



HAL
open science

Synthèse et fonctionnalisation de nanocristaux fluorescents (Quantum Dots) pour l'imagerie et la caractérisation des propriétés hydrophobes/hydrophiles de biofilms bactériens

Fadi Aldeek

► **To cite this version:**

Fadi Aldeek. Synthèse et fonctionnalisation de nanocristaux fluorescents (Quantum Dots) pour l'imagerie et la caractérisation des propriétés hydrophobes/hydrophiles de biofilms bactériens. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2010. Français. NNT : 2010NAN10078 . tel-01746378

HAL Id: tel-01746378

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746378>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ

Mention : « Science de la Vie et de la Santé »

Présentée et soutenue publiquement par

Fadi ALDEEK

Le 10 Novembre 2010

Synthèse et fonctionnalisation de nanocristaux fluorescents (Quantum Dots) pour l'imagerie et la caractérisation des propriétés hydrophobes/hydrophiles de biofilms bactériens

Composition du jury

Rapporteurs :

- Christine Roques, Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse
- Valérie Martchi-Hartzner, Directrice de Recherche CNRS, Rennes

Examineurs :

- Lavinia Balan, Chargé de Recherche CNRS, Mulhouse
- Romain Briandet, Chargé de Recherche INRA, Massy

Invités :

- Marie-Pierre Fontaine-Aupart, Directrice de Recherche CNRS, Orsay
- Christian Mustin, Chargé de Recherche CNRS, Nancy

Directeurs de thèse :

- Jean-Claude Block, Professeur, Nancy-Université
- Raphaël Schneider, Professeur, Nancy-Université

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier Monsieur le Professeur Jean-Claude Block pour avoir accepté de diriger ce travail et pour les réunions qui ont permis un suivi régulier de notre travail. Aussi, j'adresse toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Raphael Schneider pour son encadrement tout au long de ma thèse, pour sa patience, sa sympathie, son aide précieuse, ses conseils, le savoir qu'il m'a transmis ainsi que pour tous les moments de sympathie partagés en dehors du laboratoire.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Mesdames Valérie Martchi-Hartzner et Christine Roques pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, à Madame Lavinia Balan ainsi que à Monsieur Romain Briandet pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse. Je les remercie de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse.

J'adresse toute ma gratitude à Monsieur Christian Mustin pour tout le temps consacré à l'imagerie confocale de fluorescence et pour toutes les discussions scientifiques très intéressantes partagées.

Je remercie profondément Monsieur Christophe Merlin pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour l'initiation à la microbiologie ainsi que pour toutes les critiques scientifiques qui ont fait avancer le travail. Je tiens à remercier toute l'équipe de microbiologie du pôle de l'eau : Hélène Guilloteau, Laetitia Alleron, Sébastien Bonot, Florence et Edit pour leur gentillesse immesurables ainsi que pour la préparation des précultures bactériennes de nuit.

Je remercie également Madame Marie-Pierre Fontaine-Aupart pour sa gentillesse, son aide précieuse ainsi que pour toutes les connaissances qu'elle m'a apportées sur la spectroscopie de corrélation de fluorescence. Je remercie tous les membres du CLUPS (Centre du Laser de l'Université Paris Sud) : Sandrine Lecart, Karine Steenkest, Sandrine Lévêque-Fort, Samia Daddi Oubekka, Viviane Devauges, Christophe Lefumeux et Guillaume Dupuis pour leur chaleureux accueil au laboratoire ainsi que pour leur sympathie.

Remerciements

Un énorme merci à toutes les personnes qui ont fait partie de notre équipe de chimie durant ces trois années : Abdelhay Aboulaïch, Malgorzata Geszka et Ralph-Olivier Moussodia pour leurs échanges scientifiques et humains au quotidien.

Je remercie également Messieurs Pierre Leroy et Joël Coulon pour leur accueil au laboratoire de pharmacie au début de ma thèse.

J'adresse un remerciement spécial aux membres de Laboratoire de Réactions et Génie des procédés (LRGP) et à toutes les personnes qui ont collaboré scientifiquement avec moi au cours de la thèse.

J'adresse du nouveau mes plus sincères remerciements à Lavinia Balan pour la caractérisation structurale des nanoparticules par MET et AFM, à Jaafar Ghanbaja pour la caractérisation complémentaire par MET, à Jacques Lambert et Aurélien Renard pour les analyses XPS, à Ghouti Medhaji pour les analyses DRX, à Serge Corbel pour les manipulations de photostabilité des nanoparticules et à Marie-José Stebe pour les mesures de tailles hydrodynamique par DLS et de potentiel zêta des nanoparticules.

Un merci particulier à mes anciens encadrents Abdelaziz Jouaiti et Mohammed Kurmoo pour leur soutien et encouragement à distance de Strasbourg.

Je tiens également à remercier tous les membres du Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME) notamment Jean-Paul Moulin pour la fabrication des chambres d'écoulement du biofilm bactérien.

Merci à Thibault Roques-Carmes pour avoir partagé son bureau avec nous ainsi que pour sa bonne humeur et le temps qu'il m'a consacré pour les mesures d'angle de contact des nanoparticules.

Je présente toute ma gratitude et mes remerciements à ma famille « Aldeek ». Mes frères, Firas et Fares et mes sœurs Taghreed, Abir, Joumana et Yasmine et aussi à mon beau frère aïman pour leur soutien morale et psychologique et toute l'affection qu'ils m'ont attribuée durant toute ma résidence en France.

Remerciements

J'exprime mes plus sincères remerciements à ma mère Noufa Abdelkader d'avoir supporté dix années d'absence de son fils et pour tout le soutien qu'elle m'a apporté et je tiens à lui dire que la plus belle chose qui m'était donné d'entendre durant tout mon séjour en France était sa voie au téléphone.

Je voudrais également remercier tout particulièrement Lucie Moursy pour m'avoir soutenu, aidé et aussi pour tout ce qu'elle a fait dans le but de m'offrir un environnement convivial de travail.

Enfin, je voudrais rendre hommage à mon père Hamdan Aldeek qui nous a quittés le 30 avril 1999. Je tiens à lui dire « Merci papa pour tout ce que tu m'a appris dans la vie et surtout pour tout ce que tu as fait à tes enfants. Tes souvenirs resteront gravés dans ma mémoire à tout jamais ».

Table des Matières

Remerciements	1
Table des Matières	4
Abréviations	7
Introduction Générale	8
Chapitre I : Etude Bibliographique	12
<i>I.1. Généralités sur les Quantum Dots</i>	12
I.1.1. Structure des Quantum Dots (QDs)	12
I.1.2. Structure électronique et propriétés optiques des semi-conducteurs	13
I.1.3. Importance du diamètre des Quantum Dots	16
I.1.4. Propriétés photophysiques	20
I.1.4.1. Absorption	20
I.1.4.2. Photoluminescence	21
I.1.5. Structure cristalline des QDs	22
I.1.6. Structures cœur/coquille	24
I.1.7. Synthèse des nanocristaux de semi-conducteurs II-VI	26
I.1.7.1. Synthèse organométallique	28
I.1.7.2. Synthèses en milieux aqueux ou synthèses hydrothermales	29
I.1.8. Dispersion des QDs en milieu aqueux	31
I.1.8.1. Echange de ligand à la surface des QDs	32
I.1.8.2. Interactions de QDs hydrophobes avec des molécules amphiphiles	35
I.1.8.2.1. Encapsulation des QDs par des tensioactifs. Formation de micelles	35
I.1.8.2.2. Encapsulation des QDs par des oligomères amphiphiles	37
I.1.8.3. Incorporation des QDs dans des nanosphères de silice	38
I.1.9. Ancrage de biomolécules à la surface des QDs	39
I.1.9.1. Conjugaison par liaisons non-covalentes	39
I.1.9.2. Conjugaison par couplage covalent	40
<i>I.2. Utilisation des QDs en imagerie de fluorescence</i>	42
I.2.1. Marquage des cellules bactériennes à l'aide des Quantum Dots	44
I.2.2. Les quantum dots dans les biofilms bactériens	46
<i>I.3. Les Exopolymères (EPS) de biofilms bactériens</i>	47

I.3.1. Les biofilms	47
I.3.2. Formation et développement du biofilm bactérien	49
I.3.3. Espace extracellulaire et exopolymères (EPS)	50
I.3.4. Caractérisation des EPS	51
I.3.5. Observation des biofilms en microscopie	55
I.3.6. Mise en évidence des zones hydrophobes au sein de biofilms bactériens à l'aide de la microscopie confocale de fluorescence	59
I.3.7. Diffusion-interaction dans le biofilm	61
I.3.7.1. Microscopie "Time Lapse"	65
I.3.7.2. FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)	65
I.3.7.3. FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging)	66
I.3.7.4. FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy)	66
Bibliographie	68
Chapitre II : Influence de la structure du ligand thioacide sur la croissance et les propriétés photophysiques des quantum dots CdTe et CdSe	79
<i>II.1. Introduction</i>	79
<i>II.2. Synthèse des QDs cœur/coquille CdSe/ZnS par voie organométallique et échange de ligand avec l'acide 11-mercaptoundécanoïque</i>	79
<i>II.3. Limitations des QDs CdSe/ZnS@MUA pour les applications biologiques</i>	82
<i>II.4. Synthèse des QDs CdSe ou CdTe stabilisés par le MHA et le MUA par voie hydrothermale</i>	83
Bibliographie	85
<i>II.5. The influence of the capping thioalkyl acid on the growth and photoluminescence efficiency of CdTe and CdSe quantum do</i>	85
Chapitre III : Tentatives d'amélioration des propriétés photophysiques des quantum dots CdTe et CdSe à caractère amphiphile par introduction d'une coquille	106
<i>III.1. Introduction d'une coquille CdS à la surface des QDs</i>	106
Bibliographie	110
<i>III.2. Enhanced Optical Properties of Core/Shell/Shell CdTe/CdS/ZnO and Core/Shell CdSe(S)/ZnO Quantum Dots Prepared in Aqueous Solution</i>	110

Chapitre IV : Des Quantum Dots amphiphiles pour la localisation de microdomaines hydrophobes au sein de biofilms bactériens	134
<i>IV.1. Introduction</i>	134
<i>IV.2. Choix du ligand</i>	134
<i>IV.3. Stratégie A</i>	135
<i>IV.4. Stratégie B</i>	137
Bibliographie	138
<i>IV.5. Surface-engineered quantum dots for the labeling of hydrophobic Microdomains in bacterial biofilms</i>	138
Chapitre V: Diffusion et accumulation des QDs dans l'espace extracellulaire polymérique (EPS)	182
<i>V.1. Introduction</i>	182
<i>V.2. Diffusion limited sorption of functionalized nanoparticles (Quantum Dots) in Shewanella oneidensis biofilm</i>	183
<i>V.3. Probing hydrophobic domains of the intercellular space in Shewanella oneidensis MR-1 biofilms using functionalized nanoprobos (QDs)</i>	197
<i>V.4. Hydrophilic/hydrophobic balance of the intercellular space in Shewanella oneidensis MR-1 biofilms under low and high di-oxygen flux</i>	207
Conclusion et Perspectives	213

Abréviations

AFM	Atomic Force Microscopy
D	Coefficient de diffusion
D_H	Diamètre hydrodynamique
DHLA	Acide dihydrolipoïque
DLS	Dynamic Light Scattering
E _g	Energie du band gap
EDC	Chlorhydrate du <i>N</i> -(3-diméthylaminopropyl)- <i>N</i> -éthylcarbodiimide
EDTA	Acide d'éthylène diamine tétra-acétique
EPS	Extracellular Polymeric Substances
EROs	Espèces réactives de l'oxygène
FWHM	Full-width-at-half-maximum
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy
HDA	Hexadécylamine
Leu	Leucine
LML	Lactose Mother Liquor
MPA	Acide 3-mercaptopropionique
MHA	Acide 6-mercaptohexanoïque
MUA	Acide 11-mercaptoundécanoïque
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OPA	Ortho-phtaldialdéhyde
PEG	Polyéthylène glycol
Phe	Phénylalanine
PL	Photoluminescence
QD	Quantum Dot
QY	Quantum Yield
TEM	Transmission Electron Microscopy
TGA	Acide thioglycolique
TOP	Tri- <i>n</i> -octylphosphine
TOPO	Oxyde de tri- <i>n</i> -octylphosphine
τ_D	Temps de diffusion
W	Wurtzite
XPS	X-ray Photoelectron Spectroscopy
XRD	X-ray Diffraction
ZB	Structure zinc blende

Introduction Générale

Introduction Générale

Depuis les années 1960, la question de l'adhésion des microorganismes sur des surfaces dures a fait l'objet de très nombreuses recherches. Costerton et ses collègues proposaient en 1978 une approche globale au travers d'un titre accrocheur « *How bacteria stick* ». ¹ Malgré un effort constant en recherche, les thèmes concernant l'adhésion initiale et l'organisation sous forme de biofilm représentent cependant toujours un champ de recherche ouvert tant sur le plan scientifique que sur le plan économique (industrie, transport, milieu hospitalier). Le mot « biofilm » désigne une population organisée de micro-organismes adhérente à une surface et enrobée d'une matrice de polymères organiques extracellulaires (EPS). Cette matrice extracellulaire est une structure hydratée et viscoélastique qui constitue la véritable interface entre les cellules et leur environnement.

Durant de nombreuses années, la littérature scientifique considérait les « exopolysaccharides » comme les seuls constituants de cette matrice. Différentes méthodes de caractérisation ont récemment montré que cette matrice était très hétérogène et qu'elle contenait notamment des protéines, des polysaccharides, des acides nucléiques, et d'une manière générale des hétéropolymères glycoconjugués (glycolipides, glycoprotéines, lipopolysaccharides, ...). Aussi dans ce travail l'abréviation EPS est utilisée pour exprimer le mot ExoPolymèreS sans connotation de la composition chimique. Si les EPS représentent un élément indispensable dans la formation des biofilms, la cohésion de l'ensemble est assurée par des liaisons hydrogènes, des cations divalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}) ainsi que des interactions hydrophobes qui permettent la formation d'un réseau supramoléculaire tridimensionnel réticulé qui stabilise et « rigidifie » la structure et qui protègent les cellules.

La composition de la matrice d'EPS est cependant variable et traduit une réponse des cellules à leur environnement. ² Cette notion de variabilité des caractéristiques de la matrice d'EPS fait globalement l'objet d'un consensus au sein de la communauté scientifique mais reste très difficile à mettre en évidence du fait de la multiplicité des paramètres environnementaux ainsi que les limites rencontrées par les différentes techniques de caractérisation (l'observation *in situ* devant évidemment être privilégiée). L'hypothèse que nous avons formulée au début de ce travail est que, lors d'un stress oxydant (par exemple, l'exposition au di-oxygène O_2), la communauté bactérienne intégrée dans le biofilm répond par réorganisation de l'espace extracellulaire dans le but de se protéger de l'oxygène et des espèces réactives de l'oxygène (EROs). A cet effet, les cellules modifieraient la composition chimique de leurs EPS afin de les rendre plus hydrophobes, ce qui

devrait se traduire par une plus grande cohésion du biofilm et la limitation de la diffusion d'O₂ dans la matrice EPS.

Notre objectif était d'étudier *in situ*, la réactivité ainsi que la variabilité des propriétés hydrophobes de la matrice extracellulaire polymérique. Dans le but de localiser et de marquer des microdomaines hydrophobes au sein des EPS du biofilm bactérien, nous avons réalisé la synthèse et la fonctionnalisation de la surface de nanocristaux fluorescents appelés Quantum Dots (QDs). Ces « nanosondes » ont été utilisées pour l'exploration des biofilms bactériens de *Shewanella oneidensis* MR-1 en combinant la microscopie confocale de fluorescence et la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS).

Les QDs sont des nanoparticules fluorescentes (de semi-conducteur ou de métal) de dimension nanométrique (1-10 nm) possédant des propriétés structurales, optiques et électroniques exceptionnelles dépendantes de leur important rapport surface sur volume et du phénomène dit de « confinement quantique ».³ Depuis leur première dispersion en milieu aqueux en 1998 et en raison de leurs propriétés photophysiques uniques dépendantes de leurs dimensions, ces nanocristaux se sont imposés comme une nouvelle classe de nanosondes fluorescentes dépassant largement les colorants organiques classiques en termes de performances.⁴⁻⁷ La fonctionnalisation de surface de ces nanocristaux permet de modifier leurs propriétés physico-chimiques selon la nature du ligand à la surface.

Conduit au sein d'un projet ANR blanc Dynabio (Dynamic imaging of the intercellular space in bacterial biofilms using original nanoprobos and biosensors), ce travail a bénéficié du savoir-faire de quatre partenaires : le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), UPR 3349 pour les aspects « Synthèse et fonctionnalisation de surface de QDs », le Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), UMR 7564 pour la partie « Biofilms », le Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols (LIMOS), UMR 7137 pour la « Microscopie confocale de fluorescence » et l'Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay (ISMO), UMR 8214 pour l'imagerie de fluorescence dynamique (FCS).

Au début de ce travail, quatre étapes clés avaient été programmées :

- synthétiser des quantum dots hydrodispensables pour leur utilisation dans les biofilms bactériens,
- rendre ces QDs photostables pour résister aux conditions expérimentales de la microscopie confocale de fluorescence (résistance au photoblanchiment),
- fonctionnaliser ces QDs à leur périphérie avec des motifs plus ou moins hydrophobes pour

que les nanoparticules aient un caractère amphiphile et permettent de localiser les microdomaines hydrophobes de la matrice extracellulaire,

- explorer des biofilms bactériens à l'aide des QDs sélectionnés et observer leurs comportements au sein de l'espace extracellulaire,

Le manuscrit est divisé en cinq grandes parties :

- Le Chapitre I présente une synthèse bibliographique en deux parties relatives d'une part aux QDs et d'autre part aux biofilms. Les propriétés optiques, les synthèses, et les applications des quantum dots sont tout d'abord décrites. La seconde partie présente un bilan des connaissances sur les biofilms bactériens et l'espace extracellulaire (formation, caractérisation, rôle des exopolymères).
- Le Chapitre II traite de la synthèse hydrothermale de quantum dots à cœur CdSe ou CdTe stabilisés par des thioacides à caractère amphiphile tels que l'acide 6-mercaptohexanoïque (MHA) ou l'acide 11-mercaptoundécanoïque (MUA). Les obstacles rencontrés au cours de ce travail (faible contrôle du diamètre des QDs et obtention de nanocristaux avec des propriétés photophysiques modestes) sont analysés et expliquent le choix de la synthèse de QDs de structure cœur/coquille.
- Le Chapitre III est consacré au développement de méthodes de synthèse de nouveaux QDs de structure cœur/coquille/coquille CdTe/CdS/ZnO ou cœur/coquille CdSe(S)/ZnO par voie hydrothermale. Les nanocristaux obtenus possèdent d'excellentes propriétés photophysiques et ont été utilisés avec succès pour le marquage de l'EPS de biofilms bactériens. Les QDs CdTe/CdS/ZnO ou le CdSe(S)/ZnO ne répondent cependant pas parfaitement à certains critères recherchés pour le projet (fonctionnalisation difficile par des motifs hydrophobes) et ont conduit à explorer une autre voie de synthèse (*cf.* chapitre suivant).
- Le Chapitre IV traite de la synthèse de QDs cœur/coquille CdSe/ZnS par voie organométallique ainsi que de leur dispersion en milieu aqueux via un échange de ligands mettant en jeu l'acide dihydrolipoïque (DHLA) couplé aux acides aminés Leucine ou Phénylalanine. Les nanocristaux amphiphiles obtenus par cette voie de synthèse ont été utilisés avec succès pour le marquage des EPS au sein du biofilm. La

localisation/distribution spatiale de ces QDs amphiphiles est comparée à celle de QDs fonctionnalisés par des ligands hydrophiles comme l'acide 3-mercaptopropionique (MPA).

- Le Chapitre V est divisé en trois parties complémentaires. La « diffusion/interaction » des QDs préparés au cours des chapitres précédents « dans/avec » les biofilms bactériens a tout d'abord été étudiée par spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) et microscopie confocale de fluorescence. La seconde partie montre la localisation des QDs ainsi qu'à leur distribution dominante dans l'espace extracellulaire (EPS) des biofilms. Enfin, le dernier sous-chapitre compare le marquage par les QDs amphiphiles dans des biofilms préparés en conditions aérobie ou micro-aérobie.

Bibliographie

- [1] J. W. Costerton, G. G. Geesey, K. -J. Cheng, *Sci. Am.* **1978**, 238, 86-95.
- [2] H. -C. Flemming, J. Wingender, *Nature Rev. Microbiol.* **2010**, 8, 623-633.
- [3] Al. L. Efros, A. L. Efros, *Sov. Phys. Semicond.* **1982**, 16, 772-775.
- [4] A. M. Smith, X. Gao, S. Nie, *Photochem. Photobiol.* **2004**, 80, 377-385.
- [5] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science* **1998**, 281, 2013-2016.
- [6] W. C. W. Chan, S. Nie, *Science* **1998**, 281, 2016-2018.
- [7] I. L. Medintz, H. T. Uyeda, R. E. Goldman, H. Mattoussi, *Nature Mater.* **2005**, 4, 435-446.

Chapitre I

Etude Bibliographique

I.1. Généralités sur les Quantum Dots

Dans ce chapitre bibliographique, nous allons tout d'abord décrire la structure ainsi que les propriétés optiques et électroniques des quantum dots (QDs). Les stratégies de dispersion en milieux aqueux développées au cours de ces dernières années, la fonctionnalisation de surface de ces nanocristaux, ainsi que leur utilisation en imagerie de fluorescence feront l'objet de la seconde partie de ce chapitre.

I.1.1. Structure des Quantum Dots (QDs)

Les Quantum Dots sont des particules cristallines de semi-conducteur ou du métal de forme sphérique et de dimension nanométrique, le diamètre pouvant varier de 1 à 10 nm. Cela correspond à quelques centaines voire dizaine de milliers d'atomes. Beaucoup de ces atomes se trouvent à la surface des nanoparticules. La Figure 1 montre une représentation simplifiée d'un QD. Il est constitué d'un noyau inorganique d'un matériau semi-conducteur (cœur) et d'un revêtement extérieur de molécules organiques (ligand tri-*n*-octylphosphine). Le ligand permet de stabiliser les particules et empêche leur agrégation. Le cœur lui-même peut être recouvert d'une ou plusieurs coquilles d'autres matériaux semi-conducteurs. Ces coquilles permettent de protéger le cœur photoactif et d'améliorer ses propriétés photophysiques.

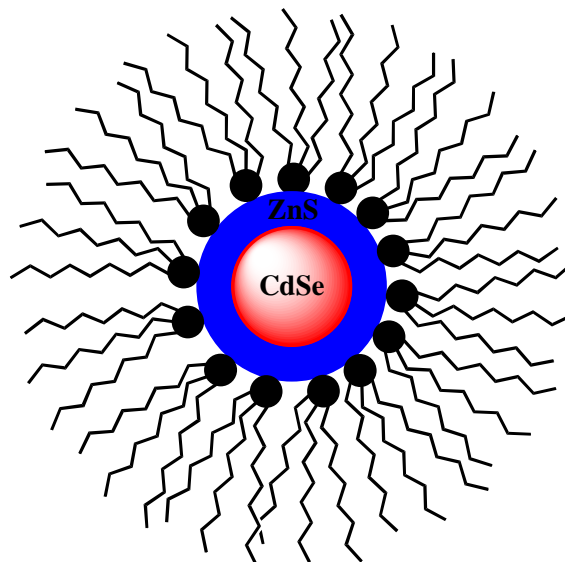


Figure 1. Représentation schématique d'un nanocristal de semiconducteur de type cœur/coquille CdSe/ZnS stabilisé par la tri-*n*-octylphosphine (TOP).

Les QDs les plus couramment utilisés, notamment pour les applications biologiques, proviennent du groupe II-VI des éléments du tableau périodique (CdS, CdSe, CdTe, ZnO, ZnS, ZnSe).¹⁻¹² D'autres QDs appartenant à d'autres familles ont également été synthétisés et étudiés. On peut citer les nanocristaux du groupe III-V (InP, InAs, GaN, GaP, GaAs), ainsi que les groupes IV-VI (PbS, PbSe, PbTe), I-VII (CuCl), V-VI (Bi₂Te₃) et II-V (Cd₃As, Zn₃P₂, Zn₃As₂).¹³⁻²⁰

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux quantum dots de CdSe et de CdTe.

I.1.2. Structure électronique et propriétés optiques des semi-conducteurs

Les matériaux solides peuvent être classés en trois groupes, les isolants, les semi-conducteurs et les conducteurs (Figure 2).

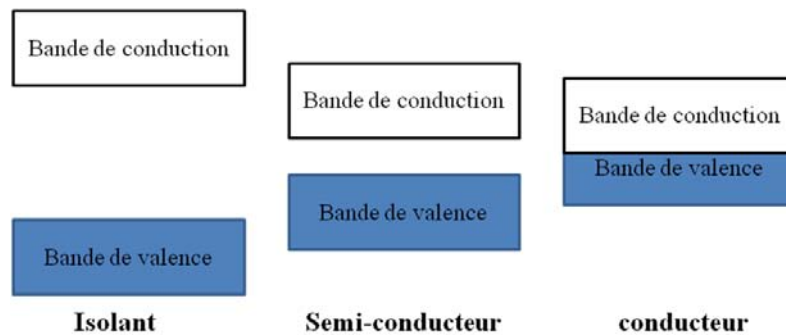


Figure 2. Bandes d'énergie pour les matériaux Isolant, Semi-conducteur et Conducteur.

La conduction électrique résulte du déplacement des électrons à l'intérieur de chaque bande. Sous l'action du champ électrique appliqué au matériau, l'électron acquiert une énergie cinétique dans le sens opposé au champ électrique. Les trois types de matériaux contiennent une bande basse en énergie appelée bande de valence et une bande haute d'énergie appelée bande de conduction. La différence entre les trois types de matériaux est la distance qui sépare la bande de valence de la bande de conduction ou ce qu'on appelle la bande interdite ou « band gap ».

Pour les matériaux isolants, la bande de valence est pleine d'électrons et la bande de conduction est totalement vide. La distance entre ces deux bandes est très grande et l'énergie nécessaire pour déplacer un électron de la bande de valence vers la bande de conduction est très grande et dépasse généralement les 9 eV.

Les matériaux qui nous intéressent sont les semi-conducteurs. Dans ces matériaux, la distance séparant la bande de valence de la bande de conduction est beaucoup plus petite que dans le cas d'isolants. Pour transférer un électron de la bande de valence à la bande de conduction, il faut fournir une énergie supérieure à seulement 1-3 eV.

Enfin, dans le cas de conducteurs, la bande de conduction et de valence s'interpénètrent et donc il n'y a pas de bande interdite. La bande de conduction est alors partiellement pleine et la conduction du matériau est élevée.

Pour mieux comprendre la structure électronique des semi-conducteurs, il faut tout d'abord revenir à leur état massif. Les propriétés optiques des semi-conducteurs sont liées à leur structure électronique. La structure électronique d'un semi-conducteur massif présente une décomposition des énergies accessibles aux électrons sous forme de bandes.

Pour expliquer l'existence de ces bandes, il faut revenir aux liaisons entre deux ou plusieurs atomes capables de former un matériau semi-conducteur par l'interaction de leurs électrons de valence. Par exemple, prenons deux atomes identiques possédant chacun quatre électrons de valence, comme l'atome de silicium ($[Ne] 3s^2 3p^2$). L'interaction de ces atomes ainsi que la mise en commun de leurs électrons de valence crée des orbitales de type s et p, liantes et antiliantes (Figure 3).

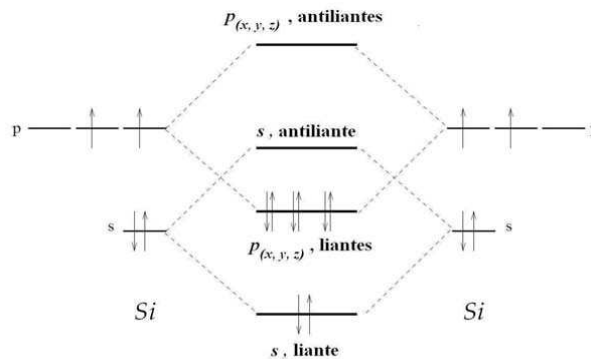


Figure 3. Schéma des niveaux d'énergie de deux atomes de silicium couplés.

Lors de la formation d'un cristal, l'interaction pour un grand nombre d'atomes entre ces orbitales (s, p_x, p_y, p_z) donne naissance aux bandes d'énergie (Figure 4). Ainsi, la bande de valence est essentiellement constituée d'orbitales p liantes et la bande de conduction, d'orbitales s antiliantes. Entre ces deux bandes apparaît une bande interdite de largeur énergétique E_g , aussi appelée " gap " du semi-conducteur.

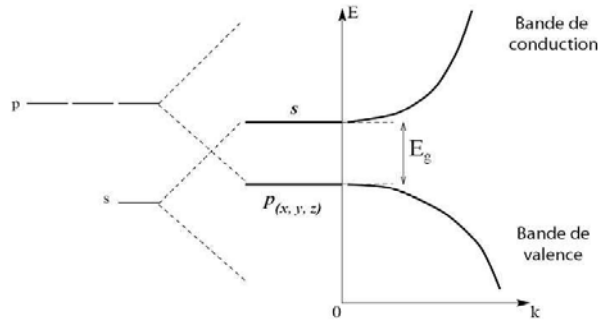


Figure 4. Représentation simplifiée de la structure de bande d'un semi-conducteur massif, en fonction du vecteur d'onde k , en ne tenant compte que des niveaux s et p . E_g est la largeur de bande interdite.

La structure de bande du semi-conducteur massif CdSe que nous avons principalement utilisé au cours de cette thèse est décrite Figure 5.

Le semi-conducteur CdSe est constitué d'un élément de la colonne II de la classification périodique de Mendeleïev et d'un élément de la colonne VI. L'atome de cadmium est du groupe II et il possède donc deux électrons de valence sur une orbitale s : $[Cd] = [Kr] 4d^{10} 5s^2$. L'atome de sélénium étant du groupe VI, il possède six électrons de valence sur des orbitales s et p : $[Se] = [Ar] 3d^{10} 4s^2 4p^4$. Ainsi, la bande de valence du cristal CdSe massif est essentiellement constituée d'orbitales p du sélénium et la bande de conduction d'orbitales s du cadmium.

Les niveaux de conduction sont dégénérés deux fois par le spin des électrons et la courbe de dispersion de cette bande peut être considérée comme parfaitement parabolique pour calculer les niveaux d'énergie électronique. En revanche, la bande de valence est dégénérée six fois en $k = 0$ (k étant le vecteur d'onde) et sa courbe de dispersion est plus complexe.

Cette dégénérescence est partiellement levée par l'importante interaction spin-orbite dans le sélénium. En effet, la description des bandes d'énergie doit tenir compte du moment orbitalaire ($I_h = 1$), auquel il faut ajouter le moment de spin ($s_h = 1/2$), ce qui donne un nouveau nombre quantique (le moment angulaire J). D'après les valeurs d' I_h et s_h , J peut prendre les valeurs $1/2$ ou $3/2$ ($J = I+s$ et $I-s$), auxquelles correspondent deux bandes séparées, en $k = 0$, par la constante de couplage spin-orbite Δ_{SO} (Figure 5). Pour CdSe, on a $\Delta_{SO} = 420$ meV.

La bande $J = 3/2$ est dégénérée quatre fois en $k = 0$, et se dédouble pour $k \neq 0$, donnant naissance à deux bandes de courbure différente. Ces bandes se distinguent par leur projection

du moment angulaire total sur l'axe cristallin : $J_z = \pm 1/2$ pour celle de plus forte courbure et $J_z = \pm 3/2$ pour celle de courbure moindre. La première bande est dite bande de trous " légers " (lh , pour light-holes) et la seconde, bande de trous " lourds " (hh , pour heavy-holes). On introduit la notion de masse effective m^* , afin de tenir compte de la courbure de bande que voit chaque porteur de charge. Dans l'approximation du potentiel parabolique, chaque bande i possède, au voisinage de $k = 0$, une énergie :

$$E(k) = \hbar^2 k^2 / 2 m_i^*$$

où \hbar est la constante de Planck réduite. On définit m^* par rapport à la masse de l'électron au repos m_e . Par exemple, les électrons dans la bande de conduction de CdSe ont une masse effective : $m_e^* = 0,13 m_e$.

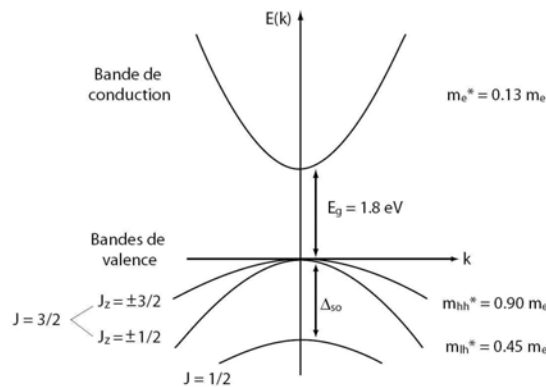


Figure 5. Représentation simple de la structure de bande du CdSe massif, en ne tenant compte que des niveaux s et p. Les valeurs de la largeur de bande interdite E_g , du couplage spin-orbite Δ_{SO} , des moments angulaires J et des masses effectives m^* sont indiquées.

I.1.3. Importance du diamètre des Quantum Dots

Les Quantum Dots (QDs) de chalcogénures de cadmium (CdSe, CdTe, CdS) possèdent des propriétés physico-chimiques et photophysiques directement dépendantes de leur dimension. La propriété qui a le plus intéressée la communauté scientifique au cours des dernières années est la possibilité de changer la largeur de bande d'énergie interdite (énergie de gap : E_g) par un simple changement du diamètre de la nanoparticule (Figure 6).^{21,22}

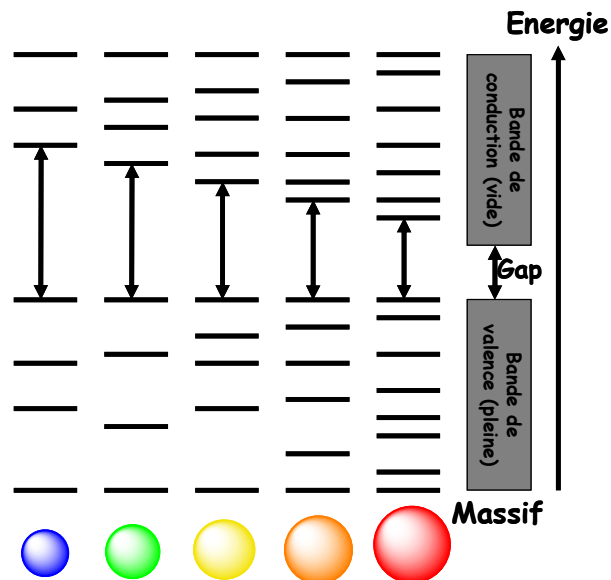


Figure 6. Evolution de la structure électronique entre le solide massif et des QDs de tailles décroissantes.²⁵

Comme décrit précédemment, à l'état massif, un semi-conducteur présente une bande de valence (contenant les électrons à leur état d'énergie fondamental, bas en énergie) et une bande de conduction (vide, haute en énergie), séparées par une bande interdite, le gap, de largeur E_g . Par excitation lumineuse avec des photons d'énergie $h\nu_{exc} \geq E_g$, il est possible de transférer un électron de la bande de valence à la bande de conduction et ainsi, de créer un trou dans la bande de valence. L'électron et le trou ne peuvent pas se déplacer indépendamment en raison de l'interaction coulombienne. Ils forment ainsi un exciton, c'est-à-dire une paire électron-trou. Cette paire e^-/h^+ possède une énergie légèrement inférieure à la bande de conduction. En même temps, sa fonction d'onde est étendue sur une région large, c'est-à-dire que son rayon est très grand car les masses effectives des porteurs de charge sont petites et que la constante diélectrique est grande.

La diminution de la taille de la particule à quelques nanomètres conduit à la situation atypique où l'exciton est plus grand que les dimensions du cristal. Dans les QDs, les porteurs de charge doivent accepter une énergie cinétique plus élevée, ce qui conduit à une augmentation du gap et à un confinement des niveaux énergétiques en valeurs discrètes. Ce phénomène est appelé « confinement quantique ».²³ En raison de cette diminution de diamètre, la structure énergétique passe d'une structure en bandes à une structure en niveaux discrets.

La relation entre le diamètre et l'énergie du band gap pour les nanocristaux de semi-conducteur a été développée par Brus en faisant une approximation de particules sphériques (Equation 1).²⁴

$$Eg = Eg^{solide} + \frac{\hbar^2 \pi^2}{2r^2} \left(\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) - \frac{1,786 e^2}{\epsilon_r \epsilon_0 r}$$

Equation 1. Equation permettant le calcul en première approximation du gap de nanocristaux sphériques

où, Eg^{solide} correspond au gap du cristal massif vers lequel Eg tend quand r croît indéfiniment. Le deuxième terme en $1/r^2$ (avec r en nm) est le terme de « confinement quantique » calculé dans l'hypothèse d'un puit 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) et \hbar la constante de Planck réduite ($\hbar = 1,0546.10^{-34}$ J.s). Le troisième terme décrit l'attraction coulombienne entre l'électron et le trou, ϵ_r (sans dimension) étant la permittivité diélectrique statique du matériau relative à celle du vide ϵ_0 ($\epsilon_0 = 8,854.10^{-12}$ F/m).

La distance physique qui sépare l'électron et le trou est égale au rayon de Bohr de l'exciton r_B . Cette distance est fonction du matériau (Figure 7). Le rayon de Bohr peut être calculé à partir du modèle de Bohr de l'atome d'hydrogène avec les paramètres du matériau semi-conducteur du nanocristal (Equation 2).

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

Equation 2. Expression du rayon de Bohr de l'exciton (en nm)

Par conséquent, la largeur du band gap est exprimée par l'introduction de r_B dans l'équation 2 pour donner l'équation 3.

$$Eg(eV) = Eg^{solide}(eV) + \frac{2,6}{\epsilon_r \times r(nm)} \left(2,74 \frac{r_B(nm)}{r(nm)} - 1 \right)$$

Equation 3. Formule du calcul du gap en fonction du rayon de Bohr de l'exciton

Cette formule permet de calculer le gap E_g de QDs de rayon r de différents matériaux à partir des paramètres du solide massif. Le tableau 1 donne les paramètres à température ambiante de quelques semi-conducteurs II-VI et III-V et la Figure 7 montre l'évolution du gap en fonction du rayon des QDs de divers matériaux. Selon le type de matériaux semi-conducteur utilisés, on peut avoir différentes énergies de gap qui nous permettent de couvrir toute une large gamme spectrale allant de l'ultraviolet jusqu'au proche infrarouge.

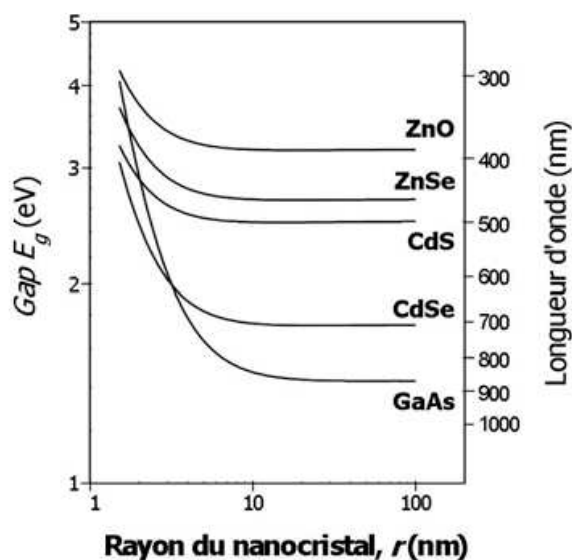


Figure 7. Variation théorique du gap calculée pour des QDs de différents semi-conducteurs à partir de l'équation 3 et des paramètres du Tableau 1.²⁵

Tableau 1. Propriétés physiques de quelques semi-conducteurs des groupes II-VI et III-V.^{26,27}

Matériau	Structure	Type	E_g solide (eV)	m_e^*	m_h^*	ϵ_r	r_B (nm)
			à 300 K				
ZnO	wurtzite	II-VI	3,30	0,26	0,6	8,2	2,4
ZnSe	zinc blende	II-VI	2,70	0,157	0,75	8,7	3,6
ZnS	zinc blende	II-VI	3,60	0,28	0,61	8,9	2,5
CdS	wurtzite	II-VI	2,52	0,2	0,7	8,8	3,0
CdSe	wurtzite	II-VI	1,76	0,12	0,45	9,5	5,3
CdTe	zinc blende	II-VI	1,45	0,1	0,4	7,2	4,8
GaAs	zinc blende	III-V	1,42	0,063	0,5	12,9	12,2
InP	zinc blende	III-V	1,34	0,075	0,64	12,56	9,9
InAs	zinc blende	III-V	0,35	0,027	0,41	14,9	31,2

I.1.4. Propriétés photophysiques

I.1.4.1. Absorption

Comme mentionné précédemment, les propriétés photophysiques des QDs dépendent de leurs dimensions et plus précisément du confinement quantique.²⁸ L'absorption d'un photon par le QD a lieu si son l'énergie est supérieure au gap.

Les spectres d'absorption des QDs CdSe et CdTe sont larges et étendus sur une gamme importante allant de l'ultraviolet au visible selon la taille du nanocristal et possèdent un épaulement bien défini au seuil d'absorption qui correspond à la transition optique du premier exciton (pic excitonique).

En raison du confinement quantique, l'énergie du « band gap » est inversement proportionnelle à la longueur d'onde d'absorption du premier exciton. Une diminution du diamètre du nanocristal entraîne un déplacement hypsochrome (c'est-à-dire vers des énergies plus élevées et donc des longueurs d'onde plus faibles du seuil d'absorption) (Figure 8c).

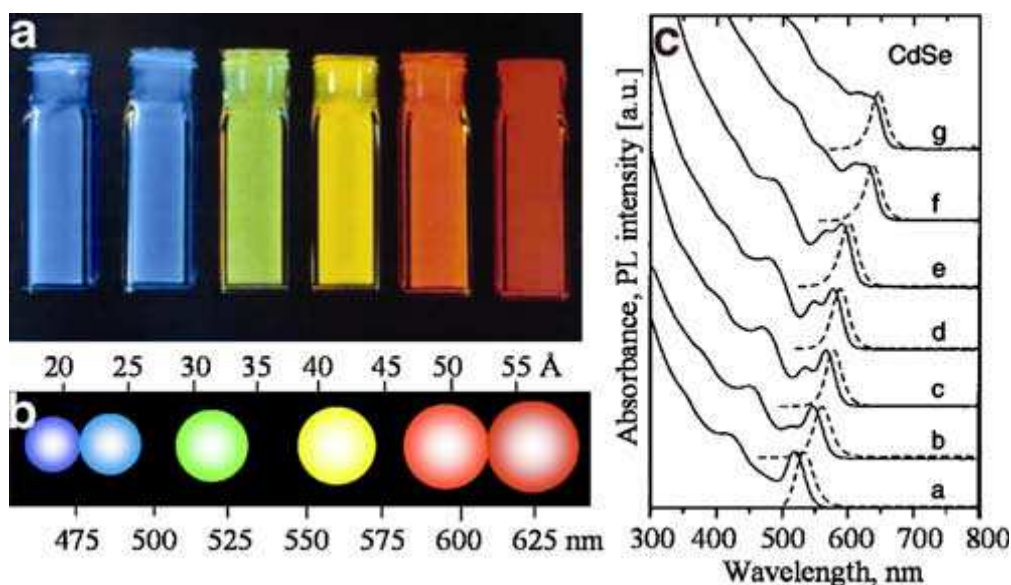


Figure 8. a) Influence du diamètre des QDs sur l'émission de fluorescence (b) une présentation schématique des tailles et couleurs des QDs CdSe/ZnS. (c) Spectres d'absorption (ligne solide) et d'émission de fluorescence (ligne brisée) de QDs CdSe.^{28,29}

La position du pic excitonique dépend du gap et donc du diamètre des QDs. La forme et la largeur de ce pic sont influencées par la distribution de tailles des nanoparticules. Des échantillons polydisperses ne présentent généralement qu'un épaulement dans leur spectre à la position de la transition excitonique. Des bandes d'absorption moins définies aux énergies plus élevées peuvent également apparaître et correspondent à des états excités de plus haute énergie, leur résolution dépendant également de la polydispersité de l'échantillon.

I.1.4.2. Photoluminescence

Lors d'une excitation lumineuse, le QD absorbe un photon conduisant à la formation d'un exciton (paire électron-trou). Via une recombinaison radiative électron-trou, l'électron peut retourner à son état fondamental (bande de valence) générant de la fluorescence. Le spectre de photoluminescence (PL) présente une raie fine et symétrique qui se déplace selon le diamètre des QDs. En théorie, la fluorescence correspond à l'émission d'un photon d'énergie égale au gap E_g . En fait, la raie de PL est déplacée de quelques nm vers les grandes longueurs d'onde par rapport au pic excitonique dans le spectre d'absorption (Figure 8c). Ce décalage appelé décalage de Stokes (Stokes shift) trouve son origine dans la structure particulière des niveaux énergétiques des QDs.³⁰⁻³¹ En effet, dans le cas des QDs CdSe, le premier état excité de l'exciton ($1S_{3/2}1S_e$) est divisé en 5 sous-niveaux (niveaux vibrationnels). Lors d'une excitation lumineuse, l'électron se trouve dans le cinquième sous-niveau du premier état excité « état brillant ». Ensuite, l'électron subit une relaxation non radiative vers le troisième sous-niveau vibrationnel le moins brillant « état noir » et enfin cet électron retombe à l'état fondamental pour émettre de la fluorescence. C'est pour cette raison que l'énergie de l'émission de fluorescence est moins élevée que celle de l'absorbance du premier exciton et par conséquent la longueur d'onde d'émission est décalée de quelques nanomètres.

La largeur à mi-hauteur (**FWHM** : *full width at half maximum*) des spectres de fluorescence des QDs est influencée par la polydispersité de l'échantillon. Par exemple, pour une population monodisperse, la largeur à mi-hauteur des spectres de fluorescence est d'environ 20 à 30 nm. Si les QDs sont plus polydispersés en taille, la largeur à mi-hauteur du spectre de fluorescence peut atteindre 50-60 nm.

I.1.5. Structure cristalline des QDs

Un cristal est un matériau qui a un arrangement ordonné et périodique des atomes dans un espace tridimensionnel. Une structure cristalline est composée d'un motif, un ensemble d'atomes disposés d'une manière spécifique, et d'un réseau. Le réseau cristallin est constitué par la répétition périodique dans les 3 dimensions de l'espace d'un motif atomique ou moléculaire. Six constantes de réseaux sont généralement nécessaires pour définir la forme et la taille d'une unité. Les longueurs axiales (longueurs des arêtes de la maille le long de ses axes principaux) sont généralement désignées par a , b et c et les angles inter-axiaux sont généralement désignés par α (α), β (β) et γ (γ). Dans certaines structures cristallines, les longueurs des arêtes le long de tous les axes sont égales ($a = b = c$), de sorte qu'une seule constante de réseau est utilisée pour sa description dimensionnelle (a).

Les paramètres de maille élémentaire ainsi que la structure cristalline sont nécessaires pour calculer les distances entre les atomes voisins dans un cristal, et pour déterminer les propriétés physiques et électriques de ce dernier. Le tableau 2 donne les principales structures cristallines et les constantes de réseau de certains semi-conducteurs du groupe II-VI.

Tableau 2. Structures cristallines et constantes de réseaux de quelques semi-conducteurs du groupe II-VI.³²

QDs	Structure	Paramètre de la maille (Å)
CdS	Zinc blende	5,8320
CdS	Wurtzite	$a = 4,16; c = 6,75$
CdSe	Zinc blende	6,08
CdSe	Wurtzite	$a = 4,31; c = 7,02$
CdTe	Zinc blende	6,48
ZnS	Zinc blende	5,42
ZnS	Wurtzite	$a = 3,82; c = 6,26$

Les semi-conducteurs du groupe II-VI cristallisent principalement dans les structures zinc blende (ZB) « cubique » où $a = b = c$ et wurtzite (W) « hexagonale » où $a = b \neq c$ (Figure 9). Ces deux structures sont assez semblables, seul l'empilement varie : pour la structure ZB, il est de type ABCABC, alors que pour la structure W, il est de type ABABAB. La différence d'énergie entre les deux structures est très faible. La structure zinc blende est stable à basse température alors que la structure wurtzite est plus stable à température élevée.³³

La synthèse traditionnelle des QDs CdSe par voie organométallique à haute température ($> 300^{\circ}\text{C}$) dans des solvants coordinants (par exemple, dans l'oxyde de trioctylphosphine (TOPO)) conduit généralement à des nanoparticules dans un réseau cristallin de type W. Au début de la phase de croissance, les atomes constituant les QDs s'empilent dans une structure ZB. A partir d'une certaine taille (taille critique) dépendante des QDs, il y a une transition de la structure ZB vers la structure W.³⁴

Différents travaux ont démontré que l'utilisation de ligands phosphorés (acide tétradécylphosphonique (TDPA), acide octadécylphosphonique (ODPA)) favorisait la formation de la structure zinc blende.³⁵ Qu *et al.* ont démontré que les QDs CdSe obtenus dans le TOPO en présence d'amines primaires telles que la dodécylamine (DDA) ou l'octadécylamine (ODA) étaient de structure ZB si le précurseur Se est injecté à 230°C .³⁶

Lors de la synthèse des QDs en milieu aqueux à basse température (100°C), Rogach *et al.* ont préparé des QDs CdSe stabilisés par des thioalcools et des thioacides. Ces nanocristaux ont essentiellement cristallisé dans une structure zinc blende.³

Lors d'une synthèse hydrothermale similaire, Vossmeier *et al.* ont obtenu des QDs CdS cristallisant dans les deux structures ZB et W en changeant simplement les ligands à la surface des QDs, polyphosphate de sodium et thioglycérol, respectivement.³⁷

En conclusion, la structure cristalline des semi-conducteurs CdSe, CdTe et CdS dépend fortement de la nature du ligand stabilisant les QDs.

