choix de précurseurs métalliques est possible, de même

que le choix du ligand soufré, qui peut présenter à son autre extrémité des fonctions carboxyles (*e.g.* acide thioglycolique<sup>281-284</sup> et acide mercaptopropanoïque<sup>281, 285-287</sup>), amines (*e.g.* cystéamine)<sup>288-291</sup> ou alcool (*e.g.* mercaptoéthanol).<sup>292-293</sup> De nombreux travaux ont portés sur l'optimisation de la stœchiométrie de réactifs,<sup>294-296</sup> ainsi que sur leurs concentrations et la valeur du pH.<sup>297</sup> Ces voies de synthèse en phase aqueuse permettent d'obtenir des QDs directement hydrosolubles et efficacement stabilisé par leur ligand soufré et le choix de la fonction périphérique facilite leurs fonctionnalisations ultérieures. Cependant elles ont certaines limites<sup>298</sup> : les QDs obtenus sont généralement faiblement cristallins à cause de la température de réaction peu élevée, le rendement de synthèse est souvent bas et la dispersion en taille des QDs synthétisés est la plupart du temps supérieure à 15%, ce qui nécessite une étape supplémentaire de séparation en taille pour l'obtention d'échantillons monodisperses. De plus, ces techniques font appel à une méthode de chauffage dans les conditions standards de pression, et il n'est donc pas possible de dépasser une température de 100°C.

Afin de remédier à ces inconvénients, de nouvelles méthodes de synthèses ont été développées, faisant appel à des techniques de chauffage alternatives, comme l'irradiation micro-onde<sup>299-303</sup> ou la synthèse dite hydrothermale,<sup>304-308</sup> qui permettent une excitation thermique du milieu réactionnel plus efficace que dans les conditions standards. Ces protocoles ont permis une nette amélioration des cinétiques de croissance des QDs en phase aqueuse, un gain important en rendement quantique de fluorescence ainsi qu'une amélioration de la monodispersité des lots de QDs synthétisés. Il a en effet été montré que pour une synthèse réalisée par irradiation micro-onde, la répartition de chaleur au sein du milieu réactionnel est homogène et beaucoup plus rapide que lors des méthodes de chauffage standard. Ceci implique une croissance plus rapide et homogène des QDs, ce qui va résulter en une meilleure monodispersité du lot de QDs ainsi qu'une meilleure cristallinité, qui se traduit par une nette amélioration des rendements quantiques de fluorescence qui peuvent alors atteindre 1.<sup>300</sup> La possibilité de chauffer à des températures bien supérieures à celles obtenues dans les conditions standards (reflux de l'eau) va engendrer une hydrolyse partielle des thiols<sup>309</sup> qui vont alors devenir une source de soufre. Ce phénomène aboutit à la formation de QDs en alliage ternaire de type CdTe(S) et cette modification de structure a un impact sur le *bandgap* du QD et va ainsi permettre d'obtenir des QDs dont les propriétés spectrales d'absorption et d'émission de fluorescence sont situées dans le rouge/proche infrarouge.<sup>309</sup>

### II.8.3 Fonctionnalisation

Le choix du ligand dépend directement de la méthode de synthèse adoptée (en phase organique ou aqueuse). Ce ligand, en plus de stabiliser le QD, va jouer un rôle très important dans l'application de ces NPs. En effet, il va directement contrôler les propriétés de dispersion des QDs, mais également les possibilités de greffer à la surface du QD des molécules d'adressage ou de le coupler à des vecteurs. La structure du ligand va donc directement influencer les capacités de couplage du QDs. Ce ligand est généralement composé de trois parties.<sup>310-314</sup> Tout d'abord une fonction d'ancrage, qui va assurer la liaison entre la surface du QD et le ligand. Cette fonction d'ancrage est généralement un thiol pour les synthèses en phase aqueuse ou un oxyde de phosphine pour les synthèses en phase organique. A l'autre extrémité du ligand se trouve la fonction qui va à la fois assurer la dispersion des QDs dans un solvant spécifique, mais également le greffage de molécules ou de vecteurs. Cette fonction est souvent assurée par un carboxyle ou une amine, mais peut également être un alcool. Entre cette fonction et le point d'ancrage du ligand se trouve un groupement espaceur, de nature généralement aliphatique ou aromatique. Le choix du ligand étant déterminant dans le futur emploi des QDs, de nombreux travaux relatent l'emploi de ligands à fonction d'ancrage plus robuste,<sup>315-317</sup> ou en plus grand nombre,<sup>318-320</sup> l'emploi de dendrimères réticulés<sup>321-325</sup> ou d'oligomères.<sup>319, 326</sup>

La fonctionnalisation de la surface des QDs peut également être réalisée par leur encapsulation. Cette stratégie implique l'ajout d'une coquille organique, et les propriétés optiques initiales sont généralement conservées étant donné que les ligands de surface ne sont pas échangés. Cette coquille peut être de différentes natures : elle peut être constituée de ligands amphiphiles, entraînant la formation d'une micelle.<sup>327-331</sup> La partie hydrophobe du ligand amphiphile interagit avec les ligands issus de la synthèse, formant une micelle autour du NC qui le rend hydrophile. L'encapsulation peut aussi se faire par une coquille de silice<sup>332-335</sup> ou par des billes de polystyrène micrométriques contenant un grand nombre de QDs.<sup>336-340</sup>

La fonctionnalisation des QDs est donc une partie essentielle de leur élaboration, et le choix du ligand, et donc de la voie de synthèse choisie, devra donc être fonction des futures applications envisagées pour les QDs.



*Potentialité des Quantum  
Dots comme  
photosensibilisateurs pour la  
thérapie photodynamique*



# **Chapitre IV : Potentialité des quantum dots comme photosensibilisateurs pour la thérapie photodynamique**

## **I. Cahier des charges**

Dans le domaine de la PDT, de nombreuses recherches sont effectuées concernant le développement de photosensibilisateurs ayant des longueurs d'onde d'absorption proches de l'infrarouge. Comme cela a été expliqué dans le premier chapitre, ces rayonnements sont moins absorbés par les tissus endogènes que ceux de longueur d'onde inférieure. Par conséquent, des PS absorbants dans ce domaine de longueur d'onde vont permettre une amélioration du traitement PDT des tumeurs (traitement possible jusqu'à 7 mm de profondeur pour un rayonnement à 650 nm, alors qu'il n'est pas possible au-delà de 4 mm pour un rayonnement compris entre 500 et 600 nm).<sup>341</sup> La nature organique des PS communément utilisés en PDT les rend très peu solubles dans l'eau, et cela a pour inconvénient majeur d'engendrer une agrégation de ces molécules. Cette agrégation peut modifier défavorablement leurs propriétés photophysiques et leur biodistribution.<sup>342</sup> Les QDs constituent une des alternatives afin de résoudre les problèmes rencontrés avec les photosensibilisateurs organiques classiques. Fondamentalement, un QD adapté à une utilisation en PDT devra être hydrosoluble, avoir des propriétés spectrales orientées dans la région proche infrarouge du spectre et être fonctionnalisable par des molécules d'adressage.

### **I.1 Hydrosolubilité**

Pour une application en bioimagerie et/ou en PDT, la molécule photoactive devra être hydrosoluble. En effet, un PA hydrophobe aura tendance à s'agréger, voire précipiter en milieu biologique. Dans le cas de PA photoactifs, ces phénomènes sont préjudiciables, dans la mesure où leurs propriétés spectrales peuvent être altérées, en particulier une diminution du rendement quantique en oxygène singulet. Les QDs sont une alternative prometteuse aux PS organiques: en effet, il est possible d'agir soit sur la méthode de synthèse, soit sur le traitement post-synthétique afin de les rendre hydrosolubles.

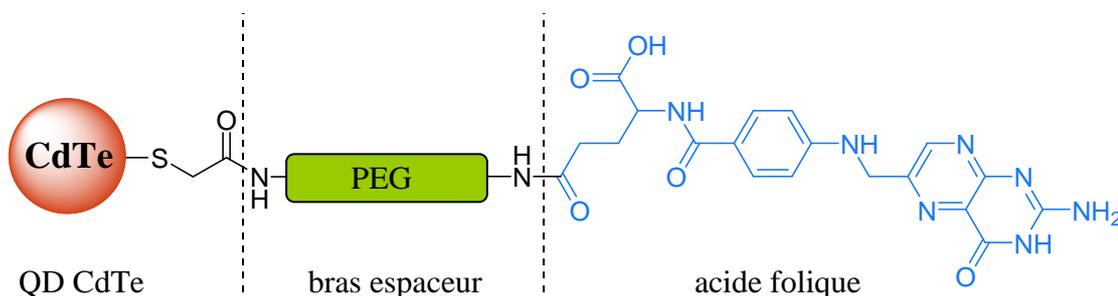
### **I.2 Modularité des propriétés spectrales : Absorption IR**

Il est intéressant de synthétiser des PSs dont les propriétés photophysiques sont adaptées à la fenêtre thérapeutique de la PDT. Comme expliqué précédemment, la modularité des

propriétés photophysiques des QDs est fonction de leur taille et de leur composition.<sup>104</sup> Une utilisation des QDs comme PS s'avère judicieuse, ces propriétés étant ajustables par un contrôle de leur synthèse.

### I.3 Fonctionnalisation

Par un choix judicieux des ligands stabilisateurs, les QDs vont pouvoir avoir une surface fonctionnalisable. En effet, les fonctions chimiques de surface, à l'instar des dendrimères (voir chapitre II), peuvent servir de point d'ancrage à des molécules d'adressage. Cet adressage, défini et expliqué chapitre I, va permettre de cibler l'action des PS/QDs vers les cellules tumorales. Dans le cadre d'une utilisation de QDs en PDT, notre choix s'est arrêté sur l'acide folique (AF). L'intérêt de cette biomolécule pour un adressage de PA vers des cellules cancéreuses sera développé ultérieurement au chapitre 5. D'un point de vue pratique, un bras espaceur de type diaminopolyéthylène glycol (PEG) sera utilisé afin d'assurer la jonction QD-AF (Figure 38). Cet espaceur hydrophile aura en plus la fonction d'améliorer la solubilité de la structure, contrebalançant ainsi la solubilité limitée en milieu hydrophile de l'acide folique.



**Figure 38. Structure typique d'un QD type CdTe fonctionnalisé par l'acide folique via un bras espaceur type PEG.**

### I.4 Avantages des QDs par rapport aux PS organiques classiques

Les QDs présentent des propriétés intéressantes par rapport aux PS organiques, comme leur stabilité photochimique, c'est-à-dire leur résistance au photoblanchiment.<sup>343-345</sup> C'est un phénomène récurrent chez les PS. En effet, une molécule fluorescente à l'état excitée peut soit émettre un photon, soit être engagée dans une réaction photochimique. Cette réaction photochimique aboutit généralement à une dégradation du fluorophore. Il peut s'agir d'une réaction avec l'oxygène sous forme de radicaux libres, ou d'une réaction chimique avec une molécule du milieu.

En plus de cette résistance au photoblanchiment, les QDs peuvent présenter de très bons rendements quantiques de fluorescence (jusque 1) ainsi que des coefficients d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) très élevés.<sup>346</sup>

## **II. Choix de la composition du QD : le tellure de cadmium CdTe**

Depuis le début du développement des nano-objets, de nombreux matériaux semi-conducteurs ont été étudiés pour la synthèse de QDs. Parmi eux, les alliages binaires de chalcogénure de cadmium (semi-conducteur de type II-VI), principalement le sulfure de cadmium (CdS), mais également le sélénure de cadmium (CdSe) et le tellure de cadmium (CdTe), représentent les types les plus étudiés.

Le choix de CdTe pour la synthèse de QDs pour la PDT se justifie par le fait que cet alliage offre une meilleure adaptabilité aux applications recherchées que les autres chalcogénures de cadmium. En effet, en reprenant l'équation 15, on constate que lorsque le rayon  $r$  du QD augmente, la valeur du *bandgap* diminue jusqu'à atteindre la valeur limite minimale défini par  $E_g^{\text{massif}}$  :

$$\lim_{r \rightarrow +\infty} E_g = E_g^{\text{massif}} \quad (20)$$

le terme  $\frac{2,6}{\epsilon_r r(nm)} \left( 2,74 \frac{r_B(nm)}{r(nm)} - 1 \right)$  tendant alors vers 0. Cette valeur minimale imposée par

$E_g^{\text{massif}}$  définit donc la longueur d'onde maximale  $\lambda_{\text{abs.max}}$  que l'on pourra atteindre avant que le phénomène de confinement quantique ne disparaisse. Par conséquent, le chalcogénure ayant  $E_g^{\text{massif}}$  le plus faible permettra d'atteindre les longueurs d'onde les plus élevées (Tableau 5).

**Tableau 5. Exemples de  $E_g^{\text{massif}}$  de quelques SC et leur  $\lambda_{\text{abs.max}}$  théorique.**

Matériau	Type de SC	$E_g^{\text{massif}}$ (eV) <sup>a</sup>	$\lambda_{\text{abs.max}}$ (nm) <sup>b</sup>
CdS	II-IV	2,52	492
CdSe	II-IV	1,76	705
CdTe	II-IV	1,45	900
ZnO	II-IV	3,30	376
InP	III-V	1,34	925
InAs	III-V	0,35	3542
Si	IV	1,12	1107
Ge	IV	0,66	1878

<sup>a</sup> : valeur à 300 degrés Kelvin.

$$^b : \lambda(nm) = \frac{1239.8}{E_g^{\text{massif}}(eV)}$$

Parmi les chalcogénures de cadmium, on constate que le type CdTe permet d'obtenir des particules ayant des spectres d'absorption pouvant se situer dans les domaines rouges (600-700 nm) et proche infrarouge (700-800 nm) ce qui, comme il a été montré, est un critère de choix pour une application en PDT.

### **III.Synthèse**

L'un des objectifs principaux de ce travail est de synthétiser des QDs de type CdTe ayant leurs propriétés spectrales orientées vers le proche infrarouge. Ce contrôle des propriétés des QDs va directement être lié au contrôle de leur synthèse. De nombreux travaux ont porté sur différents modes de préparations de QDs de type chalcogénures de cadmium.

#### **III.1 Choix du type de synthèse**

Parmi les différentes méthodes de synthèse à disposition, notre choix s'est arrêté sur les méthodes chimiques en solution. Cela se justifie d'une part par l'équipement nécessaire à certaines méthodes (comme les dépôts chimiques ou physiques de vapeur), les rendant coûteuses et plus lourdes à mettre en place. D'autre part, l'application recherchée des QDs synthétisés nous impose certaines contraintes, telles que l'obtention de nanoparticules discrètes ayant une faible polydispersité sous forme de solutions colloïdales aqueuses stables. Dans ce but, notre choix s'est arrêté sur les synthèses en phase liquide, car ce sont souvent les méthodes les moins lourdes et les plus simples à mettre en œuvre. De plus, ces méthodes

offrent une grande modularité dans le choix de ligands de surface ainsi que des solvants de synthèse. Ces méthodes impliquent des techniques d'extraction basées sur une précipitation sélective permettant une ségrégation des NPs obtenues par la taille. Ces techniques d'extraction sont simples à mettre en place, ne nécessitant qu'un ajout contrôlé de contre-solvant.

Parmi les méthodes en phases liquides possibles, notre choix s'est arrêté sur les synthèses monophasiques, qui peuvent se dérouler, comme cela a été montré précédemment, soit en phase organique, soit en phase aqueuse.

Les synthèses en phase organique permettent de travailler avec des solvants à hauts points d'ébullition, offrant la possibilité d'opérer à haute température. Ceci aboutit en général à une croissance rapide des NCx (de l'ordre de quelques minutes). La faible durée de manipulations induit une assez bonne monodispersité des QDs obtenus. Le seul inconvénient lié à ce type de synthèse est que les QDs obtenus sont hydrophobes. Il faut donc opérer à un traitement post-synthétique d'échange de ligands afin de les rendre hydrosolubles pour une application potentielle en PDT. Dans ce but, on veillera à bien choisir le ligand organique pour la synthèse, celui-ci devant s'échanger facilement avec le ligand hydrophile lors du traitement.

Les synthèses en phase aqueuse permettent d'obtenir directement des QDs hydrosolubles et permet donc d'éviter les problèmes d'échange de ligands parfois rencontrés. De plus, ces méthodes, appelés parfois "synthèses vertes" car réalisées en milieu aqueux, évitent l'emploi de solvants organiques à haute température et des précurseurs dangereux que l'on emploie parfois en synthèse organique.

Le premier des objectifs principaux de ce travail de thèse est la synthèse de QDs de type CdTe dont les propriétés d'absorption sont orientées vers le proche infrarouge. Pour cela, diverses méthodes de synthèses en phase organique ou aqueuse ont été testées.

### **III.2 Les éléments fondamentaux à une synthèse de QDs en phase liquide**

Lors d'une synthèse en phase liquide de QDs ou plus généralement de NPs, que ce soit en milieu aqueux ou organique, quatre éléments sont nécessaires à la bonne maîtrise de ces synthèses. En se focalisant sur les QDs binaires de type II-IV, plus précisément les tellurures de cadmium CdTe, ces quatre éléments sont le choix de la source de cadmium, des

précurseurs des tellures, de l'agent stabilisateur et le contrôle post-synthétique des QDs obtenus.

### III.2.1 Les cadmium " $\text{Cd}^{2+}$ "

Le cadmium métal  $\text{Cd}^0$ , de par sa toxicité intrinsèque et sa réactivité, n'est jamais utilisé en tant que tel en synthèse de QDs. Les réactifs de base sont le plus souvent l'oxyde de cadmium  $\text{CdO}$ , ses sels, tels le chlorure de cadmium  $\text{CdCl}_2$  ou le perchlorure de cadmium  $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ , ou bien encore des sels organiques tel l'acétate de cadmium  $\text{CdAc}_2$ . Les composés organométalliques à base de cadmium, comme le diméthyl-cadmium  $\text{CdMe}_2$ , ont été les premiers précurseurs de Cd utilisés lors de synthèses en milieu organique.<sup>249</sup> Cependant, leur caractère instable, pyrophorique, volatile et toxique a poussé à stopper leur emploi au profit des précurseurs précédemment cités.

### III.2.2 Les précurseurs de tellures " $\text{Te}^{2-}$ "

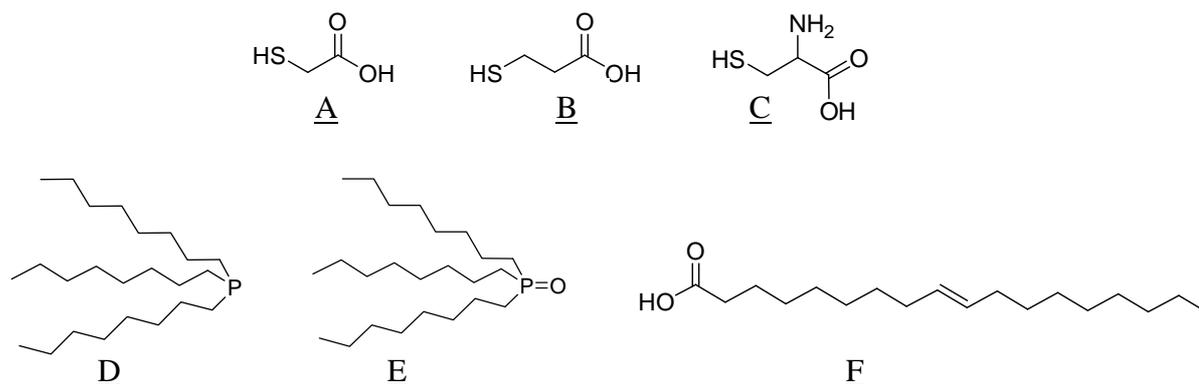
Le dianion  $\text{Te}^{2-}$  est très réactif. Il est notamment très sensible à l'oxydation, et on ne le trouve en solution aqueuse qu'à des pH élevés. Afin de le rendre manipulable, il est nécessaire de synthétiser les précurseurs juste avant la synthèse proprement dite des QDs.

### III.2.3 L'agent stabilisateur des NPs : le ligand

Comme nous l'avons vu précédemment, les QDs ne sont stables que cinétiquement à cause de leurs dimensions. Toute synthèse de NPs inclut donc l'utilisation de molécules qui vont permettre une stabilisation temporelle. Ces ligands doivent interagir de manière efficace avec la surface de la NP, et ainsi empêcher une labilité de ce ligand dans le milieu environnant la NP. Cette labilité aboutit généralement à une mise à nue partielle de la surface, pouvant entraîner des phénomènes de dégradation des NPs comme des oxydations ou leur coalescence.

Ces ligands peuvent être de différents types, mais comportent généralement une extrémité polaire qui interagit avec la surface de la NP afin d'en garantir la stabilité. En effet, l'interaction entre le cadmium électro-attracteur et un hétéroatome électro-donneur du ligand aboutit à une interaction électrostatique forte. Parmi ces ligands, on retrouve principalement des phosphines (interaction entre le cadmium et le doublet électronique non-liant du phosphore) et des oxydes de phosphines (interaction cadmium/oxygène) pour des interactions

NP/ligand faibles, et des thiols qui eux vont permettre la création d'une interaction forte entre le Cd et le soufre (Figure 39).



**Figure 39.** Exemples de ligands stabilisateurs couramment utilisés en synthèse en phase aqueuse : **A** : acide thioglycolique, **B** : acide mercaptopropanoïque, **C** : L-cystéine; et en phase organique : **D** : trioctylphosphine, **E** : oxyde de trioctylphosphine, **F** : acide oléique

Le ligand va également influencer directement la synthèse, dans un premier temps par sa nature intrinsèque. En effet, au cours de la croissance des NPs, les ligands s'adsorbent réversiblement à la surface des QDs pour former une coquille organique dynamique qui les stabilise en solution et canalise leur croissance. Des ligands qui se lient fortement à la surface des QDs (*i.e.* par des thiols ou des carboxylates) ou qui entraînent une forte gêne stérique vont ralentir le taux d'addition de matière à la surface, ce qui aboutit généralement à des QDs de tailles moyennes faibles. Dans un second temps, la quantité de ligand joue aussi un rôle, car un rapport ligand/réactif (" $\text{Cd}^{2+}$ " et " $\text{Te}^{2-}$ ") élevé favorise la formation de nucléi plus petits et par conséquent des QDs de plus petite taille.<sup>249-251</sup>

#### III.2.4 Le contrôle post-synthétique de QDs : absorption/fluorescence

Comme cela a été expliqué précédemment, les propriétés photophysiques sont directement liées aux dimensions des QDs, et par conséquent à la voie de synthèse utilisée. En général, la taille des NPs augmente avec l'allongement du temps de réaction et l'augmentation de la température, dans la mesure où le premier paramètre influe sur la quantité de matériau ajouté à la surface, et le second sur le taux d'addition de matériau aux nucléi existants.<sup>249-251</sup>

Le principal objectif de la thèse est l'élaboration de QDs ayant leurs propriétés spectrales orientées vers le proche infrarouge, idéalement vers 660 nm. Un ajustement systématique des paramètres réactionnels de temps et de température, mais également la nature et la concentration des réactifs et des ligands, est nécessaire afin de contrôler la taille, la forme et la

qualité des QDs synthétisés. Dans ce but, un contrôle systématique de l'absorption et de l'émission de fluorescence des QDs synthétisés a été effectué. Ces méthodes de caractérisation sont simples et rapides à mettre en place et nous permettent d'être directement renseignés sur la polydispersité et les propriétés spectrales des échantillons. Ces méthodes, et plus particulièrement l'étude du rendement quantique de fluorescence  $\Phi_{\text{fluo}}$ , permettent également d'avoir une bonne idée de la qualité d'un échantillon. Cet aspect de la caractérisation des échantillons de QDs sera plus amplement développé au chapitre Caractérisation.

Typiquement, pour une synthèse de QDs de type CdTe, nous aurons donc :



où la température de chauffage  $\Delta$  et le temps de réaction  $t$  vont être fonction du solvant utilisé ainsi que de la nature des réactifs employés.

Par convention, la nomenclature des QDs fait état de la composition du cœur, qui peut être multicouche, et du ligand de surface stabilisant. Par exemple, un QD de cœur CdTe recouvert d'une couche de CdSe stabilisé par un ligand de type acide thioglycolique (ATG) sera désigné par CdTe/CdSe@ATG.

### **III.3 Synthèse en milieu organique**

Plusieurs méthodes de synthèse en milieu organique ont été testées. Toutes ces réactions ont été réalisées en milieu coordinant, c'est-à-dire un milieu où le solvant sert également de ligand stabilisateur à la NP. Ce sont des solvants/ligands de type phosphine, principalement la trioctylphosphine TOP<sup>347-348</sup> ou encore la tributylphosphine TBP,<sup>349</sup> ou de type oxyde de phosphine, principalement l'oxyde de trioctylphosphine TOPO,<sup>347-348</sup> auxquels on peut aussi ajouter d'autres types de ligands tels l'acide oléique (AO)<sup>350</sup> ou la n-dodécylamine (DDA)<sup>351</sup> afin de moduler la cinétique réactionnelle de la croissance des QDs. Ce type de synthèse est réalisé à haute température, en général entre 140 et 280°C, mais parfois jusqu'à 320°C.<sup>349</sup> Cela permet non seulement d'utiliser le TOPO comme solvant, car celui-ci est solide à température ambiante ( $T_{\text{fusion}}=52^\circ\text{C}$ ), mais également une activité thermique importante qui va considérablement accélérer la croissance des particules par une augmentation du taux d'addition de matériau à la surface des nucléi néoformés. Cela se traduit par un temps de

réaction relativement court (de 2-3 min à un maximum d'une heure) pour obtenir de QDs aux propriétés spectrales orientées dans le rouge et proche infrarouge.

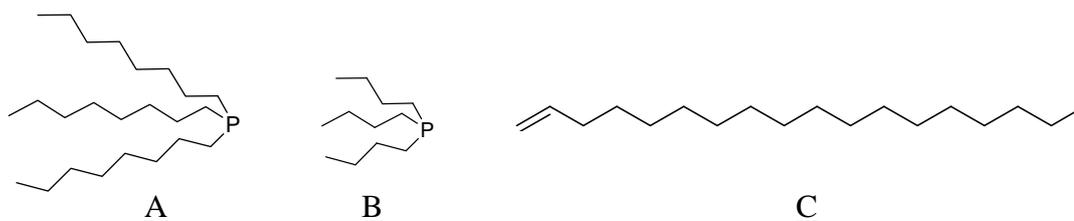
Une synthèse typique de QDs en phase organique comprend la synthèse de la source de chalcogénure (ici Te), qui une fois préparée, est injectée dans le milieu réactionnel contenant le solvant/ligand et la source de Cd. Il est important de rappeler que la finalité de ces QDs est une utilisation en PDT anticancéreuse. Par conséquent, les QDs synthétisés en phase organique, et qui possèdent donc des ligands de surfaces hydrophobes, devront subir un traitement post-synthétique d'échange de ligands afin de les rendre hydrosolubles et donc utilisables pour des applications biologiques.

### III.3.1 Synthèse du précurseurs "Te<sup>2-</sup>": TOP-Te

Pour une synthèse en milieu organique coordinant à base de phosphines et d'oxydes de phosphore, le précurseur "Te<sup>2-</sup>" utilisé est de type tellure de trialkylphosphine. Dans la littérature, la majorité des synthèses de QDs en milieu organique relate l'emploi du précurseur tellure de trioctylphosphine TOP/Te, bien que d'autres longueurs de chaînes alkyles peuvent être envisagées, à l'instar du tellure de tributylphosphine TBP ou encore du tellure de trihexylphosphine THP.<sup>352</sup> Le caractère pyrophorique des alkylphosphines nous oblige à travailler dans des conditions très strictes d'inertie atmosphérique. Pour cela, toute manipulation des alkylphosphines est réalisée en sac à gants, sous atmosphère de N<sub>2</sub>.

De manière générale, le complexe alkylphosphine/Te est réalisé en accord avec le milieu de croissance des QDs, c'est-à-dire que pour la synthèse de QDs en milieu TOPO seul ou TOP/TOPO, la préparation de la source de Te sera à base de TOP et de Te. De la même manière, la source de Te pour la synthèse de QDs type CdTe@TBP, la source de Te sera préparée à base de TBP et de Te. Le choix de la taille des chaînes alkyles des phosphines est issu de la volonté du contrôle de la cinétique réactionnelle de la croissance des QDs. En effet, comme nous l'avons expliqué précédemment, la nature et la taille du ligand vont être un facteur prépondérant. Dans le cas de TOP et TBP, nous avons affaire à des phosphines et l'interaction entre ces ligands et les nucléi néoformés ou les QDs en cours de croissance sera du même type. La différence de réactivité réside ici dans l'encombrement stérique plus ou moins important que le ligand va créer. Dans le cas présent, TOP est davantage encombrant que TBP, d'où une cinétique de croissance cristalline beaucoup plus lente et qui aboutit à l'obtention de QDs plus petits qu'avec TBP pour un temps de réaction équivalent. Dans le

cadre du protocole utilisant TBP un adjuvant a été utilisé, l'octadécène ODE (Figure 40) qui est en fait le solvant de la réaction. Cet adjuvant n'est pas nécessaire à la préparation du complexe TBP/Te, en revanche, il est en accord avec la voie de synthèse choisie préconisant l'utilisation d'un solvant non-coordinant afin de contrôler la cinétique réactionnelle.<sup>352</sup> Cet aspect de la synthèse est développé ci-après dans le paragraphe relatif à la croissance des QDs.



**Figure 40. Ligands et solvant utilisés lors de la préparation du complexe de Te : A : trioctylphosphine TOP, B : tributylphosphine TBP C : octadécène ODE.**

Différents protocoles ont été testés pour la préparation de la source de Te (principalement TOP-Te) nécessaire à la synthèse de QDs type CdTe. Différentes stœchiométries, ainsi que deux températures de réaction ont été expérimentées (Tableau 6).

**Tableau 6. Protocoles testés pour la préparation de la source de Te**

Essai	Précurseur	Réactifs (équivalent)	Température (°C)	Temps de réaction (h)	réf
n°1	TOP-Te	Te <sup>0</sup> /TOP (1/1)	150	2	347
n°2	TOP-Te	Te <sup>0</sup> /TOP (1/2)	150	2	
n°3	TOP-Te	Te <sup>0</sup> /TOP (1/4.2)	22	2	350
n°4	TOP-Te	Te <sup>0</sup> /TOP (1/21)	22	2	348
n°5	TOP-Te	Te <sup>0</sup> /TOP (1/21)	22	3	
n°6	TOP-Te	Te <sup>0</sup> /TOP (1/21)	22	nuit	
n°7	TBP-Te	Te <sup>0</sup> /TBP (1/5,7)	22	3	349

Face à la relative fragilité du précurseur alkylphosphine/Te impliquant sa manipulation sous atmosphère inerte (N<sub>2</sub>), aucune analyse de rendement de réaction ou encore d'analyse spectrométrique n'a été effectuée. Seule une analyse qualitative reposant sur l'aspect du produit obtenu est possible. La préparation du précurseur "Te<sup>2-</sup>" consiste principalement en une solubilisation dans l'alkylphosphine du métalloïde Te<sup>0</sup> qui se présente sous forme d'une poudre pulvérulente. La solution est grisâtre à l'injection de l'alkylphosphine et tend à prendre

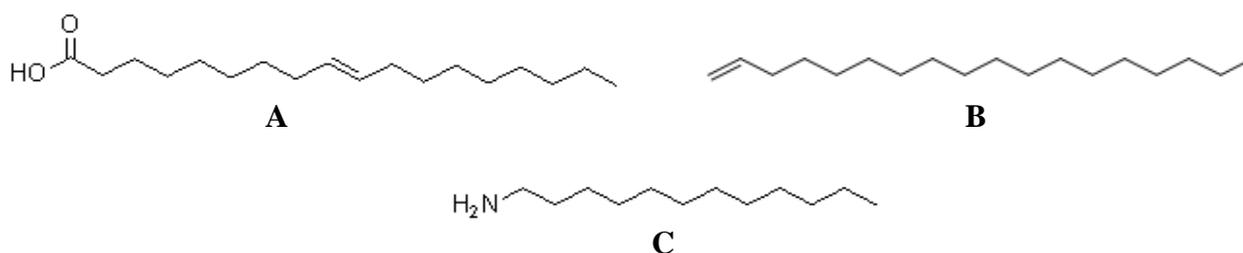
l'aspect d'une solution jaune limpide. Aucune différence notable n'a été constatée entre les résultats issus des différents protocoles. Les considérations ne sont donc que pratiques : si l'on utilise un nombre d'équivalent faible de TOP (1 ou 2, essai n°1 et 2) par rapport à  $\text{Te}^0$  un chauffage est nécessaire ( $150^\circ\text{C}$ ), mais celui-ci ne doit pas excéder 2 h sous peine d'une dégradation du complexe alkylphosphine/Te (retour à une solution grise/noire). En revanche, l'utilisation d'un nombre d'équivalent plus élevé de TOP (4,2 à 21, essais n°3 à 6) par rapport à  $\text{Te}^0$  permet de travailler dans des conditions de température ambiante, le temps influençant très peu la stabilité du produit obtenu (essai n°6). L'essai portant sur la synthèse du complexe TBP-Te (essai n°7) a quant à lui été concluant.

À résultats équivalents, le choix de préparation du complexe TOP/Te peut être fait sur des considérations purement pratiques. L'utilisation d'un grand nombre d'équivalent (21) de TOP permet de s'affranchir de tout chauffage et offre également un confort de manipulation. En effet, la quantité de TOP utilisée permet la dilution de Te, si bien qu'un plus grand volume de TOP/Te doit être prélevé pour être injecté dans le milieu réactionnel de la croissance des QDs, rendant ainsi les quantités de TOP/Te plus facilement manipulable. En revanche, si l'on travaille sur de plus grandes quantités ou si l'on désire faire une économie en produit, le choix peut s'orienter sur les protocoles "économiques" en TOP (essais n°1 ou 2), mais le chauffage est alors nécessaire.

### III.3.2 Injection et croissance des QDs

La synthèse proprement dite des QDs, c'est-à-dire leur croissance à partir des nuclei néoformés, consiste en l'injection de la source de Te dans un milieu réactionnel chaud constitué de la source de Cd en présence du ligand coordonnant, et éventuellement d'un solvant ou d'autres adjuvants. Ce mélange réactionnel est préparé parallèlement à celle de la source de Te. Comme cela a été suggéré par l'équipe de Murray,<sup>249</sup> le protocole de synthèse faisant intervenir TOP et TOPO est devenu très populaire pour la préparation de NPs type chalcogénures de cadmium comme CdTe ou plus récemment HgTe.<sup>353-356</sup> Cette méthode utilise le diméthyl cadmium  $\text{Cd}(\text{Me})_2$  comme précurseur de Cd. Or ce composé est volatile, hautement toxique, instable et pyrophorique. Il a été montré par la suite que d'autres précurseurs de Cd moins dangereux comme l'oxyde de cadmium CdO ou l'acétate de Cd  $\text{Cd}(\text{Ac})_2$  peuvent être utilisés pour préparer des QDs de type CdSe. Notre choix s'est porté sur ce type de synthèse moins dangereux et plus "vert" pour synthétiser des QDs de type CdTe.

Différents protocoles ont été expérimentés, faisant tous intervenir une injection rapide à chaud du précurseur TOP/Te dans le milieu réactionnel constitué de cadmium dissout dans le TOPO. Des adjuvants ont été également utilisés, tels l'acide oléique (AO), la n-dodécylamine (DDA) comme ligands alternatifs au TOPO et l'octadécène (ODE) et le diphényléther (Ph<sub>2</sub>O) comme solvants non-coordinants. L'utilisation de ces ligands complémentaires (AO et DDA) au TOPO permet tout d'abord un contrôle plus fin de la cinétique réactionnelle car ils jouent sur la balance globale de coordination, la solubilité ainsi que la labilité des monomères de Cd et des *nuclei* néoformés.<sup>249-251</sup> De plus, cela permet d'obtenir des QDs plus stables<sup>349</sup> que ceux avec TOPO seul, car ces ligands vont protéger plus efficacement le QD du milieu extérieur, et donc mieux prévenir les phénomènes d'oxydation et d'agrégation. L'ODE et Ph<sub>2</sub>O, quant à eux, sont des solvants non-coordinants qui, contrairement aux solvants coordinants comme le TOPO, ne jouent pas le rôle de ligand dans la synthèse des QDs. En revanche, ils ont un impact sur la cinétique réactionnelle, car ils modulent la réactivité des monomères des sources de Cd et de chalcogénures<sup>352</sup> ainsi que la quantité de nucléi formé.<sup>357</sup> L'ODE n'a été utilisé que lors des synthèses de QDs de type CdTe@TBP et Ph<sub>2</sub>O lors des synthèses de CdTe@AO.



**Figure 41. Adjuvants testés lors de la synthèse de QDs CdTe en milieu coordiant : A : acide oléique (OA), B : octadécène (ODE), C : n-dodécylamine (DDA).**

La préparation de la source de Cd est toujours réalisée en accord avec les ligands employés pour stabiliser les QDs. Ainsi, l'oxyde de cadmium CdO ou l'acétate de cadmium Cd(Ac)<sub>2</sub> sont dissous soit dans du TOPO ou de l'AO, ou dans un mélange binaire de ligands : TOPO et AO ou TOPO et DDA.

L'étape clé de la synthèse de QDs est l'injection de la source de Te dans le milieu réactionnel contenant la source de Cd. Elle doit être effectuée rapidement et en une seule fois lorsque le mélange Cd/ligand a atteint la température nécessaire à la croissance cristalline. Il est à noter que pour les protocoles faisant intervenir l'acide oléique, le précurseur de Cd formé est un oléate de cadmium qui peut être dégradé par voie thermique. Il est donc nécessaire d'injecter la source de Te lorsque le milieu réactionnel contenant le Cd et l'acide oléique devient incolore et limpide, ce qui témoigne de la formation de l'oléate de Cd. Dans le

cas d'une attente trop longue avant l'injection, le milieu se recolore et prend une constitution hétérogène, signifiant que l'oléate de Cd s'est dégradé.

Dès que l'injection du précurseur TOP/Te est réalisée, le milieu prend immédiatement une coloration jaune, indiquant que la nucléation puis le début de la croissance des QDs se sont opérés. Cette coloration évolue au cours de la synthèse, balayant le spectre visible du jaune au rouge au fur et mesure de la croissance des QDs. En fonction des conditions expérimentales, cette évolution s'échelonne généralement entre 3 et 15 minutes pour les synthèses les plus efficaces (Tableau 7). Les synthèses organiques permettent d'obtenir des lots de QDs avec une bonne monodispersité, ainsi la croissance des nanocristaux est stoppée par précipitation de l'ensemble des QDs par ajout d'acétone au milieu réactionnel en fin de réaction.

Toutes les synthèses testées ont permis d'obtenir des QDs CdTe « organiques » de qualité, les rendements quantiques de fluorescence étant compris entre 0,15 et 0,40, en accord avec la littérature. Le facteur déterminant et discriminant sur le choix de synthèse est donc la longueur d'onde maximale d'absorption ( $\lambda_{\max}$ ), l'objectif étant qu'elle soit supérieure ou au moins égale à 650 nm.

- Les protocoles n°1 et 2 sont issus du même mode opératoire avec TOPO faisant office de ligand/solvant. Ils font intervenir une température de croissance cristalline relativement peu élevée (70°C), ce qui a pour conséquence d'engendrer des temps de croissance long (de 6 h à 2 jours). Ces essais ne se sont pas révélés concluants, car une prolongation du temps de contact n'a pas permis de faire croître efficacement les QDs ( $\lambda_{\max}$  limité à 480 nm).

- Le protocole n°3 présente la particularité de ne pas employer directement le TOPO. Celui-ci est en effet généré *in situ* lors de la préparation du milieu réactionnel. La source de Cd (CdO) est chauffée à l'air avec un excès de TOP, ce qui a comme conséquence de l'oxyder en TOPO. Cet essai fait intervenir une température de réaction élevée (250°C), ce qui raccourcit considérablement le temps de réaction (15 min) par rapport aux deux premiers essais, pour un  $\lambda_{\max}$  pouvant atteindre 615 nm.

- Le protocole n°4 fait intervenir exclusivement que l'AO comme ligand et est réalisé dans le solvant Ph<sub>2</sub>O à 174°C. Cette température pourrait laisser penser que la cinétique de croissance des QDs est moins élevée que précédemment. Cependant, cet effet est contrebalancé par l'emploi du solvant Ph<sub>2</sub>O qui dilue les réactifs, ce qui fait que la quantité de réactif passe rapidement sous les valeurs de concentrations critiques nécessaires à la nucléation, la quantité de réactifs restant ne participant alors plus qu'à la croissance des QDs à

partir des *nuclei* déjà formés. Ce protocole permet donc d'obtenir rapidement (entre 5 et 7 min) des QDs pouvant atteindre des valeurs de  $\lambda_{\max}$  de 620 nm.

- Le protocole n°5 fait intervenir la DDA comme ligand complémentaire au TOPO. Les différents essais sont réalisés à une température de 150°C. Les temps de réaction les plus longs (10 min) ont permis d'obtenir des QDs CdTe@TOPO/DDA ayant un  $\lambda_{\max}$  de 650 nm.

- Le protocole n°6 est inspiré par le précédent, seules les quantités de réactifs varient. Aucune différence notable n'a été observée entre ces deux derniers protocoles, que ce soit au niveau de  $\lambda_{\max}$  ou de  $\Phi_{\text{fluo}}$ .

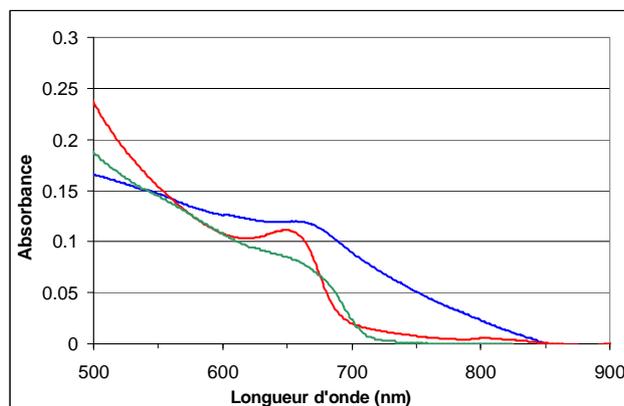
- Le dernier protocole de synthèse testé (essai n°7) permet la synthèse de QDs de type CdTe@TBP/OA. La haute température utilisée (280°C) ainsi que l'emploi de la TBP comme ligand favorisent une croissance cristalline plus rapide qu'avec le TOPO. L'emploi d'un second ligand, l'AO, permet de ralentir cette cinétique et rend la manipulation contrôlable, les temps de réactions étant compris entre 5 et 8 min.

**Tableau 7. Conditions expérimentales des différentes synthèses de QDs CdTe en milieu organique.**

Protocole n°	Type de QD	Stœchiométrie	T(°C)/durée	$\lambda_{\max}$ (nm)	Commentaires	réf
1	CdTe@TOPO	Te/Cd/TOPO 6,8/1/5	70 / 6h	480 nm	Croissance lente	347
2	CdTe@TOPO	Te/Cd/TOPO 3,4/1/5	70 / 48h	480 nm	idem n°1.malgré temps de contact long	347
3	CdTe@TOPO	Te/Cd/TOP 1/2/excès	250 / 15 min	615 nm	TOPO généré <i>in situ</i>	348
4	CdTe@AO	Te/Cd/AO 1/2,4/7,2	174 / 5 à 7 min	620 nm	solvant non-coordinant Ph <sub>2</sub> O	350
5	CdTe@TOPO/D DA	Te/Cd/TOPO/DDA 1/2/20/10	150 / 3 à 10min	<u>550-660 nm</u>	emploi d'un ligand complémentaire : DDA	351
6	CdTe@TOPO/D DA	Te/Cd/TOPO/DDA 1/2/21/8,4	150 / 10 min	<u>550-655 nm</u>	idem n°5, sauf quantité de DDA	351
7	CdTe@TBP/AO	Te/Cd/TBP/AO 1/2/5,6/8	280 / 5 à 8 min	<u>640-660 nm</u>	solvant non-coordinant ODE	349

Il a été démontré qu'il est possible de synthétiser des QDs de type CdTe « hydrophobes » absorbant vers le proche infrarouge, l'objectif étant fixé à  $\lambda_{\max}=650-660$  nm (Figure 42). Les protocoles efficaces pour atteindre ce but font intervenir un mélange binaire de ligands stabilisateurs, à savoir TOPO/DDA (protocole n°5 et 6) et TBP/AO (protocole n°7). Ces ligands supplémentaires présentent des fonctions amine (DDA) ou carboxyliques (AO) qui vont interagir plus fortement avec la surface du QD que les phosphines TBP ou oxydes de phosphine (TOPO). L'emploi de ce type de ligand tend à ralentir la cinétique de croissance, mais en contrepartie, le gain obtenu en stabilisation des QDs permet alors d'atteindre des tailles de QDs supérieures à celles préconisant l'emploi de phosphines ou d'oxydes de phosphine. En effet, il est important de noter que les données reportées dans tableau 7 sont les données optimales de  $\lambda_{\max}$  et de  $\Phi_{\text{fluo}}$ . Un temps de contact plus long ou une température plus élevée ne permettent pas d'obtenir, pour un protocole donné, des QDs de meilleure qualité absorbant davantage dans le rouge. Une augmentation d'un de ces deux paramètres n'engendre aucun gain en absorption ou fluorescence (protocole n°4 à 7), et aboutit généralement à une dégradation des QDs au cours de la synthèse pour les synthèses

impliquant l'emploi unique de phosphines (protocole n°3) ou d'oxydes de phosphine (protocole n°1 et 2).



**Figure 42. Spectre d'absorbance de QDs synthétisés par les protocoles permettant une absorption dans la région rouge-proche infrarouge : CdTe@TOPO/DDA (en bleu : protocole n°5,  $\lambda_{\text{max}}=660$  nm; en rouge : protocole n°6,  $\lambda_{\text{max}}=655$  nm), et CdTe@TBP/AO (en vert : protocole n°7,  $\lambda_{\text{max}}=660$  nm).**

Bien que les QDs obtenus aient les propriétés spectrales attendues, il est nécessaire d'effectuer un post-traitement afin de les rendre compatibles avec une future application en milieu biologique.

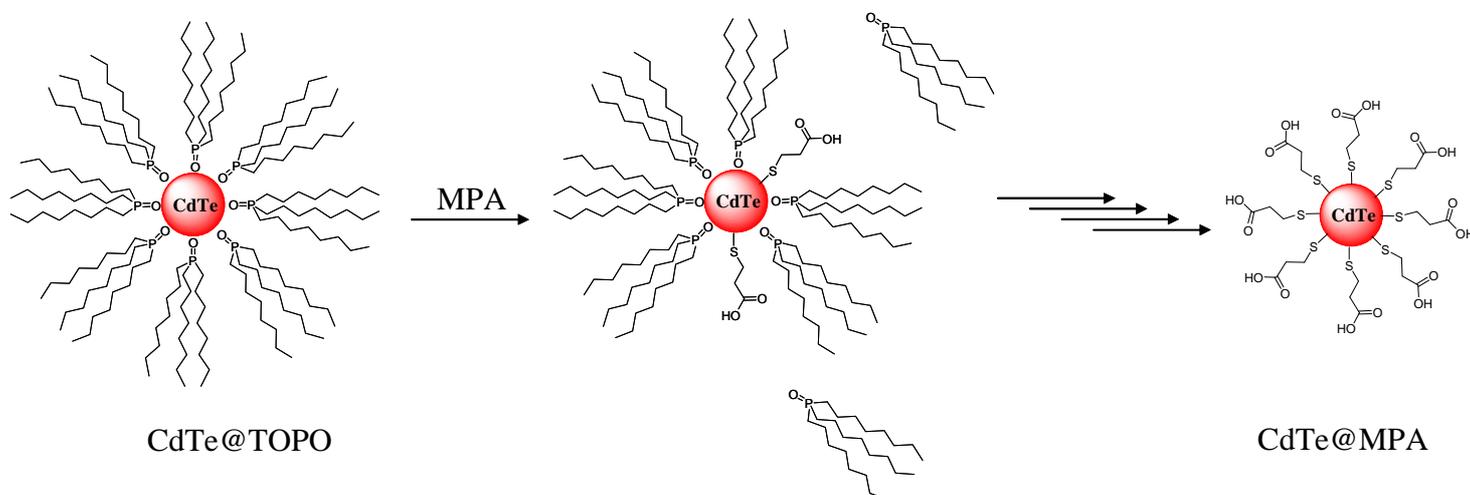
### III.3.3 Echange de ligand

Les QDs obtenus par les différentes voies de synthèse en milieu organique ne sont pas directement exploitables pour des applications en biologie. D'une part, leur nature hydrophobe est un frein à une utilisation en milieu aqueux où ils ne pourraient être mis en solution, et d'autre part par le type d'interaction entre le QD et son ligand stabilisateur, qui n'étant pas covalente est trop faible pour garantir une stabilité pérenne. En effet, le lien chimique est de type covalent de coordination, c'est-à-dire qu'elle résulte d'une interaction électrostatique entre un acide de Lewis, ici Cd, et une base de Lewis, ici les ligands. Contrairement à une liaison covalente standard où chacun des deux atomes liés apporte un de ses électrons de valence pour former la liaison, la liaison de coordination est plus faible et va conférer une certaine labilité du ligand dans le milieu. Cette particularité peut présenter un désavantage lors de l'utilisation des QDs en milieu biologique. En effet, ce type de milieu est généralement complexe, et peut contenir des thiols, des molécules chélatrices ou encore des molécules pouvant interagir avec la surface du QD, et ainsi le dénaturer, voire le déstabiliser suffisamment.

Cependant, cette particularité peut être avantageuse. Pour un emploi de ces QDs en milieu biologique, il est indispensable de les rendre hydrosolubles afin de rendre leur utilisation plus confortable en milieu aqueux. Par conséquent, la relative labilité des ligands utilisés lors de la synthèse de QDs « hydrophobes » va nous permettre de procéder à un échange de ligands, non seulement pour les rendre hydrosolubles, mais également afin de renforcer le lien QD-ligand et les rendre plus stables.

Notre choix s'est porté sur des ligands présentant une fonction thiol R-SH. Les thiolates R-S<sup>-</sup>, les bases conjuguées dérivées des thiols, forment des complexes solides avec beaucoup d'ions métalliques, et spécialement avec ceux classifiés « mous » selon la HSABT (*Hard and Soft Acid and Base Theory*), comme le cadmium. D'ailleurs, le terme mercaptan, autre nom des dérivés thiols, provient du latin *mercurium captans*, qui « capte le mercure ». La théorie HSAB stipule en effet, que la force de liaison entre deux atomes va être fonction du recouvrement orbitélaire. Ainsi, une interaction entre deux atomes de dimensions du même ordre sera beaucoup plus forte : les interactions entre une base et un acide qualifiés de « dur/dur » (de petite dimension), ou « mou/mou » (de grande dimension) sera plus importante qu'une liaison « dur-mou ». Ainsi, un acide mou comme le cadmium se liera beaucoup plus fortement à une base molle comme le soufre, plutôt qu'à des bases dures comme l'azote ou l'oxygène. De plus, l'électronégativité du soufre étant moindre par rapport à l'azote ou l'oxygène, la liaison Cd-S se rapproche d'un lien covalent strict plutôt que ionique/de coordination.

La création d'une liaison forte, donc plus stable énergétiquement, favorise la réaction d'échange entre le thiol et le TOPO, TBP, DDA et AO (Figure 43).



**Figure 43. Exemple d'échange de ligand entre un QD CdTe@TOPO et l'acide mercaptopropanoïque (MPA).**

L'influence du nouveau ligand sur la solubilité du QD dépend, quant à elle, de sa nature, c'est-à-dire la longueur de la chaîne alkyle le composant et la présence ou non de fonctions polaires. Le but étant de rendre les QDs hydrosolubles, notre choix s'est principalement porté sur des « ligands thiol » à petite chaîne alkyle et présentant une fonction acide carboxylique terminale (ATG et AMP), gage d'hydrosolubilité. Cependant, quelques tests ont été réalisés sur des ligands présentant des chaînes alkyles plus longue (AMU), ou la particularité de posséder deux fonctions thiols susceptibles de se lier à la surface du QD (ADHL), voire des ligands thiols totalement hydrophobes (DDT) (Tableau 8).

**Tableau 8. Récapitulatif des essais d'échange de ligands. Comparaison entre les  $\Phi_{\text{fluo}}$  initiaux et les  $\Phi_{\text{fluo}}$  après échange.**

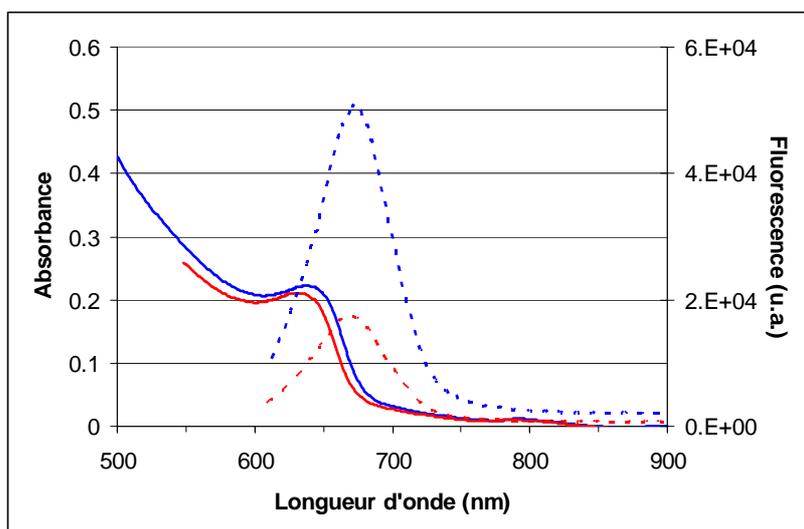
QD	Ligand d'échange	effet hypsochromique (nm)	$\Phi_{\text{fluo}}$ initial	$\Phi_{\text{fluo}}$ final	réf
CdTe@TOPO	ADHL <sup>a</sup>	/	0,15	/	358
CdTe@TOPO	AMU <sup>b</sup>	/	0,20	/	359
CdTe@TOPO	AMP <sup>c</sup>	2	0,20	0,10	359
CdTe@TOPO	ATG <sup>d</sup>	2	0,20	0,10	359
CdTe@TOPO	DDT <sup>e</sup>	1	0,15	0,05	358
CdTe@AO	ATG <sup>d</sup>	0	0,30	0,10	358
CdTe@TOPO/DDA	ATG <sup>d</sup>	1	0,35	0,08	358
CdTe@TBP/AO	ATG <sup>d</sup>	1	0,25	0,05	360

<sup>a</sup> : acide dihydrolipoïque ; <sup>b</sup> : acide mercaptoundécanoïque ; <sup>c</sup> : acide mercaptopropionique  
<sup>d</sup> : acide thioglycolique ; <sup>e</sup> : dodécane-thiol

Le suivi de la réaction est possible dans le cas d'un échange avec des thiols hydrosolubles : le processus se déroule en milieu biphasique lipophile/hydrophile. Le contrôle de l'avancement est permis par le passage de la coloration due aux QDs de la phase lipophile à la phase hydrophile. Comme nous l'avons vu, cette réaction d'échange est favorable, et peut donc être menée avec un bon rendement, indiqué par le passage complet des QDs en phase aqueuse.

Un contrôle des propriétés spectrales est réalisé en fin de réaction afin de vérifier qu'elles n'ont pas été modifiées durant l'échange. Plus précisément, la position du pic d'absorption et l'évolution des rendements quantiques de fluorescence sont mesurées. Cette réaction

d'échange rend en effet le QD vulnérable au milieu extérieur, qui peut alors subir des dégradations engendrant une baisse de  $\Phi_{\text{flu}}$ , principalement une oxydation de la surface déplaçant l'absorption et l'émission de fluorescence vers les rayonnements de longueurs d'ondes inférieures (effet hypsochrome ou *blue shift*).<sup>361-364</sup>



**Figure 44. Spectres d'absorbance (lignes pleines) et de fluorescence (en pointillés) de QDs CdTe. En bleu : CdTe@TOPO/DDA avant échange de ligand ; en rouge : après échange de ligand (CdTe@ATG).**

En dehors des échanges avec l'ADHL et l'AMU, qui ont aboutit à une dégradation totale des QDs, chacun des autres échanges ont fonctionné, permettant d'obtenir des QDs hydrosolubles à partir de QDs hydrophobes. Cependant, bien que l'effet hypsochrome soit négligeable (entre 0 et 2 nm) et probablement dû à une modification des phénomènes de relaxation énergétique liés à la nature différente des ligands, on note une forte baisse du  $\Phi_{\text{flu}}$ . Cette baisse est sans doute due à l'apparition de défauts de surface du QDs, qui vont résulter en des phénomènes non-radiatifs de désexcitation, faisant ainsi baisser le  $\Phi_{\text{flu}}$ .

Cette baisse de  $\Phi_{\text{flu}}$  est conséquente pour chaque type de QDs et de ligands testés (tableau 7), et notamment pour les QDs présentant les propriétés spectrales désirées (CdTe@AO, CdTe@TOPO/DDA, CdTe@TBP/AO,  $\lambda_{\text{abs}}=650-660$  nm). Les meilleurs résultats ont été obtenus à partir des QDs de type CdTe@TOPO, qui, malheureusement ne constituent pas les QDs-cibles. Le TOPO est en effet plus labile que DDA et AO, la réaction est par conséquent encore plus favorable et plus rapide, prémunissant le QD de dégradations conséquentes (baisse de  $\Phi_{\text{flu}}$  d'un facteur 2). Les QDs-cibles, c'est-à-dire ceux retenus pour une éventuelle

application en PDT anticancéreuse (CdTe@AO, CdTe@TOPO/DDA, CdTe@TBP/AO), présentent des résultats peu satisfaisants (chute de  $\Phi_{\text{fluor}}$  d'un facteur 3). La meilleure interaction entre DDA et AO et la surface du QDs engendre probablement un arrachement de quelques atomes de Cd à la surface du QDs lors de leur départ. Un nombre conséquent de défauts de surface apparaît ainsi, d'où cette chute de  $\Phi_{\text{fluor}}$ .

Devant le manque de résultats probants de ces échanges, surtout ceux concernant les QDs-cibles, il a été décidé d'explorer une autre voie de synthèse en milieu aqueux pour permettre l'utilisation des ligands hydrosolubles, et d'obtenir des QDs directement hydrosolubles. Cela permet d'éviter toute dégradation susceptible de modifier les propriétés spectrales des QDs.

### **III.4 Synthèse en milieu aqueux**

Une alternative aux synthèses organiques de QDs, qui constituent les premiers protocoles développés, est la synthèse en phase aqueuse. Cette chimie présente de nombreux avantages par rapport à son aînée. Elle peut être considérée comme "verte", car le solvant utilisé est l'eau. On travaille également avec des précurseurs type chlorure ou perchlorate de Cd au lieu d'organométalliques dangereux. De plus, la synthèse se fait à reflux de l'eau (100°C), non négligeable d'un point de vue sécurité alors que les synthèses en phase « organique » se déroulent à 250°C, avec parfois de pics à 330°C selon le protocole utilisé. D'un point de vue synthétique, la synthèse hydrophile propose une simplicité de mise en place et une plus haute reproductibilité par rapport à la synthèse organique.<sup>250-251</sup> Elle permet également d'obtenir de solutions colloïdes de QDs dont la polydispersité n'excède pas 10%, et ce sans avoir recours à la technique d'injection à chaud nécessaire à la synthèse de QDs dans un milieu TOP/TOPO.

Le principal avantage de cette méthode est la possibilité d'obtenir des QDs hydrosolubles : les QDs synthétisés par cette méthode seront directement hydrophiles, et n'auront donc pas à subir de traitements post-synthétiques pouvant les endommager.

De nombreux protocoles ont été développés permettant la synthèse de QDs de type chalcogénures de cadmium stabilisés par de nombreux types de ligands hydrophiles.<sup>299, 301-303, 306, 365-374</sup> Il est donc possible de synthétiser des QDs de type CdTe, et rester ainsi en accord avec le choix de ce composé comme étant le mieux adapté pour synthétiser des QDs aux propriétés spectrales orientées vers le rouge/proche infrarouge pour une éventuelle application en PDT anticancéreuse.

L'intérêt principal de cette méthode est donc l'obtention de QDs hydrophiles. Ceci est dû au choix du ligand utilisé. Différents protocoles synthétiques ont été expérimentés, faisant majoritairement intervenir le même type de ligand thioalkylcarboxylate, comme l'ATG et l'AMP. Ce type de ligand permet, comme cela a été expliqué précédemment, la création d'une liaison solide Cd-S de type covalente, offrant ainsi une grande stabilité au QD obtenu, et la fonction acide carboxylique terminale conférant une hydrosolubilité (pour un  $\text{pH} > 3$ , donc à  $\text{pH}$  physiologique) au QD. D'autres types de ligands ont été testés, notamment des ligands cationiques (à  $\text{pH}$  physiologique), comme la cystéamine et la L-cystéine, ou encore des ligands neutres, comme le mercaptoéthanol.

Comme pour la synthèse en phase organique et pour les mêmes raisons, la synthèse en milieu aqueux nécessite tout d'abord la préparation de la source de Te, qui est ensuite injectée rapidement et en une fois dans le milieu réactionnel contenant le Cd et le ligand.

#### III.4.1 Synthèse du précurseur " $\text{Te}^{2-}$ "

Une synthèse en milieu aqueux de QDs type CdTe nécessite tout d'abord la synthèse d'un précurseur " $\text{Te}^{2-}$ ".  $\text{Te}^{2-}$  n'étant pas un ion stable en tant que tel, il est produit par la réduction de  $\text{Te}^0$  (métal pulvérulent) par un hydrure ( $\text{NaBH}_4$  ou  $\text{NaH}$ ) afin d'obtenir l'intermédiaire réactionnel  $\text{NaHTe}$  cinétiquement plus stable, qui est alors injecté dans le milieu réactionnel afin d'initier la croissance des NCs.

Plusieurs méthodes de synthèse de  $\text{NaHTe}$  ont été expérimentées (Tableau 9).<sup>375-376</sup> Différentes sources d'hydrure ( $\text{NaBH}_4$  ou  $\text{NaH}$ ) ainsi que les conditions de température de réaction ( $0^\circ\text{C}$  et  $80^\circ\text{C}$ ) ont été étudiées, le but étant d'obtenir un intermédiaire de bonne qualité et suffisamment stable dans le temps.  $\text{NaHTe}$ , bien que plus stable que l'ion  $\text{Te}^{2-}$ , qui donne une coloration violette intense à la solution, est en effet très sensible à l'oxygène, atmosphérique ou dissous dans l'eau, et tend à se réoxyder en  $\text{Te}^0$ . La solution devient alors hétérogène et grisâtre, avec parfois l'apparition d'une couche de  $\text{Te}^0$  à l'aspect métallique à l'interface air/eau. Des précautions sont donc prises au cours de la synthèse afin de travailler sous conditions inertes, l'atmosphère de la verrerie utilisée est inertée à l'azote  $\text{N}_2$ , et l'eau utilisée comme solvant est dégazée sous flux de  $\text{N}_2$ .

**Tableau 9. Récapitulatif des synthèses du précurseur de « Te<sup>2-</sup> » NaHTe.**

Source d'hydruure	Protocole	Equivalent Te <sup>0</sup> / "H"	T (°C)	Durée (h)	Stabilité	Résultat
NaH/tBuOH	1	1/4,5	65	2	/	solution hétérogène grisâtre
NaBH <sub>4</sub>	2	1/2	0	2	+	solution violette intense +
	3	1/2,1	0	8	++	solution violette intense ++
	4	1/2,63	0	6	+++	solution violette intense ++
	5	1/2,63	80	0.5	+	solution violette intense ++

De la même manière que pour le précurseur TOP-Te des synthèses en phase organique, la fragilité de NaHTe ne nous a pas permis de contrôler la qualité du produit ou le rendement de la réaction. Cependant, un contrôle qualitatif du produit obtenu peut être possible, une solution de NaHTe de bonne qualité prenant une teinte violette homogène intense.

Les différents essais menés ont montré que la réduction de Te<sup>0</sup> en Te<sup>2-</sup> était plus effective avec le borohydruure NaBH<sub>4</sub> que l'hydruure de sodium NaH, l'aspect final laissant même à penser que la réaction n'a pas du tout fonctionnée (prot. n°1). Dans le but de valider la synthèse de NaHTe la plus efficace, le critère de choix se révèle être la stabilité du produit formé. Par stabilité du produit, nous entendons ici la période durant laquelle NaHTe obtenu conserve une qualité équivalente à celle de fin de synthèse.

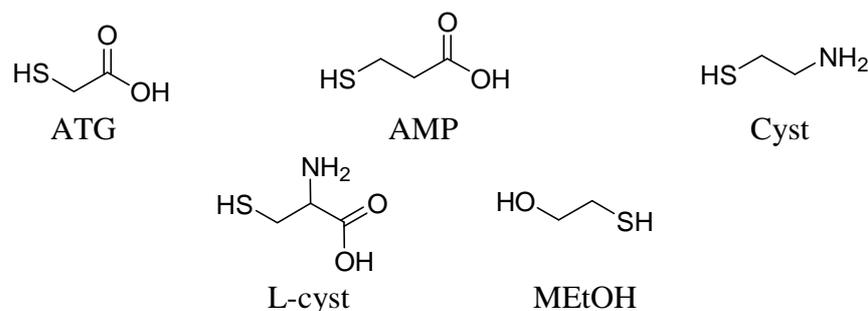
En effet, tous les protocoles faisant intervenir le borohydruure comme réducteur ont permis d'obtenir NaHTe de très bonne qualité, mis à part peut-être le protocole n°2, où la teinte violette reste très sombre, probablement dû à du Te<sup>0</sup> n'ayant pas réagi. Parmi ces essais (n°3, 4 et 5), le protocole n°4 est retenu pour la synthèse du précurseur de Te<sup>2-</sup> NaHTe nécessaire à la synthèse de QDs CdTe. En effet, cette synthèse a non seulement permis d'obtenir NaHTe de très bonne qualité, mais ce dernier s'est révélé stable pour des périodes pouvant aller jusque quatre jours, tandis que le protocole n°3 ne permettait pas d'excéder 3 jours, et le n°4 1,5 jours. L'intérêt de cette stabilité est que la préparation d'un lot de NaHTe va permettre la réalisation de plusieurs synthèses de QDs, offrant donc non seulement une économie en réactifs, mais aussi en temps, car il n'est plus alors nécessaire d'attendre la fin des 6 h de préparation de NaHTe avant chaque synthèse de QDs.

Le protocole n°3 est donc défini comme le protocole standard de synthèse de NaHTe nécessaire à la synthèse de la source de Te<sup>2-</sup> pour une synthèse de QDs type CdTe, et a été

utilisé pour tous les types de synthèses expérimentées, à savoir la synthèse hydrophile « standard », la synthèse en autoclave, la synthèse sous micro-ondes et la synthèse hydrothermale, développées ci-après.

### III.4.2 Injection et croissance des QDs

Pour tous les protocoles de synthèses expérimentés, la croissance proprement dite des QDs se déroule à chaud en milieu aqueux après l'injection du précurseur de  $\text{Te}^{2-}$ . Différentes sources de Cd et différents ligands hydrophiles, tous étant des dérivés de thiols (figure 45), sont testés, ainsi que plusieurs conditions expérimentales, où l'impact sur la taille des QDs obtenus des variations de stœchiométrie et concentrations a pu être apprécié. La principale différence entre tous ces protocoles réside dans le mode d'agitation thermique. Ainsi, quatre types de sources de chauffage ont été testés et sont décrits ici.



**Figure 45. Ligands utilisés lors des synthèses de QDs hydrophiles : acide thioglycolique (ATG); acide mercaptopropanoïque (AMP); cystéamine (Cys); L-cystéine (L-cyst); mercaptoéthanol (MEtOH).**

#### III.4.2.1 Synthèse hydrophile standard

Le terme standard regroupe en fait les protocoles qui impliquent un chauffage à reflux de la solution aqueuse ( $T \approx 100^\circ\text{C}$ ) à pression atmosphérique ( $P \approx 1 \text{ atm.}$ ). Ainsi, ces manipulations peuvent être réalisées avec de la verrerie standard de chimie, sans appareillage spécial.

Cinq ligands ont été testés, leur nature influençant la réactivité des différents précurseurs ainsi que la cinétique de croissance des QDs. Pour tous ces ligands, le lien ligand-QD sera assuré, comme cela a été expliqué précédemment, par une liaison de type covalente entre le soufre du thiol et le cadmium. Les facteurs influençant la croissance des QDs vont principalement être la taille du ligand (sa chaîne carbonée) et sa fonction terminale.

En effet, un des éléments fondamentaux lors de la croissance de QDs en milieu aqueux va être la mobilité du complexe ligand-Cd, directement régulée par le type de ligand utilisé. De la même manière que pour les ligands utilisés en synthèse organique, plus un ligand sera encombrant stériquement, moins le complexe ligand-Cd sera mobile. De même, plus la chaîne alkyl constituant le ligand hydrophile est longue, moins la balance hydrophobe/hydrophile penchera en faveur de l'hydrophilie du complexe ligand-Cd, ce qui atténuera également sa mobilité en milieu aqueux. Cette mobilité amoindrie fait que lors de la croissance du QD, les précurseurs ligand-Cd seront moins labiles, et par conséquent fera baisser la cinétique de croissance des NPs, et donc la taille des QDs que l'on peut obtenir.

**Tableau 10. Protocoles utilisés pour la synthèse de QDs type CdTe hydrophiles adaptés à la PDT**

Type de QDs	source de Cd	pH	équivalent Te/Cd/ligand	[Cd <sup>2+</sup> ] (mM)	temps (h)	$\lambda_{\text{abs max}}$ (nm)	$\Phi_{\text{fluo}}$
CdTe@Cys	Cd(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5,7	1/5/20	18	7	570	0,02
CdTe@L-cys	Cd(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	9	1/5/12	10	8	440	0,17
		11.4	1/5/20	18	15	580	0,18-0,20
CdTe@MEtOH	Cd(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	11,3	1/5/38	0.8	7	470	0,05
CdTe@AMP	CdCl <sub>2</sub>	9,1	1/2/3,6	6,2	76	615	0,18-0,22
CdTe@ATG	CdCl <sub>2</sub>	8.2	1+1/2+2/5+5	2,5-5	7	600	0,25
		9	1/2/5	0,625-1.25	15	540-590	0,32
	Cd(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	9	1/5/38	0,8	15	525-600	0.20
			1/5/20	1,25	18	590	0.10
		11.2	1/1.48/12.8	11	3	620	0,20
			1/1.48/6.4	11	7	580	22
			1/10/20	18	20	500-580	0,15-0,25
			1/5/38	1	2	530	0,15
			1/2/8	2	44	430	0,25
			1+1/10/20	15	19	420	0,12
1/5,5/12.6	8	9	570	0,15			

Tous les protocoles testés (Tableau 9) ont suivi le même type de préparation : le précurseur de Cd et le ligand sont introduits dans de l'eau ultrapure distillée dégazée à N<sub>2</sub>, afin d'éviter la présence d'impureté et les risques d'oxydation de NaHTe à l'injection. Le pH est

ensuite ajusté à la valeur désirée, en général à un  $\text{pH} > 6,5$  afin que le complexe Cd-Ligand se solubilise correctement. Cette solution est ensuite dégazée une nouvelle fois 30 min afin de préserver l'inertie de l'atmosphère. Enfin, l'injection de NaHTe est réalisée rapidement en une fois (sauf mention contraire). Le milieu réactionnel est ensuite porté à reflux. Une fois la réaction suffisamment amorcée, c'est à dire dès que le NaHTe injecté a complètement réagi pour former les nucléi, le milieu n'est plus trop sensible, ce qui va nous permettre d'effectuer des prélèvements afin de contrôler en temps réel l'avancement de la réaction. L'ensemble des résultats reportés dans le tableau sont issus des synthèses qui ont le mieux fonctionnées pour un protocole donné. Les principales différences entre ces protocoles résident dans le pH et la stoechiométrie réactionnelle. La concentration en Cd a été fixée en accord avec la littérature pour CdTe@Cys,<sup>374</sup> CdTe@L-cys,<sup>368</sup> CdTe@MEtOH,<sup>292</sup> CdTe@AMP<sup>306</sup> et CdTe@ATG.<sup>297, 365, 377</sup>

Comme le montre le tableau 10, beaucoup de méthodes de préparation ont été testées. Pour ce qui est de la préparation de QDs type CdTe adaptés à une utilisation en PDT (absorption dans le rouge proche infrarouge), le ligand ATG semble le plus prometteur. Ils semblent en effet également montrer la meilleure cinétique réactionnelle, se traduisant par le rapport temps de réaction/  $\lambda_{\text{abs max}}$  obtenu le plus favorable, comparativement à CdTe@L-cys et CdTe@AMP. Dans le cas de CdTe@Cys et CdTe@MEtOH, les QDs obtenus présentent une très mauvaise solubilité dans les meilleurs des cas, et plusieurs essais issus de ces protocoles ont abouti à l'obtention d'une poudre noire insoluble, figurant un échec de la synthèse dans la préparation de QD.

Suite à ces résultats, notre attention s'est par la suite exclusivement focalisée sur les protocoles utilisant le ligand ATG, et dans une moindre mesure AMP. En effet, c'est avec ces deux ligands que l'on a obtenu les  $\lambda_{\text{abs max}}$  les plus proches du rouge/proche infrarouge. Cependant, force est de constater qu'il est très difficile de dépasser 600 nm en absorption (Tableau 10), et ce quelque soit le protocole. Il faut tout de même remarquer que par rapport aux principes de croissance des QDs, évoqués précédemment dans ce chapitre où il est préconisé d'avoir une concentration élevée des différents précurseurs, et les travaux de Li *et al.*<sup>7</sup> où il est montré que plus la concentration en précurseur est faible, meilleur sera le  $\Phi_{\text{fluor}}$ , les meilleurs compromis taille/  $\Phi_{\text{fluor}}$  sont effectivement obtenus pour des [Cd] intermédiaires, en accord avec ces deux principes.

L'objectif d'obtenir des QDs hydrophiles absorbant idéalement vers 650-660 nm n'ayant pas pu être atteint, il a fallu se pencher sur des méthodes alternatives de synthèses. Ces protocoles reposent sur les mêmes principes que la synthèse standard, et ne fait intervenir que des méthodes d'apport énergétique différent au milieu réactionnel.

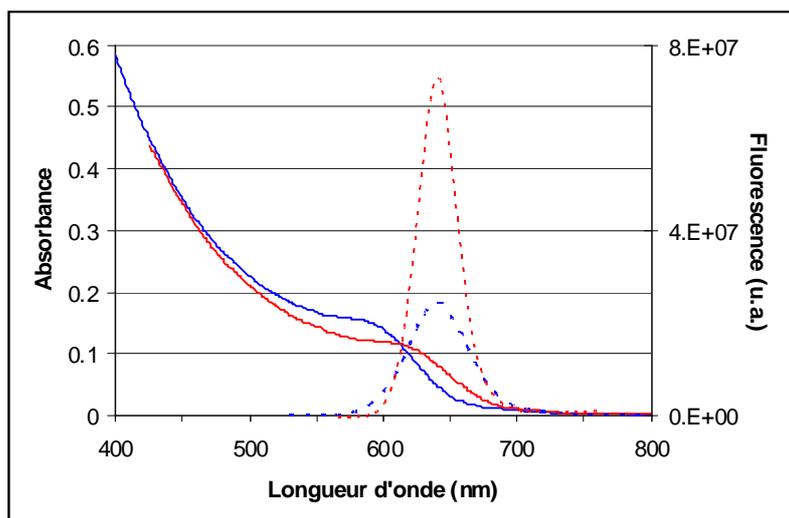
#### III.4.2.2 Irradiation micro-onde

Comparée aux méthodes standards de chauffage, l'irradiation par micro-onde pour la synthèse de QDs présente de nombreux avantages, comme la rapidité de chauffage, l'homogénéité de l'énergie apportée par les micro-ondes dans le milieu réactionnel.<sup>299-300, 378-379</sup> Ce type d'activation permet une croissance rapide des particules et l'obtention d'échantillon à polydispersité faible. La cinétique de croissance plus élevée que lors d'une synthèse en conditions standards est constatée. En effet, par comparaison de deux protocoles de synthèse identiques ne différant que par la méthode de chauffage (tableau 11), on constate l'obtention rapide de Qds CdTe absorbant vers le rouge ( $\lambda_{\text{max}}=610$  nm après 1h30 de chauffage) pour l'irradiation par micro-onde.

**Tableau 11. Comparaison de la méthode de chauffage standard et par micro-onde.**

Essai	Te/Cd/ATG	Mode de chauffage	Température/ Puissance	temps	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\Phi_{\text{fluo}}$	FWHM (nm)
1	1/2/5	standard	100°C	30 h	590	0.25	65
2	1/2/5	micro-onde	600 W	1h30	610	0.10	40

De plus, les QDs obtenus sont moins polydisperses que par la méthode standard, le FWHM du brut de réaction passant de 65 nm à 40 nm (figure 46). Le gain en cinétique est, quant à lui, vérifié par la comparaison des  $\lambda_{\text{abs}}$ . En effet, on constate que les QDs obtenus par irradiation micro-onde absorbent d'avantage vers les rayonnements rouge que ceux obtenus par la méthode de chauffage standard malgré un temps de réaction 20 fois plus important.



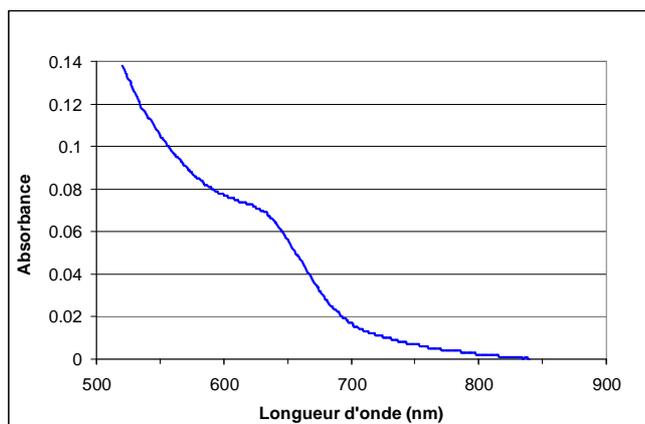
**Figure 46. Spectres d'absorption (lignes pleines) et de fluorescence (en pointillés) de QDs CdTe@ATG obtenus par voie standard (essai n°1, en bleu) et par irradiation micro-onde (essai n°2, en rouge).**

Afin d'obtenir des QDs absorbant à 650 nm, il est nécessaire de laisser les nanoparticules sous irradiation micro-onde pour un minimum de temps estimé à 2h. Cependant, faute de réacteur adéquat, c'est-à-dire supportant une augmentation de pression et micro-ondable, la réaction ne peut être conduite que par succession d'irradiation n'excédant pas 15 min. En effet, une partie du milieu réactionnel est perdu au cours de la synthèse. Ceci est dû à une augmentation trop forte de la température qui engendre un reflux trop important et une évacuation d'une partie du milieu réactionnel, le réacteur utilisé n'étant pas hermétique afin d'éviter tout phénomène de surpression.

#### III.4.2.3 Autoclave

Cette méthode de chauffage, inspirés des travaux de Mao *et al.*, permet de travailler sous une pression supérieure permettant alors d'accéder à des températures plus élevées que le reflux de l'eau à pression standard. De plus, un chauffage conséquent aboutit à l'hydrolyse partielle du ligand thiol.<sup>309</sup> Ainsi, des ions sulfure vont être générés dans le milieu réactionnel qui vont réagir avec les ions  $\text{Cd}^{2+}$  pour former du sulfure de cadmium CdS. Cette hydrolyse aboutit à la formation de QDs à cœur CdTe avec un gradient de sulfure du cœur à la périphérie. Cette synthèse conduit à une structure "alliage" CdTe(S) plutôt qu'à une structure "cœur/coquille" type CdTe/CdS.<sup>300</sup> Cette structure « alliage » permet d'obtenir des QD possédant des propriétés photophysiques situées dans la zone rouge/proche infra-rouge du spectre. Cependant, l'autoclave à disposition ne permet pas d'atteindre une température supérieure à 120°C, ce qui empêche une hydrolyse efficace du ligand ATG. Il n'a donc pas été

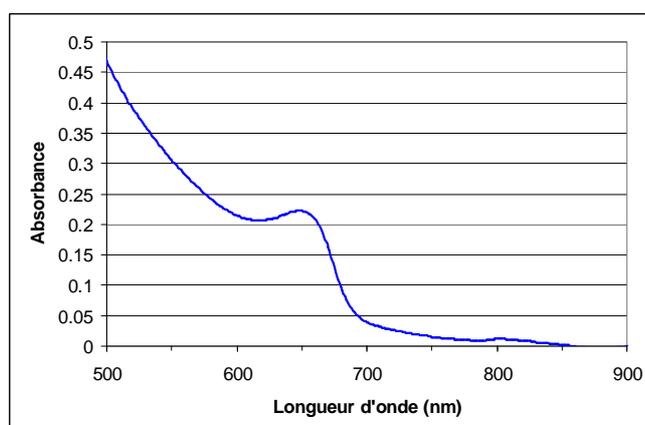
possible de préparer par cette méthode des QDs possédant un maximum d'absorption au-delà de 625-630 nm, et ce même après des temps de contact longs (Figure 47).



**Figure 47.** Spectre d'absorption de QDs CdTe(S)@ATG obtenu par la méthode de chauffage en autoclave ( $\lambda_{\max}$ =625-635 nm,  $t_{\text{contact}}$ =8 h).

#### III.4.2.4 Hydrothermale

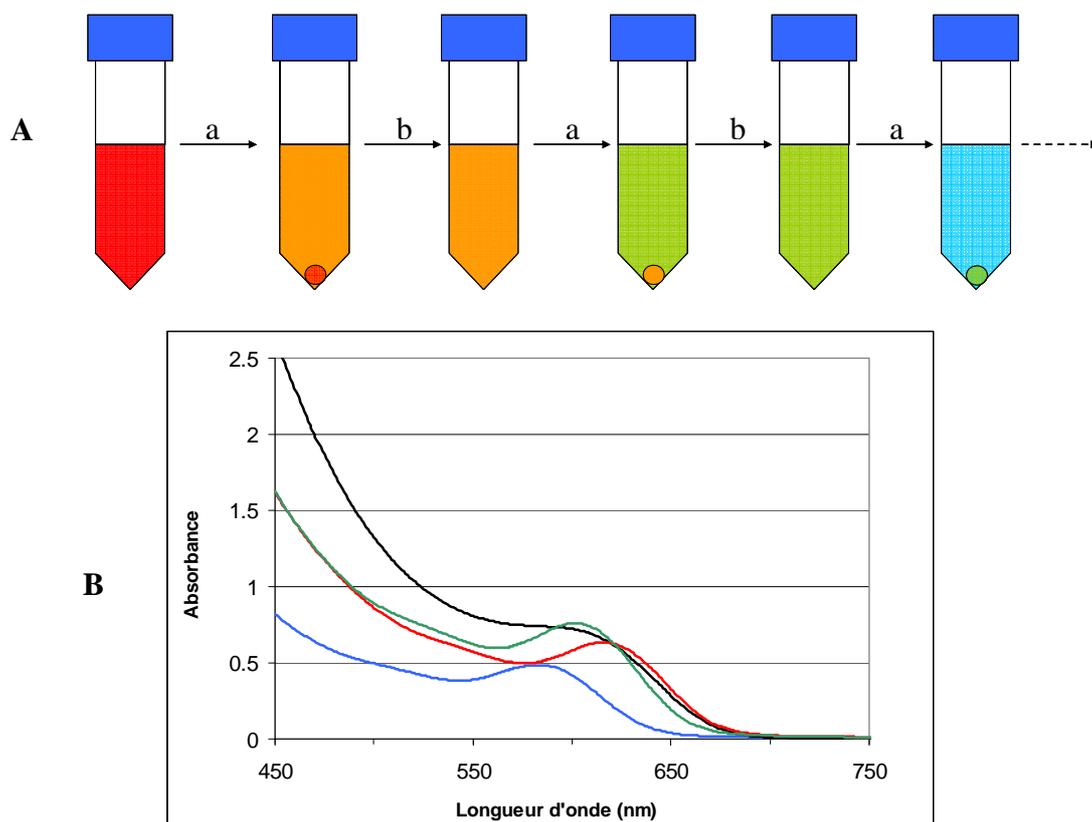
Ce procédé est basé sur le même principe que la réaction en autoclave, et selon les mêmes conditions de stœchiométrie (Te/Cd/Ligand=1/2/3,6). Ici, un réacteur hermétique en téflon contenu dans une coque acier supportant les fortes pressions est placé dans un four. La principale différence avec la réaction en autoclave est que nous allons pouvoir atteindre ici des températures supérieures à 120°C, jusqu'à 150°C. Cela nous permet d'obtenir également une cinétique réactionnelle plus élevée qu'en conditions standards, mais surtout une hydrolyse plus efficace du ligand qu'en autoclave, générant ainsi plus efficacement les ions sulfure *in situ*. Les QDs obtenues présentent une énergie  $E_g$  de *bandgap* plus basse que précédemment,<sup>309</sup> permettant ainsi une absorption du premier exciton à 650 nm (Figure 48).



**Figure 48.** Spectre d'absorption de QDs CdTe(S)@ATG obtenu par la méthode hydrothermale ( $\lambda_{\max}$ =655 nm,  $t_{\text{contact}}$ =5 h).

### III.4.3 Purification

A la différence des synthèses en phase organique où les QDs obtenus sont précipités en une fois car ils présentent une bonne homogénéité de taille, les lots de QDs obtenus par synthèse en phase aqueuse vont nécessiter un tri sélectif. En effet, la voie en phase aqueuse permet d'obtenir des lots plus polydisperses qu'en phase organique, et l'étape d'isolation/purification des QDs doit s'accompagner d'un tri des QDs en fonction de leurs tailles. Ceci va être possible par une succession d'étapes de précipitation, où l'*iso*-propanol utilisé comme contre-solvant va être ajouté à une solution de QDs jusqu'à apparition d'un trouble, puis centrifugation suivie de la récupération du surnageant qui va subir alors le même procédé (Figure 49). Ces précipitations vont permettre d'obtenir des lots successifs de QDs décroissant en taille, les plus gros étant les premiers à précipiter lors d'un ajout de contre-solvant.

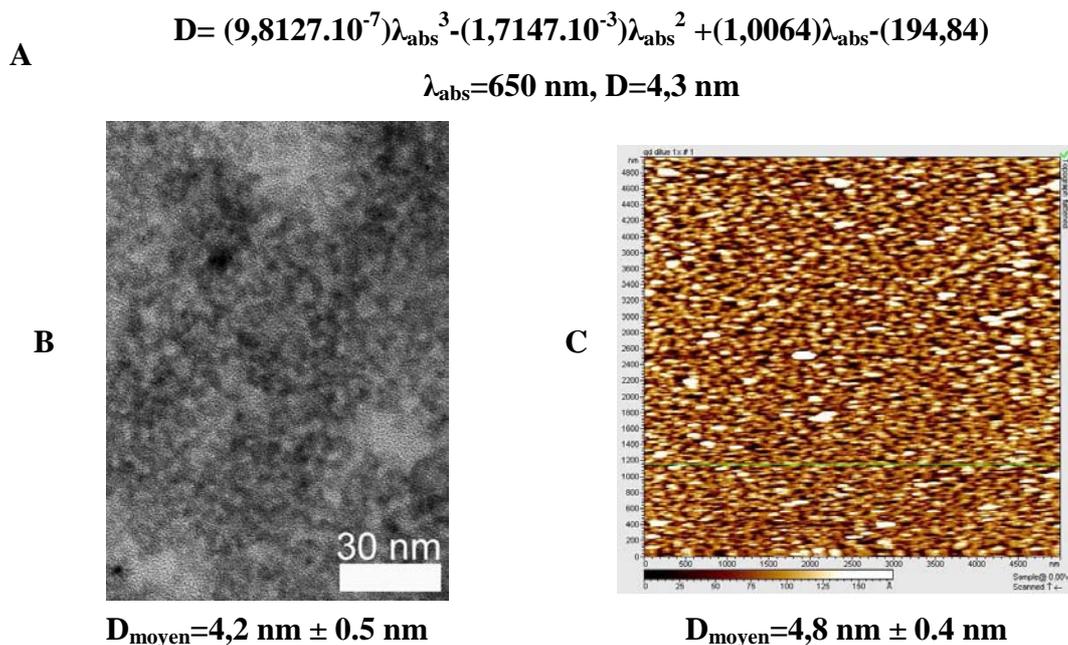


**Figure 49. A : Processus de précipitation sélective de QDs hydrophiles : a) ajout d'*iso*-propanol puis centrifugation; b) isolation du surnageant. B : Spectres d'absorption d'une solution brute de QDs après synthèse (en noir) et de la première (en rouge), seconde (en vert) et troisième (en bleu) fraction précipitée.**

### III.4.4 Caractérisation

Une fois les QDs synthétisés, il est nécessaire de les caractériser. Cette caractérisation inclus aussi bien la détermination de leur diamètre que l'étude de leurs propriétés spectroscopiques, leur cristallinité, leur composition chimique et leur pureté.

Pour déterminer la taille des QDs CdTe hydrophiles, nous disposons de quatre méthodes, à savoir une loi empirique qui relie mathématiquement le maximum d'absorption au diamètre de la particule (Figure 50A),<sup>346</sup> le microscope électronique à transmission (MET, Figure 50B), qui nous a permis d'estimer les tailles de QDs, la diffraction des rayons X (DRX) qui nous permet, une fois les paramètres de mailles établis d'évaluer la taille des nanocristaux et la microscopie à force atomique (AFM, Figure 50C), qui nous permet d'analyser la topographie d'un échantillon et donc d'avoir accès aux dimensions des QDs. Toutes ces techniques nous ont permis de déterminer la taille des QDs CdTe hydrophiles que l'on a synthétisés, et qui est comprise entre 3 et 4 nm.



**Figure 50. Exemples d'évaluation du diamètre de QDs absorbant à 650 nm. A : méthode empirique,<sup>346</sup> B : MET, C : AFM.**

Afin de vérifier la cristallinité des QDs hydrophiles, nous avons pu utiliser deux techniques, à savoir le MET, qui par l'étude de la diffraction des électrons permet de déterminer les paramètres de maille des QDs et la DRX.

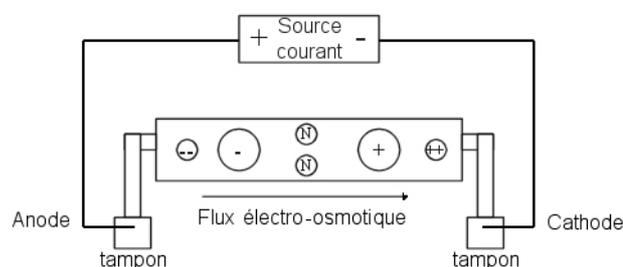
Pour ce qui est de la détermination de la composition élémentaire des QDs, deux méthodes ont été utilisées:

- le MET, qui nous permet de déterminer la répartition des éléments au sein des QDs, et vérifier la liaison entre Cd et Te et la XPS (pour *X-ray Photoelectron Spectrometry*), qui nous permet d'analyser la surface des QDs sur une épaisseur d'une dizaine d'atomes, et donc déterminer si cette surface a été détériorée, notamment par oxydation.

Ces méthodes d'analyse nous permettent une caractérisation globale de l'échantillon étudié (diamètre moyen, structure cristalline, répartition des tailles, composition chimique...). Cependant, ces techniques sont coûteuses en moyens et/ou en produit, longues à mettre en place, et parfois des problèmes dans la préparation des échantillons à analyser aboutissent à des résultats erronés voire inexploitable. Il a donc été nécessaire de trouver une technique rapide, simple à mettre en œuvre et fiable permettant un contrôle immédiat de la qualité de polydispersité des échantillons de QDs : l'électrophorèse capillaire de zone (ECZ).

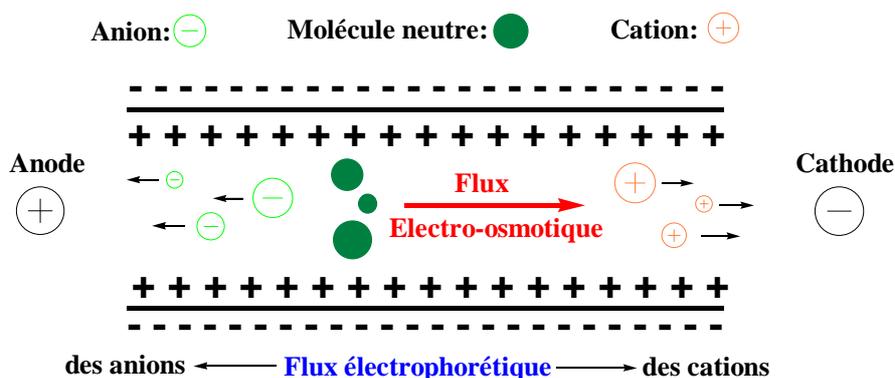
### III.4.5 Electrophorèse capillaire de zone

#### III.4.5.1 Principe



**Figure 51. Schéma de principe de composition d'une électrophorèse capillaire de zone.**

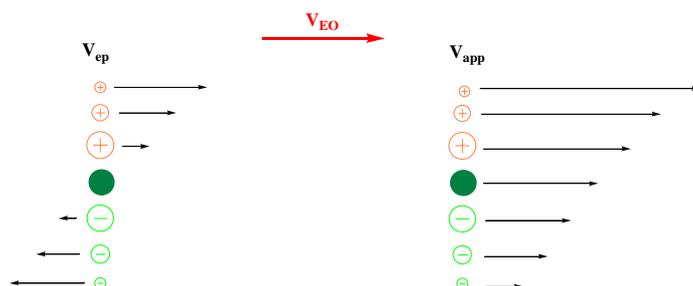
L'ECZ est une méthode basée sur la séparation de particules chargées en fonction de leur taille et de leur charge au sein d'un capillaire de silice soumis à un champ électrique (Figure 51). La migration dépend de deux facteurs: le flux électro-osmotique ( $V_{eo}$ ) et le flux électrophorétique ( $V_{ep}$ ). En pratique, un tampon basique est présent dans le capillaire, ce qui engendre une ionisation de la silice. Cette ionisation induit à son tour la formation d'une couche de cation à l'interface éluant/capillaire, et c'est là que va naître l'électro-osmose (migration de l'ensemble de l'éluant vers la cathode due à cette couche cationique). S'ajoute à ce phénomène la migration classique des ions soumis à un champ électrique (anions vers anode et cations vers cathode): c'est le flux électrophorétique (Figure 52).



**Figure 52. Principe de séparation de particules chargées par ECZ.**

Au final, la mobilité apparente des ions ( $V_{app}$ ) va être la résultante de ces deux flux ( $V_{app} = V_{ep} + V_{eo}$ ), sachant que  $V_{eo}$  est constant et que  $V_{ep}$  va dépendre de la taille ( $m$ ) et de la charge ( $z$ ) de l'ion ( $V_{ep} = f(z/m) = f(1/r)$ ,  $r = \text{rayon de l'ion}$ ). Cette technique est par conséquent utilisable uniquement pour l'analyse de QDs chargés, donc hydrophiles tel que CdTe@TGA.

L'ordre d'élution sera alors équivalent à  $V_{app}$  (Figure 53), et la détection faite à la cathode par mesure d'absorption ou de fluorescence. Dans le cadre de cette étude, on s'intéressera à l'ordre d'élution des anions. En effet, ce travail a été réalisé sur CdTe@TGA qui est anionique pour un  $\text{pH} > 2-3$ .



**Figure 53. Ordre d'élution des particules en fonction de leur charge et de leur taille.**

#### III.4.5.2 Résultats

Cette technique nous a permis d'identifier les différentes populations de QDs type CdTe@TGA, et donc d'étudier la répartition des tailles en fin de synthèse (large si la plage des temps de migration l'est aussi) et la qualité d'un échantillon purifié (un pic unique sur l'électrophorégramme figure une seule population de QDs). Ces résultats sont plus amplement décrits dans la publication qui suit : « Optimization of CdTe Quantum Dots Synthesis Using Capillary Zone Electrophoresis », Clarot, I. ; Wolpert, C. ; Morosini, V. ; Schneider, R. ; Balan, L. ; Diez, L. ; Leroy, P. ; **Current Nanoscience**, 2009, 5, 154-159.

## **IV. Conclusions**

L'utilisation de QDs comme nouvelle classe de PS pour une application en PDT nécessite l'élaboration de protocoles de synthèses permettant d'obtenir des nanoparticules hydrophiles, stables, fonctionnalisables et dont les propriétés d'absorption et d'émission de fluorescence sont situées dans le rouge/proche infrarouge. Les approches étudiées font état soit d'une synthèse en milieu organique suivie d'un processus d'échange de ligand afin de rendre les QDs hydrophiles, soit d'une synthèse en milieu aqueux qui permet l'obtention directe de QDs hydrophiles. Les protocoles de synthèse qui nous ont permis de répondre au cahier des charges établis nous ont été réalisés par voie hydrothermale et nous ont permis d'obtenir des QDs de type CdTe(S) dont les propriétés d'absorption et d'émission de fluorescence sont situées dans le rouge et proche infrarouge. Ces méthodes présentent de nombreux avantages par rapport aux synthèses organiques et hydrophiles standards, comme l'obtention de QDs directement hydrophiles, ce qui permet d'éviter une étape d'échange de ligand qui a tendance à dégrader le QD et ainsi dénaturer ses propriétés photophysiques initiales; et le mode de chauffage alternatif qui permet à la fois d'augmenter la cinétique de croissance des QDs et de modifier leur structure afin d'obtenir les propriétés spectrales désirées. Les QDs ainsi préparés présentent un pic excitonique situé entre 655 et 665 nm afin de correspondre aux conditions optimales en clinique (bonne pénétration de la lumière dans les tissus). Dans le cadre d'une amélioration de la PDT anticancéreuse, l'étude de leur fonctionnalisation par une molécule d'adressage comme l'acide folique (AF), ainsi que de l'efficacité de cet adressage et de l'activité photodynamique de ces structures est abordée et est décrite dans le chapitre VI.

Nous avons également optimisé l'application de l'électrophorèse capillaire de zone à la caractérisation de ces QDs CdTe(S)@ATG. Cette méthode rapide, facile à mettre en œuvre, peu coûteuse en moyen et en produit, nous a permis de caractériser l'homogénéité des échantillons de QDs issus des phases de purification par précipitation sélective. En effet, la mobilité électrophorétique ( $\mu_{ep}$ ) d'un QD est fonction de sa taille, et chaque population homogène en taille de QD aura donc la même  $\mu_{ep}$ . Ainsi, après identification des différentes populations de QDs contenues dans un mélange réactionnel polydisperse, il est alors possible d'identifier et d'évaluer la dispersité en taille de chaque fraction issue des étapes de précipitations sélectives, et donc l'efficacité des étapes de purification.

## **V. Matériels et méthodes**

La synthèse, ainsi que la purification et la caractérisation de Qds hydrophiles de types CdTe sont décrites au chapitre VI, dans l'article "Quantum Dot-folic acid conjugates as potential photosensitizers in photodynamic therapy of cancer", Morosini, V. ; Bastogne, T. ; Frochot, C. ; Schneider, R. ; François, A. ; Clarot, I. ; Guillemin, F. ; Barberi-Heyob, M., soumis au **Journal of Medicinal Chemistry**.

La caractérisation par ECZ des QDs hydrophiles de type CdTe est décrite dans l'article qui suit : "Optimization of CDTE Quantum Dots Synthesis Using Capillary Zone Electrophoresis", Clarot, I. ; Wolpert, C. ; Morosini, V. ; Schneider, R. ; Balan, L. ; Diez, L. ; Leroy, P. ; **Current Nanoscience**, 2009, 5, 154-159.

## **VI. Optimization of CDTE Quantum Dots Synthesis Using Capillary Zone Electrophoresis**

Clarot, I. ; Wolpert, C. ; Morosini, V. ; Schneider, R. ; Balan, L. ; Diez, L. ; Leroy, P.

**Current Nanoscience**, 2009, 5, 154-159.

Les synthèses permettant d'aboutir à l'obtention de QDs adaptés à la fenêtre thérapeutique de la PDT nécessitent des phases de purification/précipitation afin d'obtenir des échantillons homogènes en taille. Ces méthodes font appel à l'appréhension subjective du manipulateur dans la gestion des précipitations sélectives. Il a donc été nécessaire de développer une méthode de caractérisation rapide, simple à mettre en place, robuste et efficace afin d'évaluer la qualité des échantillons de QDs obtenus après purification. Notre choix s'est arrêté sur l'électrophorèse capillaire de zone (ECZ), méthode basée sur la séparation différentielle des solutés en fonction de leur masse et de leur taille.

La synthèse et les caractérisations des QDs employés pour ces tests sont décrits dans l'article qui suit, ainsi que les protocoles utilisés lors des ECZ. Les résultats obtenus montrent une bonne répétabilité et robustesse de cette caractérisation, ainsi qu'une bonne corrélation entre la taille des QDs et leur temps de migration.

Il nous a ainsi été permis d'identifier les échantillons homogènes en taille ainsi que l'efficacité du processus de précipitation sélective sur la séparation des QDs obtenus.

## Optimization of CDTE Quantum Dots Synthesis Using Capillary Zone Electrophoresis

Igor Clarot<sup>1,2,\*</sup>, Cécile Wolpert<sup>3</sup>, Vincent Morosini<sup>4</sup>, Raphaël Schneider<sup>4</sup>, Lavinia Balan<sup>5</sup>, Laurent Diez<sup>1,3</sup> and Pierre Leroy<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Chimie Analytique et Bioanalyse du Médicament, Nancy University, Faculté de Pharmacie, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France

<sup>2</sup>Groupe d'étude des Vecteurs Supramoléculaires du Médicament (actual address), UMR CNRS 7565, Nancy University, Faculté de Pharmacie

<sup>3</sup>Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, CNRS, Nancy University, Faculté de Pharmacie

<sup>4</sup>DCPR, Département de Chimie Physique de Réactions, Nancy University, CNRS, 1 rue Grandville, BP 20451, F-54001 Nancy, France

<sup>5</sup>Département de Photochimie Générale, UMR CNRS 7525, Université de Haute-Alsace, ENSCMu, 3 rue Alfred Werner, 68093 Mulhouse Cedex, France

**Abstract:** Water-soluble, thiol protected cadmium telluride CdTe quantum dots (QDs) exhibit size dependent excitation/emission wavelength tunability. The heating period ensuring the growth of CdTe nanocrystals capped with thioglycolic acid (CdTe@TGA) in aqueous solution is critical to reach a required/desirable diameter. Thus, reaction medium was monitored using a capillary zone electrophoresis (CZE) technique in order to select an appropriate heating time. QDs migrate as anionic species in a borate buffer pH 8.5 used as background electrolyte and they were separated according to their size (larger ones have shorter migration times), as confirmed by measuring their maximum wavelength of absorption, with on-line diode array detection. A relationship between electrophoretic mobilities and  $\lambda_{\max}$  was tentatively proposed. Efficiency of the purification process of crude QDs using multiple step alcohol precipitation was also confirmed with the developed CZE technique.

**Keywords:** quantum dots, synthesis, size-selective precipitation, capillary zone electrophoresis, diode array detection, size-dependent migration.