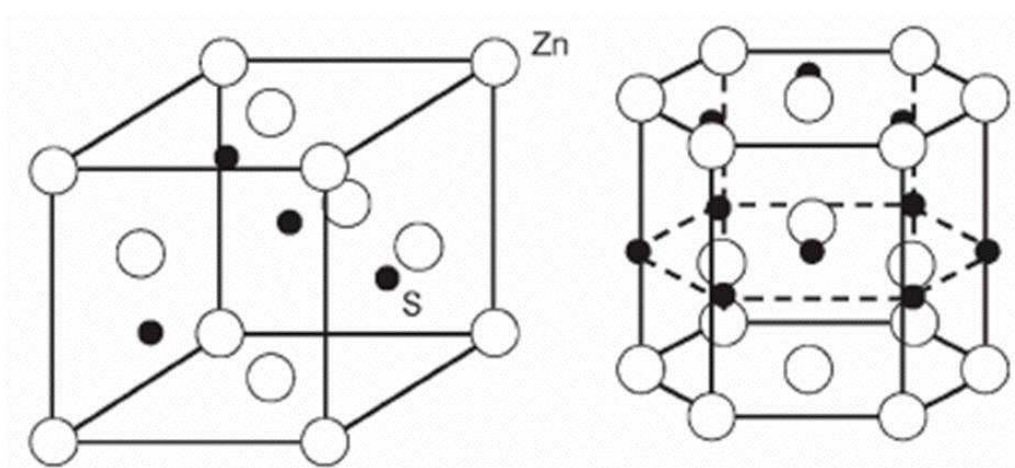


Figure 9. Mailles cristallines élémentaires des structures zinc blende (gauche) et wurtzite (droite) de ZnS.³⁸

I.1.6. Structures cœur/coquille

Souvent, la surface des nanocristaux contient des imperfections et des défauts comme des liaisons pendantes réactives ou des sites vacants dans la maille cristalline. Ces imperfections constituent des pièges à électrons, diminuent les performances optiques du QD, et altèrent notamment le rendement quantique de fluorescence. Si le cœur du quantum dot n'est pas passivé, la désexcitation via des chemins non radiatifs peut devenir plus probable que la recombinaison radiative et, par conséquent, le rendement quantique de fluorescence diminue considérablement. L'apparition de bandes de fluorescence de faibles énergies à des longueurs d'onde élevées (« trap emissions ») est également observée (Figure 10).³⁹⁻⁴³

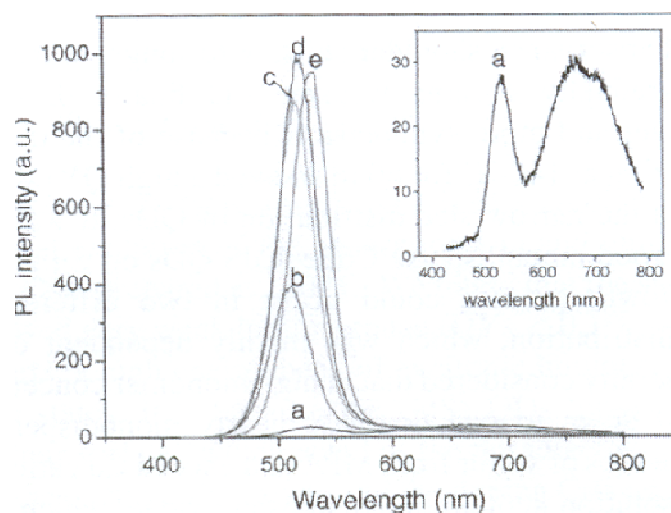


Figure 10. Spectres d'émission de fluorescence de QDs CdSe/CdS avec des défauts de surface. Un second signal de fluorescence est observable à 700 nm.⁴³

Afin d'éliminer ces défauts, une coquille inorganique d'un autre semi-conducteur (généralement de band gap plus large) est introduite sur le cœur pour corriger les défauts de surface.

De nombreux groupes de recherche travaillent actuellement sur l'amélioration des propriétés photophysiques des QDs par l'introduction d'une ou de plusieurs coquille(s) à la surface du cœur photoactif.

Il existe 3 configurations pour les systèmes cœur/coquille selon l'alignement des bandes entre le cœur et la coquille (Figure 11).⁴⁴

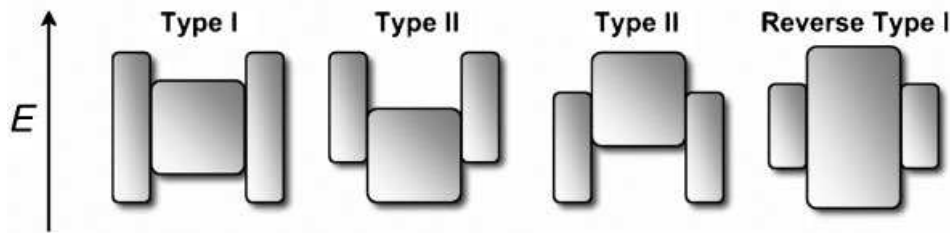


Figure 11. Alignement des bandes dans des structures cœur/coquille de type I, type II et type I inversé.⁴⁴

Type I : une coquille d'un autre semi-conducteur ayant un « band gap » plus grand que celui du cœur est introduite. La bande de conduction de la coquille a une énergie plus élevée que celle du cœur alors que la bande de valence a une énergie plus basse que celle du cœur (par exemple: CdSe/ZnS). Les électrons et les trous se retrouvent donc confinés dans le cœur. Par conséquent, la longueur d'onde d'émission des QDs cœur/coquille est décalée de seulement quelques nanomètres vers le rouge par rapport à celle du cœur seul.^{45,46} Ce déplacement vers le rouge est observable au cours de la croissance de la coquille, et est dû à une fuite partielle de l'exciton dans la matrice de la coquille, réduisant ainsi le confinement. Il est plus prononcé pour les nanocristaux de petites tailles, où la fuite de l'exciton dans la coquille a un effet plus important sur l'énergie de confinement des porteurs de charge.

Type I inversé : la coquille a un « band gap » plus petit que celui du cœur. La bande de conduction de la coquille a une énergie plus basse que celle du cœur alors que la bande de valence a une énergie plus élevée que celle du cœur. Les porteurs de charge sont donc délocalisés, au moins partiellement, dans la coquille. La longueur d'onde d'émission est également modulable par l'épaisseur de la coquille. Un déplacement vers le rouge de l'émission de fluorescence est observé (exemple : CdS/CdSe).⁴⁷

Les propriétés photophysiques de ces systèmes cœur/coquille sont souvent modestes. Afin d'améliorer la photostabilité, une coquille d'un semi-conducteur à gap plus grand peut être ajoutée, comme dans les systèmes de type I classiques (exemple : CdS/CdSe/CdS).⁴⁷

Type II : il existe deux structures de ce système. Dans la première, les bandes de valence et de conduction du cœur sont plus basses que celles de la coquille. Dans la deuxième structure, c'est l'inverse. Les structures les plus couramment rencontrées pour les QDs de type II sont CdTe/CdSe et ZnTe/CdTe. Ces structures sont actuellement très étudiées car il est possible de

déplacer leur émission de fluorescence jusqu'au proche IR. Notons également que la durée de vie de l'exciton dans les QDs de type II est très supérieure à celle des QDs de type I car l'électron et le trou peuvent être délocalisés à la fois dans le cœur et la coquille.^{48,49}

Les contraintes de maille (ou le désaccord de maille) entre le cœur et la coquille sont également un paramètre très important à considérer avant introduction d'une coquille à la surface de nanocristaux. Cette contrainte peut être calculée à l'aide des paramètres de maille élémentaire (a) pour les 2 réseaux cristallins (par exemple, pour CdTe/ZnSe, le désaccord est de $\Delta a/a = 14\%$, sachant que $a = 6.48 \text{ \AA}$ pour CdTe et 5.66 \AA pour ZnSe).⁵⁰

Si le désaccord est élevé, la coquille va compresser le cœur et inversement, le cœur pourra provoquer une dislocation de la coquille (effet de saturation que nous observerons dans le chapitre III de ce mémoire).

Lorsque le désaccord de maille entre le cœur et la coquille est important, il a été observé, par exemple pour le système CdSe/ZnS ($\Delta a/a = 12\%$), qu'après la croissance de deux monocouches du matériau ZnS, le rendement quantique de fluorescence diminue, probablement à cause de la formation de défauts dus aux contraintes.²⁹ Dans le cas de QDs CdSe/ZnSe, le désaccord de maille est de 7% , la diminution du rendement quantique de fluorescence apparaît seulement après l'introduction de 4 monocouches de ZnSe à la surface du cœur CdSe.⁵¹

Afin d'éviter la diminution du rendement quantique de fluorescence, des systèmes cœur/coquille/coquille (par exemple : CdSe/CdS/ZnS ou CdSe/ZnSe/CdS) ont été développés.^{52,53} La coquille intermédiaire est choisie pour avoir un faible désaccord de maille à la fois avec les matériaux de cœur et de coquille extérieure et ainsi réduire les contraintes entre ces deux matériaux.^{54,55} Pour ces systèmes à double coquille, la coquille extérieure permet de réduire significativement le nombre de défauts de surface, entraînant une augmentation de l'intensité d'émission. Les systèmes cœur/double coquille conduisent à des rendements quantiques plus élevés que les systèmes à simple coquille et permettent la croissance de coquilles plus épaisses sans perte de luminescence.

I.1.7. Synthèse des nanocristaux de semi-conducteurs II-VI

Il existe principalement deux méthodes de synthèse des quantum dots de chalcogénure de cadmium (CdSe et CdTe). La première est dite « synthèse organométallique » et la deuxième

est appelée « synthèse hydrothermale ». Le principe de la synthèse est la séparation temporelle des processus de nucléation et de croissance.⁵⁶ Expérimentalement, la séparation de la nucléation et de la croissance peut être réalisée par l'injection rapide, par exemple dans le cas de CdSe, du précurseur de sélénium dans un solvant à point d'ébullition élevé contenant le précurseur de cadmium. La formation des QDs se déroule alors en plusieurs étapes successives (Figure 12). Initialement, le précurseur de cadmium se trouve à la concentration c_0 dans le solvant. L'injection du précurseur de sélénium fait monter la concentration en « monomères » CdSe au-dessus du seuil de nucléation et par conséquent des germes se forment. Ceci entraîne alors une diminution rapide de la concentration. Quand celle-ci passe en-dessous du seuil de nucléation, la formation des germes s'arrête immédiatement. L'injection du précurseur de sélénium doit donc être très rapide afin d'avoir une nucléation quasi-instantanée, ce qui est la clé pour l'obtention de QDs monodisperses. Ensuite, les germes croissent rapidement de manière homogène par consommation des précurseurs restants en solution. Quand il n'y a plus assez de précurseurs en solution pour permettre une croissance homogène, la phase de maturation d'Ostwald commence.^{57,58} Pendant cette phase, les petites particules ayant une énergie de surface plus élevée vont se dissoudre au profit des particules plus grandes jusqu'à ce qu'un équilibre soit atteint. En conséquence, le nombre de particules diminue alors que leur taille moyenne augmente.

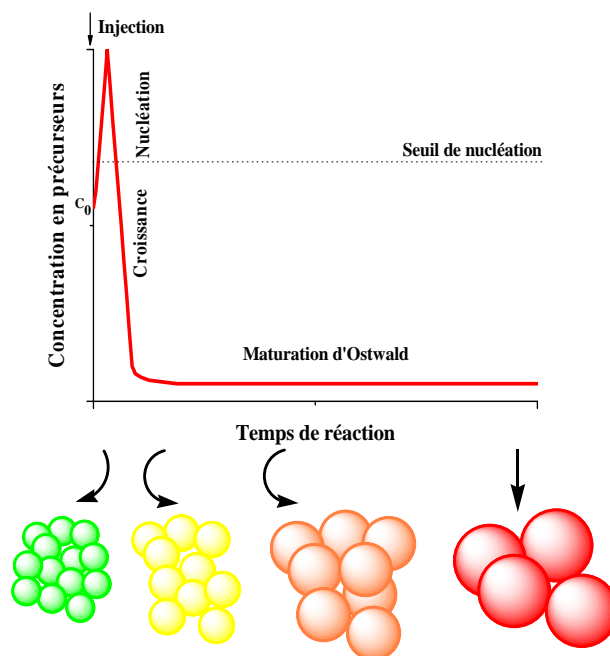


Figure 12. Les différentes étapes de la synthèse de QDs : nucléation homogène par l'injection rapide des précurseurs, croissance des germes par consommation des précurseurs en solution, suivie de la dissolution des germes plus petits au profit des plus gros.⁵⁹

I.1.7.1. Synthèse organométallique

La synthèse de QDs CdSe, CdTe, et CdS possédant de bonnes qualités photophysiques avec contrôle du diamètre a été développée par Murray *et al.* en 1993.⁶⁰ Cette méthode est basée sur l'injection rapide du précurseur de sélénium à haute température (270-300°C) au précurseur de cadmium ($\text{Cd}(\text{CH}_3)_2$) dans des solvants coordinants tel que l'oxyde de trioctylphosphine (TOPO) qui joue le rôle de ligand des QDs. Ce solvant intervient lors de la nucléation et de la croissance des QDs car il a une forte interaction avec les précurseurs et les nanoparticules formées. Depuis 1993, la synthèse par voie organométallique à haute température a connu de nombreuses modifications. Elles ont consisté à améliorer le contrôle de la croissance ainsi que le diamètre des nanoparticules et à simplifier le protocole expérimental. Talapin *et al.* ont montré que l'addition d'un autre solvant coordinant, l'hexadécylamine (HDA), au TOPO permettait un meilleur contrôle de la cinétique de croissance durant la préparation des QDs CdSe. La distribution de taille est plus étroite et le rendement quantique de fluorescence est voisin de 60%.⁶¹

Le diméthylcadmium est cependant un précurseur sensible à l'air, pyrophorique et toxique. Peng *et al.* ont réussi à remplacer ce composé par l'oxyde ou l'acétate de cadmium, produits plus faciles à manipuler et moins toxiques.^{62,63}

Les solvants coordinants tels que le TOPO et l'HDA sont toxiques et chers,⁶² c'est pourquoi ils ont récemment été remplacés par des solvants non coordinants qui ne présentent pas ces inconvénients.⁶⁴ Ces nouveaux solvants sont typiquement des alcanes ou alcènes à longue chaîne tels que le 1-octadécène (ODE). Contrairement aux solvants coordinants, les solvants non-coordinants ne jouent pas le rôle de ligand dans la synthèse des QDs. Le contrôle de la cinétique de la réaction et de la taille des QDs se fait par changement de la quantité de ligand (par exemple, phosphines, acides carboxyliques ou phosphoniques) introduite dans le milieu.⁶⁵

Avec le développement de la synthèse en solvant non-coordinant, des procédés à base de sélénium dissout dans l'ODE (Se/ODE) ont été développées pour CdSe, évitant ainsi l'utilisation des séléniures de trialkylphosphine sensibles à l'air.⁶⁶ Cependant, Jasienak *et al.* ont observé que le mélange Se/ODE mène à un nombre de nucléi deux fois plus faible que le TOP-Se, indiquant que le sélénium est plus accessible avec TOP-Se qu'avec le Se/ODE.⁶⁷ Toujours dans le but de simplifier le protocole de synthèse et d'obtenir une synthèse facilement transposable à plus grande échelle, de nombreuses équipes ont cherché à s'affranchir de l'étape limitante d'injection rapide des précurseurs.

Parmi les nombreuses publications décrivant la synthèse de QDs sans injection des précurseurs, seulement quelques-unes conduisent à des QDs ayant une faible dispersion en taille.⁶⁸⁻⁷⁰

La synthèse du cœur est généralement suivie par la croissance d'une coquille d'un autre semi-conducteur à sa périphérie. Cette étape s'effectue également à haute température en utilisant des méthodes de synthèse proches de celles du cœur. La seule différence est la rapidité de l'injection et la température. L'introduction de la coquille se fait par injection goutte à goutte de ses précurseurs à une température plus basse que celle utilisée pour la formation du cœur. La structure la plus étudiée à ce jour est de type cœur/coquille CdSe/ZnS, comme en témoigne le grand nombre de publications traitant de ce système.⁷¹⁻⁷⁴ Cette synthèse des QDs CdSe/ZnS a pour la première fois été décrite par Hines et Guyot-Sionnest.⁷⁵ La croissance de la coquille ZnS a été réalisée par injection d'un mélange de diéthylzinc et hexaméthylsilylathiane et en utilisant des températures de croissance comprises entre 140 et 220°C (selon la taille du cœur). Ces auteurs ont réussi à couvrir des QDs CdSe de 3 nm de diamètre avec 1-2 monocouche(s) de ZnS (0,31 nm). Le rendement quantique de fluorescence des QDs cœur/coquille est de 50%, alors qu'il n'était que de 15% pour CdSe non passivé.

Peu de temps après, une série de QDs CdSe/ZnS de différentes tailles et leurs caractérisations complètes ont été décrites par le groupe de Bawendi.²⁹

En résumé, la synthèse organométallique nécessite généralement l'utilisation de solvants de coût élevé, toxiques ainsi qu'une technologie (boîte à gants, rampes à vide, ...) qui n'est pas accessible pour tous les laboratoires. Les QDs ainsi préparés sont stabilisés par des ligands hydrophobes qui n'ont aucune affinité avec les milieux aqueux. Leur utilisation pour toute bio-application nécessitera une étape supplémentaire pour les disperser en milieu aqueux. Les synthèses dites hydrothermales constituent des alternatives de préparation de QDs solubles en milieu aqueux dès leur préparation.

I.1.7.2. Synthèses en milieux aqueux ou synthèses hydrothermales

La synthèse des QDs en milieux aqueux a été développée par Weller *et al.* en 1996.⁷⁶ C'est une méthode qui permet d'accéder directement à des QDs hydrodispensables et biocompatibles. Ce procédé a, de plus, l'avantage d'être moins onéreux et d'utiliser des précurseurs moins toxiques que ceux employés dans les synthèses organométalliques.

Au cours des dernières années, la synthèse de QDs tels que CdS,⁷⁷ CdSe,³ CdTe,⁷⁸ ZnS,⁷⁹ ZnSe,⁸⁰ et HgTe¹¹ a été développée avec succès en milieu aqueux.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur la préparation des QDs CdSe et CdTe par voie hydrothermale.

La première étape de cette voie de synthèse consiste à préparer une solution contenant un précurseur de Cd^{2+} et un ligand, généralement soufré. Ce dernier peut être un thioacide, un thioalcool ou une thioamine. L'acide thioglycolique (TGA) ou l'acide 3-mercaptopropionique (MPA) sont les ligands les plus utilisés pour cette voie de synthèse. Le mélange du Cd^{2+} avec un thiol à pH basique conduit à la formation de complexes $\text{Cd}^{2+}/\text{RSH}$ cationique, neutre et anioniques ayant pour stoechiométries $(\text{Cd-SR})^+$, $\text{Cd}(\text{SR})_2$, $\text{Cd}(\text{SR})_3^-$ et $\text{Cd}(\text{SR})_4^{2-}$.⁸¹ Il convient de noter que tous ces complexes Cd^{2+} -thiol ne sont pas solubles dans l'eau à pH acide.

La deuxième étape de la synthèse est basée sur l'injection rapide de Se^{2-} ou de Te^{2-} à température ambiante dans la solution des complexes Cd^{2+} -thiol. Le mélange est ensuite chauffé soit à reflux,³ soit dans un autoclave à une température supérieure à 150°C (synthèse hydrothermale),⁷ soit dans un four à microondes.⁸² Après l'injection de Se^{2-} ou Te^{2-} , des monomères CdTe ou CdSe se forment et par chauffage, la croissance des QDs CdTe et CdSe commence par maturation d'Ostwald.

Les propriétés photophysiques et la qualité des QDs obtenus par cette voie de synthèse sont influencées par plusieurs paramètres (le rapport molaire Cd/thioacide/Te ou Se, la température de croissance, le pH et la concentration de cadmium dans la solution).^{81,83} Les conditions traditionnelles et optimales pour la synthèse des QDs CdTe par voie hydrothermale sont : un rapport molaire Cd/thioacide/Te = 1 : 2,4 : 0,5, un pH égal à 9 et une concentration en Cd de 5 mM.⁸³⁻⁸⁶ La fonction thiol du stabilisant est liée à la surface du QD par une liaison très forte, quasi covalente. La tête polaire est chargée dès que le pH est supérieur au pKa de cette fonction et permet non seulement une bonne dispersion des nanoparticules en milieu aqueux mais limite également leur coalescence/agrégation grâce à des répulsions électrostatiques. Il faut également noter qu'il existe une coordination secondaire entre les atomes d'oxygène des ligands TGA et MPA (formation de cycles à 5 ou 6 chaînons, respectivement pour le TGA et le MPA) et les atomes de cadmium présents à la surface des QDs, ce qui en retour conduit à une meilleure passivation de la surface et à une amélioration du rendement quantique de fluorescence (Figure 13).^{87,88}

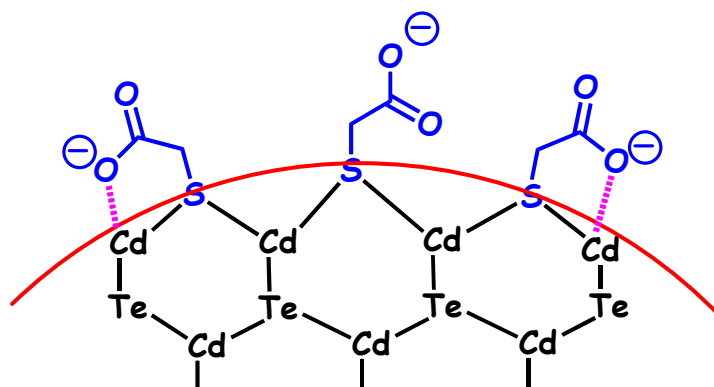


Figure 13. Représentation schématique de la coordination entre l'atome d'oxygène du ligand TGA et l'atome de cadmium à la surface des QDs.

La synthèse en milieu aqueux à haute température et forte pression est appelée synthèse hydrothermale. Cette technique permet d'accélérer la phase de croissance des nanoparticules et d'améliorer leurs propriétés photophysiques. En effet, le thioacide à la surface des particules ou celui restant en solution se décompose par hydrolyse basique durant la croissance, et permet l'incorporation de sulfure (S^{2-}) dans la maille élémentaire des QDs CdTe ou CdSe. Le sulfure vient occuper les sites vacants Te^{2-} ou Se^{2-} à la surface des QDs pour former des QDs de type cœur/coquille CdSe/CdS et CdTe/CdS ou alliage CdSe(S) et CdTe(S) selon les conditions réactionnelles avec un gradient de soufre du coeur vers la coquille.⁷

Comme pour les QDs obtenus par voie organométallique, l'introduction d'une coquille à la surface des QDs CdSe ou CdTe améliore significativement les propriétés photophysiques de ces nanocristaux. L'introduction d'une coquille CdS ou ZnS est la plus courante.^{85,86,89}

I.1.8. Dispersion des QDs en milieu aqueux

Les QDs préparés par voie organométallique sont généralement stabilisés par des ligands hydrophobes tels que le TOPO, le TOP ou l'HDA. Ces QDs sont uniquement solubles dans des solvants organiques peu polaires tels que le chloroforme, le toluène ou l'hexane. Pour la plupart des applications biologiques, il est nécessaire que les QDs soient hydrodispersibles afin de les exploiter en tant que marqueurs fluorescents.

Ils existent plusieurs stratégies pour rendre hydrodispersibles les QDs issus de la synthèse organométallique.

I.1.8.1. Echange de ligand à la surface des QDs

Cette méthode consiste au déplacement des ligands hydrophobes présent à la surface des QDs par des molécules hydrophiles. Les molécules hydrophiles sont généralement bi- ou trifonctionnelles (Tableau 2). Elles comportent une fonction d'ancrage (généralement un thiol) qui interagit avec la surface des QDs et une tête hydrophile (acide, amine, alcool) qui permet non seulement la dispersion des QDs en milieu aqueux mais également le couplage ultérieur avec des biomolécules pour diriger les nanoparticules vers des cibles biologiques spécifiques (Figure 14).⁹⁰⁻⁹⁶

Tableau 2. Exemples de molécules hydrophiles utilisées pour disperser des QDs hydrophobes en milieu aqueux

Molécules hydrophiles	Exemple
Thioacides	TGA, MPA et MUA
Thioamine	2-aminoéthanthiol
Thioalcool	1-thioglycérol, 2-mercaptoéthanol
Thioacide- α -aminés	L-cystéine, thiopronine

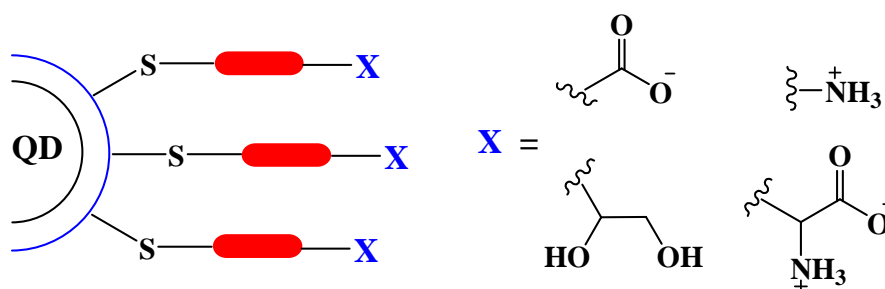


Figure 14. Représentation schématique de QDs fonctionnalisés par des thiols polaires permettant leur dispersion en milieu aqueux.

D'autres molécules hydrophiles polyfonctionnelles ont été évaluées pour stabiliser les QDs. On peut citer :

- l'utilisation d'oligomères coordinants (ex : les oligomères de phosphines) (Figure 15). Ces oligomères forment une couche organique dense à la surface des QDs après déplacement des ligands TOP et TOPO.⁹⁷

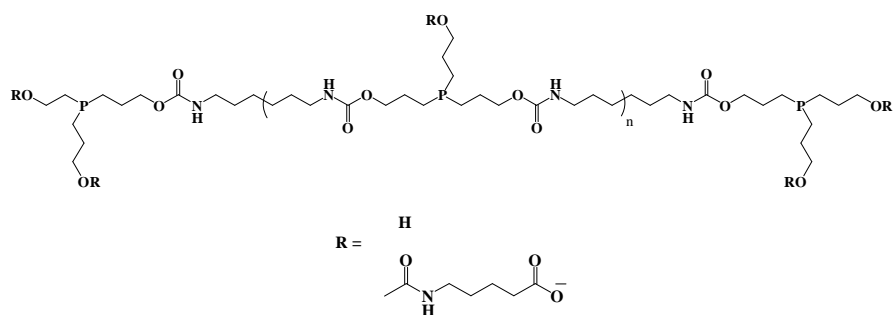


Figure 15. Structure d'un ligand oligomère comportant des fonctions phosphine.⁹⁷

- les dendrons comportant un point focal thiol (-SH). La stabilisation de QDs par des dendrons augmente considérablement leur stabilité photochimique en protégeant fortement le cœur photoactif.⁹⁸ Généralement, les groupements terminaux des dendrons sont des fonctions amines, acides carboxyliques, alcools et esters (Figure 16) et permettent le couplage des nanocristaux à des biomolécules pour des marquages spécifiques.⁹⁹

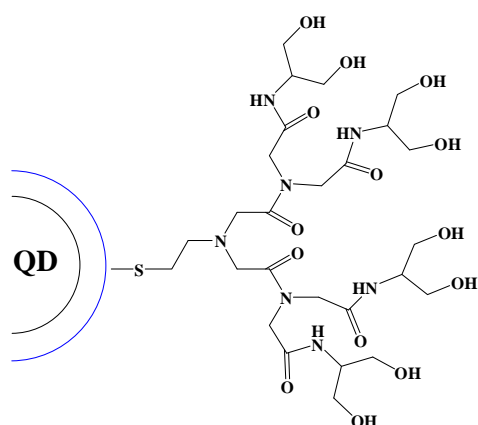


Figure 16. Représentation schématique de QDs stabilisés par un dendron de 3^{ème} génération.⁹⁹

L'amélioration de l'échange et de la stabilité des nanocristaux a également conduit au développement de ligands bidentates. Les QDs fonctionnalisés par l'acide dihydrolipoïque (DHHLA) (Figure 17) seraient stables pendant des mois, alors que la stabilité de ceux substitués par des thioacides simples est décrite comme très inférieure.¹⁰⁰

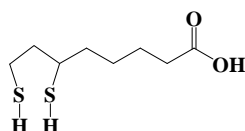


Figure 17. Structure de l'acide dihydrolipoïque (DHHLA).

Une stratégie souvent utilisée pour améliorer la biocompatibilité des QDs stabilisés par le DHLA est la PEGylation de la surface de ces QDs (couplage du DHLA avec un PEG avant ancrage sur le nanocrystal).^{100,101} L'ajout de PEG diminue la probabilité d'interactions non spécifiques entre la fonction carboxylate du DHLA et le système biologique lors de marquages (Figure 18).¹⁰³

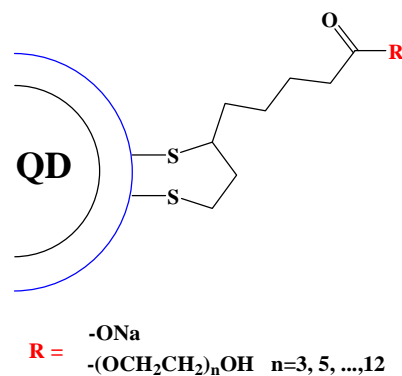


Figure 18. Représentation schématique des quantum dots stabilisés par de l'acide dihydrolipoïque (DHLA) et ses dérivés PEGylés.

Une variante de la stratégie d'échange de ligand est la silanisation de surface. Cette méthode emploie un thiosilane tel que le mercaptotriméthoxysilane. Les méthoxysilanes sont, par la suite, hydrolysés en silanol (Si-OH). Les liaisons siloxanes formées créent une coquille stable autour des QDs et permettent leur dispersion en milieu aqueux. Des siloxanes fonctionnalisés avec des fonctions amines, hydroxyles, acides ou phosphonates sont généralement employés pour accroître l'hydrosolubilité des nanocristaux et permettre leur fonctionnalisation (Figure 19).¹⁰⁴

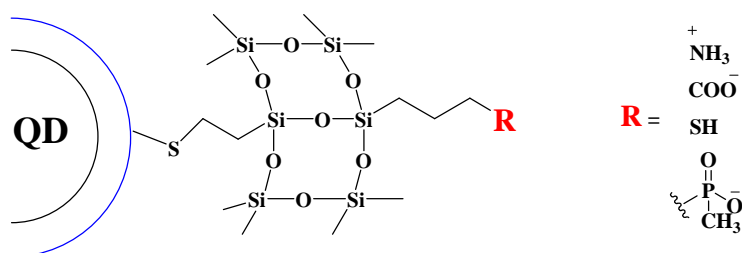


Figure 19. Représentation schématique de QDs stabilisés par des thiosiloxanes.

La majeure partie de ces réactions d'échange de ligands conduit à une baisse significative du rendement quantique de fluorescence. Cette baisse est liée à la fois à la forte polarité du solvant aqueux et à la fragilité de la surface du nanocrystal lors du déplacement des ligands

TOP/TOPO.¹⁰⁵ Il convient cependant de noter que le diamètre hydrodynamique des nanocristaux obtenus après ce type d'échange est inférieur à celui de QDs hydrodispersés via une stratégie micelle (*vide infra*).¹⁰⁶

I.1.8.2. Interactions de QDs hydrophobes avec des molécules amphiphiles

Dans ce procédé, le ligand hydrophobe reste lié à la surface du QD. La méthode consiste à ajouter des molécules amphiphiles pour disperser les QDs en milieu aqueux. Les chaînes alkyles du composé amphiphile interagissent par liaison de Van der Waals avec les groupements *n*-octyle du TOP et/ou du TOPO. Les extrémités hydrophiles des molécules amphiphiles permettent de disperser l'assemblage en milieu aqueux.¹⁰⁷

I.1.8.2.1. Encapsulation des QDs par des tensioactifs. Formation de micelles

Les composés amphiphiles peuvent encapsuler les QDs stabilisés par le TOPO et former des micelles par interaction hydrophobe/hydrophobe.

La tête polaire des tensioactifs est généralement une fonction ammonium (cas du CTAB, Bromure d'hexadécyltriméthylammonium, ou du Gemini 12-4-12 $[\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_4(\text{CH}_3)_2\text{N}^+\text{C}_{12}\text{H}_{25}] \cdot 2\text{Br}^-$) (Figure 20). Le tensioactif de type Gemini assure une meilleure stabilisation des QDs et permet une conservation parfaite de leurs propriétés optiques. Les rendements quantiques de fluorescence sont souvent améliorés après encapsulation. Notons finalement que l'utilisation de tensioactifs simples comme le CTAB peut conduire à de fortes augmentations de diamètre après assemblage avec le QD (jusqu'à 100 nm).^{108,109}

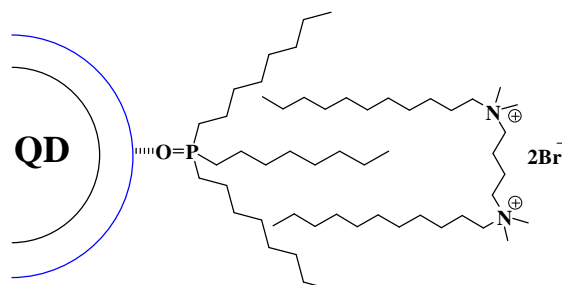


Figure 20. Hydrodispersion de QDs stabilisés par le TOPO à l'aide d'un tensioactif de type Gemini.

Ces tensioactifs simples ont, depuis quelques années, été remplacés par des molécules amphiphiles plus sophistiquées qui assurent une meilleure protection des QDs et/ou qui ne conduisent pas à une augmentation trop importante du diamètre de la nanoparticule (le diamètre de la micelle est généralement de 20-25 nm). Les composés phares dans cette série sont des gallates^{110,111} (Figure 21) ou des phosphoglycérolipides PEGylés (Figure 22).^{112,113}

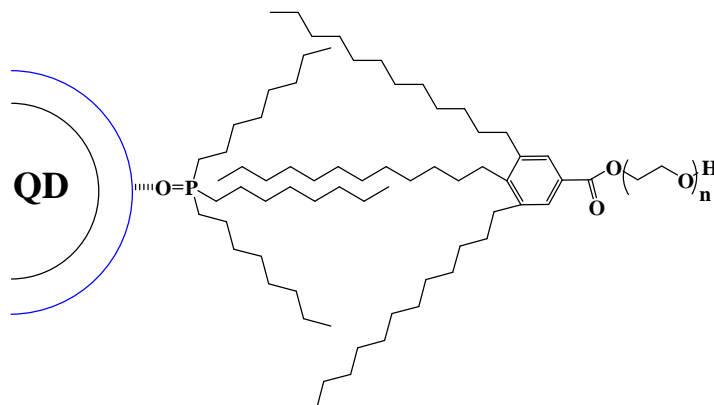


Figure 21. Hydrodispersion de QDs stabilisés par le TOPO à l'aide d'un galate PEGylé.¹¹¹

Pour les phospholipides, la tête polaire hydrophile est généralement constituée de fonctions polyéthylène glycol ayant pour extrémité une fonction éther (cas du PEG-DSPE₂₀₀₀ (1,2-Distéaroyl-*sn*-Glycéro-3-Phosphoéthanolamine-*N*-[Méthoxy (Polyéthylène glycol)-2000]) ou amine primaire (cas du 1,2-Distéaroyl-*sn*-Glycéro-3-Phosphoéthanolamine-*N*-amino (Polyéthylène glycol)). L'encapsulation des QDs par des phospholipides a attiré l'attention pour plusieurs raisons :

- L'encapsulation n'altère pas la surface des QDs.
- Les propriétés photophysiques des QDs restent inchangées.
- La forte densité de polyéthylène glycol (PEG) à la surface des QDs réduit la probabilité des interactions non spécifiques.
- Par contre, le diamètre hydrodynamique obtenu par DLS des QDs solubilisés par encapsulation est variable selon le rapport QD/phospholipide, il est compris entre 25 et 190.

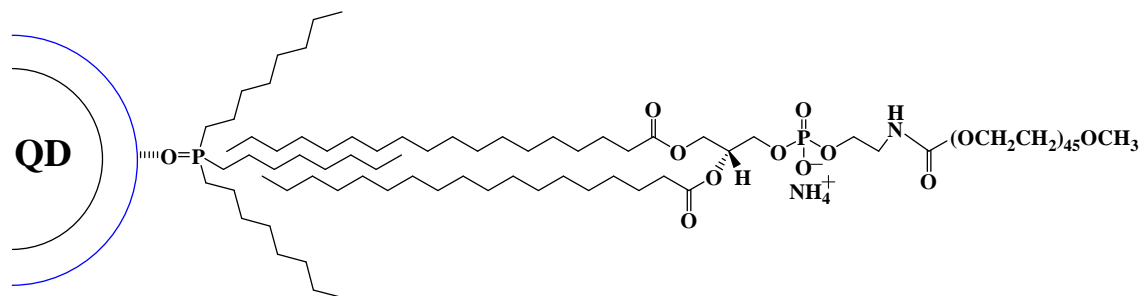


Figure 22. Hydrodispersion de QDs stabilisés par le TOPO à l'aide du phospholipide PEGylé PEG-DSPE₂₀₀₀.¹¹³

I.1.8.2.2. Encapsulation des QDs par des oligomères amphiphiles

Cette stratégie consiste en l'enrobage des QDs par des polymères amphiphiles. On peut citer l'utilisation :

- de dérivés poly(maléique anhydride alt-1-tétradécène) qui, associés à la bis(6-aminohexyl)amine, génèrent des fonctions carboxylates permettant de solubiliser les QDs,¹¹⁴
- d'acides polymaléiques modifiés par des alcools aliphatiques,¹¹⁵
- d'acides polyacryliques modifiés par des alkylamines (Figure 23),¹¹⁶
- de copolymères de méthacrylate/acide méthylacrylique (PSMs) (Figure 24),¹¹⁷
- et de polymères composés de plusieurs blocs comme les polymères tri-blocs décrits par Smith *et al.* constitués de trois fragments (polybutylacrylate, polyéthylacrylate et acide polyéthylacrylique),¹¹⁸ les fragments acide méthacrylique étant partiellement modifiés avec l'octylamine et un PEG-NH₂.

Les avantages de cette stratégie d'encapsulation sont quasiment les mêmes que ceux obtenus avec les molécules amphiphiles, c'est-à-dire :

- L'encapsulation n'altère pas la surface des QDs.
- La préservation des propriétés photophysiques des QDs.
- L'épaisseur de la couche organique permet une excellente passivation de la surface des QDs car l'enveloppe polymérique est souvent hautement réticulée. Les QDs stabilisés par les polymères sont généralement stables dans une gamme de pH beaucoup plus large que ceux préparés par échange de ligand.

L'inconvénient majeur de cette stratégie d'hydrodispersion est que la couche polymérique provoque une augmentation significative du diamètre des QDs (typiquement 5 à 30 nm).

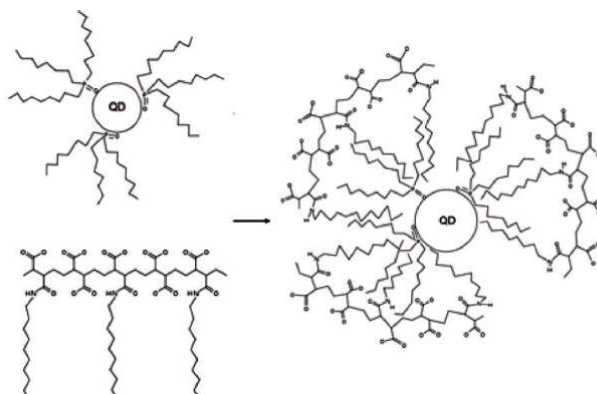


Figure 23. Représentation de QDs@TOPO dispersés en milieu aqueux par encapsulation dans de l'acide polyacrylique modifié par l'octylamine.¹¹⁶

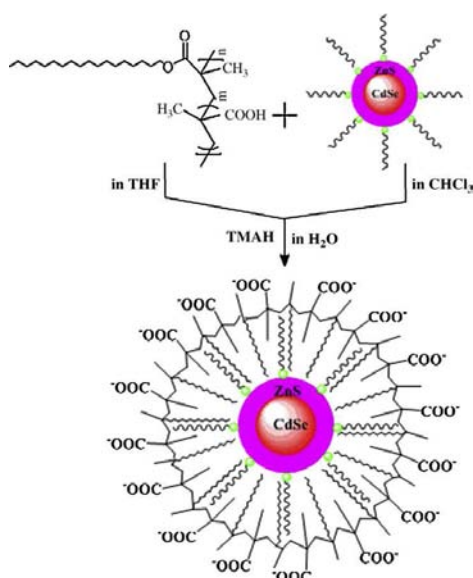


Figure 24. Représentation schématique de QDs solubilisés à l'aide de polymères PSM.¹¹⁷

I.1.8.3. Incorporation des QDs dans des nanosphères de silice

Dans cette méthode, les QDs sont mis au contact de tétraéthyl orthosilicate (TEOS). Ce dernier est hydrolysé dans des conditions douces et contrôlées pour former des nanosphères de silice qui enrobent les QDs.¹¹⁹ Les QDs incorporés dans ces nanosphères sont bien isolés du milieu environnant et possèdent généralement de meilleures propriétés photophysiques que les QDs de départ.^{120,121} Il y a généralement 3-10 QDs par nanosphère de silice, mais ce nombre est ajustable par le rapport QDs/TEOS et par la cinétique d'hydrolyse du TEOS. Il faut cependant signaler que les nanosphères de silice ont un diamètre généralement supérieur à 25 nm, ce qui limite leur utilisation en imagerie (Figure 25).¹²¹

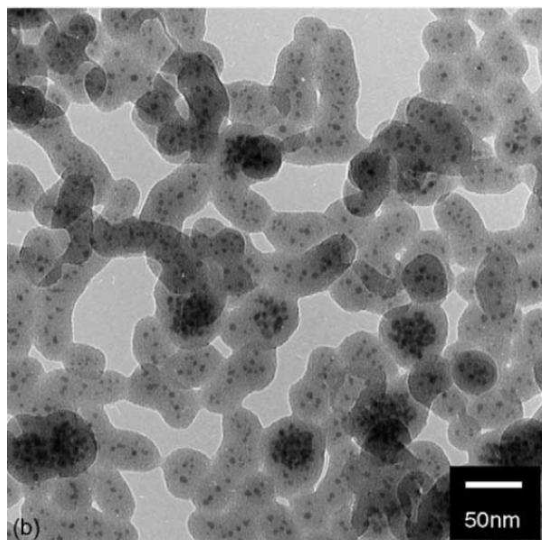


Figure 25. Image MET des QDs CdSe incorporés dans des nanosphères de silice.¹²¹

I.1.9. Ancrage de biomolécules à la surface des QDs

Comme nous l'avons montré au paragraphe précédent, la modification de la surface des QDs est une étape clé pour leur hydrodispersion. Une seconde fonctionnalisation est cependant nécessaire pour que ces sondes fluorescentes interagissent sélectivement avec une cible cellulaire donnée. Les stratégies de conjugaison avec les biomolécules (anticorps, protéines, peptides ou petites molécules) exigent que les biomolécules soient liées aux QDs sans altérer leur activité et/ou leur reconnaissance par certaines cibles cellulaires. Il existe deux grands procédés d'ancrage de biomolécules à la surface de QDs.

I.1.9.1. Conjugaison par liaisons non-covalentes

Les QDs peuvent être conjugués à des biomolécules chargées via des stratégies non covalentes impliquant des interactions électrostatiques.¹²² Dans ce cas, les QDs sont synthétisés de manière à porter une charge complémentaire de celle de la biomolécule. Les deux entités sont simplement mélangées et s'auto-associent. Cette approche simple a été utilisée avec succès pour la préparation des QDs fonctionnalisés avec des anticorps et des protéines via l'interaction streptavidine/biotine.¹²³

La conjugaison peut également mettre en jeu une interaction des biomolécules avec le métal (Cd, Zn, ...) présent à la surface des QDs. Les protéines ou peptides possèdent des séquences

d'acides aminés qui ont une affinité pour les métaux ou les cations métalliques.^{124,125} Les biomolécules sont alors adsorbées à la surface des QDs via :

- des interactions entre la fonction carboxylate (COO^-) du ligand et le Cd ou le Zn présent à la surface du QD.¹²⁶
- des liaisons d'hydrogènes entre les fonctions amine $-\text{NH}_2$ ou alcool $-\text{OH}$ des acides aminés de la biomolécule et les fonctions carboxylate présentes à la surface des QDs.¹²⁶

I.1.9.2. Conjugaison par couplage covalent

L'ancrage des biomolécules par des liaisons covalentes est le plus souvent basé sur la réaction entre une fonction amine de la biomolécule et un acide carboxylique (ou carboxylate) appartenant au ligand du QD. Ce couplage se fait habituellement à l'aide d'un carbodiimide jouant le rôle d'agent de couplage tel que le chlorhydrate du *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N*-éthylcarbodiimide (EDC) et d'un activant tel que le *N*-hydroxysuccinimide (NHS). Le groupement OH de l'acide carboxylique est un mauvais groupe partant. L'ester activé formé avec le NHS facilite le couplage de la biomolécule par attaque nucléophile de la fonction amine sur le centre électrophile de la fonction carbonyle. La conjugaison entre le ligand à la surface des QDs et la biomolécule désirée conduit à la formation d'une liaison amide (Figure 26).^{127,128}

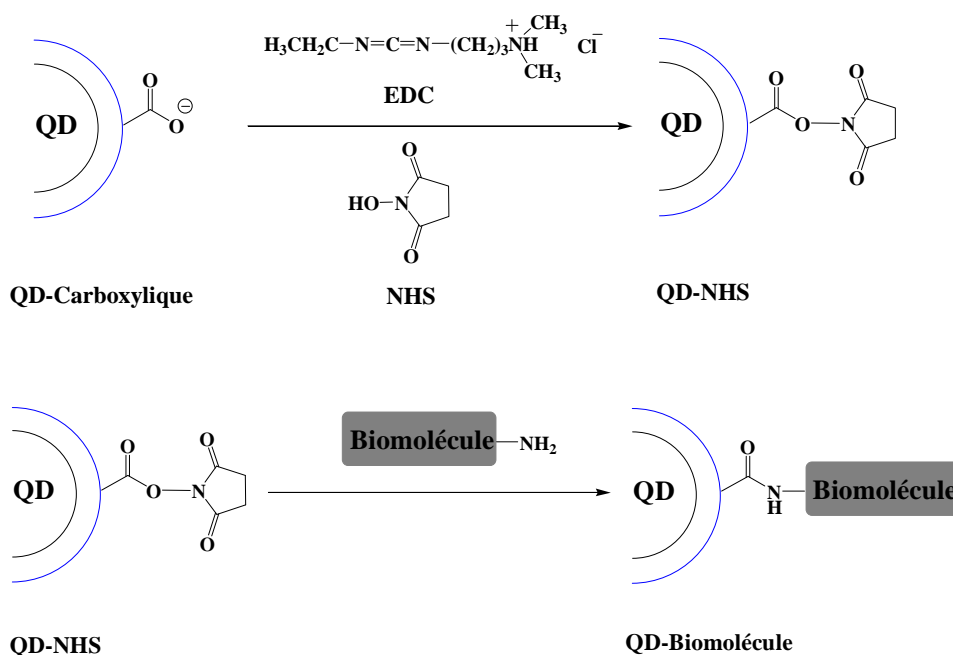


Figure 26. Couplage entre des QDs carboxyliques et une biomolécule aminée à l'aide de l'EDC et du NHS.

Le couplage covalent peut également se faire entre une fonction acide carboxylique et un hydrazide tel que l'hydrazide de l'acide adipique (ADH) à l'aide d'EDC. Les QDs-hydrazide obtenus permettent le couplage avec des biomolécules porteuses d'une fonction acide (Figure 27).^{127,128}

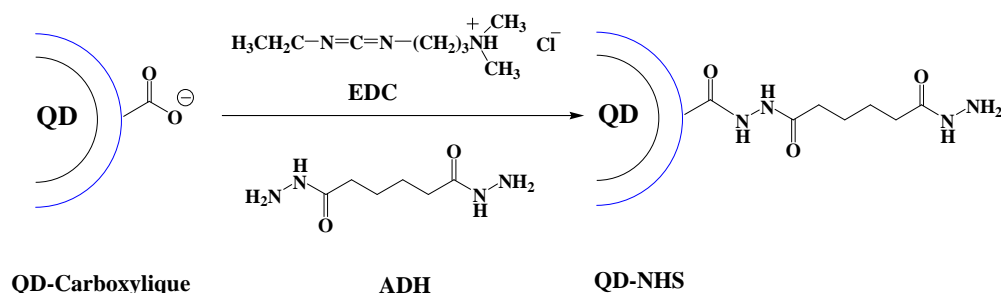


Figure 27. Couplage entre des QDs carboxyliques et le (ADH) hydrazine à l'aide de l'EDC.