### INTRODUCTION

Quantum dots (QDs) are semiconducting nanocrystals that have attracted widespread attention owing to their distinct optical and electronic properties that can be tuned by the quantum size effect and surface chemistry [1-2]. The spectral advantages of QDs are apparent, narrow and symmetrical photoluminescence (PL), a broad and intense absorption band, and tunable emission peak positions. With stronger emissions and longer lifetimes than organic dyes, QDs offer great potential for light-emitting device (LED) display applications [3], photovoltaic uses [4-6] or in the field of biomedical imaging [7-8].

The conventional methods applied to characterize the size distribution of solution-grown nanoparticles (NPs) are either transmission electron microscopy (TEM) or atomic force microscopy (AFM). However, these techniques do not involve any separation process and no size- or shape dependent properties can be determined, and they are not convenient for numerous samples. Light-scattering is frequently used for the size measurement of NPs but it presents some limitation in the very low nanometric range.

Thus, there is a need for the development of separative methods devoted to QDs characterization as a function of their size and capping components and also to the studies of their interaction with the expected biological target. Size-exclusion liquid chromatography can be useful at a preparative scale [9], however it does not offer enough selectivity to separate QDs in a narrow size range. Magnetic field-flow fractionation can only be applied to NPs with corresponding properties [10]. A review has presented different applications of capillary electrophoresis (CE) separation of polymeric,

inorganic, microbial, and sub-cellular particles [11]. Very recently, a review has highlighted the use of nanomaterials in capillary and microchip electrophoresis [12], with the new developments in that field concerning both use of NPs as a tool to enhance separations, and separation and characterization of target NPs with different sizes. Among the different techniques applied in CE, capillary zone electrophoresis (CZE) seems the most attractive to separate NPs as a function of their size and apparent charge. CZE has been applied to investigate the electrophoretic behaviour and separation of sulfated polystyrene latex microspheres [13], iron oxide [14], gold [15], silver [16], and Au/Ag core/shell NPs [17]. In those different studies applied to a wide range of diameters (between 5 and 380 nm), a good linear relationship was observed between the electrophoretic mobility and the NP diameter. In the silver NPs separation [16], combining CE and diode array detection (DAD) was found to be a powerful tool for their characterization. QDs can also be designed to fit with the highly sensitive laser induced fluorescence (LIF) detection coupled with CZE. For example, CE-LIF was applied to the separation and detection of CdTe QDs (size range: 1-10 nm) capped with 3-mercaptopropionic as stabilizer, and their BSA and horseradish peroxidase conjugates [18]. Capillary gel (CGE) has also been demonstrated its usefulness for CdTe QDs separation [19] and capillary electrophoresis immunoassay was applied to QDs conjugated with antibodies (Ab) to separate free Ab from Ab-Ag complex [20].

CdTe QDs capped with thioglycolic acid (CdTe@TGA) (Fig. (1)) have a pivotal role for further linkage with biomolecules selected for their specific interaction with cells. The aim of the present work is to develop a CZE method devoted to the control of CdTe@TGA QDs size distribution in relationship with critical operating conditions of their synthesis influencing their sizes and consequently their optical properties.

\*Address correspondence to this author at the Groupe d'étude des Vecteurs Supramoléculaires du Médicament, CNRS, Nancy-University, Faculté de Pharmacie, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France; Tel: +33 3 83 68 23 40; E-mail: igor.clarot@pharma.uhp-nancy.fr.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

Tellurium powder (99.997 %), cadmium perchlorate hydrate (99.999 %), sodium borohydride (99 %) and thioglycolic acid (TGA) (>99 %) were purchased from Sigma Aldrich Fine Chemicals and used as received. Isopropyl alcohol (*i*-PrOH) was purchased from Carlo Erba. Milli-Q water (Millipore) was used as a solvent.

### Instrumentation

All the optical measurements were performed at room temperature ( $20 \pm 2$  °C) under ambient conditions. Absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer (Lambda 2, Courtaboeuf, France) UV-visible spectrophotometer. Fluorescence spectra were recorded on a Fluorolog-3 spectrofluorimeter F222 (Jobin Yvon, Longjumeau, France) equipped with a thermostated cell compartment (25 °C), using a 450 W Xenon lamp. The quantum yield (QY) values were determined by equation 1.

$$QY(\text{sample}) = (F_{\text{sample}}/F_{\text{ref}})(A_{\text{ref}}/A_{\text{sample}})(n_{\text{sample}}^2/n_{\text{ref}}^2)QY_{\text{(ref)}} \quad \text{Eq. 1}$$

where *F*, *A* and *n* are the measured fluorescence (area under the emission peak), the absorbance at the excitation wavelength, and the refractive index of the solvent, respectively. The room-temperature quantum yield of CdTe nanocrystals was estimated by comparison with Rhodamine 6G (laser grade) in ethanol assuming its photoluminescence PL as 95 % [21].

To determine the morphology of the nanoparticles, the samples were analyzed *ex situ* by Atomic Force Microscopy (AFM). Characterization was carried out using a PicoPlus from molecular imaging microscope. AFM measurements were done by tapping mode using a Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> tip with resonance frequency and spring constant being 100 kHz and 0.6 N.m<sup>-1</sup>, respectively to provide surface topography.

The diameters of CdTe nanocrystals were determined by measuring their optical absorption spectra, as their molar absorbance are known from the literature [22], and further confirmed by AFM. The full-width-at-half-maximum (fwhm), which is an indication of the size distribution of QDs in the ensemble, was determined from the first exciton peak assuming a Gaussian peak shape.

The CE apparatus was a P/ACE Beckman 5500 model (Beckman Coulter, Villepinte, France). Separations of QDs were realized using an untreated fused-silica capillary of 75 μm I.D. and of 37 cm total length (*L*) (effective length (*l*): 30 cm). The background electrolyte (BGE) was a borate 25 mM buffer pH 8.5. The capillary temperature was 25 °C, and applied voltage 12 kV. When necessary, samples from reaction medium were diluted in ultrapure water (10-fold) and they were injected onto the capillary in a hydrodynamic mode (pressure: 20 mBar; injection time: 10 s). Either an UV-filter detector (214 nm) or a diode array detector (200 – 600 nm) was presently used. Before each injection, the capillary was successively rinsed with 1 M sodium hydroxide (3 min), ultrapure water (3 min) and BGE (5 min). The electroosmotic flow (EOF) was determined using benzylic alcohol injection (migration time:  $2.09 \pm 0.03$  min,  $\mu\text{EOF} = 7.4 \pm 0.1 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (*n* = 3)).

### Preparation and Purification of Thioglycolic Coated CdTe nanocrystals

#### Preparation of Sodium Hydrogen Telluride NaHTe

In a Schlenk tube sealed with septa and valves, 10 mL water were deaerated under a nitrogen flow for 1 h. Next, NaBH<sub>4</sub> (500 mg, 13.26 mmol) was added to water cooled at 0 °C and the resulting suspension was stirred under nitrogen until NaBH<sub>4</sub> was completely dissolved. Metallic Te powder (640 mg, 5 mmol) was then added. During the reaction, a small outlet connected to the tube was

kept open to discharge the pressure from the hydrogen formed. After approximately 8 h, the black tellurium powder disappeared and sodium tetraborate white precipitation appeared on the bottom of the flask instead. The resulting pink NaHTe solution can be stored for a few days at 0 °C in the dark.

#### Synthesis of thioglycolic acid coated CdTe QDs (CdTe@TGA)

In a four-necked flask (250 mL) equipped with a reflux condenser, septa and valves, Cd(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O (2.35 mL of a 1 M solution) and TGA (0.40 mL) were added to 125 mL ultrapure water and the solution was adjusted to pH 11.2 with aqueous NaOH (1 M). The mixture was stirred under nitrogen for 1 h. Then, 0.50 mL of the NaHTe solution was added under nitrogen. The mixture of the precursors turned from colorless to orange and was then refluxed (5 h) to ensure the growth of CdTe nanocrystals. Aliquots (1 mL) were withdrawn at different interval periods to monitor the progress of the reaction.

#### CdTe@TGA QDs Purification

After cooling to room temperature, thioglycolic acid coated CdTe nanocrystals (CdTe@TGA) were isolated from non-reacted precursors by precipitation using an anti solvent, *i*-PrOH, to narrow the particle size distribution (slow addition of *i*-PrOH until the solution became turbid followed by centrifugation, 3000 rpm, 15 min). The precipitated nanocrystal fractions were collected and dried *in vacuo* at room temperature. CdTe@TGA QDs can be kept dry during a long period of time as water-soluble powders.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Synthesis and Optical Properties of QDs

Small thioalkyl acids like TGA and mercaptopropionic acid (MPA) are the most commonly used ligands for the preparation of CdSe and CdTe QDs in aqueous solution [23-28]. Indeed, reaction between Cd<sup>2+</sup> and TGA or MPA to form soluble monothio- or dithiocomplexes is immediate at pH > 7. Once the QDs formed, a secondary coordination between the carbonyl O atom and the Cd atom at the particle surface exists, which in return provides better surface passivation and consequently higher PL efficiency [27-30]. TGA and MPA at the surface of CdSe or CdTe QDs also decompose during the growth stage leading to the incorporation of sulfur into the NP [31]. TGA can also produce sulfide ions by photodegradation [32,33]. Mixed CdTe(S) or CdSe(S) QDs with some gradient of sulfur distribution from inside the nanocrystals to the surface and enhanced PL QY are thus obtained [31,33].

CdTe QDs were prepared by adding an oxygen-free NaHTe solution to a nitrogen-saturated Cd(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-TGA acid aqueous solution at pH = 11.2. The precursor ratio of Cd(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>/NaHTe/TGA was in all experiments fixed at 2/1/4.8 having in mind the possibility of obtaining CdTe analogues of Cd<sub>17</sub>S<sub>4</sub>(SR)<sub>26</sub> and C<sub>32</sub>S<sub>14</sub>(SR)<sub>36</sub> (R = Alkyl) [34].

After the freshly prepared NaHTe solution was injected into the Cd<sup>2+</sup>-thioalkyl acid monomer, the resulting yellow mixture was subjected to refluxing to grow the CdTe nanocrystals. The temporal evolution of the optical properties was monitored by UV-vis spectroscopy (Fig. (2)).

After 6 h heating at 100°C, CdTe@TGA nanocrystals with the excitonic peak at 554 nm were obtained. After cooling to room temperature CdTe@TGA QDs were isolated from non-reacted precursors by precipitation using an anti solvent, *i*-PrOH, to narrow the particle size distribution. Five fractions were isolated and the mean diameters of each fraction were determined by Atomic Force Microscopy (AFM) (Fig. (3)).

CdTe@TGA QDs span a range in size from 3.2 nm (fraction 2) to 2.5 nm (fraction 5) with emission wavelengths from 537 to 582 nm. PL QYs of the CdTe@TGA nanocrystals, measured using

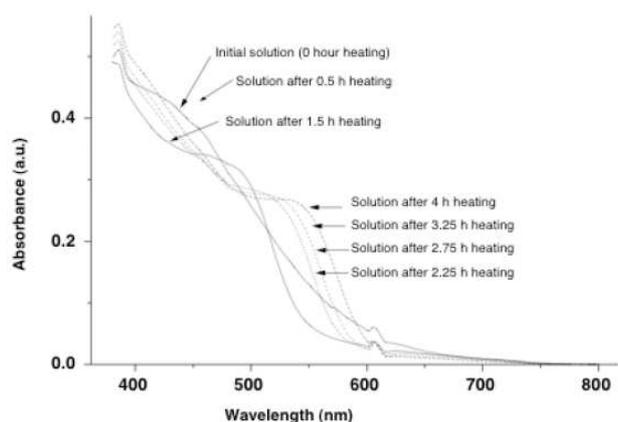


Fig. (2). Growth of TGA-stabilized CdTe QDs monitored by UV-vis absorption spectroscopy during 5 h at 100°C.

Rhodamine 6G as reference, were respectively of 20, 18, 16 and 15 % for emission peaks at 535, 554, 570 and 580 nm (fraction 1 was discarded due to its weak fluorescence properties, QY < 1%) (Fig. (4)).

When QDs diameter increases, their excitation and emission wavelengths shift toward longer wavelengths. The heating period used for QDs synthesis appears to be critical to obtain an appropriate size corresponding to fluorescence properties required for cell imaging. For that purpose, two main factors have to be considered: excitation (i) in the visible range, which is necessary to avoid any autofluorescence of cells, (ii) with the laser argon (emission wavelength = 488 nm), which seems useful because many techniques (e.g. confocal microscopy, flow cytometry, CE) include this excitation source.

An empirical relationship between the CdTe QD diameter (D) and  $\lambda_{max}$  (nm) has been previously established in the wavelength range from 550 to 750 nm, corresponding to QDs diameter from 4 to 9 nm [22]:

$$D = (9.8127 \times 10^{-7}) \lambda_{max}^3 - (1.7147 \times 10^{-3}) \lambda_{max}^2 + (1.0064) \lambda_{max} - (194.84) \tag{Eq. 2}$$

Diameter and molar absorbance of CdTe@TGA QDs were calculated according to Yu *et al.* [22], even if the excitonic peak values obtained for the 4 samples after size-selective precipitation (respectively 553, 536, 526 and 506 nm for fractions 2 to 5) were in the lowest range of those used for establishing the theoretical equation 2. The diameters determined using AFM heights are in good agreement with those calculated from the absorption spectra. The fwhm, which is related to the particle size distribution and samples

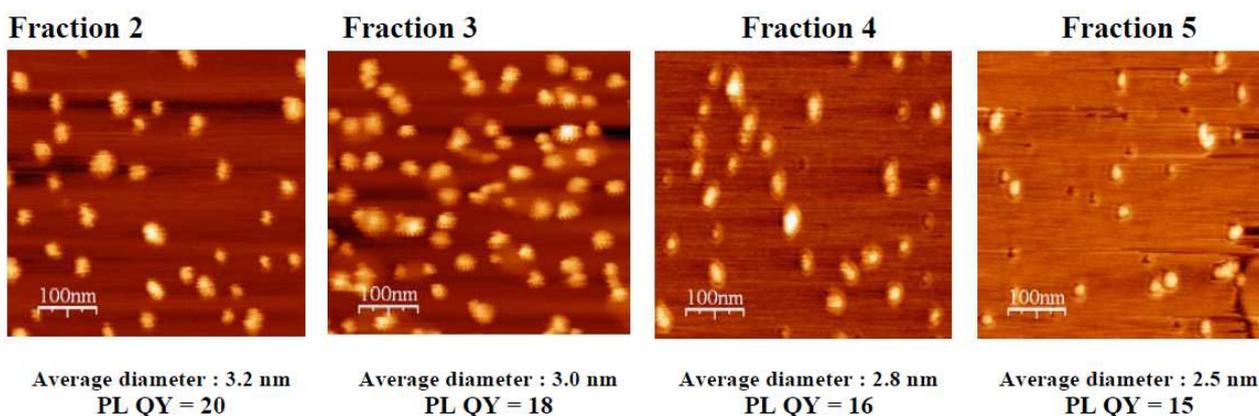


Fig. (3). AFM images of the different fractions of CdTe@TGA QDs obtained after size selective precipitation and the corresponding PL QYs. The NP diameters were determined using AFM heights.

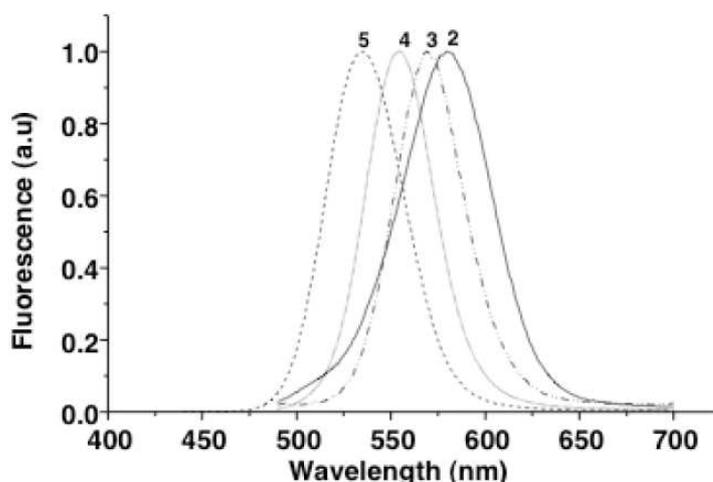
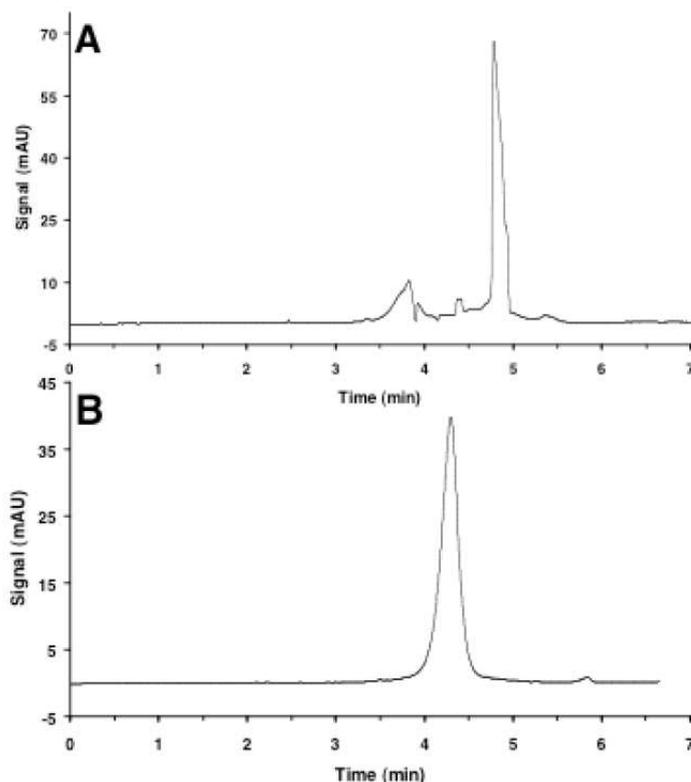


Fig. (4). Normalized PL spectra of the different fractions (from 2 to 5) of CdTe@TGA QDs obtained after size-selective precipitation. PL spectra were recorded with an excitation at 400 nm.



**Fig. (5).** Typical electrophoregrams of QDs CdTe@TGA: (A) crude product; (B): purified fraction corresponding to the fifth *i*-PrOH precipitation.

monodispersity, was calculated from the emission spectrum of each fraction. An fwhm value  $\leq 40$  nm represents a narrow size distribution [35,36]. The fwhms were found to be 41, 58, 42 and 47 nm respectively for fractions 2 to 5 of TGA-capped CdTe QDs and show that quite monodisperse nanoparticles could be obtained by size-selective precipitation.

#### CZE Separation of QDs

Different sized particles display specific mobilities in a capillary in the presence of an applied voltage, which results from their different charge-to-diameter ratios. In the present CZE system, the tested QDs are anionic species (BGE is buffered at a pH value higher than the pKa value of the carboxylic group of TGA equal to 3.67), as observed by their migration times higher than the EOF marker.

No aggregation process seems to occur as demonstrated by diluting several times the crude product in the BGE and observing no variation in migration times. Moreover, QDs and internal capillary surface have both negative charges, limiting attractive adhesion and a conventional washing process between each sample injection leads to reproducible electrophoregrams.

Considering QDs as homogeneous spheres with uniform capping by the ligand TGA, their mobility  $\mu_{ep}$  appears related to their diameter  $D$ , as follows:

$$\mu_{ep} (\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}) = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{L \times l}{V \times t_m} = \frac{k}{D} \quad \text{Eq. 3}$$

With  $\mu_{ep}$  the QD electrophoretic mobility,  $v_{ep}$  its electrophoretic speed,  $E$  the electric field,  $L$  and  $l$  the total and the effective capillary length respectively,  $V$  the work voltage,  $t_m$  the QD migration

time,  $D$  the QD diameter and  $k$  the constant for the QD family under study.

As described by equation 3, QDs with higher diameters migrate faster, which is confirmed by analysing different samples resulting from multiple precipitation of the crude synthetic product. Indeed, an increase of  $\mu_{ep}$  value of the main peak was observed through the successive alcohol precipitation steps, which select QDs with decreasing sizes. A decrease of QDs size distribution range through purification process was also noted; even to obtain a single peak in some fractions (Fig. (5)). Thus, the efficiency of the purification process was demonstrated through CZE monitoring.

A parameter which greatly influenced the QDs size is the heating period during the second step of their synthesis. Its real effect was studied using CZE. For the different heating times,  $\lambda_{max}$  of the resulting QD mixture was determined by UV-visible spectrophotometry and CZE-DAD (major peak) (Fig. (6)).

Both approaches give close curves as a function of heating time (Fig. (7A)).  $\lambda_{max}$  values reach a quasi plateau at ca. 3 h, indicating a small influence of heating time on the QDs size. The electrophoregram corresponding to each heating time exhibits 3 or 4 peaks with  $\mu_{ep}$  correlated to  $\lambda_{max}$  (Fig. (7B)). The same proportional tendency was observed for the different heating times. In previous studies [15,17], a good linear relationship was observed between the electrophoretic mobility and the NPs diameter.

Additional experiments are needed to establish an accurate relationship between  $\mu_{ep}$  and diameter of QDs presently studied. The differences observed in electrophoretic mobilities between the different samples from the same batch reaction but at different heating periods could be explained with various surface charges of QDs. It is known that the surface stabilizer of the QDs, presently TGA, plays a decisive role in determining the surface charge according to

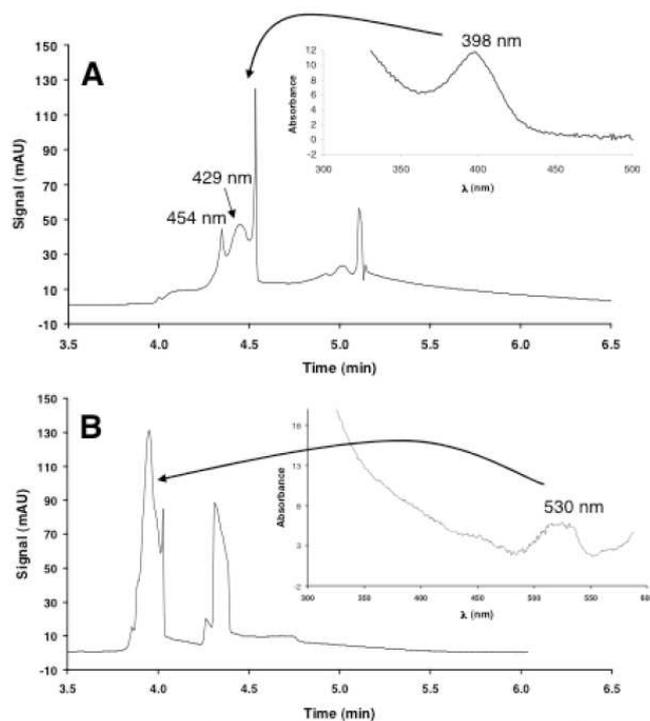


Fig. (6). Typical electrophoregrams of QDs CdTe@TGA corresponding to crude product after 15-min (A) and 730-min (B) heating periods (inserts correspond to UV-vis spectrum of the major peak, obtained with the DAD).

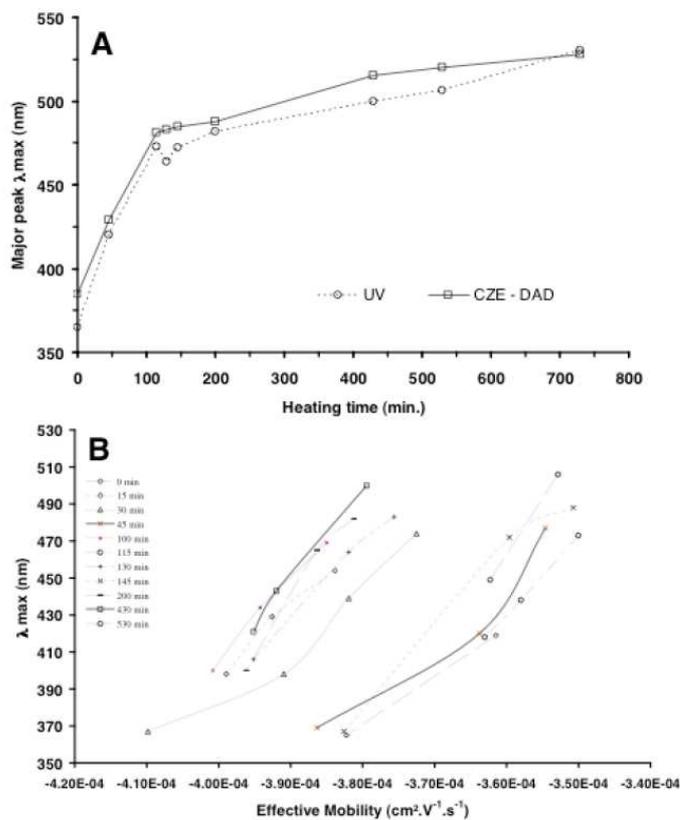


Fig. (7). Relationship between (A) maximum wavelength ( $\lambda_{max}$ ) obtained for the crude product with UV spectrophotometry (x) or with CZE-DAD for the major peak (o), and heating time; (B) between  $\lambda_{max}$  and effective electrophoretic mobility ( $\mu_{ep}$ ).

its capping yield and to the pH value of the BGE which influences the dissociation of the carboxyl group of TGA. Other factors such as binding of metal cations to the surface of the QDs could also affect their surface charge.

## CONCLUSION

CZE equipped with an on-line DAD detector appears to be an efficient analytical tool to monitor the size- and/or species-dependent properties of QDs, even in the very low nanometric range. A relationship between electrophoretic mobilities and  $\lambda_{\max}$  was observed permitting to adapt different parameters of their synthesis to obtain required diameter and luminescent properties for their biological application. Efficiency of the purification process of crude QDs using multiple step alcohol precipitation was also confirmed with the developed CZE technique. Further applications of CZE will be realized using laser induced fluorescence to detect QDs in biological matrices.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Olivier Soppera (UMR CNRS 7525, Mulhouse) for acquiring the AFM images and Professor Alain Nicolas, head of the Laboratoire de Chimie Analytique et Bioanalyse du Médicament (Nancy University, Faculté de Pharmacie, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France) for providing capillary electrophoresis facilities.

## REFERENCES

- [1] Jun, Y. W.; Jung, Y.Y.; Cheon, J. Architectural control of magnetic semiconductor nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 615-619.
- [2] Lifshitz, E.; Bashouti, M.; Kloper, V.; Kigel, A.; Eisen, M.S.; Berger, S. Synthesis and characterization of PbSe quantum wires, multipods, quantum rods, and cubes. *NanoLett.* 2003, 3, 857-862.
- [3] Coe, S.; Woo, W.-K.; Bawendi, M.; Bulovic, V. Electroluminescence from single monolayers of nanocrystals in molecular organic devices. *Nature* 2002, 420, 800-803.
- [4] Han, L.; Qin, D.; Jiang, X.; Liu, Y.; Wang, L.; Chen, J.; Cao, Y. Synthesis of high quality zinc-blende CdSe nanocrystals and their application in hybrid solar cells. *Nanotechnology* 2006, 17, 4736-4742.
- [5] Wei, G.; Forrest, S.R. Intermediate-band solar cells employing quantum dots embedded in an energy fence barrier. *NanoLett.* 2007, 7, 218-222.
- [6] McDonald, S.A.; Konstantatos, G.; Zhang, S.; Cyr, P.W.; Klem, E.J.D.; Levina, L.; Sargent, E.H. Solution-processed PbS quantum dot infrared photodetectors and photovoltaics. *Nat. Mater.* 2005, 4, 138-142.
- [7] Gao, X.; Cui, Y.; Levenson, R.M.; Chung, L.W.K.; Nie, S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 2004, 22, 969-976.
- [8] Gao, X.; Yang, L.; Petros, J. A.; Marshall, F.F.; Simons, J.W.; Nie, S. In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005, 16, 63-72.
- [9] Tortiglione, C.; Quarta, A.; Tino, A.; Manna, L.; Cingolani, R.; Pellegrino, T. Synthesis and biological assay of GSH functionalized fluorescent quantum dots for staining *Hydra vulgaris*. *Bioconjugate Chem.*, 2007, 18, 829-835.
- [10] Latham, A.H.; Freitas, R.S.; Schiffer, P.; Williams, M.E. Capillary magnetic field flow fractionation and analysis of magnetic nanoparticles. *Anal. Chem.*, 2005, 77, 5055-5062.
- [11] Rodriguez, M.A.; Armstrong, D.W. Separation and analysis of colloidal/nano-particles including microorganisms by capillary electrophoresis: A fundamental review. *J. Chromatogr. B.* 2004, 800, 7-25.
- [12] Wang, Y.; Ouyang, J.; Baeyens, W.R.G.; Delanghe, J.R. Use of nanomaterials in capillary and microchip electrophoresis. *Exp. Rev. Proteomics*, 2007, 4, 287-298.
- [13] Radko, S.P.; Stastna, M.; Chrambach, A. Capillary zone electrophoresis of sub- $\mu\text{m}$ -sized particles in electrolyte solutions of various ionic strengths: Size-dependent electrophoretic migration and separation efficiency. *Electrophoresis*, 2000, 21, 3583-3592.
- [14] Vanifatova, N.G.; Spivakov, B.Y.; Mattusch, J.; Franck, U.; Wennrich, R. Investigation of iron oxide nanoparticles by capillary zone electrophoresis. *Talanta*, 2005, 66, 605-610.
- [15] Liu, F.K.; Lin, Y.Y.; Wu, C.H. Highly efficient approach for characterizing nanometer-sized gold particles by capillary electrophoresis. *Anal. Chim. Acta*, 2005, 528, 249-254.
- [16] Liu, F.K.; Ko, F.H.; Huang, P.W.; Wu, C.H.; Chu, T.C. Studying the size/shape separation and optical properties of silver nanoparticles by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 2005, 1062, 139-145.
- [17] Liu, F.K.; Tsai, M.H.; Hsu, Y.C.; Chu, T.C. Analytical separation of Au/Ag core/shell nanoparticles by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 2006, 1133, 340-346.
- [18] Huang, X.; Weng, J.; Sang, F.; Song, X.; Cao, C.; Ren, J. Characterization of quantum dot bioconjugates by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescent detection. *J. Chromatogr. A*, 2006, 1113, 251-254.
- [19] Song, X.; Li, L.; Qian, H.; Fang, N.; Ren, J. Highly efficient size separation of CdTe quantum dots by capillary electrophoresis using polymer solution as sieving medium. *Electrophoresis*, 2006, 27, 1341-1346.
- [20] Feng, H.T.; Law, W.S.; Yu, L.J.; Li, S.F.-Y. Immunoassay by capillary electrophoresis with quantum dots. *J. Chromatogr. A*, 2007, 1156, 75-79.
- [21] Kubin, R.F.; Fletcher, A.N. Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes. *J. Lumin.*, 1982, 27, 455-462.
- [22] Yu, W.W.; Qu, L.; Guo, W.; Peng, X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chem. Mater.*, 2003, 15, 2854-2860.
- [23] Rogach, A.L.; Kornowski, A.; Gao, M.; Eychmüller, A.; Weller, H. Synthesis and characterization of a size series of extremely small thiol-stabilized CdSe nanocrystals. *J. Phys. Chem. B*, 1999, 103, 3065-3069.
- [24] Nikoobakht, B.; Burda, C.; Braun, M.; Hun, M.; El-Sayed, M.A. The quenching of CdSe quantum dots photoluminescence by gold nanoparticles in solution. *Photochem. Photobiol.*, 2002, 75, 591-597.
- [25] Zhong, P.; Yu, Y.; Wu, J.; Lai, Y.; Chen, B.; Long, Z.; Liang, C. Preparation and application of functionalized nanoparticles of CdSe capped with 11-mercaptoundecanoic acid as a fluorescence probe. *Talanta*, 2006, 70, 902-906.
- [26] Liu, Y.; Qiu, H.-Y.; Xu, Y.; Wu, D.; Li, M.-J.; Jiang, J.-X.; Lai, G.-Q. Selective synthesis of wurtzite CdSe nanorods and zinc blend CdSe nanocrystals through a convenient solvothermal route. *J. Nanoparticle Res.*, 2007, 9, 745-752.
- [27] Guo, J.; Yang, W.; Wang, C. Systematic study of the photoluminescence dependence of thiol-capped CdTe nanocrystals on the reaction conditions. *J. Phys. Chem. B*, 2005, 109, 17467-17473.
- [28] Aldeek, F.; Balan, L.; Lambert, J.; Schneider, R. The influence of the capping thioalkyl acid on the growth and photoluminescence efficiency of CdTe and CdSe quantum dots. *Nanotechnology* 2008, 19, in press.
- [29] Gao, M. Y.; Kirstein, S.; Möhwald, H.; Rogach, A. L.; Kornowski, A.; Eychmüller, A.; Weller, H. Strongly photoluminescent CdTe nanocrystals by proper surface modification. *J. Phys. Chem. B*, 1998, 102, 8360-8363.
- [30] Zhang, H.; Zhou, Z.; Yang, B.; Gao, M. The influence of carboxyl groups on the photoluminescence of mercaptocarboxylic acid-stabilized CdTe nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, 2003, 107, 8-13.
- [31] Rogach, A. L. Nanocrystalline CdTe and CdTe(S) particles: Wet chemical preparation, size-dependent optical properties and perspectives of optoelectronic applications. *Mater. Sci. Eng. B*, 2000, 69, 435-440.
- [32] Gaponik, N.; Talapin, D.V.; Rogach, A.L.; Hoppe, K.; Shevchenko, E.V.; Kornowski, A.; Eychmüller, A.; Weller, H. Thiol-capping of CdTe nanocrystals: An alternative to organometallic synthetic routes. *J. Phys. Chem. B*, 2002, 106, 7177-7185.
- [33] Bao, H.; Gong, Y.; Li, Z.; Gao, M. Enhancement effect of illumination on the photoluminescence of water-soluble CdTe nanocrystals: Toward highly fluorescent CdTe/CdS core-shell structure. *Chem. Mater.*, 2004, 16, 3853-3859.
- [34] Vossmeier, T.; Reck, G.; Schulz, B.; Katsikas, L.; Weller, H. Double-layer superlattice structure built up of CdS(SCH<sub>3</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>HO clusters. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, 12881-12882.
- [35] Michalet, X.; Pinaud, F.; Lacoste, T.D.; Dahan, M.; Bruchez, M.P.; Alivisatos, A.P.; Weiss, S. Properties of fluorescent semiconductor nanocrystals and their application to biological labeling. *Single Mol.* 2001, 2, 261-276.
- [36] Murray, C.B.; Norris, D.J.; Bawendi, M.G. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 8706-8715.



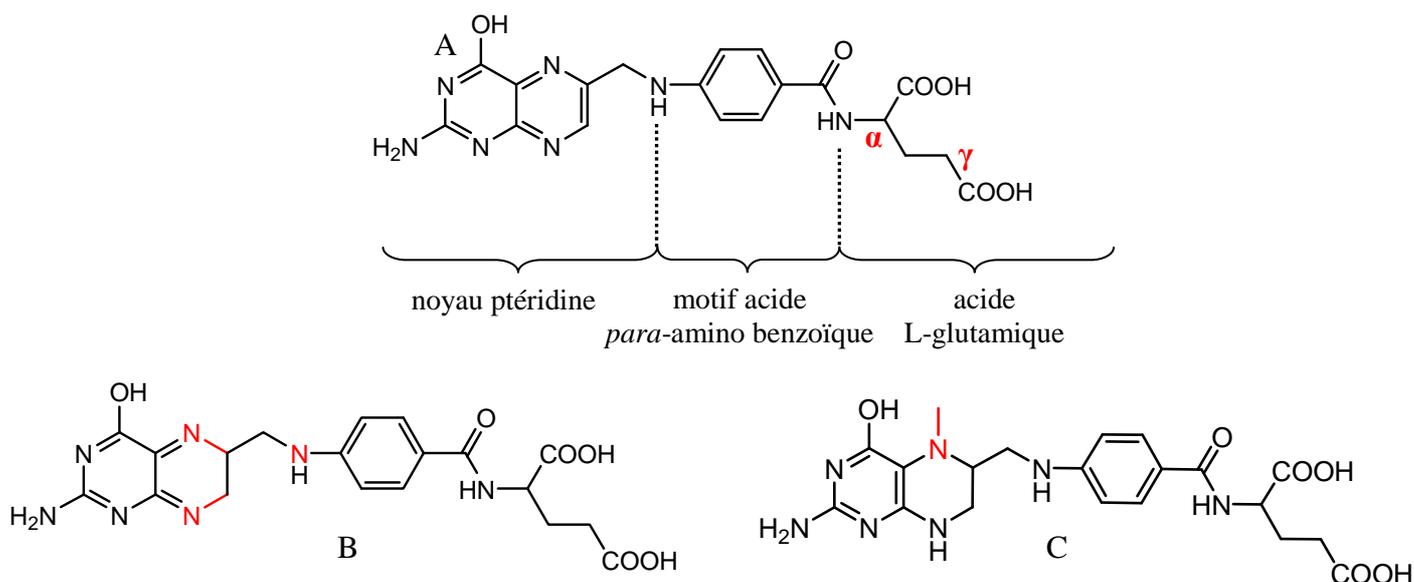
# *L'acide folique*



# Chapitre V : L'acide folique

## I. Généralités

Jusqu'à la fin des années 1920, la communauté médicale ne pensait pas que l'anémie et la carence en folate étaient des maux différents.<sup>380</sup> Il a fallu attendre 1931 et les travaux du docteur Lucy Willis sur l'anémie des femmes enceintes pour le constater. En effet, suite à ses observations, elle postula que cette anémie macrocytaire était due à une carence en un autre facteur nutritionnel que la vitamine B<sub>12</sub>, cas rencontré pour une anémie standard. Pendant plusieurs années, le folate (Figure 54A), ce nutriment alors inconnu, a été identifié comme le "facteur de Wills".<sup>381</sup> La découverte proprement dite du folate remonte à la fin des années 1930, où il a été identifié comme substance prépondérante des levures de bière dans la prévention de cette anémie. C'est en 1941 que le folate a été isolé et extrait pour la première fois par l'équipe de Mitchell à partir de feuilles d'épinards,<sup>382</sup> ce qui lui a valu sa dénomination actuelle (folate vient du latin *follum*, feuille). En 1943, Stockstad réussit à isoler le folate pur sous forme cristalline.<sup>383</sup> Cela ouvrit la voie à la première synthèse en 1945 de l'acide folique, également appelée vitamine B<sub>9</sub> et forme synthétique du folate, à partir d'acide pantothénique et d'acide *para*-amino-benzoïque (Figure 54B).<sup>384</sup> Ces travaux ont permis d'appréhender la synthèse de l'aminoptérine antifolate, le premier médicament anticancéreux, dont l'efficacité a été mise en évidence en 1948 par le docteur Sydney Farber.<sup>385</sup> L'apport en vitamine B<sub>9</sub> dans l'alimentation humaine peut se faire aussi bien par les légumes verts (tels qu'épinard, petits pois, asperge, laitue, brocoli...) que par certains fruits (poire), le jaune d'œuf ou encore par les abats. Les besoins en acide folique sont estimés entre 100 et 300 µg/jour chez l'enfant, entre 200 et 400 µg/jour chez l'adulte. L'apport alimentaire quotidien est en général largement suffisant pour couvrir ces besoins. Les réserves, qui ne représentent que 10 à 15 mg, sont surtout présentes sous forme de N<sup>5</sup>-méthyl-tétrahydrofolate (stockage hépatique, Figure 54C)), et sont épuisables en 3 à 4 mois.



**Figure 54. Structure de l'acide folique (A), du tétrahydrofolate (B) et du N5-méthyl-tétrahydrofolate.**

A l'état naturel, l'acide folique se trouve le plus souvent sous forme polyglutamylée, mais sauf cas de carence, les cellules ne peuvent l'intégrer que lorsqu'il est sous la forme d'un monoglutamate. Une telle carence peut entraîner une anémie caractérisée par une augmentation de la taille des globules rouges (appelée anémie macrocytaire) et peut également être à l'origine de malformations du fœtus chez la femme enceinte. Son rôle a notamment été mis en évidence dans la prévention de malformations telles que les fentes labiales ou la spina bifida (défaut de fermeture du tube neural). Ainsi un apport supplémentaire en vitamine B9 est souvent prescrit durant la grossesse.

## **II. Rôle de l'acide folique**

Au niveau biochimique, l'un des rôles principaux de l'acide folique est d'agir en tant que coenzyme, sous sa forme réduite, dans le transfert de groupements méthyles. Sous sa forme oxydée, il est internalisé dans la cellule par endocytose ou potocytose<sup>386</sup> via un récepteur spécifique envers lequel il présente une très forte affinité (FR pour *folate receptor*), avant d'être réduit successivement en dihydrofolate (DHF) par la folate réductase, puis en tétrahydrofolate (THF) par la dihydrofolate réductase. Il joue alors un rôle important dans la réplication de l'ADN, en permettant la transformation de la désoxyuridine monophosphate (dUMP) en désoxythymidine monophosphate (dTMP). Ce rôle explique l'intérêt particulier

porté à l'acide folique en matière de lutte contre le cancer : de nombreuses molécules utilisées en chimiothérapie, comme le méthotrexate ou le perimetrexed, inhibent l'action de la dihydrofolate réductase (ou des folates réductases) interférant avec la réplication cellulaire et limitant la prolifération des cellules tumorales.

### **III. Récepteurs**

Afin d'internaliser la vitamine B9 nécessaire à leur survie et à leur réplication, les cellules possèdent une grande variété de récepteurs que l'on peut répartir en deux groupes principaux : les récepteurs de l'acide folique (RAF)<sup>387</sup> et les récepteurs de sa forme réduite (di- et tétrahydrofolate).<sup>388-389</sup> Ces deux familles de récepteurs se distinguent par leur spécificité et leur répartition.

Les récepteurs des formes réduites sont dits « ubiquitaires », c'est-à-dire qu'ils sont présents sur une grande partie des cellules de l'organisme. Cette propriété en fait des cibles peu attractives car les agents thérapeutiques utilisant cette voie peuvent ainsi se retrouver dans l'ensemble de l'organisme. Il s'agit là d'ailleurs d'un des problèmes majeurs avec les chimiothérapies utilisant des inhibiteurs des folates réductases : se retrouvant répartis dans l'ensemble des tissus, sain ou non, avec une faible prépondérance pour les tissus tumoraux, ils altèrent le fonctionnement des tissus sains et provoquent de nombreux effets secondaires. Cette classe de récepteurs, si elle permet l'internalisation des hydrofolates, ne montre que très peu d'affinité pour l'acide folique.<sup>390-392</sup> Par conséquent, les agents couplés avec l'acide folique ne passeront pas par la voie des folates réduits, laissant présager une meilleure sélectivité envers certaines tumeurs surexprimant la seconde famille de récepteurs, c'est-à-dire ceux de la forme oxydée.

Les récepteurs de la deuxième famille montrent une forte affinité ainsi qu'une bonne sélectivité envers la vitamine B9 sous sa forme oxydée. Il en existe trois isoformes ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) qui remplissent chacune des rôles bien distincts dans l'organisme, et qui ont chacune leur localisation propre. Un gène codant pour une quatrième isoforme ( $\delta$ ) a été identifié, mais à ce jour aucun signe d'expression de celle-ci n'a pu être détecté.<sup>393</sup> Les trois isoformes exprimées montrent une affinité très forte avec l'acide folique, la constante de dissociation ( $K_d$ ) est inférieure à  $10^{-9}$  M.<sup>394</sup>

### **III.1 L'isoforme $\alpha$ (RAF- $\alpha$ )**

Les RAF- $\alpha$  furent découverts pour la première fois dans des extraits placentaires,<sup>395</sup> où ils jouent un rôle important dans le transport de la vitamine B9 du sang de la mère vers l'embryon ou le fœtus en développement. Ils se caractérisent par la présence d'un segment terminal hydrophobe qui sert de signal pour l'adjonction d'une glycoprotéine, la glycosylphosphatidylinositol.<sup>396</sup> Cette protéine, aussi appelée ancre GPI, doit sa dénomination au fait qu'elle joue le rôle d'attache entre le récepteur et la membrane cellulaire.

Le récepteur à l'acide folique  $\alpha$  est la forme la plus exprimée dans l'organisme, relativement à ses deux autres isoformes  $\beta$  et  $\gamma$ . Son expression est limitée aux cellules épithéliales comme celles du plexus choroïde, des tubules proximaux des reins, des trompes de Fallope, de l'utérus, de l'épididyme, des glandes salivaires et bronchiques ou encore les cellules acinaires de la poitrine<sup>397</sup> et les trophoblastes du placenta.<sup>398</sup> Dans les cellules saines, le niveau de l'expression du récepteur à l'acide folique est inversement proportionnel à la concentration cytoplasmique en folate, et par conséquent à la disponibilité du folate dans l'environnement. Il a été démontré que cette régulation ne se faisait pas par une régulation au niveau du gène, mais au niveau de la transcription de l'ARN messenger *via* la concentration cellulaire en homocystéine.<sup>393</sup> Cette régulation est fonction de la concentration cytoplasmique en folate et par l'intermédiaire de l'homocystéine. Le 5-méthyl-THF sert à la transformation de l'homocystéine en méthionine. Si l'homocystéine stimule le facteur de transcription de l'ARNm (*trans-factor*), la méthionine est sans effet. Une augmentation de la concentration en acide folique dans le cytoplasme va conduire à une réduction de la concentration d'homocystéine et par conséquent à une diminution de l'expression du récepteur  $\alpha$ .<sup>393</sup>

Fait particulièrement intéressant dans le cadre des stratégies de ciblage, le RAF- $\alpha$  n'est présent que sur la partie apicale (ou luminale) des cellules endothéliales polarisées. Les seules exceptions notables sont les cellules pigmentaires de la rétine où il est présent sur les membranes baso-latérales.<sup>399</sup> Les récepteurs  $\alpha$  présents à la surface des cellules saines de l'organisme ne sont donc pas ou très peu accessibles à l'acide folique présent dans la circulation sanguine. Par conséquent, cette disposition des récepteurs offre aux cellules saines une certaine protection vis-à-vis des agents thérapeutiques couplés à l'acide folique et injectés par voie intraveineuse. De plus, les RAF- $\alpha$  montrent des capacités d'internalisation active de

la vitamine B9 dans les cellules, ce qui ne semble pas être le cas de l'isoforme  $\beta$  par exemple.<sup>400</sup>

Ces propriétés en font une cible d'adressage intéressante dans la recherche de nouvelles thérapeutiques antitumorales.<sup>79</sup> En effet, cette isoforme est largement surexprimée dans certaines lignées de cellules cancéreuses (ovariennes, cérébrales, cutanées, naso-pharyngées) par rapport à leurs homologues saines,<sup>401</sup> comme le montre la Figure 55. De plus, l'anaplasie des cellules tumorales, c'est-à-dire leur manque d'organisation structurale, fait que les récepteurs  $\alpha$  qu'elles surexpriment sont largement plus accessibles que ceux des cellules saines, puisque distribués de manière plus homogène à leur surface.

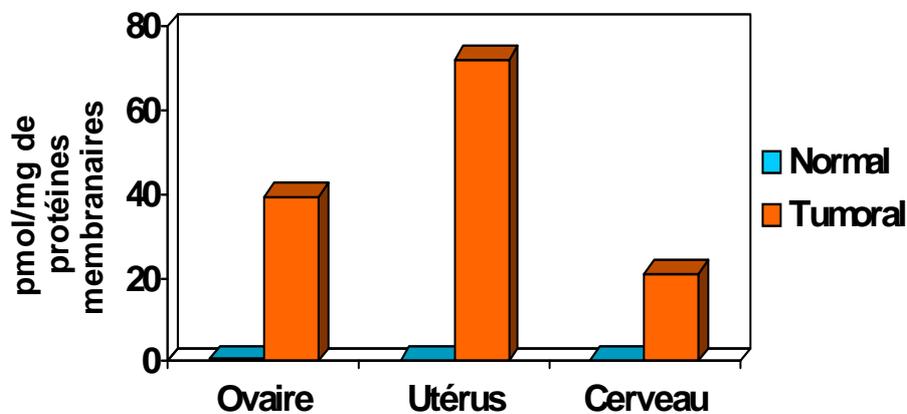


Figure 55. Niveau d'expression du RAF- $\alpha$  pour des tissus ovariens, utérins et cérébraux selon qu'ils soient sains (bleu), ou tumoraux, (orange).<sup>401</sup>

### III.2 L'isoforme $\beta$ (RAF- $\beta$ )

Tout comme l'isoforme  $\alpha$ , le RAF- $\beta$  présente une longue chaîne terminale hydrophobe pour l'adjonction d'une ancre GPI. De manière similaire, on retrouve parfois le FR- $\beta$  sous une forme hydrosoluble. Contrairement à ce qui se passe pour la forme  $\alpha$ , où le récepteur est couplé puis séparé de l'ancrage GPI, les récepteurs  $\beta$  suivent deux voies de synthèse intracellulaires différentes, l'une aboutissant à l'adjonction de la glycoprotéine d'ancrage membranaire, l'autre à la sécrétion sous forme soluble.<sup>401</sup>

Le rôle du récepteur  $\beta$  est encore aujourd'hui mal compris. Il semblerait qu'il offre une certaine protection en cas de déficience en acide folique lors du développement embryonnaire, il est présent comme l'isoforme  $\alpha$  au niveau des tissus placentaires. Son expression chez l'individu adulte se limite essentiellement aux cellules hématopoïétiques. Il y apparaît comme

un marqueur de la différenciation dans la lignée des myélomonocytes et son niveau d'expression augmente durant la maturation des neutrophiles ou l'activation des monocytes et des macrophages. De manière assez surprenante, le RAF- $\beta$  ne semble pas capable d'internaliser l'acide folique dans les cellules où il est exprimé chez l'adulte. En revanche, les myélomonocytes tumoraux ou les monocytes / macrophages activés l'expriment sous une forme visiblement active.<sup>402</sup> Le ciblage de ce récepteur est donc des plus intéressants pour le traitement des leucémies myéloïdes ou de certaines maladies auto-immunes.