Pour les biomolécules soufrées ou modifiées à leur extrémité avec une fonction thiol, il existe deux méthodes de couplage covalent afin de les conjuguer aux QDs. La première méthode consiste en l'utilisation d'un agent de réticulation hétérobifonctionnel tel que sulfosuccinimidyl-4-(*N*-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC). Les quantum dots azotés (QD-NH₂) réagissent avec le sulfo-SMCC et forment des QDs-Maléimide. Ces derniers peuvent ensuite former une liaison thioéther stable avec une fonction thiol de la biomolécule via une réaction d'addition radicalaire (Figure 28).^{127,128}

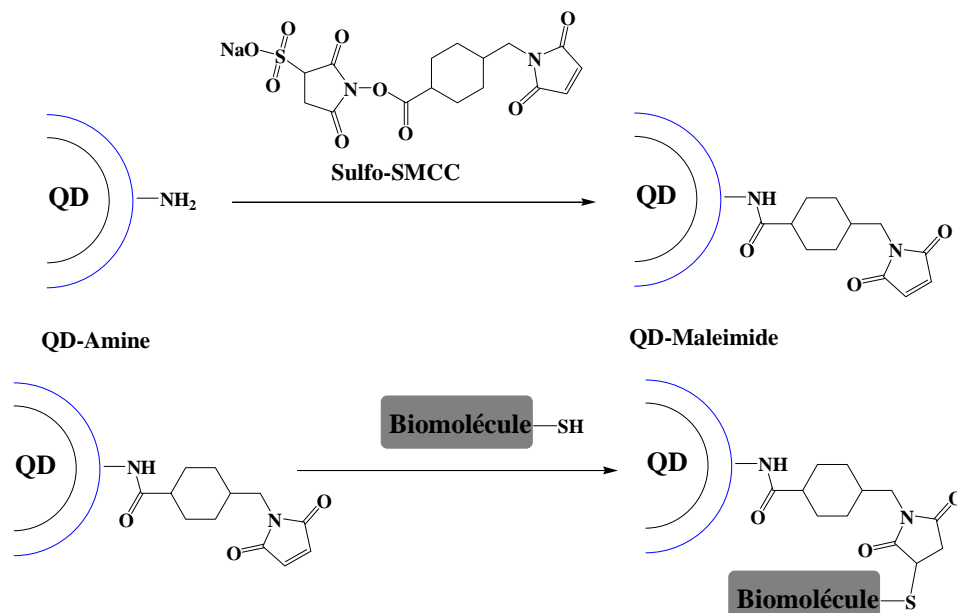


Figure 28. Couplage entre des QDs aminés et une biomolécule soufrée à l'aide de sulfo-SMCC.

La deuxième méthode consiste à coupler les QDs-NH₂ avec le succinimidyl 3[3'-(2-pyridyldithio)propanoate suivie de la réduction du disulfure à l'aide de dithiothréitol (DTT). Une nouvelle liaison disulfure se forme entre la biomolécule soufrée et le thiol présent à la surface du QD (Figure 29).^{127,128}

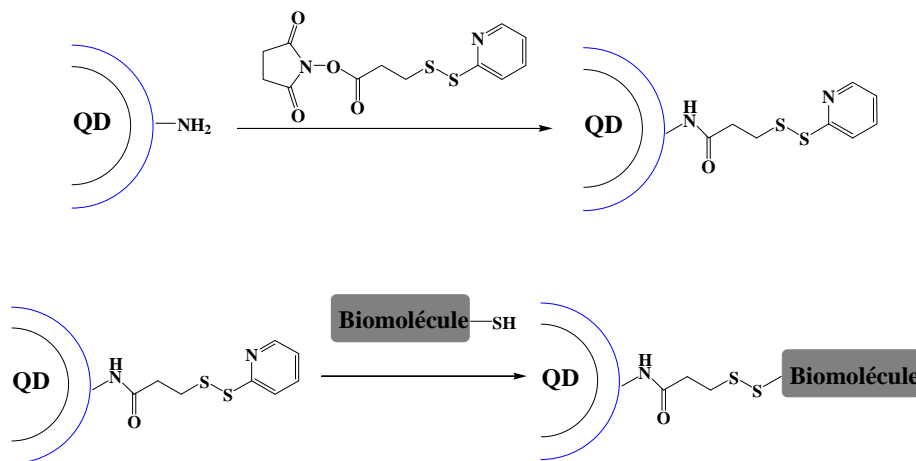


Figure 29. Couplage entre des QDs aminés et une biomolécule soufrée à l'aide de succinimidyl 3[3'-(2-pyridyldithio)]propanoate.

I.2. Utilisation des QDs en imagerie de fluorescence

L'intérêt majeur des QDs réside dans leur grande adaptabilité à de nombreuses applications biologiques. C'est en 1998 que deux équipes (Alvisatos et Nie) ont, pour la première fois et quasi-simultanément, réussi à disperser des quantum dots en milieu aqueux via deux stratégies différentes. L'équipe d'Alvisatos a hydrodispersé les QDs par silanisation en utilisant le 3-mercaptopropyl-triméthoxysilane.¹²⁹ Nie *et al.* ont réalisé un simple échange de ligand mettant en jeu l'acide thioglycolique (TGA) (Figure 30).⁹¹

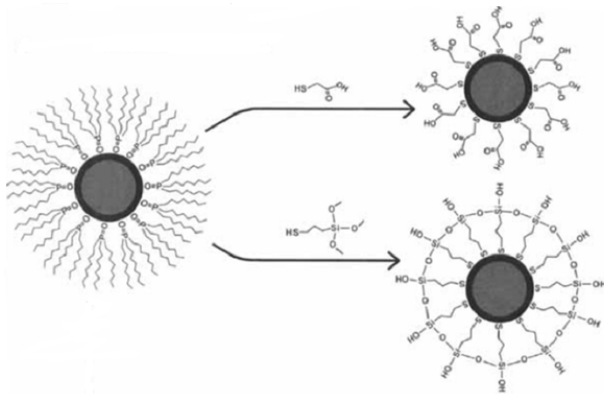


Figure 30. Stratégies d'hydrodispersion de QDs CdSe/ZnS@TOPO utilisées en 1998 par Alvisatos et Nie.¹³⁰

Les QDs ont des propriétés optiques hors du commun qui offrent beaucoup d'avantages comparés aux fluorophores organiques (Rhodamine, Fluorescéine, Alexa Fluor, etc...) pour l'imagerie de fluorescence.

On peut notamment citer :

- un large spectre d'absorption dans l'UV et le visible et un spectre d'émission étroit et symétrique (la majorité des fluorophores organiques ont un spectre d'absorption étroit et un spectre d'émission large, Figure 31). Un recouvrement des spectres d'absorption et d'émission est généralement observé pour les fluorochromes classiques tels que la Rhodamine 6G, alors que pour les QDs, ce recouvrement peut être évité grâce à leur large *Stokes shift* (Figure 31),
- sur un même échantillon biologique, il est possible de visualiser simultanément plusieurs QDs émettant à des longueurs d'onde différentes via une excitation unique,¹³¹
- une excellente photostabilité (résistance au photoblanchiment de plusieurs heures voire plusieurs jours),
- une très bonne résistance aux dégradations chimiques,
- de bons rendements quantiques de fluorescence (jusqu'à 85 %),
- une durée de vie de fluorescence très grande (typiquement de l'ordre de plusieurs dizaines de nanosecondes) qui permet de différencier les QDs de l'autofluorescence des cellules, et finalement, une section d'absorption qui est une à deux fois plus grande et des coefficients d'extinction molaire 10 à 100 fois plus importants (de 10^5 à $10^6 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) que les fluorophores organiques, ce qui les rend beaucoup plus brillants et permet d'obtenir un meilleur contraste.¹³⁰

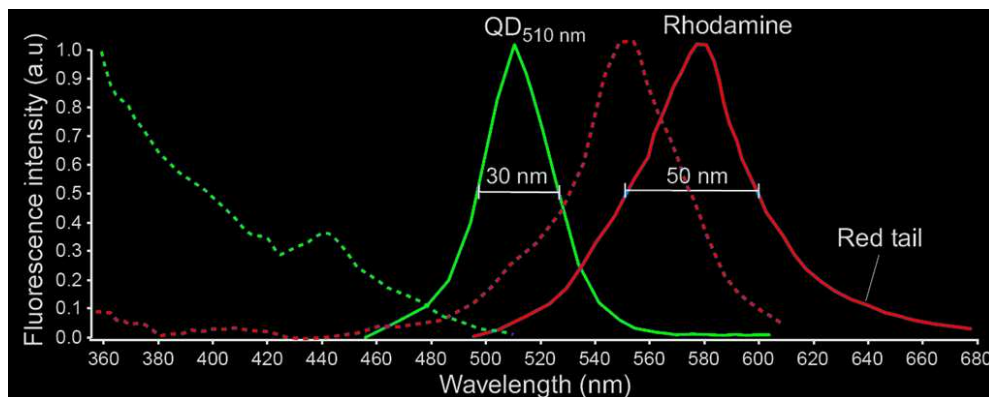


Figure 31. Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence d'un colorant organique, la Rhodamine émettant à 580 nm et de QDs CdSe émettant à 510 nm.

I.2.1. Marquage des cellules bactériennes à l'aide des Quantum Dots

L'imagerie *in vitro* et *in vivo* des cellules eucaryotes à l'aide des QDs a fait l'objet de nombreuses études depuis 1998.¹³⁰ Les cellules eucaryotes utilisent un processus de diffusion passive et/ou d'endocytose (processus d'invagination de la membrane externe qui conduit à une « encapsulation ») pour internaliser les macromolécules, les nutriments, etc, dans la cellule. L'endocytose est un mécanisme récepteur-dépendant et est lié à l'affinité d'un ligand pour son récepteur à la surface de la cellule.¹³³⁻¹³⁴ Il a, par exemple, été montré que des QDs fonctionnalisés par la transferrine humaine marquaient les cellules eucaryotes et qu'un mécanisme d'endocytose était responsable de l'internalisation des nanocristaux par les cellules.¹³⁵

Contrairement aux cellules eucaryotes, les bactéries ne pratiquent pas l'endocytose. L'enveloppe bactérienne est composée d'une membrane externe (barrière rigide de peptidoglycanes) et d'une membrane cytoplasmique dont la perméabilité est très limitée.¹³⁶ La paroi des bactéries gram-positives est formée d'une couche homogène de peptidoglycanes de 20-80 nm d'épaisseur se trouvant à l'extérieur de la membrane plasmique. La paroi des bactéries gram-négatives est plus complexe. Elle contient une couche de peptidoglycanes de 2-7 nm d'épaisseur entourée d'une membrane externe épaisse de 7-8 nm.¹³⁷

L'internalisation dans la cellule procaryote ne peut se faire que par diffusion passive (limitée aux petites molécules de masse molaire < 600 Da), ou via des protéines transmembranaires (porines) ou des protéines possédant des récepteurs très spécifiques pour l'incorporation de macromolécules tels que les virus ou les protéines.

Le diamètre des QDs est un critère très important pour le marquage interne de cellules bactériennes. Kloepfer *et al.* l'ont démontré en marquant des bactéries à l'aide d'une série de QDs CdSe de différents diamètres conjugués à l'adénine. Seuls les QDs possédant un diamètre inférieur à 4 nm ont pénétré et marqué l'intérieur des bactéries.¹³⁸

Plusieurs équipes ont observé une internalisation des QDs par des bactéries Gram-positives et Gram-négatives seulement après exposition des échantillons « cellules + QDs » à la lumière. Après exposition à la lumière, des transferts d'électrons entre les QDs, l'oxygène du milieu et les bactéries permettent la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) qui endommagent la membrane bactérienne et permettent aux QDs de pénétrer dans les cellules.¹³⁸ En conclusion, des QDs de diamètre supérieur à 4 nm, même conjugués à une biomolécule, ne peuvent pas entrer dans les cellules bactériennes. S'il y a marquage, ce

dernier ne peut être que périphérique, sauf si la membrane est endommagée.

La première utilisation de QDs conjugués à la transferrine ou à des lectines pour le marquage de bactéries a été décrite en 2003 par Kloepfer *et al.*¹³⁹ Depuis, ces nanocristaux ont notamment été utilisés pour le marquage, la détection et la quantification des bactéries *Pseudomonas aeruginosa*,¹³⁹ *Escherichia coli*,¹⁴⁰ *Staphylococcus saprophyticus*,¹³⁹ *Bacillus subtilis*,¹⁴¹ *Streptococcus pneumoniae*¹³⁹ et *Salmonella typhimurium*.¹⁴² Dans la plupart des cas, les QDs étaient fonctionnalisés par des ligands tels que l'adénine,¹³⁸ des peptides,¹⁴³ et des lectines (par exemple, WGA, Wheat Germ Agglutinin),^{136,137} ou des anticorps.¹³⁹

Signalons finalement que notre équipe a développé une synthèse des QDs ZnO fonctionnalisés à leur périphérie par des dendrimères polyamidoamine (PAMAM) de deuxième génération G2. Seules les bactéries Gram-positives ont été marquées. Tous les essais réalisés avec les bactéries gram-négatives se sont révélés infructueux.¹⁴⁴

Il y a de nombreuses applications au marquage, même périphérique, de cellules bactériennes à l'aide de QDs fonctionnalisés. On peut citer le développement d'une méthode sensible, spécifique et rapide de détection de *E. coli* O157:H7 par spectroscopie de fluorescence couplée à une séparation immuno-magnétique.¹⁴⁵ Dans ce travail, des billes magnétiques recouvertes d'anticorps ont été utilisées pour capturer les bactéries *E. coli* O157:H7, et de la biotine conjuguée avec l'anticorps de *E. coli* a été ajoutée pour former des complexes sandwichs. Après la séparation magnétique de ces bactéries, les complexes ont été marqués avec des QDs conjugués avec la streptavidine puis détectés par fluorescence. L'intensité de l'émission de fluorescence est proportionnelle à la concentration initiale en cellules *E. coli* O157: H7. En 2005, les QDs ont été utilisés dans un simple dosage fluorimétrique pour détecter des cellules d'une souche d'*E. coli* pathogène.¹⁴⁶ Des QDs cœur/coquille CdSe/ZnS ont tout d'abord été conjugués à la streptavidine. La souche pathogène de bactéries *E. coli* O157:H7 avec un anticorps spécifique a été couplée à la biotine. Les QDs ont permis l'identification rapide et précise d'*E. coli* O157:H7 par fluorescence avec une grande sensibilité par rapport aux fluorophores organiques comme le FITC qui a été utilisé comme référence. En 2008, des travaux basés sur le même principe ont montré l'efficacité ainsi que la sensibilité de QDs pour détecter et quantifier des bactéries de faible abondance (10 cellules par millilitre) dans un environnement composé de différentes autres bactéries.¹⁴⁷

I.2.2. Les quantum dots dans les biofilms bactériens

A ce jour, seules trois études décrivent l'utilisation de QDs dans des biofilms bactériens. Des QDs commerciaux émettant à différentes longueurs d'onde ($\lambda_{em} = 525 \text{ nm}, 605 \text{ nm}$ et 655 nm) et conjugués à des anticorps (SWLA1.2, IgG ou F(ab')₂) ont été utilisés par Chalmers *et al.*¹⁴⁸ pour détecter des souches bactériennes spécifiques au sein d'une population complexe de microorganismes (stratégie dite d'immunofluorescence). Une étude parallèle a été réalisée avec des sondes organiques (Alexa Fluor, ...) conjuguées aux mêmes anticorps. Ce travail a mis en évidence les avantages des QDs (brillance, résistance au photoblanchiment et grande sensibilité) par rapport aux fluorophores organiques dans ce type de détection.

En 2008, une stratégie très similaire a été développée par les mêmes auteurs pour détecter et marquer les cellules bactériennes de *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Viellonella*, et *Niesseria* dans un biofilm de plaque dentaire à l'aide de QDs conjugués à des anticorps.^{149,150}

Enfin, Lee *et al.* ont très récemment conjugué des QDs à des séquences d'ADN via des interactions streptavidine/biotine (QDs-streptavidine + biotine-ADN). Les QDs-ADN ont été employés pour la détection de gènes de *Bacillus spoOA* dans un biofilm par cytométrie en flux.¹⁵¹

En résumé, l'utilisation des QDs au sein de biofilms a, jusqu'à présent, été limitée à la détection de cellules bactériennes au sein d'environnements complexes. A notre connaissance, aucune étude n'a utilisé des QDs pour explorer les autres constituants de ces biofilms bactériens, et notamment l'espace extracellulaire polymérique (EPS).

I.3. Les Exopolymères (EPS) de biofilms bactériens

I.3.1. Les biofilms

Les biofilms bactériens peuvent se définir comme des communautés bactériennes adhérentes à une surface et enrobées d'une matrice intercellulaire hydratée, viscoélastique, composée de polymères organiques et de particules minérales.^{152,153}

Depuis l'observation par Van Leeuwenhoek de la plaque de ses propres dents au XVII^{ème} siècle, la première étude scientifique consacrée aux biofilms date vraiment des années 1940.¹⁵⁴ Cependant les travaux les plus systématiques ont été menés par l'équipe de W. Characklis (Bozeman, Montana, USA) dans les années 1960-1970.

Costerton *et al.* ont rapporté que la communauté bactérienne attachée dans les systèmes aquatiques se trouve dans une matrice avec une dominante de nature polysaccharidique, matrice qui contrôle l'adhérence.¹⁵⁵ En 1987, Costerton *et al.* ont déclaré que les biofilms sont formés de cellules uniques et de microcolonies au sein d'une matrice principalement constituée d'exopolymères anioniques et très hydratés.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸

Le terme « biofilm » recouvre des réalités très différentes qui dépendent de l'environnement, des caractéristiques de la surface des matériaux, du microorganisme, des nutriments disponibles et, de fait, des auteurs utilisant ce terme. A titre d'exemple, la figure 32 montre quelques « amas » de microorganismes auxquels les chercheurs ont attribué le mot « biofilm ». Cela peut aller des colonies de levures formées sur un milieu gélosé, des systèmes photosynthétiques multi-espèces accumulés sur des galets, jusqu'aux amas de virus qui collent à la surface cellulaire.¹⁵⁹

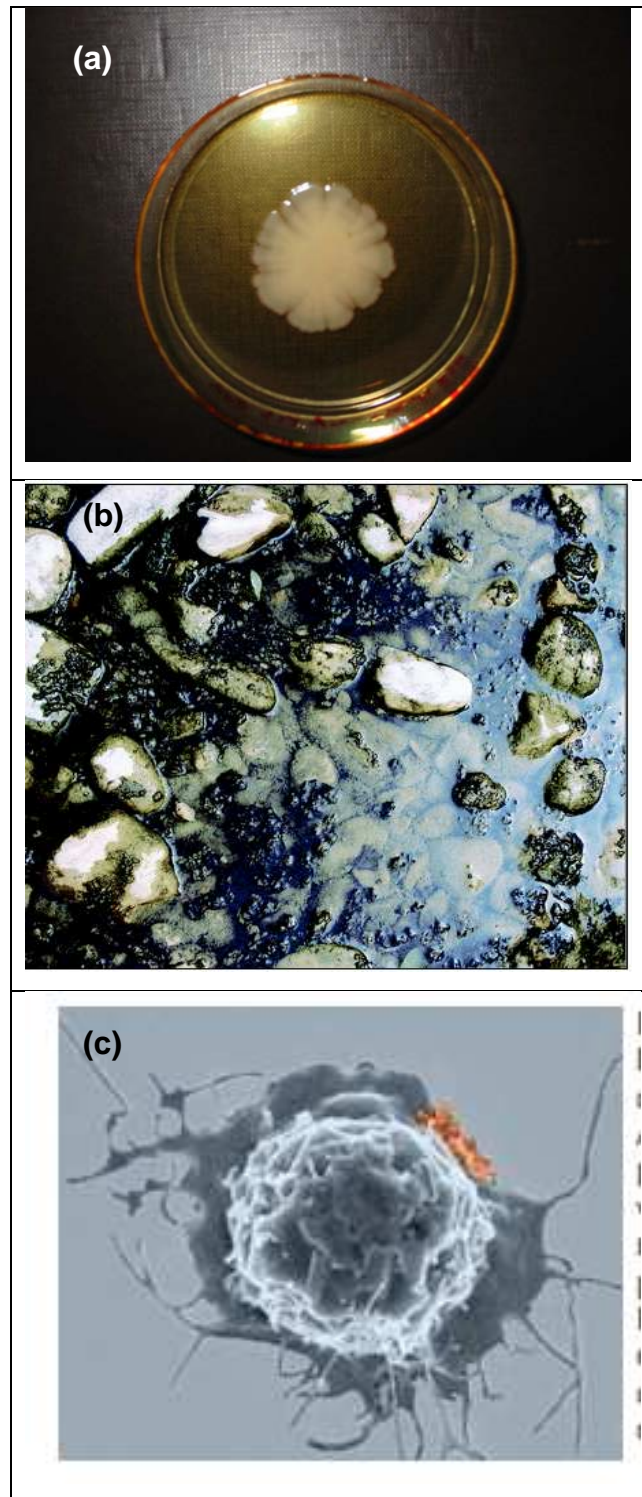


Figure 32. Quelques exemples de microorganismes portant le nom de biofilm : (a) levures cultivées sur gélose molle, (b) biofilms sur galets d'un lit de rivière, (c) virus type 1 (HTLV-1) sur cellules.¹⁵⁹

I.3.2. Formation et développement du biofilm bactérien

La formation de biofilms par les micro-organismes est un phénomène très commun, et de nombreuses études ont clairement établi que les bactéries pouvaient adhérer et coloniser la surface de la plupart des matériaux pour former un biofilm. Le processus de formation d'un biofilm est généralement divisé en quatre étapes : (1) le transport des micro-organismes vers la surface des matériaux, (2) l'adhésion initiale des cellules microbiennes au support, (3) la consolidation de l'adhésion par la synthèse de composés extracellulaires (polymères organiques), et (4) la colonisation du support par multiplication des cellules adhérentes et de la matrice de polymères organiques, formant le biofilm (Figure 33).^{160,161} Les molécules du « quorum sensing », qui assurent la communication interbactérienne (par exemple, le 2-alkyl-4-quinolones (AQs) ou les lactones d'acylhomosrines (AHLs)), permettent de coordonner certains comportements ou actions entre bactéries de la même espèce et ce, en fonction de la densité de population.¹⁶² L'adhésion des bactéries sur les surfaces pourrait déclencher l'expression des gènes contrôlant la production de composants bactériens nécessaires à la formation de biofilms. Le processus de formation du biofilm est régi par des gènes transcrits lors de la fixation initiale de cellules.^{163,164}

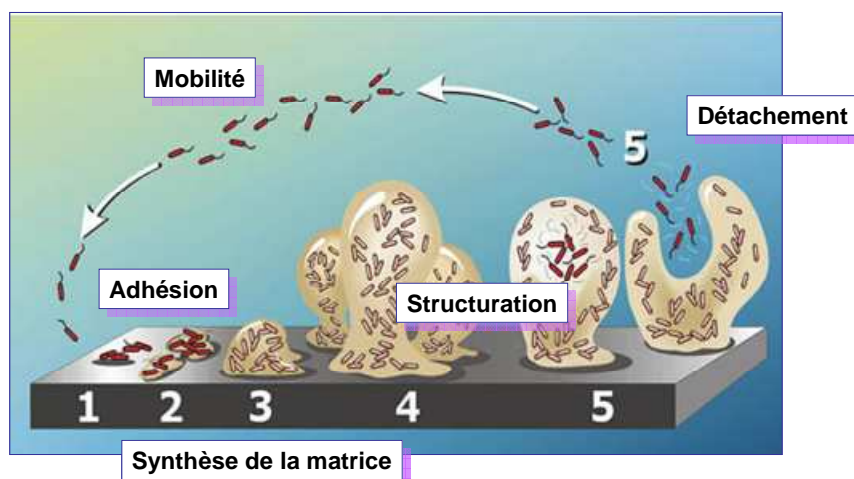


Figure 33. Cycle de vie d'un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*.¹⁶⁰

Le point d'intérêt du biofilm bactérien dans notre travail est la présence d'un espace intercellulaire souvent de plusieurs micromètres d'épaisseur au sein duquel il est possible de trouver des polymères organiques.

Les polymères de cette matrice intercellulaire ont été longtemps décrits comme des exopolysaccharides, mais les nombreuses publications de ces dix dernières années montrent la présence de protéines, de polysaccharides, d'acides nucléiques, d'hétéropolymères glycoconjugués (glycolipides, glycoprotéines, lipopolysaccharides, etc).¹⁶⁵ Aussi l'abréviation EPS systématiquement utilisée pour exopolysaccharides doit aujourd'hui exprimer la présence d'**ExoPolymèreS**.

I.3.3. Espace extracellulaire et exopolymères (EPS)

Les biofilms sont principalement composés de cellules microbiennes et d'exopolymères (EPS) (Figure 34). Les EPS peuvent représenter 50% à 90% de la matière organique totale de biofilms et doivent être considérés comme le principal matériau de la matrice du biofilm.^{166,167}

L'espace extracellulaire polymérique représente la véritable interface entre l'environnement et la communauté bactérienne emprisonnée dans le biofilm bactérien. Les EPS peuvent également contribuer aux propriétés de résistance aux antimicrobiens des biofilms en empêchant le transport d'antibiotiques, ces derniers se liant à l'espace extracellulaire qui présente une barrière physique de diffusion au sein du biofilm.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰

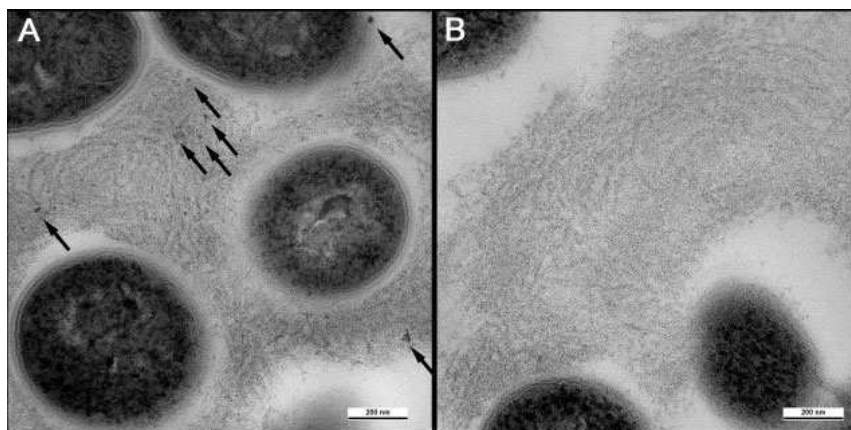


Figure 34. Microscopie électronique à transmission d'un biofilm qui montre la présence des EPS ainsi que la distance intercellulaire (200 nm à 1 μ m).¹⁷¹

Les EPS varient dans leurs compositions chimiques et leurs propriétés physiques. Certains des polysaccharides qui les composent sont neutres ou polyanioniques. La présence d'acides uroniques tels que D-glucuronique, D-galacturonique, l'acide mannuronique et les résiduels inorganiques tel que le phosphate ou rarement le sulfate confèrent des propriétés anioniques à cet espace extracellulaire.¹⁷²

Ces propriétés anioniques des EPS (polysaccharides, protéines, acides aminés...) proviennent également de l'abondance des fonctions carboxylates dans le biofilm. Plusieurs types d'interactions physico-chimiques au sein des EPS expliquent la cohésion de l'ensemble : les interactions hydrophobes, les liaisons d'hydrogène, et les pontages par des ions calcium et magnésium. Toutes ces interactions permettent aux bio-polymères des EPS de former un réseau moléculaire tridimensionnel et intercellulaire bien organisé.^{173,174}

I.3.4. Méthodes de caractérisation des EPS

Pour étudier la composition des EPS, de nombreuses méthodes d'analyse après extraction des EPS ont été utilisées (séparation par voie mécanique ou/et chimique). Aucune de ces méthodes n'est parfaitement satisfaisante (rendement inconnu du fait de l'absence de témoins, risque de contamination de la fraction EPS par érosion des surfaces cellulaires ou par lyse cellulaire). Aussi, au-delà des méthodes brièvement décrites ci-après, les méthodes d'analyse *in situ* sans extraction apparues plus récemment semblent préférables.

L'extraction physique (ou mécanique) des EPS repose sur l'utilisation de techniques de centrifugation, d'homogénéisation, de mélange, de sonication ou de traitement par la chaleur (Tableau 3).¹⁷⁵⁻¹⁷⁷

Tableau 3. Méthodes d'extraction physiques (ou mécaniques) des EPS.

Méthode	Mode d'opérateur
Centrifugation	L'échantillon est centrifugé (20 000 g) pendant 20 minutes. Les EPS sont séparées des bactéries par filtration sur membrane (0.2 µm) et purifiés par dialyse avant lyophilisation.
Sonication	L'échantillon est traité aux ultrasons et les EPS sont purifiés comme précédemment.
Résines d'échange cationique avec ou sans sonication	L'échantillon (sans ou avec traitement aux ultrasons) est traité par une résine cationique pendant une 1 h à 600 rpm pour piéger les EPS.
Chauffage	L'échantillon est chauffé pendant 10 min à 80°C et les EPS sont récupérés par filtration, dialyse et lyophilisation.

Les extractions par voie chimique mettent en jeu des composés (formaldéhyde, éthanol ou EDTA) qui facilitent l'isolement des EPS de cellules (Tableau 4).^{175,178,179}

Tableau 4. Méthodes d'extraction chimiques des EPS.

Méthode	Mode d'opérateur
Formaldéhyde + hydroxyde de sodium	Du formaldéhyde est ajouté au biofilm à 4°C et le mélange est incubé pendant 1 h. Le formaldéhyde permet la fixation des cellules bactériennes (réaction avec les fonctions amines et hydroxyle des protéines et des acides aminés constituant la membrane bactérienne). Une solution 1M de NaOH est alors additionnée afin d'améliorer le rendement de l'extraction des EPS vers la phase aqueuse.
Centrifugation + Ethanol	Après centrifugation (20 000 g) pendant 20 minutes de l'échantillon, un excès d'éthanol refroidi à 0°C est additionné et le mélange est incubé pendant une nuit à 4°C. Le traitement par l'éthanol permet l'extraction des polysaccharides. Ces derniers sont récupérés par centrifugation à 4 000 g pendant 15 minutes.
Traitement par l'EDTA (Sel tétrasodique de l'acide éthylène diamine tétraacétique)	L'échantillon est mis en contact avec une solution à 2% d'EDTA et le mélange est incubé pendant 3 h à 4°C. Les complexes EDTA-EPS obtenus sont récupérés par centrifugation puis lyophilisés.

Un classement de l'efficacité des procédés décrits dans les tableaux 3 et 4 est donné ci-dessous :

Centrifugation \approx sonication \approx centrifugation + éthanol \leq chauffage $<$ résine à échange cationique \leq résine à échange cationique + sonication \ll EDTA \lll formaldéhyde + NaOH.

Quelques méthodes de caractérisation des EPS après extraction et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5. Méthodes de caractérisation des EPS après extraction.

Méthode	Résultats	Références
Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	Mise en évidence des sucres : glucose, mannose, galactose, fructose, ribose, arbose, xylose, rhamnose et acide uronique.	180, 181
Chromatographie en phase liquide (HPLC)	Mise en évidence de plusieurs monosaccharides : glucose, fructose, galactose, arabinose, et d'aminohexoses.	182, 183
Spectroscopie photoélectronique des rayons X (XPS)	Mise en évidence des éléments carbone, oxygène et azote. L'analyse XPS montre les énergies typiques des fonctions carbonyle, amide, carboxylate, acide carboxylique, C-N et C-OH.	180, 184
Résonance magnétique nucléaire (RMN)	Mise en évidence de plusieurs monosaccharides et oligosaccharides : α -glucose, β -glucose, α -1,4-glucane, β -1,6-glucane, β -2,6-fructane, ...	185, 186

Les méthodes d'analyse *in situ* sans extraction représentent une avancée considérable. Ces méthodes de caractérisation des EPS et leurs résultats sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6. Méthodes de caractérisation des EPS « *in situ* » sans extraction.

Méthode	Résultats	Profondeur sondée	Références
Spectroscopie Infrarouge (FT-IR)	Cette méthode met en évidence la présence des fonctions carbonyle, N-H, C-N, COO ⁻ , COOH, C-OH, C-H et C-O-C.	10 μ m	187, 188
Spectroscopie Raman	Mise en évidence de la présence des bandes de vibration correspondant aux CH/CH ₂ , C-C, C-O-C, COO ⁻ , COOH, C-CH ₃ , C-N et C-OH.	8,5 μ m	189

Toutes ces méthodes de caractérisations démontrent clairement la présence de mono-, et d'oligo-polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques et d'acides aminés au sein des EPS (tableau 7) (Figure 35).

Tableau 7. Bandes de vibrations des EPS par spectroscopie IR.

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Type de vibration	Groupe Fonctionnel
3750-3000	Elongation d'OH	OH de polysaccharides et protéines
2926 ± 10	Elongation asymétrique de CH ₂	
2853 ± 10	Elongation symétrique de CH ₂	
1680-1630	Elongation de C=O et C-N	Amide I (protéines) liaison peptidique)
1630-1580	Elongation de C-N et déformation de N-H	Amide II (protéines) (liaison peptidique)
1455	déformation de CH ₂	
1240	déformation de C=O et élongation d'OH	Acide carboxylique et phénols
1120-950	Déformation de CH	Hydrocarbure aromatique
1150-1030	Elongation de C-O-C	Polysaccharides

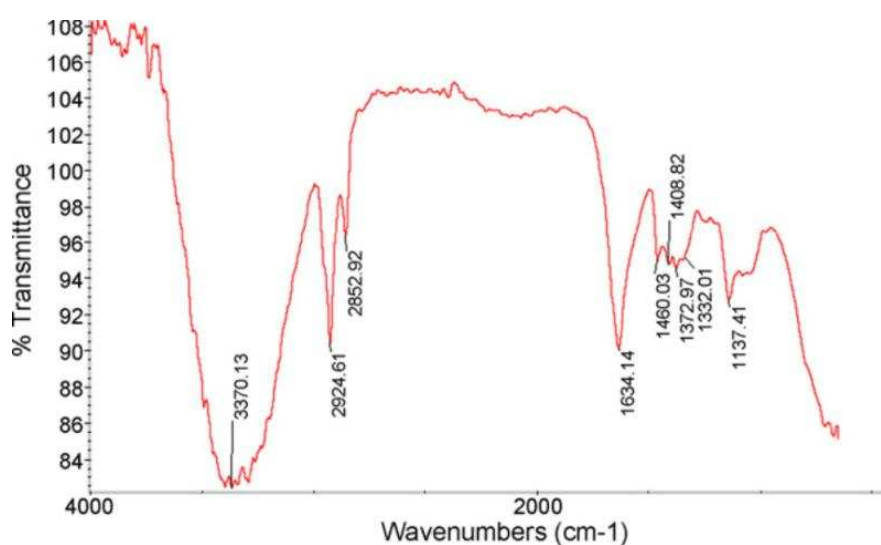


Figure 35. Spectre Infrarouge montrant les caractéristiques des EPS.¹⁹⁰

I.3.5. Observation des biofilms en microscopie

Beaucoup de méthodes ont été développées dans le but de visualiser et caractériser les biofilms bactériens. Les premières observations des biofilms ont été réalisées grâce au microscope électronique à balayage.¹⁹¹ Cette technique impose de déshydrater le biofilm avant l'examen car l'eau d'hydratation n'est pas compatible avec le vide utilisé. La déshydratation conduit à une déformation significative du biofilm et des substances polymériques extracellulaires emprisonnées. Ainsi, le biofilm apparaît avec une couche de fibres environnant les cellules (Figure 36).¹⁵⁷ L'utilisation de la microscopie électronique à transmission avec marquage à l'aide du rouge ruthénium a permis aux chercheurs de fixer les EPS par des interactions avec le ruthénium et identifier la nature des fibres extracellulaires dans les biofilms pour mieux comprendre leur association avec les cellules.^{192,193}

La microscopie électronique a été utilisée pour l'examen, la caractérisation et la visualisation des biofilms sur les dispositifs médicaux et dans les infections humaines.^{194,195} En raison de son excellente résolution, la microscopie électronique continue à être un outil important pour le biofilm.

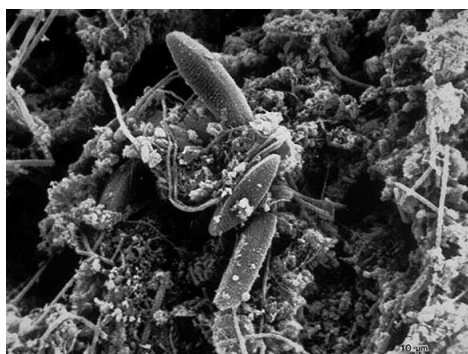


Figure 36. Microscopie électronique à balayage d'un biofilm sur une surface métallique à partir d'un réseau d'eau industrielle (<http://www.microbelibrary.org>).

Par comparaison avec les techniques de microscopie décrites ci-dessus, la microscopie à force atomique (AFM) et la microscopie confocale à balayage laser sont les plus performantes pour étudier le biofilm bactérien de manière non destructive.

La microscopie à force atomique (AFM) est une technique en fort développement actuellement pour des applications en imagerie d'échantillons biologiques.¹⁹⁶⁻²⁰⁰

Par AFM, différentes structures moléculaires et cellulaires peuvent être résolues avec une résolution latérale pouvant aller jusqu'au nanomètre (celle-ci dépend de la pointe utilisée).¹⁹⁸

L'AFM est capable de fournir des images en trois dimensions d'une structure de surface avec une résolution moléculaire ou quasi-moléculaire dans des conditions physiologiques et avec un minimum de préparation de l'échantillon. Elle permet d'étudier les interactions entre les cellules au niveau moléculaire. Emerson et Camesano ont mesuré l'adhérence des bactéries pathogènes aux biomatériaux en mesurant les forces d'interaction locales entre une cellule immobilisée et les surfaces des biomatériaux et des biofilms qui l'entourent.¹⁹⁷ L'hydrophobicité de la surface cellulaire et la charge ont également été étudiées par AFM avec une pointe fonctionnalisée.²⁰⁰ L'AFM peut être une très bonne méthode pour calculer l'énergie de cohésion des EPS dans le biofilm et permet notamment de visualiser la tomographie du biofilm à une échelle nanométrique (Figure 37).^{199,200}

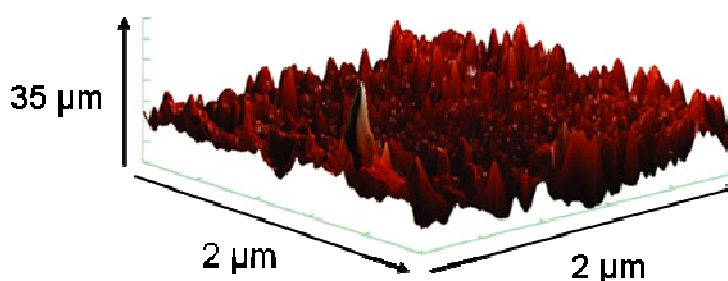


Figure 37. Image 3-D de microscopie à force atomique (AFM) de biofilms de *Candida albicans*.²⁰⁰

Depuis les années 1980, le développement du microscope confocal à balayage laser a également offert aux chercheurs la possibilité d'examiner les biofilms *in situ* sans les limites rencontrées avec le microscope électronique à balayage.^{201,202}

L'utilisation de la microscopie confocale de fluorescence ou de la microscopie d'épifluorescence nécessite que les organismes dans les biofilms soient marqués avec des sondes fluorescentes.

L'utilisation de fluorophores organiques conjugués à des lectines permet le marquage des EPS et montre leur distribution tridimensionnelle dans le biofilm bactérien. Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines, elles se retrouvent dans toutes les classes d'organismes, chez les microorganismes (virus, bactéries), chez les plantes, chez les insectes et les animaux. Elles ont souvent été utilisées dans la détection, l'isolation et la caractérisation d'oligosaccharides. Le tableau 8 présente les exemples les plus significatifs de certains fluorophores organiques conjugués à des lectines et leur spécificité vis-à-vis de l'espace extracellulaire (EPS).

Tableau 8. Exemples de lectines conjuguées aux fluorophores organiques pour le marquage de l'espace extracellulaire polymérique (EPS).

Lectines	Fluorophores	Spécificité	Références
ConA	TRITC		
	Cy5	α -D-mannose	203, 204
	FITC	α -D-glucose	
	Alexa 633		
UEA1	TRITC	α -L-Fucose	
Pha-E	TRITC	Galactose	203
PNA	TRITC	β -Galactose(1 \rightarrow 3) <i>N</i> -acétylgalactosamine	203
WGA	TRITC	<i>N</i> -acétyl- β -D-glucosamine	203, 204, 207, 209
	Texax Red	Acide <i>N</i> -acétylneuraminique	
	FITC	Acide <i>N</i> -acétylmuraminique	
Gly- max	TRITC	<i>N</i> -acétylgalactosamine	209

ConA (*Canavalia esniformis*), UEA1 (*Ulex europaeus*), Pha-E (*Phaseolus vulgaris*), PNA (*Arachis hypogaea*), WGA (*Triticum vulgaris*), Gly-max (*Glycine max*), TRITC (*Tétraméthyl rhodamine isothiocyanate*), FITC (*Fluorescéine isothiocyanate*), Cy5 (*Cyanine*).

Les sondes fluorescentes spécifiques des acides nucléiques tels que le DAPI, l'acridine orange, le Syto 9, le Syto 59 et le Syto 61 sont des molécules permettant la coloration de l'ADN et de l'ARN de toutes les cellules, indépendamment de leur viabilité. Ces sondes sont souvent utilisées pour détecter et quantifier les cellules bactériennes au sein de biofilm. De plus, le double marquage réalisé à l'aide des sondes fluorescentes d'acide nucléique et d'une lectine couplé à un fluorophore organique permet de distinguer les bactéries des EPS au sein du biofilm (Figure 38).

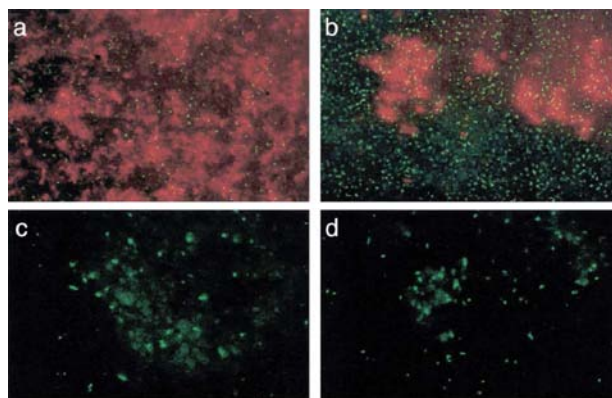


Figure 38. Image de fluorescence du biofilm de *P. aeruginosa* marqué à l'aide de (a,b) TRITC-ConA (rouge) et Syto 9 (vert), (c) FITC-WGA et (d) FITC-ConA.²⁰⁴

La GFP (Green Fluorescent Protein), YFP (Yellow Fluorescent Protein) sont des protéines exprimées par les bactéries et constitutivement produites. Ces protéines fluorescentes peuvent permettre aux biofilms d'être examinés de façon non invasive, sans fixation ou de coloration.^{210,211} La Figure 39 montre une image confocale de fluorescence d'un biofilm bactérien de *Shewanella oneidensis* MR1 qui exprime de la gfp.

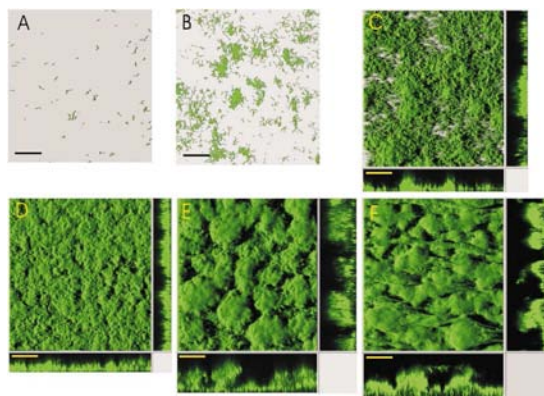


Figure 39. Observation de la formation du biofilm de *Shewanella oneidensis* MR1 exprimant de la GFP. Les images (A à F) montrent la formation du biofilm après 1, 8, 16, 24, 48 et 120 h respectivement.²¹¹

L'ADN extracellulaire (e-ADN) issu des cellules lysées a été signalé comme un composant des EPS. Palmgren et Nielsen ont observé l'accumulation d'ADN au sein des EPS de boues activées.²¹² Allesen-Holm *et al.* ont constaté que, dans les biofilms de *P. aeruginosa*, l'e-ADN est similaire à l'ADN génomique. Ils ont également montré la présence de l'e-ADN par la microscopie confocale de fluorescence (Figure 40).^{212,213}

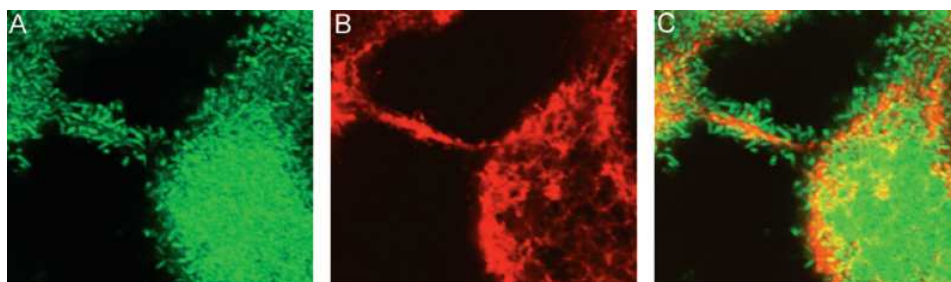


Figure 40. (A) Image de fluorescence du biofilm de *P. aeruginosa* exprimant de la GFP, (B) marqué à l'aide d'iodure de propidium (IP) et (C) la superposition de A et B. (IP est considéré comme marqueur de l'ADN capable de marquer les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire « extracellulaire »).²¹³

Les observations de Böckelmann *et al.* démontrent la présence d'un réseau filamenteux de l'e-ADN dans les biofilms (Figure 41).²¹⁴

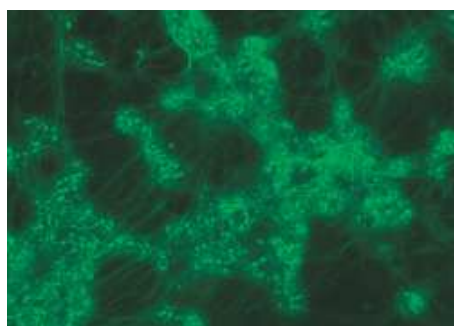


Figure 41. Image d'épifluorescence du biofilm marqué à l'aide de Syto 9 qui montre les substances extracellulaires d'ADN en forme d'un réseau filamenteux.²¹⁴

I.3.6. Mise en évidence des zones hydrophobes au sein de biofilms bactériens à l'aide de la microscopie confocale de fluorescence

La cohésion structurale des biofilms dans un environnement hydrique est généralement expliquée par deux mécanismes : pontage par des cations divalents et présence de domaines hydrophobes au sein du biofilm.

Les zones hydrophobes sont un paramètre aussi important que les sites multivalents cationiques pour la cohésion et le maintien de la matrice bio-organique d'architecture tridimensionnelle dans un milieu aussi hydraté. L'ensemble pourrait être assimilé à un hydrogel rendu cohésif grâce à des points de réticulation formés d'une colle hydrophobe.²¹⁵

Ces domaines hydrophobes pourraient également jouer un rôle protecteur contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans le biofilm bactérien. McLean *et al.* ont préparé des biofilms de *Shewanella oneidensis* MR-1 en conditions aérobies. Le biofilm a été soumis à un stress oxydant généré par O₂. La communauté bactérienne intégrée dans le biofilm essaie de se protéger de ce stress oxydant par la réorganisation de la matrice bio-organique (EPS) en formant des agrégats. Les tests BATH (Bacterial Adherence To Hydrocarbons) confirment que la matrice devient plus hydrophobe lorsque le biofilm est soumis à un stress oxydant.²⁰⁶

L'identification et la localisation des domaines hydrophobes par fluorescence dans le biofilm bactérien ont été peu étudiées. Kuo et Chan *et al.* ont identifié à l'aide de 1-anilinonaphtalène-8-sulfonate (ANS) (fluorophore organique hydrophobe) les interactions hydrophobes entre des antibiotiques cationiques (CAP) composés d'une séquence peptidique à caractère hydrophobe KK-AAAXAA-AAAXAAWAXAAA-KKKK (où les X représentent trois copies de même résidu d'acide aminé peu polaire. X = leucine, tryptophane ou Phénylalanine) et les alginates dans les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*.^{216,217}

Wolfaardt *et al.* ont étudié l'accumulation de composés hydrophobes tels que « diclofop-méthyl » (biocide) dans les zones marquées par le fluorophore organique Nile Red. La fixation du Nile Red a montré la présence des zones hydrophobes et la distribution non uniforme des régions chargées et hydrophobes dans l'espace extracellulaire du biofilm (Figure 42).¹⁶⁵

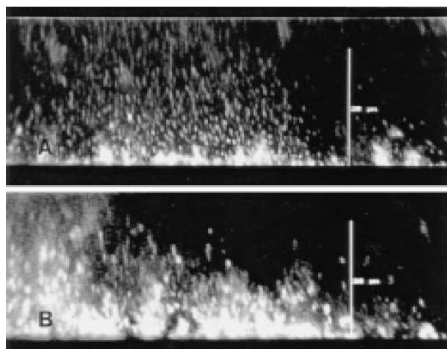


Figure 42. Marquage des microdomaines hydrophobes des EPS à l'aide de (a) Nile Red et (b) Nile Red et diclofop-méthyl.¹⁶⁵

Plus récemment, Pan *et al.* ont étudié l'accumulation de Dicamba (acide 3,6-dichloro-2-méthoxybenzoïque) et de phénanthrène dans l'EPS de boues activées. L'émission de fluorescence de protéines associées aux EPS (à 338-340 nm) est inhibée après interaction avec le Phénanthrène.^{218,219}

Ces résultats ont montré clairement la composition hétérogène des polymères bio-organiques, et confirment la présence de domaines hydrophobes responsables du maintien de la structure du biofilm.

I.3.7. Diffusion-interaction dans le biofilm

Les processus de diffusion des espèces chimiques dans un biofilm sont extrêmement importants car ils contrôlent en partie la disponibilité des nutriments pour les microorganismes. Cette question a été largement explorée dans la littérature mais c'est sans doute Stewart qui a (assez élégamment) le mieux approché les questions tant sur le plan de la physico-chimie que de la biologie.¹⁷⁰

La limitation de la diffusion est facile à appréhender dans des systèmes biologiques tels que les biofilms bactériens. Cette limitation de diffusion peut provenir de la densité cellulaire localement élevée (amas de cellules bactériennes) et bien évidemment de la présence de substances polymériques extracellulaires (EPS). La diffusion est le processus de transport prédominant au sein des agrégats de cellules.

Considérant que la distance de diffusion pour un micro-organisme librement suspendu est de l'ordre de grandeur de la dimension d'une cellule individuelle, la distance de diffusion dans un biofilm devient donc la dimension d'un amas multicellulaires.

Le tableau 9 représente le coefficient de diffusion dans l'eau (D_{aq}) de différents solutés dépendant de la température (T) et la viscosité (μ) de la solution. Cette dépendance en température des coefficients de diffusion aqueuse peut être calculée par la relation $D_{aq} \cdot \mu / T =$ constante.

Tableau 9. Coefficients de diffusion de différents solutés à 25 °C.²²⁰

Solute	$10^{-6} D_{aq}$ in cm ² /s
Hydrogen	45.0
Nitrogen	18.8
Oxygen	20.0
Carbon dioxide	19.2
Methane	14.9
Ethane	12.0
Propane	9.7
Benzene	10.2
Hydrogen sulfide	16
Formic acid	14.1
Acetic acid	12.1
Propionic acid	10.6
Butyric acid	8.7
Benzoic acid	10.0
Succinic acid	9.4
<i>p</i> -Aminobenzoic acid	8.4
Fluorescein	5.4
Methanol	15
Glycerol	9.4
Urea	13.8
Glucose	6.7
Sucrose	5.2
Lactose	4.9
Maltose	4.8
Raffinose	4.3
Glycine	11
Glutamine	7.6
Alanine	9.1
Leucine	7.3
Serine	8.8
Valine	8.3
Asparagine	8.3
Threonine	8.0
<i>N</i> -(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine lactone	4.9
<i>N</i> -Butyryl-L-homoserine lactone	7.2
Li ⁺	10.3
NH ₄ ⁺	19.7
Cl ⁻	20.3
HCO ₃ ⁻	11.8
SO ₄ ²⁻	10.6
H ₂ PO ₄ ²⁻	8.8
HPO ₄ ⁻	7.6

La valeur du coefficient moyen de diffusion dans le biofilm (D_e) peut être réduite par rapport au coefficient de diffusion dans l'eau en raison de la densité de la biomasse dans le biofilm et des propriétés physico-chimiques des solutés, des polymères extracellulaires, et des particules abiotiques ou des bulles de gaz qui sont prises au piège dans le biofilm.

La figure 43 présente les valeurs de D_e/D_{aq} pour différents solutés. On remarque que les valeurs D_e/D_{aq} sont similaires pour des entités de même nature (par exemple : D_e/D_{aq} des gaz = 0.6 et D_e/D_{aq} des produits organiques = 0.25).

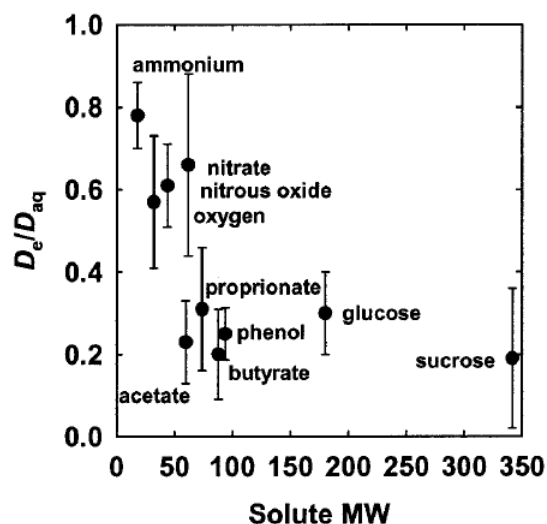


Figure 43. Coefficients de diffusion effectifs de différents solutés dans les biofilms.¹⁷⁰

La nature de l'entité diffusante (ions, molécules ou particules) est un paramètre très important qu'il faut considérer. Leur diffusion dans le biofilm peut être limitée par sorption ou par réaction avec les constituants. La figure 44 montre schématiquement le comportement de trois entités dans le biofilm prises à titre d'exemple.

- 1- Diffusion libre d'ion chlorure Cl^- au sein du biofilm.
- 2- Diffusion limitée de l'ion hypochlorite (ClO^-) par réaction avec les composants du biofilm.
- 3- Diffusion limitée des nanoparticules inorganiques par sorption/interaction avec les composants du biofilm.

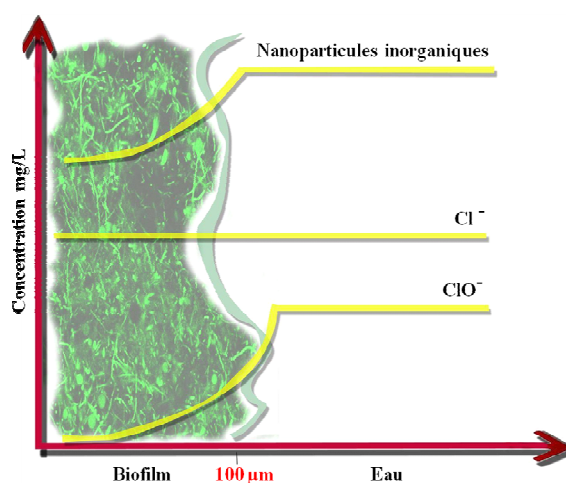


Figure 44. Schéma représentatif de la diffusion, réaction et sorption de Cl^- , ClO^- , et de nanoparticules inorganiques dans un biofilm.

Le comportement de ces trois solutés est complètement différent. Pour les ions chlorure Cl^- ,¹⁹ la diffusion dans le biofilm est quasiment identique à celle dans l'eau en raison de sa charge négative et son faible diamètre. L'ion hypochlorite est fortement réactif et est consommé par oxydation avec la matière organique dans le biofilm.^{221,222} Sa concentration est nulle dans les profondeurs du biofilm.

Dans le cas de nanoparticules inorganiques, nous supposons un mécanisme d'interaction ou sorption par le biofilm bactérien en fonction :^{223,224}

- 1- du diamètre hydrodynamique
- 2- de la composition chimique de la particule
- 3- de la charge de surface
- 4- de la fonctionnalisation de surface

La diffusion des nanoparticules dans le biofilm est dominée par un mouvement brownien aléatoire. Une augmentation de la taille de ces nanoparticules accroît la probabilité de choc (collision particule-surface ou particule-particule) et peut conduire à leur sédimentation.^{224,225}

Le phénomène de sorption/interaction des nanoparticules dans le biofilm peut s'interpréter par deux mécanismes :

- 1- L'association avec la matière organique présente dans le biofilm.
- 2- La chélation avec les sels présents dans le milieu biologique (sulfate, phosphate).

Finalement, il faut noter que les nanoparticules peuvent également subir des transformations chimiques lorsqu'elles sont mises dans des systèmes biologiques tels que le biofilm bactérien (oxydation/réduction, dissolution, hydrolyse et dégradation biologique).^{223,226,227}

Pour analyser les processus de diffusion moléculaires au sein des structures 3-D de biofilms, il est nécessaire d'avoir des méthodes non-invasives et efficaces en termes de la résolution spatiale, de sensibilité et de vitesse d'acquisition. Les techniques d'imagerie de fluorescence ou les approches basées sur l'intensité de fluorescence permettant des études de diffusion ou d'interaction des entités moléculaires au sein du biofilm. Les méthodes utilisées pour étudier la diffusion moléculaire dans le biofilm sont couplées à la microscopie confocale ou biphotonique de fluorescence. Ces méthodes sont :

- 1- Microscopie “Time Lapse”.
- 2- FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching).
- 3- FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging), imagerie de durée de vie de fluorescence.
- 4- FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy), spectroscopie de corrélation de fluorescence.

I.3.7.1. Microscopie “Time Lapse”

Cette technique consiste à visualiser en temps réel la pénétration de molécules fluorescentes dans des systèmes biologiques tels que les biofilms bactériens. L'intensité de fluorescence dans une zone de l'échantillon est exprimée en fonction du temps. Le Time lapse permet notamment de suivre la diffusion d'une population statistique de fluorophore avant accumulation à condition que le processus de diffusion ne soit pas trop rapide (limite du microscope).^{228,229}

I.3.7.2. FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

La technique de FRAP est basée sur l'excitation de molécule fluorescente par une source de lumière très intense dans un volume défini par l'objectif du microscope confocal ou dans une région définie par l'utilisateur afin de stopper de manière irréversible leur fluorescence (photoblanchiment). Ensuite, la régénération de fluorescence est observée si les fluorophores diffusent dans le volume d'excitation (Figure 45).

L'analyse de l'évolution dans le temps du retour de l'émission de fluorescence donne accès à la mobilité des molécules fluorescentes.

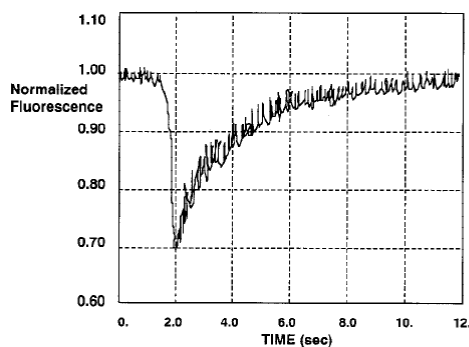


Figure 45. Exemple de la régénération de la fluorescence de la fluorescéine-dextran après photoblanchiment.²³⁰

Pour définir la diffusion ou l'interaction moléculaire locale à travers une structure biologique tridimensionnelle, le FRAP est une méthode simple qui est désormais couramment mise en œuvre. Cette méthode a été appliquée aux biofilms et donne des informations sur la variation spatiale du coefficient de diffusion.²³⁰⁻²³³ Par exemple, la présence des canaux d'eau dans le biofilm peut être mise en évidence en comparant la vitesse de diffusion de molécule fluorescentes dans l'eau avec celle obtenue dans les biofilms bactériens.²³⁰

Notons ici que la technique de FRAP nécessite généralement des concentrations moléculaires de fluorophores de l'ordre micro-molaire, et donne par conséquent accès seulement à la moyenne (c'est-à-dire sur un grand nombre de molécules) des coefficients de diffusion comme pour la méthode de Time Lapse. Ce qui pourrait masquer les effets de l'hétérogénéité locale.²³² Cette limitation peut être levée par l'utilisation de la FCS décrite ci-après.

I.3.7.3. FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging)

L'inhibition de diffusion est souvent liée à une interaction des fluorophores avec le biofilm. Pour caractériser ces processus d'interaction moléculaire, le FLIM est bien adapté. La durée de vie de fluorescence est une propriété intrinsèque d'un fluorophore, indépendante de sa concentration. Ainsi, la durée de vie de fluorescence d'une molécule peut varier en fonction de sa réactivité locale avec le milieu biologique (pH, force ionique ...). Expérimentalement, il est donc possible de construire des images de durée de fluorescence, qui permettent d'évaluer la réactivité d'un fluorophore à un niveau moléculaire dans une structure biologique tridimensionnelle comme le biofilm bactérien. Le FLIM a été utilisé dans certaines études de biofilms pour caractériser l'interaction entre les sucres et les EPS,²³⁴ pour sonder le pH local et plus récemment pour mesurer la différenciation entre les bactéries actives et non actives par l'estimation de rapport ARN/ADN intracellulaire.^{235,236}

I.3.7.4. FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy)

La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) apparaît comme la technique la plus appropriée pour analyser les processus d'interaction ou de diffusion moléculaire au sein des systèmes biologiques à l'échelle de la molécule unique. La FCS est une méthode microscopique de haute résolution spatio-temporelle et non invasive pour étudier la diffusion

moléculaire de fluorophores en faibles concentrations (\sim nM). La méthode est basée sur la mesure de l'intensité de fluorescence causées par les fluctuations de molécules uniques passant dans un volume confocal d'excitation ($<$ un femtolitre). Ces fluctuations peuvent être quantifiées par l'autocorrélation temporelle de l'intensité du signal enregistré. Il est ainsi possible d'obtenir des informations sur la diffusion des fluorophores à l'intérieur de la structure 3-D des biofilms à l'échelle de la molécule unique.

La FCS a permis de suivre la pénétration, la diffusion et l'interaction de sondes fluorescentes (billes de latex et de l'isothiocyanate de fluorescéine-dextran) de différentes tailles et de charges électriques, de bactériophages fluorescents et d'agents antimicrobiens dans différents modèles de biofilms bactériens et avec différentes densités en EPS. Une diffusion gênée et même une inhibition totale de diffusion ont été observés notamment dans les zones à haute teneur en EPS.^{168,234,237} Par ailleurs, les mécanismes de non-diffusion ont été liés à des interactions fortes entre les fluorophores et le biofilm (Figures 46 et 47).^{168,232,235} Ces études ont permis une meilleure compréhension du rôle de la matrice comme «réservoir» et de sa capacité à moduler le transport et l'interaction des entités au sein du biofilm bactérien.

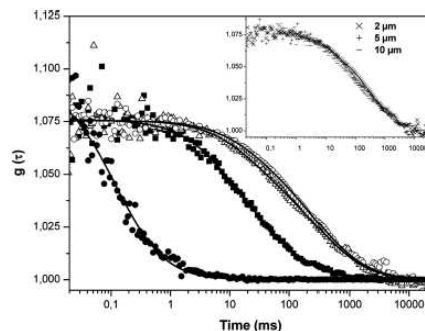


Figure 46. Courbes de diffusion ■ des bactériophages marqué à l'aide de Syto 9 dans l'eau, ● du Syto 9 dans l'eau, ○ et ◇ des bactériophages marqué l'aide de Syto 9 dans différentes zones de biofilm de *S. maltophilia*.²³⁷

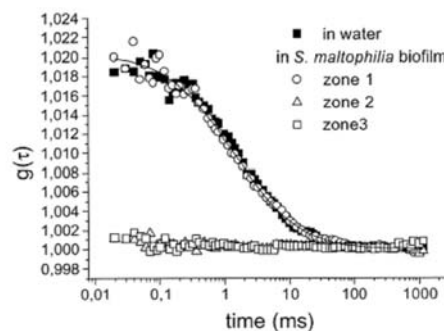


Figure 47. Courbes de diffusion ■ de FITC- dextran dans l'eau, □, ○, ◇ FITC- dextran dans différentes zones de biofilm de *S. maltophilia*.²³⁴

Bibliographie

- [1] H. Li, W. Y. Shih, W. H. Shih, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, *46*, 2013-2019.
- [2] Z. Sedaghat, N. Taghavinia, M. Marandi, *Nanotechnology* **2006**, *17*, 3812-3816.
- [3] A. L. Rogach, A. Kornowski, M. Gao, A. Eychmüller, H. Weller, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 3065-3069.
- [4] B. Nikoobakht, C. Burda, M. Braun, M. Hun, M. A. El-Sayed, *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 591-597.
- [5] P. Zhong, Y. Yu, J. Wu, Y. Lai, B. Chen, Z. Long, C. Liang, *Talanta* **2006**, *70*, 902-906.
- [6] Y. Zhang, S. Gao, J. Y. Ying, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 376-380.
- [7] W. Mao, J. Guo, W. Yang, C. Wang, J. He, J. Chen, *Nanotechnology* **2007**, *18*, 485611.
- [8] H. Li, W. Y. Shih, W. -H, Shih, *Nanotechnology* **2007**, *18*, 495605.
- [9] H. Qian, X. Qiu, L. Li, J. Ren, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 9034-9040.
- [10] Y. Zheng, Z. Yang, J. Y. Ying, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1475-1479.
- [11] M. T. Harrison, S. V. Karshaw, M. G. Burt, A. L. Rogach, A. Kornowski, A. Eychmüller, H. Weller, *Mater. Res. Symp. Proc.* **1999**, *536*, 217-222.
- [12] R. -O. Moussoudia, L. Balan, R. Schneider, *New J. Chem.* **2008**, *32*, 1388-1393.
- [13] D. W. Lucey, D. J. MacRae, M. Furis, Y. Sahoo, A. N. Cartwright, P. N. Prasad, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 3754-3762.
- [14] D. Battaglia, X. Peng, *Nano Letters.* **2002**, *2*, 1027-1030.
- [15] M. A. Malik, P. O'Brien, S. Norager, J. Smith, *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 2591-2595.
- [16] J. Zhu, X. Liao, J. Wang, H. -Y. Chen, *Materials Research Bulletin* **2001**, *36*, 1169-1176.
- [17] E. Lifshitz, M. Brumer, A. Kigel, A. Sashchiuk, M. Bashouti, M. Sirota, E. Galun, Z. Burshtein, A. Q. Le Quang, I. Ledoux-Rak, J. Zyss, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 25356-25365.
- [18] J. E. Murphy, M. C. Beard, A. G. Norman, S. P. Ahrenkiel, J. C. Johnson, P. Yu, O. I. Mic'ic', R. J. Ellingson, A. J. Nozik, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3241-3247.
- [19] M. Green, P. O'Brien, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 4500-4505.
- [20] E. E. Foos, R. M. Stroud, A. D. Berry, *Nano Lett.* **2001**, *1*, 693-695.
- [21] A. L. Efros, A. L. Efros, *Sov. Phys. Semicond.* **1982**, *16*, 772-775.
- [22] L. E. Brus, *J. Chem. Phys.* **1984**, *80*, 4403-4409.
- [23] M. G. Bawendi, M. L. Steigerwald, L. E. Brus, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1990**, *41*, 477-496.
- [24] L. E. Brus, *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 2555-2560.

- [25] P. Reiss, F. Chandezon, *Techniques de l'Ingénieur* **2004**, RE22, 1-15.
- [26] C. Kittel, *Physique de l'Etat Solide. Dunod.* **1983**.
- [27] D. Bimberg et coll. Landolt-Börnstein Series: Crystal and Solid State Physics-Physics of Group IV Elements and III-V Compounds et Physics of II-VI and I-VII Compounds. O. Madelung, Springer **1982**.
- [28] V. Biju, T. Itoh, A. Anas, A. Sujith, M. Ishikawa, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, 2469-2495.
- [29] B. O. Dabbousi, J. RodriguezViejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen, M. G. Bawendi, *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 9463-9475.
- [30] Q. Zhao, P. A. Graf, W. B. Jones, A. Franceschetti, J. Li, L. -W. Wang, K. Kim, *Nano Lett.* **2007**, 7, 3274-3280.
- [31] M. Nirmal, D. J. Norris, M. Kuno, M. G. Bawendi, *Phys. Rev. Lett.* **1995**, 75, 3728-3731.
- [32] J. Singh, *Physics of Semiconductors and Their Heterostructures McGraw-Hill*, New York **1993**.
- [33] V. A. Fedorov, V. A. Ganshin, Y. N. Korkishko, *Phys. Status. Solidi. A* **1991**, 126, K5-K7.
- [34] M. B. Mohamed, D. Tonti, A. AL-Salman, A. Chemseddine, M. Chergui, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 10533-10537.
- [35] W. W. Yu, Y. A. Wang, *X. Chem. Mater.* **2003**, 15, 4300-4308.
- [36] L. Qu, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2049-2055.
- [37] T. Vossmeier, L. Katsikas, M. Giersig, I. G. Popovic, K. Diesner, A. Chemseddine, A. Eychmüller, H. Weller, *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 7665-7673.
- [38] D. Moore, Z. L. Wang, *J. Mater. Chem.* **2006**, 16, 3898-3905.
- [39] A. M. Kapitonov, A. P. Stupak, S. V. Gaponenko, E. P. Petrov, A. L. Rogach, A. Eychmüller, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 10109-10113.
- [40] A. L. Rogach, D. Nagesha, J. W. Ostrander, M. Giersig, N. A. Kotov, *Chem. Mater.* **2000**, 12, 2676-2685.
- [41] M. J. Bowers, J. R. McBride, S. J. Rosenthal, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15378-15379.
- [42] Y. -W. Lin, M. -H. Hsieh, C. -P. Liu, H. -T. Chang, *Langmuir* **2005**, 21, 728-734.
- [43] H. Qian, L. Li, J. Ren, *Mater. Res. Bull.* **2005**, 40, 1726-1736.
- [44] P. Reiss, M. Protière, L. Li, *Small* **2009**, 2, 154-168.
- [45] D. V. Talapin, R. Koeppel, S. Götzinger, A. Kornowski, J. M. Lupton, A. L. Rogach, O. Benson, J. Feldmann, H. Weller, *Nano Lett.* **2003**, 3, 1677-1681.
- [46] J. S. Steckel, J. P. Zimmer, S. Coe-Sullivan, N. E. Stott, V. Bulovic, M. G. Bawendi, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 2154.

- [47] D. Battaglia, J. J. Li, Y. Wang, X. Peng, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5035-5039.
- [48] S. Kim, B. Fisher, H. J. Eisler, M. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11466-11467.
- [49] R. G. Xie, X. H. Zhong, T. Basché, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2741-2744.
- [50] I. V. Sedova, O. G. Lyubliskaya, S. V. Sorokin, A. A. Toropov, F. Donatini, L. S. Dang, S. V. Ivanov, *Semicond.* **2007**, *41*, 1345-1350.
- [51] H. Zajicek, P. Juza, E. Abramof, O. Pankratov, H. Sitter, H. Helm, G. Brunthaler, W. Faschinger, K. Lischka, *Appl. Phys. Lett.* **1993**, *62*, 717-719.
- [52] S. Jun, E. Jang, J. E. Lim, *Nanotechnology* **2006**, *17*, 3892-3896.
- [53] D. Talapin, I. Mekis, S. Gotzinger, A. Kornowski, O. Benson, H. Weller, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 18826-18831.
- [54] R. Xie, U. Kolb, J. Li, T. Basche, A. Mews, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7480-7488.
- [55] P. Reiss, S. Carayon, J. Bleuse, A. Pron, *Synth. Met.* **2003**, *139*, 649-652.
- [56] V. K. LaMer, R. H. Dinegar, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 4847-4854.
- [57] P. W. Voorhees, *J. Stat. Phys.* **1985**, *38*, 231-252.
- [58] W. Z. Ostwald, *Phys. Chem.* **1901**, *37*, 385.
- [59] C. B. Murray, C. R. Kagan, M. G. Bawendi, M. G, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **2000**, *30*, 545-610.
- [60] C. B. Murray, D. J. Norris, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8706-8715.
- [61] D. V. Talapin, A. L. Rogach, A. Kornowski, M. Haase, H. Weller, *Nano Lett.* **2001**, *1*, 207-211.
- [62] Z. A. Peng, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 183-184.
- [63] L. Qu, A. Z. Peng, X. Peng, *Nano Lett.* **2001**, *1*, 333-337.
- [64] W. Yu, X. Peng, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2368-2371.
- [65] C. R. Bullen, P. Mulvaney, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 2303-2307.
- [66] S. Sapra, A. L. Rogach, J. Feldmann, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 3391-3395.
- [67] J. Jasieniak, C. Bullen, J. van Embden, P. Mulvaney, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 20665-20668.
- [68] D. V. Talapin, S. Haubold, A. L. Rogach, A. Kornowski, M. Haase, H. Weller, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 2260-2263.
- [69] N. Pradhan, S. Efrima, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2050-2051.
- [70] C. -Q. Zhu, P. Wang, X. Wang, *Nanoscale. Res. Lett.* **2008**, *3*, 213-220.
- [71] V. V. Breus, C. D. Heyes, K. Tron, G. U. Nienhaus, *ACS Nano.* **2009**, *3*, 2573-2580.
- [72] A. Anas, H. Akita, H. Harashima, T. Itoh, M. Ishikawa, V. Biju, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 10005-10011.

- [73] V. R. Hering, G. Gibson, R. I. Schumacher, A. Faljoni-Alario, M. J. Politi, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1705-1708.
- [74] M. Tomasulo, I. Yildiz, S. L. Kaanumalle, F.M. Raymo, *Langmuir* **2006**, *22*, 10284-10290.
- [75] M. A. Hines, P. Guyot-Sionnest, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 468-471.
- [76] A. L. Rogach, L. Katsikas, A. Kornowski, D. Su, A. Eyhmüller, H. Weller, *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 1772-1778.
- [77] J. Mao, J. -Na. Yao, L. -Na. Wang, W. -S. Liu, *J. Colloid Interf. Sci.* **2008**, *319*, 353-356.
- [78] H. Zhang, L. Wang, H. Xiong, L. Hu, B. Yang, W. Li, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1712-1715.
- [79] H. Li, W. Y. Shih, W. -H. Shih, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2010**, *49*, 578-582.
- [80] L. Huang, H. Han, *Mater. Lett.* **2010**, *64*, 1099-1101.
- [81] L. Zou, Z. Gu, N. Zhang, Y. Zhang, Z. Fang, W. Zhu, X. Zhong, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 2807-2815.
- [82] Y. He, L. -M. Sai, H. -T. Lu, M. Hu, W. -Y. Lai, Q. -L. Fan, L. -H. Wang, W. Huang, *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 359-365.
- [83] H. Zhang, Z. Zhou, B. Yang, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 8-13.
- [84] L. Li, H. Qian, J. Ren, *Chem. Commun.* **2005**, *4*, 528-530.
- [85] Y. He, H. Lu, L. Sai, W. Lai, Q. Fan, L. Wang, W. Huang, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 13352-13356.
- [86] Y. He, H. Lu, L. Sai, W. Lai, Q. Fan, L. Wang, W. Huang, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 13370-13374.
- [87] J. Guo, W. Yang, C. Wang, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 17467-17473.
- [88] M. Y. Gao, S. Kirestein, H. Möhwald, A. L. Rogach, A. Eychmüller, H. Weller, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 8360-8363.
- [89] B. Y. He, H. T. Lu, L. M. Sai, Y. Y. Su, M. Hu, C. H. Fan, W. Huang, L. H. Wang, *Adv. Mater.* **2008**, *9999*, 1-6.
- [90] J. Aldana, Y. A. Wang, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8844-8850.
- [91] W. C. W. Chan, S. Nie, *Science* **1998**, *281*, 2016-2018.
- [92] S. F. Wuister, I. Swart, F. V. Driel, S. G. Hickey, C. M. Donega, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 503-507.
- [93] P. Zhong, Y. Yu, J. Wu, Z. Long, C. Liang, *Anal. Sci.* **2007**, *23*, 1085-1089.
- [94] W. Liu, H. S. Choi, J. P. Zimmer, E. Tanaka, J. V. Frangioni, M. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14530-14531.
- [95] D. L. Fuente, J. M. Fandel, M. Berry, C. C. Riehle, M. Cronin, L. Aitchison, G. Curtis, *ChemBioChem.* **2005**, *6*, 985-991.

- [96] M. J. Murcia, D. L. Shaw, E. C. Long, C. A. Naumann, *Optics Commun.* **2008**, *281*, 1771-1780.
- [97] S. Kim, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14652-14653.
- [98] W. Guo, J. J. Li, Y. A. Wang, X. Peng, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 3125-3133.
- [99] Y. A. Wang, J. J. Li, H. Chen, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2293-2298.
- [100] W. R. Algar, U. J. Krull. *Chem. Phys. Chem.* **2007**, *8*, 561-568.
- [101] H. T. Uyeda, I. L. Medintz, J. K. Jaiswal, S. M. Simon, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3870-3878.
- [102] K. Susumu, H. T. Uyeda, I. L. Medintz, T. Pons, J. B. Delehanty, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13987-13996.
- [102] T. J. Daou, L. Li, P. Reiss, V. Josserand, I. Texier, *Langmuir* **2009**, *25*, 3040-3044.
- [104] D. Gerion, F. Pinaud, S. C. Williams, W. J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss, P. Alivisatos, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 8861-8871.
- [105] A. M. Smith, H. Duan, M. N. Rhyner, G. Ruan, S. Nie, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 3895-3903.
- [106] T. Pons, H. T. Uyeda, I. L. Medintz, H. Mattoussi, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 20308-20316.
- [107] B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireau, A. H. Brivanlou, A. Libchaber, *Science* **2002**, *298*, 1759-1762.
- [108] H. Li, X. Wang, *Sensors and Actuators B* **2008**, *134*, 238-244.
- [109] H. Li, W. Wang, Z. Gao, Z. He, *Nanotechnology* **2007**, *18*, 205603.
- [110] V. Roullier, F. Grasset, F. Boulmedais, F. Artzner, O. Cador, V. Marchi-Artzner, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 6657-6665.
- [111] F. Boulmedais, P. Bauchat, M. J. Brienne, I. Arnal, F. Artzner, T. Gacoin, M. Dahan, V. Marchi-Artzner, *Langmuir* **2006**, *22*, 9797-9803.
- [112] H. Fan, E. W. Leve, C. Scullin, J. Gabaldon, D. Tallant, S. Bunge, T. Boyle, M. C. Wilson, C. J. Brinker, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 645-648.
- [113] W. J. M. Mulder, R. Koole, R. J. Brandwijk, G. Storm, P. T. K. Chin, G. J. Strijkers, C. M. Donega, K. Nicolay, A. W. Griffioen, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1-6.
- [114] T. Pellegrino, L. Manna, S. Kudera, T. Liedl, D. Koktysh, A. L. Rogach, S. Keller, J. Rädler, G. Natile, W. J. Parak, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 703-707.
- [115] C. Zhou, H. Shen, Y. Guo, L. Xu, J. Niu, Z. Zhang, Z. Du, J. Chen, L. S. Li, *J. Colloid Interf. Sci.* **2010**, *344*, 279-285.
- [116] R. E. Anderson, W. W. C. Chan, *ACS Nano* **2008**, *2*, 1341-1352.

- [117] Z. Wu, Y. Zhao, F. Qiu, Y. Li, S. Wang, B. Yang, L. Chen, J. Sun, J. Wang, *Colloids Surf. A* **2009**, *350*, 121-129.
- [118] A. M. Smith, S. Nie, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9916-9921.
- [119] X. Zhou, Z. Chen, P. Huang, X. Wang, A. Kasuya, *Colloid J.* **2008**, *70*, 734-739.
- [120] S. T. Selvan, T. T. Tan, J. Y. Ying, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 1620-1625.
- [121] X. Zhoua, Y. Kobayashib, V. Romanyuka, N. Ochuchic, M. Takedac, S. Tsunekawad, A. Kasuya, *Appl. Surf. Sci.* **2005**, *242*, 281-286.
- [122] A. R. Clapp, E. R. Goldman, H. Mattoussi, *Nature Protocol* **2006**, *1*, 1258-1266.
- [123] E. R. Goldman, G. P. Anderson, P. T. Tran, H. Mattoussi, P. T. Charles, J. M. Mauro, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 841-847.
- [124] F. Pinaud, D. King, H. -P. Moore, S. Weiss, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6115-6123.
- [125] J. M. Slocik, J. T. Moore, D. W. Wright, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 169-173.
- [126] Q. Shang, H. Wang, H. Yu, G. Shan, R. Yan, *Colloids Surf. A* **2007**, *294*, 86-91.
- [127] Y. Xing, Q. Chaudry, C. Shen, K. Y. Kong, H. E. Zhau, L. W. Chung, J. A. Petros, R. M. O'Rregan, M. V. Yezhelyev, J. W. Simons, M. D. Wang, *Nature Protocols* **2007**, *2*, 1152-1165.
- [128] I. L. Medintz, H. T. Uyeda, R. E. Goldman, H. Mattoussi, *Nature Mater.* **2005**, *4*, 435-446.
- [129] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science* **1998**, *281*, 2013-2016.
- [130] A. M. Smith, X. Gao, S. Nie, *Photochem. Photobiol.* **2004**, *80*, 377-385.
- [131] H. Kobayashi, Y. Hama, Y. Koyama, T. Barrett, C. A. S. Regino, Y. Urano, P. L. Choyke, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1711-1716.
- [132] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *110*, 4128-4158.
- [133] W. C. W. Chan, D. J. Maxwell, X. Gao, R. E. Bailey, M. Han, S. Nie, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 40-46.
- [134] M. Han, X. Gao, J. Z. Su, S. Nie, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 631-635.
- [135] W. J. Parak, R. Bodreau, M. Le Gros, D. Gerion, D. Zanchet, C. M. Micheel, S. C. Williams, A. P. Alivisatos, C. Larabell, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 882-886.
- [136] H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell, *Molecular Cell Biology* **1995**, 3rd edn. Scientific American, New York.
- [137] L. M. Prescott, J. P. Harley, D. A. Klein, C. -M. Bacq-Calberg, J. Dusart, *Microbiology* **2002**, 3rd edn.
- [138] J. A. Kloepfer, R. E. Mielke, J. L. Nadeau, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 2548-2557.
- [139] J. A. Kloepfer, R. E. Mielke, M. S. Wong, K. H. Nealson, G. Stucky, J. L. Nadeau, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 4205-4213.

- [140] S. Dwarakanath, J. G. Bruno, A. Shastry, T. Phillips, A. John, A. Kumar, L. D. Staphenson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, 325, 739-743.
- [141] L. Wenhua, X. Haiyan, X. Zhixiong, L. Zhexue, O. Jianhong, C. Xiangdong, S. Ping, *J. Biochem. Biophys. Methods.* **2004**, 58, 59-66.
- [142] Y. Liju, L. Yanbin, *Analyst.* **2006**, 131, 394-401.
- [143] R. Schneider, C. Wolpert, H. Guilloteau, L. Balan, J. Lambert, C. Merlin, *Nanotechnology* **2009**, 20, 225101.
- [144] R. -O. Moussodia, L. Balan, C. Merlin, C. Mustin, R. Schneider, *J. Mater. Chem.* **2010**, 20, 1147-1155.
- [145] X. -L. Su, Y. Li, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 4806-4810.
- [146] M. A. Hahn, J. S. Tabb, T. D. Krauss, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 4861-4869.
- [147] F. C. Dudak, I. H. Boyaci, *J. Rapid Meth. Aut. Mic.* **2008**, 16, 122-131.
- [148] N. I. Chalmers, R. J. Palmer, Jr, L. Du-Thumm, R. Sullivan, W. Shi, P. E. Kolenbrander, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, 73, 630-636.
- [149] N. I. Chalmers, R. J. Palmer, Jr, J. O. Cisar, P. E. Kolenbrander, *J. Bacteriol.* **2008**, 190, 8145-8154.
- [150] M. E. Davey, *J. Bacteriol.* **2008**, 190, 7869-7870.
- [151] J. Lee, I. S. Kim, H. -W. Yu, *Anal. Chem.* **2010**, 82, 2836-2843.
- [152] J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. De Beer, D. Caldwell, D. Korber, G. James, *J. Bacteriol.* **1994**, 176, 2137-2142.
- [153] P. Stoodley, Z. Lewandowski, J. D. Boyle, H. M. Lappin-Scott, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, 57, 536-544.
- [154] C. E. Zobell, *J. Bacteriol.* **1943**, 46, 39-56.
- [155] J. W. Costerton, G. G. Geesey, K. -J. Cheng, *Sci. Am.* **1978**, 238, 86-95.
- [156] J. W. Costerton, K. J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, N. C. Nickel, M. Dosgupton, I. J. Marine, *Annu. Rev. Microbiol.* **1987**, 41, 4635-4641.
- [157] J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, H. M. Lappin-Scott, *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, 49, 711-745.
- [158] W. G. Characklis, K. C. Marshall, *Biofilms*. John Wiley & Sons, New York, N.Y. **1990**, 3-15.
- [159] A. -M. Pais-Correia, M. Sachse, S. Guadagnini, V. Robbiati, R. Lasserre, A. Gessain, O. Gout, A. Alcover, M-I. Thoulouze, *Nature Med.* **2009**, 16, 83-89.
- [160] K. Sauer, A. K. Camper, G. D. Ehrlich, J. W. Costerton, D. G. Davies, *J. Bacteriol.* **2002**, 184, 1140-1154.

- [161] D. Haras, *Matériaux & Technique* **2005**, 93, 27-41.
- [162] P. Williams, *Microbiology* **2007**, 153, 3923-3938.
- [163] J. W. Costerton, H. M. Lappin-Scott, **1995**. *Introduction to microbial biofilms*, p. 1-11. In H. M. Lappin-Scott and J. W. Costerton (ed.), *Microbial biofilms*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- [164] D. G. Davies, G. G. Geesey, *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, 61, 860-867.
- [165] G. M. Wolfaardt, J. R. Lawrence, R. D. Roberts, D. E. Caldwell, *Microb. Ecol.* **1998**, 35, 213-223.
- [166] B. E. Christensen, W. G. Characklis, *Physical and chemical properties of biofilms*, S. John Wiley & Sons, New York. **1990**, 93-130.
- [167] P. H. Nielsen, B. Frølund, K. Keiding, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, 44, 823-830.
- [168] P. Lacroix-Gueu, R. Briandet, S. Lecart, S. Lévêque-Fort, M.-N. Bellon-Fontaine, M.-P. Fontaine-Aupart, *C. R. Biologies.* **2005**, 328, 1065-1072.
- [169] R. M. Donlan, *ASAIO. J.* **2000**, 46, S47-S52.
- [170] P. S. Stewart, *J. Bacteriol.* **2003**, 185, 1485-1491.
- [171] S. Reese, B. Guggenheim, *Res. Techn.* **2007**, 70, 816-822.
- [172] I. W. Sutherland, *Microbiology* **2001**, 147, 3-9.
- [173] C. Mayer, R. Moritz, C. Kirschner, W. Borchard, R. Maibaum, J. Wingender, H. -C. Flemming, *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, 26, 3-16.
- [174] H. -C. Flemming, J. Wingender, *Nature Rev. Microbiol.* **2010**. 8, 623-633.
- [175] H. Liu, H. H. P. Fang, *J. Biotechnol.* **2002**, 95, 249-256.
- [176] M. F. Dignac, V. Urbain, D. Rybacki, A. Bruchet, D. Snidaro, P. Scribe, *Water. Sci. Technol.* **1998**, 38, 45-53.
- [177] X. Zhang, P. L. Bishop, B. K. Kinkle, *Water Sci. Technol.* **1999**, 39, 211-218.
- [178] H. H. P. Fang, X. S. Jia, *Biotechnol. Tech.* **1996**, 10, 803-808.
- [179] M. Rätto, R. Verhoef, M. L. Suihko, A. Blanco, H. A. Schols, A. G. J. Voragen, R. Wilting, M. Siika-Aho, J. Buchert, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 33, 359-367.
- [180] B. O. Ortega-Morales, J. L. Santiago-Garcia, M. J. Chan-Bacab, X. Moppert, E. Miranda-Tello, M. L. Fardeau, J. C. Carrero, P. Bartolo-Pérez, A. Valadéz-Gonzalez, J. Guezennec, *J. Appl. Microbiol.* **2007**, 102, 254-264.
- [181] P. Saravanan, S. Jayachandran, *Lett. Appl. Microbiol.* **2008**, 46, 1-6.
- [182] K. Myszka, K. Czaczyk, *Curr. Microbiol.* **2009**, 58, 541-546.
- [183] S. Meisen, J. Wingender, U. Telgheder, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, 993-1002.

- [184] L. Leone, J. Lorine, S. Sjöberg, P. Persson, A. Shchukarev, *Surf. Interface Anal.* **2006**, *23*, 202-205.
- [185] P. Cescutti, R. Toffanin, P. Pollesello, I. W. Sutherland, *Carbohydr. Res.* **1999**, *315*, 159-168.
- [186] D. Lattner, H. C. Flemming, C. Mayer, *Int. J. Biol. Macromol.* **2003**, *33*, 81-88.
- [187] J. Schmitt, D. Nivens, D. C. White, H. C. Flemming, *Water Sci. Technol.* **1995**, *32*, 149-155.
- [188] D. E. Nivens, R. J. Palmer, D. C. White, *J. Induct. Microbiol.* **1995**, *15*, 263-276.
- [189] N. P. Iveleva, M. Wanger, H. Horn, R. Niessner, C. Haisch, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 197-206.
- [190] D. Zhang, J. Wang, X. Pan. *J. Hazard. Mater. B* **2006**, *138*, 589-593.
- [191] H. C. Jones, I. L. Roth, W. M. Sanders, *J. Bacteriol.* **1969**, *99*, 316-325.
- [192] I. Raad, W. Costerton, U. Sabharwal, M. Sacilowski, W. Anaissie, G. P. Bodey, *J. Infect. Dis.* **1993**, *168*, 400-407.
- [193] D. Stickler, N. Morris, M.-C. Moreno, N. Sabbuba, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1998**, *17*, 649-652.
- [194] D. J. P. Ferguson, A. A. McColm, D. M. Ryan, and P. Acred, *Br. J. Exp. Pathol.* **1986**, *67*, 679-686.
- [195] J. C. Nickel, J. W. Costerton, *J. Urol.* **1992**, *147*, 398-401.
- [196] J. Gamby, A. Pailleret, C. B. Clodic, C. -M. Pradier, B. Tribollet, *Electrochim. Acta.* **2008**, *54*, 66-73.
- [197] R. J. Emerson, T. A. Camesano, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 6012-6022.
- [198] F. Ahimou, F. A. Denis, A. Touhami, Y. F. Dufrêne, *Langmuir* **2002**, *18*, 9937-9941.
- [199] F. Ahimou, M. J. Semmens, P. J. Novak, G. Haugstad, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 2897-2904.
- [200] P. Lal, D. Sharma, P. Pruthi, V. Pruthi, *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *109*, 128-136.
- [201] D. E. Caldwell, D. R. Korber, J. R. Lawrence, *Adv. Microb. Ecol.* **1992**, *12*, 1-67.
- [202] J. R. Lawrence, D. R. Korber, B. D. Hoyle, J. W. Costerton, D. E. Caldwell, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 6558-6567.
- [203] A. R. Johnsen, M. Hausner, A. Schnell, S. Wuertz, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 3487-3491.
- [204] M. Strathmann, J. Wingender, H. C. Flemming, *J. Microbiol. Methods* **2002**, *50*, 237-248.
- [205] O. Nosyk, E. T. Haseborg, U. Metzger, F. H. Frimmel, *J. Microbiol. Methods* **2008**, *75*, 449-456.

- [206] J. S. Maclean, G. E. Pinchuk, O. V. Geydebrekht, C. L. Bilskis, B. A. Zakrajsek, E. A. Hill, D. A. Saffarini, M. F. Romine, Y. A. Gorby, J. K. Fredrickson, A. S. Beliaev, *Environ. Microbiol.* **2008**, *10*, 1861-1876.
- [207] J. R. Lawrence, T. R. Neu, G. D. W. Swerhone, *J. Microbiol. Methods* **1998**, *32*, 253-261.
- [208] L. M. Joubert, G. M. Wolfaardt, A. Botha, *Microb. Ecol.* **2006**, *52*, 187-197.
- [209] J. R. Lawrence, B. Scharf, G. Packroff, T. R. Neu, *Microb. Ecol.* **2002**, *43*, 199-207.
- [210] T. K. Teal, D. P. Lies, B. J. Wold, D. K. Newman, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 7324-7330.
- [211] K. M. Thormann, R. M. Saville, S. Shukla, D. A. Pelletier, A. M. Spormann, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 8096-8104.
- [212] R. Palmgren, P. H. Nielsen, *Water Sci. Technol.* **1996**, *34*, 233-240.
- [213] M. Allesen-Holm, K. B. Barken, L. Yang, M. Klausen, J. S. Webb, S. Kjelleberg, S. Molin, M. Givskov, T. Tolker-Nielsen, *Mol. Microbiol.* **2006**, *59*, 1114-1128.
- [214] U. Bockelmann, A. Janke, R. Kuhn, T. R. Neu, J. Wecke, J. R. Lawrence, U. Szewzyk, *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *262*, 31-38.
- [215] G. Miquelard-Garnier, C. Creton, D. Hourdet, *Macromol. Symp.* **2007**, *256*, 189-194.
- [216] H. Kuo, C. Chan, L. Burrows, M. Deber, *Chem. Biol. Drug. Des.* **2007**, *69*, 405-412.
- [217] C. Chan, L. L. Burrows, C. M. Deber, *J. Peptides. Res.* **2005**, *65*, 343-351.
- [218] X. Pan, L. Liu, D. Zhang, *Colloids Surf. B* **2010**, *80*, 103-106.
- [219] X. Pan, L. Liu, D. Zhang, X. Chen, W. Song, F. Wu, *J. Colloid Interf. Sci.* **2010**, *345*, 442-447.
- [220] R. H. Perry, C. H. Chilton, *Chemical engineers' handbook*, 5th ed. McGraw-Hill Book Co., New York, N. Y.
- [221] D. Beer, D. R. Srinivasan, P. S. Stewart, *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 4339-4344.
- [222] P. S. Stewart, J. Rayner, F. Roe, W. M. Rees, *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *91*, 525-532.
- [223] S. J. Klaine, P. J. J. Alvarez, G. E. Batley, T. F. Frenandes, R. D. Handy, D. Y. Lyon, S. Mahendra, M. J. McLaughlin, J. R. Lead, *Environ. Toxicol. Chem.* **2008**, *27*, 1825-1851.
- [224] M. R. Weisner, J. -Y. Bottero, *Environmental Nanotechnology*, The McGraw-Hill Company., New York, **2007**, p540.
- [225] N. Tufenkji, M. Elimelech, *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 529-536.
- [226] M. Auffan, J. Rose, J. -Y. Bottero, G. V. Lowry, J. -P. Jolivet, M. R. Wiesner, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 634-641.
- [227] A. R. Petosa, D. P. Jaisi, I. R. Quevedo, M. Elimelech, N. Tufenkji, *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 6532-6549.

- [228] S. A. Rani, B. Pitts, P. S. Stewart, *Antimicro. Agents Chemother.* **2005**, 49, 728-732.
- [229] C. K. Hope, M. Wilson, *Antimicro. Agents Chemother.* **2004**, 48, 1461-1468.
- [230] J. D. Breyer, F. Drummond, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, 60, 462-473.
- [231] J. R. Lawrence, G. W. Wolfaardt, D. R. Korber. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, 60, 1166-1173.
- [232] S. Seiffert, W. Oppermann, *J. Microscopy.* **2005**, 220, 20-30.
- [230] F. Waharte, K. Steenkeste, R. Briandet, M. -P. Fontaine-aupart, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, 76, 5860-5869.
- [234] E. Guiot, P. Georges, A. Brun, M. P. Fontaine-Aupart, M. N. Bellon-Fontaine, R. Briandet, *Photochem. Photobiol.* **2002**, 75, 570-578.
- [235] J. M. Vroom, K. J. De Grauw, H. C. Gerritsen, D. J. Bradshaw, P. D. Marsh, G. K. Watson, J. J. Birmingham, C. Allison, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 65, 3502-3511.
- [236] P. Walczysko, U. Kuhlicke, S. Knappe, C. Cordes, T. R Neu. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, 74, 294-299.
- [237] R. Briandet, P. Lacroix-Gueu, M. Renault, S. Lecart, T. Meylheuc, E. Bidnenko, K. Steenkests, M.-N. Bellon-Fontaine, M.-P. Fontaine-Aupart, *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, 74, 2135-2143.

Chapitre II

Influence de la structure du ligand thioacide sur la croissance et les propriétés photophysiques des quantum dots CdTe et CdSe

II.1. Introduction

Dans ce chapitre, nous allons détailler nos premières synthèses de QDs à caractère amphiphile, nanocristaux que nous souhaitons utiliser pour le marquage de l'espace extracellulaire polymérique (EPS) de biofilms bactériens.

Nous avons débuté cette étude par la synthèse par voie organométallique de QDs lipophiles cœur/coquille CdSe/ZnS stabilisés par l'oxyde de tri-*n*-octylphosphine (TOPO) et l'hexadécylamine (HDA). L'utilisation de ces QDs pour des bio-applications nécessite un échange du ligand à leur surface. Cet échange a été réalisé avec l'acide 11-mercaptoundécanoïque (MUA) afin de conférer un caractère amphiphile aux QDs CdSe/ZnS.

En parallèle, nous avons réalisé la synthèse de QDs CdTe et CdSe stabilisés par différents thioacides (MUA, acide 6-mercaptohexanoïque, MHA, et acide 3-mercaptopropionique, MPA) par voie hydrothermale pour préparer des QDs amphiphiles (ligand = MHA ou MUA) ou hydrophiles (ligand = MPA).

II.2. Synthèse des QDs cœur/coquille CdSe/ZnS par voie organométallique et échange de ligand avec l'acide 11-mercaptoundécanoïque

Nous avons tout d'abord synthétisé des QDs cœur/coquille CdSe/ZnS selon les méthodes décrites par Breus *et al.* et Mulder *et al.* respectivement pour la préparation du cœur photoactif CdSe et l'introduction de la coquille ZnS.^{1,2}

La synthèse consiste à mettre en contact un sel de cadmium (CdO) avec l'acide stéarique. Le mélange est chauffé à 190°C jusqu'à obtention d'une solution incolore. Les ligands, oxyde de tri-*n*-octylphosphine (TOPO) et hexadécylamine (HDA), sont alors ajoutés et le milieu réactionnel est chauffé à 280°C. A cette température, une solution de sélénium stabilisé par la tri-*n*-octylphosphine (TOP) est rapidement injectée pour obtenir le cœur photoactif CdSe. La croissance de la coquille ZnS a été réalisée par addition du mélange TOPO, HDA, acide stéarique et stéarate de zinc au milieu réactionnel, suivie de l'injection d'une solution de soufre élémentaire dans l'oleylamine à des températures comprises entre 140 à 220°C.

Les QDs CdSe/ZnS stabilisés par le TOPO et l'HDA ont un diamètre moyen de 3.9 nm, diamètre calculé via l'équation empirique de Yu *et al.*³ L'absorption du premier exciton se situe à 585 nm, l'émission de fluorescence est centrée à 608 nm, et le rendement quantique de fluorescence dans le chloroforme est de 33 % (Figure 1).