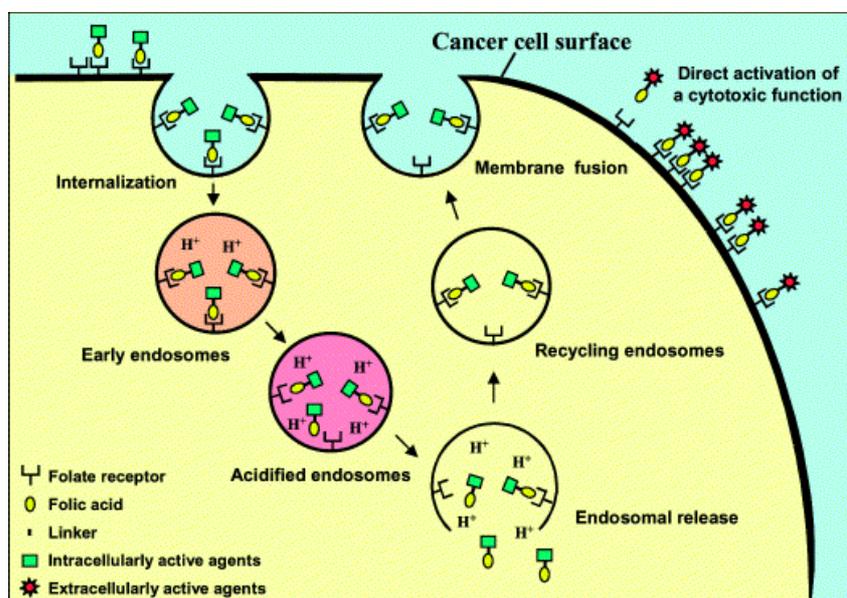
### **III.3 L'isoforme $\gamma/\gamma'$ (RAF- $\gamma$ )**

Les récepteurs à l'acide folique  $\gamma$  se trouvent uniquement sous forme hydrosoluble dans l'organisme.<sup>403</sup> Il semblerait ainsi que le RAF- $\gamma$  joue un rôle important en tant que «transporteur» des folates dans l'organisme. Il peut arriver parfois que ce récepteur soit exprimé de manière tronquée  $\gamma'$ , qui est totalement inactive. A l'instar de l'isoforme  $\beta$ , le RAF- $\gamma$  est essentiellement produit par les cellules hématopoïétiques et leucémiques. Etant donné qu'il n'est normalement pas présent à des niveaux détectables dans le sérum sanguin, ce récepteur peut éventuellement servir de marqueur permettant de détecter une leucémie.<sup>403</sup>

## **IV. Récepteurs à l'acide folique comme cible thérapeutique**

Des études ont montré que le greffage covalent d'une molécule sur le groupement carboxylique  $\gamma$  de l'acide folique ne nuisait pas à sa reconnaissance par les RAF- $\alpha$ .<sup>404</sup> De nombreuses molécules ont été élaborées qui utilisent l'acide folique en tant que molécule de ciblage. Ces stratégies consistent à lier une molécule d'intérêt médical, thérapeutique ou diagnostic, avec l'acide folique par l'intermédiaire d'un « espaceur » (généralement une courte chaîne peptidique, alkyle ou éthylène glycol) afin d'éviter les encombrements stériques. Dans le cas d'une tumeur surexprimant le RAF- $\alpha$ , ces composés bénéficient alors d'une voie d'internalisation qui leur permet d'être incorporés et de manière spécifique dans les cellules malades (Figure 56).<sup>405</sup> Après reconnaissance de la partie acide folique par les récepteurs spécifiques, les molécules thérapeutiques sont internalisées puis acheminées vers le pré-endosome avant d'être relâchées après acidification de la vésicule. Les récepteurs à l'acide folique sont ensuite recyclés vers la surface membranaire. Des agents dont la cytotoxicité s'exerce de manière externe, comme sur la membrane cellulaire, n'auront pas besoin d'être internalisées pour être actifs.<sup>399</sup>

De nombreuses études ont été menées dans l'imagerie médicale ou la chimiothérapie, démontrant la possibilité, sur des temps courts allant de 4 à 6,5 h après injection des composés, d'améliorer la sélectivité et l'incorporation de molécules au sein de la tumeur.



**Figure 56. Illustration de la stratégie de vectorisation par l'acide folique : après reconnaissance de l'acide folique par les récepteurs spécifiques, les molécules thérapeutiques vont être internalisées puis acheminées vers le pré-endosome avant d'être relâchées après acidification de la vésicule. Les récepteurs à l'acide folique sont ensuite recyclés vers la surface membranaire.<sup>399</sup>**

Outre les avantages précités, l'intérêt de ce type de ciblage réside dans le fait que les molécules internalisées par la voie des RAF- $\alpha$  ne sont pas acheminées jusque dans le lysosome des cellules, où elles risqueraient d'être dégradées. En effet, les agents d'adressage classiques, comme les anticorps ou les hormones, sont incorporés puis détruits pour libérer le récepteur.<sup>406</sup> Ce processus normal du fonctionnement biologique permet d'éviter que certains signaux soient constamment activés ou au contraire bloqués, dérégulant l'activité cellulaire. Les produits de couplage à ces agents sont donc acheminés jusqu'au lysosome où ils risquent ensuite d'être dégradés par l'activité enzymatique de la cellule. L'acide folique, au contraire, est internalisé parce qu'il est nécessaire au bon fonctionnement de la cellule. Même si des doutes subsistent quant au mode exact d'internalisation de l'acide folique dans la cellule, à savoir s'il s'agit de potocytose ou d'un autre mécanisme,<sup>407</sup> il est admis qu'il est relâché dans le cytoplasme après avoir été détaché du récepteur par acidification du pré-endosome. Les molécules qui lui sont couplées sont donc elles aussi relâchées dans le cytoplasme, sans risque d'atteinte à leur intégrité par l'activité enzymatique du lysosome.

De plus, l'acide folique n'induit pas de réaction immunitaire. Son couplage à un agent thérapeutique non immunogène n'aboutit donc pas à une structure immunogène. De plus, sa faible taille facilite la mise en œuvre de greffages comparativement à des macromolécules comme les anticorps monoclonaux ou des protéines. Enfin, le faible coût et la large disponibilité de l'acide folique sont là encore des avantages incontestables face à des molécules de ciblage telles que les hormones, les anticorps monoclonaux ou même les peptides.

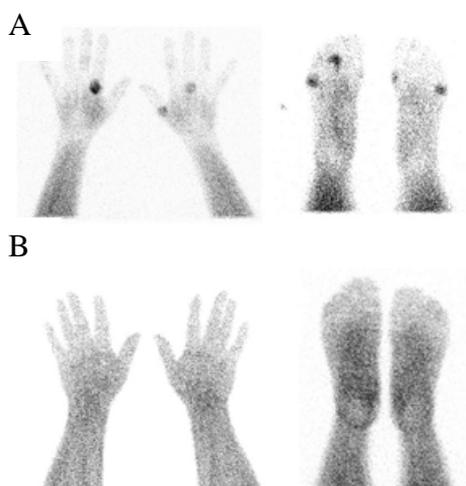
## **V. Méthodes d'imagerie basées sur l'adressage par l'acide folique**

Depuis de nombreuses années, l'acide folique est connu en tant que molécule de ciblage des tumeurs et de nombreuses études ont été menées sur son utilisation. Il existe une grande diversité de stratégies l'employant aussi bien dans l'imagerie médicale, pour le diagnostic et guider les choix thérapeutiques (chirurgie, radiothérapie, ...), que dans la chimiothérapie, pour améliorer la sélectivité des traitements. Des nanocristaux inorganiques, des lipides, des copolymères et des molécules immunogènes ont ainsi été couplés à la vitamine B9. Certaines de ces applications, les plus récentes et/ou les plus pertinentes, sont détaillées dans les paragraphes suivants.

### **V.1 La radio-imagerie**

Dans ce domaine, Xia *et al.* décrivent l'utilisation de différents agents de contraste de radioimagerie adressés par l'acide folique. Leurs travaux portent sur la détection des macrophages activés lors de réactions inflammatoires.<sup>408</sup> En effet, suite à des stimuli inflammatoires, les macrophages passent sous une forme activée afin de pouvoir mobiliser différents mécanismes de protections par la production de médiateurs pro-inflammatoires qui activent les défenses des cellules environnantes et permettent de recruter des cellules de défense immunitaire sur le site d'inflammation.<sup>409-410</sup> Des travaux sur l'arthrite rhumatoïde montrent que ces macrophages, une fois activés, vont surexprimer le récepteur à l'AF. Il est également montré que ces macrophages activés jouent un rôle important dans l'étiologie de nombreuses pathologie, comme les lupus, l'athérosclérose, la rectocolite hémorragique ou encore certains diabètes et psoriasis. L'utilisation d'agents de contraste couplés à l'AF comme l'EC20, chélateur du technétium <sup>99m</sup>Tc, a permis de mettre en évidence l'accumulation de ces

macrophages activés au niveau de sites inflammatoires, comme les articulations arthritiques (Figure 57).



**Figure 57. Radioimagerie des mains (à gauche) et des pieds (à droite) d'un patient atteint d'une arthrite rhumatoïde (A) où le composé AF-EC20-<sup>99m</sup>Tc s'accumule au niveau des articulations inflammées, et d'un patient sain (B) dans les mêmes conditions.**<sup>408</sup>

La radiothérapie ou la radioimagerie basée sur un adressage par l'acide folique n'a été jusqu'à présent que rarement envisagée, dû à une accumulation significative et spécifique des radiofolates par les reins,<sup>411-412</sup> provoquant un risque accru de radionéphrotoxicité. Müller *et al.* décrivent une méthode permettant de limiter cet aspect tout en conservant l'utilité de l'adressage par l'AF du radioélément. Pour cela, ils ont développés un radiofolate hydrophile à base d'acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique (DOTA) et de <sup>111</sup>In, qui est utilisé conjointement au Pemetrexed (PMX), un anti-folate multivalent. Leur méthode consiste en l'injection du PMX 1 h avant celle du composé AF-DOTA-<sup>111</sup>In. Le PMX va alors neutraliser les récepteurs à l'AF des reins, et ainsi limiter l'accumulation du radioélément dans ces organes (Figure 58). Les images obtenues en tomographie d'émission monophotonique couplée tomodensitométrie (TMP/TDM, Figure 58) montrent que le radioélément ne s'accumule qu'au niveau des tissus ayant un niveau élevé en récepteur à acide folique (reins et tumeurs), et que le PMX permet de réduire une accumulation au niveau des reins, rendant cette technique d'imagerie viable.<sup>413</sup>



**Figure 58. Images en tomographie d'émission monophotonique couplée tomодensitométrie (TEM/TDM) de souris porteuses de tumeurs KB (RAF+) au niveau des épaules. A : souris de contrôle, B : souris ayant reçue une injection de PMX avant celle du radiofolate.<sup>413</sup>**

D'autres radioéléments adressés par l'AF ont également fait l'objet d'études, comme le gallium  $^{67}\text{Ga}$ <sup>414</sup> et le fluor  $^{18}\text{F}$ .<sup>415</sup>

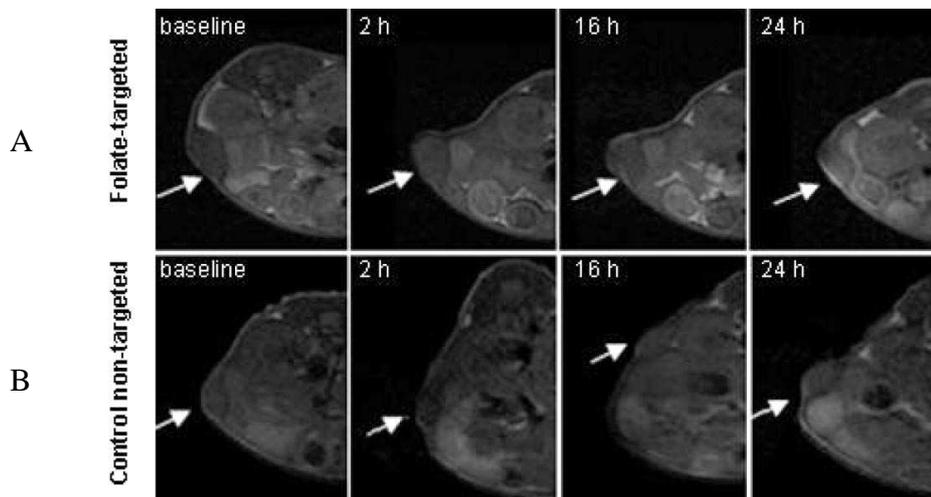
## **V.2 L'imagerie par résonance magnétique (IRM)**

Mohapatra *et al.* ont préparé des particules d'oxyde de fer adressées par l'acide folique.<sup>416</sup> Les particules ont été synthétisées par coprécipitation de  $\text{FeCl}_3$  et  $\text{FeSO}_4$  et leur surface fonctionnalisée par de l'acide 2-carboxyléthylphosphonique. De l'acide folique et de la fluorescéine couplés à de courtes chaînes de type PEG (2,2'-éthylènedioxy-bis-éthylamine) ont été greffés sur les groupements carboxyliques de surface. Les molécules de fluorescéine ont permis le suivi par fluorescence de l'incorporation des nanoparticules dans les lignées cellulaires B16 F0 (mélanome murin, RAF+) et HeLa ainsi que dans des macrophages péritonéaux murins. Les images de microscopie confocale montrent une très forte fluorescence des cellules BF16 F0 après 4 h d'incubation en présence du composé. Une très faible incorporation dans les macrophages, même après 12 h de mise en contact, a été mise en évidence.<sup>416</sup>

Chen *et al.* décrivent l'emploi de dendrimères de 3<sup>ème</sup> génération à cœur polyéthylène glycol fonctionnalisés par l'acide folique et un complexe gadolinium/diéthylène triamine penta acide (Gd-DTPA).<sup>417</sup> Le but de leur étude est d'une part la détection de tumeur exprimant le récepteur à AF, mais également un suivi de l'accumulation de l'agent de

contraste au cours du temps *via* une IRM dynamique. Leurs résultats montrent que le contraste est effectivement amélioré dans le cas de tumeurs KB (RAF+), et que ce contraste procuré par l'agent adressé par l'AF a un temps de vie plus élevé que celui du contrôle non-adressé.<sup>417</sup>

Kamaly *et al.* relatent l'utilisation de liposomes adressés par l'acide folique dans le cadre de techniques d'imagerie bimodale.<sup>418</sup> En effet, la formulation du liposome comprend en plus de l'acide folique, du gadolinium comme agent de contraste IRM et de la rhodamine comme fluorophore. Leurs travaux sont réalisés sur des souris porteuses de tumeurs de type IGROV-1 (RAF+). Ils démontrent que 2 h après injection, les liposomes adressés par l'AF ont une accumulation 4 fois plus importantes que ceux non-adressés et que cette amélioration rapide du signal IRM persiste jusqu'à 24 h post-injection (Figure 59).<sup>418</sup>

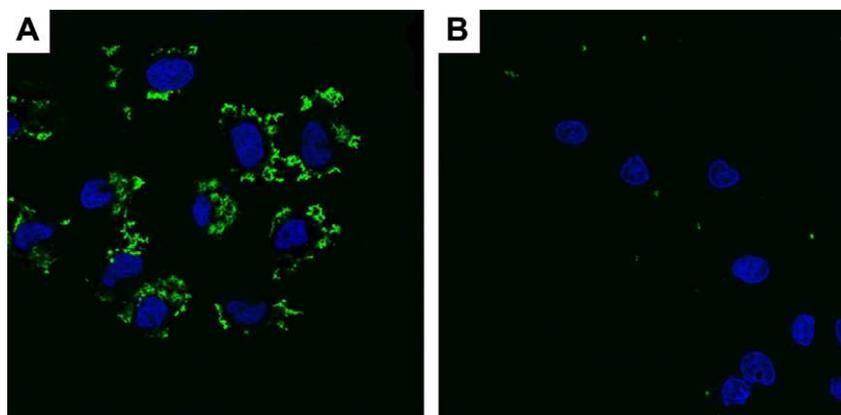


**Figure 59.** IRM d'une souris porteuse d'une tumeur IGROV-1 (indiqué par une flèche blanche). A : liposomes adressés par l'AF, B : liposomes contrôles non-adressés.<sup>418</sup>

### V.3 L'imagerie par fluorescence

De nombreux travaux ont porté sur l'adressage de fluorophores organiques. L'émergence de l'utilisation de QDs en imagerie, de part leurs propriétés prometteuses, a suscité l'intérêt de nombreuses équipes. Ces travaux relatent leur emploi en imagerie de fluorescence, où ces QDs peuvent jouer aussi bien le rôle de vecteur de fluorophore,<sup>419-420</sup> de sondes fluorescentes<sup>325, 330, 421</sup> ou d'agent de contraste dans une approche bimodale<sup>419-420</sup> et adopter différentes formulations.<sup>330, 421</sup>

Zhang *et al.* décrivent l'emploi de nanoparticules d'or couplées à l'AF et à de la fluorescéine isothiocyanate (FITC) *via* le glutathion.<sup>419</sup> La NP sert de point d'ancrage à la molécule d'adressage (AF) et à la sonde fluorescente (FITC). Ils ont mis en évidence l'efficacité de l'adressage d'un tel type de structure par comparaison entre les lignées tumorales HeLa (RAF+, Figure 60A) et A549 (RAF-, Figure 60B).

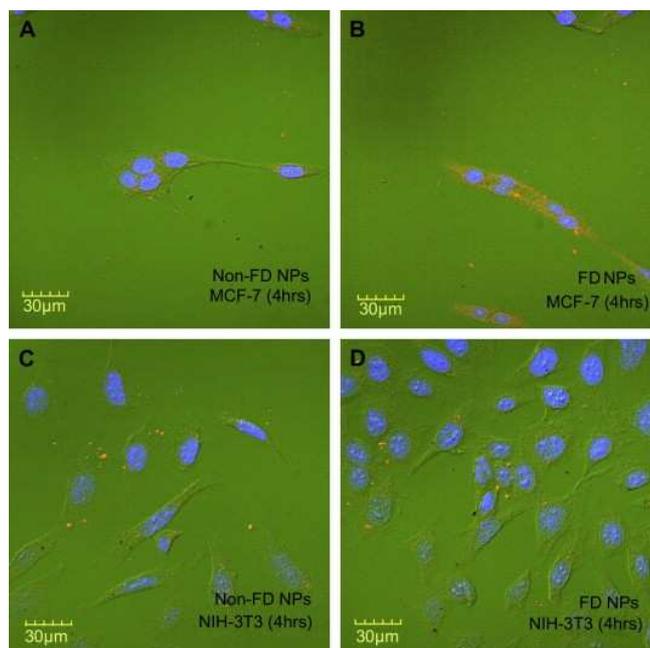


**Figure 60. Image par microscopie confocale de l'internalisation des nanoparticules d'or. (en vert). A : lignée HeLa (RAF+); B : lignée A549 (RAF-).**<sup>419</sup>

De la même manière, Ke *et al.* ont synthétisé des nanosphères (NS) de polymère d'acide polyacrylique incluant une NP d'oxyde de fer  $Fe_3O_4$  et fonctionnalisée à sa surface par l'AF pour l'adressage et une rhodamine pour la détection en fluorescence. Leurs résultats en microscopie confocale sur l'incorporation cellulaire montrent une accumulation préférentielle des NS adressées par l'AF dans des lignées tumorales KB (RAF+) par rapport aux mêmes structures non-adressées.<sup>420</sup>

D'autres travaux ont porté sur l'emploi de nanosphères (NS) incluant des QDs hydrophobes.<sup>421</sup> La matrice est constituée de deux copolymères de type poly(lactide)-vitamine E D- $\alpha$ -tocophéryl polyéthylène glycol 1000 succinate (PLA-TPGS) et de vitamine E D- $\alpha$ -tocophéryl polyéthylène glycol 1000 succinate (TPGS). Par imagerie confocale, il a été mis en évidence que les NS adressées par l'AF s'internalisaient en plus grande quantité dans les lignées MCF-7 (RAF+, Figure 61B) que les NS non-adressées (Figure 61A), ce qui tend à montrer le marquage spécifique dû à un adressage par l'AF. Pour confirmer cette hypothèse, des tests ont également été menés sur la lignée cellulaire NIH 3T3 (RAF-). Il a été mis en évidence, grâce à l'intensité de fluorescence que les NS, adressées ou non par l'AF, étaient internalisées en quantité équivalente (Figures 61C et 61D). D'après les auteurs, cela est sans doute dû à un mécanisme non spécifique. La comparaison des intensités de fluorescence

démontre également que l'internalisation des NS adressées par l'AF est beaucoup plus efficace dans la lignée MCF-7 (RAF+) que dans la lignée NIH 3T3 (RAF-).



**Figure 61. Imagerie confocale laser de A : NS non adressées et MCF-7 (RAF+), B : NS-AF et MCF-7, C : NS non adressées et NIH 3T3 (RAF-), D : NS-AF et NIH 3T3.**<sup>421</sup>

Des études ont également été menées sur l'exploitation des propriétés de vecteurs macromoléculaires. Ainsi, Zhao *et al.* ont synthétisés des QDs fonctionnalisés par un dendrimère de type PAMAM de génération 3,5.<sup>325</sup> Les amines périphériques du dendrimère ont ensuite été couplées à l'acide folique et cela a ainsi permis d'obtenir une structure fluorescente s'accumulant préférentiellement dans les lignées cellulaires surexprimant le RF (ici, lignée tumorale SKOV3). Schroeder *et al.* ont, quant à eux, préparé des liposomes (Lipodots) adressés par l'acide folique incluant des QDs hydrophobes de type CdSe@TOPO.<sup>330</sup> Dans ce cas également, la sélectivité s'est améliorée pour les structures adressées par l'AF vis-à-vis des lignées tumorales KB (RAF+).

## **VI. Thérapies adressées par l'acide folique**

Si l'imagerie joue un rôle très important aussi bien *in vivo*, pour l'aide au diagnostic, qu'*in vitro*, pour la compréhension des mécanismes encore mal connus de l'incorporation par les RAF- $\alpha$ , l'intérêt majeur du couplage à l'acide folique réside dans son potentiel antitumoral. Plusieurs études ont ainsi exploité la sélectivité apportée par la conjugaison à la vitamine B9 en le couplant à des agents chimiques, à des oligonucléotides, des protéines, des gènes ou encore à des matériaux inorganiques.

## VI.1 Chimiothérapie adressée

Une stratégie de couplage de l'acide folique à un dérivé de l'héparine, par Yu *et al.*, a montré quelques résultats plus probants.<sup>422</sup> L'héparine est un anticoagulant dont l'activité anti-proliférative a été démontrée à la fois par des effets pro-apoptotiques et anti-angiogéniques. Cependant, son effet sur la circulation sanguine en limite cependant fortement l'utilisation. Yu *et al.* se sont orientés vers des dérivés conjugués entre l'héparine et l'acide lithocolique. Ces dérivés amphiphiles forment des micelles où l'héparine est orientée vers le milieu extérieur, limitant ainsi le pouvoir anticoagulant sans pour autant freiner l'activité anti-angiogénique. Afin de limiter la dose nécessaire à l'action antitumorale, limitant ainsi les effets secondaires, et pour optimiser l'effet apoptotique sur les cellules tumorales, un conjugué folate-héparine-acide lithocolique a été synthétisé. Ce composé forme des micelles présentant une partie acide folique en pourtour, permettant ainsi la reconnaissance par les RFs. Les tests *in vitro* sur des cellules KB ont montré la capacité de ces conjugués à provoquer l'apoptose, mais seulement dans un milieu pauvre en vitamine B9. Toutefois, les résultats *in vivo* n'ont montré qu'une faible variation dans l'inhibition de la croissance tumorale par rapport aux micelles non couplées à l'acide folique, ce qui suggère que l'effet essentiel de ces produits provient du potentiel anti-angiogénique plus que du pouvoir apoptotique de l'héparine.

Maeng *et al.* rapportent l'étude d'une plateforme multifonctionnelle regroupant des NPs d'oxyde de fer Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> au sein d'une matrice polymère adressée par l'AF.<sup>423</sup> Cette structure présente l'intérêt de transporter également un agent chimiothérapeutique, la doxorubicine. Leurs travaux ont porté sur l'évaluation de l'efficacité d'une telle structure (YCC-DOX) en tant qu'agent thérapeutique adressé, mais également son efficacité en tant qu'agent de contraste IRM. Ainsi, les tests ont porté sur la comparaison entre les propriétés de cette structure et celles de produits couramment utilisés en chimiothérapie (Doxil®) et en IRM (Resovist®). Leurs résultats montrent qu'à concentration en fer équivalente, YCC-DOX améliore grandement le signal IRM (Figure 62A) par rapport au Resovist®. YCC-DOX se pose donc comme un agent potentiel efficace en IRM. De plus, l'activité inhibitrice de croissance tumorale de la doxorubicine se trouve être meilleure que celle du Doxil® (Figure 62B), sans doute dû au fait que YCC-DOX est une structure adressée qui s'accumulera sélectivement dans les tumeurs surexprimant le RAF.

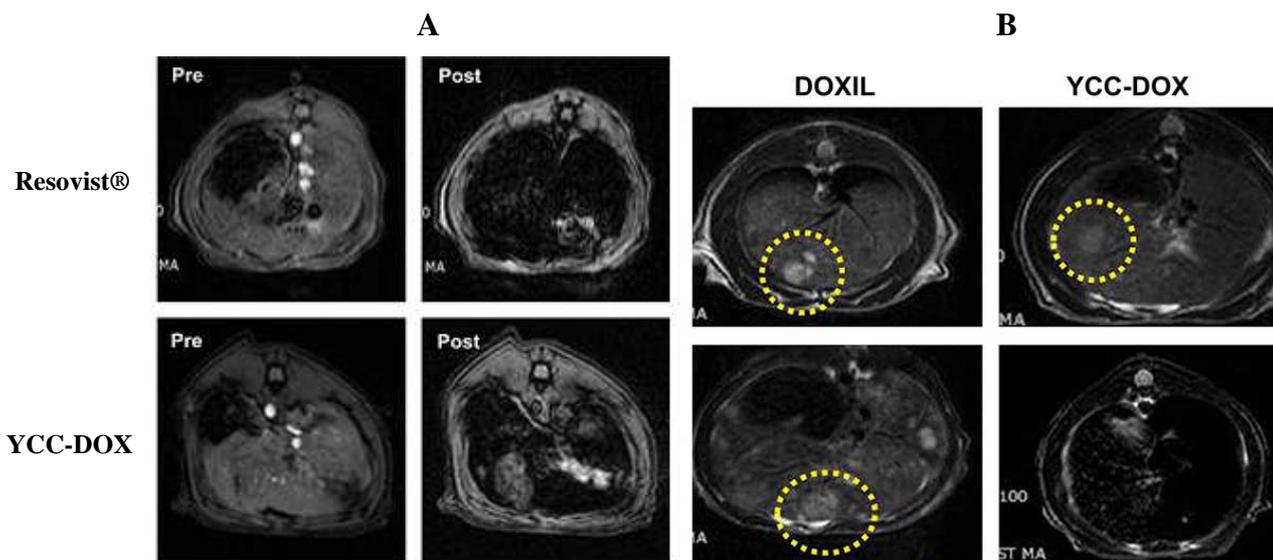


Figure 62. A : Image IRM pré- et post-injection du Resovist® et de YCC-DOX-AF dans un rat porteur d'une tumeur du foie. B : Images IRM avant et après effet antitumoral du Doxil et de YCC-DOX.<sup>423</sup>

## VI.2 Thérapie photodynamique

Dans le cadre d'une stratégie PDT, notre équipe a été la première à coupler l'acide folique à un photosensibilisateur.<sup>77</sup> Dans cette étude, un PS de type 4-carboxyphénylporphyrine a été couplé à l'AF *via* un bras espaceur de type diamine (Figure 63).

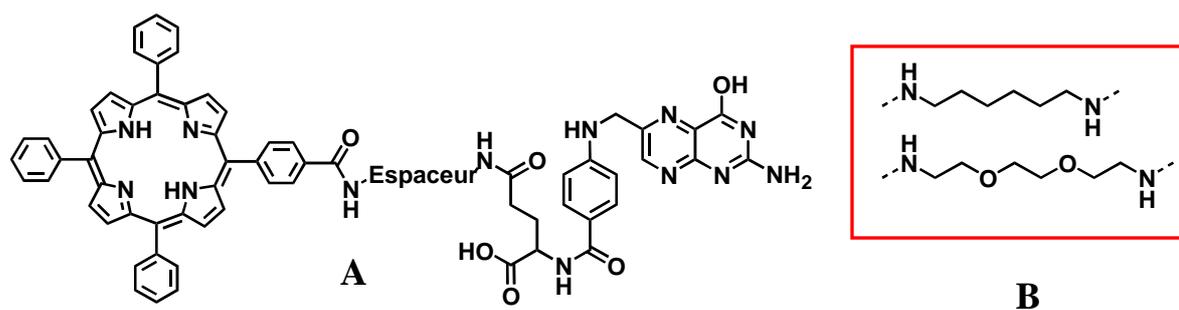
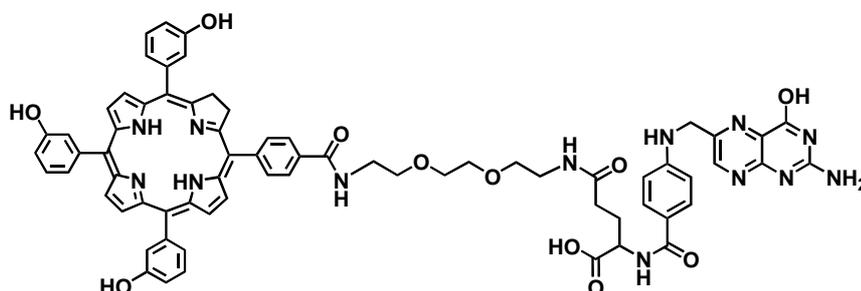


Figure 63. Structure de la molécule cible de l'étude préliminaire. A : structure générale de la molécule cible ; B : en haut : espaceur hexane ; en bas : espaceur 2,2'-éthylènedioxy-bis-éthylamine.<sup>77</sup>

Cette étude a permis de mettre en évidence que le PS adressé par l'AF était beaucoup mieux internalisé (d'un facteur 7 quelque soit le bras espaceur utilisé) dans les cellules KB que le PS non-adressé. En revanche, cette étude a montré que le type d'espaceur peut avoir une influence sur les propriétés photophysiques du PS, et que ce choix doit être réalisé avec

précautions. En effet, le PS adressé par l'AF via l'espaceur 2,2'-éthylènedioxy-bis-éthylamine présente une photocytotoxicité 3,4 fois plus importante que le composé avec l'espaceur hexane, et ce pour une internalisation cellulaire équivalente.

Ces travaux ont par la suite été poursuivis par Gravier *et al.* Notre équipe a adopté une approche qui repose sur l'utilisation d'une chlorine, la *meta*-tetra(hydroxyphényl)chlorine (m-THPC) couplée à l'AF via un bras espaceur de type PEG, le 2,2'-(éthylènedioxy)-bis-éthylamine (Figure 64).<sup>424</sup> Cette structure a été testée *in vivo* sur des souris xénotransplantées KB (RAF+) et HT-29 (RAF-). L'étude de l'incorporation cellulaire, réalisée par fluorimétrie à fibre optique, a montré que 4h après injection par intraveineuse, l'internalisation "folate-spécifique" du composé a été améliorée d'un facteur 2 dans le cas des tumeurs KB, comparée au PS non couplé à l'AF. De plus, la sélectivité tumeur/tissu sain s'est révélée élevée (5:1). Par utilisation d'une méthode de modélisation par analyse factorielle de la variance, Gravier *et al.* ont finalement démontré que la structure du PS (couplé ou non à l'acide folique) ainsi que le type de tumeurs traitées (KB (RAF+) ou HT-29 (RAF-)) sont les paramètres les plus importants pour l'accumulation du PS, et par conséquent qu'un adressage par l'AF se révèle effectif dans le cadre d'une amélioration de la sélectivité du traitement.



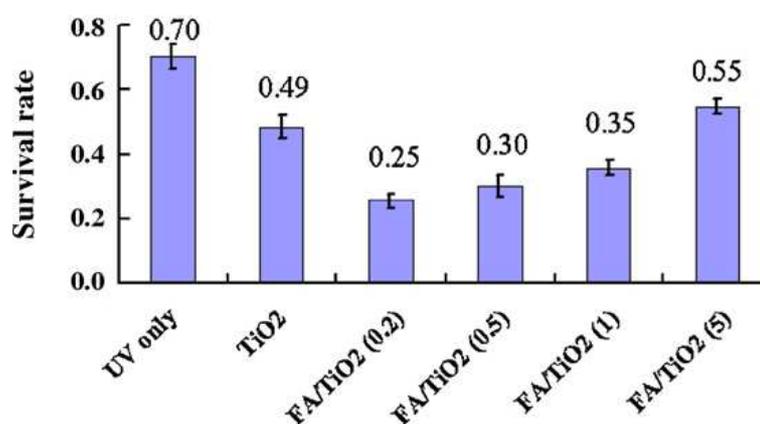
**Figure 64.** La chlorine m-THPC couplée à l'AF via un bras 2,2'-(éthylènedioxy)-bis-éthylamine (PEG<sub>2</sub>).<sup>424</sup>

### **VI.3 Adressage de macromolécules**

Une amélioration de la sélectivité d'incorporation cellulaire d'entités de tailles importantes est également permise par un adressage par l'AF. Ainsi, Zhang *et al.* décrivent l'adressage par l'AF de petits ARN interférents (siRNA pour *small interfering ribonucleotide acid*) dans le cadre d'une thérapie génique.<sup>425</sup> Ces siRNA permettent comme son nom l'indique, d'interférer avec un ARN messager spécifique conduisant à sa dégradation et à la diminution de sa traduction en protéine. La structure proposée fait intervenir une liaison non-covalente *via* des interactions base/base entre le siRNA et un oligodesoxyribonucléotide couplé à l'AF.

Cette méthode, en plus d'être simple à mettre en place, permet de synthétiser à grande échelle ce type de composé, et permet un adressage efficace du siRNA vers des cellules RAF+.

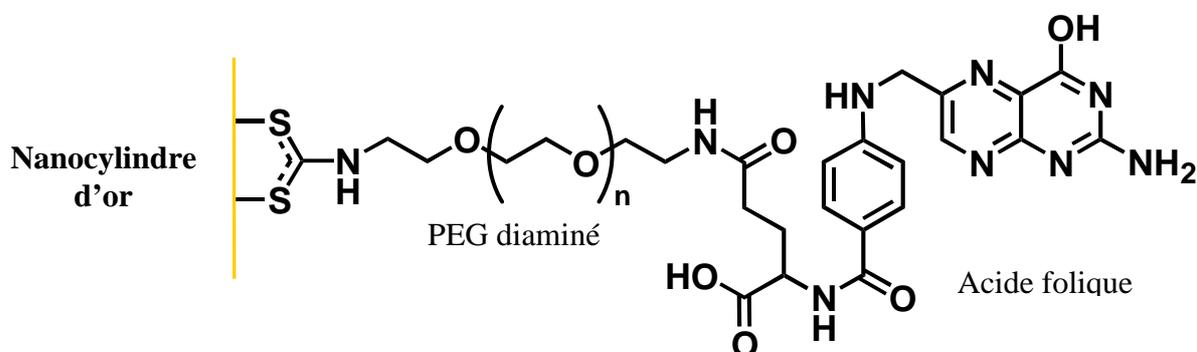
Des hypothèses de traitements faisant intervenir des nanoparticules adressées par l'AF voient également le jour. Ainsi, Lai *et al.* décrivent l'emploi de NPs d'oxyde de titane TiO<sub>2</sub> adressées par l'AF. L'activité photocatalytique de TiO<sub>2</sub> permet la destruction après irradiation UV des cellules ayant incorporées la NP.<sup>426</sup> Bien que les résultats montrent que le greffage d'AF à la surface de la NP altère les propriétés photocatalytiques de TiO<sub>2</sub>, le gain apporté en internalisation cellulaire par le greffage à l'AF permet de garder une efficacité du traitement. En effet, plus la quantité d'AF utilisée lors du greffage est importante, moins l'activité photocatalytique de TiO<sub>2</sub> est importante (Figure 65), le meilleur rapport AF/TiO<sub>2</sub> étant évalué à 0,2.



**Figure 65. Survivance de cellules tumorales HeLa (RAF+) en fonction du rapport AF/TiO<sub>2</sub>.**<sup>426</sup>

Une autre technique faisant appel aux NPs utilise cette fois-ci des nanocylindres d'or (Figure 66). Ces structures absorbent la lumière dans un domaine proche de l'infrarouge et transforment l'énergie ainsi apportée en chaleur. L'étude faite par Tong *et al.*<sup>427</sup> démontre la capacité de telles nanoparticules à se lier spécifiquement à la surface des cellules KB, puis à déstabiliser la membrane cytoplasmique sous l'action d'une lumière de grande longueur d'onde (765 nm). Les nanostructures d'or peuvent entraîner la destruction de cellules lorsqu'elles sont liées à la surface de ces dernières : elles déstabilisent thermiquement leur membrane, la rendant poreuse, et le déséquilibre ionique qui résulte de cette perméabilité membranaire accrue (perforation) entraîne la nécrose. L'utilisation de l'acide folique présente alors le double avantage de favoriser l'accumulation des bâtonnets au niveau de la tumeur, et d'augmenter l'effet membranaire. Tong *et al.* ont étudié la localisation de ces particules au cours du temps sur des cellules KB et NIH-3T3 (FR-). Si les nanostructures n'ont montré

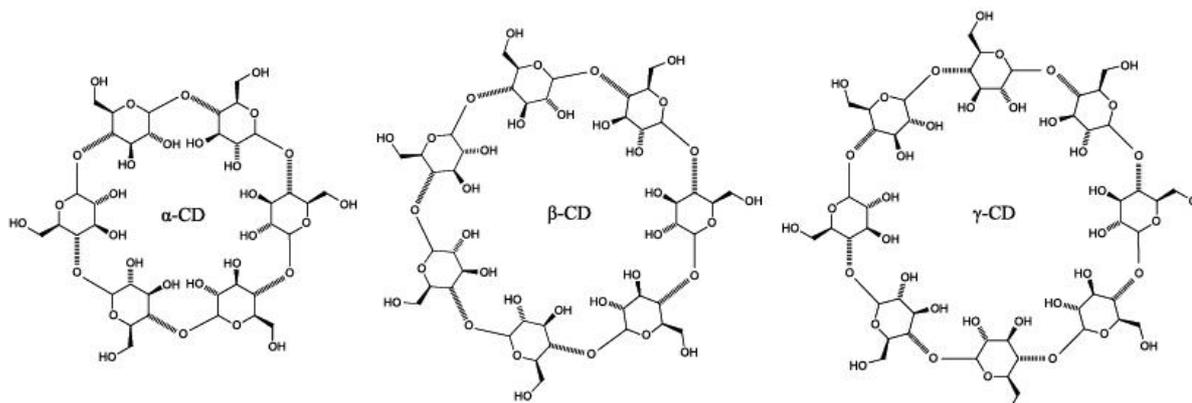
aucune affinité vis-à-vis des cellules NIH-3T3, elles se concentrent fortement à la surface des cellules KB, 6 h après co-incubation. Dix-sept heures après la mise en contact, les nanocylindres se retrouvent localisés essentiellement dans le compartiment endosomal autour du noyau des cellules KB.



**Figure 66. Structure du dithiocarbamate couplé à l'acide folique par un espaceur PEG et greffé à la surface d'un nanocylindre d'or.**<sup>426</sup>

#### **VI.4 Adressage de vecteurs moléculaires**

L'adressage de molécules peut parfois s'avérer problématique, comme par exemple lorsque le clivage de l'acide folique et de la molécule thérapeutique est nécessaire à l'action antitumorale, ou lorsque la solubilité de cette dernière est médiocre en milieu biologique. Une alternative consiste alors non pas à coupler directement la vitamine B9 au composé à adresser, mais à un vecteur qui va transporter le principe actif. L'agent thérapeutique est alors inclus dans un assemblage moléculaire plus important qui, lui, est directement couplé à l'acide folique. Caliceti *et al.* décrivent la synthèse d'une cyclodextrine (CD) adressée.<sup>103</sup> Les CDs (Figure 67) sont des oligosaccharides cycliques, dont la conformation spatiale décrit approximativement une section de cône creuse, dont la surface externe est hydrophile, et la surface interne hydrophobe.<sup>428</sup> Cette particularité fait que les CDs sont régulièrement utilisées pour la vectorisation de molécules hydrophobes difficilement solubles en milieux biologiques : le composé thérapeutique s'inclut dans la cavité interne hydrophobe du vecteur, et l'hydrophilie de la surface externe de la CD lui permet d'être véhiculé dans la circulation sanguine.



**Figure 67. Structure des cyclodextrines : à gauche, l'α-cyclodextrine ; au centre, la β-cyclodextrine ; à droite, la γ-cyclodextrine.**<sup>428</sup>

L'acide folique a été couplé, *via* un copolymère à bloc polypropylène-polyéthylène-polypropylène, à une β-CD afin d'améliorer la concentration efficace délivrée aux cellules cibles. Ce conjugué (CD-PEG-AF, Figure 67) a ensuite été utilisé dans des tests *in vitro*, d'une part, pour vérifier que le vecteur conservait sa capacité d'inclusion malgré le couplage, d'autre part, que l'acide folique conservait sa capacité d'adressage. Les constantes d'inclusion de la β-CD et de son homologue conjugué ont été déterminées grâce à l'utilisation de la rhodamine. Les constantes d'inclusion calculées sont respectivement de 4580 et 3000 M<sup>-1</sup> pour la β-CD et la β-CD couplée à l'acide folique. Le couplage réduit donc en partie la capacité d'inclusion de la partie CD.

L'étude de récepteurs à l'AF extraits du lait de vache et immobilisés sur une électrode d'or modifiée, ont montré une forte interaction du conjugué qui n'existe pas pour la CD, prouvant une interaction spécifique avec les récepteurs à l'acide folique. L'incorporation du conjugué dans les cellules KB a été démontrée en utilisant la rhodamine. L'incorporation de ce fluorophore est augmentée de 10 à 20% lorsqu'il est inclus dans le CD-PEG-AF par rapport à une formulation libre ou lorsque la rhodamine est incluse dans une CD non conjuguée. De plus, les images de microscopie confocale ont montré que la rhodamine internalisée grâce au transporteur conjugué était présente principalement dans les compartiments multivésiculaires, preuve d'une endocytose dépendante des RAF-α.

Une autre stratégie faisant appel aux polymères repose sur la classe très particulière des dendrimères. Comme cela a été expliqué au chapitre II, ces polymères présentent une structure en branche de plus en plus dense à mesure que l'on s'éloigne du cœur du dendrimère. Ces particularités en font de bons transporteurs par deux voies possibles :

l'adsorption physique de composés dans la cavité interne ou le greffage chimique sur l'une des nombreuses fonctions terminales externes.<sup>111</sup> Quintana *et al.* ont synthétisé un dendrimère en périphérie duquel ont été greffés de la fluorescéine, de l'acide folique et du méthotrexate.<sup>429</sup> Différents types de 'capping', réaction sur les fonctions terminales amines, et différents types de liaisons dendrimère/méthotrexate (ester et amide) ont été envisagés. Les tests *in vitro* sur des lignées de cellules KB ont mis en évidence la supériorité du *capping* utilisant un acétamide sur ceux utilisant des groupement terminaux hydroxy et carboxy, essentiellement pour des raisons physico-chimiques, comme les problèmes de solubilité. L'utilisation d'un lien ester, plus facilement hydrolysable, entre le transporteur et le méthotrexate s'avère aussi bénéfique pour l'efficacité biologique du composé. Au final, l'assemblage moléculaire s'est montré 100 fois plus cytotoxique que le méthotrexate seul contre les cellules de la lignée KB. Plus tard la même équipe obtiendra des résultats similaires *in vitro* sur des lignées KB mais en utilisant le paclitaxel.<sup>430</sup>

Comme nous venons de le décrire, l'acide folique a suscité et suscite encore aujourd'hui un très vif intérêt de la part de la communauté scientifique en matière d'adressage moléculaire. L'état de l'art fait dans ce paragraphe ne regroupe que certains travaux de ces dernières années, et de fait, est loin d'être exhaustif.

La PDT est une voie de traitement prometteuse dans le cadre de la recherche contre le cancer. Malgré de nombreuses années de recherches, elle continue de souffrir de problèmes relatifs entre autres au manque de sélectivité des composés utilisés. Comme cela a été décrit au chapitre concernant la PDT, de nombreuses stratégies d'adressages ont été envisagées pour en améliorer les performances de la PDT. Les travaux sur l'adressage d'un PS type chlorure par l'acide folique réalisé par notre équipe<sup>424</sup> n'avaient jamais été décrits dans la littérature à leur date de publication, et restent encore d'actualité.

L'objectif de cette étude est d'élaborer et d'étudier un nouveau type de structure PS couplés à l'AF pour des applications en PDT. Dans un désir d'originalité et en considération de leurs propriétés prometteuses, notre étude s'est arrêtée sur l'emploi potentiel des QDs en PDT et de l'apport de l'adressage *via* l'AF de telles structures.

*Fonctionnalisation des  
quantum dots pour un  
adressage via l'acide folique.*



## **Chapitre VI : Fonctionnalisation des quantum dots pour un adressage via l'acide folique.**

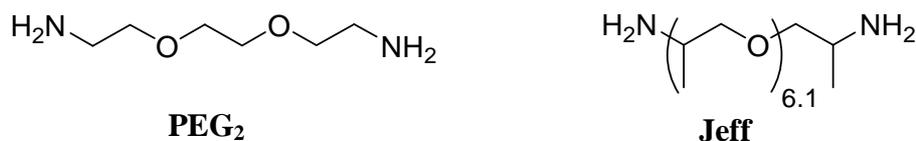
Comme cela a été décrit précédemment, l'acide folique présente de nombreux avantages en tant que molécule d'adressage : faible masse molaire, forte affinité pour son récepteur, site de greffage accessible sans perte d'affinité, non-immunogène et faible coût. Bien qu'elle ait été utilisée dans le cadre de nombreuses stratégies d'imagerie et de thérapeutique, notre équipe a été la première à synthétiser un produit de couplage entre l'acide folique et un PS pour la thérapie photodynamique.

Dans un premier temps, nous allons nous intéresser aux bras espaceurs choisis pour la liaison QD/AF, ensuite nous aborderons différents protocoles de couplage entre l'acide folique et les QDs CdTe(S)@ATG ( $\lambda_{\text{max}}=650-660$  nm), ainsi que la purification et la caractérisation des composés obtenus. Les propriétés photophysiques du conjugué QD-AF ont été étudiées afin de déterminer l'impact du couplage sur les propriétés de l'agent photosensibilisateur.

### **I. Choix du bras espaceur**

La nature de l'espaceur peut jouer un rôle important dans la reconnaissance de la partie folate au niveau cellulaire et dans l'incorporation de l'assemblage moléculaire. Si l'unité photosensibilisatrice se trouve trop proche de la partie acide folique, l'encombrement généré alors par les QDs peut fortement atténuer, voire empêcher, la reconnaissance du conjugué par les récepteurs cellulaires. A l'inverse, un bras espaceur trop long peut engendrer des repliements du conjugué sur lui-même, aboutissant encore une fois à des gênes pouvant nuire à la reconnaissance. De plus, la balance hydrophile/hydrophobe globale du conjugué obtenu peut influencer sa solubilisation dans le cytoplasme ou la membrane cellulaire et ainsi influencer son incorporation. Compte tenu de ces faits et dû à la faible solubilité de l'acide folique en milieu aqueux ( $1,6 \cdot 10^{-3}$  mg.ml<sup>-1</sup> à 25°C), notre choix s'est arrêté sur des espaceurs hydrophiles de type polyéthylène glycol (PEG) de petites tailles (entre 148 et 400 Da).

Pour déterminer le rôle de la taille de l'espaceur dans la reconnaissance des conjugués, deux types d'espaceurs ont été testés. Un bras court, la 2,2'-éthylènedioxy-*bis*-éthylamine (PEG<sub>2</sub>) de masse molaire de 148,21 g.mol<sup>-1</sup>, ce qui correspond à une longueur de 2 motifs glycol, et un bras plus long, une polyoxypropylène diamine, la Jeffamine D-400 (Jeff), qui possède une masse molaire moyenne d'environ 400 g.mol<sup>-1</sup>, correspondant en théorie à une moyenne de 6,1 motifs glycol (Figure 68).



**Figure 68.** La 2,2'-éthylènedioxy-bis-éthylamine (PEG<sub>2</sub>) et la polyoxypropylène diamine Jeffamine (Jeff).

*Au cours des expériences réalisées avec la Jeffamine, nous avons cependant pu constater que le composé commercial est en fait un mélange d'oligomères jusqu'à plus de 15 unités méthyléthylène glycol (MEG).*

## **II. Couplage QD/AF**

Il s'agit ici de fonctionnaliser les QDs type CdTe par l'acide folique. Comme cela a été vu précédemment, les QDs adaptés à une application en PDT et obtenus par voie hydrothermale sont stabilisés par le ligand ATG. Les QDs utilisés présentent donc à leur périphérie des fonctions carboxyliques qui vont nous servir de point d'attache pour les différents couplages à mener. En effet, il est alors possible de créer des liaisons de type ester ou amide à partir de ces fonctions périphériques.

### **II.1 Purification et caractérisation du conjugué QD/AF**

Avant d'aborder le couplage proprement dit entre le QD et l'AF, il est nécessaire de prendre connaissance des méthodes de purification et de caractérisation des conjugués obtenus. Ceci nous permettra alors de définir les critères de sélection de la méthode de couplage QD/AF la plus efficace.

#### **II.1.1 Purification**

Comme nous l'avons vu précédemment, la méthode la plus simple et la plus efficace pour isoler/purifier les QDs est la précipitation sélective. Dans le cas du conjugué QD/AF, cette opération a déjà été effectuée avant la réaction de couplage, afin de travailler uniquement sur une population homogène en taille qui permet d'obtenir une homogénéité de la réactivité des QDs ainsi que du greffage.

Cependant, il a été constaté qu'une précipitation trop massive engendrait régulièrement un problème de resolubilisation partielle du conjugué. Par une précipitation massive, il est entendu une

utilisation d'un solvant certes miscible dans l'eau, mais dont la polarité resterait faible. Ainsi, les contre-solvants tels le *n*-butanol, le *n*-hexanol, voire l'*iso*-propanol ont tendance à trop fortement déstabiliser la solution. L'emploi d'un contre-solvant "plus doux" à base d'éthanol est préconisé. Une solution méthanol/éthanol (3/7, v/v) donne les meilleurs résultats de précipitation/resolubilisation.

L'élimination des produits secondaires de couplage ainsi que des réactifs non-consommés est un élément important de cette étape de purification. Il est important d'éliminer les produits de réactions secondaires qui peuvent se révéler toxiques pour les cellules utilisées, ainsi que l'AF en excès qui n'a pas réagi et qui pourrait interférer avec l'internalisation active du conjugué *via* les RAF. Il a été constaté que l'emploi du contre-solvant méthanol/éthanol (3/7, v/v) lors de l'étape de précipitation permet d'éliminer une partie de l'AF libre. Ce fait est avéré par une coloration jaune limpide du surnageant de précipitation qui ne présente aucun signal de fluorescence imputable aux QDs employés lors du couplage.

Afin de compléter l'élimination des produits indésirables, une dialyse est effectuée en fin de couplage et à l'obscurité. Cette dialyse du conjugué qui se trouve dans un tampon type PBS (pH=7,2) ou borate (pH=9), est réalisée contre le même type de tampon. Les dialyses ne doivent pas excéder 5 h, sous peine d'aboutir à une floculation du conjugué qui peut elle-même aboutir à des problèmes de resolubilisation, ce phénomène semblant plus prompt à se produire dans le cas d'une utilisation du tampon PBS. Ainsi, les dialyses effectuées durent en moyenne 4 h dans un tampon borate avant de réaliser une dernière précipitation afin d'isoler le conjugué QD/AF.

Un cycle de purification du conjugué QD/AF comportera donc deux phases successives de précipitation à l'aide d'une solution méthanol/éthanol (3/7, v/v), suivie par une dialyse de 4 h contre un tampon borate basique, puis une dernière précipitation au méthanol/éthanol (3/7, v/v).

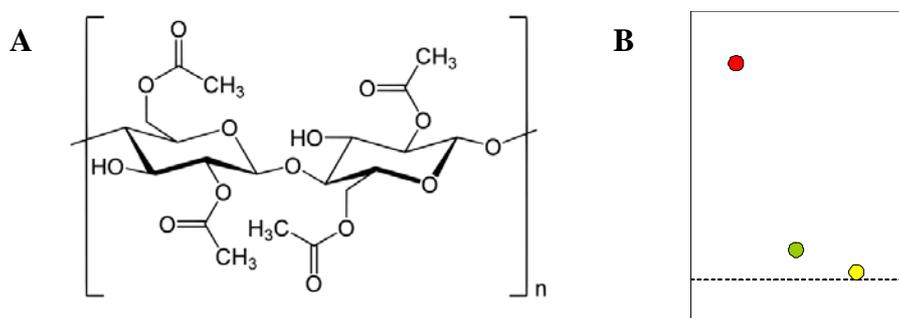
### II.1.2 Caractérisations photophysiques

Comme cela a déjà été évoqué, le facteur recherché et déterminant pour des QDs adaptés à une utilisation en PDT est une absorption localisée dans le rouge/proche infrarouge, idéalement vers 650-660 nm. Au cours des réactions de couplage, il se révèle que le milieu ou les réactifs employés destabilisent le QD qui peut alors se dégrader. Leurs propriétés spectrales étant directement liées à leur dimension, une déstabilisation de la surface du QD par arrachement d'atomes aura une conséquence directe sur ces propriétés. Ce type de dégradation fait alors apparaître un déplacement hypsochrome des propriétés d'absorption et d'émission de fluorescence du QD.