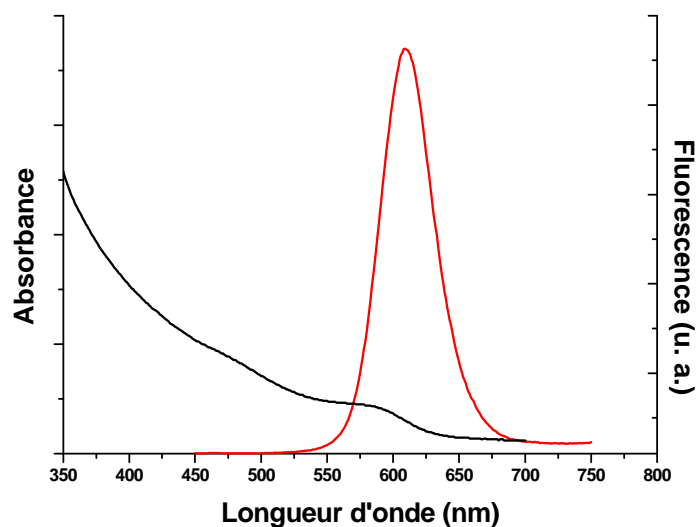


Figure 1. Spectres UV-visible et d'émission de fluorescence des QDs CdSe/ZnS stabilisés par le TOPO et l'HDA dans le chloroforme (excitation à 400 nm).

Les QDs CdSe/ZnS@TOPO obtenus sont hydrophobes. Il est indispensable de réaliser un échange de ligand à la surface de ces nanocristaux afin de les rendre hydrodispensables pour toute application biologique. Un des objectifs de notre projet était de préparer des QDs CdSe/ZnS fonctionnalisés par l'acide 11-mercaptoundécanoïque (MUA), thioacide qui possède à la fois des propriétés hydrophiles (tête polaire carboxylate) et hydrophobes (chaîne alkyle en C₁₀).

Trois méthodes d'échange de ligand à la surface des QDs CdSe/ZnS@TOPO ont été évaluées.

- 1- 50 mg de QDs CdSe/ZnS@TOPO ont été mélangés avec 200 mg de MUA. Le mélange est chauffé pendant 15 h à 70°C. Une fois la réaction terminée, le mélange est dilué dans 5 mL de CHCl₃. Après centrifugation, le culot est récupéré et dispersé dans 5 mL de tampon borate (pH = 9). Cette solution est précipitée à l'éthanol, le culot est récupéré et dispersé dans l'eau à pH neutre. Les QDs obtenus par cette méthode ne sont pas solubles dans l'eau à pH neutre.⁴
- 2- 500 mg de MUA sont ajoutés à 150 mg des QDs CdSe/ZnS@TOPO. Le mélange est chauffé pendant 2 h à 70°C. 5 mL de DMF et 300 mg de *tert*-butoxide de potassium sont alors ajoutés. On additionne alors 5 mL d'eau. Après centrifugation, le surnagant est récupéré et précipité plusieurs fois à l'isopropanol. Les QDs obtenus ne sont que faiblement dispersables dans l'eau à pH neutre.⁵
- 3- Un excès de ligand MUA (100000 équivalent par rapport aux QDs) est mis en contact avec les QDs CdSe/ZnS@TOPO dispersés dans le CHCl₃. Le mélange est chauffé pendant 15 h à

70°C. Après retour à température ambiante, le mélange est centrifugé, le culot est récupéré et lavé trois fois au chloroforme et une fois au méthanol. Le culot est ensuite dispersé dans un tampon borate (pH = 9). Les QDs sont précipités à l’isopropanol et le culot redispersé dans l’eau à pH neutre.⁶ En utilisant le mode opératoire décrit par Algar *et al.* (Figure 2), nous avons réussi à obtenir des QDs CdSe/ZnS@MUA avec des longueurs d’onde d’absorption et émission de fluorescence similaires à celles des QDs CdSe/ZnS stabilisés par le TOPO et l’HDA (585 et 608 nm, respectivement).

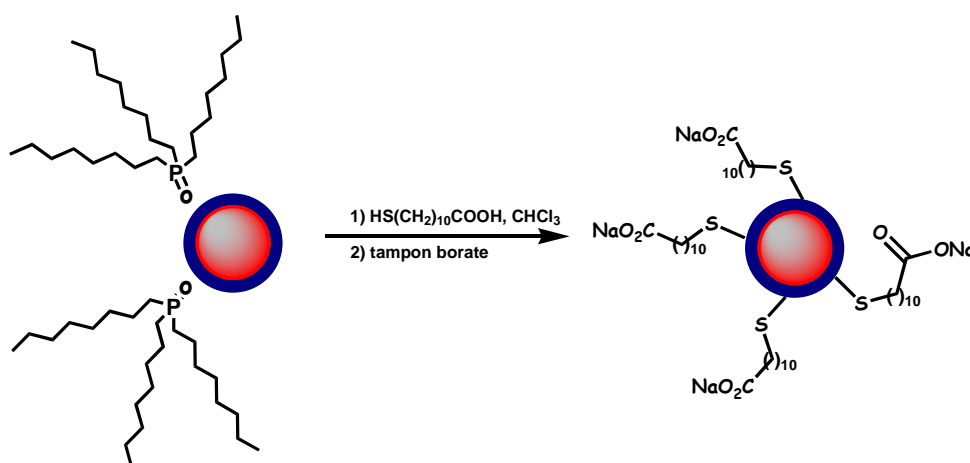


Figure 2. Echange de ligand (TOPO → MUA) à la surface des QDs CdSe/ZnS

Il faut cependant noter que le rendement quantique de fluorescence chute de 33 à 9 % après l’échange de ligand et le transfert du chloroforme à l’eau. Cette diminution du rendement quantique de fluorescence (que l’on peut assimiler à un « Quenching de la Fluorescence », c’est-à-dire à une diminution du rendement quantique de fluorescence en raison des conditions environnementales comme la force ionique, le pH, l’effet du solvant ou la présence d’autres fluorophores qui réduisent l’efficacité de l’émission) a souvent été observée lorsque des QDs lipophiles sont transférés dans un solvant très polaire comme l’eau.¹

II.3. Limitations des QDs CdSe/ZnS@MUA pour les applications biologiques

Les QDs CdSe/ZnS@MUA obtenus par la synthèse organométallique puis échange du ligand ne sont dispersables dans l'eau qu'à pH basique ($\text{pH} \geq 9$) et uniquement partiellement solubles au pH physiologique ($\text{pH} = 7,2$). Au pH physiologique, les QDs CdSe/ZnS@MUA présentent une forte tendance à l'agrégation. Ce phénomène a notamment été observé par microscopie de corrélation de fluorescence (FCS) après excitation biphotonique à 800 nm. La courbe FCS obtenue pour les QDs CdSe/ZnS@MUA a été ajustée et nous a permis de mesurer la constante de diffusion, le temps de diffusion et la taille hydrodynamique des QDs (Figure 3). $g(\tau)$ est la fonction d'autocorrélation pour une diffusion brownienne des molécules et τ_D est le temps de diffusion d'une molécule (le temps moyen mis par une molécule pour traverser latéralement le volume d'excitation).

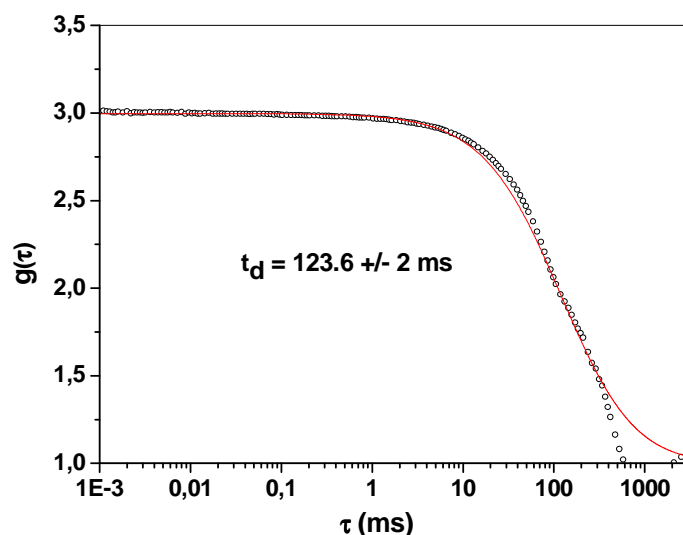


Figure 3. Courbes de corrélation de fluorescence expérimentale (rouge) et théorique (noir) obtenues (sous excitation à deux photons) pour les QDs CdSe/ZnS@MUA (60 nM dans l'eau à pH = 7,2).

Le temps de diffusion τ_d obtenu pour les QDs CdSe/ZnS@MUA est relativement grand ($50 \text{ ms} < \tau_d < 150 \text{ ms}$). Le diamètre hydrodynamique calculé à partir de l'équation de Stokes Einstein pour ces nanocristaux est compris entre 180 et 500 nm, ce qui témoigne de la présence d'agrégats dans les solutions colloïdales. Il convient également de noter qu'après une semaine de stockage en milieu aqueux à 4°C, nous avons observé une chute de l'intensité de fluorescence des QDs CdSe/ZnS@MUA.

Un traitement de la solution colloïdale aux ultrasons pendant 15 min (dissociation des agrégats) permet de retrouver l'intensité de fluorescence initiale des QDs (Figure 4).

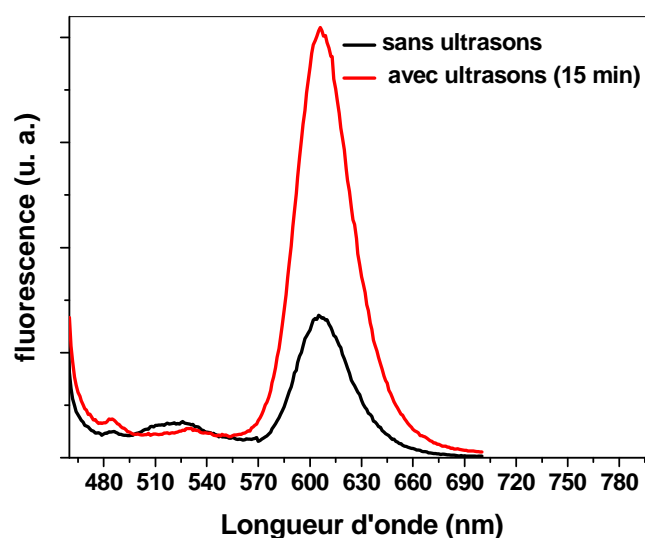


Figure 4. Spectres d'émission de fluorescence des QDs CdSe/ZnS@MUA avant et après traitement aux ultrasons pendant 15 min.

Ces phénomènes d'agrégation ou d'auto-association des QDs CdSe/ZnS@MUA au pH physiologique limitent l'utilisation de ces nanocristaux dans les applications biologiques. Nous n'avons pas cherché à améliorer l'échange de ligand ou d'alternatives à ces QDs et avons choisi de développer des synthèses de QDs amphiphiles directement en milieu aqueux.

II.4. Synthèse des QDs CdSe ou CdTe stabilisés par le MHA et le MUA par voie hydrothermale

En parallèle à la synthèse organométallique présentée ci-dessus, des QDs à cœur CdSe ou CdTe stabilisés par des thioacides à caractère amphiphile tels que l'acide 6-mercaptophexanoïque (MHA) et l'acide 11-mercaptoundecanoïque (MUA) ont été préparés selon la méthode hydrothermale développée par Gaponik *et al.*⁷

La littérature ne décrit que des synthèses de QDs CdSe ou CdTe stabilisés par de petits thioacides comme l'acide thioglycolique (TGA) ou l'acide 3-mercaptopropionique (MPA).⁸ Avec ces deux ligands, les QDs obtenus possèdent généralement de bonnes propriétés photophysiques et le contrôle de la croissance des nanocristaux est aisé (Figure 5).

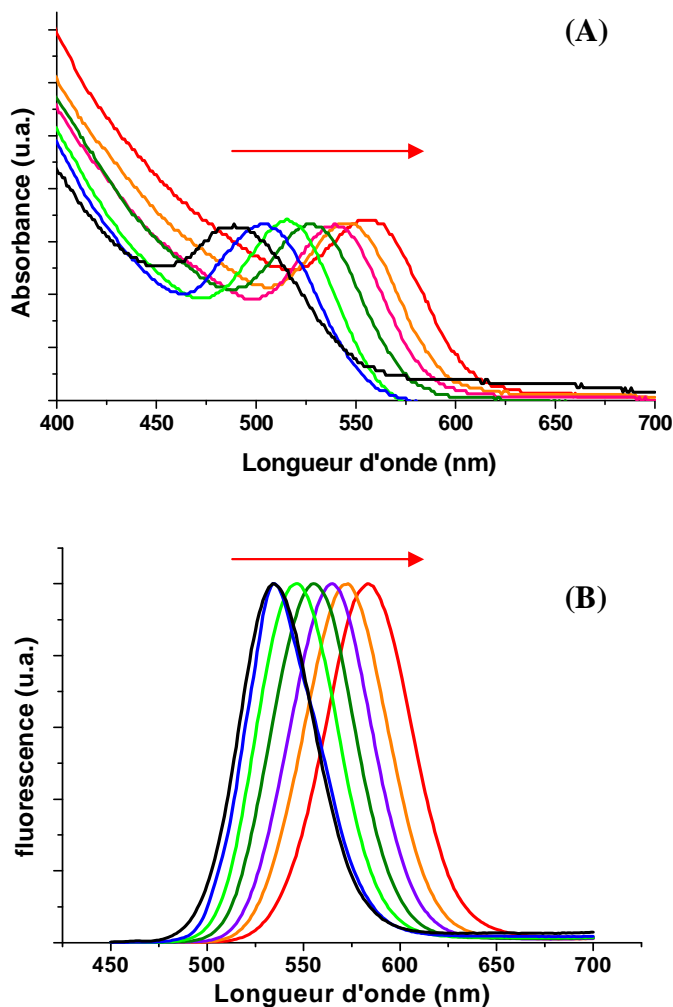


Figure 6. Evolution des spectres UV-visible (A) et d'émission de fluorescence (B) lors de la synthèse par voie hydrothermale de QDs CdTe@MPA.

Il convient de signaler que les bons rendements quantiques de fluorescence (généralement entre 10 et 20 %) des QDs stabilisés par le TGA ou le MPA trouvent notamment leur origine dans :

- le « colmatage des défauts » de surface par adsorption des complexes Cd^{2+} /thiol excédentaires à la surface des QDs CdSe ou CdTe.⁹
- la dégradation thermique du ligand lors du chauffage sous pression en milieu aqueux. Le ligand se décompose, génère des ions sulfure S^{2-} qui s'associent aux ions Cd^{2+} libres pour former une coquille de CdS à la surface des QDs CdSe ou CdTe. Cette coquille permet de corriger les défauts de surface.¹⁰ Les QDs cœur/coquille CdSe/CdS ou CdTe/CdS obtenus ont également une émission de fluorescence décalée vers le rouge en raison de la diminution

de confinement quantique et de la délocalisation de la paire électron-trou dans la coquille CdS (QDs de type I).¹¹

Jusqu'en 2008, aucune étude n'avait été réalisée sur la synthèse par voie hydrothermale de QDs à cœur CdTe ou CdSe stabilisés par des thioacides à longue chaîne alkyle. La suite de ce chapitre décrit les résultats obtenus lors de ce type de synthèse. Nous avons notamment évalué l'impact de la longueur de la chaîne alkyle séparant les fonctions thiol et carboxylate sur la croissance et les propriétés photophysiques des quantum dots préparés.

Bibliographie

- [1] V. V. Breus, C. D. Heyes, G. U. Nienhaus, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 18589-18594.
- [2] W. J. M. Mulder, R. Koole, R. J. Brandwijk, *Nano.Lett.* **2006**, *6*, 1-6.
- [3] W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2854-2860.
- [4] K. Susumu, H. Tetsuo Uyeda, I. L. Medintz, T. Pons, J. B. Delehanty, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13987-13996.
- [5] H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec, M. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *122*, 12142-12150.
- [6] W. R. Algar, U. J. Krull, *Chem. Phys. Chem.* **2007**, *8*, 561-568.
- [7] N. Gaponik, D. V. Talapin, L. Rogach, K. Hoppe, E. V. Shevchenko, A. Kornowski, A. Eychmuller, H. Weller, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 7177-7185.
- [8] J. Guo, W. Yang, C. Wang, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 17467-17473.
- [9] L. Zou, Z. Gu, N. Zhang, Y. Zhang, Z. Fang, W. Zhu, X. Zhong, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 2807-2815.
- [10] W. Mao, J. Guo, W. Yang, C. Wang, J. He, J. Chen, *Nanotechnology* **2007**, *18*, 485611.
- [11] Q. Zeng, X. Kong, Y. Sun, Y. Zhang, L. Tu, J. Zhao, H. Zhang, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 8587-8593.

II.5. The influence of the capping thioalkyl acid on the growth and photoluminescence efficiency of CdTe and CdSe quantum dots

The influence of capping thioalkyl acid on the growth and photoluminescence efficiency of CdTe and CdSe quantum dots

Fadi Aldeek^{1,2}, Lavinia Balan³, Jacques Lambert¹ and Raphaël Schneider^{2,4}

¹ Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, Nancy-University, CNRS, 405, rue de Vandoeuvre, 54600 Villers-lès-Nancy, France

² Département de Chimie Physique des Réactions, Nancy-University, CNRS, 1, rue Grandville, BP 20451, 54001 Nancy Cedex, France

³ Département de Photochimie Générale, UMR CNRS 7525, Université de Haute Alsace, ENSCMu, 3 rue Alfred Werner, 68093 Mulhouse, France

E-mail: raphael.schneider@pharma.uhp-nancy.fr

Received 11 July 2008, in final form 11 September 2008

Published 29 October 2008

Online at stacks.iop.org/Nano/19/475401

Abstract

The influence of thioalkyl acid ligand was evaluated during aqueous synthesis at 100 °C and under hydrothermal conditions (150 °C) of CdTe and CdSe quantum dots (QDs). Experiments performed with 3-mercaptopropionic acid (MPA), 6-mercaptophexanoic acid (MHA) and 11-mercaptoundecanoic acid (MUA) demonstrated that the use of MHA and MUA allowed for the preparation of very small nanoparticles (0.6–2.5 nm) in carrying out the reaction under atmospheric pressure or in an autoclave and that the photophysical properties of QDs were dependent on the ligand and on the synthesis conditions. The influence of various experimental conditions, including the Te-to-Cd ratio, temperature, and precursor concentration, on the growth rate of CdTe or CdSe QDs has been systematically investigated. The fluorescence intensities of CdTe QDs capped with MPA, MHA, or MUA versus pH were also found to be related to the surface coverage of the nanoparticles.

 Supplementary data are available from stacks.iop.org/Nano/19/475401

1. 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 symmetric 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 diode (LED) display applications [3], photovoltaic applications [4–6], and biomedical imaging applications [7, 8].

The most conventional QD synthesis routes use pyrolysis of often hazardous organometallic precursors in high boiling

point organic solvents such as tri-*n*-octylphosphine/tri-*n*-octylphosphine oxide (TOP/TOPO) [9–11]. These nanocrystals are generally capped with hydrophobic ligands and cannot be directly used in bioapplications. Special challenges are faced to design and fabricate water-soluble QDs for biological labeling. Several strategies (use of thiol stabilizer, incorporation into polymer, etc) have been developed to transfer hydrophobic QDs to the aqueous phase. Although these methods are efficient, they require additional steps. Moreover, the PL quantum yield (QY) of the QDs often decreases when they are transferred into water due to the high polarity of this solvent.

Aqueous synthesis is an alternative strategy to directly prepare water-dispersed QDs. In addition, this method is cheaper, simpler and less toxic. In recent years, methods of preparing luminescent QDs in the aqueous phase have

⁴ Author to whom any correspondence should be addressed.

been significantly improved. Nanocrystals such as CdS [12], CdSe [13–15], CdTe [16, 17], ZnS [18], ZnSe [19, 20], and HgTe [21] with good PL QY have been prepared in the presence of thioalkyl acids (generally thioglycolic acid (TGA) or 3-mercaptopropionic acid (MPA)) either by heating at 100 °C, by the hydrothermal method, or by microwave-assisted synthesis [20, 22]. The thiol moiety binds to the QD surface and, at the basic pH used for the synthesis, the carboxylic acid is deprotonated into carboxylate which renders the QD water soluble. Electrostatic repulsions keep thioalkyl carboxylate-capped QDs dispersed in aqueous solution. Although the surface chemistry of thioalkyl carboxylate-stabilized QDs provides for neither the more luminescent nor for the most stable QDs, these easy to prepare water-soluble QDs with only one layer of capping ligand at their surface are widely used as biolabels in imaging and detection.

Small thioalkyl acids like TGA and MPA are the most commonly used ligands for the preparation of CdSe and CdTe QDs in aqueous solution [13–15, 23, 24]. Indeed, the reaction between Cd²⁺ and TGA or MPA to form soluble monothio or dithio complexes is easy at pH > 7. Once the QDs have 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 [24–26]. 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 nanoparticle [27]. TGA can also produce sulfide ions by photodegradation [28, 29]. 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 [27, 29].

In this work, we have investigated the growth of CdSe and CdTe QDs during their aqueous synthesis using different water-soluble thioalkyl acids (MPA, 6-mercaptopentanoic acid (MHA) and 11-mercaptoundecanoic acid (MUA), which are the best ligands reported for biological labeling using CdSe/ZnS QDs [30]), with the goal of preparing QDs with various surface hydrophobic properties and of studying biomolecular interactions at the cellular environment. The effect of the capping ligand on the QY of the QDs was studied. It was demonstrated that the particle growth is directly related to the structure of the capping ligand and that very small particles are produced using thioalkyl acids bearing hydrophobic alkyl chains like MHA or MUA regardless of the reaction conditions. The results obtained show that the size of the thiol compound plays an important role in determining the optical properties and stability of the QDs.

2. Experimental details

2.1. Materials

Tellurium powder (99.8%), selenium powder (99.5%), CdCl₂·2.5H₂O (99%), NaBH₄ (96%), 3-mercaptopropionic acid (MPA, 99+%), 11-mercaptoundecanoic acid (MUA, 95%), and Rhodamine 6G (99%) were purchased from Aldrich and used as received. *iso*-propanol (*i*-PrOH) was purchased

from Carlo-Erba and used as received. Ultrapure water was used as a solvent. All reactions were conducted in a three-neck flask under flowing nitrogen gas. The 6-mercaptopentanoic acid (MHA) was prepared from ϵ -caprolactone and thiourea according to the procedure described by Chevelot *et al* [31].

2.2. Synthesis

Preparation of sodium hydrogen telluride. The NaHTe solution was prepared using a synthetic route reported earlier [28], with some modifications. Briefly, 500 mg (13.2 mmol) of sodium borohydride was added to a small flask cooled with ice containing 10 ml of ultrapure water under a dry N₂ atmosphere. 640 mg (5 mmol) of tellurium powder was then added and a small outlet was connected to the flask to discharge the hydrogen pressure. After 8 h at 4 °C, the black tellurium powder disappeared and white tetraborate precipitates appeared at the bottom of the flask. The pink aqueous solution obtained was separated and immediately used for the preparation of CdTe QDs. The concentration of NaHTe was 0.5 M.

Preparation of sodium hydrogen selenide. The preparation of NaHSe was performed according to Klayman *et al* [32], with some modifications. 76 mg (2.009 mmol) of sodium borohydride was added to a small flask cooled with ice containing 1 ml of ultrapure water under a N₂ atmosphere. 79 mg (1.004 mmol) of selenium powder was then added and a small outlet was connected to the flask to discharge the hydrogen pressure. After 3 h at 4 °C, the black selenium powder disappeared and a clear NaHSe solution was obtained. This solution was diluted with 20 ml of N₂-degassed water under nitrogen for the preparation of CdSe QDs. The typical concentration of NaHSe was 0.05 M.

Synthesis of CdTe and CdSe nanocrystals. A series of aqueous colloidal CdTe or CdSe solutions was prepared by the reaction of Cd²⁺ with NaHTe or NaHSe at pH = 11.2 using thioacids as stabilizers following the method described elsewhere [15, 28], with some modifications. CdCl₂·2.5H₂O ([Cd²⁺] = 1.25, 5.0, 10.9 or 26.0 mM) and the thiol stabilizer were dissolved in 100 ml of N₂-saturated ultrapure water followed by adjustment of the pH to 11.2 by addition of 1 M NaOH solution. The typical molar ratio of Cd²⁺/NaHTe (or NaHSe)/HS-(CH₂)_n-COOH used in our experiments was 2/1/4.8. The mixture was further deaerated by N₂ bubbling for 30 min. Then, the NaHTe (or NaHSe) solution was quickly injected into the mixture under vigorous stirring. The mixture was either refluxed at 100 °C for 15 h or put into a Teflon-lined stainless steel autoclave and heated at 150 °C for 1 h. The different sized CdTe (or CdSe) nanocrystals were isolated by precipitation with *i*-PrOH followed by centrifugation (4000 rpm for 15 min).

2.3. Characterization

All the optical measurements were performed at room temperature (20 ± 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 QY values were determined from the equation $QY(\text{sample}) = (F_{\text{sample}}/F_{\text{ref}})(A_{\text{ref}}/A_{\text{sample}})(n_{\text{sample}}^2/n_{\text{ref}}^2)QY(\text{ref})$, where F , A , and n are the measured fluorescence (area under the emission peak), the absorbance at the excitation wavelength, and the refractive index of the solvent, respectively. PL spectra were spectrally corrected and quantum yields were determined relative to Rhodamine 6G in ethanol (QY = 95%) [33].

To determine the morphology and the diameters of the nanoparticles, the samples were analyzed *ex situ* by atomic force microscopy (AFM) and by transmission electron microscopy (TEM). AFM characterization was carried out using a Digital Instruments Nanoscope III. AFM measurements were done by tapping mode using a Si₃N₄ tip with the resonance frequency and spring constant being 100 kHz and 0.6 N m⁻¹, respectively, to provide surface topography. TEM images were taken by placing a drop of the particles in water onto a carbon film supported copper grid. Samples were studied using a Philips CM20 instrument with a LaB₆ cathode operating at 200 kV. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) measurements were performed at a residual pressure of 10⁻⁹ mbar, using a KRATOS Axis Ultra electron energy analyser operating with an Al K α monochromatic source.

The diameters of CdTe and CdSe nanocrystals were determined by measuring their optical absorption spectra, as their molar extinction coefficient is known from the literature [34], and further confirmed by AFM and TEM. The full width at half maximum (fwhm) of the first exciton peak, 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.

3. Results and discussion

CdTe QDs were prepared by adding an oxygen-free NaHTe solution to a nitrogen-saturated CdCl₂-thioalkyl acid aqueous solution at pH = 11.2. Although the best QYs for CdTe@MPA QDs were obtained using a pH value close to 8.0 during the nanocrystal growth [35], the synthesis could not be performed at this pH value with MHA and MUA due to the poor solubility of these acids in aqueous media. Cd²⁺-MHA and Cd²⁺-MUA monomers were prepared by adding MHA and MUA dissolved in 1 N NaOH to CdCl₂ in water followed by adjustment to pH = 11.2. An attempt was also made with 16-mercaptohexadecanoic acid. However, due to its hydrophobic alkyl chain, this acid failed to give water-soluble monomers, even at high pH. The precursor ratio of CdCl₂/NaHTe/mercaptoalkyl acid in all experiments was fixed at 2/1/4.8, having in mind the possibility of obtaining CdTe analogues of Cd₁₇S₄(SR)₂₆ and C₃₂S₁₄(SR)₃₆ [36]. It is worth nothing that 1:1 complexes of Cd²⁺ and MHA or MUA are not soluble in water at neutral or basic pH. With

these two acids, all attempts to increase the reactivity of the monomers by lowering the concentration of the ligand failed. After the freshly prepared NaHTe solution was injected into the Cd²⁺-thioalkyl acid monomer, the resulting yellow mixture was subjected to refluxing to grow the CdTe nanocrystals. Using the optimal concentration reported by Li *et al* [35], [Cd²⁺] = 1.25 mM, afforded CdTe@MPA nanocrystals with the excitonic peak at 546 nm. After size-selective precipitation with *i*-PrOH, QDs with PL QY up to 43% were isolated (emission at 571 nm). Using the same reaction conditions, but changing MPA to MHA or MUA, had dramatic effects on the diameters of the nanocrystals produced (see figure S1 available at stacks.iop.org/Nano/19/475401 for typical absorption and PL spectra of MPA-, MHA-, and MUA-capped CdTe QDs after 15 h heating at 100 °C). The temporal evolution of the optical properties monitored by UV-vis spectroscopy indicated that the growth was definitively stopped after 2 h at 100 °C at 466 and 451 nm, respectively, for CdTe@MHA and CdTe@MUA QDs. A decrease of the emission intensity was also noticed, which was accompanied by a considerable blue-shift of the emission maxima, respectively, 520 (QY = 4%) and 517 nm (QY = 1%) for CdTe@MHA and CdTe@MUA QDs. During the growth of the QDs, smaller particles dissolve and become the constituents of larger particles, a process known as Ostwald ripening [37]. The direct consequence of this process is the increase in size distribution, a phenomenon called 'defocusing'. This effect can be observed in the 'flattening' of the excitonic peak of CdTe@MPA QDs as particles increase in diameter during the growth phase. Narrow size distributions obtained with CdTe@MHA and CdTe@MUA are reflected in their sharp excitonic absorption peaks [9]. The fwhm, which is related to the particle size distribution, was calculated from the emission spectrum of each QDs. The fwhms were found to be 72, 50 and 49 nm, respectively, for MPA-, MHA-, and MUA-capped CdTe QDs.

Further attempts were made with higher precursor concentration ([Cd²⁺] = 10.9 mM) while maintaining Cd/Te/thioalkyl acid = 2/1/4.8. Indeed, at high precursor concentration, more nuclei are formed when injecting the NaHTe solution to the Cd²⁺-thioalkyl acid monomers and the excess monomers can easily be consumed to provide the fast growth of CdTe nanocrystals. Our experimental results revealed that this procedure was efficient with the MPA ligand (exciton absorption at 564 nm and emission peak at 608 nm) (figure 1). The absorption spectra of CdTe QDs recorded just after the formation of CdTe precursors indicated that the kinetics of nucleation at room temperature were very close ($\lambda_{\text{abs}} = 438, 445, \text{ and } 447 \text{ nm}$, respectively, for CdTe@MUA, CdTe@MHA and CdTe@MPA QDs) and that the ligands had much more effect on the growth of nanoparticles (see figure S2, available at stacks.iop.org/Nano/19/475401). The optical characteristics of CdTe@MHA and CdTe@MUA QDs were, however, almost the same as those obtained at low monomer concentration (CdTe@MHA: $\lambda_{\text{abs}} = 501 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 533 \text{ nm}$; CdTe@MUA: $\lambda_{\text{abs}} = 448 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 517 \text{ nm}$). Moreover, the rapid consumption of the Cd monomers probably leads to an ineffective passivation of the nanocrystal surface defects and their PL QYs were reduced (respectively, 20, 2, and 1% for

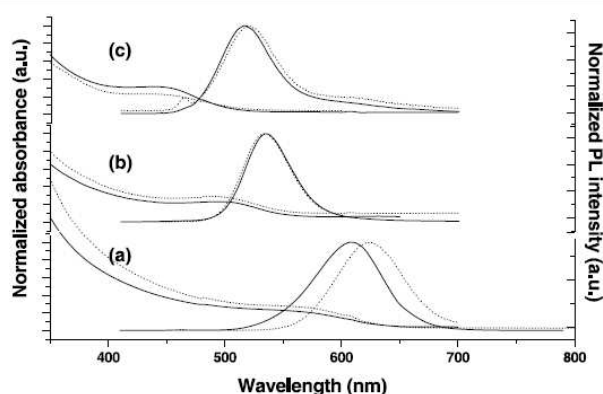


Figure 1. UV-vis absorption and PL spectra of (a) MPA-, (b) MHA-, and (c) MUA-stabilized CdTe QDs prepared at 100 °C for 15 h (solid) or at 150 °C for 1 h (dot) using a Cd²⁺ concentration of 10.9 mM. The PL spectra were recorded with an excitation at 400 nm.

CdTe@MPA, CdTe@MHA, and CdTe@MUA QDs). Typical TEM photographs of the largest QDs obtained after these syntheses and size-selective precipitation using *i*-PrOH as anti-solvent are given in figure 2. AFM photographs are provided in figure S3 (available at stacks.iop.org/Nano/19/475401). CdTe@MPA, CdTe@MHA, and CdTe@MUA QDs appear as spherical nanoparticles with average diameters of, respectively, 3.9±0.7, 2.9±0.6, and 1.1±0.5 nm. The diameters determined using TEM are in good agreement with those calculated from the absorption spectra [34] but are slightly enhanced compared to those determined using AFM heights (respectively, 3.5, 2.5, and 0.6 nm for CdTe@MPA, CdTe@MHA, and CdTe@MUA QDs) because AFM sizing of nanoparticles in air is very sensitive to attractive forces between the tip and the sample [38, 39]. Figure 3(a) shows a photograph of the emission colors under the radiation of an UV lamp of CdTe

QDs prepared and demonstrates the influence of the ligand on nanocrystal growth.

Even at the high concentration in Cd²⁺ (26 mM) recently used by Green *et al* [30], no significant shift in absorption and emission was observed ($\lambda_{\text{abs}} = 454$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 538$ nm, QY = 0.7%, fwhm = 54 nm) after the growth of CdTe@MUA QDs. It is finally worth noting that the use of a low Cd/Te ratio (1/20) as recently reported by Zou *et al* [40] for the ultrafast synthesis of CdTe@MPA QDs afforded no significant growth rate enhancement with the MHA and MUA ligands. A similar influence of ligand length and reactant concentration on the PL intensity and nanocrystal diameter has already been observed during the aqueous synthesis of CdS QDs [41, 42].

The hydrothermal method was also evaluated since high temperature and pressure in the autoclave favor an increase of the growth rate of nanocrystals. On the basis of previous attempts, the initial Cd²⁺ concentration was fixed at 10.9 mM (CdCl₂/NaHTe/thioalkyl acid = 2/1/4.8) and the mixture was heated at 150 °C for 1 h. The growth rate of CdTe@MPA was faster than in the traditional aqueous synthesis performed at 100 °C (figure 1). The excitonic peak shifted to 570 nm and the optical properties of QDs were markedly increased (PL QY = 51%, $\lambda_{\text{em}} = 625$ nm, fwhm = 63 nm), probably due to the partial hydrolysis of MPA and incorporation of sulfur into the growing nanoparticles to yield a kind of core-shell CdTe/CdS@MPA QD [27, 29]. The hydrothermal route had almost no effect on the growth of MHA- and MUA-capped CdTe QDs. After 1 h at 150 °C, the absorptions shifted to 503 and 451 nm (compared to 501 and 448 nm, respectively, when the reaction was conducted at 100 °C) and the emission peak positions were, respectively, at 537 and 522 nm (with fwhm values of about 50 nm). The PL QYs stayed weak (3.0 and 0.8% for CdTe@MHA and CdTe@MUA QDs).

The fluorescence intensity of these QDs versus pH was also evaluated. A solution of 0.1 M HCl was used to

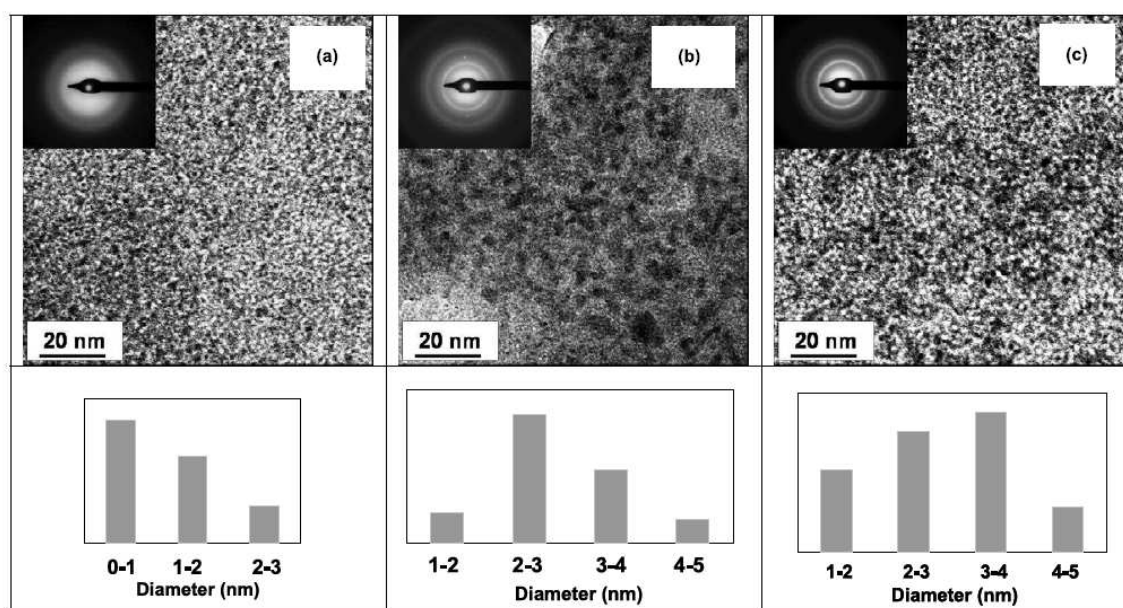


Figure 2. TEM images and electron diffraction patterns of the largest (a) CdTe@MUA, (b) CdTe@MHA, and (c) CdTe@MPA nanoparticles synthesized at 100 °C after size-selective precipitation, and the corresponding particle size distribution.

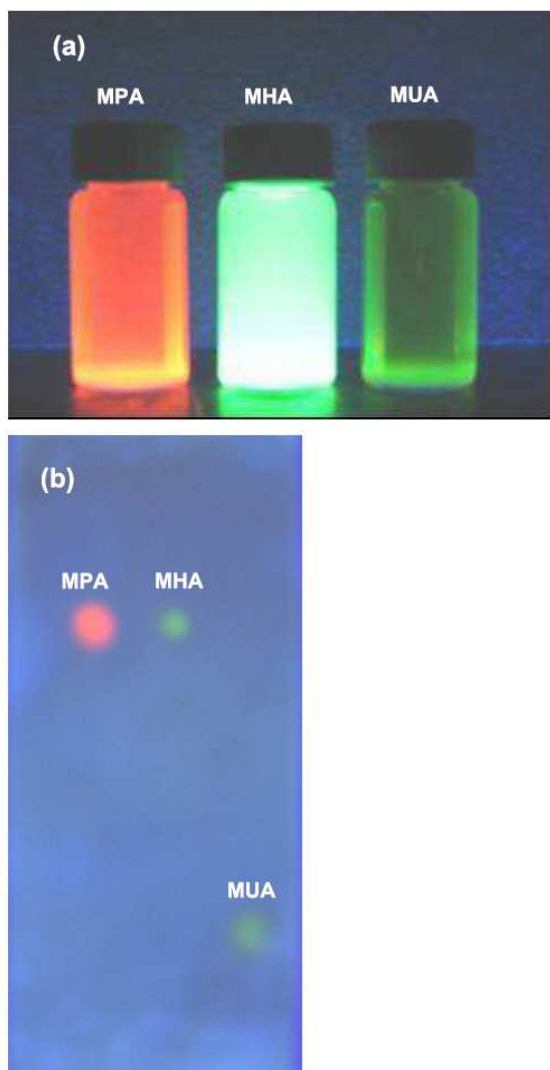


Figure 3. (a) PL images of MUA-, MHA-, and MPA-capped CdTe QDs excited by an ultraviolet lamp, and (b) characterization of MPA-, MHA-, and MUA-capped CdTe QDs by means of gel electrophoresis.

(This figure is in colour only in the electronic version)

decrease the pH of MPA-, MHA-, and MUA-capped QDs after synthesis. In accordance with the report of Zhang *et al* [26], the PL intensity of CdTe@MPA QDs increased gradually when the pH was reduced and reached its maximum at pH = 5.5–6.0. Under pH = 5.0, the QDs became unstable in the acidic aqueous environment; they precipitated and the PL disappeared (figure 4). CdTe@MHA QDs had a similar behavior. The PL intensity gradually increased with the decrease of pH to 6.0 and then decreased drastically. The impact of the pH decrease was completely different with CdTe@MUA QDs. The maximum PL intensity was observed at pH = 9.0–10.0 and a rapid decay of PL was observed when the pH was below 8.0. Since MPA, MHA, and MUA have quite similar pK_{COOH} values (4.3, 4.5, and 4.4, respectively, for MPA, MHA, and MUA), the differences in stability and PL intensity observed by lowering the pH cannot only be explained by the

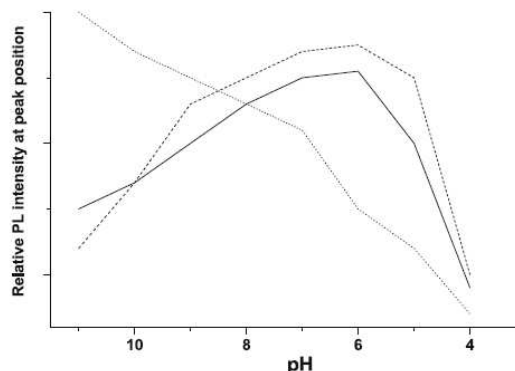


Figure 4. Relative peak fluorescence intensity of CdTe@MPA (solid), CdTe@MHA (dash), and CdTe@MUA (dot) QDs versus pH values.

protonation of carboxylate groups at the periphery of the QDs. In the case of CdTe@MUA QDs, it is likely that Cd^{2+}/MUA monomers which are only soluble in water at pH > 9.0 provide only surface passivation at high pH and that these complexes critically determine the PL of the CdTe nanocrystals. However, the surface coverage in ligand should also be considered. The mobility of MPA-, MHA-, and MUA-capped CdTe QDs was first compared by gel electrophoresis on cellulose acetate in a borate buffer (pH = 9.0). CdTe@MPA and CdTe@MHA QDs migrate quite similarly from the negative pole to the positive pole in the gel electrophoresis run (figure 3(b)). Despite their lower mass, QDs capped with MUA were strongly retarded, indicating that their overall negative charge is weaker than that of CdTe@MPA and CdTe@MHA QDs. This result was confirmed by the elemental composition of CdTe QDs determined by x-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Figure 5 shows the XPS spectra of CdTe@MPA QDs prepared under hydrothermal conditions (see figures S4–S9 (available at stacks.iop.org/Nano/19/475401) for XPS spectra of all QDs prepared). The typical peaks of Cd3d_{5/2} at 405.0 eV, Cd3d_{3/2} at 411.6 eV, Te3d_{5/2} at 572.0 eV, Te3d_{3/2} at 582.4 eV, and S 2p at 162.0 eV appeared in all XPS spectra, confirming the existence of cadmium, tellurium, and sulfur in the QDs. A distinct difference emerged in the C 1s spectra and in the elemental analyses. The C 1s peak at 284.6 eV showed a significant increase varying from MPA to MHA and MUA, which indicated that the C species in CdTe QDs increased. The S/Te ratios obtained from the XPS analyses were used to estimate the number of S atoms per nm² of the particle surfaces (table 1). Using a cubic zinc blende model for CdTe nanoparticles, the surface coverage of thiols was found to be 5.9, 6.4, and 3.4 S atoms per nm², respectively, for MPA-, MHA-, and MUA-capped CdTe QDs. These results provide more evidence that the use of thioacids with long alkyl chains like MUA for the synthesis of CdTe QDs in aqueous solution results in a weaker S surface coverage. The steric hindrance of the ligand and/or the formation of a macrocyclic complex annulus that wraps around the CdTe nanoparticle via the interaction between the carboxyl group of the acid function and surface cadmium atoms could explain this phenomenon.

The epitaxial growth of an inorganic shell possessing a higher band gap on the surface of QDs is an effective

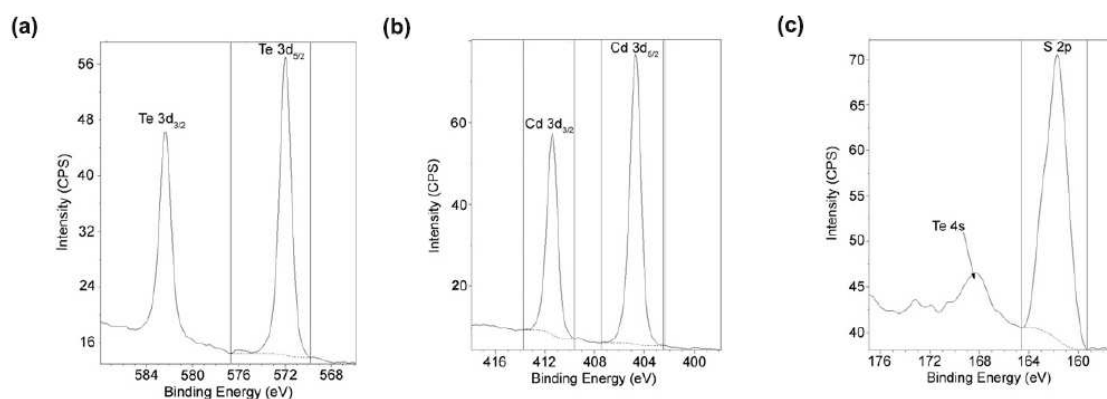


Figure 5. Te 3d (a), Cd 3d (b), and S 2p (c) x-ray photoelectron spectra of CdTe@MPA QDs.

Table 1. The calculated values of S atoms per nm² of the CdTe particle surface.

	Average diameter (nm) ^a	S/Te ratio obtained by elemental analysis ^b	Number of S atoms per nm ² of particle surface ^c
MPA-capped CdTe	3.4	1.1	5.9
MHA-capped CdTe	2.5	2.1	6.4
MUA-capped CdTe	0.6	2.0	3.4

^a Determined by AFM.

^b Determined from XPS analyses.

^c Calculated using a zinc blende model for all nanoparticles.

method to improve their photophysical properties through the elimination of both the anionic and the cationic surface dangling bonds [43]. Two methods were investigated for the introduction of a CdS shell at the surface of CdTe@MHA and CdTe@MUA QDs. The use of thioacetamide as a sulfur source, as recently been reported by Peng *et al* [44], afforded no results with these QDs. Water-insoluble materials arising probably from the inhomogeneous nucleation of new CdS nanoparticles rather than the formation of CdS shells around CdTe cores were observed. The treatment of thioalkyl acid-capped nanocrystals obtained after size-selective precipitation with an aqueous NaOH solution (pH = 11.5) at 100 °C to force basic hydrolysis of the ligands and thus repair surface defects afforded only results with CdTe@MHA QDs. Upon hydrolysis, the growth of the CdS shell was clearly evident by the excitonic peak position shift from 480 to 530 nm. In the meantime, the PL peak position shifts from 530 to 575 nm (figure 6). The introduction of the CdS shell to the CdTe surface also has a strong effect on PL QY, which increases from 3 to 14% after 6 h reaction.