Un contrôle de l'absorption et de la fluorescence des QDs est réalisé avant et après chaque étape du couplage.

### II.1.3 Electrophorèse sur acétate de cellulose (EAC)

Afin de vérifier le couplage de l'AF au QD, nous avons employé une technique rapide, peu coûteuse en produit et très simple de préparation et d'utilisation : l'Electrophorèse sur acétate de cellulose (EAC). Comme toute électrophorèse, cette technique repose sur la migration différentielle d'espèces soumises à un champ électrique. Dans le cas présent, la phase solide est une feuille d'ester d'acétate de cellulose (Figure 69).



**Figure 69. A : Structure de l'acétate de cellulose. B : Profil typique d'une EAC : CdTe(S)@ATG (point rouge), CdTe(S)@ATG-espaceur (point vert) et CdTe(S)@ATG-espaceur-AF (point jaune).**

Etant donné la nature anionique des QDs (fonctions carboxylates périphériques), la phase liquide sera un tampon basique (PBS ou borate). Comme pour l'ECZ, la ségrégation des QDs est fonction de leur charge et de leur masse. Ainsi, un QD CdTe(S)@ATG-espaceur migrera plus vite qu'un QD CdTe(S)@ATG-espaceur-AF, mais plus lentement qu'un QD "nu" CdTe(S)@ATG, du fait des différences de masses et de charges. Typiquement, une EAC nécessite 15 minutes de préparation (préparation des bandes d'acétate et des dépôts), et la tension nécessaire à appliquer aux bornes de l'EAC est de 100mV pour une migration rapide des différents dépôts (entre 5 et 8 min). Ainsi, une EAC est réalisée après chaque couplage et permet de contrôler très rapidement l'avancement de la réaction.

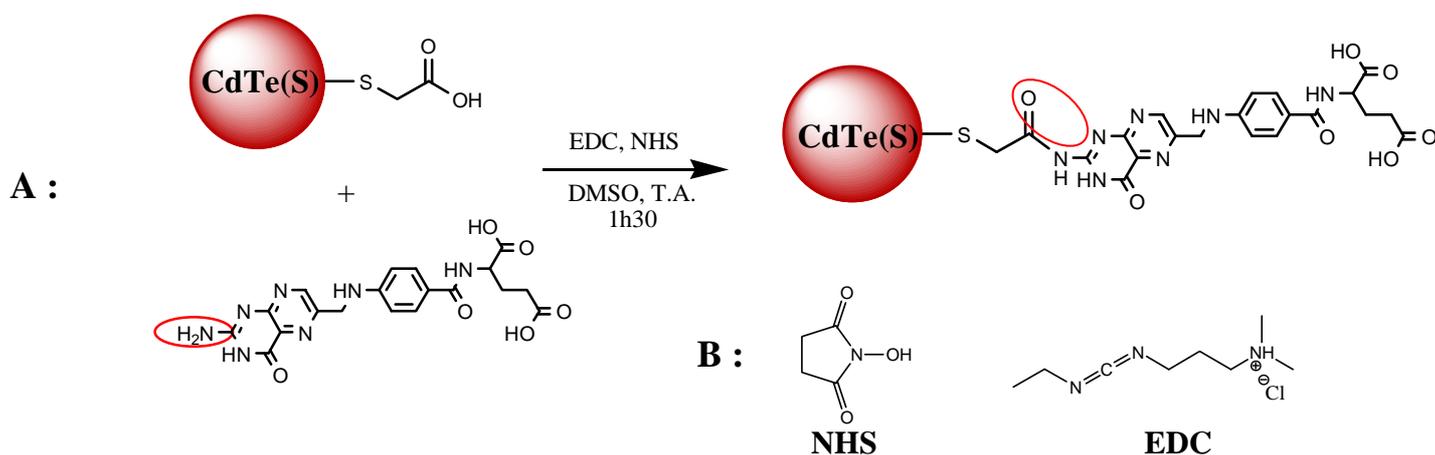
## II.2 Protocoles de synthèse

Différents protocoles de couplage QD/AF ont été expérimentés. Les premiers essais ont fait appel à un couplage direct entre le QD et l'acide folique. Par la suite, l'utilisation d'un bras espaceur a été étudiée.

## II.2.1 Couplage direct QD/AF

D'après Bharali *et al.*,<sup>360</sup> il est possible de coupler directement un QD@ATG à l'acide folique par la création d'une liaison amide entre le carboxylate périphérique du QD et l'amine primaire du noyau ptéroïle de l'acide folique (Figure 70A), et ce sans perdre l'affinité de l'AF vis-à-vis des récepteurs membranaires. Nos premiers essais de couplage se sont tournés vers cette méthode simple, faisant intervenir comme agent de couplage, le N-hydroxysuccinimide (NHS) et le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) (Figure 70B).

Cette méthode de couplage s'est montrée infructueuse. En effet, en fin de réaction, les QDs récupérés ne se resolubilisent pas et montrent une disparition quasiment complète du signal de fluorescence. Certains essais ont même aboutit à l'obtention d'une poudre noire complètement insoluble dans l'eau, témoignant certainement d'une destruction complète du QD.



**Figure 70. A :** Réaction entre le Qd CdTe(S)@ATG et l'amine primaire du noyau ptéroïle de l'AF; **B :** Structure du N-hydroxysuccinimide (NHS) et du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC).

En considérant les éléments évoqués plus haut, il nous a semblé alors préférable d'utiliser un bras espaceur de type diamino-PEG pour le couplage entre le QD et l'AF. Ainsi, nos travaux se sont focalisés sur les méthodes de fonctionnalisation du QD par l'AF *via* les bras PEG<sub>2</sub> et Jeff.

## II.2.2 Couplage *via* un bras espaceur

Pour un couplage entre un QD et l'AF par un bras espaceur de type diamino-PEG, deux méthodes sont envisageables. La première implique la fonctionnalisation du QD par l'AF préalablement couplé au bras espaceur et la seconde fait appel à une étape de couplage entre le QD et le bras espaceur, suivi par une conjugaison à l'AF.

### II.2.2.1 Couplage "CdTeS@ATG + bras-AF"

Cette voie de conjugaison nécessite la préparation au préalable du composé "espaceur-AF", via la création d'une liaison amide entre une extrémité amine de l'espaceur et la fonction  $\gamma$ -carboxylique de l'AF. Ensuite, ce composé est couplé au QD via la création d'un lien amide entre l'amine libre de l'espaceur et le carboxyle périphérique du QD (Figure 71). Il faut noter que la majorité des nombreux essais de cette voie de couplage concerne le bras espaceur PEG<sub>2</sub>.

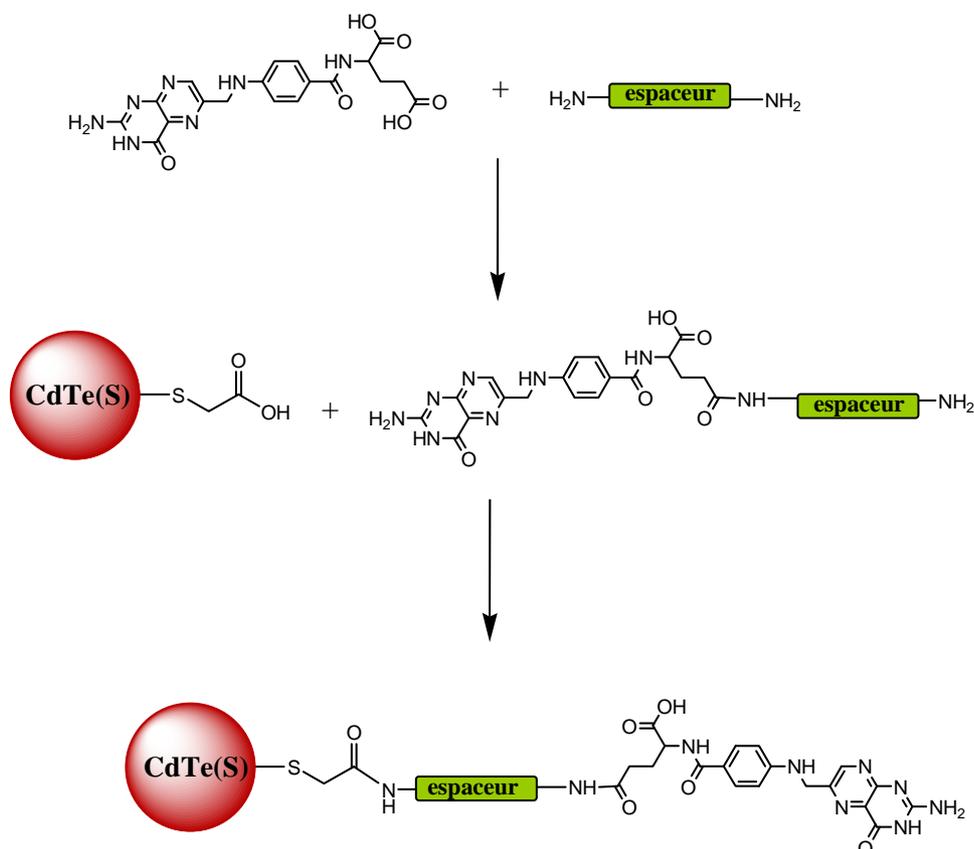


Figure 71. Schéma de la voie de couplage "QD + espaceur-AF".

#### - Première étape : Synthèse du composé "espaceur-AF"

Les espaceurs ont tout d'abord été protégés à l'aide d'un groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc, Figure 72) sur l'une de leurs extrémités. Cette protection permet de s'assurer qu'il n'y aura pas un double couplage de l'AF sur une même molécule. Pour éviter la protection des deux extrémités de l'espaceur, l'anhydride *di-tert*-butyldicarbonique (Boc<sub>2</sub>O) a été traité par un excès d'espaceurs (8 équivalents) dans le chloroforme.

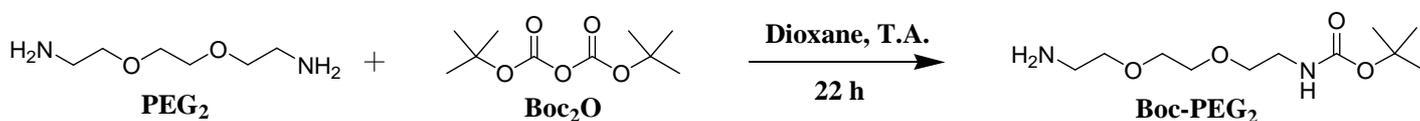
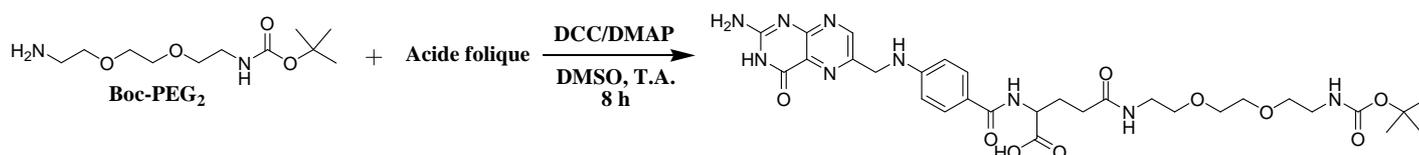


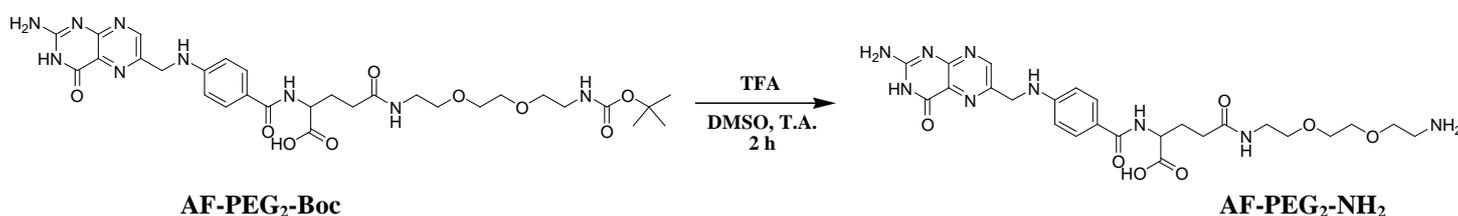
Figure 72. Préparation des espaceurs PEG<sub>2</sub> et Jeff monoprotégés.

Cette réaction se déroule à température ambiante pendant 22h, et donne des rendements proches de 100%. L'espaceur monoprotégé est ensuite couplé à l'acide folique (Figure 72) *via* une activation de ses fonctions carboxyles par le couple dicyclohexylcarbodiimide (DCC)/4-Diméthylaminopyridine (DMAP) dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à température ambiante (Figure 73). La RMN du produit obtenu montre clairement que certains signaux singulets sont dédoublés. Ce dédoublement est attribué à la formation de l'isomère  $\alpha$  (non présenté). Les intégrales de RMN  $^1\text{H}$  indiquent qu'il est constitué de 80% d'isomère  $\gamma$  et de 20% de l'isomère  $\alpha$ . Ces valeurs sont en accord avec celles trouvées dans la littérature<sup>404, 431</sup> lors du couplage de dérivés azotés avec l'acide folique.



**Figure 73. Synthèse du composé AF-PEG<sub>2</sub>-Boc.**

Ce composé est ensuite déprotégé (figure 74) par traitement à l'acide trifluoroacétique (TFA). Ce produit a finalement été isolé avec 85% de rendement après purification sur colonne chromatographique.

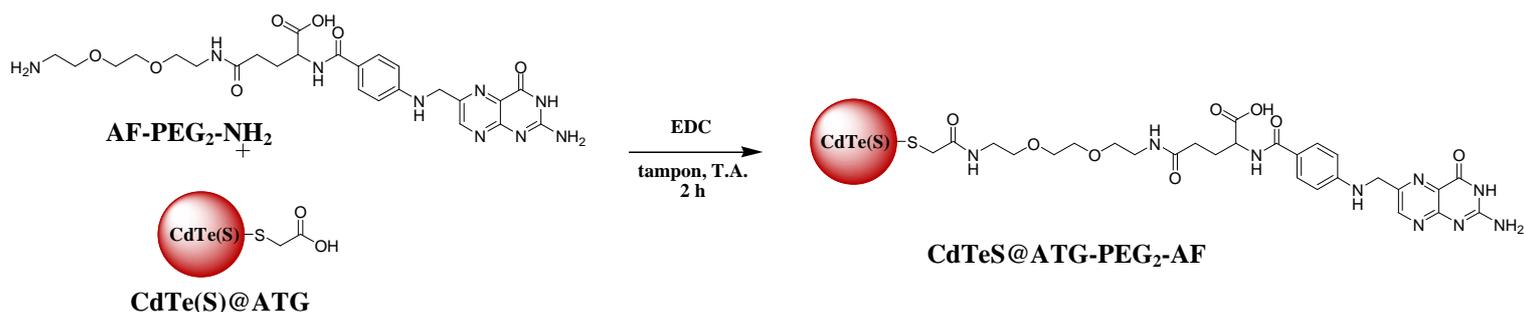


**Figure 74. Déprotection du composé AF-PEG<sub>2</sub>-Boc.**

Le produit obtenu AF-PEG<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, dont le rendement global de préparation est de 68 %, peut alors être couplé au QD CdTe(S)<sub>2</sub>@ATG.

- Seconde étape : Couplage QD/"espaceur-AF"

Le couplage proprement dit entre le QD et l'AF va consister en la création d'une liaison amide entre l'amine libre de l'espaceur du composé AF-PEG<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> et le carboxyle périphérique du QD. Cette réaction se déroule pendant 3-4h dans un tampon borate ou PBS et fait intervenir l'EDC comme agent de couplage (Figure 75).



**Figure 75. Couplage entre le QD CdTe(S)@ATG et le composé AF-PEG<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>.**

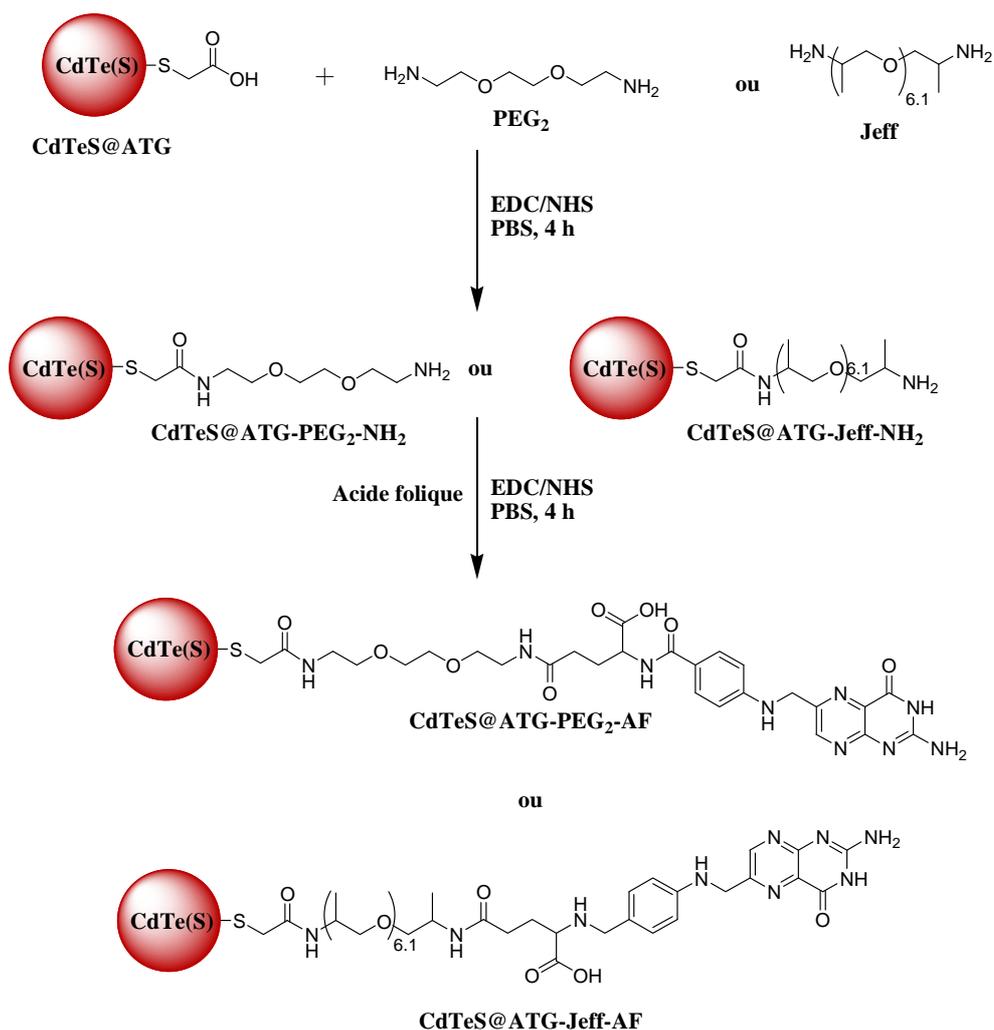
Après purification, le conjugué obtenu est dispersé en milieu aqueux mais présente une tendance à la floculation. De plus, l'étude des propriétés spectrales montre une disparition quasiment totale des propriétés d'émission ( $\Phi_{\text{fluor}}$  passe de 0,15 à 0,01), et dans une moindre mesure des propriétés d'absorption, témoignant d'une dégradation importante des QDs.

Cette méthode de couplage QD/AF *via* un composé de type AF-PEG<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> ne se révèle pas satisfaisante. Elle est en effet assez coûteuse en temps et en produit par sa nature multi-étape et la qualité des QDs obtenus n'est pas acceptable, même pour les lots de conjugué présentant la meilleure qualité. De plus, une accumulation des étapes de synthèse augmente la probabilité de retrouver des produits secondaires indésirables.

Une méthode moins coûteuse en temps et plus douce a donc été expérimentée, et qui consiste simplement en deux couplages successifs au QD du bras espaceur puis de l'AF.

#### II.2.2.2 Couplage CdTeS@ATG-bras + AF

Cette voie de coupage fait intervenir deux réactions de couplage sous des conditions expérimentales similaires. La première étape consiste en la conjugaison d'une amine du bras espaceur au carboxylate périphérique du QD activé par le couple EDC/NHS. Le QD obtenu, de type CdTeS@ATG-espaceur-NH<sub>2</sub> est ensuite couplé à l'AF par formation d'une liaison amide entre l'amine périphérique du QD et le  $\gamma$ -carboxyle de l'AF (réaction majoritaire, figure 76).



**Figure 76. Schéma de la voie de couplage "QD- espaceur + AF".**

Dans un premier temps, chacune de ces conjugaisons a fait l'objet d'un cycle de purification intermédiaire comme cela a été décrit plus tôt. Des essais ont été réalisés par la suite sans cette purification intermédiaire. Ce couplage "one pot" offre un gain de temps considérable, car il nous dédouane des précipitations et surtout de la dialyse intermédiaire et permet ainsi d'obtenir le conjugué QD-espaceur-AF en une journée. Il a été également constaté que cette procédure aboutit aux mêmes résultats, que ce soit pour la stabilité des QDs en solution ou pour la conservation des propriétés spectrales du QD, quel que soit le bras espaceur utilisé (PEG<sub>2</sub> ou Jeff). Par conséquent, le couplage "one pot" est choisi comme la voie de synthèse effective des conjugués QD-espaceur-AF qui serviront pour toutes les expérimentations *in vitro*.

Ce couplage, comparativement au "couplage direct QD/AF" et "QD + AF-espaceur", nous a permis d'obtenir des conjugués de bonne qualité. En effet, aucun déplacement hypsochrome n'a été constaté en fin de synthèse par rapport aux QDs initiaux, et les EAC nous montrent que les

couplages successifs ont bien été accomplis. Cependant, la quantité d'AF couplé a un impact direct sur la stabilité en solution du conjugué final. En effet, les couplages faisant intervenir un très grand nombre d'équivalent d'AF ont abouti à l'obtention de conjugués relativement peu stables en solution qui présentent une tendance à la floculation. Comme cela a été indiqué précédemment, l'AF folique présente une solubilité en milieu aqueux assez faible, et il est très fortement probable que la trop grande quantité d'AF couplée à la périphérie du QD déstabilise ce dernier, et ce malgré la présence des espaceurs hydrophiles. Cette tendance a pu être atténuée par un mode opératoire faisant intervenir l'utilisation d'une quantité moindre d'AF, permettant ainsi un taux de couplage de l'AF moins élevé.

La conservation des propriétés photophysiques du QDs de départ (absence de déplacement hypsochrome) ainsi que la stabilité en solution du conjugué obtenu nous montre que le QD n'a pas subi de dégradation majeure au cours du couplage. Cependant, une baisse du  $\Phi_{\text{fluo}}$  au fur et à mesure des étapes de couplage est observée (Figure 1 de l'article). Ceci est dû au fait que l'AF est un très bon quencher de fluorescence, en raison de sa flexibilité qui aboutit à des chocs AF/surface du QD et de la présence de fonctions carboxyles qui vont fortement interagir avec les atomes de cadmium de surface, faisant alors baisser le  $\Phi_{\text{fluo}}$ .<sup>432-433</sup>

### **III. Validation de l'efficacité photodynamique des QDs "Quantum Dot-folic acid conjugates as potential photosensitizers in photodynamic therapy of cancer"**

Morosini, V. ; Bastogne, T. ; Frochot, C. ; Schneider, R. ; François, A. ; Clarot, I. ; Guillemin, F. ; Barberi-Heyob, M.

Article soumis au **Journal of Medicinal Chemistry**.

Après l'obtention de QDs adaptés à la fenêtre thérapeutique de la PDT et leur couplage efficace à l'AF, notre travail s'est ensuite focalisé sur l'évaluation de l'activité photodynamique des composés obtenus.

Pour cela, une étude *in vitro* a été menée, dans un premier temps afin d'évaluer la cytotoxicité intrinsèque de tels composés, pour ensuite s'intéresser à leurs comportements consécutifs à une irradiation lumineuse. Ces tests de photocytotoxicité ont été menés sur des lignées cellulaires tumorales de type KB (RAF+), ainsi que sur des lignées cellulaires tumorales de type HT-29 (RAF-), ce qui nous a permis, en plus de mettre en évidence une activité photodynamique des conjugués, d'évaluer également l'impact d'un adressage par l'AF de ces QDs employés comme PS.

L'interprétation des résultats a été réalisée selon la méthodologie des plans d'expérience, méthode de simulation mathématique qui permet à partir de quelques expérimentations pertinentes, de reconstruire dans son intégralité un plan d'expérience factoriel. Cette méthode, en plus des économies en temps, en produits et en consommables, nous a permis de hiérarchiser l'impact des différents facteurs expérimentaux, qu'ils soient numériques (concentration en composé, temps de contact, fluence) ou qualitatif (lignée cellulaire, adressage ou non par l'AF, choix du bras espaceur), sur la réponse cellulaire étudiée, l'activité photodynamique des QDs.

Ces travaux nous ont permis tout d'abord de mettre en évidence que pour une concentration inférieure à 10 nM, les composés présentaient une activité photodynamique intéressante tout en conservant une cytotoxicité à l'obscurité satisfaisante. Ils nous ont par la suite permis de mettre en évidence l'efficacité de l'adressage des QDs par l'AF envers les lignées RAF+, ce qui s'est traduit par une efficacité photocytotoxique accrue.

Dans l'article qui suit, la synthèse et la caractérisation photophysique des QDs utilisés, ainsi que la méthode de couplage QD/AF, sont présentés. La description des modalités de la méthodologie des plans d'expérience et leurs interprétations y sont plus largement développés.

# **Quantum Dot-folic acid conjugates as potential photosensitizers in photodynamic therapy of cancer**

Vincent Morosini<sup>†</sup>, Thierry Bastogne<sup>†</sup>, Céline Frochot<sup>‡</sup>, Raphaël Schneider<sup>‡</sup>, Aurélie François<sup>†</sup>,  
François Guillemin<sup>†</sup>, Muriel Barberi-Heyob<sup>†</sup>

CRAN, Centre de Recherche en Automatique de Nancy, Nancy-University, CNRS,  
CAV, Avenue de Bourgogne, F-54511 Vandœuvre-lès-Nancy  
LRGP, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, Nancy-University, CNRS,  
1 rue Grandville, BP 20451, F-54001 Nancy, France

GDR CNRS 3049 "Médicaments Photoactivables-Photochimiothérapie (PHOTOMED)

To whom correspondence should be addressed. Phone: + 33 3 8359 83 06, Fax: + 33 3 83 59 83 78

E-mail: [m.barberi@nancy.fnclcc.fr](mailto:m.barberi@nancy.fnclcc.fr)

<sup>†</sup> CRAN, Nancy University

<sup>‡</sup> LRGP, Nancy University

<sup>⊥</sup> SRSMC, Nancy University

Abbreviations : ANOVA, analysis of variance; Boc, *tert*-butoxycarbonyl; DCC, dicyclohexylcarbodiimide; DLI, drug-light interval; DoE, design of experiment; EDC, 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride; FA, folic acid; FR, folate receptor; NHS, N-hydroxysuccinimide; FRET, Förster resonance energy transfer; Jeff, Jeffamine D-400; NMP, N-methylpyrrolidinone; PDT, photodynamic therapy; PEG, poly(ethylene glycol); PEG<sub>2</sub>, 2,2' (ethylenedioxy)-bis-ethylamine; PS, photosensitizer; QD, Quantum dot;  $\Phi_F$ : fluorescence quantum yield;  $\Phi(^1O_2)$ : singlet oxygen quantum yield; ROS, reactive oxygen species; *m*-THPC, *meta*-tetrahydroxyphenylchlorin; THF, tetrahydrofuran; TGA, thioglycolic acid.

## **Abstract (300)**

The present study examined *in vitro* the potential of bioconjugated quantum dots (QDs) as photosensitizers (PS) for photodynamic therapy (PDT). Quantum dots are nanometer-scale, light-emitting semi-conductor particles and new potential applications, such as therapeutic management, were explored, as their unique chemical and physical properties were unraveled. Indeed, QDs conjugate may have some advantages in PDT of cancer, in particular because of their large absorbance cross-section and their tunable optical properties. According to our previous approach using PS, folic acid (FA) appears to be an optimal targeting ligand for selective delivery of attached therapeutic agents to cancer tissues. In this study, we synthesize hydrophilic near infrared emitting CdTe(S)-type QDs conjugated with folic acid using different spacers, differing by their size and hydrophilic/lipophilic balance and report on their photophysical properties. Photodynamic efficiency of QDs conjugated or not with folic acid was evaluated on KB cells, acting as a positive control due to their overexpression of FR- $\alpha$ , and HT-29 cells lacking FR- $\alpha$ , as negative control. A design of experiments (DoE) based on a fixed-effect model and an analysis of variance (ANOVA) was suggested as a rational solution to evaluate the impacts of each experimental factor (quantum dot type and concentration, light fluence and wavelength, time of contact before irradiation and cell phenotype). According to the ANOVA results, we demonstrated that, for concentrations lower than 10 nM, QDs displayed practically no cytotoxic effect without light exposure for both cell lines. Whereas QDs at 2.1 nM displayed a weak photodynamic activity, a concentration of 8 nM significantly enhanced the photodynamic efficiency characterized by a light dose-dependent response. A statistically significant difference between KB and HT-29 tumors was observed in case of conjugated QDs. Optimal conditions led to an enhanced photocytotoxicity response, allowing us to validate the interest of QDs to generate a photodynamic effect and of folic acid-conjugated QDs for targeted PDT.

**Keywords.** Quantum Dots, Photodynamic Therapy, Targeting; Folic Acid, Singlet Oxygen

## **Introduction**

Photodynamic therapy (PDT) has emerged over the last few years as a promising alternative/substitute to chemo- and radiotherapy for the treatment of various diseases including cancer.<sup>1-4</sup> PDT is a non-invasive treatment of localized tumors, and involves a photoactivable, but harmless in the dark, agent, known as photosensitizer, light and molecular oxygen.<sup>5</sup> After PS injection and an appropriate drug-light interval (DLI), the area to be treated is illuminated with light of convenient wavelength. In a photodynamic reaction, the photosensitizer irradiated by light is promoted to a higher energy/electronic level, an excited singlet state that become a triplet one thereafter. Several mechanisms then occur in order to enable the photosensitizer to return to its fundamental single state. Among them, energy, electron and/or hydrogen transfer to vicinal compounds will lead to the generation of reactive oxygen species (ROS), that are very harmful to cells and will cause cells death.<sup>6-8</sup>

One essential element in PDT is the photosensitizer ability to generate ROS and its selectivity for the target tissues of great importance for a good photodynamic effect. Various types of photosensitizers have been developed over the past decade in order to improve their light absorption and diseased tissues selectivity in comparison with the first-generation photosensitizers.<sup>9</sup> Second-generation photosensitizers, such as chlorin and phthalocyanine, present better absorption in the red side of the visible light spectrum, which commonly represent the therapeutic window<sup>10</sup> because of the slightest absorption of endogenous tissues compounds in this area (mainly hemoglobin and water).<sup>4</sup> Despite photophysical enhancements, tumors/healthy cells selectivity remains low,<sup>11</sup> giving birth to side effects like photosensitivity upon sunlight due to skin accumulation.<sup>1,12</sup> Third-generation photosensitizers have been developed for a strategy of selective delivery of the drug into diseased tissues. They consist of second-generation photosensitizers conjugated with, for example, oligo-nucleotides, peptides, monoclonal antibodies (for a review, see W.M. Sharman *et al.*<sup>13</sup>). Among these strategies, the one targeting folate receptor (FR) emerges interesting to provide a good selectivity to tumors cells. The folic acid, also known as vitamin B9, is a ligand able to target covalently attached bioactive agents quite specifically to FR-positive (FR+) cancer cells.<sup>14, 15</sup> The FR, which is a well-known cancer cell-associated protein, can actively internalize bound folates *via* endocytosis.<sup>16-18</sup> Folate receptors exist in three major forms namely FR- $\alpha$ , FR- $\beta$  and FR- $\gamma$ . The FR- $\alpha$  form is over-expressed by many types of tumor cells, including ovarian, colorectal, breast, lung, renal, neuroendocrine carcinomas and brain metastases.<sup>14, 19, 20</sup> Upon receptor interaction, the folic acid-receptor complex is taken up by cells and moves to various many organelles involved in endocytotic trafficking, providing for cytosolic deposition.<sup>21</sup> Moreover, due to its high stability, compatibility with both organic and aqueous solvent, low-cost, non immunogenic character, ability

to conjugate with a wide variety of molecules, and low molecular weight, folic acid has attracted wide attention as a targeting agent for tumor detection<sup>15, 22-24</sup> (see references in the review<sup>24</sup> for a comprehensive overview of this technology).

An alternative approach to existing photosensitizers based on organic dyes is the use of quantum dots. Their unique photophysical properties, in several respects superior to organic dyes,<sup>25</sup> confer advantages to standard organic photosensitizers and set QDs as a promising new generation of photosensitizers.<sup>26</sup> QDs are nano-sized fluorescent semiconductor crystals with diameters of 2-100 nanometers possessing unique tunable chemical and physical properties<sup>27</sup> that are synthesized from a variety of semiconductor materials. They can be II-VI (CdS, CdSe, CdTe),<sup>28-31</sup> III-V (InP)<sup>32</sup> or IV-VI-type (PbSe)<sup>33</sup> semiconductor nanocrystals, in reference to the periodic table groups that these elements are from. QDs are characterized by large absorption spectra, narrow and symmetric emission bands, and a very high molar extinction coefficient (up to  $5 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ),<sup>27, 34, 35</sup> which can be great advantages over conventional PS for a PDT strategy. They also possess a better photostability than conventional organic fluorophores<sup>36-38</sup> and their fluorescence quantum yield can be up to 1.<sup>39</sup> It has been shown that QDs can be used as energy donors to conventional organic photosensitizer by fluorescence resonance energy transfer (FRET) mechanism<sup>40-42</sup>, but also directly used as photosensitizer by generating ROS on their own.<sup>40</sup>

The present study examines the potential of CdTe(S)-type QDs conjugated with folic acid to sensitize cells to light irradiation and to promote a photodynamic efficiency. We describe the synthesis of folic acid-bounded *via* amino-PEG spacer near-IR absorbing CdTe(S)-type QDs, suited for PDT, followed by an optimization of the *in vitro* PDT-targeting strategy. We report on the synthesis and on the photophysical properties of a CdTe(S)-type QD stabilized by thioglycolic acid (TGA) (**QD 1**) conjugated *via* two different  $\alpha,\omega$ -poly(ethylene glycol) spacers, the 2,2' (ethylenedioxy)-bis-ethylamine PEG<sub>2</sub> (**QD 2**) and the jeffamine D-400 Jeff (**QD 3**), to folic acid (**QD 4** and **5**, respectively). We evaluated the photodynamic efficiency of CdTe(S)-type **QD 1, 2, 3, 4** and **5** on KB cells, acting as a positive control due to their overexpression of FR- $\alpha$ , and HT-29 cells lacking FR- $\alpha$ , as negative control.<sup>43, 44</sup> In this purpose, the impacts of each experimental factor (QD type and concentration, light fluence, irradiation wavelength, time of contact and cell phenotype) were investigated. In this context, we decided to use statistical methods for experimental design in order to accurately estimate the factor effects while controlling the experimental cost by selecting only the relevant experiments to be carried out. An analysis of variance (ANOVA) was performed on the experimental data, followed by statistical tests of significance on the model coefficients in order to identify the dominant factors and to choose the relevant factor modalities, leading to the best phototoxic effect. As previously demonstrated, design of experiments (DoE) approach has already been successfully applied in PDT.<sup>45</sup>

## **Experimental section**

**Chemistry and Photophysical Studies.** The hydrothermal synthesis of TGA-capped CdTe(S) alloyed QDs was based on works already published.<sup>46, 47</sup> In a typical procedure, 500 mg of sodium borohydride ( $1.32 \cdot 10^{-2}$  mol, 2.63 eq.) was added to 640 mg of tellurium powder ( $5.01 \cdot 10^{-3}$  mol) in a schlenk flask sealed by a rubber plug to synthesize NaHTe. Vacuum was performed by a pump in the flask under inert atmosphere. The flask was put in an ice-water bath and 10 mL of ultrapure degassed distilled water was injected. After 4h, the black tellurium disappeared and white sodium tetraborate precipitates appeared in the bottom of the flask. The resulting intense purple aqueous solution was maintained in the ice-water bath. 85.2 mg (0.37 mmol) of CdCl<sub>2</sub>·5/2H<sub>2</sub>O was dissolved in 60 mL of ultrapure degassed distilled water ([Cd]= $6.2 \cdot 10^{-3}$  M; Te/Cd/TGA =1/2/3.6 eq.) and 34 mg (0.67 mmol) of TGA was added. The pH was adjusted to 9.2 by adding dropwise 1 M NaOH solution. The Cd/TGA mixture was degassed by N<sub>2</sub> bubbling for 0.5h prior to the swiftly injection into it of the as-prepared oxygen free NaHTe solution. Finally, the Te/Cd/TGA solution was carefully transferred into a Teflon-lined stainless steel autoclave and heated up to 160°C for 5 h. The CdTe(S)@TGA alloyed QDs solution was cooled to room temperature by a hydro-cooling process and kept in the dark prior to further modification.

CdTe(S)@TGA QDs ( $\lambda_{\text{first exciton abs}}=655$  nm, [QD]= $1.5 \cdot 10^{-8}$  M, determined according to Yu *et al.*)<sup>29</sup> were dissolved in phosphate buffered saline (PBS) and the solution was mixed at room temperature with 2,2' (ethylenedioxy)-bis-ethylamine (PEG<sub>2</sub>) or Jeffamine D-400 (Jeff) with EDC/NHS as coupling agent (QD/NHS/EDC/spacer=1/1000/1000/500 eq.). After 4 hours, FA (QD/NHS/EDC/FA=1/1500/1500/500 eq.) was added with NHS/EDC, and the solution was stirred for 4 more hours. The coupling occurrence was evaluated by cellulose acetate electrophoresis. The solution was then purified by dialysis against borate buffer to remove free spacer and FA as well as undesired byproducts.

**Photophysical studies.** Absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer (Lambda 2, Courtaboeuf, France) UV-visible spectrophotometer. Fluorescence spectra were recorded on a Fluorolog-3 spectrofluorimeter F222 (Jobin Yvon, Longjumeau, France) equipped with a thermostated cell compartment (25 °C) using a 450 W xenon lamp. The  $\Phi_{\text{fluo}}$  values were determined according to the equation:

$$\phi_{QD} = \phi_{ref} \frac{A_{ref} \cdot I_{QD}}{I_{ref} \cdot A_{QD}} * \frac{n_{QD}^2}{n_{ref}^2}$$

where  $I$ ,  $A$ , and  $n$  are respectively the intensity of the measured fluorescence (area under the emission peak), the absorbance at the excitation wavelength, and the refractive index of the solvent ( $n_{water}=1.33$ ). Tetraphenylporphyrin (TPP) in toluene was used as reference [ $\Phi_{TPP}= 0.11$ ,  $n_{toluene}=1.49$ ].

**Cell Cultures.** Cell culture materials were purchased from Costar (Dutscher, Brumath, France), culture media and additives from Life Technologies (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France), except for fetal calf serum, which was obtained from Costar. All other chemicals were purchased from Sigma (Quentin Fallavier, France). KB, human head and neck carcinoma cell line, was obtained from Professor A. Hanauske (Munich University, Germany) as part of the EORTC Preclinical Therapeutic Models Group exchange program and HT-29, human colon cancer cells, was purchased from the American Type Culture Collection. KB and HT-29 cells were grown in 25 cm<sup>2</sup> plastic tissue culture flasks in RPMI 1640 medium supplemented with 9% heat inactivated fetal calf serum, penicillin (100IU/mL), and streptomycin (100  $\mu$ g/mL) in a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells were seeded in 96-well plates at a density of 10<sup>4</sup> 48h prior to colorimetric/cytotoxicity assays.

**Dark cytotoxicity.** Cell survival after incubation with the different batches of QDs in the dark was measured using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Briefly, KB and HT-29 cells were plated at an initial cell density of 5 x 10<sup>3</sup> cells/well in 96-well microtitration plates and allowed to attach overnight. Wells were then emptied, rinsed twice with PBS and filled with 200  $\mu$ L RPMI medium containing various concentrations of QDs (concentrations ranged from 10 to 100 n M). After different times of incubation at 37°C, wells were emptied, rinsed twice with cold PBS and filled with 200  $\mu$ L RPMI. Cell survival was measured 24 h later, as described previously<sup>43</sup>. Experiments were reproduced six times.

**Photodynamic activity and light source.** Photodynamic activity of QDs on KB and HT-29 cells was also assessed by MTT assay. Cell survival was measured 24 h after photosensitization. Cells were seeded at the initial density of 2 x 10<sup>4</sup> cells/mL in 96-well microtitration plates. 48 hours after plating, cells were exposed to photoactive QDs at 2.1 and 8 nM. After incubation at 37°C (1 or 6 hours of contact), the medium was removed, and cells were then washed three times with cold PBS and fresh RPMI was added before cell irradiation. Irradiation was carried out at 515 and 658 nm, using a dye laser (SpectraPhysics 375B, Les Ulis, France), pumped with an argon laser (Spectra-Physics 2020). The output power was 700 mW. The light spot was 14 cm in diameter, providing a fluence rate of 4.54 mW/cm<sup>2</sup>. Light doses 5 and 16 J/cm<sup>2</sup>. During irradiation, the temperature never exceeded 24 $\pm$ 2°C. This temperature did not influence cell viability. Caution was

taken to avoid exposure of cells to light before and after irradiation. Negative controls were QDs free-medium without photo-irradiation, QDs containing-medium without photo-irradiation.

**Design of Experiments.** DoE is a statistical inference method that focuses the investigation on a reduced number of specific points in the whole experimental domain. In this case, the goal is to accurately estimate the factor effects while controlling the experimental cost by selecting only the relevant experiments to be carried out (less time consuming and less costly). A fractional factorial design, in which all factors are varied simultaneously, was selected for the factor analysis study.<sup>66</sup> The cell viability after PDT is the response variable and the six experimental factors are presented in Table 1 in which the bold values indicate the reference modalities. The fluence and wavelength variables have been thereafter gathered in only one factor to avoid some potential incoherence between their modalities (for instance the combination of a wavelength without fluence). Three factors: QD concentration, time of contact and the cancer cell line are decomposed into two levels (noted A and ref) while the two other factors: fluence-wavelength and QDs type have five modalities each (noted A, B, C, D and ref). Compared to a full factorial design (200 experiments), the selected fractional factorial design (42 experiments, see Table 2) allows dividing by about five the experimental cost. Each experiment were repeated six times. The maximum value of the variance inflation factor associated with this experimental design is about  $1.47 < 2$ , synonym of acceptable accuracy for the model coefficients. Indeed, such an experimental design relies on a mathematical model defined as follows,

$$\begin{aligned}
 Y = & \quad b_0 + \quad b_{1A} * (X_{1A}) + \quad b_{2A} * (X_{2A}) \\
 & + \quad b_{3A} * (X_{3A}) + \quad b_{4A} * (X_{4A}) + \quad b_{4B} * (X_{4B}) \\
 & + \quad b_{4C} * (X_{4C}) + \quad b_{4D} * (X_{4D}) + \quad b_{5A} * (X_{5A}) \\
 & + \quad b_{5B} * (X_{5B}) + \quad b_{5C} * (X_{5C}) + \quad b_{5D} * (X_{5D}) + \quad E
 \end{aligned}$$

Y is the response variable (viability),  $X_{iA}$  denotes the A-level of the  $i^{\text{th}}$  factor (see Table 1) and E is the experimental error described by a centred Gaussian random variable.  $b_{iA}$  is a model coefficient that quantifies the impact on the response of the  $i^{\text{th}}$  coefficient  $X_i$  when the latter takes the modality A.  $b_0$  corresponds the reference response, *i.e.* the mean response when the factors take their reference modality (see last column “ref” Table 1). The model coefficients provide crucial information since their value allow firstly to compare the importance of the factors and secondly to test the relevance of a modality in comparison with a reference level for each factor. It is then possible to identify the most influent factors and to select their modality leading to the best photocytotoxic effect.

**Statistical analysis.** The estimation of the model coefficients and their statistical significance were supported by an analysis of variance (ANOVA) and Student's t-tests computed by the Nemrod-W<sup>®</sup> software. Wilcoxon test was also used to assess the significant level between independent variables. The level of significance was set to  $p < 0.05$ .

## **Results and discussion**

**Chemistry.** The first step of this work was to achieve the synthesis of high-quality water-soluble near-IR absorbing CdTe-type QDs. The choice of semi-conductor CdTe as a basic structure for the QDs results in the fact that it offers interesting photophysical properties, such as high fluorescence quantum yield and easiness to obtain suitable absorbance for the therapeutic window of PDT (ideally between 650 and 850 nm), compared to the other cadmium chalcogenides compounds (CdS and CdSe). Hydrophilicity was provided by an adequate choice of stabilizing agent. Thioglycolic acid (TGA) was picked, because its thiol extremity provides a solid bond with Cd, and its carboxylic one brings hydrophilicity at the other extremity. Additionally, the carboxylic group allows linkage chemistry by the likely creation of amid or ester bond with biomolecules.

CdTe(S)@TGA-type QDs (**QD 1**) were synthesized by a hydrothermal technique,<sup>46, 47</sup> consisting in a reaction in aqueous media performed at a temperature higher than 100°C in an autoclave reactor. The higher temperature (150°C) largely accelerated the growth of the nanocrystals, but also leads to the formation of QDs with a larger size than with standard synthesis performed at 100°C, and therefore achieving longer absorption/emission wavelength. At this temperature, hydrolysis of TGA occurs,<sup>48</sup> acting thus as a source of sulfur monomers, which can then substitute some of the Te atoms to form an alloyed structure, the so-called CdTe(S) (instead of a core/shell structure like CdTe/CdS), favorable for high photoluminescence quantum yield ( $\Phi_{PL}$ ). Purification of the QDs was performed by size-selective precipitation with methanol or ethanol. Near-IR QDs ( $\lambda_{\text{first exciton abs}} = 660 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emission}} = 712 \text{ nm}$ ) were then obtained, with a diameter of 4.3 nm (empirically determined from the value of  $\lambda_{\text{first exciton abs}}$ , according to Yu *et al.*)<sup>29</sup> and high  $\Phi_{PL}$  (up to 0.72).

The nature of the QD/FA linker can play an important role in FA affinity for FR- $\alpha$  and in the cellular internalization of the conjugate due to steric hindrance caused by the QD. In addition to these phenomena, relative weak solubility of FA in aqueous media ( $1.6 \cdot 10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$  at 25°C) compelled us to add small hydrophilic PEG-type linkers. **QD 1** was linked to two different types of amino-spacer, 2,2' (ethylenedioxy)-bis-ethylamine (PEG<sub>2</sub>, **QD2**), and Jeffamine D-400 (Jeff, **QD3**). In both cases, carboxylic groups at the surface of the QDs and amino groups of the spacers were linked by an EDC/NHS-mediated coupling reaction. Purification of CdTe(S)@TGA-PEG<sub>2</sub> and CdTe(S)@TGA-Jeff was realized by dialysis against saline aqueous solution.

CdTe(S)@TGA-PEG<sub>2</sub> (**QD 2**) and CdTe(S)@TGA-Jeff (**QD 3**) were then linked to FA *via* EDC-mediated reaction. FA can be coupled through both  $\alpha$ - or  $\gamma$ -carboxylic function, and it has been reported that only  $\gamma$ -carboxylic conjugates can bind to FR- $\alpha$ .<sup>49, 50</sup> Regardless it has been also reported that  $\gamma$ -carboxylic-linked conjugates are predominant.<sup>49</sup> Purification of CdTe(S)@TGA-PEG<sub>2</sub>-AF (**QD 4**) and CdTe(S)@TGA-Jeff-AF (**QD 5**) was performed by dialysis against saline aqueous solution.

**Spectroscopic characterization and photophysical properties.** Fig 1B shows the UV-Vis and fluorescence spectra in water of CdTe(S)@TGA QDs coupled or not to jeff and jeff-FA. Fig 1C shows the UV-Vis and fluorescence spectra in water of CdTe(S)@TGA QDs coupled or not to PEG<sub>2</sub> and PEG<sub>2</sub>-FA. All absorption spectra of the QDs show typical broad peaks in the visible region with tails extending to beyond 750 nm. The emission spectra are characterized by good symmetry and a maximum at around 710 nm, meaning that no aggregation occurs (aggregation of QDs would result in red shifting in emission spectra accompanied by broadening). In a same family of QD (jeff or PEG<sub>2</sub> spacer), fluorescence measurement showed a decrease in intensity as the linker and the linker-AF is coupled to the QD. This phenomenon might be to buffer ions chelation by PEG-type spacers, leading to fluorescence quenching in the case of the QD-linkers photoluminescence quenching. Recent works showed that FA can act as a good fluorescence quencher, because of its flexibility and the strong interactions between its carboxyl groups with surface Cd atoms.<sup>51, 52</sup> This photoluminescence quenching by FA is a typical Stern-Volmer quenching behavior driven by collisions between FA and the QD.<sup>53</sup>

**Preliminary evaluations of dark cytotoxicity and photodynamic activity.** In order to examine the potential of CdTe(S)-type QDs to promote a photodynamic activity before optimizing of experimental conditions using RSM, we first determined cytotoxicity and photocytotoxicity of **QD 4** on KB cells (Fig. 2). MTT test was used to evaluate the dark cytotoxicity of QD solutions for concentrations ranging from 10 to 100 nM. In the absence of light exposure and after almost all incubation times (1, 3 and 6 hours) of cells with photoactive QDs, yielded a surviving cell fraction higher than 50% for all concentrations up to 100 nM (Fig. 2). A convenient viability is generally accepted above 80%, leading to a concentration of QDs should not exceed 10 nM. A 1h-incubation time of cells with QDs at this concentration, quite no cytotoxic effect was observed (Fig. 2A). Indeed, all subsequent experiments were carried out at non-cytotoxic concentrations inferior to 10 nM. These cytotoxic concentrations are widely lower than those described for tetraphenylporphyrin conjugated with folic acid, varying from 0.5 to 30  $\mu\text{M}$ <sup>43</sup> or compared to other usual photosensitizer. Reasons for this may include the chemical properties of QDs in biological medium. Reports in the literature suggest that QDs are non cytotoxic,<sup>37, 54-58</sup> nevertheless recent data suggest QDs

cytotoxicity due to different physicochemical properties and exposure concentrations.<sup>59-63</sup> Whereas QDs at 5 nM incubated 3 hours displayed a weak photodynamic activity in KB cells at 1 J/cm<sup>2</sup>, increasing significantly the fluence dose enhanced the photodynamic efficiency (Fig. 2B). The LD<sub>50</sub> value of **QD 4** was 7 J/cm<sup>2</sup>. According to Samia *et al.*, cadmium chalcogenide QDs can generate <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, with a quantum yield of 5 % in toluene.<sup>40</sup> We aimed at giving prominence to the fact that hydrophilic CdTe(S) QDs can generate <sup>1</sup>O<sub>2</sub> or more generally ROS, in order to use them as a new class of photosensitizer in PDT.

**Experimental design and photocytotoxicity of QDs.** We conducted a factor analysis study based on a fractional factorial design<sup>66</sup>. ANOVA results are presented in Table 3. Negative values of the model coefficients mean that the associated factor modalities lead to a decrease of the viability and their absolute value quantify the magnitudes of the decrease. According to the Student's t-test values, two parameters appear as significant: b1A and b2A associated with QD concentration and time of contact, respectively. Other factor modalities emerge as significant: b4C and b4D corresponding to fluence. We cannot reasonably reject the assumption of non-influence on the viability response of the QD type as by examining values of the model coefficients, we note a substantial difference between (b5A, b5B) and (b5C, b5D). The former (QD conjugated with folic acid) are negative while the latter (without folic acid) are positive, meaning that the conjugates lead to a decreased viability while the absence of folic acid implies an increased viability.

To corroborate the previous results, new experiments with additional factor modalities were carried out and a refined analysis was performed factor by factor. As previously evaluated, photocytotoxicity tests were performed on two cell lines, KB cells acting as a positive control due to their overexpression of FR- $\alpha$ , and HT-29 cells lacking FR- $\alpha$ , as negative control<sup>44</sup>. Photodynamic efficiency conditions are related to the minimization of the response values. Whereas QDs at 0.1 and 2.1 nM displayed a weak photodynamic activity in both cell lines, an increased concentration of QDs significantly enhanced photodynamic effect with a median drop of about 40% of the viability (Fig. 3A). As illustrated in Figure 3B, a time of exposure of 6 hours was more efficient (median viability drop of about 20%) compared to a short incubation time of 1 hour. Figure 3C shows that the photodynamic effect led to a dose-dependent response even if the effect of the fluence appears less pronounced than the two previous factors (median viability drop of about 10%). The absence of irradiation wavelength influence on the viability response was confirmed (data not shown).

**Selective delivery.** The specific involvement of the FR in mediating cellular uptake was evaluated by no significant effect of conjugated QDs in HT-29 cells (Fig. 4A) compared to KB cells (Fig. 4B). No significant decrease of the response for **QD 4** and **5** in HT-29 cells lacking FR- $\alpha$ , was

indeed evidenced. According to DoE, PDT using **QD 4** and **5** improved significantly the photodynamic efficiency compared to **QD 1, 2** and **3** ( $p < 0.0004$ ). However, even if an improvement of both conjugated QDs responses was observed, survival measurements demonstrated that conjugate **QD 4** was more efficient than **QD 5** (median viability drop of about 10%). The QDs functionalization by a PEG<sub>2</sub> coating is probably the most efficient strategy to improve solubility and to avoid degradation. Many studies have indeed demonstrated the positive effect of PEG-type ligand on the bioavailability and immunogenicity<sup>64-67</sup> of such particles. However, using Jeffamine as spacer interacts with QDs response. The nature of the linker could influence chemical properties and therefore photodynamic activity. Indeed, the presence of a spacer brings flexibility to the molecule, and its length, as well as the nature of the molecule attached to it, may impact on receptor affinity.<sup>68, 69</sup> In another previous work, folic acid was conjugated to 4-carboxyphenylporphyrin *via* two short linkers that were different in nature but similar in size. Both conjugated photosensitizers showed improved intracellular uptake in KB cells. Using a short PEG, 2,2'-(ethylenedioxy)-bis-ethylamine, as spacer arm, we demonstrated that the uptake of this conjugate was on average 7-fold higher than tetraphenylporphyrin used as a reference and that the cells were significantly more sensitive to folic acid-conjugated porphyrin-mediated PDT.<sup>43</sup> More recently, we demonstrated that *in vivo* selectivity of *meta* tetra(hydroxyphenyl)chlorin (*m*-THPC)-like photosensitizer conjugated to folic acid exhibited enhanced accumulation in KB tumors *in vivo* compared to *m*-THPC, 4 hours after intra-venous injection.<sup>44</sup> Tumor-to-normal tissue ratio exhibited a very interesting selectivity for the conjugate (5:1) in KB tumors. In this study, we evidenced that an incubation time of 6 hours was more efficient compared to 1 hour; an aspect that is important for folic-acid-mediated drug delivery concerns the rate of FR recycling between the cell surface and its intracellular compartments. Accumulation of folate conjugates in KB cells will depend upon not only the number and accessibility of FR on the cell surfaces but also the time required for unoccupied receptors to recycle back to the cell surface for additional conjugated QDs uptake. Using radioactive conjugates, Paulos *et al.* found empty FR<sup>+</sup> to unload their cargo and return to the cell surface in about 8 to 12 hours.<sup>70</sup> By this approach, we also demonstrated that folic acid improves selectivity of PDT. Using folic acid-linked drugs in a FR-targeting strategy can be considered as an efficient method to improve selectivity of anti-cancer treatment, specifically to folate receptor positive (FR+) cancer cells.

**Optimal PDT Modalities.** The values of model coefficients (Table 3) can also be useful to get a first idea of the optimal PDT modalities. The best photocytotoxic effect was obtained with the **QD 4** on KB cells with an incubation time of 6 hours, a concentration of 8 nM and a fluence of 16 J/cm<sup>2</sup>. Validation experiments were carried out to test the enhanced photocytotoxicity response of the

previously selected PDT condition. Results presented in Figure 5 confirm that **QD 4** and **5**, *i.e.* with folic acid, induce a photocytotoxic efficiency. QDs have already been explored as potential agent for PDT. They are considered to be energy donors and the possibility for energy transfer between QD and cell molecules has a potential to induce generation of ROS although results in the literature have been contradictory.<sup>71</sup> Some studies find statistically significant ROS production from QDs and others none.<sup>72</sup> It appears that QDs with CdSe<sup>73</sup> and CdTe<sup>74</sup> are very efficient at ROS generation while core/shell CdSe/ZnS does not produce significant ROS by itself.<sup>72, 75</sup> Many authors used FRET (Förster Resonance Energy Transfer) mechanism to produce <sup>1</sup>O<sub>2</sub> between a QD and a photosensitizer. The first demonstration of a combination of QD with PDT photosensitizer with FRET to facilitate the excitation of a phthalocyanine was described in 2003 by Samia *et al.*<sup>40</sup> Shi *et al.* proved that a water-soluble CdTe QD with 2-aminoethanethiol as surface stabilizer was not able to produce singlet oxygen by itself but did after excitation of a *meso*-tetra(4-sulfonatophenyl)porphine dihydrochloride compound to CdTe QD *via* electrostatic interaction.<sup>76</sup> Without using FRET mechanism, Samia *et al.* have also demonstrated in 2003 for the first time the emission of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> at 1270 nm generated after photoactivation of hydrophobic capped CdSe QDs under excitation at 488 nm with <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quantum yield of around 5% in toluene.<sup>40</sup> Cooper *et al.* studied the potential of CdSe/ZnS QDs for ROS production.<sup>77</sup> ROS assays in solution were performed by using sensor green while ROS generation inside cells were done by using 5-(and 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H2DCFDA, in Vitrogen). They showed that CdSe/ZnS make ROS although negligible singlet oxygen. Anas 2008 found also formation of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> and that prolonged photoactivation of a CdSe ZnS QD-plasmid DNA conjugate at 512 nm resulted in the breakage and damage of DNA.<sup>78</sup> Clarke *et al.* reported that photoactivation of QD-dopamine complex internalized in A9 cells results also in DNA damage due to the production of <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.<sup>75</sup>

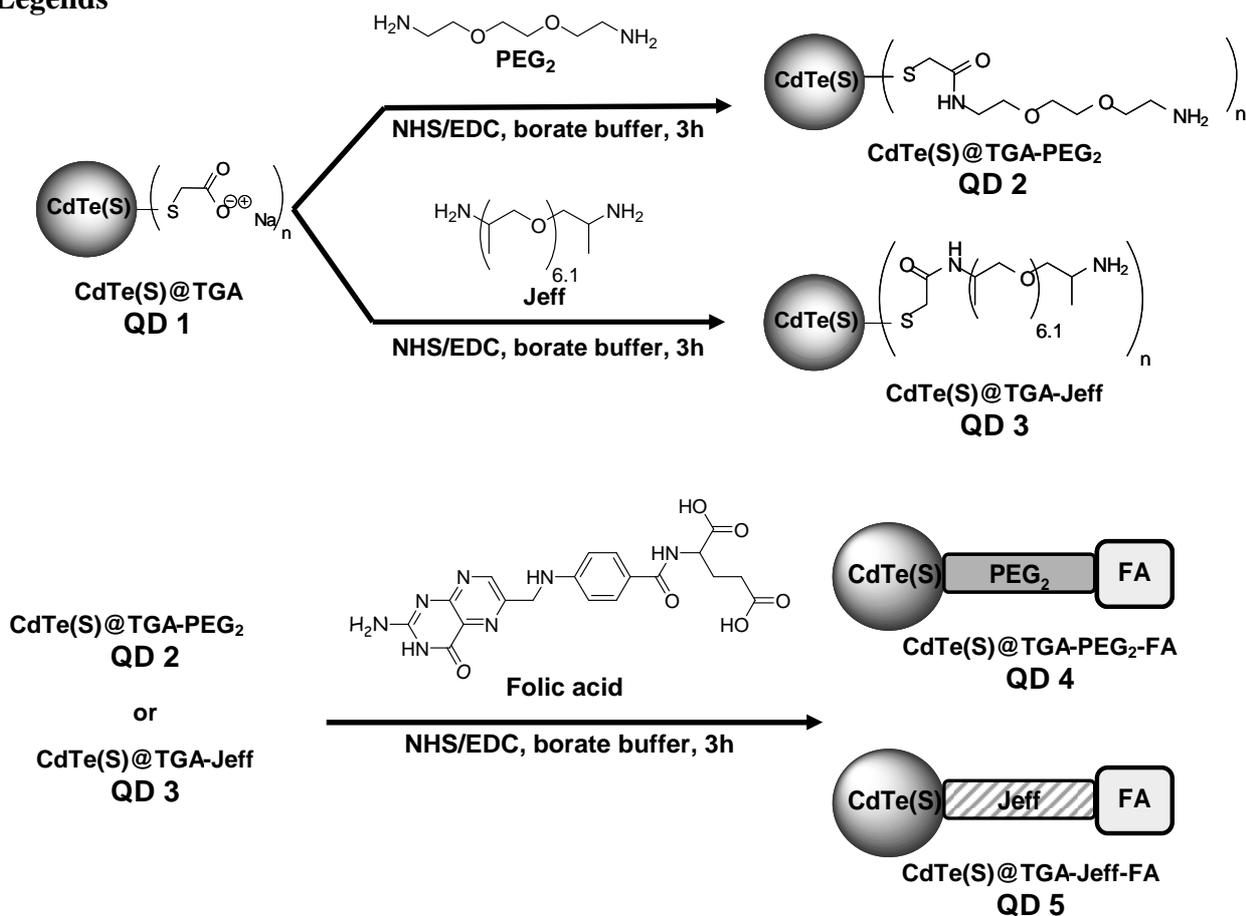
**Conclusion.** We have synthesized and photophysically characterized CdTe(S)-type QDs. Their cytotoxicity and phototoxicity after light irradiation were evaluated, and tend to prove that QDs could be used as photosensitizer for PDT. For concentration under 10 nM, with an incubation time less than 8 hours, QDs show no significant cytotoxicity without light irradiation. On the other hand, we demonstrated that CdTe(S) QDs have photosensitizing properties, leading to a possible use to promote a photodynamic effect. A factor analysis study based on a fractional factorial design of experiments enabled us to determine significant parameters in PDT and a first optimized response of cell mortality with folic acid-conjugated QDs. We therefore hope that **QD 4** could be proposed for improved selectivity of FR-positive cells. Folic acid-conjugated QDs may have some

advantages, in particular because of the large absorbance cross-section and the tunable optical properties.

### *Acknowledgements*

This work was supported by the research funds of the Ligue Nationale Contre le Cancer and the Institut National du Cancer.

## Legends

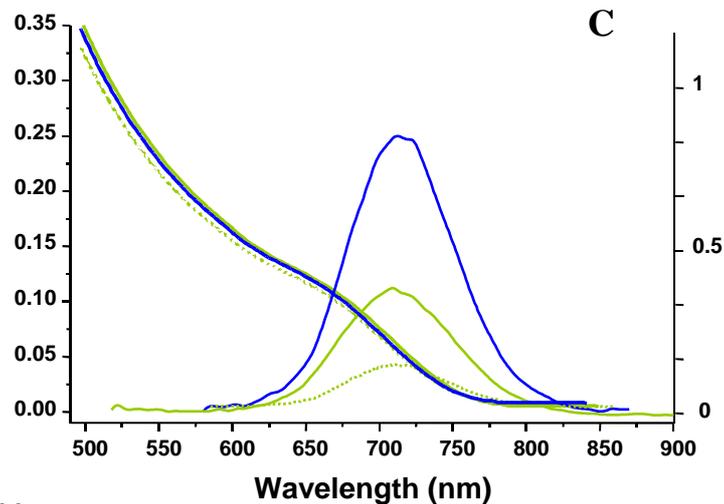
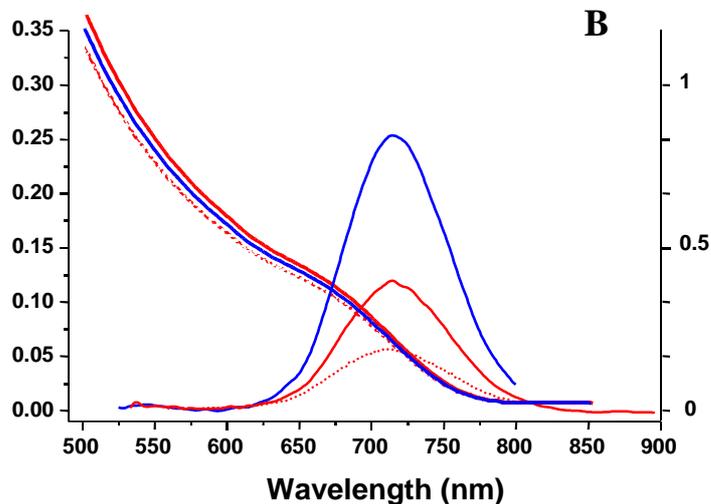


Scheme 1.

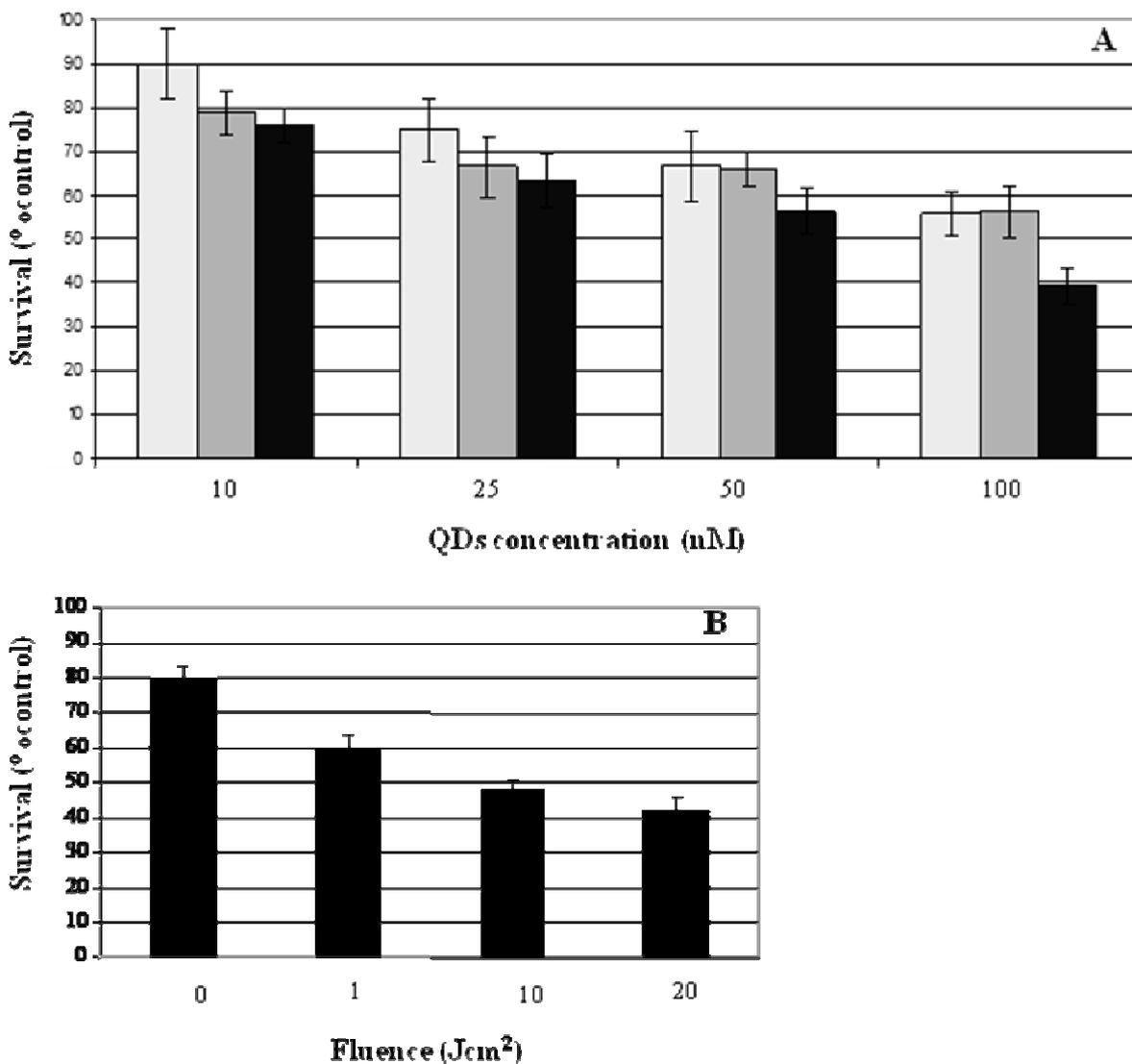
Compound	$\lambda_{\text{abs}} \text{ (nm)} / \epsilon^a$	Fluorescence $\lambda_{\text{max}} \text{ (nm)}^{a,b}$	Fluorescence quantum yield $[\Phi_F]$
1			0.62
2			0.30
3	660 /	710	0.28
4	265		0.20
5			0.15

<sup>a</sup>. All UV-vis and fluorescence spectra were recorded in EtOH

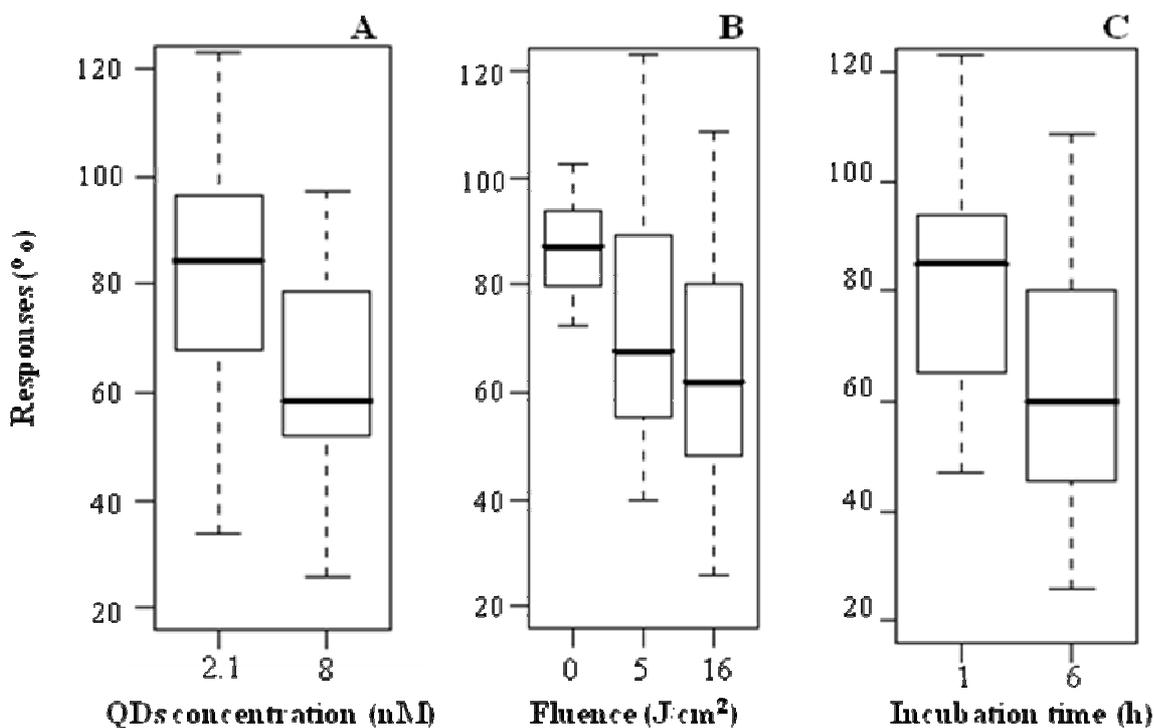
<sup>b</sup>. Fluorescence spectra were recorded after excitation at  $ca 2.5 \cdot 10^{-6}$  nm. Molar extinction coefficients are expressed in  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$



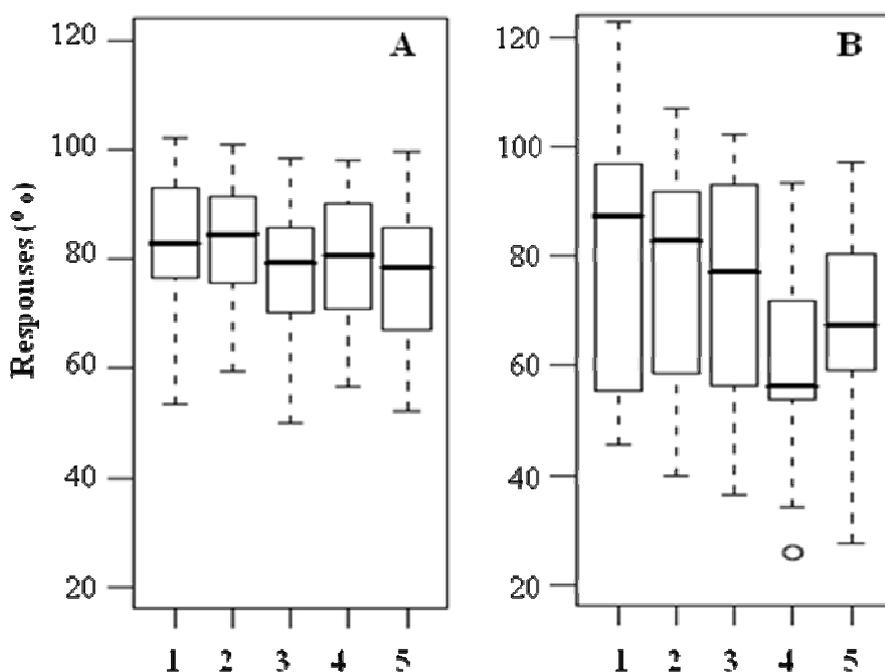
**Figure 1.** (A) Photophysical properties of quantum dots. Molar extinction coefficients and fluorescence quantum yield of **QD 1, 2, 3, 4** and **5**. Typical absorption and normalized fluorescence spectra of : (B) **QD 1** (blue line), **2** (red line), and **4** (red dotted-line). C : **QD 1** (blue line), **3** (green line) and **5** (green dotted-line). (UV-visible spectra normalized relative to absorbance at 550 nm).



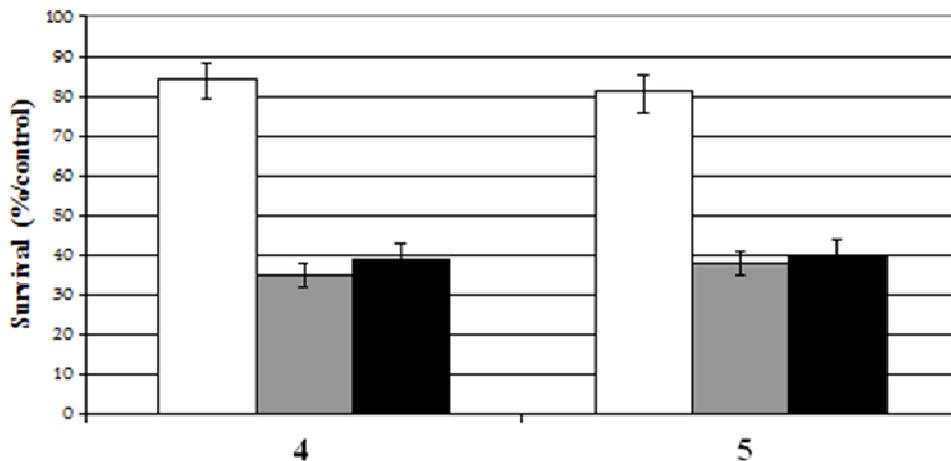
**Figure 2.** (A) Measurement of PDT sensitivity of KB cells treated with FA-conjugated **QD 4**. Cells were exposed to QDs in a concentration range of 10 nM-100 nM for 1 (light grey), 3 (dark grey) and 6 hours (black). (B) Survival curves obtained for cells incubated with QDs at 5 nM for 3 hours incubation before irradiation to increasing doses of light from 1 to 20 J/cm<sup>2</sup>. Measurement of PDT sensitivity for the QDs were obtained by MTT test (data points show the mean  $\pm$  SD, n=6). \* P<0.05 vs. previous fluence dose.



**Figure 3.** Boxplots of the measured responses (viability in %) in relation with the (A) QDs concentration, (B) incubation times and (C) light fluence doses with the photoactive compound. In each case, the other factors take values under the experimental domain as specified in Tables 1 and 2. Measurement of PDT sensitivity for all QDs types at different conditions were obtained by MTT test (data points show the mean  $\pm$  SD, n=6).



**Figure 4.** Boxplots of the measured responses in relation with the QDs type and the cell model (A) HT-29 and (B) KB. Measurement of PDT sensitivity for the QDs at different conditions were obtained by MTT test (data points show the mean  $\pm$  SD, n=6).



**Figure 5.** Measurement of PDT sensitivity of KB cells exposed to **QD 4** and **5** under dark condition (white), irradiated at 515 nm (grey) and 650 nm (black). According to the optimal conditions deduced from RSM, at 515 nm, cells were incubated with QDs (5.6 nM) for 8 hours before light irradiation (fluence of 12 J/cm<sup>2</sup>) at a concentration of 5.6 nM. At 650 nm, cells were irradiated under a fluence of 10.5 J/cm<sup>2</sup> after incubation with **QD 4** and **5** at a concentration of 8 nM. Data represent mean  $\pm$  SD for four independent experiments.

## References

1. W. M. Sharman, C. M. Allen and J. E. Van Lier, Photodynamic therapeutics: Basic principles and clinical applications, *Drug Discovery Today*, 1999, **4**, 507-517.
2. R. K. Pandey, Zhang, G., *Porphyrin Handbook*, Academic Press, San Diego, CA, Kadish, K. M., Smith, K. M., Guillard, R. edn., 2000.
3. I. J. MacDonald and T. J. Dougherty, Basic principles of photodynamic therapy, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2001, **5**, 105-129.
4. A. C. Kübler, Photodynamic therapy, *Medical Laser Application*, 2005, **20**, 37-45.
5. I. J. Mac Donald and T. J. Dougherty, Basic Principles of Photodynamic Therapy, *Porphyrins Phthalocyanines* 2001, **5**, 6.
6. K. R. Weishaupt, C. J. Gomer and T. J. Dougherty, Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo inactivation of a murine tumor, *Cancer Research*, 1976, **36**.
7. J. B. Mitchell, S. McPherson and W. DeGraff, Oxygen dependence of hematoporphyrin derivative-induced photoinactivation of Chinese hamster cells, *Cancer Research*, 1985, **45**, 2008-2011.
8. A. P. Castano, Q. Liu and M. R. Hamblin, A green fluorescent protein-expressing murine tumour but not its wild-type counterpart is cured by photodynamic therapy, *British Journal of Cancer*, 2006, **94**, 391-397.
9. N. Solban, I. Rizvi and T. Hasan, Targeted photodynamic therapy, *Lasers in Surgery and Medicine*, 2006, **38**, 522-531.
10. J. P. Taquet, C. Frochot, V. Manneville and M. Barberi-Heyob, Phthalocyanines covalently bound to biomolecules for a targeted photodynamic therapy, *Current Medicinal Chemistry*, 2007, **14**, 1673-1687.
11. T. J. Dougherty, Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors, *Photochemistry and Photobiology*, 1987, **45**, 879-889.
12. M. B. Vrouenraets, G. W. M. Visser, G. B. Snow and G. A. M. S. Van Dongen, Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy, *Anticancer Research*, 2003, **23**, 505-522.
13. W. M. Sharman, J. E. Van Lier and C. M. Allen, Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004, **56**, 53-76.
14. P. Garin-Chesa, I. Campbell, P. E. Saigo, J. L. Lewis Jr, L. J. Old and W. J. Rettig, Trophoblast and ovarian cancer antigen LK26: Sensitivity and specificity in immunopathology and molecular identification as a folate-binding protein, *American Journal of Pathology*, 1993, **142**, 557-567.
15. Y. Lu and P. S. Low, Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, **54**, 675-693.
16. B. A. Kamen and A. Capdevila, Receptor-mediated folate accumulation is regulated by the cellular folate content, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986, **83**, 5983-5987.
17. C. P. Leamon and P. S. Low, Delivery of macromolecules into living cells: A method that exploits folate receptor endocytosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, **88**, 5572-5576.
18. J. Sudimack and R. J. Lee, Targeted drug delivery via the folate receptor, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2000, **41**, 147-162.
19. P. S. Low and A. C. Antony, Folate receptor-targeted drugs for cancer and inflammatory diseases, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004, **56**, 1055-1058.
20. N. Parker, M. J. Turk, E. Westrick, J. D. Lewis, P. S. Low and C. P. Leamon, Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay, *Analytical Biochemistry*, 2005, **338**, 284-293.
21. J. J. Turek, C. P. Leamon and P. S. Low, Endocytosis of folate-protein conjugates: Ultrastructural localization in KB cells, *Journal of Cell Science*, 1993, **106**, 423-430.

22. C. P. Leamon and J. A. Reddy, Folate-targeted chemotherapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004, **56**, 1127-1141.
23. S. Sabharanjak and S. Mayor, Folate receptor endocytosis and trafficking, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004, **56**, 1099-1109.
24. E. I. Segal and P. S. Low, Tumor detection using folate receptor-targeted imaging agents, *Cancer and Metastasis Reviews*, 2008, **27**, 655-664.
25. U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke and T. Nann, Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels, *Nature Methods*, 2008, **5**, 763-775.
26. R. Bakalova, H. Ohba, Z. Zhelev, M. Ishikawa and Y. Baba, Quantum dots as photosensitizers?, *Nature Biotechnology*, 2004, **22**, 1360-1361.
27. A. P. Alivisatos, Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals, *Journal of Physical Chemistry*, 1996, **100**, 13226-13239.
28. Z. A. Peng and X. Peng, Formation of high-quality CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals using CdO as precursor *Journal of the American Chemical Society*, 2001, **123**, 183-184.
29. W. W. Yu, L. Qu, W. Guo and X. Peng, Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals, *Chemistry of Materials*, 2003, **15**, 2854-2860.
30. D. V. Talapin, S. Haubold, A. L. Rogach, A. Kornowski, M. Haase and H. Weller, A novel organometallic synthesis of highly luminescent CdTe nanocrystals, *Journal of Physical Chemistry B*, 2001, **105**, 2260-2263.
31. D. V. Talapin, A. L. Rogach, I. Mekis, S. Haubold, A. Kornowski, M. Haase and H. Weller, Synthesis and surface modification of amino-stabilized CdSe, CdTe and InP nanocrystals, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2002, **202**, 145-154.
32. D. Battaglia and X. Peng, Formation of High Quality InP and InAs Nanocrystals in a Noncoordinating Solvent, *Nano Letters*, 2002, **2**, 1027-1030.
33. J. S. Steckel, S. Coe-Sullivan, V. Bulovic and M. G. Bawendi, 1.3  $\mu\text{m}$  to 1.55  $\mu\text{m}$  Tunable Electroluminescence from PbSe Quantum Dots Embedded within an Organic Device, *Advanced Materials*, 2003, **15**, 1862-1866.
34. M. Bruchez Jr, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss and A. P. Alivisatos, Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels, *Science*, 1998, **281**, 2013-2016.
35. X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir and S. Weiss, Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics, *Science*, 2005, **307**, 538-544.
36. A. Sukhanova, J. Devy, L. Venteo, H. Kaplan, M. Artemyev, V. Oleinikov, D. Klinov, M. Pluot, J. H. M. Cohen and I. Nabiev, Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells, *Analytical Biochemistry*, 2004, **324**, 60-67.
37. B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou and A. Libchaber, In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles, *Science*, 2002, **298**, 1759-1762.
38. D. V. Talapin, I. Mekis, S. Gatzinger, A. Kornowski, O. Benson and H. Weller, CdSe/CdS/ZnS and CdSe/ZnSe/ZnS core-shell-shell nanocrystals, *Journal of Physical Chemistry B*, 2004, **108**, 18826-18831.
39. Y. He, L. M. Sai, H. T. Lu, M. Hu, W. Y. Lai, Q. L. Fan, L. H. Wang and W. Huang, Microwave-assisted synthesis of water-dispersed CdTe nanocrystals with high luminescent efficiency and narrow size distribution, *Chemistry of Materials*, 2007, **19**, 359-365.
40. A. C. S. Samia, X. Chen and C. Burda, Semiconductor Quantum Dots for Photodynamic Therapy, *Journal of the American Chemical Society*, 2003, **125**, 15736-15737.
41. R. Bakalova, H. Ohba, Z. Zhelev, T. Nagase, R. Jose, M. Ishikawa and Y. Baba, Quantum dot anti-CD conjugates: Are they potential photosensitizers or potentiators of classical photosensitizing agents in photodynamic therapy of cancer?, *Nano Letters*, 2004, **4**, 1567-1573.

42. J. M. Hsieh, M. L. Ho, P. W. Wu, P. T. Chou, T. T. Tsai and Y. Chi, Iridium-complex modified CdSe/ZnS quantum dots; a conceptual design for bifunctionality toward imaging and photosensitization, *Chemical Communications*, 2006, **6**, 615-617.
43. R. Schneider, F. Schmitt, C. Frochot, Y. Fort, N. Lourette, F. Guillemin, J. F. M<sup>1</sup>/<sub>4</sub>ller and M. Barberi-Heyob, Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2005, **13**, 2799-2808.
44. J. Gravier, R. Schneider, C. Frochot, T. Bastogne, F. Schmitt, J. Didelon, F. Guillemin and M. Barberi-Heyob, Improvement of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-like photosensitizer selectivity with folate-based targeted delivery. Synthesis and in vivo delivery studies, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008, **51**, 3867-3877.
45. L. Tirand, T. Bastogne, D. Bechet, M. Linder, N. Thomas, C. Frochot, F. Guillemin and M. Barberi-Heyob, Response Surface Methodology: An Extensive Potential to Optimize in vivo Photodynamic Therapy Conditions, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2009, **75**, 244-252.
46. J. Guo, W. Yang and C. Wang, Systematic study of the photoluminescence dependence of thiol-capped CdTe nanocrystals on the reaction conditions, *Journal of Physical Chemistry B*, 2005, **109**, 17467-17473.
47. W. Mao, J. Guo, W. Yang, C. Wang, J. He and J. Chen, Synthesis of high-quality near-infrared-emitting CdTeS alloyed quantum dots via the hydrothermal method, *Nanotechnology*, 2007, **18**.
48. A. L. Rogach, Nanocrystalline CdTe and CdTe(S) particles: Wet chemical preparation, size-dependent optical properties and perspectives of optoelectronic applications, *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology*, 2000, **69**, 435-440.
49. S. Wang, R. J. Lee, C. J. Mathias, M. A. Green and P. S. Low, Synthesis, purification, and tumor cell uptake of <sup>67</sup>Ga-deferoxamine-folate, a potential radiopharmaceutical for tumor imaging, *Bioconjugate Chemistry*, 1996, **7**, 56-62.
50. S. Wang and P. S. Low, Folate-mediated targeting of antineoplastic drugs, imaging agents, and nucleic acids to cancer cells, *Journal of Controlled Release*, 1998, **53**, 39-48.
51. Y. Wang, J. Zheng, Z. Zhang, C. Yuan and D. Fu, CdTe nanocrystals as luminescent probes for detecting ATP, folic acid and l-cysteine in aqueous solution, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2009, **342**, 102-106.
52. K. Manzoor, S. Johny, D. Thomas, S. Setua, D. Menon and S. Nair, Bio-conjugated luminescent quantum dots of doped ZnS: A cyto-friendly system for targeted cancer imaging, *Nanotechnology*, 2009, **20**.
53. J. Liang, S. Huang, D. Zeng, Z. He, X. Ji, X. Ai and H. Yang, CdSe quantum dots as luminescent probes for spironolactone determination, *Talanta*, 2006, **69**, 126-130.
54. J. K. Jaiswal, H. Mattoussi, J. M. Mauro and S. M. Simon, Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates, *Nature Biotechnology*, 2003, **21**, 47-51.
55. D. R. Larson, W. R. Zipfel, R. M. Williams, S. W. Clark, M. P. Bruchez, F. W. Wise and W. W. Webb, Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo, *Science*, 2003, **300**, 1434-1436.
56. W. C. W. Chan, D. J. Maxwell, X. Gao, R. E. Bailey, M. Han and S. Nie, Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging, *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, **13**, 40-46.
57. P. Alivisatos, The use of nanocrystals in biological detection, *Nature Biotechnology*, 2004, **22**, 47-52.
58. J. Zheng, A. A. Ghazani, Q. Song, S. Mardyani, W. C. W. Chan and C. Wang, Cellular imaging and surface marker labeling of hematopoietic cells using quantum dot bioconjugates, *Laboratory Hematology*, 2006, **12**, 94-98.

59. L. Braydich-Stolle, S. Hussain, J. J. Schlager and M. C. Hofmann, In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells, *Toxicological Sciences*, 2005, **88**, 412-419.
60. R. Hardman, A toxicologic review of quantum dots: Toxicity depends on physicochemical and environmental factors, *Environmental Health Perspectives*, 2006, **114**, 165-172.
61. S. C. Hsieh, F. F. Wang, S. C. Hung, Y. J. Chen and Y. J. Wang, The internalized CdSe/ZnS quantum dots impair the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells, *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 2006, **79**, 95-101.
62. J. Lovric, S. J. Cho, F. M. Winnik and D. Maysinger, Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death, *Chemistry and Biology*, 2005, **12**, 1227-1234.
63. O. Seleverstov, O. Zabirnyk, M. Zscharnack, L. Bulavina, M. Nowicki, J. M. Heinrich, M. Yezhelyev, F. Emmrich, R. O'Regan and A. Bader, Quantum dots for human mesenchymal stem cells labeling, a size-dependent autophagy activation, *Nano Letters*, 2006, **6**, 2826-2832.
64. A. Abuchowski, T. Van Es, N. C. Palczuk and F. F. Davis, Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol, *Journal of Biological Chemistry*, 1977, **252**, 3578-3581.
65. T. M. Allen, G. A. Austin, A. Chonn, L. Lin and K. C. Lee, Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: Influence of liposome composition and size, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1991, **1061**, 56-64.
66. T. J. Daou, L. Li, P. Reiss, V. Jossierand and I. Texier, Effect of poly(ethylene glycol) length on the in vivo behavior of coated quantum dots, *Langmuir*, 2009, **25**, 3040-3044.
67. A. Gabizon, H. Shmeeda and Y. Barenholz, Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin: Review of animal and human studies, *Clinical Pharmacokinetics*, 2003, **42**, 419-436.
68. G. Kostenich, N. Livnah, T. A. Bonasera, T. Yechezkel, Y. Salitra, P. Litman, S. Kimel and A. Orenstein, Targeting small-cell lung cancer with novel fluorescent analogs of somatostatin, *Lung Cancer*, 2005, **50**, 319-328.
69. A. Engel, S. K. Chatterjee, A. Al-Arifi and P. Nuhn, Influence of Spacer Length on the Agglutination of Glycolipid-Incorporated Liposomes by ConA as Model Membrane, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003, **92**, 2229-2235.
70. C. M. Paulos, J. A. Reddy, C. P. Leamon, M. J. Turk and P. S. Low, Ligand binding and kinetics of folate receptor recycling in vivo: Impact on receptor-mediated drug delivery, *Molecular Pharmacology*, 2004, **66**, 1406-1414.
71. P. Juzenas, W. Chen, Y. P. Sun, M. A. N. Coelho, R. Generalov, N. Generalova and I. L. Christensen, Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, **60**, 1600-1614.
72. B. I. Ipe, M. Lehnig and C. M. Niemeyer, On the generation of free radical species from quantum dots, *Small*, 2005, **1**, 706-709.
73. W. H. Chan, N. H. Shiao and P. Z. Lu, CdSe quantum dots induce apoptosis in human neuroblastoma cells via mitochondrial-dependent pathways and inhibition of survival signals, *Toxicology Letters*, 2006, **167**, 191-200.
74. A. O. Choi, S. J. Ju, J. Desbarats, J. Lovric and D. Maysinger, Quantum dot-induced cell death involves Fas upregulation and lipid peroxidation in human neuroblastoma cells, *Journal of Nanobiotechnology*, 2007, **5**.
75. S. J. Clarke, C. A. Hollmann, Z. Zhang, D. Suffern, S. E. Bradforth, N. M. Dimitrijevic, W. G. Minarik and J. L. Nadeau, Photophysics of dopamine-modified quantum dots and effects on biological systems, *Nature Materials*, 2006, **5**, 409-417.
76. L. Shi, V. De Paoli, N. Rosenzweig and Z. Rosenzweig, Synthesis and application of quantum dots FRET-based protease sensors, *Journal of the American Chemical Society*, 2006, **128**, 10378-10379.

77. D. R. Cooper, N. M. Dimitrijevic and J. L. Nadeau, Photosensitization of CdSe/ZnS QDs and reliability of assays for reactive oxygen species production, *Nanoscale*, 2010, **2**, 114-121.
78. A. Anas, H. Akita, H. Harashima, T. Itoh, M. Ishikawa and V. Biju, Photosensitized breakage and damage of DNA by CdSe-ZnS quantum dots, *Journal of Physical Chemistry B*, 2008, **112**, 10005-10011.

*Conclusions*

*&*

*Perspectives*



## Conclusions & Perspectives

Dans le cadre d'une amélioration de l'efficacité de la PDT, les choix du PS utilisé, la stratégie d'adressage et/ou de vectorisation et de la dosimétrie s'avèrent cruciaux. En effet, les propriétés photocytotoxiques du PS sont directement liées à ses propriétés photophysiques, comme son absorption et sa capacité à générer des EROs. De même, la distribution tissulaire du PS dépend directement de sa sélectivité vis-à-vis des cellules tumorales. Or, il est possible d'améliorer les résultats d'un traitement par PDT par l'utilisation de nouveaux PSs adaptés à une utilisation en PDT anticancéreuse et de molécules d'adressages spécifiques des caractéristiques phénotypiques des tumeurs, ainsi que de vecteurs transportant efficacement ces PS. De plus, l'efficacité du traitement sera également dépendante du mode d'illumination de la tumeur (dose de lumière et mode d'irradiation).

Le premier thème abordé au cours de ce travail de thèse a été la fonctionnalisation de dendrimères PAMAM par des PSs de type porphyrines. Après avoir fonctionnalisé des dendrimères PAMAM de 2<sup>ème</sup> génération sur l'ensemble de leurs fonctions périphériques, nous avons démontré la faisabilité d'un couplage sélectif de porphyrines sur des dendrimères de demi-génération. Ces composés ont été obtenus avec de très bons rendements, et l'étude des propriétés photophysiques des PSs conjugués, à savoir l'absorbance et la fluorescence, a permis de démontrer qu'elles n'étaient pas altérées. L'étude du rendement quantique de production en oxygène singulet ( $\Phi_{\Delta}$ ) a montré qu'un phénomène d'agrégation des PSs peut se produire, dû à une proximité spatiale des composés photosensibles. Cependant, une formulation de ces composés PAMAM/porphyrines comprenant 0,2% de bromure de cetyltriméthylammonium, un surfactant cationique, permet d'éradiquer ce phénomène et de retrouver un  $\Phi_{\Delta}$  très proche de celui de la porphyrine non conjuguée prise comme référence.

Cette nouvelle classe de dendrimères asymétriques fonctionnalisés par des PSs de types porphyrines se posent comme des éléments très prometteurs pour la construction de dendrimères fonctionnalisés sélectivement pour une application en PDT anticancéreuse.

La deuxième approche abordée au cours de ce travail de thèse a porté sur l'utilisation d'une nouvelle classe de PS, les QDs, les premières études mentionnant l'utilisation de QDs pour des applications en PDT datent de moins de dix ans. Pour cela, nous avons synthétisé des QDs de type CdTe(S) dont les propriétés d'absorption et d'émission de fluorescence sont situées dans le rouge et proche infrarouge afin de correspondre à la fenêtre thérapeutique de la PDT anticancéreuse. Idéalement, les QDs que nous avons préparés présentent un pic

excitonique situé entre 655 et 665 nm afin de correspondre aux conditions optimales en clinique (bonne pénétration de la lumière dans les tissus). Le protocole de synthèse développé nous a permis d'obtenir des QDs hydrophiles de type CdTe(S) stabilisés par un ligand de type acide thioglycolique (ATG). Le choix de ce ligand a permis d'élaborer des QDs efficacement stabilisés grâce à la forte interaction entre la surface du QD et l'extrémité thiol de ce ligand. De plus, ce choix permet d'obtenir des QDs hydrophiles grâce à l'extrémité carboxyle qui va servir de site de greffage pour les conjugaisons futures à des molécules d'adressage *via* la création de liaisons amides. Nous avons également optimisé l'application de l'électrophorèse capillaire de zone à la caractérisation de ces QDs CdTe(S)@ATG. Cette méthode rapide, facile à mettre en œuvre, peu coûteuse en moyen et en produit, nous a permis de caractériser l'homogénéité des échantillons de QDs issus des phases de purification par précipitation sélective. En effet, la mobilité électrophorétique ( $\mu_{ep}$ ) d'un QD est fonction de sa taille, et chaque population homogène en taille de QD aura donc la même  $\mu_{ep}$ . Ainsi, après identification des différentes populations de QDs contenues dans un mélange réactionnel polydisperse, il est alors possible d'identifier et d'évaluer la dispersité en taille de chaque fraction issue des étapes de précipitations sélectives, et donc l'efficacité des étapes de purification.

La troisième approche abordée a été l'étude de l'adressage des QDs par l'AF. Dans un premier temps, nous avons couplé avec succès l'AF aux QDs *via* deux bras espaceurs de type polyéthylène glycol, la 2,2'-éthylènedioxy-*bis*-éthylamine (PEG<sub>2</sub>) et la Jeffamine D-400 (Jeff). Des tests *in vitro* évaluant la photocytotoxicité, ont validé l'activité photodynamique des QDs. Afin d'évaluer les facteurs influençant l'activité photodynamique des QDs, nous avons mené une étude *in vitro* des modalités de photocytotoxicité de ces composés suivant la méthodologie des plans d'expérience. Cette approche nous a permis de déterminer l'impact des différents facteurs expérimentaux (adressage par l'AF, concentration en QD, fluence, temps d'incubation, longueur d'onde d'excitation et lignée cellulaire) sur la réponse cellulaire, et nous a permis plus particulièrement de mettre en évidence l'apport d'un adressage de PS par l'acide folique pour une PDT visant des lignées cellulaire surexprimant le récepteur à AF (RF). Les résultats obtenus par analyse de la variance (ANOVA) ont démontré que pour une concentration inférieure à 10 nM, les QDs ne présentent pas de cytotoxicité à l'obscurité notable sur aucune des lignées cellulaires testées. Bien qu'une faible activité photodynamique n'ait été trouvée pour une concentration en QDs de 2,1 nM, une augmentation de la dose à 8 nM a permis de mettre en évidence une activité photodynamique accrue des QDs, caractérisée

par un profil de réponse cellulaire fluence-dépendant. Les résultats des conjugués QD-AF ont également montré une différence statistique significative de réponse cellulaire entre les lignées KB et HT-29, mettant ainsi en évidence l'impact d'un adressage par l'AF envers des lignées tumorales FR+. L'approche statistique offerte par les plans d'expérience a également permis d'optimiser les conditions expérimentales de PDT *in vitro*, et nous a ainsi permis de valider l'intérêt d'une utilisation de conjugués QD-AF dans le cadre d'une stratégie PDT anticancéreuse.

Le vecteur choisi, les dendrimères de type PAMAM, joue à la fois le rôle de vecteur hydrophile de PS hydrophobes, mais aussi de plateforme multifonctionnelle. Sa fonctionnalisation asymétrique ouvre en effet la voie à une potentialisation de ce type de structure, notamment par la fonctionnalisation des fonctions périphériques restées libres par diverses molécules d'adressage. Néanmoins, le développement de la stratégie divergente/divergente de fonctionnalisation asymétrique de dendrimères par des PSs reste d'actualité, que ce soit dans l'optimisation du nombre et du type de structure (PS et agent d'adressage) à greffer à sa surface, ou du contrôle de la géolocalisation des PSs couplés afin de se dédouaner complètement des phénomènes d'agrégation, très souvent préjudiciables pour leurs propriétés photophysiques.

L'utilisation des QDs comme agents photosensibilisants potentiels a abouti au développement de protocoles de synthèses permettant l'obtention de QDs adaptés à la fenêtre thérapeutique de la PDT anticancéreuse. Cette approche a été assez peu développée, et seuls quelques travaux évoquent la possible utilisation directe de QDs comme PS. En effet, la grande majorité des travaux évaluant l'intérêt d'utiliser des QDs en PDT suggèrent leur emploi dans une stratégie FRET (*Förster Resonance Energy Transfert*), où le QD, couplé à un PS organique, agirait comme donneur d'énergie. Il serait également nécessaire de mener des études de l'impact sur l'activité photodynamique de la composition et la structure du cœur du QD, mais également de la composition de sa surface, que ce soit par ajout de couches de passivation ou un choix différent des ligands stabilisateurs.

De plus, la composition actuelle des QDs, qui sont majoritairement à base de semi-conducteurs constitué de métaux lourds, est un frein potentiel à leur utilisation *in vivo*. L'élaboration de QDs résistant aux dégradations rencontrées en milieu biologique ou alors composés de métaux moins toxiques nécessite de poursuivre les recherches. Diverses approches peuvent être alors envisagées, comme l'utilisation de compositions plus résistantes

que CdTe aux dégradations, comme les phosphures d'indium InP, où le caractère covalent prononcé de la liaison In-P peut être gage d'un relargage moindre des composants dans le milieu biologique. Il est également possible d'utiliser des métaux moins toxiques que le cadmium, comme le zinc (principalement ZnO et ZnS), soit comme structure de cœur du QDs, soit comme couche de passivation isolant le cœur à base de Cd du QD du milieu extérieur. Cette passivation peut être également réalisée par des matériaux inertes comme la silice ou des polymères, qui vont protéger le QD de toute dégradation et ainsi prévenir tout relargage de composés toxiques, permettant ainsi au QD de préserver son intégrité jusqu'à son élimination par l'organisme.

L'adressage par l'AF a permis une amélioration *in vitro* de l'efficacité du traitement *via* les QDs fonctionnalisés. Il serait nécessaire d'approfondir notre connaissance sur les mécanismes générant l'effet photocytotoxique des QDs, notamment déterminer lesquels sont prépondérant entre ceux de type I et ceux de type II. Une étude de ces deux mécanismes est possible par l'utilisation *in vitro* de quenchers, physiques ou chimiques, spécifiques à  $^1\text{O}_2$  et aux autres EROs afin de déterminer l'importance de chacun de ces deux phénomènes dans l'activité photodynamique du QD. Il est également possible d'utiliser des sondes fluorescentes qui, après avoir réagi spécifiquement avec  $^1\text{O}_2$  ou une autre ERO, verront leur signal d'émission de fluorescence altéré (augmentation ou diminution de l'intensité du signal), ce qui va permettre un suivi dans le temps de la cinétique d'activité photodynamique du QD.