A series of CdSe nanoparticles capped with MPA, MHA, and MUA ligands was also prepared in aqueous solution from CdCl₂ and NaHSe using an experimental procedure adapted from the report of Rogach *et al* [13]. The initial molar ratio of CdCl₂/NaHSe/thioalkyl acid was chosen as 2/1/4.8, and [Cd²⁺] = 10.9 mM, which were the same conditions used

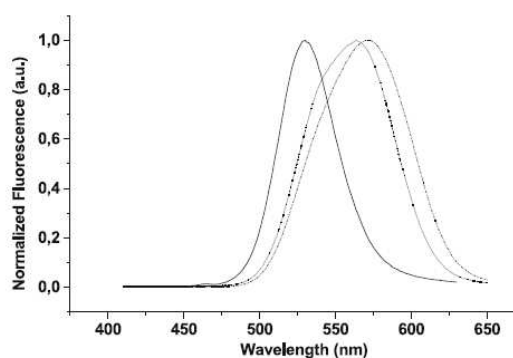


Figure 6. Temporal evolution of the fluorescence spectra of CdTe@MHA during basic hydrolysis of the MHA ligand (a) starting CdTe@MHA QDs (QY = 3%), (b) after 3 h reaction (QY = 10.5%), and (c) after 6 h reaction (QY = 14%).

for the synthesis of CdTe QDs at high Cd²⁺ concentration. Bright-yellow colloidal solutions produced after injection of NaHSe were first heated to 100 °C and the growth of nanoparticles was monitored by UV-vis spectroscopy. During the growth phase, a red-shift of absorptions from 450 to 521 nm, from 440 to 485 nm, and from 360 to 430 nm was, respectively, observed for CdSe@MPA, CdSe@MHA, and CdSe@MUA QDs, while the short-wavelength absorption gradually disappeared (figure 7). As previously observed with CdTe QDs, the growth of CdSe QDs was markedly decreased with MHA and MUA. Moreover, no evolution in absorption spectra was noticed after 2 h refluxing using these ligands. The better resolution of the 1s–1s electron transitions with MHA and MUA also indicates that the size distribution of CdSe nanoparticles becomes narrower using these ligands. The PL spectra of CdSe@MPA is composed of three parts: the exciton emission centered at 545 nm and two strong and wide low-energy bands at 641 and 673 nm arising from the recombination of trapped charge carriers [13, 45–48]. The room-temperature PL QY of these particles is weak, about 0.5% in comparison with Rhodamine 6G. Increasing the size of the stabilizing ligand leads to a strong decrease of the PL emission located in the near-IR (figure 7). With the MHA

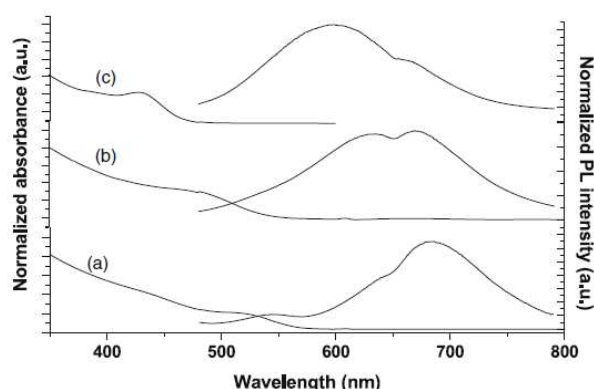


Figure 7. UV-vis absorption and PL spectra of (a) MPA-, (b) MHA-, and (c) MUA-stabilized CdSe QDs prepared at 100 °C for 15 h using a Cd²⁺ concentration of 10.9 mM. The PL spectra were recorded with an excitation at 400 nm.

ligand, the PL QY remained weak (0.2%) but it increased significantly using MUA (12%). The high fwhm (125 nm) determined from the emission spectra of CdSe@MUA QDs, however, indicated a wide size distribution. TEM images of CdSe particles obtained at these base-case conditions show particles on the order of about 2.8, 2.5, and 1.9 nm in diameter, respectively, for MPA, MHA, and MUA ligands (figure 8) (see figure S10 (available at stacks.iop.org/Nano/19/475401) for AFM images of these QDs). We next explored the effect of the temperature, all other variables remaining the same. Heating at 150 °C for 1 h induced no significant changes in absorption and luminescence spectra regardless of the ligand used. However, when the Cd²⁺ concentration was decreased to 1.25 mM, the relative intensity of trapped emission strongly decreased and the emission spectrum became more

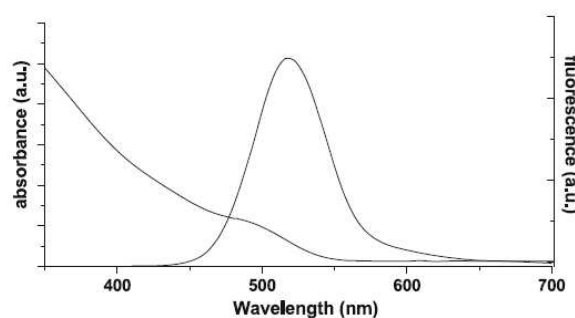


Figure 9. UV-vis absorption and PL spectra of MPA-stabilized CdSe QDs prepared at 150 °C for 1 h using a Cd²⁺ concentration of 10.9 mM and a Cd²⁺/Se²⁻/MPA ratio of 8/1/8. The PL spectrum was recorded with an excitation at 400 nm.

narrow (maximum at 577 nm) (figure S11, available at stacks.iop.org/Nano/19/475401). The effect of the thiol loading was next investigated. Changing the Cd²⁺/thioalkyl acid ratio could only be performed with MPA since 1:1 complexes of Cd²⁺ with MHA and MUA were not soluble in water at pH = 11.2. Figure 9 shows that when the Cd/Se ratio was increased to 8/1 while using a Cd²⁺/MPA ratio of 1/1 yielded nanoparticles with a weakly pronounced absorption at 481 nm. The emission spectrum centered at 519 nm was, however, well resolved, and the fwhm (about 58 nm) indicated a narrow size distribution. The average diameter of CdSe@MPA prepared at 150 °C using a Cd/Se/MPA ratio of 8/1/8, which we estimated by analyzing the AFM photograph (not shown) and the absorbance spectrum, was found to be 2.2 nm. The PL QY of these QDs (12%) is greater than that obtained using a Cd/Se/MPA ratio of 2/1/4.8 (0.9%) and demonstrates that the precursor ratio can dramatically

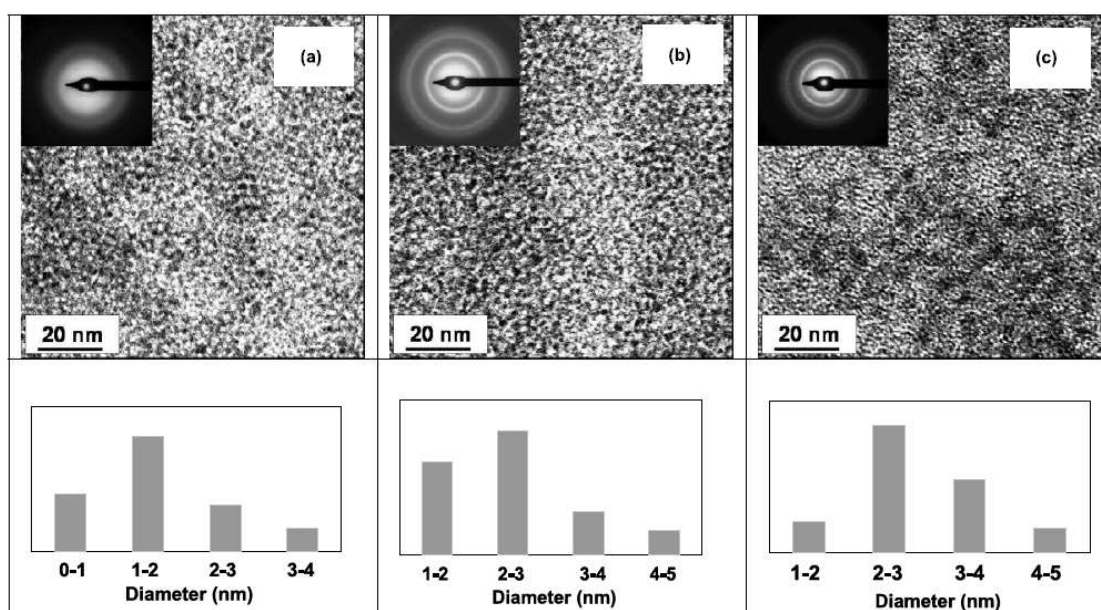


Figure 8. TEM images and electron diffraction patterns of the largest (a) CdSe@MUA, (b) CdSe@MHA, and (c) CdSe@MPA nanoparticles synthesized at 100 °C after size-selective precipitation, and the corresponding particle size distribution. The average diameters of the nanoparticles are (a) 1.9 nm, (b) 2.5 nm, and (c) 2.8 nm.

influence the optical properties of CdSe nanoparticles prepared under hydrothermal conditions. The same trend was observed when CdSe QDs were grown in the presence of the weak sodium citrate stabilizer under hydrothermal conditions [49] or using microwave irradiation [50]. Lowering the amount of Se^{2-} while maintaining a Cd^{2+} /thioalkyl acid ratio of 1/2.4 was attempted with the MHA ligand. The excitonic emission maximum of the CdSe@MHA QDs thus prepared was located at 587 nm and the trapped emission was reduced (see figure S12, available at stacks.iop.org/Nano/19/475401), but the PL QY remained weak (1.4%) and the fwhm high (147 nm).

4. Conclusions

In this paper, we have demonstrated that the thioalkyl acids MPA, MHA, and MUA can be used to prepare spherical CdTe and CdSe QDs in aqueous solution either at 100 °C or under hydrothermal conditions (150 °C) and that the sizes of the thiol compounds play an important role in determining the stability and optical properties of the QDs. With the MUA ligand, very small CdTe particles (0.6 nm) were produced whatever the reaction conditions, ligand-to-Cd molar ratio or precursor concentration, and the growth of the QDs could only be controlled with the small MPA ligand. The PL QY of CdTe@MHA and CdTe@MUA QDs was significantly weaker (1–3%) than that of CdTe@MPA QDs (up to 51% for nanoparticles prepared under hydrothermal conditions). An improvement of the PL QY of the CdTe@MHA nanocrystals to 14% was, however, achieved through the introduction of a CdS shell by basic hydrolysis of the MHA ligand. For CdSe QDs, the intensity of the deep trap emission centered at about 673 nm was reduced using the MHA and MUA ligands. A much narrower emission feature and higher PL QY (12%) were observed with CdSe@MUA nanocrystals. In the case of the MPA ligand, CdSe QDs with a good QY (12%) could be prepared under hydrothermal conditions by decreasing the amount of ligand ($\text{Cd}/\text{MPA} = 1/1$) and selenide ($\text{Cd}/\text{Se} = 8/1$) during the synthesis. The stability of CdTe QDs capped with MPA, MHA, and MUA when decreasing pH was found to correlate with the ligand surface coverage of the nanoparticles. The long alkyl chain of MUA afforded QDs with the lowest charge density and ligand packing density and thus they were the less stable towards aggregation at lower pH. The results presented are expected to open new opportunities to modulate the luminescence of semiconductor QDs in a simple way.

Acknowledgments

The authors thank Professor Michel François (LCSM, Nancy-University, CNRS) for facilitating the hydrothermal synthesis of quantum dots, and Dr Jaafar Ghanbaja (SCMEM, Nancy) and Olivier Soppera (UMR CNRS 7525, Mulhouse), respectively, for acquiring the TEM and AFM images. This work was supported by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR blanc 07, project DYNABIO).

References

- [1] Jun Y W, Jung Y Y and Cheon J 2002 *J. Am. Chem. Soc.* **124** 615–9
- [2] Lifshitz E, Bashouti M, Kloper V, Kigel A, Eisen M S and Berger S 2003 *Nano Lett.* **3** 857–62
- [3] Coe S, Woo W-K, Bawendi M and Bulovic V 2002 *Nature* **420** 800–3
- [4] Han L, Qin D, Jiang X, Liu Y, Wang L, Chen J and Cao Y 2006 *Nanotechnology* **17** 4736–42
- [5] Wei G and Forrest S R 2007 *Nano Lett.* **7** 218–22
- [6] McDonald S A, Konstantatos G, Zhang S, Cyr P W, Klem E J D, Levina L and Sargent E H 2005 *Nat. Mater.* **4** 138–42
- [7] Gao X, Cui Y, Levenson R M, Chung L W K and Nie S 2004 *Nat. Biotechnol.* **22** 969–76
- [8] Gao X, Yang L, Petros J A, Marshall F F, Simons J W and Nie S 2005 *Curr. Opin. Biotechnol.* **16** 63–72
- [9] Murray C B, Norris D J and Bawendi M G 1993 *J. Am. Chem. Soc.* **115** 8706–15
- [10] Peng Z A and Peng X 2001 *J. Am. Chem. Soc.* **123** 183–4
- [11] Qu L and Peng X 2002 *J. Am. Chem. Soc.* **124** 2049–55
- [12] Sedaghat Z, Taghavinia N and Marandi M 2006 *Nanotechnology* **17** 3812–6
- [13] Rogach A L, Kornowski A, Gao M, Eychmüller A and Weller H 1999 *J. Phys. Chem. B* **103** 3065–9
- [14] Nikoobakht B, Burda C, Braun M, Hun M and El-Sayed M A 2002 *Photochem. Photobiol.* **75** 591–7
- [15] Zhong P, Yu Y, Wu J, Lai Y, Chen B, Long Z and Liang C 2006 *Talanta* **70** 902–6
- [16] Zhang Y, Gao S and Ying J Y 2007 *Adv. Mater.* **19** 376–80
- [17] Mao W, Guo J, Yang W, Wang C, He J and Chen J 2007 *Nanotechnology* **18** 485611
- [18] Li H, Shih W Y and Shih W-H 2007 *Nanotechnology* **18** 495605
- [19] Qian H, Qiu X, Li L and Ren J 2006 *J. Phys. Chem. B* **110** 9034–40
- [20] Zheng Y, Yang Z and Ying J Y 2007 *Adv. Mater.* **19** 1475–9
- [21] Harrison M T, Karshaw S V, Burt M G, Rogach A L, Kornowski A, Eychmüller A and Weller H 1999 *Mater. Res. Symp. Proc.* **536** 217–22
- [22] He Y, Sai L-M, Lu H-T, Hu M, Lai W-Y, Fan Q-L, Wang L-H and Huang W 2007 *Chem. Mater.* **19** 359–65
- [23] Liu Y, Qiu H-Y, Xu Y, Wu D, Li M-J, Jiang J-X and Lai G-Q 2007 *J. Nanopart. Res.* **9** 745–52
- [24] Guo J, Yang W and Wang C 2005 *J. Phys. Chem. B* **109** 17467–73
- [25] Gao M Y, Kirstein S, Möhwald H, Rogach A L, Kornowski A, Eychmüller A and Weller H 1998 *J. Phys. Chem. B* **102** 8360–3
- [26] Zhang H, Zhou Z, Yang B and Gao M 2003 *J. Phys. Chem. B* **107** 8–13
- [27] Rogach A L 2000 *Mater. Sci. Eng. B* **69** 435–40
- [28] Gaponik N, Talapin D V, Rogach A L, Hoppe K, Shevchenko E V, Kornowski A, Eychmüller A and Weller H 2002 *J. Phys. Chem. B* **106** 7177–85
- [29] Bao H, Gonz Y, Li Z and Gao M 2004 *Chem. Mater.* **16** 3858–9
- [30] Green M, Harwood H, Barrowman C, Rahman P, Eggeman A, Festy F, Dobson P and Ng T 2007 *J. Mater. Chem.* **17** 1989–94
- [31] Chevelot Y et al 2001 *Bioorg. Med. Chem.* **9** 2949–53
- [32] Klayman D L and Griffin T S 1973 *J. Am. Chem. Soc.* **95** 197–9
- [33] Crosby G A and Demas J N 1971 *J. Phys. Chem.* **75** 991–1024
- [34] Wu W W, Qu L H, Guo W Z and Peng X G 2003 *Chem. Mater.* **15** 2854–60
- [35] Liang L, Qian H, Fang N and Ren J 2006 *J. Lumin.* **116** 59–66
- [36] Vossmeier T, Reck G, Schulz B, Katsikas L and Weller H 1995 *J. Am. Chem. Soc.* **117** 12881

- [37] Peng X G, Wickham J and Alivisatos A P 1998 *J. Am. Chem. Soc.* **120** 5343–4
- [38] Ebenstein Y, Nahum E and Banin U 2002 *Nano Lett.* **2** 945–50
- [39] Pinaud F, King D, Moore H-P and Weiss S 2004 *J. Am. Chem. Soc.* **126** 6115–23
- [40] Zou L, Gu Z, Zhang N, Zhang Y, Fanf Z, Zhu W and Zhong X 2008 *J. Mater. Chem.* **18** 2807–15
- [41] Kundu M, Khosrani A A, Kulkarni S K and Singh P 1997 *J. Mater. Sci.* **32** 245–58
- [42] Winter J O, Gomez N, Gatzert S, Schmidt C E and Korgel B A 2005 *Colloids Surf. A* **254** 147–57
- [43] Peng X, Schlamp M C, Kadavanich A V and Alivisatos A P 1997 *J. Am. Chem. Soc.* **119** 7019–29
- [44] Peng H, Zhang L, Soeller C and Trivas-Sejdic J 2007 *J. Lumin.* **127** 721–6
- [45] Kapitonov A M, Stupak A P, Gaponenko S V, Petrov E P, Rogach A L and Eychmüller A 1999 *J. Phys. Chem. B* **103** 10109–13
- [46] Rogach A L, Nagesha D, Ostrander J W, Giersig M and Kotov N A 2000 *Chem. Mater.* **12** 2676–85
- [47] Bowers M J II, McBride J R and Rosenthal S J 2005 *J. Am. Chem. Soc.* **127** 15378–9
- [48] Lin Y-W, Hsieh M-H, Liu C-P and Chang H-T 2005 *Langmuir* **21** 728–34
- [49] Williams J V, Adams C N, Kotov N A and Savage P E 2007 *Ind. Eng. Chem. Res.* **46** 4358–62
- [50] Chu M, Shen X and Liu G 2006 *Nanotechnology* **17** 444–9

Supporting Information

Figure S1. UV-vis absorption and PL spectra of (a) MPA-, (b) MHA- and, (c) MUA-stabilized CdTe QDs prepared at 100°C for 15 h using a Cd²⁺ concentration of 1.25 mM. PL spectra were recorded with an excitation at 400 nm.

Figure S2. UV-vis absorption spectra of (a) MPA-, (b) MHA- and, (c) MUA-stabilized CdTe QDs just after the formation of CdTe precursors (black) and after 15h heating at 100°C (red).

Figure S3. AFM images of the largest (a) CdTe@MUA, (b) CdTe@MHA and (c) CdTe@MPA nanoparticles synthesized at 100 °C conditions after size selective precipitation and the corresponding particles' size distributions determined using AFM heights.

Figure S4. Te3d (A), Cd3d (B), S2p (C) and C1s (D) X-ray photoelectron spectra of CdTe@MPA QDs.

Figure S5. Te3d (A), Cd3d (B), S2p (C) and C1s (D) X-ray photoelectron spectra of CdTe@MHA QDs.

Figure S6. Te3d (A), Cd3d (B), S2p (C) and C1s (D) X-ray photoelectron spectra of CdTe@MUA QDs.

Figure S7. Se3d (A), Cd3d (B), S2p (C) and C1s (D) X-ray photoelectron spectra of CdSe@MPA QDs.

Figure S8. Se3d (A), Cd3d (B), S2p (C) and C1s (D) X-ray photoelectron spectra of CdSe@MHA QDs.

Figure S9. Se3d (A), Cd3d (B), S2p (C) and C1s (D) X-ray photoelectron spectra of CdSe@MUA QDs.

Figure S10. AFM images of the largest (a) CdSe@MUA, (b) CdSe@MHA and (c) CdSe@MPA nanoparticles synthesized at 100 °C conditions after size selective precipitation and the corresponding particles' size distributions determined using AFM heights.

Figure S11. UV-vis absorption and PL spectra of MPA-stabilized CdSe QDs prepared at 150°C for 1 h using a Cd²⁺ concentration of 1.25 mM and a Cd²⁺/Se²⁻/MPA ratio of 2/1/4.8. PL spectrum was recorded with an excitation at 400 nm.

Figure S12. UV-vis absorption and PL spectra of MHA-stabilized CdSe QDs prepared at 150°C for 1 h using a Cd²⁺ concentration of 10.9 mM and a Cd²⁺/Se²⁻/MHA ratio of 2/0.25/4.8. PL spectrum was recorded with an excitation at 400 nm.

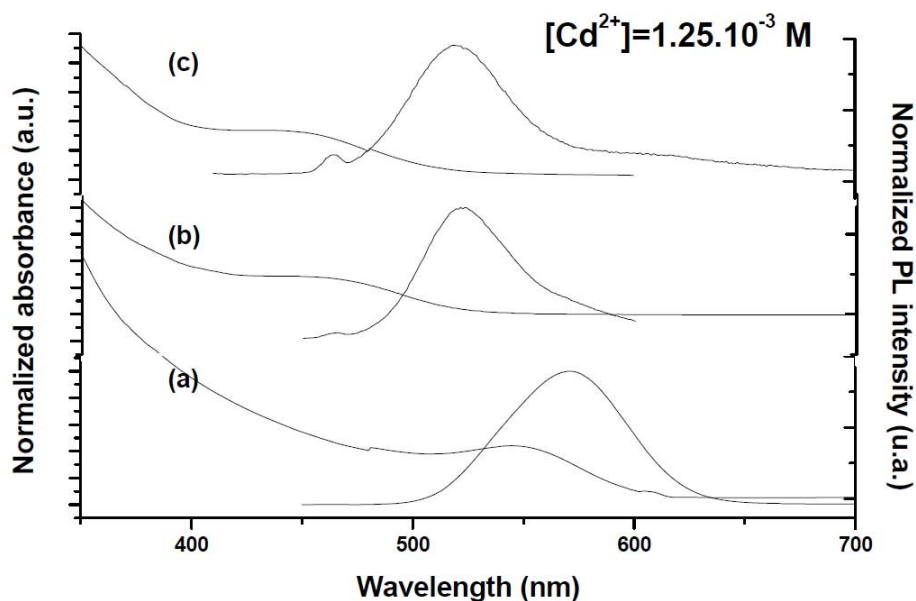


Figure S1. UV-vis absorption and PL spectra of (a) MPA-, (b) MHA- and, (c) MUA-stabilized CdTe QDs prepared at 100°C for 15h using a Cd²⁺ concentration of 1.25 mM. PL spectra were recorded with an excitation at 400 nm.

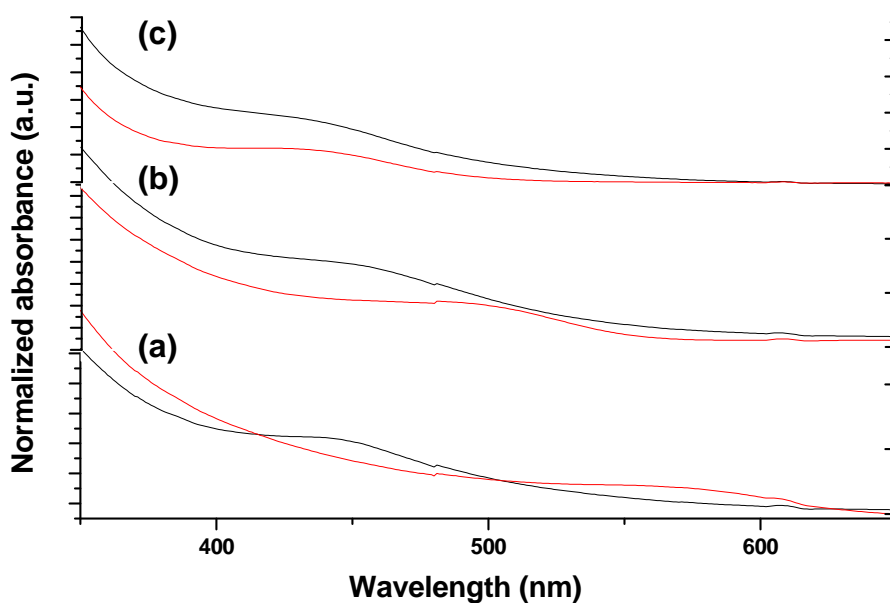


Figure S2. UV-vis absorption spectra of (a) MPA-, (b) MHA- and, (c) MUA-stabilized CdTe QDs just after the formation of CdTe precursors (black) and after 15h heating at 100 °C (red) using a [Cd²⁺] concentration of 10.9 mM.

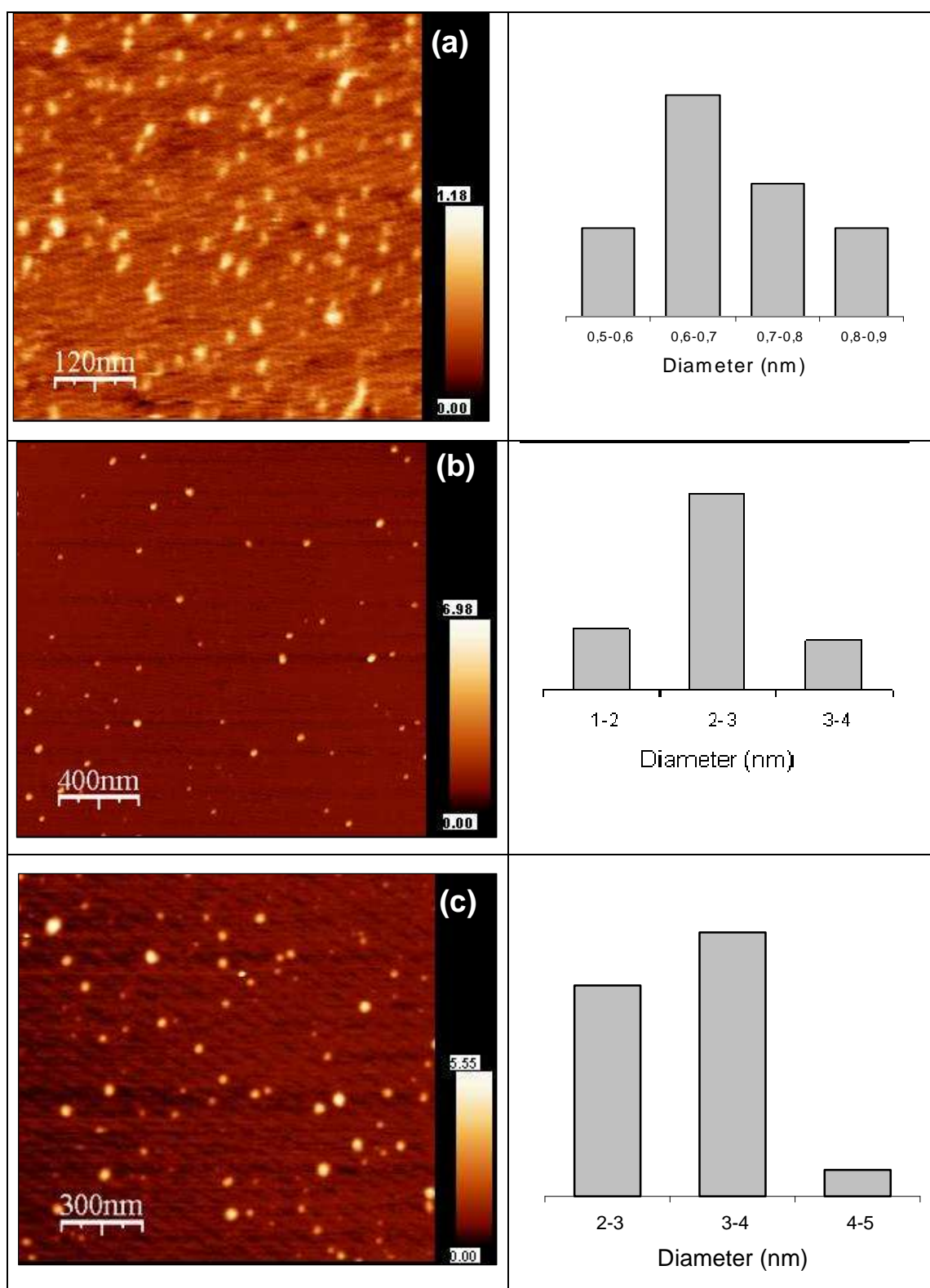


Figure S3. AFM images of the largest (a) CdTe@MUA, (b) CdTe@MHA and (c) CdTe@MPA nanoparticles synthesized at 100 °C conditions after size selective precipitation and the corresponding particles' size distributions determined using AFM heights.

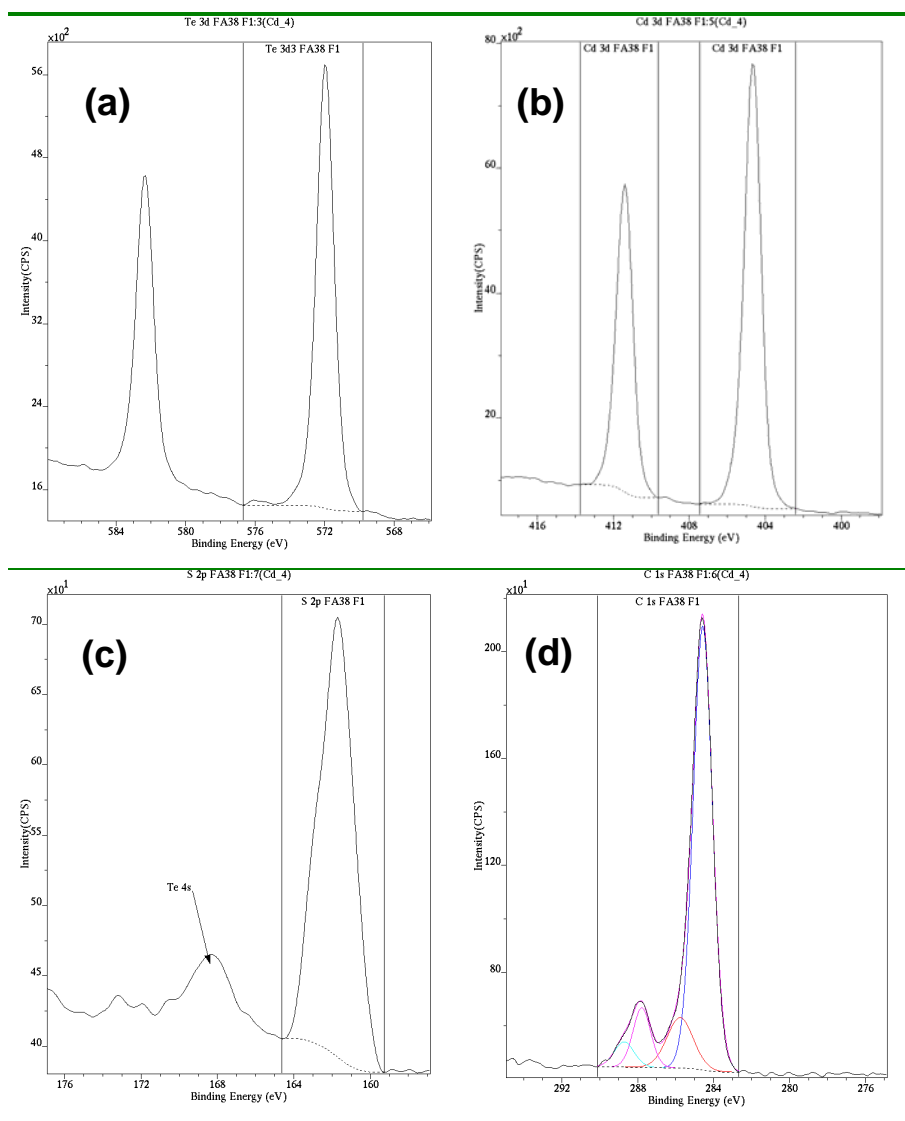


Figure S4. Te3d (A), Cd3d (B), S2p (C) and C1s (D) X-ray photoelectron spectra of CdTe@MPA QDs.

Quantification Report

/C=/data/Thiol/Cd_4.dset Fri Mar 14 10:11:03 2008

Peak	Position BE (eV)	FWHM (eV)	Raw Area (CPS)	RSF	Atomic Mass	Atomic Conc %	Mass Conc %
Na 1s FA38 F1	1071.200	1.605	1675.3	1.685	22.990	4.58	3.21
Te 3d3 FA38 F1	572.000	1.165	5694.1	5.705	127.620	5.71	22.23
O 1s FA38 F1	530.900	1.765	1787.7	0.780	15.999	13.12	6.41
cd 3d FA38 F1	404.700	1.020	13708.0	6.623	112.422	11.85	40.64
C 1s FA38 F1	284.600	1.273	2863.9	0.278	12.011	58.54	21.45
S 2p FA38 F1	161.700	2.216	702.0	0.668	32.065	6.20	6.06

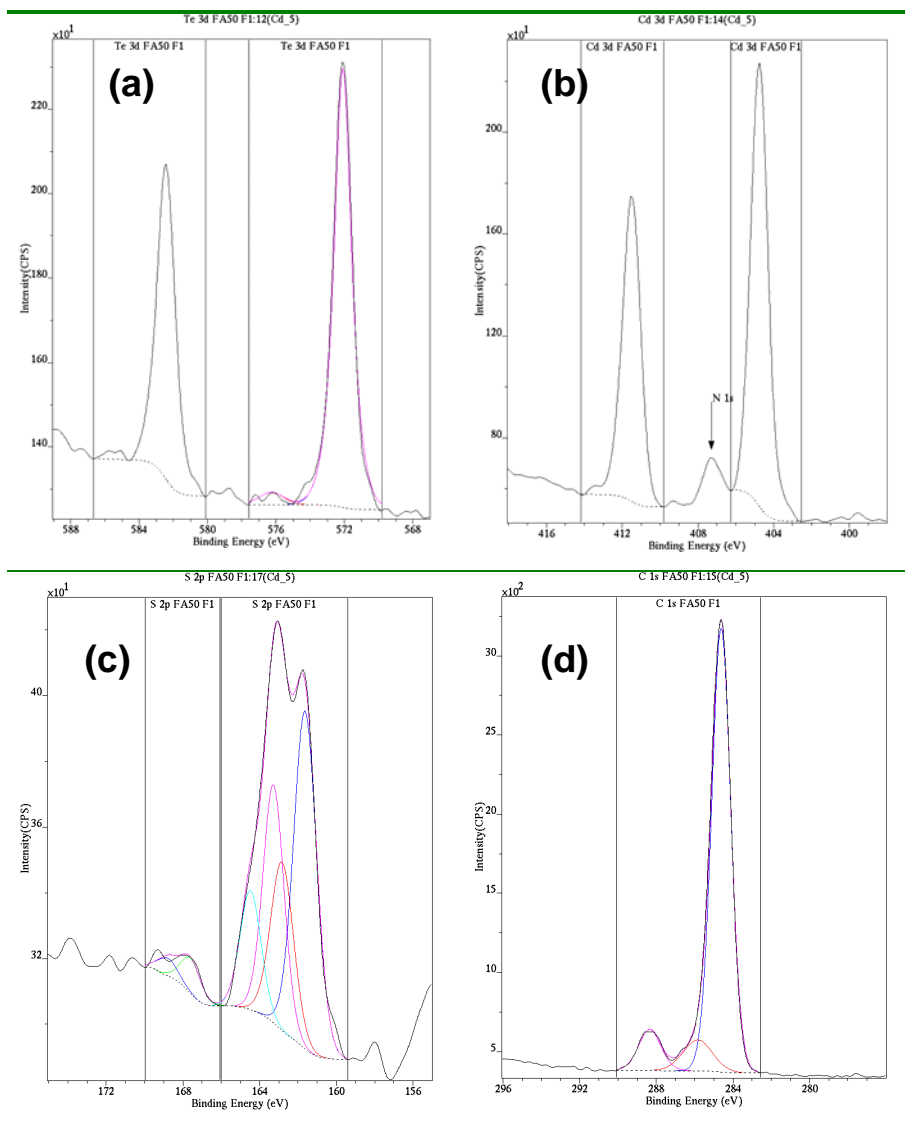


Figure S5. Te3d (a), Cd3d (b), S2p (c) and C1s (d) X-ray photoelectron spectra of CdTe@MHA QDs.

Quantification Report

/C=/data/Thiol/cd_5.dset *Fri Apr 4 11:23:48 2008*

<i>Peak</i>	<i>Position BE (eV)</i>	<i>FWHM (eV)</i>	<i>Raw Area (CPS)</i>	<i>RSF</i>	<i>Atomic Mass</i>	<i>Atomic Conc %</i>	<i>Mass Conc %</i>
<i>Na 1s FASO F1</i>	<i>1071.550</i>	<i>1.503</i>	<i>2475.0</i>	<i>1.685</i>	<i>22.990</i>	<i>5.13</i>	<i>6.60</i>
<i>Te 3d FASO F1</i>	<i>572.150</i>	<i>1.271</i>	<i>2691.2</i>	<i>9.508</i>	<i>127.620</i>	<i>1.23</i>	<i>8.76</i>
<i>O 1s FASO F1</i>	<i>532.050</i>	<i>2.451</i>	<i>3736.8</i>	<i>0.780</i>	<i>15.999</i>	<i>20.79</i>	<i>18.62</i>
<i>Cd 3d FASO F1</i>	<i>404.750</i>	<i>1.065</i>	<i>3512.1</i>	<i>6.623</i>	<i>112.422</i>	<i>2.30</i>	<i>14.47</i>
<i>C 1s FASO F1</i>	<i>284.600</i>	<i>1.221</i>	<i>4324.5</i>	<i>0.278</i>	<i>12.011</i>	<i>67.01</i>	<i>45.04</i>
<i>Cl 2p FASO F1</i>	<i>198.350</i>	<i>1.143</i>	<i>165.1</i>	<i>0.891</i>	<i>35.460</i>	<i>0.82</i>	<i>1.62</i>
<i>S 2p FASO F1</i>	<i>163.050</i>	<i>3.033</i>	<i>407.9</i>	<i>0.668</i>	<i>32.065</i>	<i>2.73</i>	<i>4.89</i>

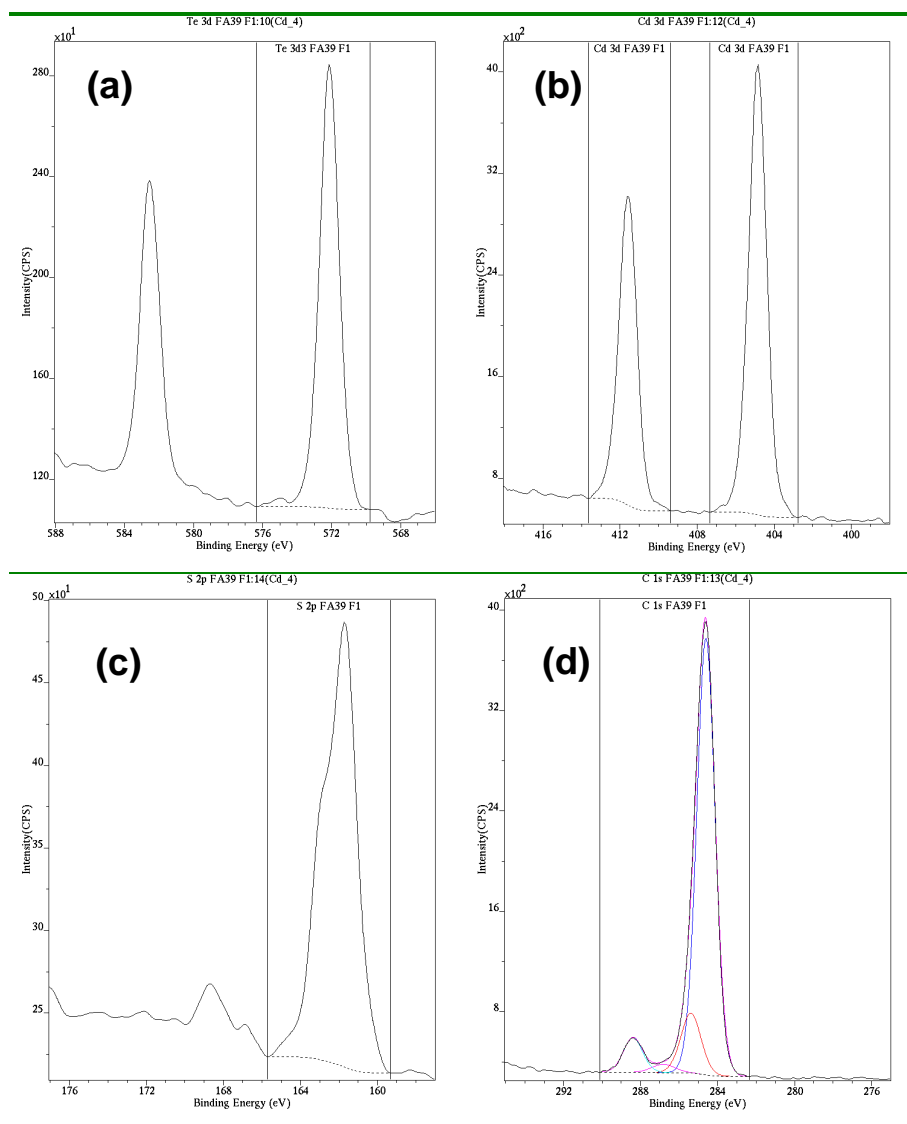


Figure S6. Te3d (a), Cd3d (b), S2p (c) and C1s (d) X-ray photoelectron spectra of CdTe@MUA QDs.

Quantification Report

/C=/data/Thiol/Cd_4.dset *Fri Mar 14 10:59:49 2008*

<i>Peak</i>	<i>Position BE (eV)</i>	<i>FWHM (eV)</i>	<i>Raw Area (CPS)</i>	<i>RSF</i>	<i>Atomic Mass</i>	<i>Atomic Conc %</i>	<i>Mass Conc %</i>
<i>Te 3d3 FA39 F1</i>	<i>572.150</i>	<i>1.282</i>	<i>2535.0</i>	<i>5.705</i>	<i>127.620</i>	<i>1.84</i>	<i>11.82</i>
<i>O 1s FA39 F1</i>	<i>531.350</i>	<i>1.735</i>	<i>2235.8</i>	<i>0.780</i>	<i>15.999</i>	<i>11.87</i>	<i>9.57</i>
<i>Cd 3d FA39 F1</i>	<i>404.850</i>	<i>1.066</i>	<i>7133.0</i>	<i>6.623</i>	<i>112.422</i>	<i>4.46</i>	<i>25.26</i>
<i>C 1s FA39 F1</i>	<i>284.600</i>	<i>1.225</i>	<i>5283.2</i>	<i>0.278</i>	<i>12.011</i>	<i>78.09</i>	<i>47.29</i>
<i>S 2p FA39 F1</i>	<i>161.750</i>	<i>2.166</i>	<i>586.9</i>	<i>0.668</i>	<i>32.065</i>	<i>3.75</i>	<i>6.05</i>

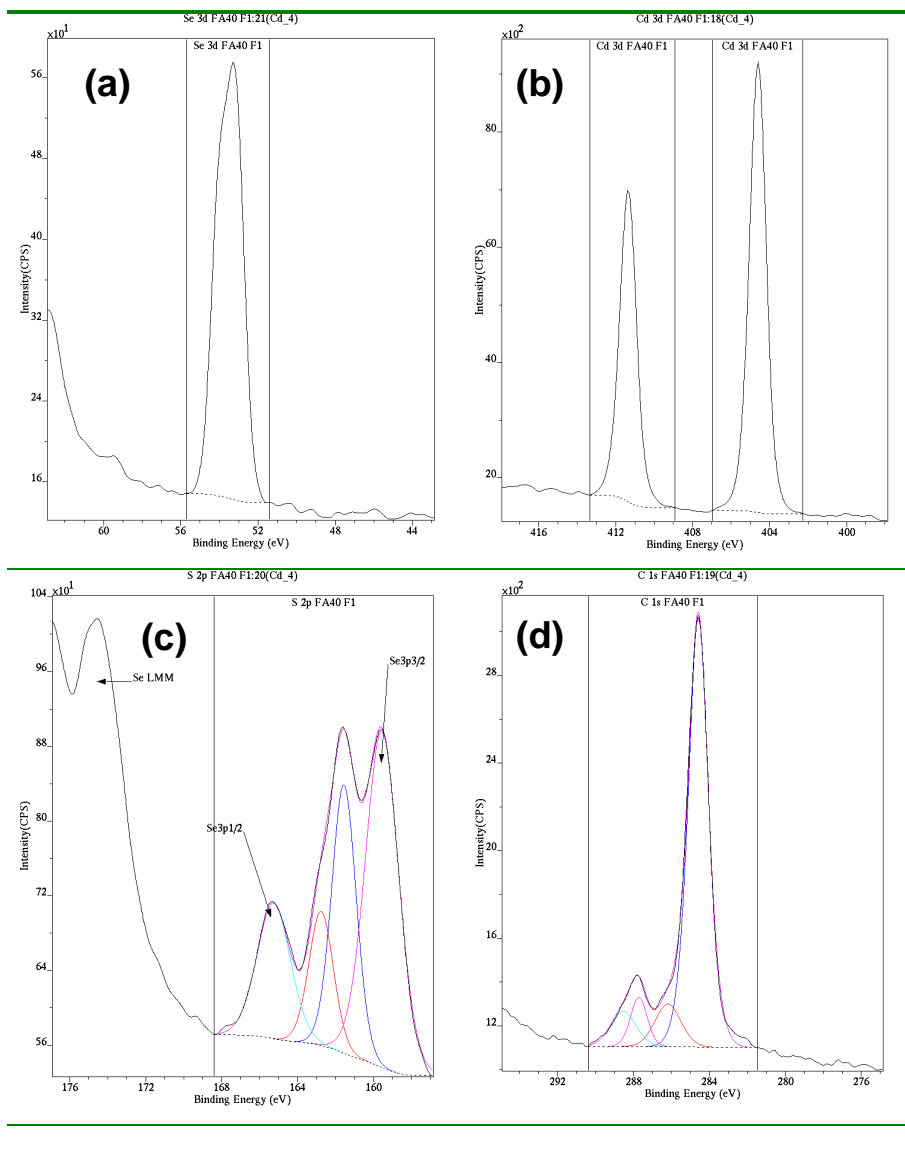


Figure S7. Se3d (a), Cd3d (b), S2p (c) and C1s (d) X-ray photoelectron spectra of CdSe@MPA QDs.

Quantification Report

/C=/data/Thiol/cd_4.dset Fri Mar 14 13:27:27 2008

Peak	Position BE (eV)	FWHM (eV)	Raw Area (CPS)	RSF	Atomic Mass	Atomic Conc %	Mass Conc %
Na 1s FA40 F1	1071.200	1.507	1632.5	1.685	22.990	3.78	3.09
O 1s FA40 F1	530.900	1.679	1963.0	0.780	15.999	12.21	6.95
Cd 3d FA40 F1	404.600	1.017	15080.6	6.623	112.422	11.04	44.16
C 1s FA40 F1	284.600	1.311	3646.7	0.278	12.011	63.14	26.98
S 2p FA40 F1	159.600	4.423	1835.0	1.735	32.065	5.29	6.03
Se 3d FA40 F1	53.300	1.697	737.1	0.853	78.982	4.55	12.79

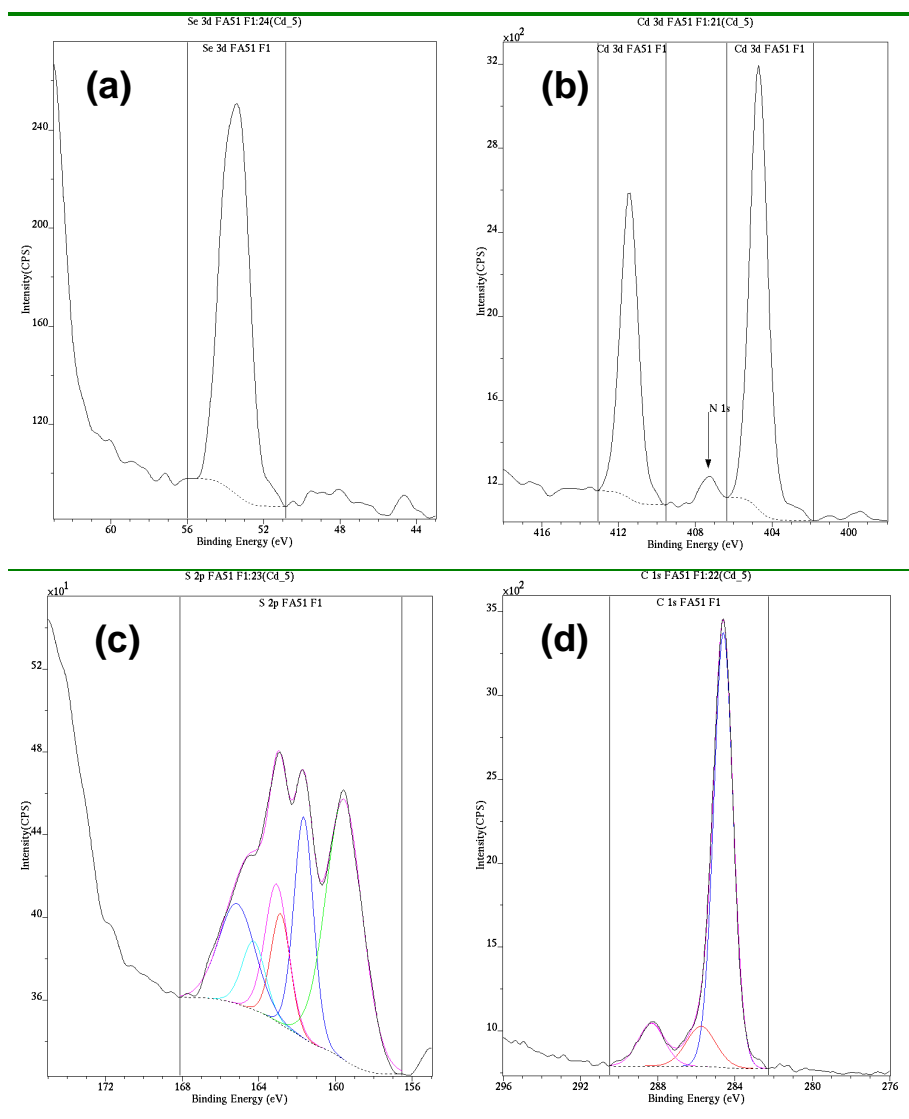


Figure S8. Se3d (a), Cd3d (b), S2p (c) and C1s (d) X-ray photoelectron spectra of CdSe@MHA QDs.

Quantification Report

/C=/data/Thiol/cd_5.dset Fri Apr 4 13:27:00 2008

Peak	Position BE (eV)	FWHM (eV)	Raw Area (CPS)	RSF	Atomic Mass	Atomic Conc %	Mass Conc %
Na 1s FAS1 F1	1071.600	1.470	3051.1	1.685	22.990	6.41	8.22
O 1s FAS1 F1	532.000	2.559	3534.5	0.780	15.999	19.94	17.79
cd 3d FAS1 F1	404.700	1.063	4231.8	6.623	112.422	2.81	17.62
C 1s FAS1 F1	284.600	1.232	4249.2	0.278	12.011	66.75	44.71
S 2p FAS1 F1	162.900	6.454	780.7	1.452	32.065	2.43	4.35
se 3d FAS1 F1	53.400	1.768	296.1	0.853	78.982	1.66	7.31

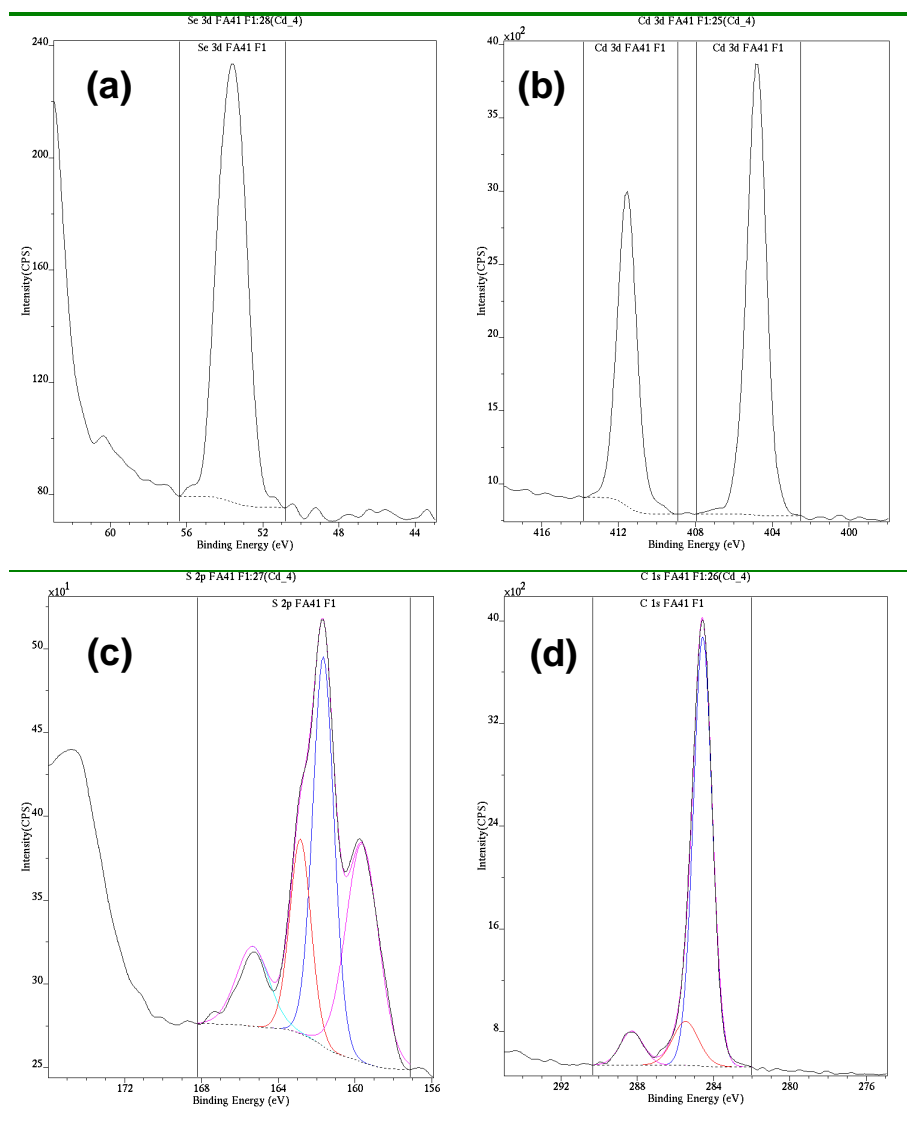


Figure S9. Se3d (A), Cd3d (B), S2p (C) and C1s (D) X-ray photoelectron spectra of CdSe@MUA QDs.