Une étude portant sur la localisation intracellulaire de ces composés permettrait de mieux comprendre leur action cytotoxique. En effet, il est possible par microscopie confocale de suivre en temps réel la distribution intracellulaire des PSs, et ainsi déterminer les zones d'action de la PDT induite par ces PSs. Cette étude permettrait de déterminer non seulement quels organites sont affectés par ce traitement, mais également, si la distribution intracellulaire évolue au cours du temps, de déterminer l'instant où le traitement sera le plus efficace.

Dans un contexte où l'utilisation des nanoparticules, en particulier dans le domaine de la santé, est largement controversée, il serait nécessaire d'évaluer, à cause de leur toxicité intrinsèque, le devenir à plus long terme des QDs à base de métaux lourds. Peu d'études portent sur cet aspect, notamment du fait du délai nécessaire à la dégradation et l'accumulation des résidus de ces QDs dans les tissus, et à l'apparition des pathologies liées à une intoxication par des métaux lourds. En effet, la majorité de la littérature traitant de ce

sujet n'étudie que rarement la cytotoxicité des QDs au-delà de 48 h (à l'exception d'une étude sur les embryons de poisson zèbre sur 120 heures)<sup>434</sup> et le plus souvent au cours d'études réalisées *in vitro*. Un suivi de l'élimination du cadmium serait possible en dosant la quantité éliminée par les voies naturelles, et ainsi déterminer la quantité de Cd qui s'accumule dans l'organisme. Il serait alors possible de déterminer, pour un type de QD donné, le ratio Cd injecté/Cd accumulé, et en corrélation avec les résultats issus des travaux portant sur la toxicité du Cd, durant lesquels les doses létales de cet éléments ont été déterminées, il serait alors possible d'évaluer la quantité de QD pour laquelle l'accumulation de Cd s'avère dangereuse pour la santé.

D'un point de vue environnemental, le devenir des quantum dots mérite beaucoup d'attention. Le cadmium qu'ils contiennent, rejeté par l'organisme, va contaminer les stations d'épuration, et notamment s'accumuler dans les boues issues du traitement des eaux. Ces boues vont alors pouvoir polluer les sols aussi bien en surface qu'en profondeur, de même que les cours d'eau et les nappes phréatiques. Le cadmium va alors pouvoir être absorbé par la matière organique présente dans les sols, et par conséquent être absorbé par les végétaux, ce qui induira une intoxication de tous les organismes qui en consomment. Suivant ce principe, en plus d'être une réelle menace pour de nombreux écosystèmes, le risque d'intoxication de l'homme s'en retrouve fortement augmenté, le cadmium pouvant être bio-accumulé dans les viandes des animaux de prairies, les poissons, les crevettes les moules et les huîtres.

Dans le but d'éviter ces problèmes de cytotoxicité, de nouvelles nanoparticules ont été développées dans le cadre d'une application à la PDT. Nous pouvons citer celles à base de matériaux inertes comme la silice qui peuvent inclure des PS organique mais aussi un cœur à base métaux lourd, qui serait alors isolé du milieu et préviendrait ainsi tout largage, dans le cadre d'une stratégie bimodale (PDT couplée à de l'imagerie par résonance magnétique).

La sélectivité accrue du PS envers les tissus tumoraux pourrait être abordée sur un plan plurimodal. En effet, que ce soit pour des vecteurs de type dendrimères ou des PSs de type QDs, leurs surface multifonctionnalisable offre la possibilité de coupler plusieurs molécules d'adressage afin d'en accroître la sélectivité. En plus de la multiplication potentielle du type et du nombre d'agents de reconnaissance cellulaire, il serait également possible d'envisager l'emploi de peptides permettant de cibler spécifiquement un compartiment cellulaire comme le noyau, et ainsi adresser le PS au niveau de la partie la plus sensible de la cellule.



*Références*  
*bibliographiques*



## Références

1. Fokam, P.; Roy, D. C., PDT : concepts, mécanismes d'action et application en greffe de cellules souches. *Ann. Biol. Clin. Québec* **2006**, *43*, 28-33.
2. Raab, O., Über die Wirkung fluorescierender Stoffe auf Infusoria. *Z. Biol.* **1900**, *39*, 524-530.
3. Tappeiner, H. V.; Jesonek, A., Therapeutische versuch mit fluoreszeirender Stoff. *Muchen Med. Wehnschr.* **1903**, *1*, 2042-2044.
4. Tappeiner, H. V.; Jodlbauer, A., Über die Wirkung der Photodynamischer (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme. *Deutsche Arch. Klin. Med.* **1904**, *80*, 427.
5. Hasselbach, K. A., Untersuchungen über die Wirkung des Lichtes auf Blutfarbstoffe und rote Blutkörperchen wie auch über optische Sensibilisation für diese Lichtwirkungen. . *Biochem. Z.* **1909**, *19*, 435.
6. Hausmann, W., Die sensibilisierende Wirkung des Hematoporphyrins. *Biochem. Z.* **1911**, *30* (276-316).
7. Policard, A., Etude sur les aspects offerts par des tumeurs expérimentales examinées à la lumière de Wood. *C. R. Soc. Biol.* **1924**, *91*, 1423-1424.
8. Auler, H.; Banzer, G., Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. *Z. Krebsforschung* **1942**, *53*, 65-68.
9. Figge, F. H. J.; Weiland, G. S.; Manganiello, L. J., Cancer detection and therapy, affinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1948**, *68*, 640-641.
10. Schwartz, S.; Absolon, K.; Vermund, H., Some relationships of porphyrins, x-rays and tumors. *Med. Bull.* **1955**, *68*, 7-13.
11. Lipson, R. L.; Baldes, E. J., The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. *Arch. Dermatol.* **1960**, *82*, 508-516.
12. Dougherty, T. J.; Grindey, G. B.; Fiel, R., Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *Journal of the National Cancer Institute* **1975**, *55* (1), 115-121.
13. Dougherty, T. J.; Kaufman, J. E.; Goldfarb, A., Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Research* **1978**, *38* (8), 2628-2635.
14. Dougherty, T. J., Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. *Photochemistry and Photobiology* **1987**, *45* (6), 879-889.
15. Brown, S. B.; Brown, E. A.; Walker, I., The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncology* **2004**, *5* (8), 497-508.
16. Plaetzer, K.; Krammer, B.; Berlanda, J.; Berr, F.; Kiesslich, T., Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. *Lasers in Medical Science* **2009**, *24* (2), 259-268.
17. Sutedja, T. G.; Postmus, P. E., Photodynamic therapy in lung cancer. A review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1996**, *36* (2), 199-204.
18. Kübler, A. C.; Haase, T.; Staff, C.; Kahle, B.; Rheinwald, M.; Mühling, J., Photodynamic therapy of primary nonmelanomatous skin tumours of the head and neck. *Lasers in Surgery and Medicine* **1999**, *25* (1), 60-68.
19. Lam, M.; Oleinick, N. L.; Nieminen, A. L., Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells: Reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276* (50), 47379-47386.
20. Weersink, R. A.; Bogaards, A.; Gertner, M.; Davidson, S. R. H.; Zhang, K.; Netchey, G.; Trachtenberg, J.; Wilson, B. C., Techniques for delivery and monitoring of TOOKAD

(WST09)-mediated photodynamic therapy of the prostate: Clinical experience and practicalities. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2005**, *79* (3 SPEC. ISS.), 211-222.

21. Berger, A. P.; Steiner, H.; Stenzl, A.; Akkad, T.; Bartsch, G.; Holzl, L., Photodynamic therapy with intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid for patients with recurrent superficial bladder cancer: A single-center study. *Urology* **2003**, *61* (2), 338-341.

22. Nseyo, U. O.; Lamm, D. L., Immunotherapy of bladder cancer. *Seminars in Surgical Oncology* **1997**, *13* (5), 342-349.

23. Calzavara-Pinton, P. G., Repetitive photodynamic therapy with topical 5-aminolaevulinic acid as an appropriate approach to the routine treatment of superficial non-melanoma skin tumours. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1995**, *29* (1), 53-57.

24. Delasalle, F.; Mordon, S.; Thomas, P., Photothérapie dynamique des angiomes plans. *Nouvelles dermatologies* **2008**, *27*, 25-26.

25. Ghazi, N. G.; Jabbour, N. M.; De La Cruz, Z. C.; Green, W. R., Clinicopathologic studies of age-related macular degeneration with classic subfoveal choroidal neovascularization treated with photodynamic therapy. *Retina* **2001**, *21* (5), 478-486.

26. Sbarra, M. S.; Arciola, C. R.; Di Poto, A.; Saino, E.; Rohde, H.; Speziale, P.; Visai, L., The photodynamic effect of tetra-substituted N-methyl-pyridyl-porphine combined with the action of vancomycin or host defense mechanisms disrupts *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *International Journal of Artificial Organs* **2009**, *32* (9), 574-583.

27. Lüthi, M.; Besic Gyenge, E.; Engström, M.; Bredell, M.; Grätz, K.; Walt, H.; Gmür, R.; Maake, C., Hypericin- and mTHPC-mediated photodynamic therapy for the treatment of cariogenic bacteria. *Medical Laser Application* **2009**, *24* (4), 227-236.

28. Ochsner, M., Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1997**, *39* (1), 1-18.

29. Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbek, M.; Moan, J.; Peng, Q., Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute* **1998**, *90* (12), 889-905.

30. Vogl, T. J.; Eichler, K.; Mack, M. G.; Zangos, S.; Herzog, C.; Thalhammer, A.; Engelmann, K., Interstitial photodynamic laser therapy in interventional oncology. *European Radiology* **2004**, *14* (6), 1063-1073.

31. Bonnet, R., *Chemical aspects of photodynamic therapy*. Gordon and Breach Science Publishers: 2000; p 305.

32. Foote, C. S., Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochemistry and Photobiology* **1991**, *54* (5), 659.

33. Halliwell, B., Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research* **1999**, *31* (4), 261-272.

34. Wilson, B. C.; Van Lier, J. E., Radiolabelled photosensitizers for tumour imaging and photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* **1989**, *3* (3), 459.

35. Foote, C. S.; Shook, F. C.; Abakerli, R. B., Characterization of singlet oxygen. *Methods in Enzymology* **1984**, *105*, 36-47.

36. Davies, M. J., Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2004**, *3* (1), 17-25.

37. Piette, J.; Volanti, C.; Vantieghem, A.; Matroule, J. Y.; Habraken, Y.; Agostinis, P., Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. *Biochemical Pharmacology* **2003**, *66* (8), 1651-1659.

38. Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R., Mechanisms in photodynamic therapy: Part three - Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2005**, 2 (2), 91-106.
39. Wyld, L.; Reed, M. W. R.; Brown, N. J., Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. *British Journal of Cancer* **2001**, 84 (10), 1384-1386.
40. Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R., Mechanisms in photodynamic therapy: Part two - Cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2005**, 2 (1 SPEC. ISS.), 1-23.
41. Parkin, D. M., The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International Journal of Cancer* **2006**, 118 (12), 3030-3044.
42. Zimmermann, K. C.; Bonzon, C.; Green, D. R., The machinery of programmed cell death. *Pharmacology and Therapeutics* **2001**, 92 (1), 57-70.
43. Yang, J. C.; Cortopassi, G. A., dATP causes specific release of cytochrome c from mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1998**, 250 (2), 454-457.
44. Bratton, S. B.; Walker, G.; Srinivasula, S. M.; Sun, X. M.; Butterworth, M.; Alnemri, E. S.; Cohen, G. M., Recruitment, activation and retention of caspases-9 and-3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO Journal* **2001**, 20 (5), 998-1009.
45. Gavrieli, Y.; Sherman, Y.; Ben-Sasson, S. A., Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology* **1992**, 119 (3), 493-501.
46. Green, D. R., Apoptotic pathways: Ten minutes to dead. *Cell* **2005**, 121 (5), 671-674.
47. Shweiki, D.; Itin, A.; Soffer, D.; Keshet, E., Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **1992**, 359 (6398), 843-845.
48. Shweiki, D.; Neeman, M.; Itin, A.; Keshet, E., Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: Implications for tumor angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, 92 (3), 768-772.
49. Carmeliet, P.; Jain, R. K., Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **2000**, 407 (6801), 249-257.
50. Folkman, J.; Shing, Y., Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, 267 (16), 10931-10934.
51. Abels, C., Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochemical and Photobiological Sciences* **2004**, 3 (8), 765-771.
52. Casas, A.; Venosa, G. D.; Vanzulli, S.; Perotti, C.; Mamome, L.; Rodriguez, L.; Simian, M.; Juarranz, A.; Pontiggia, O.; Hasan, T.; Battle, A., Decreased metastatic phenotype in cells resistant to aminolevulinic acid-photodynamic therapy. *Cancer Letters* **2008**, 271 (2), 342-351.
53. Korbelik, M.; Parkins, C. S.; Shibuya, H.; Cecic, I.; Stratford, M. R. L.; Chaplin, D. J., Nitric oxide production by tumour tissue: Impact on the response to photodynamic therapy. *British Journal of Cancer* **2000**, 82 (11), 1835-1843.
54. Henderson, B. W.; Dougherty, T. J., How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and Photobiology* **1992**, 55 (1), 145-157.
55. Agarwal, M. L.; Larkin, H. E.; Zaidi, S. I. A.; Mukhtar, H.; Oleinick, N. L., Phospholipase activation triggers apoptosis in photosensitized mouse lymphoma cells. *Cancer Research* **1993**, 53 (24), 5897-5902.
56. Yamamoto, N.; Homma, S.; Sery, T. W.; Donoso, L. A.; Hooper, J. K., Photodynamic immunopotential: In vitro activation of macrophages by treatment of mouse peritoneal

cells with haematoporphyrin derivative and light. *European Journal of Cancer* **1991**, 27 (4), 467-471.

57. Krosli, G.; Korbelik, M.; Dougherty, G. J., Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by photofrin-based photodynamic therapy. *British Journal of Cancer* **1995**, 71 (3), 549-555.

58. Germain, R. N., Accessory cell stimulation of T cell proliferation requires active antigen processing, Ia-restricted antigen presentation, and a separate nonspecific 2nd signal. *Journal of Immunology* **1981**, 127 (5), 1964-1966.

59. Korbelik, M.; Cecic, I., Contribution of myeloid and lymphoid host cells to the curative outcome of mouse sarcoma treatment by photodynamic therapy. *Cancer Letters* **1999**, 137 (1), 91-98.

60. Vonarx, V.; Foultier, M. T.; Anasagasti, L.; Morlet, L.; Lajat, Y.; Patrice, T., Photodynamic effect on the specific antitumor immune activity. *International Journal of Immunopharmacology* **1997**, 19 (2), 101-110.

61. Gomer, C. J.; Ferrario, A.; Murphree, A. L., The effect of localized porphyrin photodynamic therapy on the induction of tumour metastasis. *British Journal of Cancer* **1987**, 56 (1), 27-32.

62. Korbelik, M.; Sun, J., Photodynamic therapy-generated vaccine for cancer therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **2006**, 55 (8), 900-909.

63. Schreiber, S.; Gross, S.; Brandis, A.; Harmelin, A.; Rosenbach-Belkin, V.; Scherz, A.; Salomon, Y., Local photodynamic therapy (PDT) of rat C6 glioma xenografts with Pd-bacteriopheophorbide leads to decreased metastases and increase of animal cure compared with surgery. *International Journal of Cancer* **2002**, 99 (2), 279-285.

64. Kübler, A. C., Photodynamic therapy. *Medical Laser Application* **2005**, 20 (1), 37-45.

65. Meunier-Reynes, A.; Diebold, S.; Lignon, D.; Granjon, Y.; Guillemin, F. H., Light dosimetry in vivo in interstitial photodynamic therapy of human tumors. *Proc. SPIE* **1991**, 1525, 177-182.

66. Boyle, R. W.; Dolphin, D., Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochemistry and Photobiology* **1996**, 64 (3), 469-485.

67. Razum, N.; Balchum, O. J.; Profio, A. E.; Carstens, F., Skin photosensitivity: duration and intensity following intravenous hematoporphyrin derivatives, HpD and DHE. *Photochemistry and Photobiology* **1987**, 46 (5), 925-928.

68. Wooten, R. S.; Smith, K. C.; Ahlquist, D. A.; Muller, S. A.; Balm, R. K., Prospective study of cutaneous phototoxicity after systemic hematoporphyrin derivative. *Lasers in Surgery and Medicine* **1988**, 8 (3), 294-300.

69. Zhang, M.; Zhang, Z.; Blessington, D.; Li, H.; Busch, T. M.; Madrak, V.; Miles, J.; Chance, B.; Glickson, J. D.; Zheng, G., Pyropheophorbide 2-deoxyglucosamide: A new photosensitizer targeting glucose transporters. *Bioconjugate Chemistry* **2003**, 14 (4), 709-714.

70. Gomer, C. J.; Ferrario, A.; Luna, M.; Rucker, N.; Wong, S., Photodynamic therapy: Combined modality approaches targeting the tumor microenvironment. *Lasers in Surgery and Medicine* **2006**, 38 (5), 516-521.

71. Rosenberg, S. A., A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* **1999**, 10 (3), 281-287.

72. Di Stasio, B.; Frochet, C.; Dumas, D.; Even, P.; Zwier, J.; Müller, A.; Didelon, J.; Guillemin, F.; Viriot, M. L.; Barberi-Heyob, M., The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 40 (11), 1111-1122.

73. Mathupala, S. P.; Rempel, A.; Pedersen, P. L., Aberrant glycolytic metabolism of cancer cells: A remarkable coordination of genetic, transcriptional, post-translational, and

mutational events that lead to a critical role for Type II hexokinase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **1997**, 29 (4), 339-443.

74. Csik, G.; Balog, E.; Voszka, I.; Tölgyesi, F.; Oulmi, D.; Maillard, P.; Momenteau, M., Glycosylated derivatives of tetraphenyl porphyrin: Photophysical characterization, self-aggregation and membrane binding. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1998**, 44 (3), 216-224.

75. Carter, P.; Presta, L.; Gorman, C. M.; Ridgway, J. B. B.; Henner, D.; Wong, W. L. T.; Rowland, A. M.; Kotts, C.; Carver, M. E.; Shepard, H. M., Humanization of an anti-p185(HER2) antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, 89 (10), 4285-4289.

76. Fong, L.; Hou, Y.; Rivas, A.; Benike, C.; Yuen, A.; Fisher, G. A.; Davis, M. M.; Engleman, E. G., Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, 98 (15), 8809-8814.

77. Schneider, R.; Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Gravier, J.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M., Recent improvements in the use of synthetic peptides for a selective photodynamic therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2006**, 6 (5), 469-488.

78. Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Trinquet, E.; Pinel, S.; Viriot, M. L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M., A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *Journal of Controlled Release* **2006**, 111 (1-2), 153-164.

79. Leamon, C. P.; Reddy, J. A., Folate-targeted chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, 56 (8), 1127-1141.

80. Solban, N.; Rizvi, I.; Hasan, T., Targeted photodynamic therapy. *Lasers in Surgery and Medicine* **2006**, 38 (5), 522-531.

81. Konan, Y. N.; Gurny, R.; Allmann, E., State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2002**, 66 (2), 89-106.

82. D'Hallewin, M. A.; Kochetkov, D.; Viry-Babel, Y.; Leroux, A.; Werkmeister, E.; Dumas, D.; Gräfe, S.; Zorin, V.; Guillemin, F.; Bezdetnaya, L., Photodynamic therapy with intratumoral administration of lipid-based mTHPC in a model of breast cancer recurrence. *Lasers in Surgery and Medicine* **2008**, 40 (8), 543-549.

83. Grossweiner, L. I.; Patel, A. S.; Grossweiner, J. B., Type I and type II mechanisms in the photosensitized lysis of phosphatidylcholine liposomes by hematoporphyrin. *Photochemistry and Photobiology* **1982**, 36 (2), 159-167.

84. Derycke, A. S. L.; De Witte, P. A. M., Liposomes for photodynamic therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, 56 (1), 17-30.

85. Dragicevic-Curic, N.; Scheglmann, D.; Albrecht, V.; Fahr, A., Development of liposomes containing ethanol for skin delivery of temoporfin: Characterization and in vitro penetration studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2009**, 74 (1), 114-122.

86. Maurer-Jones, M. A.; Bantz, K. C.; Love, S. A.; Marquis, B. J.; Haynes, C. L., Toxicity of therapeutic nanoparticles. *Nanomedicine* **2009**, 4 (2), 219-241.

87. Nawalany, K.; Rusin, A.; Kepczyński, M.; Mikhailov, A.; Kramer-Marek, G.; Āńnietura, M.; Połowicz, J.; Krawczyk, Z.; Nowakowska, M., Comparison of photodynamic efficacy of tetraarylporphyrin pegylated or encapsulated in liposomes: In vitro studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2009**, 97 (1), 8-17.

88. Venosa, G. D.; Hermida, L.; Fukuda, H.; Defain, M. V.; Rodriguez, L.; Mamone, L.; MacRobert, A.; Casas, A.; Batlle, A., Comparison of liposomal formulations of ALA

Undecanoyl ester for its use in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2009**, *96* (2), 152-158.

89. Cousse, E.; Azar, R.; Mercier, D.; Codaccioni, M. X., Choc anaphylactoïde à un hydrosol polyvitaminé Responsabilité probable du crémophor EL. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* **1991**, *31* (3), 176.

90. Szebeni, J., Complement activation-related pseudoallergy caused by amphiphilic drug carriers: The role of lipoproteins. *Current Drug Delivery* **2005**, *2* (4), 443-449.

91. Nishiyama, N.; Nakagishi, Y.; Morimoto, Y.; Lai, P. S.; Miyazaki, K.; Urano, K.; Horie, S.; Kumagai, M.; Fukushima, S.; Cheng, Y.; Jang, W. D.; Kikuchi, M.; Kataoka, K., Enhanced photodynamic cancer treatment by supramolecular nanocarriers charged with dendrimer phthalocyanine. *Journal of Controlled Release* **2009**, *133* (3), 245-251.

92. Hofman, J. W.; Carstens, M. G.; Van Zeeland, F.; Helwig, C.; Flesch, F. M.; Hennink, W. E.; Van Nostrum, C. F., Photocytotoxicity of mTHPC (temoporfin) loaded polymeric micelles mediated by lipase catalyzed degradation. *Pharmaceutical Research* **2008**, *25* (9), 2065-2073.

93. Skidan, I.; Dholakia, P.; Torchilin, V. P., Photodynamic therapy of experimental B-16 melanoma in mice with tumor-targeted 5,10,15,20-tetraphenylporphin-loaded PEG-PE micelles. *Journal of Drug Targeting* **2008**, *16* (6), 486-493.

94. Roy, I.; Ohulchanskyy, T. Y.; Pudavar, H. E.; Bergey, E. J.; Oseroff, A. R.; Morgan, J.; Dougherty, T. J.; Prasad, P. N., Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: A novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (26), 7860-7865.

95. Bechet, D.; Couleaud, P.; Frochot, C.; Viriot, M. L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M., Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends in Biotechnology* **2008**, *26* (11), 612-621.

96. Anderson, J. M.; Shive, M. S., Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, *28* (1), 5-24.

97. Li, H.; Marotta, D. E.; Kim, S.; Busch, T. M.; Wileyto, E. P.; Zheng, G., High payload delivery of optical imaging and photodynamic therapy agents to tumors using phthalocyanine-reconstituted low-density lipoprotein nanoparticles. *Journal of Biomedical Optics* **2005**, *10* (4).

98. Koo, Y. E. L.; Reddy, G. R.; Bhojani, M.; Schneider, R.; Philbert, M. A.; Rehemtulla, A.; Ross, B. D.; Kopelman, R., Brain cancer diagnosis and therapy with nanoplatforms. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, *58* (14), 1556-1577.

99. Goren, D.; Horowitz, A. T.; Tzemach, D.; Tarshish, M.; Zalipsky, S.; Gabizon, A., Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump. *Clinical Cancer Research* **2000**, *6* (5), 1949-1957.

100. Kopelman, R.; Lee Koo, Y. E.; Philbert, M.; Moffat, B. A.; Ramachandra Reddy, G.; McConville, P.; Hall, D. E.; Chenevert, T. L.; Bhojani, M. S.; Buck, S. M.; Rehemtulla, A.; Ross, B. D., Multifunctional nanoparticle platforms for in vivo MRI enhancement and photodynamic therapy of a rat brain cancer. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, *293* (1), 404-410.

101. Couleaud, P.; Morosini, V.; Frochot, C.; Richeter, S.; Raehm, L.; Durand, J. O., Silica-based nanoparticles for photodynamic therapy applications. *Nanoscale* **2010**, *2* (7), 1083-1095.

102. Yuan, H.; Miao, J.; Du, Y. Z.; You, J.; Hu, F. Q.; Zeng, S., Cellular uptake of solid lipid nanoparticles and cytotoxicity of encapsulated paclitaxel in A549 cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, *348* (1-2), 137-145.

103. Caliceti, P.; Salmaso, S.; Semenzato, A.; Carofiglio, T.; Fornasier, R.; Fermeglia, M.; Ferrone, M.; Pricl, S., Synthesis and physicochemical characterization of folate-cyclodextrin bioconjugate for active drug delivery. *Bioconjugate Chemistry* **2003**, *14* (5), 899-908.
104. Alivisatos, P., Colloidal quantum dots. From scaling laws to biological applications. *Pure and Applied Chemistry* **2000**, *72* (1-2), 3-9.
105. Krämer, M.; Stumbé, J. F.; Grimm, G.; Kaufmann, B.; Krüger, U.; Weber, M.; Haag, R., Dendritic polyamines: Simple access to new materials with defined treelike structures for application in nonviral gene delivery. *ChemBioChem* **2004**, *5* (8), 1081-1087.
106. Li, Y.; Jang, W. D.; Nishiyama, N.; Kishimura, A.; Kawauchi, S.; Morimoto, Y.; Miake, S.; Yamashita, T.; Kikuchi, M.; Aida, T.; Kataoka, K., Dendrimer generation effects on photodynamic efficacy of dendrimer porphyrins and dendrimer-loaded supramolecular nanocarriers. *Chemistry of Materials* **2007**, *19* (23), 5557-5562.
107. Inoue, K., Functional dendrimers, hyperbranched and star polymers. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **2000**, *25* (4), 453-571.
108. Barth, R. F.; Coderre, J. A.; Vicente, M. G. H.; Blue, T. E., Boron neutron capture therapy of cancer: Current status and future prospects. *Clinical Cancer Research* **2005**, *11* (11), 3987-4002.
109. Heegaard, P. M. H.; Boas, U.; Sorensen, N. S., Dendrimers for vaccine and immunostimulatory uses. A review. *Bioconjugate Chemistry* **2010**, *21* (3), 405-418.
110. Shi, X.; Wang, S.; Meshinchi, S.; Van Antwerp, M. E.; Bi, X.; Lee, I.; Baker Jr, J. R., Dendrimer-entrapped gold nanoparticles as a platform for cancer-cell targeting and imaging. *Small* **2007**, *3* (7), 1245-1252.
111. Svenson, S.; Tomalia, D. A., Dendrimers in biomedical applications - Reflections on the field. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, *57* (15), 2106-2129.
112. Wolinsky, J. B.; Grinstaff, M. W., Therapeutic and diagnostic applications of dendrimers for cancer treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60* (9), 1037-1055.
113. Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P., New class of polymers : starburst-dendritic macromolecules. *Polymer Journal* **1984**, *17* (1), 117-132.
114. Buhleier, E.; Wehner, W.; Vögtle, F., Cascade- and nonskid-chain-like synthesis of molecular cavity topologies. *Synthesis* **1978**, *2*, 155-158.
115. Devarakonda, B.; Hill, R. A.; Liebenberg, W.; Brits, M.; De Villiers, M. M., Comparison of the aqueous solubilization of practically insoluble niclosamide by polyamidoamine (PAMAM) dendrimers and cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics* **2005**, *304* (1-2), 193-209.
116. Lagnoux, D.; Darbre, T.; Schmitz, M. L.; Reymond, J. L., Inhibition of mitosis by glycopeptide dendrimer conjugates of colchicine. *Chemistry - A European Journal* **2005**, *11* (13), 3941-3950.
117. Na, M.; Yiyun, C.; Tongwen, X.; Yang, D.; Xiaomin, W.; Zhenwei, L.; Zhichao, C.; Guanyi, H.; Yunyu, S.; Longping, W., Dendrimers as potential drug carriers. Part II. Prolonged delivery of ketoprofen by in vitro and in vivo studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *41* (5), 670-674.
118. Najlah, M.; D'Emanuele, A., Synthesis of dendrimers and drug-dendrimer conjugates for drug delivery. *Current Opinion in Drug Discovery and Development* **2007**, *10* (6), 756-767.
119. Wiwattanapatapee, R.; Lomlim, L.; Saramunee, K., Dendrimers conjugates for colonic delivery of 5-aminosalicylic acid. *Journal of Controlled Release* **2003**, *88* (1), 1-9.
120. Boas, U.; Heegaard, P. M. H., Dendrimers in drug research. *Chemical Society Reviews* **2004**, *33* (1), 43-63.

121. Hawker, C. J.; Wooley, K. L.; Fréchet, J. M. J., Unimolecular micelles and globular amphiphiles: Dendritic macromolecules as novel recyclable solubilization agents. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I* **1993**, (12), 1287-1297.
122. Turnbull, W. B.; Stoddart, J. F., Design and synthesis of glycodendrimers. *Reviews in Molecular Biotechnology* **2002**, *90* (3-4), 231-255.
123. Roy, R.; Kim, J. M., Amphiphilic p-tert-butylcalix[4]arene scaffolds containing exposed carbohydrate dendrons. *Angewandte Chemie - International Edition* **1999**, *38* (3), 369-372.
124. Majoral, J. P.; Caminade, A. M., Dendrimers Containing Heteroatoms (Si, P, B, Ge, or Bi). *Chemical Reviews* **1999**, *99* (3), 845-880.
125. Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J., Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112* (21), 7638-7647.
126. Jaffrès, P. A.; Morris, R. E., Synthesis of highly functionalised dendrimers based on polyhedral silsesquioxane cores. *Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions* **1998**, (16), 2767-2770.
127. Bosman, A. W.; Janssen, H. M.; Meijer, E. W., About Dendrimers: Structure, Physical Properties, and Applications. *Chemical Reviews* **1999**, *99* (7), 1665-1688.
128. Fréchet, J. M. J.; Ihre, H.; Davey, M., Preparation of "Fréchet-type" polyether dendrons and aliphatic polyester dendrimers by convergent growth: an experimental primer. Chapter 24. In *Dendrimers and other Dendritic Polymers*, ed.; Fréchet, J. M. J. a. T., D.A., Ed. J. Wiley and Sons: Chichester and New York, 2001; pp 569-586.
129. Tomalia, D. A.; Majoros, I., Dendrimeric supramolecular and supramacromolecular assemblies. In *Supramolecular Polymers*, Marcel Dekker: New York, 2000; Vol. 12, pp 359-435.
130. Newkome, G. R.; Yao, Z. Q.; Baker, G. R.; Gupta, V. K., Cascade molecules: A new approach to micelles. A [27]-arborol. *Journal of Organic Chemistry* **1985**, *50* (11), 2003-2004.
131. Matthews, O. A.; Shipway, A. N.; Stoddart, J. F., Dendrimers - Branching out from curiosities into new technologies. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **1998**, *23* (1), 1-56.
132. Fréchet, J. M. J.; Hawker, C. J., Hyperbranched polyphenylene and hyperbranched polyesters: new soluble, three-dimensional, reactive polymers. *Reactive and Functional Polymers* **1995**, *26* (1-3), 127-136.
133. Nanjwade, B. K.; Bechra, H. M.; Derkar, G. K.; Manvi, F. V.; Nanjwade, V. K., Dendrimers: Emerging polymers for drug-delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, *38* (3), 185-196.
134. Kawaguchi, T.; Walker, K. L.; Wilkins, C. L.; Moore, J. S., Double exponential dendrimer growth. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117* (8), 2159-2165.
135. Maraval, V.; Laurent, R.; Marchand, P.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., Accelerated methods of synthesis of phosphorus-containing dendrimers. *Journal of Organometallic Chemistry* **2005**, *690* (10), 2458-2471.
136. Maraval, V.; Pyzowski, J.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P., "Lego" chemistry for the straightforward synthesis of dendrimers. *Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68* (15), 6043-6046.
137. Wu, P.; Feldman, A. K.; Nugent, A. K.; Hawker, C. J.; Scheel, A.; Voit, B.; Pyun, J.; Fréchet, J. M. J.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V., Efficiency and fidelity in a click-chemistry route to triazole dendrimers by the copper(I)-catalyzed ligation of azides and alkynes. *Angewandte Chemie - International Edition* **2004**, *43* (30), 3928-3932.

138. Hong, S.; Leroueil, P. R.; Majoros, I. J.; Orr, B. G.; Baker Jr, J. R.; Banaszak Holl, M. M., The Binding Avidity of a Nanoparticle-Based Multivalent Targeted Drug Delivery Platform. *Chemistry and Biology* **2007**, *14* (1), 107-115.
139. Shi, X.; Patri, A. K.; Lesniak, W.; Islam, M. T.; Zhang, C.; Baker Jr, J. R.; Balogh, L. P., Analysis of poly(amidoamine)-succinamic acid dendrimers by slab-gel electrophoresis and capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **2005**, *26* (15), 2960-2967.
140. Hummelen, J. C.; Van Dongen, J. L. J.; Meijer, E. W., Electro spray mass spectrometry of poly(propylene imine) dendrimers-The issue of dendritic purity or polydispersity. *Chemistry - A European Journal* **1997**, *3* (9), 1489-1493.
141. Zhang, C.; Tomalia, D. A., In *Dendrimers and Other Dendritic Polymers*, Fréchet, J. M. J., Tomalia, D. A., Ed. John Wiley & Sons: New York, 2001; pp 239-252.
142. Brothers II, H. M.; Piehler, L. T.; Tomalia, D. A., Slab-gel and capillary electrophoretic characterization of polyamidoamine dendrimers. *Journal of Chromatography A* **1998**, *814* (1-2), 233-246.
143. Jackson, C. L.; Chanzy, H. D.; Booy, F. P.; Drake, B. J.; Tomalia, D. A.; Bauer, B. J.; Amis, E. J., Visualization of dendrimer molecules by transmission electron microscopy (TEM): Staining methods and cryo-TEM of vitrified solutions. *Macromolecules* **1998**, *31* (18), 6259-6265.
144. Ehrlich, P. H., The effect of multivalency on the specificity of protein and cell interactions. *Journal of Theoretical Biology* **1979**, *81* (1), 123-127.
145. Lee, J. J.; Ford, W. T.; Moore, J. A.; Li, Y., Reactivity of organic anions promoted by a quaternary ammonium ion dendrimer. *Macromolecules* **1994**, *27* (16), 4632-4634.
146. Mong, T. K. K.; Niu, A.; Chow, H. F.; Wu, C.; Li, L.; Chen, R., BETA-alanine-based dendritic BETA-peptides: Dendrimers possessing unusually strong binding ability towards protic solvents and their self-assembly into nanoscale aggregates through hydrogen-bond interactions. *Chemistry - A European Journal* **2001**, *7* (3), 686-699.
147. Valério, C.; Alonso, E.; Ruiz, J.; Biais, J. C.; Astruc, D., A polycationic metallodendrimer with 24 [Fe( $\dot{I}$ -5-C5Me5)( $\dot{I}$ -6-N-alkylaniline)]<sup>+</sup> termini that recognizes chloride and bromide anions. *Angewandte Chemie - International Edition* **1999**, *38* (12), 1747-1751.
148. Valério, C.; Fillaut, J. L.; Ruiz, J.; Guittard, J.; Blais, J. C.; Astruc, D., The dendritic effect in molecular recognition: Ferrocene dendrimers and their use as supramolecular redox sensors for the recognition of small inorganic anions. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119* (10), 2588-2589.
149. Zeng, F.; Zimmerman, S. C., Dendrimers in supramolecular chemistry: From molecular recognition to self-assembly. *Chemical Reviews* **1997**, *97* (5), 1681-1712.
150. Esfand, R.; Beezer, A. E.; Mitchell, J. C.; Twyman, L. J., Synthesis, complexation and pharmaceutical applications of tetra-directional cascade dendrimers. *Pharmaceutical Sciences* **1996**, *2* (3), 157-159.
151. Esfand, R.; Tomalia, D. A., Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: From biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discovery Today* **2001**, *6* (8), 427-436.
152. Twyman, L. J.; Beezer, A. E.; Esfand, R.; Hardy, M. J.; Mitchell, J. C., The synthesis of water soluble dendrimers, and their application as possible drug delivery systems. *Tetrahedron Letters* **1999**, *40* (9), 1743-1746.
153. Jansen, J. F. G. A.; De Brabander-van Den Berg, E. M. M.; Meijer, E. W., Encapsulation of guest molecules into a dendritic box. *Science* **1994**, *266* (5188), 1226-1229.
154. Jansen, J. F. G. A.; Janssen, R. A. J.; De Brabander-van Den Berg, E. M. M.; Meijer, E. W., Triplet radical pairs of 3-carboxyproxyl encapsulated in a dendritic box. *Advanced Materials* **1995**, *7* (6), 561-564.

155. Jansen, J. F. G. A.; Meijer, E. W.; De Brabander-van Den Berg, E. M. M., The dendritic box : Shape-selective liberation of encapsulated guests. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117* (15), 4417-4418.
156. Wallimann, P.; Mattei, S.; Seiler, P.; Diederich, F., New Cyclophanes as Initiator Cores for the Construction of Dendritic Receptors: Host-Guest Complexation in Aqueous Solutions and Structures of Solid-State Inclusion Compounds. *Helvetica Chimica Acta* **1997**, *80* (8), 2368-2390.
157. Wallimann, P.; Seiler, P.; Diederich, F., Dendrophanes: Novel steroid-recognizing dendritic receptors: Preliminary communication. *Helvetica Chimica Acta* **1996**, *79* (3), 779-788.
158. Smith, D. K.; Diederich, F., Dendritic hydrogen bonding receptors: Enantiomerically pure dendroclefts for the selective recognition of monosaccharides. *Chemical Communications* **1998**, (22), 2501-2502.
159. Smith, D. K.; Zingg, A.; Diederich, F., Dendroclefts: Optically active dendritic receptors for the selective recognition and chiroptical sensing of monosaccharide guests. *Helvetica Chimica Acta* **1999**, *82* (8), 1225-1241.
160. Chen, W.; Tomalia, D. A.; Thomas, J. L., Unusual pH-dependent polarity changes in PAMAM dendrimers: evidence for pH-responsive conformational changes. *Macromolecules* **2000**, *33* (25), 9169-9172.
161. Lee, I.; Athey, B. D.; Wetzell, A. W.; Meixner, W.; Baker Jr, J. R., Structural molecular dynamics studies on polyamidoamine dendrimers for a therapeutic application: Effects of pH and generation. *Macromolecules* **2002**, *35* (11), 4510-4520.
162. Rietveld, I. B.; Bouwman, W. G.; Baars, M. W. P. L.; Heenan, R. K., Location of the outer shell and influence of pH on carboxylic acid-functionalized poly(propyleneimine) dendrimers. *Macromolecules* **2001**, *34* (23), 8380-8383.
163. Chai, M.; Niu, Y.; Youngs, W. J.; Rinaldi, P. L., Structure and conformation of DAB dendrimers in solution via multidimensional NMR techniques. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123* (20), 4670-4678.
164. De Backer, S.; Prinzie, Y.; Verheijen, W.; Smet, M.; Desmedt, K.; Dehaen, W.; De Schryver, F. C., Solvent dependence of the hydrodynamical volume of dendrimers with a rubicene core. *Journal of Physical Chemistry A* **1998**, *102* (28), 5451-5455.
165. Boas, U.; Karlsson, A. J.; De Waal, B. F. M.; Meijer, E. W., Synthesis and properties of new thiourea-functionalized poly(propylene imine) dendrimers and their role as hosts for urea functionalized guests. *Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66* (6), 2136-2145.
166. Malik, N.; Wiwattanapatapee, R.; Klopsch, R.; Lorenz, K.; Frey, H.; Weener, J. W.; Meijer, E. W.; Paulus, W.; Duncan, R., Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *Journal of Controlled Release* **2000**, *65* (1-2), 133-148.
167. Roberts, J. C.; Bhalgat, M. K.; Zera, R. T., Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst<sup>®</sup> dendrimers. *Journal of Biomedical Materials Research* **1996**, *30* (1), 53-65.
168. Boas, U.; Christensen, J. B.; Heegaard, P. M. H., *Dendrimers in Medicine and Biotechnology : New Molecular Tools*. Royal Society of Chemistry 2006; p 182.
169. Tijerina, M.; Kopeček, P.; Kopeček, J., Mechanisms of Cytotoxicity in Human Ovarian Carcinoma Cells Exposed to Free Mce6 or HPMA Copolymer-Mce6 Conjugates. *Photochemistry and Photobiology* **2003**, *77* (6), 645-652.
170. Le Garrec, D.; Taillefer, J.; Van Lier, J. E.; Lenaerts, V.; Leroux, J. C., Optimizing pH-responsive polymeric micelles for drug delivery in a cancer photodynamic therapy model. *Journal of Drug Targeting* **2002**, *10* (5), 429-437.

171. Kennedy, J. C.; Pottier, R. H.; Pross, D. C., Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin. IX: Basic principles and present clinical experience. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* **1990**, *6* (1-2), 143-148.
172. Peng, Q.; Berg, K.; Moan, J.; Kongshaug, M.; Nesland, J. M., 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: Principles and experimental research. *Photochemistry and Photobiology* **1997**, *65* (2), 235-251.
173. Battah, S.; Balaratnam, S.; Casas, A.; O'Neill, S.; Edwards, C.; Batlle, A.; Dobbin, P.; MacRobert, A. J., Macromolecular delivery of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy using dendrimer conjugates. *Molecular Cancer Therapeutics* **2007**, *6* (3), 876-885.
174. Battah, S.; O'Neill, S.; Edwards, C.; Balaratnam, S.; Dobbin, P.; MacRobert, A. J., Enhanced porphyrin accumulation using dendritic derivatives of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy: An in vitro study. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **2006**, *38* (8), 1382-1392.
175. Di Venosa, G. M.; Casas, A. G.; Battah, S.; Dobbin, P.; Fukuda, H.; MacRobert, A. J.; Batlle, A., Investigation of a novel dendritic derivative of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **2006**, *38* (1), 82-91.
176. Nishiyama, N.; Jang, W. D.; Kataoka, K., Supramolecular nanocarriers integrated with dendrimers encapsulating photosensitizers for effective photodynamic therapy and photochemical gene delivery. *New Journal of Chemistry* **2007**, *31* (7), 1074-1082.
177. Nishiyama, N.; Stapert, H. R.; Zhang, G. D.; Takasu, D.; Jiang, D. L.; Nagano, T.; Aida, T.; Kataoka, K., Light-harvesting ionic dendrimer porphyrins as new photosensitizers for photodynamic therapy. *Bioconjugate Chemistry* **2003**, *14* (1), 58-66.
178. Sugisaki, K.; Usui, T.; Nishiyama, N.; Jang, W. D.; Yanagi, Y.; Yamagami, S.; Amano, S.; Kataoka, K., Photodynamic therapy for corneal neovascularization using polymeric micelles encapsulating dendrimer porphyrins. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **2008**, *49* (3), 894-899.
179. Zhang, G. D.; Harada, A.; Nishiyama, N.; Jiang, D. L.; Koyama, H.; Aida, T.; Kataoka, K., Polyion complex micelles entrapping cationic dendrimer porphyrin: Effective photosensitizer for photodynamic therapy of cancer. *Journal of Controlled Release* **2003**, *93* (2), 141-150.
180. Jang, W. D.; Nakagishi, Y.; Nishiyama, N.; Kawauchi, S.; Morimoto, Y.; Kikuchi, M.; Kataoka, K., Polyion complex micelles for photodynamic therapy: Incorporation of dendritic photosensitizer excitable at long wavelength relevant to improved tissue-penetrating property. *Journal of Controlled Release* **2006**, *113* (1), 73-79.
181. Paul, A.; Hackbarth, S.; Mořlich, A.; Luban, C.; Oelckers, S.; Bořhm, F.; Rořder, B., Comparative study of the photosensitization of Jurkat cells in vitro by pheophorbide-a and a pheophorbide-a diaminobutane poly-propylene-imine Dendrimer complex. *Laser Physics* **2003**, *13* (1), 22-29.
182. Matsumura, Y.; Maeda, H., A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research* **1986**, *46* (12 I), 6387-6392.
183. Jori, G., Tumour photosensitizers: Approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1996**, *36* (2), 87-93.
184. Tomé, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Mendonça, A. F.; Pegado, I. N.; Duarte, R.; Valdeira, M. L., Synthesis of glycoporphyrin derivatives and their antiviral activity against herpes simplex virus types 1 and 2. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2005**, *13* (12), 3878-3888.

185. Garin-Chesa, P.; Campbell, I.; Saigo, P. E.; Lewis, J. L., Jr.; Old, L. J.; Rettig, W. J., Trophoblast and ovarian cancer antigen LK26. Sensitivity and specificity in immunopathology and molecular identification as a folate-binding protein. *American Journal of Pathology* **1993**, *142*, 557-567.
186. Parker, N.; Turk, M. J.; Westrick, E.; Lewis, J. D.; Low, P. S.; Leamon, C. P., Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Analytical Biochemistry* **2005**, *338* (2), 284-293.
187. Hilgenbrink, A. R.; Low, P. S., Folate receptor-mediated drug targeting: From therapeutics to diagnostics. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2005**, *94* (10), 2135-2146.
188. Schneider, R.; Schmitt, F.; Frochot, C.; Fort, Y.; Lourette, N.; Guillemin, F.; M<sup>1</sup>üller, J. F.; Barberi-Heyob, M., Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2005**, *13* (8), 2799-2808.
189. Inoue, K., Functional dendrimers, hyperbranched and star polymers. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **2000**, *25* (4), 453-571.
190. Beezer, A. E.; King, A. S. H.; Martin, I. K.; Mitchel, J. C.; Twyman, L. J.; Wain, C. F., Dendrimers as potential drug carriers; encapsulation of acidic hydrophobes within water soluble PAMAM derivatives. *Tetrahedron* **2003**, *59* (22), 3873-3880.
191. Lindsey, J. S.; Schreiman, I. C.; Hsu, H. C.; Kearney, P. C.; Marguerettaz, A. M., Rothmund and Adler-Longo reactions revisited: Synthesis of tetraphenylporphyrins under equilibrium conditions. *Journal of Organic Chemistry* **1987**, *52* (5), 827-836.
192. Laville, I.; Pigaglio, S.; Blais, J. C.; Loock, B.; Maillard, P.; Grierson, D. S.; Blais, J., A study of the stability of tri(glucosyloxyphenyl)chlorin, a sensitizer for photodynamic therapy, in human colon tumoural cells: A liquid chromatography and MALDI-TOF mass spectrometry analysis. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2004**, *12* (13), 3673-3682.
193. Mongin, O.; Papamica<sup>l</sup>, C.; Hoyler, N.; Gossauer, A., Modular Synthesis of Benzene-Centered Porphyrin Trimers and a Dendritic Porphyrin Hexamer. *Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63* (16), 5568-5580.
194. Ayabe, M.; Ikeda, A.; Kubo, Y.; Takeuchi, M.; Shinkai, S., A dendritic porphyrin receptor for C60 which features a profound positive allosteric effect. *Angewandte Chemie - International Edition* **2002**, *41* (15), 2790-2792.
195. Ballester, P.; Gomila, R. M.; Hunter, C. A.; King, A. S. H.; Twyman, L. J., Dendrimers as scaffolds for the synthesis of spherical porphyrin arrays. *Chemical Communications* **2003**, *9* (1), 38-39.
196. Hasobe, T.; Kashiwagi, Y.; Absalom, M. A.; Sly, J.; Hosomizu, K.; Crossley, M. J.; Imahori, H.; Kamat, P. V.; Fukuzumi, S., Supramolecular photovoltaic cells using porphyrin dendrimers and fullerenes. *Advanced Materials* **2004**, *16* (12), 975-979.
197. Yeow, E. K. L.; Ghiggino, K. P.; Reek, J. N. H.; Crossley, M. J.; Bosnian, A. W.; Scheming, A. P. H. J.; Meijer, E. W., The dynamics of electronic energy transfer in novel multiporphyrin functionalized dendrimers: A time-resolved fluorescence anisotropy study. *Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104* (12), 2596-2606.
198. Lee, D. N.; Kim, J. K.; Park, H. S.; Jun, Y. M.; Hwang, R. Y.; Lee, W. Y.; Kim, B. H., Polyamidoamine dendrimers functionalized with electrochemiluminescent polypyridyl Ru(II) complexes. *Synthetic Metals* **2005**, *150* (1), 93-100.
199. Martin, I. K.; Twyman, L. J., The synthesis of unsymmetrical PAMAM dendrimers using a divergent/divergent approach. *Tetrahedron Letters* **2001**, *42* (6), 1119-1121.
200. The Royal Society, T. R. A. o. E., *Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties*. The Royal society: 2003.
201. Alivisatos, A. P., Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science* **1996**, *271* (5251), 933-937.

202. Freestone, I.; Meeks, N.; Sax, M.; Higgitt, C., The Lycurgus Cup - A Roman nanotechnology. *Gold Bulletin* **2008**, *40* (4), 270-277.
203. British Museum Research Laboratory, D. O. P., Brikbeck College, London, File 114, 5.2.59. London, 1959.
204. Brill, R. H., The chemistry of the Lycurgus cup. *Proc. 7th Internat. Cong. Glass* **1965**, (223), 1-13.
205. Chimside, R. C., The chemistry of the Lycurgus cup. *Proc. 7th Internat. Cong. Glass* **1965**, 222, 1-6.
206. Barber, D. J.; Freestone, I. C., An investigation of the origin of the colour of the Lycurgus Cup by analytical transmission electron microscopy. *Archæometry* **1990**, *32*, 33-45.
207. Faraday, M., The Bakerian lecture : experimental relations of gold (and other metals) to light. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **1847**, *147*, 159-172.
208. Graham, T. H., Liquid Diffusion Applied to Analysis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **1861**, *151*, 183-224.
209. Feynman, R., There's Plenty of Room at the Bottom. In *American Physical Society meeting* Caltech, CA, 1959.
210. Taniguchi, N., *On the Basic Concept of Nano-Technology*. Proc. Intl. Conf. Prod. London: London, 1974.
211. Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E., C60: Buckminsterfullerene. *Nature* **1985**, *318* (6042), 162-163.
212. Iijima, S., Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**, *354* (6348), 56-58.
213. Rossetti, R.; Nakahara, S.; Brus, L. E., Quantum size effects in the redox potentials, resonance Raman spectra, and electronic spectra of CdS crystallites in aqueous solution. *The Journal of Chemical Physics* **1983**, *79* (2), 1086-1088.
214. Peng, X., Green chemical approaches toward high-quality semiconductor nanocrystals. *Chemistry - A European Journal* **2002**, *8* (2), 335-339.
215. Bawendi, M. G.; Steigerwald, M. L.; Brus, L. E., The quantum mechanics of larger semiconductor clusters ("Quantum dots"). *Annual Review of Physical Chemistry* **1990**, *41* (1), 477-496.
216. Brus, L., Electronic wave functions in semiconductor clusters: Experiment and theory. *Journal of Physical Chemistry* **1986**, *90* (12), 2555-2560.
217. Brus, L. E., Electron-electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state. *The Journal of Chemical Physics* **1984**, *80* (9), 4403-4409.
218. Kittel, C., *Physique de l'Etat Solide*. Dunod: 1983.
219. Bimberg, D., *Semiconductors: Physics of Group IV Elements and III-V Compounds*. Springer: New York, 1982; Vol. 17a.
220. Reed, M. A.; Bate, R. T.; Bradshaw, K.; Duncan, W. M.; Frensley, W. R.; Lee, J. W.; Shih, H. D., Spatial Quantization in GaAs-AlGaAs Multiple Quantum Dots. *Journal of Vacuum Science and Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures* **1986**, *4* (1), 358-360.
221. Woggon, U., *Optical Properties of Semiconductor Quantum Dots* Springer Verlag: Berlin, 1997.
222. Gaponenko, S. V., *Optical Properties of Semiconductor Nanocrystals*. Cambridge University Press Cambridge, 1998; Vol. 23.
223. Norris, D. J.; Sacra, A.; Murray, C. B.; Bawendi, M. G., Measurement of the size dependent hole spectrum in CdSe quantum dots. *Physical Review Letters* **1994**, *72* (16), 2612-2615.
224. Nirmal, M.; Brus, L., Luminescence photophysics in semiconductor nanocrystals. *Accounts of Chemical Research* **1999**, *32* (5), 407-414.

225. Underwood, D. F.; Kippeny, T.; Rosenthal, S. J., Ultrafast carrier dynamics in CdSe nanocrystals determined by femtosecond fluorescence upconversion spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105* (2), 436-443.
226. Nirmal, M.; Dabbousi, B. O.; Bawendi, M. G.; Macklin, J. J.; Trautman, J. K.; Harris, T. D.; Brus, L. E., Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals. *Nature* **1996**, *383* (6603), 802-804.
227. Brokmann, X.; Hermier, J. P.; Messin, G.; Desbiolles, P.; Bouchaud, J. P.; Dahan, M., Statistical aging and nonergodicity in the fluorescence of single nanocrystals. *Physical Review Letters* **2003**, *90* (12), 120601/1-120601/4.
228. Empedocles, S. A.; Neuhauser, R.; Shimizu, K.; Bawendi, M. G., Photoluminescence from single semiconductor nanostructures. *Advanced Materials* **1999**, *11* (15), 1243-1256.
229. Frantsuzov, P. A.; Marcus, R. A., Explanation of quantum dot blinking without the long-lived trap hypothesis. *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics* **2005**, *72* (15), 1-10.
230. Dahan, M.; Lévi, S.; Luccardini, C.; Rostaing, P.; Riveau, B.; Triller, A., Diffusion Dynamics of Glycine Receptors Revealed by Single-Quantum Dot Tracking. *Science* **2003**, *302* (5644), 442-445.
231. Nisman, R.; Dellaire, G.; Ren, Y.; Li, R.; Bazett-Jones, D. P., Application of Quantum Dots as Probes for Correlative Fluorescence, Conventional, and Energy-filtered Transmission Electron Microscopy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **2004**, *52* (1), 13-18.
232. Fomento, V.; Nesbitt, D. J., Solution control of radiative and nonradiative lifetimes: A novel contribution to quantum dot blinking suppression. *Nano Letters* **2008**, *8* (1), 287-293.
233. Ko, H. C.; Yuan, C. T.; Lin, S. H.; Tang, J., Blinking suppression of single quantum dots in agarose gel. *Applied Physics Letters* **2010**, *96* (1).
234. Yu, P.; Yuan, C. T.; Ko, H. C.; Huang, J.; Tang, J. In *Blinking suppression and anti-bunching of quantum dots as single-photon sources*, 2010.
235. Antelman, J.; Ebenstein, Y.; Dertinger, T.; Michal, X.; Weiss, S., Suppression of quantum dot blinking in DTT-doped polymer films. *Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113* (27), 11541-11545.
236. Jin, S.; Song, N.; Lian, T., Suppressed blinking dynamics of single QDs on ITO. *ACS Nano* **2010**, *4* (3), 1545-1552.
237. Yuan, C. T.; Yu, P.; Tang, J., Blinking suppression of colloidal CdSe/ZnS quantum dots by coupling to silver nanoprisms. *Applied Physics Letters* **2009**, *94* (24).
238. Chon, B.; Lim, S. J.; Kim, W.; Seo, J.; Kang, H.; Joo, T.; Hwang, J.; Shin, S. K., Shell and ligand-dependent blinking of CdSe-based core/shell nanocrystals. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, *12* (32), 9312-9319.
239. Hollingsworth, J. A.; Vela, J.; Chen, Y.; Htoon, H.; Klimov, V. I.; Casson, A. R. In *'Giant' multishell CdSe nanocrystal quantum dots with suppressed blinking: Novel fluorescent probes for real-time detection of single-molecule events*, 2009.
240. Mahler, B.; Dubertret, B.; Spinicelli, P.; Buil, S.; Quelin, X.; Hermier, J. P. In *Towards non-blinking quantum dots: The effect of thick shell*, 2009.
241. Mahler, B.; Spinicelli, P.; Buil, S.; Quelin, X.; Hermier, J. P.; Dubertret, B., Towards non-blinking colloidal quantum dots. *Nature Materials* **2008**, *7* (8), 659-664.
242. Wang, X.; Ren, X.; Kahen, K.; Hahn, M. A.; Rajeswaran, M.; MacCagnano-Zacher, S.; Silcox, J.; Cragg, G. E.; Efros, A. L.; Krauss, T. D., Non-blinking semiconductor nanocrystals. *Nature* **2009**, *459* (7247), 686-689.
243. Hohng, S.; Ha, T., Near-Complete Suppression of Quantum Dot Blinking in Ambient Conditions. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (5), 1324-1325.

244. Zhang, Y.; Gan, C.; Muhammad, J.; Battaglia, D.; Peng, X.; Xiao, M., Enhanced fluorescence intermittency in Mn-doped single ZnSe quantum dots. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112* (51), 20200-20205.
245. Oswald, w., *Lehrbruck der Allgemeinen Chemie*. Leipzig, Germany, 1897; Vol. 2.
246. Oswald, w., Studien uber die Bildung und Umwandlung fester Korper. *Z. Phys. Chem.* **1897**, *22*, 289.
247. Boistelle, R.; Astier, J. P., Crystallization mechanisms in solution. *Journal of Crystal Growth* **1988**, *90* (1-3), 14-30.
248. Ng, J. D.; Lorber, B.; Witz, J.; Théobald-Dietrich, A.; Kern, D.; Giegé, R., The crystallization of biological macromolecules from precipitates: Evidence for Ostwald ripening. *Journal of Crystal Growth* **1996**, *168* (1-4), 50-62.
249. Murray, C. B.; Norris, D. J.; Bawendi, M. G., Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115* (19), 8706-8715.
250. Peng, Z. A.; Peng, X., Formation of high-quality CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals using CdO as precursor *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123* (1), 183-184.
251. Qu, L.; Peng, Z. A.; Peng, X., Alternative Routes toward High Quality CdSe Nanocrystals. *Nano Letters* **2001**, *1* (6), 333-337.
252. An, Z.; Ueda, T.; Komiyama, S.; Hirakawa, K.; Shen, X., Lithographic quantum dot for sensitive infrared photon detection. *Physica Status Solidi (C) Current Topics in Solid State Physics* **2009**, *6* (4), 936-939.
253. Chen, J.; Chan, Y. H.; Yang, T.; Wark, S. E.; Son, D. H.; Batteas, J. D., Spatially selective optical tuning of quantum dot thin film luminescence. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (51), 18204-18205.
254. Wallraff, G. M.; Hinsberg, W. D., Lithographic Imaging Techniques for the Formation of Nanoscopic Features. *Chemical Reviews* **1999**, *99* (7), 1801-1821.
255. Petroff, P. M.; Lorke, A.; Imamoglu, A., Epitaxially self-assembled quantum dots. *Physics Today* **2001**, *54* (5), 46-52.
256. Petroff, P. M., Epitaxial Growth and Electronic Structure of Self-Assembled Quantum Dots. *Topics in Applied Physics* **2003**, *90*, 147-183.
257. Kim, S. O.; Solak, H. H.; Stoykovich, M. P.; Ferrier, N. J.; De Pablo, J. J.; Nealey, P. F., Epitaxial self-assembly of block copolymers on lithographically defined nanopatterned substrates. *Nature* **2003**, *424* (6947), 411-414.
258. Smith, A. M.; Mohs, A. M.; Nie, S., Tuning the optical and electronic properties of colloidal nanocrystals by lattice strain. *Nature Nanotechnology* **2009**, *4* (1), 56-63.
259. Bortoleto, J. R. R.; Gazoto, A.; Brasil, M. J. S. P.; Meneses, E. A.; Cotta, M. A., Nucleation and growth evolution of InP dots on InGaP/GaAs. *Journal of Physics D: Applied Physics* **2010**, *43* (28).
260. Kukta, R. V., Mechanics of quantum-dot self-organization by epitaxial growth on small areas. *Journal of Applied Mechanics, Transactions ASME* **2010**, *77* (4), 1-6.
261. Alivisatos, A. P., Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100* (31), 13226-13239.
262. De Mello Donegá, C.; Hickey, S. G.; Wuister, S. F.; Vanmaekelbergh, D.; Meijerink, A., Single-step synthesis to control the photoluminescence quantum yield and size dispersion of CdSe nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107* (2), 489-496.
263. Qu, L.; Peng, X., Control of photoluminescence properties of CdSe nanocrystals in growth. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (9), 2049-2055.
264. Talapin, D. V.; Rogach, A. L.; Kornowski, A.; Haase, M.; Weller, H., Highly Luminescent Monodisperse CdSe and CdSe/ZnS Nanocrystals Synthesized in a

- Hexadecylamine-Trioctylphosphine Oxide-Trioctylphosphine Mixture. *Nano Letters* **2001**, *1* (4), 207-211.
265. Li, L. S.; Pradhan, N.; Wang, Y.; Peng, X., High quality ZnSe and ZnS nanocrystals formed by activating zinc carboxylate precursors. *Nano Letters* **2004**, *4* (11), 2261-2264.
266. Piepenbrock, M. O. M.; Stirner, T.; O'Neill, M.; Kelly, S. M., Growth dynamics of CdTe nanoparticles in liquid and crystalline phases. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (24), 7674-7679.
267. Sun, Z. H.; Oyanagi, H.; Nakamura, H.; Jiang, Y.; Zhang, L.; Uehara, M.; Yamashita, K.; Fukano, A.; Maeda, H., Ligand effects of amine on the initial nucleation and growth processes of CdSe nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114* (22), 10126-10131.
268. Oluwafemi, S. O.; Revaprasadu, N., Study on growth kinetics of hexadecylamine capped CdSe nanoparticles using its electronic properties. *Physica B: Condensed Matter* **2009**, *404* (8-11), 1204-1208.
269. Miao, S.; Hickey, S. G.; Rellinghaus, B.; Waurisch, C.; Eychmüller, A., Synthesis and characterization of cadmium phosphide quantum dots emitting in the visible red to near-infrared. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (16), 5613-5615.
270. Bullen, C.; Van Embden, J.; Jasieniak, J.; Cosgriff, J. E.; Mulder, R. J.; Rizzardo, E.; Gu, M.; Raston, C. L., High activity phosphine-free selenium precursor solution for semiconductor nanocrystal growth. *Chemistry of Materials* **2010**, *22* (14), 4135-4143.
271. Ouyang, J.; Zaman, M. B.; Yan, F. J.; Johnston, D.; Li, G.; Wu, X.; Leek, D.; Ratcliffe, C. I.; Ripmeester, J. A.; Yu, K., Multiple families of magic-sized CdSe nanocrystals with strong bandgap photoluminescence via noninjection one-pot syntheses. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112* (36), 13805-13811.
272. Wang, L.; Sun, X.; Liu, W.; Liu, B., High quality zinc-blende CdSe nanocrystals synthesized in a hexadecylamine-oleic acid-paraffin liquid mixture. *Materials Chemistry and Physics* **2010**, *120* (1), 54-60.
273. Wang, L.; Sun, X.; Liu, W.; Yu, X., Phosphine-free synthesis of high quality zinc-blende CdSe nanocrystals in air. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2010**, *353* (2-3), 232-237.
274. Xing, B.; Li, W.; Dou, H.; Zhang, P.; Sun, K., Systematic study of the properties of CdSe quantum dots synthesized in paraffin liquid with potential application in multiplexed bioassays. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112* (37), 14318-14323.
275. Yordanov, G. G.; Yoshimura, H.; Dushkin, C. D., Synthesis of high-quality core-shell quantum dots of CdSe-CdS by means of gradual heating in liquid paraffin. *Colloid and Polymer Science* **2008**, *286* (8-9), 1097-1102.
276. Akhtar, J.; Azad Malik, M.; O'Brien, P.; Wijayantha, K. G. U.; Dharmadasa, R.; Hardman, S. J. O.; Graham, D. M.; Spencer, B. F.; Stubbs, S. K.; Flavell, W. R.; Binks, D. J.; Sirotti, F.; El Kazzi, M.; Silly, M., A greener route to photoelectrochemically active PbS nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* **2010**, *20* (12), 2336-2344.
277. Sapra, S.; Rogach, A. L.; Feldmann, J., Phosphine-free synthesis of monodisperse CdSe nanocrystals in olive oil. *Journal of Materials Chemistry* **2006**, *16* (33), 3391-3395.
278. Bullen, C. R.; Mulvaney, P., Nucleation and growth kinetics of CdSe nanocrystals in octadecene. *Nano Letters* **2004**, *4* (12), 2303-2307.
279. Deng, Z.; Yan, H.; Liu, Y., Band gap engineering of quaternary-alloyed ZnCdSSe quantum dots via a facile phosphine-free colloidal method. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (49), 17744-17745.
280. Wang, C.; Jiang, Y.; Zhang, Z.; Li, G.; Chen, L.; Jie, J., Phosphine-free synthesis of CdSe quantum dots in a new Co-capping ligand system. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2009**, *9* (8), 4735-4740.

281. Deng, Z.; Lie, F. L.; Shen, S.; Ghosh, I.; Mansuripur, M.; Muscat, A. J., Water-based route to ligand-selective synthesis of ZnSe and Cd-doped ZnSe quantum dots with tunable ultraviolet A to blue photoluminescence. *Langmuir* **2009**, *25* (1), 434-442.
282. Liu, Y. F.; Yu, J. S., Selective synthesis of CdTe and high luminescence CdTe/CdS quantum dots: The effect of ligands. *Journal of Colloid and Interface Science* **2009**, *333* (2), 690-698.
283. Su, J.; Zhang, J.; Liu, L.; Huang, Y.; Mason, R. P., Exploring feasibility of multicolored CdTe quantum dots for in Vitro and in Vivo fluorescent imaging. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2008**, *8* (3), 1174-1177.
284. Xia, Y. S.; Zhu, C. Q., Use of surface-modified CdTe quantum dots as fluorescent probes in sensing mercury (II). *Talanta* **2008**, *75* (1), 215-221.
285. Aldeek, F.; Balan, L.; Lambert, J.; Schneider, R., The influence of capping thioalkyl acid on the growth and photoluminescence efficiency of CdTe and CdSe quantum dots. *Nanotechnology* **2008**, *19* (47).
286. Duan, J.; Song, L.; Zhan, J., One-pot synthesis of highly luminescent CdTe quantum dots by microwave irradiation reduction and their Hg<sup>2+</sup>-sensitive properties. *Nano Research* **2009**, *2* (1), 61-68.
287. Kailasa, S. K.; Kiran, K.; Wu, H. F., Comparison of ZnS semiconductor nanoparticles capped with various functional groups as the matrix and affinity probes for rapid analysis of cyclodextrins and proteins in surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (24), 9681-9688.
288. Jie, G.; Huang, H.; Sun, X.; Zhu, J. J., Electrochemiluminescence of CdSe quantum dots for immunosensing of human prealbumin. *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, *23* (12), 1896-1899.
289. Kuang, R.; Kuang, X.; Pan, S.; Zheng, X.; Duan, J.; Duan, Y., Synthesis of cysteamine-coated CdTe quantum dots for the detection of bisphenol A. *Microchimica Acta* **2010**, *169* (1), 109-115.
290. Rajendran, V.; Lehnig, M.; Niemeyer, C. M., Photocatalytic activity of colloidal CdS nanoparticles with different capping ligands. *Journal of Materials Chemistry* **2009**, *19* (35), 6348-6353.
291. Yang, W. h.; Li, W. w.; Dou, H. j.; Sun, K., Hydrothermal synthesis for high-quality CdTe quantum dots capped by cysteamine. *Materials Letters* **2008**, *62* (17-18), 2564-2566.
292. Lovrić, J.; Bazzi, H. S.; Cuie, Y.; Fortin, G. R. A.; Winnik, F. M.; Maysinger, D., Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. *Journal of Molecular Medicine* **2005**, *83* (5), 377-385.
293. Moeno, S.; Nyokong, T., The photophysical studies of a mixture of CdTe quantum dots and negatively charged zinc phthalocyanines. *Polyhedron* **2008**, *27* (8), 1953-1958.
294. Byrne, S. J.; Williams, Y.; Davies, A.; Corr, S. A.; Rakovich, A.; Gun'ko, Y. K.; Rakovich, Y. P.; Donegan, J. F.; Volkov, Y., "Jelly dots": Synthesis and cytotoxicity studies of CdTe quantum dot-gelatin nanocomposites. *Small* **2007**, *3* (7), 1152-1156.
295. Liu, Y.; Wei, C.; Joly, A. G.; Wang, Y.; Pope, C.; Zhang, Y.; Bovin, J. O.; Sherwood, P., Comparison of water-soluble CdTe nanoparticles synthesized in air and in nitrogen. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110* (34), 16992-17000.
296. Rogach, A. L.; Franzl, T.; Klar, T. A.; Feldmann, J.; Gaponik, N.; Lesnyak, V.; Shavel, A.; Eychmüller, A.; Rakovich, Y. P.; Donegan, J. F., Aqueous synthesis of thiol-capped CdTe nanocrystals: State-of-the-art. *Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111* (40), 14628-14637.
297. Li, L.; Qian, H.; Fang, N.; Ren, J., Significant enhancement of the quantum yield of CdTe nanocrystals synthesized in aqueous phase by controlling the pH and concentrations of precursor solutions. *Journal of Luminescence* **2006**, *116* (1-2), 59-66.

298. Ingert, D.; Pileni, M. P., Limitations in producing nanocrystals using reverse micelles as nanoreactors. *Advanced Functional Materials* **2001**, *11* (2), 136-139.
299. He, Y.; Lu, H. T.; Sai, L. M.; Lai, W. Y.; Fan, Q. L.; Wang, L. H.; Huang, W., Synthesis of CdTe nanocrystals through program process of microwave irradiation. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110* (27), 13352-13356.
300. He, Y.; Sai, L. M.; Lu, H. T.; Hu, M.; Lai, W. Y.; Fan, Q. L.; Wang, L. H.; Huang, W., Microwave-assisted synthesis of water-dispersed CdTe nanocrystals with high luminescent efficiency and narrow size distribution. *Chemistry of Materials* **2007**, *19* (3), 359-365.
301. Li, L.; Qian, H.; Ren, J., Rapid synthesis of highly luminescent CdTe nanocrystals in the aqueous phase by microwave irradiation with controllable temperature. *Chemical Communications* **2005**, (4), 528-530.
302. Song, Q.; Ai, X.; Topuria, T.; Rice, P. M.; Alharbi, F. H.; Bagabas, A.; Bahattab, M.; Bass, J. D.; Kim, H. C.; Scott, J. C.; Miller, R. D., Microwave-assisted synthesis of monodispersed CdTe nanocrystals. *Chemical Communications* **2010**, *46* (27), 4971-4973.
303. Washington Ii, A. L.; Strouse, G. F., Microwave synthesis of CdSe and CdTe nanocrystals in nonabsorbing alkanes. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (28), 8916-8922.
304. Dan, Z.; Zhike, H.; Chan, W. H.; Martin M. F, C., Synthesis and characterization of high-quality water-soluble near-infrared-emitting CdTe/CdS quantum dots capped by N-Acetyl-L-cysteine via hydrothermal method. *Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113* (4), 1293-1300.
305. Han, H.; Di Francesco, G.; Sexton, A.; Tretiak, A.; Maye, M. M. In *Greener synthesis of nanoparticles using fine tuned hydrothermal routes*, 2010; pp 7-10.
306. Mao, W.; Guo, J.; Yang, W.; Wang, C.; He, J.; Chen, J., Synthesis of high-quality near-infrared-emitting CdTeS alloyed quantum dots via the hydrothermal method. *Nanotechnology* **2007**, *18* (48).
307. Wang, J.; Han, H., Hydrothermal synthesis of high-quality type-II CdTe/CdSe quantum dots with near-infrared fluorescence. *Journal of Colloid and Interface Science* **2010**, *351* (1), 83-87.
308. Wu, L.; Wang, D.; Yao, A.; Xie, W.; Huang, W., Hydrothermal synthesis of semiconductor CdSe quantum dots material for cell marking. *Kuei Suan Jen Hsueh Pao/ Journal of the Chinese Ceramic Society* **2009**, *37* (9), 1580-1584.
309. Rogach, A. L., Nanocrystalline CdTe and CdTe(S) particles: Wet chemical preparation, size-dependent optical properties and perspectives of optoelectronic applications. *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology* **2000**, *69*, 435-440.
310. Chan, W. C. W.; Maxwell, D. J.; Gao, X.; Bailey, R. E.; Han, M.; Nie, S., Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Current Opinion in Biotechnology* **2002**, *13* (1), 40-46.
311. Chan, W. C. W.; Nie, S., Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* **1998**, *281* (5385), 2016-2018.
312. Jaiswal, J. K.; Mattoussi, H.; Mauro, J. M.; Simon, S. M., Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nature Biotechnology* **2003**, *21* (1), 47-51.
313. Mattoussi, H.; Matthew Mauro, J.; Goldman, E. R.; Anderson, G. P.; Sundar, V. C.; Mikulec, F. V.; Bawendi, M. G., Self-assembly of CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122* (49), 12142-12150.

314. Pathak, S.; Choi, S. K.; Arnheim, N.; Thompson, M. E., Hydroxylated quantum dots as luminescent probes for in situ hybridization. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123* (17), 4103-4104.
315. Liu, D.; Wu, W.; Qiu, Y.; Lu, J.; Yang, S., Chemical conjugation of fullerene C60 to CdSe nanocrystals via dithiocarbamate ligands. *Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111* (48), 17713-17719.
316. Liu, W.; Howarth, M.; Greytak, A. B.; Zheng, Y.; Nocera, D. G.; Ting, A. Y.; Bawendi, M. G., Compact biocompatible quantum dots functionalized for cellular imaging. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (4), 1274-1284.
317. Querner, C.; Reiss, P.; Bleuse, J.; Pron, A., Chelating ligands for nanocrystals' surface functionalization. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (37), 11574-11582.
318. Gao, Y.; Zhang, Q.; Gao, Q.; Tian, Y.; Zhou, W.; Zheng, L.; Zhang, S., Synthesis of high quality CdSe quantum dots through a mild solution-phase synthetic route. *Materials Chemistry and Physics* **2009**, *115* (2-3), 724-727.
319. Kim, S.; Bawendi, M. G., Oligomeric Ligands for Luminescent and Stable Nanocrystal Quantum Dots. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (48), 14652-14653.
320. Liu, L.; Guo, X.; Li, Y.; Zhong, X., Bifunctional multidentate ligand modified highly stable water-soluble quantum dots. *Inorganic Chemistry* **2010**, *49* (8), 3768-3775.
321. Fahmi, A.; Pietsch, T.; Appelhans, D.; Gindy, N.; Voit, B., Water-soluble CdSe nanoparticles stabilised by dense-shell glycodendrimers. *New Journal of Chemistry* **2009**, *33* (4), 703-706.
322. Nann, T., Phase-transfer of CdSe@ZnS quantum dots using amphiphilic hyperbranched polyethylenimine. *Chemical Communications* **2005**, (13), 1735-1736.
323. Shi, Y.; Tu, C.; Zhu, Q.; Qian, H.; Ren, J.; Liu, C.; Zhu, X.; Yan, D.; Kong, E. S. W.; He, P., Self-assembly of CdTe nanocrystals at the water/oil interface by amphiphilic hyperbranched polymers. *Nanotechnology* **2008**, *19* (44).
324. Zeng, Y.; Tang, C.; Tian, G.; Yi, P.; Huang, H.; Hu, N.; Li, S.; Li, C.; Lin, B.; Yu, X.; Ling, Y.; Xia, X., A controlled approach for synthesizing CdTe quantum dots polyamidoamine nanocomposites. *Chemical Engineering Journal* **2010**, *156* (3), 524-527.
325. Zhao, Y.; Liu, S.; Li, Y.; Jiang, W.; Chang, Y.; Pan, S.; Fang, X.; Wang, Y. A.; Wang, J., Synthesis and grafting of folate-PEG-PAMAM conjugates onto quantum dots for selective targeting of folate-receptor-positive tumor cells. *Journal of Colloid and Interface Science* **2010**, *350* (1), 44-50.
326. Zhou, C.; Shen, H.; Guo, Y.; Xu, L.; Niu, J.; Zhang, Z.; Du, Z.; Chen, J.; Li, L. S., 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* **2010**, *344* (2), 279-285.
327. Fan, H.; Leve, E. W.; Scullin, C.; Gabaldon, J.; Tallant, D.; Bunge, S.; Boyle, T.; Wilson, M. C.; Brinker, C. J., Surfactant-assisted synthesis of water-soluble and biocompatible semiconductor quantum dot micelles. *Nano Letters* **2005**, *5* (4), 645-648.
328. Kim, Y. H.; Subramanyam, E.; Im, J. H.; Huh, K. M.; Choi, H.; Choi, J. S.; Lee, Y. K.; Park, S. W., A new PEG-lipid conjugate micelle for encapsulation of CdSe/ZnS quantum dots. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2010**, *10* (5), 3275-3279.
329. Papagiannaros, A.; Levchenko, T.; Hartner, W.; Mongayt, D.; Torchilin, V., Quantum dots encapsulated in phospholipid micelles for imaging and quantification of tumors in the near-infrared region. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **2009**, *5* (2), 216-224.

330. Schroeder, J. E.; Shweky, I.; Shmeeda, H.; Banin, U.; Gabizon, A., Folate-mediated tumor cell uptake of quantum dots entrapped in lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **2007**, *124* (1-2), 28-34.
331. Xie, M.; Luo, K.; Huang, B. H.; Liu, S. L.; Hu, J.; Cui, D.; Zhang, Z. L.; Xiao, G. F.; Pang, D. W., PEG-interspersed nitrilotriacetic acid-functionalized quantum dots for site-specific labeling of prion proteins expressed on cell surfaces. *Biomaterials* **2010**, *31* (32), 8362-8370.
332. Selvan, S. T.; Tan, T. T.; Ying, J. Y., Robust, non-cytotoxic, silica-coated CdSe quantum dots with efficient photoluminescence. *Advanced Materials* **2005**, *17* (13), 1620-1625.
333. Erogbogbo, F.; Yong, K. T.; Roy, I.; Xu, G. X.; Prasad, P. N.; Swihart, M. T., Biocompatible luminescent silicon quantum dots for imaging of cancer cells. *ACS Nano* **2008**, *2* (5), 873-878.
334. Koole, R.; Van Schooneveld, M. M.; Hilhorst, J.; De Donegal, C. M.; T Hart, D. C.; Van Blaaderen, A.; Vanmaekelbergh, D.; Meijerink, A., On the incorporation mechanism of hydrophobic quantum dots in silica spheres by a reverse microemulsion method. *Chemistry of Materials* **2008**, *20* (7), 2503-2512.
335. Wang, C.; Ma, Q.; Dou, W.; Kanwal, S.; Wang, G.; Yuan, P.; Su, X., Synthesis of aqueous CdTe quantum dots embedded silica nanoparticles and their applications as fluorescence probes. *Talanta* **2009**, *77* (4), 1358-1364.
336. Han, M.; Gao, X.; Su, J. Z.; Nie, S., Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nature Biotechnology* **2001**, *19* (7), 631-635.
337. Sheng, W.; Kim, S.; Lee, J.; Kim, S. W.; Jensen, K.; Bawendi, M. G., In-situ encapsulation of quantum dots into polymer microspheres. *Langmuir* **2006**, *22* (8), 3782-3790.
338. Yang, J.; Dave, S. R.; Gao, X., Quantum dot nanobarcodes: Epitaxial assembly of nanoparticle-polymer complexes in homogeneous solution. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (15), 5286-5292.
339. Yuan, P.; Ma, Q.; Meng, R.; Wang, C.; Dou, W.; Wang, G.; Su, X., Multicolor quantum dot-encoded microspheres for the fluoroimmunoassays of chicken newcastle disease and goat pox virus. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2009**, *9* (5), 3092-3098.
340. Zhang, B.; Liang, X.; Hao, L.; Cheng, J.; Gong, X.; Liu, X.; Ma, G.; Chang, J., Quantum dots/particle-based immunofluorescence assay: Synthesis, characterization and application. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2009**, *94* (1), 45-50.
341. Dougherty, T. J.; Marcus, S. L., Photodynamic therapy. *European Journal of Cancer Part A: General Topics* **1992**, *28* (10), 1734-1742.
342. Ramberg, K.; Melø, T. B.; Johnsson, A., In situ Assessment of Porphyrin Photosensitizers in Propionibacterium acnes. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* **2004**, *59* (1-2), 93-98.
343. Dubertret, B.; Skourides, P.; Norris, D. J.; Noireaux, V.; Brivanlou, A. H.; Libchaber, A., In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* **2002**, *298* (5599), 1759-1762.
344. Sukhanova, A.; Devy, J.; Venteo, L.; Kaplan, H.; Artemyev, M.; Oleinikov, V.; Klinov, D.; Pluot, M.; Cohen, J. H. M.; Nabiev, I., Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells. *Analytical Biochemistry* **2004**, *324* (1), 60-67.
345. Talapin, D. V.; Mekis, I.; Götzinger, S.; Kornowski, A.; Benson, O.; Weller, H., CdSe/CdS/ZnS and CdSe/ZnSe/ZnS core-shell-shell nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108* (49), 18826-18831.

346. Yu, W. W.; Qu, L.; Guo, W.; Peng, X., Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chemistry of Materials* **2003**, *15* (14), 2854-2860.
347. Jose, R.; Biju, V.; Yamaoka, Y.; Nagase, T.; Makita, Y.; Shinohara, Y.; Baba, Y.; Ishikawa, M., Synthesis of CdTe quantum dots using a heterogeneous process at low temperature and their optical and structural properties. *Applied Physics A: Materials Science and Processing* **2004**, *79* (8), 1833-1838.
348. Yu, K.; Zaman, B.; Romanova, S.; Wang, D. S.; Ripmeester, J. A., Sequential synthesis of type II colloidal CdTe/CdSe core-shell nanocrystals. *Small* **2005**, *1* (3), 332-338.
349. Yu, W. W.; Wang, Y. A.; Peng, X., Formation and Stability of Size-, Shape-, and Structure-Controlled CdTe Nanocrystals: Ligand Effects on Monomers and Nanocrystals. *Chemistry of Materials* **2003**, *15* (22), 4300-4308.
350. Vasiliev, R. B.; Vinogradov, V. S.; Dorofeev, S. G.; Kozyrev, S. P.; Kucherenko, I. V.; Novikova, N. N., IR-active vibrational modes of CdTe and CdSe colloidal quantum dots and CdTe/CdSe core/shell nanoparticles and coupling effects. *Physics of the Solid State* **2007**, *49* (3), 547-551.
351. Foos, E. E.; Wilkinson, J.; Mäkinen, A. J.; Watkins, N. J.; Kafafi, Z. H.; Long, J. P., Synthesis and surface composition study of CdSe nanoclusters prepared using solvent systems containing primary, secondary, and tertiary amines. *Chemistry of Materials* **2006**, *18* (12), 2886-2894.
352. Yu, W. W.; Peng, X., Formation of high-quality CdS and other II-VI semiconductor nanocrystals in noncoordinating solvents: Tunable reactivity of monomers. *Angewandte Chemie - International Edition* **2002**, *41* (13), 2368-2371.
353. Piepenbrock, M. O. M.; Stirner, T.; Kelly, S. M.; O'Neill, M., A low-temperature synthesis for organically soluble HgTe nanocrystals exhibiting near-infrared photoluminescence and quantum confinement. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (21), 7087-7090.
354. Talapin, D. V.; Haubold, S.; Rogach, A. L.; Kornowski, A.; Haase, M.; Weller, H., A novel organometallic synthesis of highly luminescent CdTe nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105* (12), 2260-2263.
355. Wuister, S. F.; Van Driel, F.; Meijerink, A., Luminescence of CdTe nanocrystals. *Journal of Luminescence* **2003**, *102-103* (SPEC), 327-332.
356. Wuister, S. F.; Van Driel, F.; Meijerink, A., Luminescence and growth of CdTe quantum dots and clusters. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2003**, *5* (6), 1253-1258.
357. Jasieniak, J.; Bullen, C.; Van Embden, J.; Mulvaney, P., Phosphine-free synthesis of CdSe nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109* (44), 20665-20668.
358. Tsay, J. M.; Pflughoeft, M.; Bentolila, L. A.; Weiss, S., Hybrid Approach to the Synthesis of Highly Luminescent CdTe/ZnS and CdHgTe/ZnS Nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (7), 1926-1927.
359. Kloepper, J. A.; Mielke, R. E.; Wong, M. S.; Nealon, K. H.; Stucky, G.; Nadeau, J. L., Quantum dots as strain- and metabolism-specific microbiological labels. *Applied and Environmental Microbiology* **2003**, *69* (7), 4205-4213.
360. Bharali, D. J.; Lucey, D. W.; Jayakumar, H.; Pudavar, H. E.; Prasad, P. N., Folate-receptor-mediated delivery of InP quantum dots for bioimaging using confocal and two-photon microscopy. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (32), 11364-11371.
361. Chen, H.; Gai, H.; Yeung, E. S., Inhibition of photobleaching and blue shift in quantum dots. *Chemical Communications* **2009**, (13), 1676-1678.
362. Liu, C.; Kwon, Y. K.; Heo, J., Laser-induced blue-shift of the photoluminescence from PbS quantum dots in glasses. *Chemical Physics Letters* **2008**, *452* (4-6), 281-284.

363. Van Sark, W. G. J. H. M.; Frederix, P. L. T. M.; Van den Heuvel, D. J.; Gerritsen, H. C.; Bol, A. A.; Van Lingen, J. N. J.; De Mello Donegá, C.; Meijerink, A., Photooxidation and photobleaching of single CdSe/ZnS quantum dots probed by room-temperature time-resolved spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105* (35), 8281-8284.
364. Zhang, Y.; He, J.; Wang, P. N.; Chen, J. Y.; Lu, Z. J.; Lu, D. R.; Guo, J.; Wang, C. C.; Yang, W. L., Time-dependent photoluminescence blue shift of the quantum dots in living cells: Effect of oxidation by singlet oxygen. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (41), 13396-13401.
365. De La Fuente, J. M.; Fandel, M.; Berry, C. C.; Riehle, M.; Cronin, L.; Aitchison, G.; Curtis, A. S. G., Quantum dots protected with tiopronin: A new fluorescence system for cell-biology studies. *ChemBioChem* **2005**, *6* (6), 989-991.
366. Gaponik, N.; Rogach, A. L., Thiol-capped CdTe nanocrystals: Progress and perspectives of the related research fields. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, *12* (31), 8685-8693.
367. Shen, H.; Wang, H.; Chen, X.; Niu, J. Z.; Xu, W.; Li, X. M.; Jiang, X. D.; Du, Z.; Li, L. S., Size-and shape-controlled synthesis of CdTe and PbTe nanocrystals using tellurium dioxide as the tellurium precursor. *Chemistry of Materials* **2010**, *22* (16), 4756-4761.
368. Tang, Z.; Wang, Y.; Shanbhag, S.; Kotov, N. A., Spontaneous CdTe → alloy → CdS transition of stabilizer-depleted CdTe nanoparticles induced by EDTA. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (21), 7036-7042.
369. Wang, C. L.; Zhang, H.; Zhang, J. H.; Lv, N.; Li, M. J.; Sun, H. Z.; Yang, B., Ligand dynamics of aqueous CdTe nanocrystals at room temperature. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112* (16), 6330-6336.
370. Zhang, H.; Liu, Y.; Wang, C.; Zhang, J.; Sun, H.; Li, M.; Yang, B., Directing the growth of semiconductor nanocrystals in aqueous solution: Role of electrostatics. *ChemPhysChem* **2008**, *9* (9), 1309-1316.
371. Zhang, H.; Wang, L.; Xiong, H.; Hu, L.; Yang, B.; Li, W., Hydrothermal Synthesis for High-Quality CdTe Nanocrystals. *Advanced Materials* **2003**, *15* (20), 1712-1715.
372. Zhang, H.; Zhou, Z.; Yang, B.; Gao, M., The influence of carboxyl groups on the photoluminescence of mercaptocarboxylic acid-stabilized CdTe nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107* (1), 8-13.
373. Zhong, P.; Yu, Y.; Wu, J.; Lai, Y.; Chen, B.; Long, Z.; Liang, C., Preparation and application of functionalized nanoparticles of CdSe capped with 11-mercaptoundecanoic acid as a fluorescence probe. *Talanta* **2006**, *70* (4), 902-906.
374. Gaponik, N.; Talapin, D. V.; Rogach, A. L.; Hoppe, K.; Shevchenko, E. V.; Kornowski, A.; Eychmüller, A.; Weller, H., Thiol-capping of CdTe nanocrystals: An alternative to organometallic synthetic routes. *Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106* (29), 7177-7185.
375. Gu, Z.; Zou, L.; Fang, Z.; Zhu, W.; Zhong, X., One-pot synthesis of highly luminescent CdTe/CdS core/shell nanocrystals in aqueous phase. *Nanotechnology* **2008**, *19* (13).
376. Hao, E.; Zhang, H.; Yang, B.; Ren, H.; Shen, J., Preparation of luminescent polyelectrolyte/Cu-doped ZnSe nanoparticle multilayer composite films. *Journal of Colloid and Interface Science* **2001**, *238* (2), 285-290.
377. Zhang, H.; Yang, B., X-ray photoelectron spectroscopy studies of the surface composition of highly luminescent CdTe nanoparticles in multilayer films. *Thin Solid Films* **2002**, *418* (2), 169-174.
378. Komarneni, S.; Li, D.; Newalkar, B.; Katsuki, H.; Bhalla, A. S., Microwave - Polyol process for Pt and Ag nanoparticles. *Langmuir* **2002**, *18* (15), 5959-5962.

379. Sutton, W. H., Microwave processing of ceramic materials. *American Ceramic Society Bulletin* **1989**, 68 (2), 376-386.
380. Lanska, D. j., Chapter 30 Historical aspects of the major neurological vitamin deficiency disorders: the water-soluble B vitamins. 2009; Vol. 95, pp 445-476.
381. Wills, L., Treatment of 'pernicious anaemia' of pregnancy and 'tropical anaemia,' with special reference to yeast extract as a curative agent. *British Medical Journal* **1931**, 1, 1059-1064.
382. Mitchell, H. K.; Snell, E. E.; Williams, R. J., The concentration of "folic acid" [5]. *Journal of the American Chemical Society* **1941**, 63 (8), 2284.
383. Hoffbrand, A. V.; Weir, D. G., The history of folic acid. *British Journal of Haematology* **2001**, 113 (3), 579-589.
384. Angier, R. B.; Boothe, J. H.; Hutchings, B. L.; Mowat, J. H.; Semb, J.; Stokstad, E. L. R.; SubbaRow, Y.; Waller, C. W.; Cosulich, D. B.; Fahrenbach, M. J.; Hultquist, M. E.; Kuh, E.; Northey, E. H.; Seeger, D. R.; Sickels, J. P.; Smith Jr, J. M., Synthesis of a compound identical with the L. casei factor isolated from liver. *Science* **1945**, 102 (2644), 227-228.
385. Farber, S.; Diamond, L. K.; Mercer, R. D.; Sylvester, R. F.; Wolff, J. A., Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-Aminopteroyl-glutamic acid (Aminopterin). *N. Engl. J. Med.* **1948**, 238, 787-793.
386. Kamen, B. A.; Smith, A. K., A review of folate receptor alpha cycling and 5-methyltetrahydrofolate accumulation with an emphasis on cell models in vitro. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, 56 (8), 1085-1097.
387. Antony, A. C., The biological chemistry of folate receptors. *Blood* **1992**, 79 (11), 2807-2820.
388. Corona, G.; Giannini, F.; Fabris, M.; Toffoli, G.; Biocchi, M., Role of folate receptor and reduced folate carrier in the transport of 5-methyltetrahydrofolic acid in human ovarian carcinoma cells. *International Journal of Cancer* **1998**, 75 (1), 125-133.
389. Zhao, R.; Goldman, I. D., Resistance to antifolates. *Oncogene* **2003**, 22 (47 REV. ISS. 6), 7431-7457.
390. Jackman, A. L.; Theti, D. S.; Gibbs, D. D., Antifolates targeted specifically to the folate receptor. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, 56 (8), 1111-1125.
391. Low, P. S.; Antony, A. C., Folate receptor-targeted drugs for cancer and inflammatory diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, 56 (8), 1055-1058.
392. Wollack, J. B.; Makori, B.; Ahlawat, S.; Koneru, R.; Picinich, S. C.; Smith, A.; Goldman, I. D.; Qiu, A.; Cole, P. D.; Glod, J.; Kamen, B., Characterization of folate uptake by choroid plexus epithelial cells in a rat primary culture model. *Journal of Neurochemistry* **2008**, 104 (6), 1494-1503.
393. Elnakat, H.; Ratnam, M., Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: Implications in targeted therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, 56 (8), 1067-1084.
394. Low, P. S.; Henne, W. A.; Doorneweerd, D. D., Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases. *Accounts of Chemical Research* **2008**, 41 (1), 120-129.
395. Antony, A. C.; Utey, C.; Van Horne, K. C.; Kolhouse, J. F., Isolation and characterization of a folate receptor from human placenta. *Journal of Biological Chemistry* **1981**, 256 (18), 9684-9692.
396. Sabharanjak, S.; Mayor, S., Folate receptor endocytosis and trafficking. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, 56 (8), 1099-1109.
397. Antony, A. C., Folate receptors. *Annual Review of Nutrition* **1996**, 16, 501-521.

398. Ratnam, M.; Marquardt, H.; Duhring, J. L.; Freisheim, J. H., Homologous membrane folate binding proteins in human placenta: Cloning and sequence of a cDNA. *Biochemistry* **1989**, *28* (20), 8249-8254.
399. Wang, S.; Low, P. S., Folate-mediated targeting of antineoplastic drugs, imaging agents, and nucleic acids to cancer cells. *Journal of Controlled Release* **1998**, *53* (1-3), 39-48.
400. De Luca, S.; Tesauro, D.; Lello, P. D.; Fattorusso, R.; Saviano, M.; Pedone, C.; Morelli, G., Synthesis and solution characterization of a porphyrin-CCK8 conjugate. *Journal of Peptide Science* **2001**, *7* (7), 386-394.
401. Ross, J. F.; Chaudhuri, P. K.; Ratnam, M., Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines: Physiologic and clinical implications. *Cancer* **1994**, *73* (9), 2432-2443.
402. Paulos, C. M.; Turk, M. J.; Breur, G. J.; Low, P. S., Folate receptor-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to activated macrophages in rheumatoid arthritis. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, *56* (8), 1205-1217.
403. Shen, F.; Wu, M.; Ross, J. F.; Miller, D.; Ratnam, M., Folate receptor type  $\gamma$  is primarily a secretory protein due to lack of an efficient signal for glycosylphosphatidylinositol modification: Protein characterization and cell type specificity. *Biochemistry* **1995**, *34* (16), 5660-5665.
404. Ke, C. Y.; Mathias, C. J.; Green, M. A., Folate-receptor-targeted radionuclide imaging agents. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, *56* (8), 1143-1160.
405. Sudimack, J.; Lee, R. J., Targeted drug delivery via the folate receptor. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, *41* (2), 147-162.
406. Gabizon, A.; Shmeeda, H.; Horowitz, A. T.; Zalipsky, S., Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, *56* (8), 1177-1192.
407. Rijnboutt, S.; Jansen, G.; Posthuma, G.; Hynes, J. B.; Schornagel, J. H.; Strous, G. J., Endocytosis of GPI-linked membrane folate receptor- $\alpha$ . *Journal of Cell Biology* **1996**, *132* (1-2), 35-47.
408. Xia, W.; Hilgenbrink, A. R.; Matteson, E. L.; Lockwood, M. B.; Cheng, J. X.; Low, P. S., A functional folate receptor is induced during macrophage activation and can be used to target drugs to activated macrophages. *Blood* **2009**, *113* (2), 438-446.
409. Gordon, S., Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology* **2003**, *3* (1), 23-35.
410. Gordon, S.; Taylor, P. R., Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology* **2005**, *5* (12), 953-964.
411. Müller, C.; Hohn, A.; Schubiger, P. A.; Schibli, R., Preclinical evaluation of novel organometallic  $^{99m}\text{Tc}$ -folate and  $^{99m}\text{Tc}$ -pteroate radiotracers for folate receptor-positive tumour targeting. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2006**, *33* (9), 1007-1016.
412. Müller, C.; Schubiger, P. A.; Schibli, R., Synthesis and in vitro/in vivo evaluation of novel  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -folates. *Bioconjugate Chemistry* **2006**, *17* (3), 797-806.
413. Müller, C.; Mindt, T. L.; De Jong, M.; Schibli, R., Evaluation of a novel radiofolate in tumour-bearing mice: Promising prospects for folate-based radionuclide therapy. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2009**, *36* (6), 938-946.
414. Mathias, C. J.; Lewis, M. R.; Reichert, D. E.; Laforest, R.; Sharp, T. L.; Lewis, J. S.; Yang, Z. F.; Waters, D. J.; Snyder, P. W.; Low, P. S.; Welch, M. J.; Green, M. A., Preparation of  $^{66}\text{Ga}$ - and  $^{68}\text{Ga}$ -labeled  $\text{Ga}(\text{III})$ -deferoxamine-folate as potential folate-receptor-targeted PET radiopharmaceuticals. *Nuclear Medicine and Biology* **2003**, *30* (7), 725-731.
415. Bettio, A.; Honer, M.; Müller, C.; Brühlmeier, M.; Müller, U.; Schibli, R.; Groehn, V.; Schubiger, A. P.; Ametamey, S. M., Synthesis and preclinical evaluation of a folic acid

- derivative labeled with  $^{18}\text{F}$  for PET imaging of folate receptor-positive tumors. *Journal of Nuclear Medicine* **2006**, *47* (7), 1153-1160.
416. Mohapatra, S.; Mallick, S. K.; Maiti, T. K.; Ghosh, S. K.; Pramanik, P., Synthesis of highly stable folic acid conjugated magnetite nanoparticles for targeting cancer cells. *Nanotechnology* **2007**, *18* (38).
417. Chen, W. T.; Thirumalai, D.; Shih, T. T. F.; Chen, R. C.; Tu, S. Y.; Lin, C. I.; Yang, P. C., Dynamic contrast-enhanced folate-receptor-targeted MR imaging using a gd-loaded peg-dendrimer-folate conjugate in a mouse xenograft tumor model. *Molecular Imaging and Biology* **2010**, *12* (2), 145-154.
418. Kamaly, N.; Kalber, T.; Thanou, M.; Bell, J. D.; Miller, A. D., Folate receptor targeted bimodal liposomes for tumor magnetic resonance imaging. *Bioconjugate Chemistry* **2009**, *20* (4), 648-655.
419. Zhang, Z.; Jia, J.; Lai, Y.; Ma, Y.; Weng, J.; Sun, L., Conjugating folic acid to gold nanoparticles through glutathione for targeting and detecting cancer cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2010**, *18* (15), 5528-5534.
420. Ke, J. H.; Lin, J. J.; Carey, J. R.; Chen, J. S.; Chen, C. Y.; Wang, L. F., A specific tumor-targeting magnetofluorescent nanoprobe for dual-modality molecular imaging. *Biomaterials* **2010**, *31* (7), 1707-1715.
421. Pan, J.; Feng, S. S., Targeting and imaging cancer cells by Folate-decorated, quantum dots (QDs)- loaded nanoparticles of biodegradable polymers. *Biomaterials* **2009**, *30* (6), 1176-1183.
422. Yu, M. K.; Lee, D. Y.; Kim, Y. S.; Park, K.; Park, S. A.; Son, D. H.; Lee, G. Y.; Nam, J. H.; Kim, S. Y.; Kim, I. S.; Park, R. W.; Byun, Y., Antiangiogenic and apoptotic properties of a novel amphiphilic folate-heparin-lithocholate derivative having cellular internality for cancer therapy. *Pharmaceutical Research* **2007**, *24* (4), 705-714.
423. Maeng, J. H.; Lee, D. H.; Jung, K. H.; Bae, Y. H.; Park, I. S.; Jeong, S.; Jeon, Y. S.; Shim, C. K.; Kim, W.; Kim, J.; Lee, J.; Lee, Y. M.; Kim, J. H.; Kim, W. H.; Hong, S. S., Multifunctional doxorubicin loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for chemotherapy and magnetic resonance imaging in liver cancer. *Biomaterials* **2010**, *31* (18), 4995-5006.
424. Gravier, J.; Schneider, R.; Frochot, C.; Bastogne, T.; Schmitt, F.; Didelon, J.; Guillemain, F.; Barberi-Heyob, M., Improvement of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-like photosensitizer selectivity with folate-based targeted delivery. Synthesis and in vivo delivery studies. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51* (13), 3867-3877.
425. Zhang, K.; Wang, Q.; Xie, Y.; Mor, G.; Sega, E.; Low, P. S.; Huang, Y., Receptor-mediated delivery of siRNAs by tethered nucleic acid base-paired interactions. *RNA* **2008**, *14* (3), 577-583.
426. Lai, T. Y.; Lee, W. C., Killing of cancer cell line by photoexcitation of folic acid-modified titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2009**, *204* (2-3), 148-153.
427. Tong, L.; Zhao, Y.; Huff, T. B.; Hansen, M. N.; Wei, A.; Cheng, J. X., Gold nanorods mediate tumor cell death by compromising membrane integrity. *Advanced Materials* **2007**, *19* (20), 3136-3141.
428. Uekama, K., Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2004**, *52* (8), 900-915.
429. Quintana, A.; Raczka, E.; Piehler, L.; Lee, I.; Myc, A.; Majoros, I.; Patri, A. K.; Thomas, T.; Mulé, J.; Baker Jr, J. R., Design and function of a dendrimer-based therapeutic nanodevice targeted to tumor cells through the folate receptor. *Pharmaceutical Research* **2002**, *19* (9), 1310-1316.

430. Majoros, I. J.; Myc, A.; Thomas, T.; Mehta, C. B.; Baker Jr, J. R., PAMAM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: Synthesis, characterization, and functionality. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (2), 572-579.
431. Wang, S.; Lee, R. J.; Mathias, C. J.; Green, M. A.; Low, P. S., Synthesis, purification, and tumor cell uptake of <sup>67</sup>Ga-deferoxamine-folate, a potential radiopharmaceutical for tumor imaging. *Bioconjugate Chemistry* **1996**, *7* (1), 56-62.
432. Manzoor, K.; Johnny, S.; Thomas, D.; Setua, S.; Menon, D.; Nair, S., Bio-conjugated luminescent quantum dots of doped ZnS: A cyto-friendly system for targeted cancer imaging. *Nanotechnology* **2009**, *20* (6).
433. Wang, Y.; Zheng, J.; Zhang, Z.; Yuan, C.; Fu, D., CdTe nanocrystals as luminescent probes for detecting ATP, folic acid and l-cysteine in aqueous solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2009**, *342* (1-3), 102-106.
434. King-Heiden, T. C.; Wicinski, P. N.; Mangham, A. N.; Metz, K. M.; Nesbit, D.; Pedersen, J. A.; Hamers, R. J.; Heideman, W.; Peterson, R. E., Quantum dot nanotoxicity assessment using the zebrafish embryo. *Environmental Science and Technology* **2009**, *43* (5), 1605-1611.