Quantification Report

/C=/data/Thiol/Cd_4.dset Fri Mar 14 15:15:22 2008

Peak	Position BE (eV)	FWHM (eV)	Raw Area (CPS)	RSF	Atomic Mass	Atomic Conc %	Mass Conc %
Na 1s FA41 FI	1071.450	1.605	1864.9	1.685	22.990	3.62	4.47
O 1s FA41 FI	531.450	1.937	2345.3	0.780	15.999	12.21	10.50
Cd 3d FA41 FI	404.850	1.139	6657.5	6.623	112.422	4.08	24.66
C 1s FA41 FI	284.600	1.236	5209.8	0.278	12.011	75.56	48.77
S 2p FA41 FI	161.650	2.216	867.5	1.200	32.065	3.02	5.21
Se 3d FA41 FI	53.550	1.803	291.0	0.853	78.982	1.51	6.39

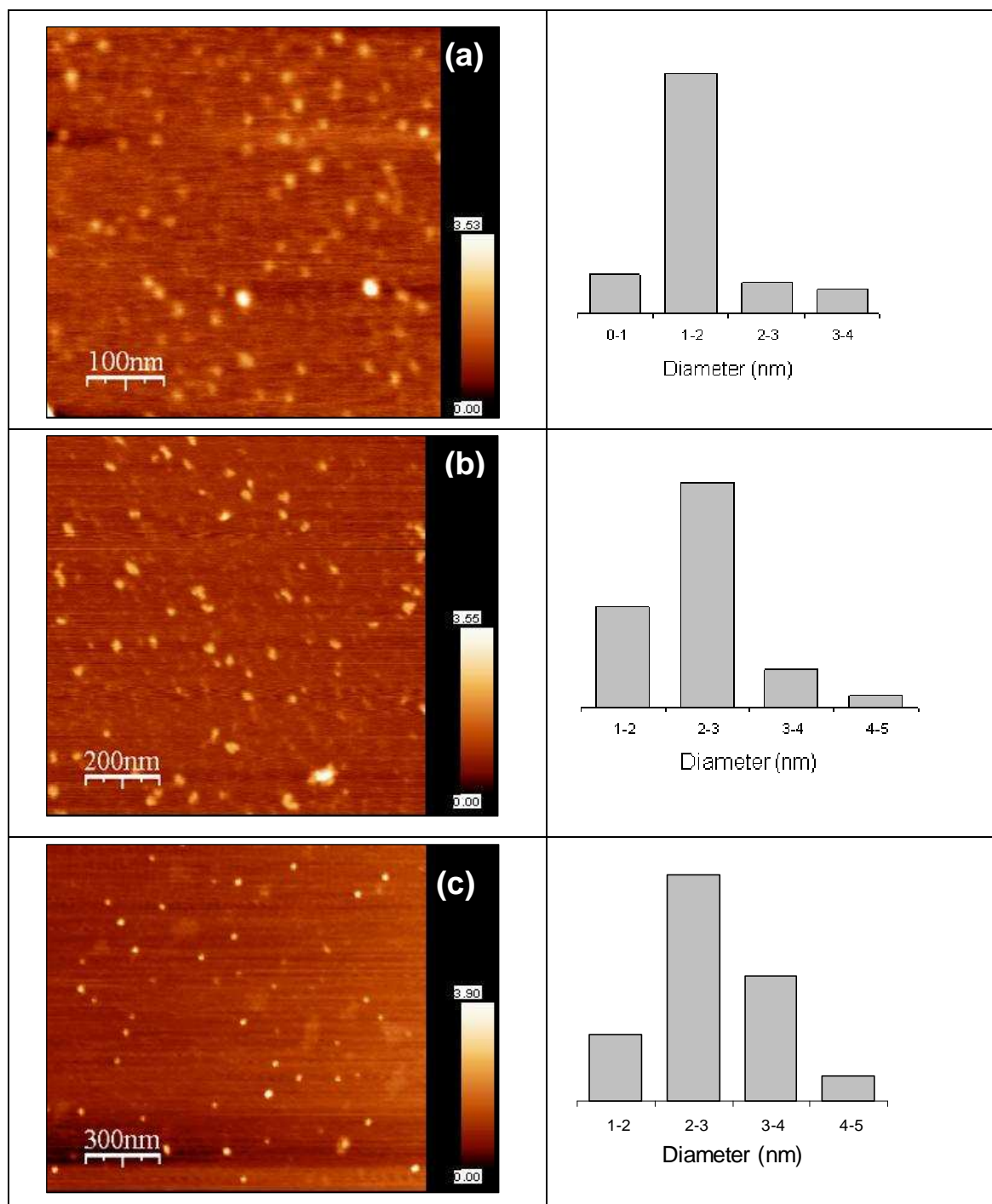


Figure S10. AFM images of the largest (a) CdSe@MUA, (b) CdSe@MHA and (c) CdSe@MPA nanoparticles synthesized at 100 °C conditions after size selective precipitation and the corresponding particles' size distributions determined using AFM heights. The average diameters of nanoparticles are (a) 1.6 nm, (b) 2.6 nm, and (c) 2.9 nm.

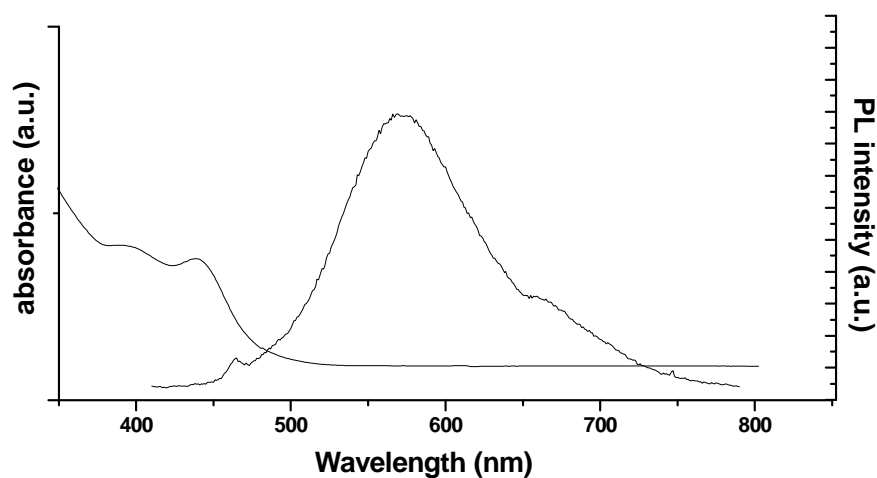


Figure S11. UV-vis absorption and PL spectra of MPA-stabilized CdSe QDs prepared at 150°C for 1 h using a Cd²⁺ concentration of 1.25 mM and a Cd²⁺/Se²⁻/MPA ratio of 2/1/4.8. PL spectrum was recorded with an excitation at 400 nm.

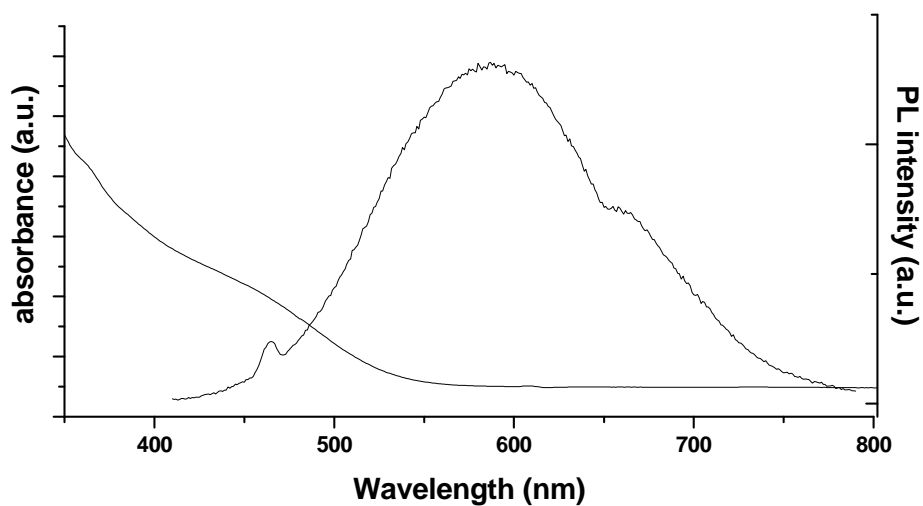


Figure S12. UV-vis absorption and PL spectra of MHA-stabilized CdSe QDs prepared at 150°C for 1 h using a Cd²⁺ concentration of 10.9 mM and a Cd²⁺/Se²⁻/MHA ratio of 2/0.25/4.8. PL spectrum was recorded with an excitation at 400 nm.

Chapitre III

**Tentatives d'amélioration des propriétés
photophysiques des quantum dots CdTe
et CdSe à caractère amphiphile par
introduction d'une coquille**

III.1. Introduction d'une coquille CdS à la surface des QDs

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la synthèse par voie hydrothermale de QDs substitués par des thioacides amphiphiles (MHA et MUA) ne permettait pas :

- le contrôle du diamètre des QDs (croissance freinée ou même bloquée) et donc d'adapter la longueur d'onde d'émission de fluorescence.
- l'obtention de nanocristaux avec de bonnes propriétés photophysiques.

La qualité de la surface des QDs est un paramètre crucial pour améliorer à la fois leur photostabilité ainsi que leurs propriétés optiques. Au cours des dernières années, beaucoup d'efforts ont été investis dans la passivation de surface des cœurs photoactifs CdSe ou CdTe pour améliorer la stabilité chimique et photophysique de ces nanocristaux.¹ Les défauts à la surface des QDs du groupe II-VI sont des sites vacants anioniques et cationiques. Ces défauts sont à l'origine des rendements quantiques de fluorescence généralement modestes des QDs, particulièrement si les nanocristaux sont préparés en solution aqueuse.² La stratégie la plus utilisée pour « gommer » ces défauts consiste à introduire une coquille d'un autre semi-conducteur possédant une bande interdite plus large que celle du cœur photoactif (Figure 1).³ L'introduction de cette coquille réduit également le confinement quantique.⁴ Par conséquent, la longueur d'onde d'émission des QDs cœur/coquille est décalée de quelques nanomètres vers le rouge par rapport au cœur non passivé. Ce déplacement vers le rouge est observé lors de la croissance de la coquille, et est dû à une fuite partielle de l'exciton dans la matrice de la coquille, réduisant ainsi le confinement.

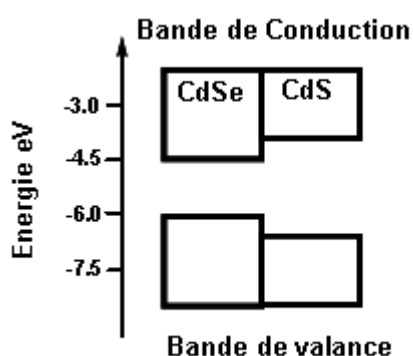


Figure 1. Diagramme d'énergie des QDs cœur/coquille CdSe/CdS (Type 1).

Dans le chapitre précédent, deux méthodes ont été évaluées pour l'introduction d'une coquille de CdS à la surface des QDs CdTe stabilisés par les ligands MPA, MHA ou MUA.

1. La génération *in situ* d'ions sulfure par décomposition basique du thioacétamide.³ Cette méthode consiste à additionner une solution (4.10^{-4} M) de thioacétamide aux QDs CdTe@MPA obtenus après 15 heures de croissance à 100°C (le rapport thioacétamide/ Te^{2-} est de 1/1). Les ions sulfure s'associent aux ions cadmium en excès dans le milieu réactionnel, forment des clusters de CdS qui germent à la surface des QDs CdTe et créent ainsi la coquille. Cette méthode n'a donné de bons résultats qu'avec les QDs CdTe@MPA (Figure 2).

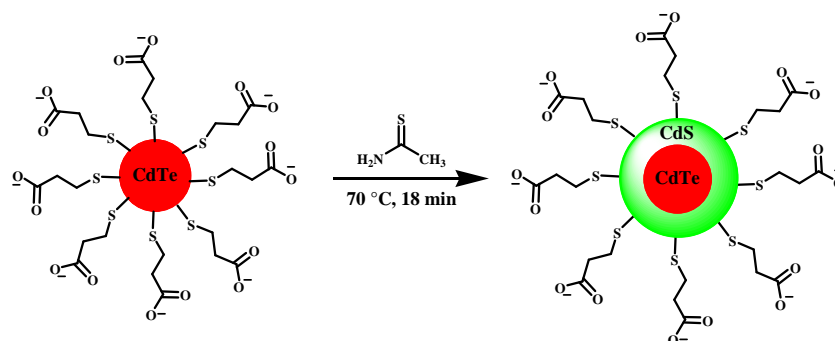


Figure 2. Introduction d'une coquille CdS à la surface des QDs CdTe@MPA par décomposition du thioacétamide.

Le rendement quantique de fluorescence passe de 33 % pour les cœurs CdTe@MPA à 43 % pour les QDs cœur/coquille CdTe/CdS. Après la passivation, l'émission de fluorescence est décalée de 15 nm dans le rouge (Figure 3).

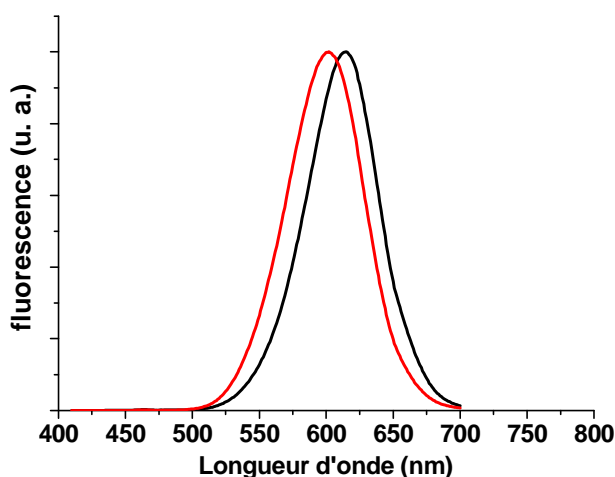


Figure 3. Spectres d'émission de fluorescence des QDs CdTe@MPA (rouge) et CdTe/CdS@MPA (noir) dans l'eau après excitation à 400 nm.

2. L'hydrolyse basique du ligand présent à la surface des QDs. Cette méthode consiste à purifier par précipitation à l'*i*-PrOH les QDs obtenus après la synthèse hydrothermale, puis de les traiter par une solution 1 M de NaOH à un pH de 11,5. Après chauffage à 100°C, la décomposition thermique du ligand génère des ions sulfure S²⁻ qui s'associent avec les ions Cd²⁺ à la surface des QDs pour former une coquille de CdS.

Cette passivation de la surface des nanocristaux n'a donné de résultats qu'avec les QDs CdTe stabilisés par le MHA et le MPA (Figure 4).

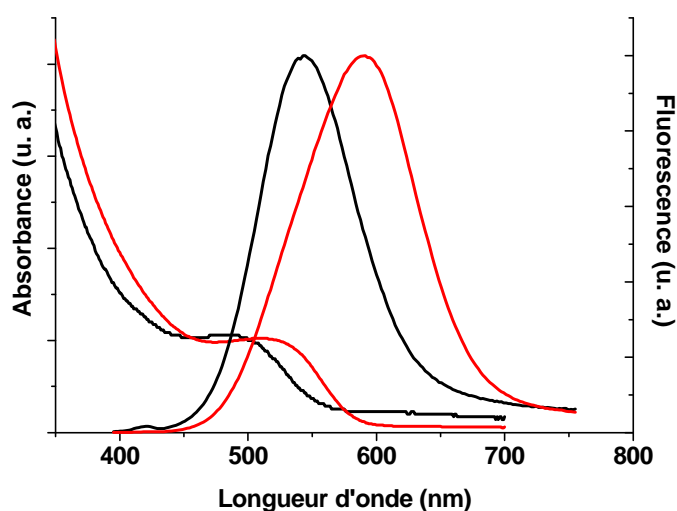


Figure 4. Spectres UV-visible et d'émission de fluorescence après excitation à 400 nm des QDs CdTe@MPA (noir) et CdTe/CdS@MPA (rouge) après hydrolyse.

Le rendement quantique de fluorescence augmente de 12 % pour les QDs CdTe@MPA à 20 % pour les QDs cœur/coquille CdTe/CdS@MPA. Après la passivation, les longueurs d'onde d'absorption du premier exciton et d'émission de fluorescence sont décalées de 484 et 535 nm à 509 et 551 nm, respectivement. Les résultats obtenus avec les QDs CdTe@MHA sont décrits à la page 91 de ce manuscrit. Après traitement basique, le rendement quantique de fluorescence passe de 3 à 14% et l'émission de fluorescence est décalée de 45 nm vers le rouge.

Aucune modification des propriétés photophysiques des QDs CdTe@MUA n'a été observée lors du traitement basique.

A ce stade de nos travaux, nous avons souhaité développer une méthode de synthèse de QDs cœur/coquille 1/coquille 2 afin de déplacer l'émission de fluorescence des nanocristaux substitués par des ligands amphiphiles vers le rouge et améliorer leurs propriétés photophysiques.

La coquille 1 intermédiaire est généralement choisie pour avoir un faible désaccord de maille à la fois avec le matériau de cœur et la coquille externe. Son rôle est de réduire les contraintes entre ces

deux matériaux.^{5,6} La coquille 1 permet également de réduire significativement le nombre de défauts de surface, entraînant une augmentation de l'intensité de fluorescence. Les systèmes cœur/double coquille conduisent à des rendements quantiques plus élevés que les systèmes à simple coquille et permettent la croissance de coquilles plus épaisses sans altération de la photoluminescence.^{7,8}

Les semi-conducteurs à large bande interdite les plus utilisés pour l'introduction d'une coquille à la surface des QDs CdSe ou CdTe sont CdS et ZnS.⁹⁻¹² La littérature ne décrit que peu de synthèses de QDs à double coquille en milieu aqueux. Généralement, le semi-conducteur ZnS est utilisé comme matériau pour la coquille 2.¹³

Le semi-conducteur ZnO est un matériau possédant une large bande interdite ($E_g = 3,37$ eV à température ambiante).¹⁴ Il a été très peu utilisé pour passiver des QDs CdSe ou CdTe à cause de son désaccord de maille très grand avec ces semi-conducteurs (29% pour CdTe et 24% pour CdSe).¹⁵ Le désaccord de maille entre le cœur et la coquille est un paramètre à considérer avant l'introduction d'une coquille à la surface des QDs. Si ce désaccord est élevé, la coquille va compresser le cœur et inversement, le cœur pourra provoquer une dislocation de la coquille. Une coquille intermédiaire CdS a donc été introduite à la surface des nanocristaux CdTe afin de diminuer les contraintes de maille entre le cœur et la coquille externe ZnO (notons cependant que le désaccord de maille entre CdS et ZnO, 21%, reste élevé). Cette stratégie a été développée dans la suite de nos travaux et a conduit au développement de nouveaux QDs cœur/coquille/coquille CdTe/CdS/ZnO.

Un développement méthodologique similaire a permis, à partir des nanocristaux « alliage » CdSe(S), la synthèse de QDs cœur/coquille CdSe(S)/ZnO.

Bibliographie

- [1] P. Reiss, M. Protière, L. Li. *Small* **2009**, 2, 154-168.
- [2] H. Zhang, Z. Zhen, B. Yang, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 8-13.
- [3] H. Peng, L. Zhang, C. Soeller, J. Travas-Sejdic, *J. Lumin.* **2007**, 127, 721-726.
- [4] D. Battaglia, J. J. Li, Y. Wang, X. Peng, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 5035-5039.
- [5] S. Jun, E. Jang, J. E. Lim, *Nanotechnology* **2006**, 17, 3892-3896.
- [6] D. Talapin, I. Mekis, S. Gotzinger, A. Kornowski, O. Benson, H. Weller, *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 18826-18831.
- [7] R. Xie, U. Kolb, J. Li, T. Basche, A. Mews, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7480-7488.
- [8] P. Reiss, S. Carayon, J. Bleuse, A. Pron, *Synth. Met.* **2003**, 139, 649-652.
- [9] X. Peng, M. C. Schlamp, A. Kadavanich, A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 7019.
- [10] J. J. Li, Y. A. Wang, W. Guo, J. C. Keay, T. D. Mishima, M. B. Johnson, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12567.
- [11] D. V. Talapin, R. Koeppel, S. Götzinger, A. Kornowski, J. M. Lupton, A. L. Rogach, O. Benson, J. Feldmann, H. Weller *Nano Lett.* **2003**, 3, 1677.
- [12] J. S. Steckel, J. P. Zimmer, S. Coe-Sullivan, N. E. Stott, V. Bulovic, M. G. Bawendi, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 2154.
- [13] B. Y. He, H. T. Lu, L. M. Sai, Y. Y. Su, M. Hu, C. H. Fan, W. Huang, L. H. Wang, *Adv. Mater.* **2008**, 9999, 1-6.
- [14] Y. -S. Fu, X. -W. Du, S. A. Kulinich, J. -S. Qiu, W. -J. Qin, R. Li, J. Sun, J. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 16029-16033.
- [15] G. Shan, X. Kong, X. Wang, Y. Liu, *Surf. Sci.* **2005**, 582, 61-68.
- [16] I. V. Sedova, O. G. Lyubliskaya, S. V. Sorokin, A. A. Toropov, F. Donatini, L. S. Dang, S. V. Ivanov, *Semicond.* **2007**, 41, 1345-1350.

III.2. Enhanced Optical Properties of Core/Shell/Shell CdTe/CdS/ZnO and Core/Shell CdSe(S)/ZnO Quantum Dots Prepared in Aqueous Solution

Enhanced Optical Properties of Core/Shell/Shell CdTe/CdS/ZnO Quantum Dots Prepared in Aqueous Solution

Fadi Aldeek,^{†,‡} Lavinia Balan,[§] Ghouti Medjahdi,^{||} Thibault Roques-Carmes,[‡]
Jean-Pierre Malval,[§] Christian Mustin,[⊥] Jaafar Ghanbaja,[#] and Raphaël Schneider^{*‡}

LCPME, Nancy-University, CNRS, 405 rue de Vandoeuvre, 54506 Villers-lès-Nancy, France, DCPR, Nancy-University, CNRS, 1 rue Grandville, 54001 Nancy Cedex, France, DPG, UMR CNRS 7525, Université de Haute Alsace, 3 rue Alfred Werner, 68093 Mulhouse, France, IJL, Nancy-University, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France, LIMOS, Nancy-University, CNRS, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France, and SCMEM, Nancy-University, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

Received: June 17, 2009; Revised Manuscript Received: September 22, 2009

New quantum dots (QDs) were fabricated with a core/shell/shell structure consisting of CdTe core/CdS shell/ZnO shell. Despite the high lattice mismatch between CdS and ZnO, a ZnO shell was successfully introduced by basic hydrolysis of Zn(OAc)₂ at the surface of core/shell CdTe/CdS QDs stabilized by 3-mercaptopropionic acid (MPA). The core/shell/shell CdTe/CdS/ZnO@MPA QDs exhibited a significant redshift of emission peaks (up to 50 nm for green-emitting CdTe/CdS QDs) when the shell grew. By changing the size of the core or the thickness of the ZnO shell, the emission colors of the obtained nanocrystals can be tuned between the green and red regions of the spectrum following an identical procedure. The influence of ZnO shell growth on photoluminescence (PL) quantum yields was found to be more pronounced for CdTe/CdS samples with green or yellow emission for which quantum yields increased up to three times. The epitaxial growth of the ZnO shell was confirmed by X-ray photoelectron spectroscopy and luminescence decay experiments. Because of the passivation of surface defects, a PL lifetime of 33.6 ns was measured for core/shell/shell CdTe/CdS/ZnO QDs prepared with a Zn/Cd ratio of 0.8, while it was only 17.7 ns for core/shell CdTe/CdS QDs.

1. Introduction

In the past decade, colloidal luminescent semiconductor nanocrystals, often referred to quantum dots (QDs), have attracted much attention because of their unique optical properties that are superior to those of conventional organic fluorophores. Indeed, their wide absorption spectrum, narrow emission, large extinction coefficients, and photostability are some of the most attractive characteristics.^{1–5} Because of these properties, QDs are becoming a new class of powerful tools in biological and medical applications for sensing, labeling, optical imaging, cell separation, and treatment of disease.^{6–9} However, these applications require QDs that are well-dispersed and stable in aqueous solution, thus creating a need to further engineer QD coatings because high-quality QDs are generally prepared via the organometallic route (e.g., core/shell CdSe/ZnS, core/shell/shell CdSe/CdS/ZnS, and core/shell/shell CdSe/CdTe/ZnSe) and are stabilized by hydrophobic ligands such as tri-*n*-octylphosphine/tri-*n*-octylphosphine oxide.^{10–12} Several strategies (use of hydrophilic thiol stabilizer, incorporation into polymers or micelles, etc) have been developed to transfer hydrophobic QDs to the aqueous phase. Although these methods are efficient, they require additional steps. Moreover, the photoluminescence quantum yield (PL QY) of the QDs generally decreases when

they are transferred into water because of the high polarity of this solvent that breaks various equilibria related to the QDs.¹³ Nevertheless, aqueous synthesis is an alternative strategy to directly prepare water-dispersed QDs. In addition, this method is cheaper, simpler, and less toxic. In recent years, methods of preparing luminescent QDs have been significantly improved. Nanocrystals such as CdSe^{14–17} or CdTe^{17–19} capped with small thioalkyl acids, generally thioglycolic acid (TGA) or 3-mercaptopropionic acid (MPA), have been prepared either by heating at 100 °C, the hydrothermal method, or microwave-assisted synthesis.^{20,21} Modest QYs (generally lower than 20%) and poor biocompatibility of these QDs have however hold back the potential applications of QDs prepared via an aqueous method.

The surface control of nanocrystals is a critical issue for enhancing photostability and luminescence efficiency.²² In recent years, much effort has been invested in surface coating to enhance the chemical and optical stability of QDs. Because II–VI semiconductors have anionic and cationic surface sites, a classical organic capping leaves a relatively large number of unpassivated sites, and consequently, their PL QYs are generally modest. Moreover, the surface coverage of these QDs is limited because of the steric bulk of the capping ligand.¹⁷ Heteroepitaxially growing an inorganic shell of a wider band gap semiconductor around the core improves the PL QY by decreasing nonradiative recombination.^{23,24} Indeed, if the band gap of the core is enclosed by that of the shell, then the wave functions of electrons and holes are confined within the core region, thus reducing the probability of nonradiative decay into surface states and trap sites.^{25,26}

* To whom correspondence should be addressed. Phone: +33 3 83 17 50 53. E-mail: raphael.schneider@ensic.inpl-nancy.fr.

[†] LCPME, Nancy-University.

[‡] DCPR, Nancy-University.

[§] DPG, Université de Haute Alsace.

^{||} IJL, Nancy-University.

[⊥] LIMOS, Nancy-University.

[#] SCMEM, Nancy-University.

Wurtzite ZnO is an important wide band gap semiconductor possessing a band gap energy of 3.37 eV at room temperature and exciton binding energy of 60 meV that has found many applications in electronic and optical devices.^{26–28} However, because of the high lattice mismatch between ZnO and CdTe or CdS (29 and 21%, respectively), preparation of core/shell CdTe/ZnO or core/shell/shell CdTe/CdS/ZnO QDs and the effects of the ZnO shell on the optical properties of aqueous CdTe core QDs have not yet been studied. In this work, we report for the first time that the growth of a thin ZnO shell on MPA-stabilized core/shell CdTe/CdS QDs in aqueous solution induces a significant redshift of absorption and emission peaks and an increase in radiative lifetime when the shell layer grew. This evolution is affected by the core size and shell thickness. The structural and photophysical properties of QDs were characterized by transmission electron microscopy (TEM), atomic force microscopy (AFM), X-ray diffraction (XRD), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), dynamic light scattering (DLS), and optical spectroscopy.

2. Experimental Procedures

2.1. Instrument. All optical measurements were performed at room temperature (20 ± 2 °C) under ambient conditions. Absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer (Lambda 2, Courtabouef, France) UV–visible spectrophotometer. Fluorescence spectra were recorded on a Fluorolog-3 spectrofluorimeter F222 (Jobin Yvon, Longjumeau, France) equipped with a thermostatted cell compartment (25 °C), using a 450 W xenon lamp. The QY values were determined by the equation: $QY(\text{sample}) = (F_{\text{sample}}/F_{\text{ref}})(A_{\text{ref}}/A_{\text{sample}})(n_{\text{sample}}^2/n_{\text{ref}}^2)QY(\text{ref})$, where F , A , and n are the measured fluorescence (area under the emission peak), absorbance at the excitation wavelength, and refractive index of the solvent, respectively. PL spectra were spectrally corrected and quantum yields were determined relative to Rhodamine 6G in ethanol ($QY = 94\%$).²⁹ Fluorescence lifetimes were measured using the time-correlated single-photon counting technique with FL920-fluorescence lifetime spectrometer (Edinburgh instrument) with the instrument response of ~ 1 ns. The excitation source was an nF900 ns flash lamp. The decays were fitted with the iterative reconvolution method on the basis of the Marquardt–Levenberg algorithm.³⁰ Such a reconvolution technique³¹ allows an overall time resolution down to 0.2 ns. The quality of the exponential fits was checked using the reduced χ^2 (≤ 1.2).

To determine the morphology and diameters of the nanoparticles, the samples were analyzed *ex situ* by atomic force microscopy (AFM) and transmission electron microscopy (TEM). AFM characterization was carried out using a Digital Instruments Nanoscope III. AFM measurements were done by tapping mode using a Si_3N_4 tip with resonance frequency and spring constant being 100 kHz and 0.6 N m^{-1} , respectively to provide surface topography. TEM and HRTEM images were taken by placing a drop of the particles in water onto a carbon film-supported copper grid. Samples were studied using a Philips CM20 instrument with LaB_6 cathode operating at 200 kV. Dynamic light scattering (DLS) was performed at room temperature using a Malvern zetasizer HsA instrument with an He–Ne laser ($4 \times 10^{-3} \text{ W}$) at a wavelength of 633 nm. The QD aqueous solutions were filtered through Millipore membranes ($0.2 \mu\text{m}$ pore size). The data were analyzed by the CONTIN method to obtain the hydrodynamic diameter (d_H) and size distribution in each aqueous dispersion of nanoparticles. XPS measurements were performed at a residual pressure of 10^{-9} mbar, using a KRATOS Axis Ultra electron energy analyzer

operating with an Al $K\alpha$ monochromatic source. Powder (XRD) analyses were obtained using Panalytical X'Pert Pro MPD diffractometer using Cu $K\alpha$ radiation. Crystalline grain sizes were obtained using the size broadening models built into FullProf and an instrumental resolution function obtained with a LaB_6 standard sample.

2.2. Reagents and Materials. The chemicals used in the experiments included $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (99%), 3-mercaptopropionic acid (MPA, 99+%), sodium borohydride (96%), tellurium powder (99.9%), $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ (99.99%), and *iso*-propanol (*i*-PrOH, HPLC grade). All chemicals were used without further purification.

2.3. Preparation of Water-Soluble Core/Shell CdTe/CdS QDs. The sodium hydrogen telluride NaHTe solution was prepared by reacting NaBH_4 with tellurium powder (2.5/1 molar ratio). Briefly, 37 mg (1 mmol) of sodium borohydride and 50 mg (0.4 mmol) of tellurium powder were added to a small Schlenk flask, and air in the system was pumped off for 30 min and replaced with N_2 . Then, 10 mL of ultrapure water was added. The reaction mixture was heated at 80 °C for 30 min under flowing N_2 . The deep red aqueous solution obtained was immediately used for the preparation of core/shell CdTe/CdS QDs. The concentration of the NaHTe solution was 0.04 M.

The CdTe/CdS QDs were prepared by using the reaction between CdCl_2 and NaHTe in the presence of MPA as the stabilizing agent, following the method described previously³² with some modifications. The molar ratio of $\text{Cd}^{2+}/\text{Te}^{2-}/\text{MPA}$ was 2/1/4.8. Briefly, $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$, and MPA were dissolved in 100 mL of nitrogen-saturated ultrapure water ($[\text{Cd}^{2+}] = 1.25$ or 10.9 mM for reactions performed at 100 °C and at 150 °C, respectively), and the pH was adjusted to 9.0 with 1 M NaOH. Then, the NaHTe solution was added to the above precursor solution. The complex solution with a faint red color was either refluxed at 100 °C for 15 h or put into a Teflon-lined stainless steel autoclave with a volume of 125 mL. The autoclave was maintained at 150 °C for a designed time and then cooled to room temperature. Different-sized CdTe/CdS QDs were prepared by varying the synthesis time (1, 1.5, and 2 h for CdTe/CdS QDs with average diameters of 1.9, 3.1, and 3.4 nm, respectively).

2.4. Preparation of Core/Shell/Shell CdTe/CdS/ZnO QDs. The Zn^{2+} injection solution (0.01 M) was prepared by dissolving $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ in aqueous solution. The molar ratio of Zn/Cd was controlled within 0.2/1 and 1/1. Briefly, the crude CdTe/CdS QDs were first added to a three-necked flask and heated under air at 100 °C. For a Zn/Cd ratio of 0.4/1, 2.5 mL of the $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ solution was first injected at a speed of 0.3 mL/min into the solution and further refluxed 1 h. After that period, another 2.5 mL portion of the $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ solution was injected, and the mixture was further heated for 1 h. The obtained CdTe/CdS/ZnO QDs were precipitated by adding *i*-PrOH and centrifuged at 4000 rpm. QDs were dried *in vacuo* at room temperature and redissolved in water. Their concentration was estimated from the reported extinction coefficient per mole of particles (ϵ) by using the Beer–Lambert's law.³³

2.5. Photostability of Core/Shell/Shell CdTe/CdS/ZnO QDs. The photostability of aqueous dispersions of CdTe/CdS and of CdTe/CdS/ZnO QDs was investigated by irradiating the samples with a 180 mW Hg–Xe lamp under open air condition at room temperature. The distance between the sample solutions and lamp was fixed to 20 cm. Aliquots of the sample solution were taken at regular intervals for PL measurements and absorption characterization.

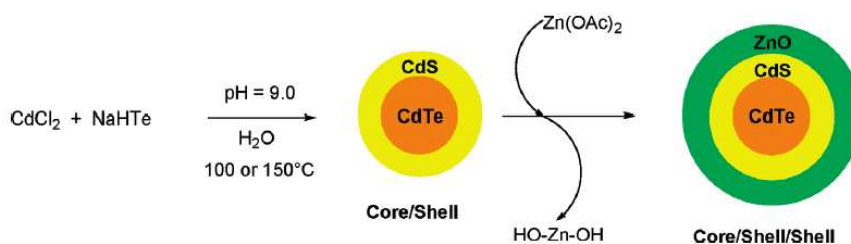


Figure 1. Schematic of the synthesis of water-soluble CdTe/CdS/ZnO core/shell/shell QDs.

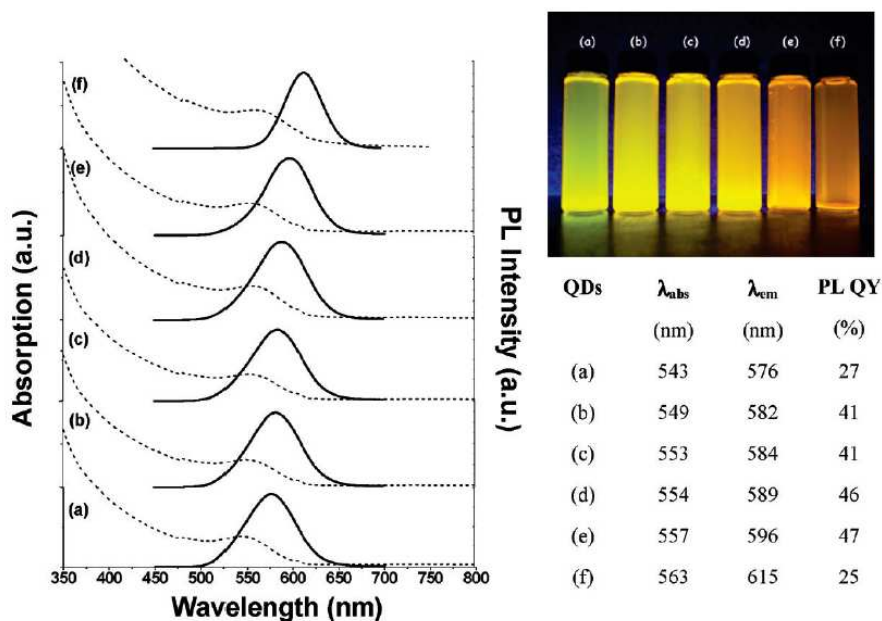


Figure 2. Absorption (dotted line) and PL (solid line) spectra after growing the ZnO shell around CdTe/CdS core/shell QDs. (a) CdTe/CdS solution taken at a reflux time of 15 h, (b) Zn/Cd = 0.2, (c) Zn/Cd = 0.4, (d) Zn/Cd = 0.6, (e) Zn/Cd = 0.8, and (f) Zn/Cd = 1.0. Related PL QYs and photograph of the samples under irradiation with 365-nm ultraviolet light from a UV lamp are presented on the right.

3. Results and Discussion

Highly luminescent core/shell CdTe/CdS QDs possessing an average diameter of 2.1 nm (determined by TEM) were first prepared in aqueous solution by refluxing CdCl₂ and NaHTe in water for 15 h at pH 9.0 in the presence of MPA.³² The core/shell/shell QDs were prepared by the slow injection of a 0.01 M aqueous solution of Zn(OAc)₂ to the crude CdTe/CdS QDs and further refluxing for 2 h. At basic pH (pH value measured at the end of the hydrothermal synthesis of CdTe/CdS QDs was found to be 8.7), Zn(OAc)₂ is first hydrolyzed and converted into its hydroxide Zn(OH)₂. Dehydration of Zn(OH)₂ produces ZnO clusters that grow at the surface of CdTe/CdS nanocrystals to form the ZnO shell (Figure 1).

Zn/Cd molar ratios of 0.2/1, 0.4/1, 0.6/1, 0.8/1, and 1/1 were used to evaluate the influence of the thickness of the ZnO shell on the PL properties of the QDs. Figure 2 displays the representative UV-vis absorption and PL spectra of CdTe core QDs and those of core/shell/shell CdTe/CdS/ZnO QDs after coating the ZnO shell. With the injection of Zn(OAc)₂ solution and further refluxing, the absorbance of CdTe core QDs shifts to longer wavelengths. Typically, after two times adding the Zn²⁺ solution to QDs with an average diameter of 2.1 nm and using a Zn/Cd ratio of 0.8, the absorption peak of the resulting core/shell/shell QDs shifted from 543 to 557 nm. Meanwhile, the emission peak shifted from 572 to 596 nm, and the PL QY increased from 27% for the CdTe core QDs to 47% for core/shell/shell CdTe/CdS/ZnO QDs prepared with a Zn/Cd molar

ratio of 0.8/1, revealing a good passivation of the core surface and elimination of surface trap states. The corresponding full width at half-maximum (fwhm) of the emission peaks was maintained during the shell growth, about 60 nm, indicating that relatively monodispersed particles were obtained. Contrary to CdTe QDs covered by a CdS shell,³⁴ the shape of the first exciton peak remains invariant regardless of the thickness of the ZnO shell. No deep trap luminescence is detected, indicating good emissive properties of the QDs. The good PL QYs of the CdTe/CdS/ZnO QDs can be maintained for several months at ambient temperature. Compared to the corresponding CdTe QDs parent aqueous solution whose PL QY decreased from 27 to 17% after 4 months storage in water at a concentration of 1000 nM, the PL QY of CdTe QDs covered by the ZnO shell (Zn/Cd = 0.8) was virtually identical (46%) after the same storage period. Above a value of 0.8 for the Zn/Cd ratio, a significant drop of the PL QY is clearly measured. Similar observations were ascribed to the strain released through the formation of dislocations in the shell with increasing shell thickness, e.g., for core/shell CdSe/ZnS QDs.^{35–37} In our case, the decrease in PL QY was also accompanied by aggregation of QDs indicating a saturation effect. Only very thin shells (<1 monolayer) of the ZnO material can be overcoated on the CdTe/CdS QDs (vide infra), although large excesses of the shell precursor have been used. This situation is probably due to the strong binding capacity of the MPA ligand to the CdTe nanocrystals or CdS shell, which prevents the addition of the shell precursor around

TABLE 1: Absorption and Emission Wavelengths and PL QYs of CdTe/CdS@MPA QDs before and after ZnO Shell Growth

material diameter (nm)	CdTe/CdS core			CdTe/CdS/ZnO (Zn/Cd = 0.4)			CdTe/CdS/ZnO (Zn/Cd = 0.8)		
	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	PL QY (%)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	PL QY (%)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	PL QY (%)
1.9	486	533	11	526	583	34	541	601	18
3.1	536	572	13	554	603	26	560	617	25
3.4	573	622	53	585	635	56	587	651	47

the core QDs. The use of long-length mercapto alkanolic acid (6-mercaptohexanoic acid, 11-mercaptoundecanoic acid, or dihydrolipoic acid)-stabilized CdTe QDs¹⁷ as core for the growth of the ZnO shell does not have any effects on the absorption and emission. It is likely that the steric bulk of the ligand and/or the formation of a macrocyclic annulus complex that wraps around the CdTe/CdS nanoparticles via the interaction between the carboxyl group of the acid function and surface cadmium atoms completely hinder the formation of the ZnO shell. It is also worth noting that the electrophoretic mobility of CdTe/CdS@MPA QDs on cellulose acetate in a borate buffer (pH 9.0) was not altered by the introduction of the ZnO shell. CdTe/CdS@MPA and CdTe/CdS/ZnO@MPA QDs migrate similarly from the negative pole to positive pole in the electrophoresis run. According to the band gap evolution displayed by the absorption spectra and the gradual increase in PL QY with the thickness of the ZnO shell and invariance of the corresponding emission band widths, we have strong indications that CdTe/CdS/ZnO have typical type-I behavior.³⁸

CdTe/CdS@MPA QDs with growing diameters were prepared under hydrothermal conditions at 150 °C by varying the synthesis time and using a Cd²⁺/NaHTe/MPA ratio of 2/1/4.8. Three samples were obtained with average QDs diameters of 1.9, 3.1, and 3.4 nm, and their respective photophysical data are collected in Table 1. The diameter increase in QDs leads to marked redshift of the first exciton peak in absorption and also to a redshift of the fluorescence band whose maximum emission wavelength increases from 533 to 622 nm (Figure 3). When a Zn/Cd ratio of 0.4 is used for the growth of the ZnO shell, absorption and fluorescence bands are strongly red-shifted as compared to that observed for QDs without a ZnO shell. In the meantime, the PL QY is multiplied by a factor 3, 2, and 1.1.

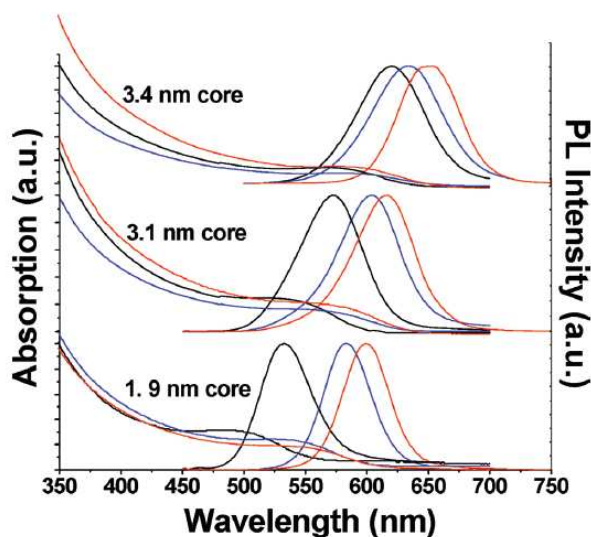


Figure 3. Absorption and photoluminescence spectra of CdTe/CdS QDs and of core/shell/shell CdTe/CdS/ZnO QDs after shell growth. Core diameters are given. Two Zn/Cd ratios were used for ZnO shell growth: Zn/Cd = 0.4 (blue line) and Zn/Cd = 0.8 (red line).

Figure 4 shows photographs of the QDs prepared from the CdTe/CdS@MPA core with an average diameter of 3.1 nm. As can be seen, CdTe/CdS/ZnO QDs are very bright, even at normal room light irradiation. It is also worth noting that the magnitude of the redshift is clearly dependent on the core size with a larger spectral shift for smaller QDs. Such an effect was also reported when growing a CdS shell around CdSe QDs.³⁹

A low temperature (100 °C) is favorable for good epitaxial growth of the ZnO shell. The aggregation of nanocrystals observed at a Zn/Cd ratio of 1/1 was also obtained when deposition of Zn(OH)₂ was attempted under hydrothermal conditions (120 or 150 °C). Blank experiments also demonstrated that the redshift observed for absorption and emission spectra (Figures 2 and 3) is due to the ZnO shell growth and not to the continuous growth of CdTe QDs or formation of a CdS shell with a larger band gap than that of CdTe^{40,41} by basic hydrolysis of the MPA ligand at the surface of CdTe QDs. Moreover, when CdTe/CdS@MPA QDs prepared at 100 °C and isolated from the reaction medium by precipitation with *i*-PrOH were redissolved in water at pH 11.0 and heated for 2 h at 100 °C to force the basic hydrolysis of MPA, a significant redshift was observed in the absorption and PL spectra (about 20 nm starting from green-emitting CdTe@MPA QDs with an average diameter of 1.9 nm, $\lambda_{\text{abs}} = 486$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 533$ nm, and PL QY

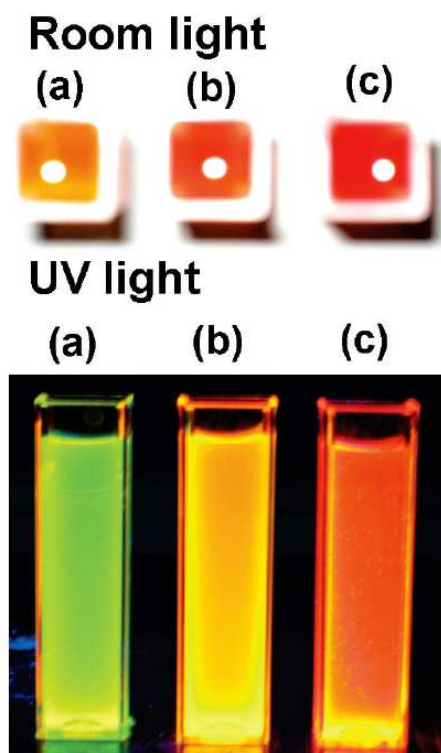


Figure 4. Photographs under room light or UV radiation of (a) CdTe/CdS QDs with a diameter of 3.1 nm, (b,c) CdTe/CdS/ZnO QDs prepared from the same core using Zn/Cd ratios of 0.4 and 0.8, respectively.

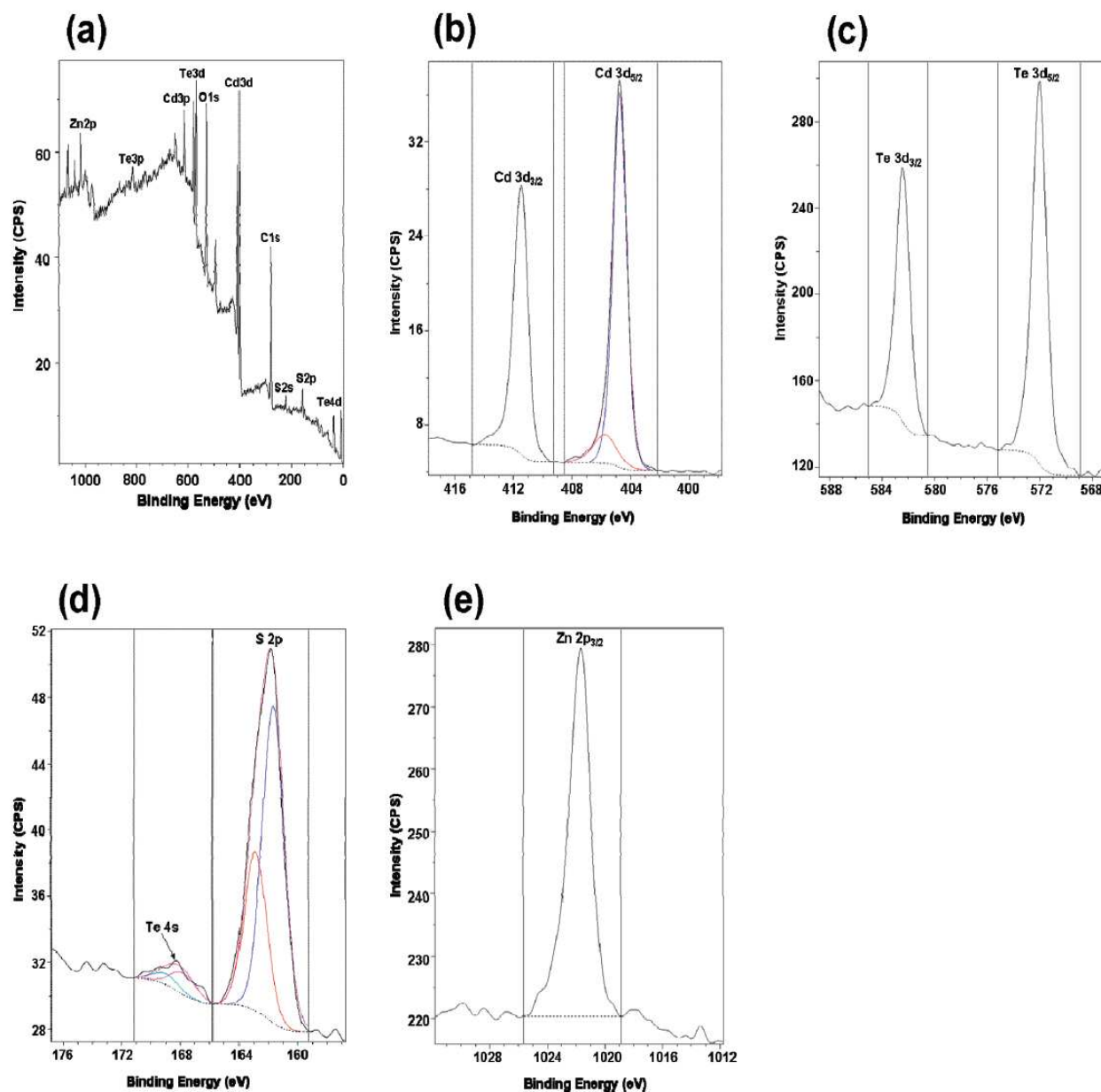


Figure 5. XPS spectra of CdTe/CdS/ZnO QDs. (a) XPS survey spectrum. Binding energy spectra of (b) Cd 3d, (c) Te 3d, (d) S 2p, and (e) Zn 2p.

= 11%). This redshift is a direct consequence of the decrease in the kinetic energy of the excited electron and a hole in the nanocrystals because of the spreading of their wave functions into the CdS shell⁴² but is much weaker than that obtained after addition of Zn(OAc)₂ (about 50 nm). PL intensity enhancement was also more pronounced after the introduction of the ZnO shell (34%) compared to CdTe/CdS QDs obtained after the forced hydrolysis process (20%). Moreover, upon addition at room temperature of aqueous solutions of Zn(OAc)₂ to a dispersion of 2.3 nm wide CdTe/CdS QDs at pH 9.0 (Zn/Cd ratios were varied from 0.2 to 1.0), the absorption spectra stayed unchanged ($\lambda_{\text{abs}} = 499$ nm). Meanwhile, the fluorescence emissions were gradually redshifted (from 534 to 539 nm) and PL QY increased from 13 to 16.7% (Figure S1 of the Supporting Information). This experiment clearly ruled out the simple coordination of the Zn²⁺ cation with negatively charged MPA-capped nanocrystals⁴³ when the reaction was conducted at 100 °C.

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) is a sensitive tool for the analysis of the chemical composition of materials, and hence, XPS was used to analyze the changes on the surface of MPA-coated CdTe-core QDs by the ZnO shell growth. Figure 5 is the typical XPS spectra of the CdTe/CdS/ZnO nanoparticles, where panel a is the survey spectrum and panels b–e are the high-resolution binding energy spectra for Cd, Te, S, and Zn species, respectively. According to the survey spectrum, the elements Cd, Te, S, Na, O, Zn, and C were detected. The typical peaks of Cd 3d_{5/2} at 405.0 eV, Cd 3d_{3/2} at 411.6 eV, Te 3d_{5/2} at 572.0 eV, Te 3d_{3/2} at 582.4 eV, and S 2p at 162.0 eV appeared in all XPS spectra, confirming the existence of cadmium, tellurium, and sulfur in the QDs. During the shell growth, we observed no significant changes for the S 2p_{3/2} and S 2p_{1/2} doublet at 161.6 and 162.8 eV, respectively, indicating that the coordination situations for S (from the MPA ligand and CdS shell formed during decomposition of MPA) were not affected.^{40,44} The peak at around 1021.7 eV comes from Zn 2p_{3/2}.

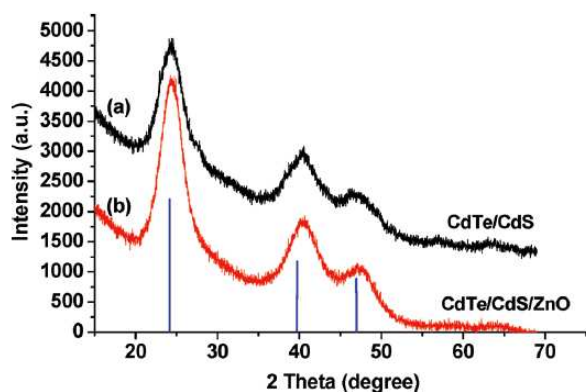


Figure 6. XRD patterns of CdTe/CdS@MPA nanocrystals recorded (a) before and (b) after ZnO shell growth. Standard diffraction lines of cubic CdTe are shown at the bottom.

This binding energy is consistent with that of the Zn element linked to oxygen (values between 1021.6 and 1021.9 eV) and confirms that the shell is formed by basic hydrolysis of Zn(OAc)₂ and not by reaction of Zn²⁺ ions with S²⁻ ions arising from the decomposition of MPA.^{40,44}

Figure 6 displays the X-ray diffraction (XRD) patterns of the starting MPA-stabilized CdTe/CdS cores prepared under hydrothermal conditions possessing an average diameter of 2.1 nm of the core/shell/shell CdTe/CdS/ZnO QDs (Zn/Cd = 0.8) precipitated from aqueous solution with an excess of *i*-PrOH, and for comparison, the standard XRD pattern of cubic CdTe is also shown. The broad peaks imply that the nanocrystals are very small. The diffraction pattern of the bare CdTe core QDs is consistent with that of the bulk cubic CdTe structure (JCPDS 75-2086) but slightly displaced toward larger 2θ values and lies between those inherent to the CdTe and CdS wurtzite phase due to the formation of core/shell CdTe/CdS QDs by decomposition of the MPA ligand at 150 °C. The emergence of the ZnO wurtzite phase was not observed, similar to the formation of a CdS shell on CdTe core QDs reported in the literature.^{40,41,45} This could be related to the poor crystallinity of the ZnO layer or to the low content of ZnO in the core/shell/shell nanoparticles. There is no recognizable difference on the positions of XRD reflections between CdTe/CdS@MPA and CdTe/CdS/ZnO@MPA QDs, and XRD patterns have roughly the same shape, which further demonstrates the formation of the core/shell/shell structure and shows that the shell does not disturb the crystalline form of the core. The lattice constant of CdTe nanocrystals at atmospheric pressure is 6.482 Å. The XRD data of the CdTe/CdS QDs prepared and refined with the Rietveld method⁴⁶ using the Fullprof program reveal a crystalline structure in a cubic phase $F43m$ with a reduced lattice constant of 6.398 Å due to the strain imposed by the CdS layer at the surface of CdTe QDs. Because the lattice parameter of wurtzite ZnO ($a = 3.249$ Å) is considerably smaller than that of CdTe and CdS, the ZnO shell compresses again the CdTe/CdS core. The lattice parameter of CdTe in core/shell/shell QDs is 6.389 Å. Small crystallite sizes manifest in the diffraction pattern by a broadening of the Bragg peaks. Figures S2 and S3 of the Supporting Information show the Rietveld refinements using spherical harmonics for the CdTe system built in the FullProf program.⁴⁷ A crystallite size of 2.0 ± 1.0 nm is given with a standard deviation (anisotropy) of 0.23 nm, so we can assume that there is no anisotropic size contribution. This size value correlated well with the results obtained from TEM analysis (vide infra).

Figure 7 shows TEM and HRTEM images of the CdTe/CdS QDs prepared at 100 °C and core/shell/shell CdTe/CdS/ZnO

QDs (Zn/Cd = 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1.0), whose PL spectra are presented in Figure 2. The observed increment in particle size results from the growth of the ZnO shell and correlates well with the Zn(OAc)₂ amount injected in the reaction mixture. This, in turn, proves that the ZnO shell thickness of CdTe/CdS/ZnO QDs can be well-controlled by our synthesis technique. CdTe/CdS@MPA are spherical with an average diameter of 2.1 ± 0.5 nm. Despite the lattice mismatch between CdS and ZnO, core/shell/shell CdTe/CdS/ZnO QDs remain spherical with diameters increasing gradually to 2.2, 2.3, 2.5, and 2.7 nm when varying the Zn/Cd ratio from 0.2 to 0.8. The diameters estimated from TEM images are coherent with those calculated using the published sizing curve and size-dependent molar extinction coefficient at the first absorption maximum³³ and correlated well with the values obtained from AFM analyses (Figure S4 of the Supporting Information). The average diameter of nanocrystals prepared with a Zn/Cd ratio of 1/1 increased to 3.1 nm. The strong decrease in PL QY measured for these particles (25%) may either originate from the weaker quantum confinement effect due to the larger particle size or from the strain released through the formation of dislocations in the shell with increasing shell thickness. Because a monolayer of ZnO (distance between consecutive planes along the [002] axis in bulk wurtzite ZnO) is 0.26 nm,³⁵ the diameter of one monolayer passivated CdTe/CdS QDs would be increased by 0.52 nm. Average diameters of 2.5 and 2.7 nm, respectively, were attained for Zn/Cd ratios of 0.6 and 0.8 nm (the original core covered by about one monolayer of ZnO) and corresponds to nanocrystals with the highest PL QYs (46 and 47%, respectively).

Aqueous dispersions of native CdTe/CdS QDs and CdTe/CdS/ZnO QDs (Zn/Cd = 0.4) were further analyzed by dynamic light scattering (DLS). Figure 8 shows the scattering intensity distributions of both QDs after about 2 days storage in phosphate buffer saline (PBS). The average hydrodynamic sizes determined from DLS data were 13.2 and 9.7 nm, respectively, for MPA-stabilized CdTe/CdS and CdTe/CdS/ZnO QDs, suggesting that the nanoparticles dispersed well in PBS. For both particles, the hydrodynamic diameters were larger than the diameters of the inorganic cores due to the solvation layer around the QDs in the buffer solution. Particle size distribution was also found to be narrower after the growth of the ZnO shell. The two batches of QDs were found to be quite aggregate-free and therefore adequate for biological labeling.

Figure 9 shows the PL decay curves measured at the respective emission peak wavelengths for CdTe/CdS QDs and core/shell/shell CdTe/CdS/ZnO heterostructures (Zn/Cd = 0.4 and 0.8, respectively), whose PL spectra are presented in Figure 2. Nanosecond PL decays of these QDs are shown at the bottom of Figure 9. The decays of all samples are confidently fitted with two exponentials. Such a behavior is often observed for the radiative deactivation of colloidal II–VI QDs.^{48–52} The lifetimes τ of fast and slow decays are reported in Table 2.

The shorter lifetime can be attributed to exciton recombination,^{53,54} while the longer time can be associated with the involvement of surface states in the carrier recombination process.^{55–57} It is found that increasing shell thickness results in longer exciton lifetimes. For CdTe/CdS QDs, the average lifetime τ_{av} is 17.7 ns. The lifetime lengthens to 28.3 and 33.6 ns for core/shell/shell QDs prepared with Zn/Cd ratios of 0.4 and 0.8, respectively. The results depicted in Table 2 show that the contribution of nonradiative processes to exciton decay is significantly reduced and/or that exciton trapping at surface defects is less efficient as a consequence of the extra ZnO inorganic shell.

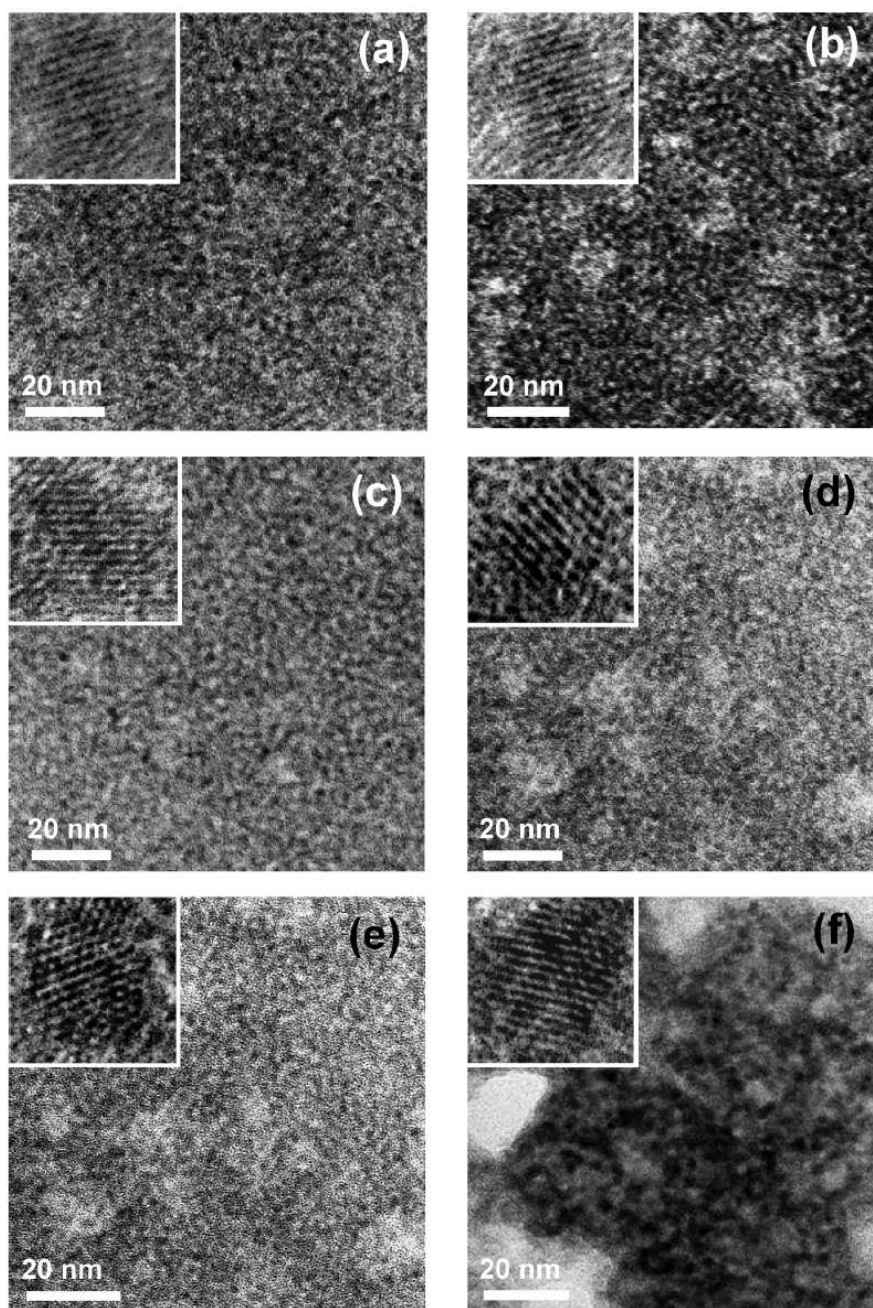


Figure 7. TEM and HRTEM (insets) micrographs of (a) CdTe/CdS core QDs and the same core with different thickness shells of ZnO: (b) Zn/Cd = 0.2, (c) Zn/Cd = 0.4, (d) Zn/Cd = 0.6, (e) Zn/Cd = 0.8, (f) Zn/Cd = 1.0.

The QDs have the advantage of long lifetimes under UV or visible excitation over those of organic dyes, and therefore, they can be used as fluorescent labels to examine the long-term kinetics of molecular–cellular interactions. Figure 10 shows the changes in the absorption and fluorescence spectra of MPA-stabilized CdTe/CdS QDs (diameter = 2.3 nm, PL QY = 15%) and of the same QDs covered by a ZnO shell (Zn/Cd = 0.4) in neutral solution during irradiation with a Hg/Xe lamp. Recent studies have shown that photobleaching of thiol-capped QDs was mainly due to oxygen-dependent photooxidation.^{58–60} The irradiation of CdTe QDs capped by thioglycolic acid (TGA) promotes oxidation of unsaturated Te atoms, which are known to be highly susceptible to oxidation.⁶⁰ Meanwhile, TGA is oxidized and detaches from the QD surface, resulting in

photobleaching and aggregation of QDs. For CdTe/CdS QDs capped with MPA, the initial exciton peak at 500 nm and fluorescence peak at 533 nm exhibited a gradual blueshift to 451 and 521 nm, respectively, during irradiation due to the formation of a CdTe_xS_{1-x} alloyed structure with a larger band gap energy compared to that of pure CdTe QDs.^{61–63} Furthermore, it is noted that the bandwidth of the emission increases from 42 to 55 nm. The PL QYs were first enhanced (up to 18.3%) during the first 5 min of the experiment because surface traps were effectively eliminated by photocorrosion and then gradually decreased overtime (7.2% after 10 min irradiation). CdTe/CdS/ZnO QDs showed much smaller shifts in absorption and emission wavelengths, from 542 to 531 nm and from 572 to 563 nm, respectively. As expected, no significant enhance-

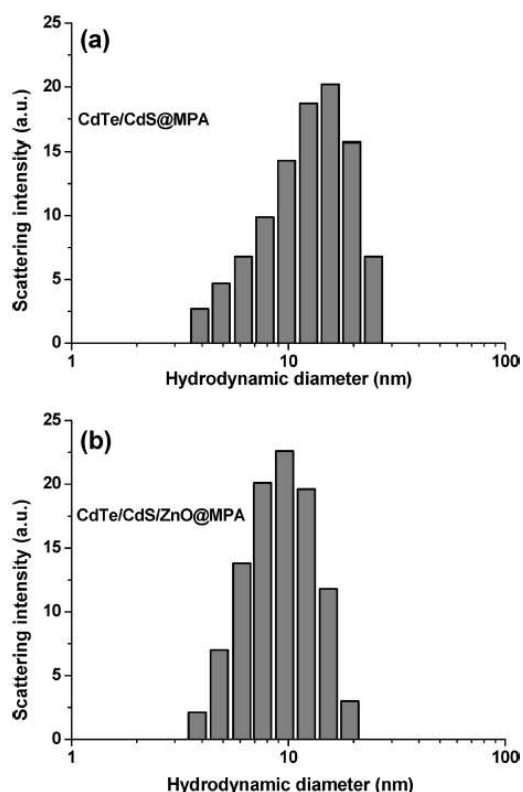


Figure 8. Intensity-hydrodynamic size distribution graphs of (a) CdTe/CdS QDs and of (b) CdTe/CdS/ZnO QDs in PBS solution at 25 °C.

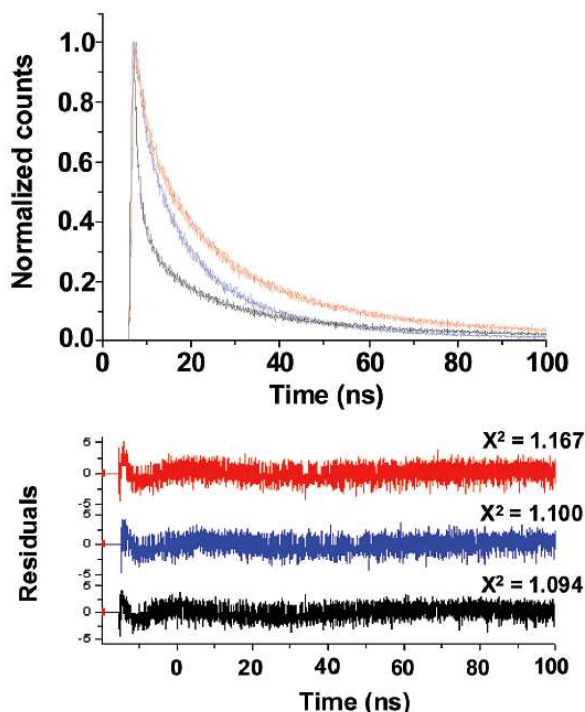


Figure 9. Luminescence decay curves of CdTe/CdS (black curve) and CdTe/CdS/ZnO QDs prepared using Zn/Cd ratios of 0.4 (blue curve) and 0.8 (red curve). Excitation wavelength is 405 nm. Lower panel shows weighted residuals for biexponential fits.

ment of the fwhm of PL spectra was observed (from 61 to 62 nm) because of the protection of the ZnO shell. The decrease

TABLE 2: Time Constants τ_1 and τ_2 and Average Lifetime τ_{av} of Core/Shell CdTe/CdS QDs and of Core/Shell/Shell CdTe/CdS/ZnO QDs

sample (ns)	CdTe/CdS	CdTe/CdS/ZnO (Zn/Cd = 0.4)	CdTe/CdS/ZnO (Zn/Cd = 0.8)
τ_1	23.8	36.6	46.0
τ_2	7.4	10.9	11.5
τ_{av}	17.7	28.3	33.6

in PL QYs was constant (from 27 to 21%) after 10 min irradiation but less marked than with CdTe/CdS QDs, thus demonstrating that the ZnO shell enhances the photostability of CdTe/CdS/ZnO QDs.

The usefulness of the engineered nanoparticles for bioimaging applications was investigated using a staining test of surface-attached microbial communities (biofilms) using green- or red-emitting CdTe/CdS/ZnO QDs. Biofilms of *Shewanella oneidensis* were grown for 48 h under the constant flow (200 μ L/min) of a LML medium⁶⁴ supplemented with fumarate (0.5 mM) in flow cell systems that can be accommodated on a microscope setup. After the growth period, a 250 nM solution of QDs was injected via a syringe pump, and incubation was performed for 5 min. Unbound QDs were removed by washing the biofilm with a fresh culture medium. Comparison of the phase contrast image (Figure 11a) and of the Z-scan image (Figure 11b) shows that QDs were quite homogeneously distributed in the biofilm. Higher magnification confocal images (data not shown) demonstrate that CdTe/CdS/ZnO@MPA QDs only associate with some *S. oneidensis* cells, while their accumulation in extracellular polymers or association with proteins was more marked. Figure 11c shows that the typical mushroom structure of the biofilm can readily be identified through fluorescence imaging with CdTe/CdS/ZnO QDs. Finally, it should be noted that the MPA-stabilized QDs are not degraded during the experiment time when interacting with the biofilm as the different QDs used retained their distinct wavelength-specific emission properties.

The dependence of QD photobleaching on the irradiation time of the confocal microscope was also studied. The focused beam of the 405 nm diode of the confocal microscope was fixed at the selected spot (about 1 μ m in diameter using a 100x objective lens) and 500 nM aqueous dispersions of CdTe/CdS or CdTe/CdS/ZnO (Zn/Cd = 0.4) QDs were submitted to constant irradiation with measuring PL intensity every 10 s. Under low power intensity (about 0.14 10^{-3} W), both QDs were found to be stable. When the power intensity was increased to 1.2 10^{-3} W, both QDs were bleached over the experiment time (Figure 12) but PL decrease in core/shell/shell CdTe/CdS/ZnO QDs was slower and exhibited a half-lifetime three times longer as that of QDs without the ZnO shell. This clearly demonstrates that the presence of ZnO improves the QDs photostability.

Conclusions

In this study, a simple, cheap, and versatile synthesis of water-soluble core/shell/shell CdTe/CdS/ZnO QDs stabilized by 3-mercaptopropionic acid possessing high photoluminescence quantum yields was developed under the moderate temperature of hydrothermal growth. Depending on the Zn/Cd ratio used and diameter of the CdTe/CdS core, we found the emission color could be tuned in a large spectral range from green to red. After growth of the ZnO shell, the room-temperature fluorescence quantum yields reached values up to 50–60% for orange-red emitting samples, and luminescence lifetimes were increased. The ease of processing and good PL properties in aqueous solution of the core/shell/shell CdTe/CdS/ZnO QDs prepared

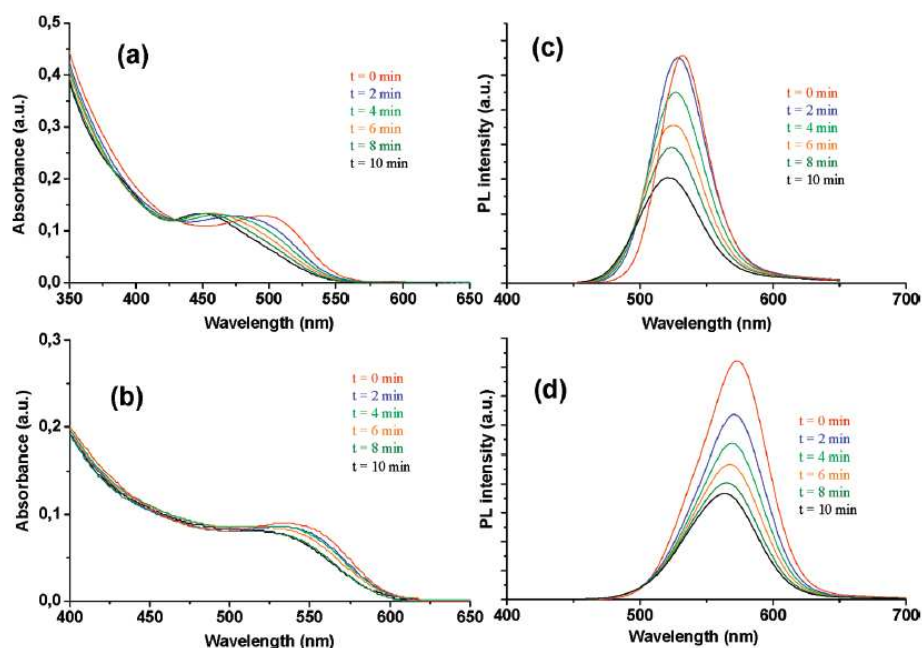


Figure 10. Time evolutions of absorption and PL spectra of (a,c) CdTe/CdS QDs and (b,d) CdTe/CdS/ZnO QDs under irradiation of a Hg/Xe lamp.

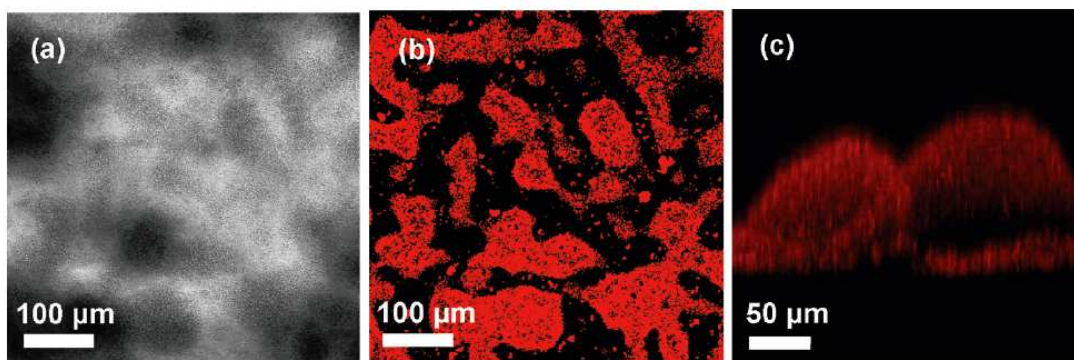


Figure 11. Confocal microscopy images of a *S. oneidensis* biofilm treated with CdTe/CdS/ZnO@MPA QDs: (a) transmission image, (b) corresponding XY plane fluorescence image, and (c) sum of XY planes. Confocal microscopy images were obtained with laser excitation at 405 nm.

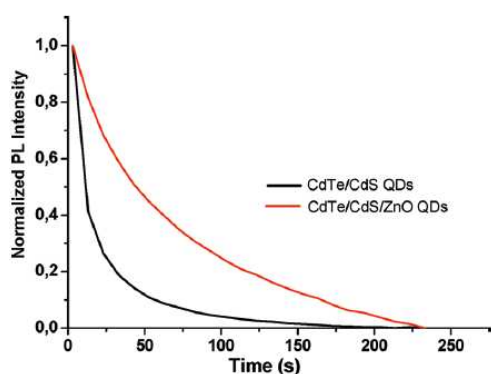


Figure 12. Photobleaching of CdTe/CdS and CdTe/CdS/ZnO QDs under the focused beam of a confocal diode (405 nm, $1.2 \cdot 10^{-3}$ W) as a function of time.

have great potential in biolabeling and lasing applications of semiconductor nanocrystals.

Acknowledgment. This work was supported by the Agence nationale pour la Recherche (ANR blanc 07, project DYNA-BIO). We express our gratitude to Dr. Jacques Lambert

(LCPME, Nancy-University) and Olivier Soppera (DPG, Mulhouse), respectively, for acquiring the XPS spectra and AFM images. The authors thank Dr. Serge Corbel (DCPR-Nancy University) for facilitating photostability experiments. The authors also thank Dr. Christophe Merlin (LCPME, Nancy-University) for helpful discussions and Dr. Marie-José Stebe (SRSMC, Nancy-University) for DLS measurements.

Supporting Information Available: Evolution of absorbance and emission spectra of CdTe/CdS QDs upon addition of Zn(OAc)₂ at room temperature, AFM characterization of CdTe/CdS and CdTe/CdS/ZnO QDs, and Rietveld refinement results of the powder XRD data of core/shell CdTe/CdS and of core/shell/shell CdTe/CdS/ZnO QDs. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References and Notes

- (1) Bruchez, M. P.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P. *Science* **1998**, *281*, 2013.
- (2) Chan, W. C. W.; Nie, S. M. *Science* **1998**, *281*, 2016.
- (3) Medintz, I. L.; Uyeda, H. T.; Goldman, E. R.; Mattoussi, H. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 435.
- (4) Weng, J.; Ren, J. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 897.

- (5) Sun, Q. J.; Wang, Y. A.; Li, L. S.; Wang, D. Y.; Zhu, T.; Xu, J.; Yang, C. H.; Li, Y. F. *Nat. Photonics* **2007**, *1*, 717.
- (6) Han, M.; Gao, X.; Su, J. Z.; Nie, S. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 631.
- (7) Alivisatos, A. P. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 198.
- (8) Rosi, N. L.; Mirkin, C. A. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1547.
- (9) Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L. A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S.; Weiss, S. *Science* **2005**, *307*, 538.
- (10) Qu, L.; Peng, X. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2049.
- (11) Talapin, D. V.; Mekis, I.; Gotzinger, S.; Kornowski, A.; Benson, O.; Weller, H. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 18826.
- (12) Blackman, B.; Battaglia, D.; Peng, X. *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 4847.
- (13) Wuister, S. F.; Swart, I.; Driel, F. V.; Hickey, S. G.; Donega, C. M. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 503.
- (14) Rogach, A. L.; Kornowski, A.; Gao, M.; Eychmüller, A.; Weller, H. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 3065.
- (15) Nikoobakht, B.; Burda, C.; Braun, M.; Hun, M.; El-Sayed, M. A. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 591.
- (16) Zhong, P.; Yu, Y.; Wu, J.; Lai, Y.; Chen, B.; Long, Z.; Liang, C. *Talanta* **2006**, *70*, 902.
- (17) Aldeek, F.; Balan, L.; Lambert, J.; Schneider, R. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 475401.
- (18) Zhang, Y.; Gao, S.; Ying, J. Y. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 376.
- (19) Mao, W.; Guo, J.; Yang, W.; Wang, C.; He, J.; Chen, J. *Nanotechnology* **2007**, *18*, 485611.
- (20) Zheng, Y.; Yang, Z.; Ying, J. Y. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1475.
- (21) He, Y.; Sai, L.-M.; Lu, H. T.; Hu, M.; Lai, W.-Y.; Fan, Q.-L.; Wang, L.-H.; Huang, W. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 359.
- (22) Alivisatos, A. P. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 13226.
- (23) Balet, L. P.; Ivanov, S. A.; Piryatinski, A.; Achermann, M.; Klimov, V. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1485.
- (24) Yang, H.; Holloway, P. H. *Adv. Func. Mater.* **2004**, *14*, 152.
- (25) Mokari, T.; Banin, U. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 3955.
- (26) Meulenkamp, E. A. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 5566.
- (27) Fu, Y.-S.; Du, X.-W.; Kulinich, S. A.; Qiu, J.-S.; Qin, W.-J.; Li, R.; Sun, J.; Liu, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 16029.
- (28) Houskova, V.; Stengl, V.; Bakardjeva, S.; Murafa, N.; Kalendova, A.; Oplustil, F. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 4215.
- (29) Fischer, M.; Georges, J. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *260*, 115.
- (30) Connor, D. V.; Phillips, D. *Time Correlated Single Photon Counting*, Academic Press: London, 1984.
- (31) Ven, M. V. D.; Ameloot, M.; Valeur, B.; Boens, N. *J. Fluoresc.* **2005**, *15*, 377.
- (32) Li, L.; Qian, H.; Fang, N.; Ren, J. *J. Lumin.* **2006**, *116*, 59.
- (33) Yu, W. W.; Qu, L. H.; Guo, W. Z.; Peng, X. G. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2854.
- (34) Zeng, Q.; Kong, X.; Sun, Y.; Zhang, Y.; Tu, L.; Zhao, J.; Zhang, H. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 8587.
- (35) Dabboussi, B. O.; Rodriguez-Viejo, J.; Mikulec, F. V.; Heine, J. R.; Mattoussi, H.; Ober, R.; Jensen, K. F.; Bawendi, M. G. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 9463.
- (36) Talapin, D. V.; Mekis, I.; Gotzinger, S.; Kornowski, A.; Benson, O.; Weller, H. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 18826.
- (37) Xia, R. G.; Kolb, U.; Li, J. X.; Basché, T.; Mews, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7480.
- (38) Li, J. J.; Wang, Y. A.; Guo, W. Z.; Keay, J. C.; Mishima, T. D.; Johnson, M. B.; Peng, X. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12567.
- (39) Mekis, A.; Talapin, D. V.; Kornowski, A.; Haase, M.; Weller, H. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 7454.
- (40) Bao, H.; Gong, Y.; Li, Z.; Gao, M. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 3853.
- (41) He, Y.; Lu, H.-T.; Sai, L.-M.; Lai, W.-Y.; Fan, Q.-L.; Wang, L.-H.; Huang, W. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 13370.
- (42) Peng, X.; Schlamp, M.; Kadavanich, A. V.; Alivisatos, A. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7019.
- (43) Susha, A. S.; Munoz Javier, A.; Parak, W. J.; Rogach, A. L. *Colloids Surf., A* **2006**, *281*, 40.
- (44) Meissner, D.; Benndorf, C.; Memming, R. *Appl. Surf. Sci.* **1987**, *27*, 423.
- (45) Wang, C. L.; Zhang, H.; Zhang, J. H.; Li, M. J.; Sun, H. Z.; Yang, B. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 2465.
- (46) Rietveld, H. M. *J. Appl. Crystallogr.* **1969**, *2*, 65.
- (47) Rodríguez-Carvajal, J. *Recent Developments of the Program FullProf*; Commission on Powder Diffraction Newsletter 26; International Union of Crystallography (IUCr): Ottawa, December 2001.
- (48) Kapitonov, A. M.; Stupak, A. P.; Gaponenko, S. V.; Petrov, E. P.; Rogach, A. L.; Eychmüller, A. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 10109.
- (49) Wang, X.; Qu, L.; Zhang, J.; Peng, X.; Xiao, M. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1103.
- (50) Franzl, T.; Koktysh, D. S.; Klar, T. A.; Rogach, A. L.; Feldmann, J. *Appl. Phys. Lett.* **2004**, *84*, 2904.
- (51) Wuister, S. F.; van Driel, F.; Meijerink, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, *203*, 1253.
- (52) Petrov, E. P.; Cichos, F.; Zenkevich, E.; Starukhin, D.; von Borczyskowski, C. *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *402*, 233.
- (53) Klimov, V. I.; Mc Branch, D. W.; Leatherdale, C. A.; Bawendi, M. G. *Phys. Rev. B: Condens. Mater.* **1999**, *60*, 13740.
- (54) Zhang, J. Y.; Wang, X.-Y.; Xiao, M. *Opt. Lett.* **2002**, *27*, 1253.
- (55) Bawendi, M. G.; Carroll, P. J.; Wilson, W.; Brus, L. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 946.
- (56) Efros, A. L.; Rosen, M.; Kuno, M.; Nirmal, M.; Norris, D. J.; Bawendi, M. G. *Phys. Rev. B* **1996**, *54*, 4843.
- (57) Wang, X. Y.; Qu, L.; Zhang, J. Y.; Peng, X. G.; Xiao, M. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1103.
- (58) Samia, A. C. S.; Chen, X.; Burda, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15736.
- (59) Zhang, Y.; He, J.; Wang, P.-N.; Chen, J.-Y.; Lu, Z.-J.; Lu, D.-R.; Guo, J.; Wang, C.-C.; Yang, W. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13396.
- (60) Ma, J.; Chen, J.-Y.; Zhang, Y.; Wang, P.-N.; Guo, J.; Yang, W.-L.; Wang, C.-C. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 12012.
- (61) Resch, U.; Weller, H.; Henglein, A. *Langmuir* **1989**, *5*, 1015.
- (62) Mekis, I.; Talapin, D. V.; Kornowski, A.; Haase, M.; Weller, H. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 7454.
- (63) Steckel, J. S.; Snee, P.; Coe-Sullivan, S.; Zimmer, J. P.; Halpert, J. E.; Anikeeva, P.; Kim, L.-A.; Bulovic, V.; Bawendi, M. G. *Angew. Chem., Int. Ed* **2006**, *45*, 5796.
- (64) Teal, T. K.; Lies, D. P.; Wold, B. J.; Newman, D. K. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 7324.

Supporting Information

Table of contents

Figure S1. Evolution of (a) the absorption and (b) the photoluminescence spectra upon addition of $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ to CdTe/CdS QDs at room temperature.

Figure S2. A Rietveld refinement result (red curve) of the powder XRD data of CdTe/CdS QDs (black curve), using the cubic phase of CdTe. The green curve below illustrates the difference between data and simulation.

Figure S3. A Rietveld refinement result (red curve) of the powder XRD data of core/shell/shell CdTe/CdS/ZnO QDs (black curve), using the cubic phase of CdTe. The green curve below illustrates the difference between data and simulation.

Figure S4. AFM images of (a) the CdTe/CdS core QDs and the same core with different thickness shells of ZnO. (b) $\text{Zn}/\text{Cd} = 0.2$, (c) $\text{Zn}/\text{Cd} = 0.4$, (d) $\text{Zn}/\text{Cd} = 0.6$, (e) $\text{Zn}/\text{Cd} = 0.8$, (f) $\text{Zn}/\text{Cd} = 1.0$.

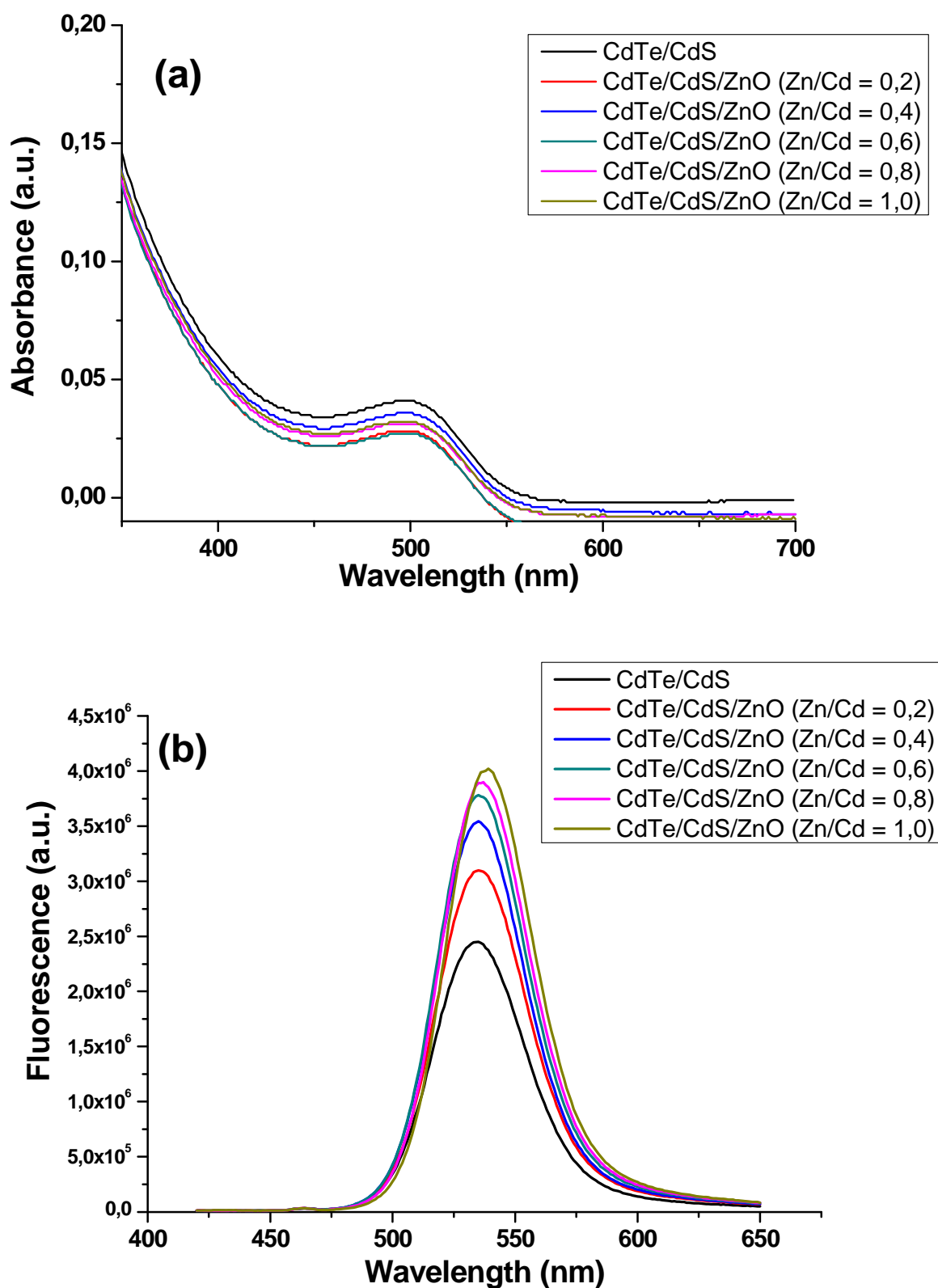


Figure S1. Evolution of (a) the absorption and (b) the photoluminescence spectra upon addition of Zn(OAc)₂ to CdTe/CdS QDs at room temperature.

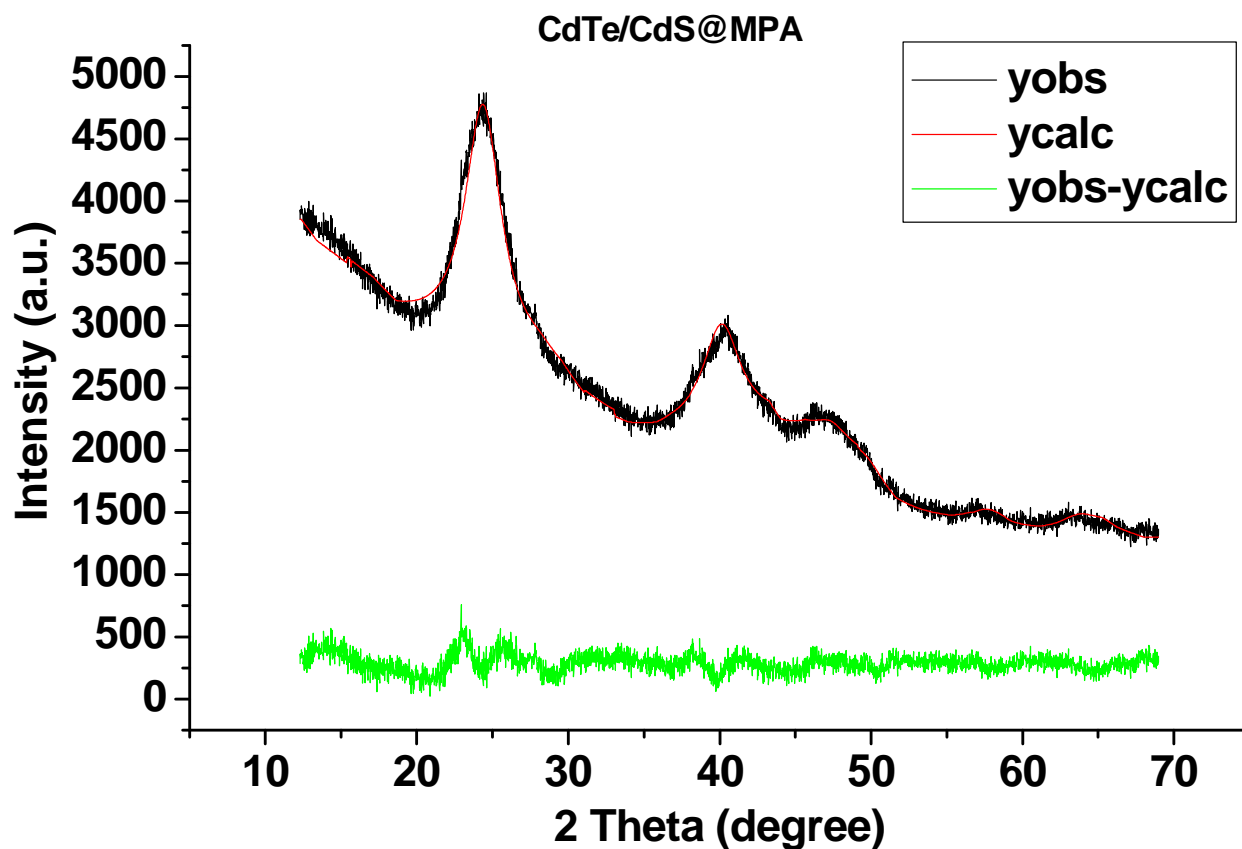


Figure S2. A Rietveld refinement result (red curve) of the powder XRD data of CdTe/CdS QDs (black curve), using the cubic phase of CdTe. The green curve below illustrates the difference between data and simulation.

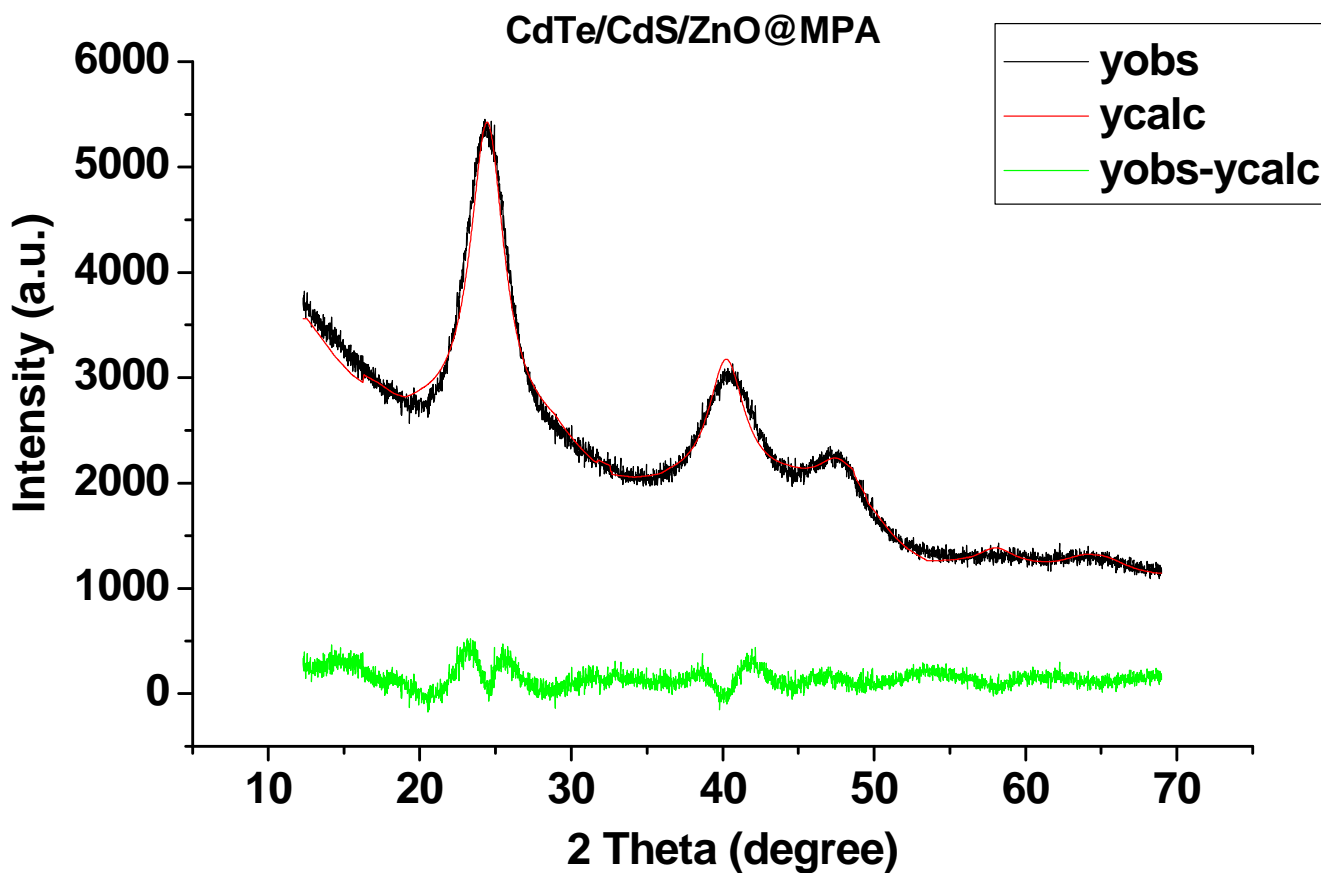


Figure S3. A Rietveld refinement result (red curve) of the powder XRD data of core/shell/shell CdTe/CdS/ZnO QDs (black curve), using the cubic phase of CdTe. The green curve below illustrates the difference between data and simulation.

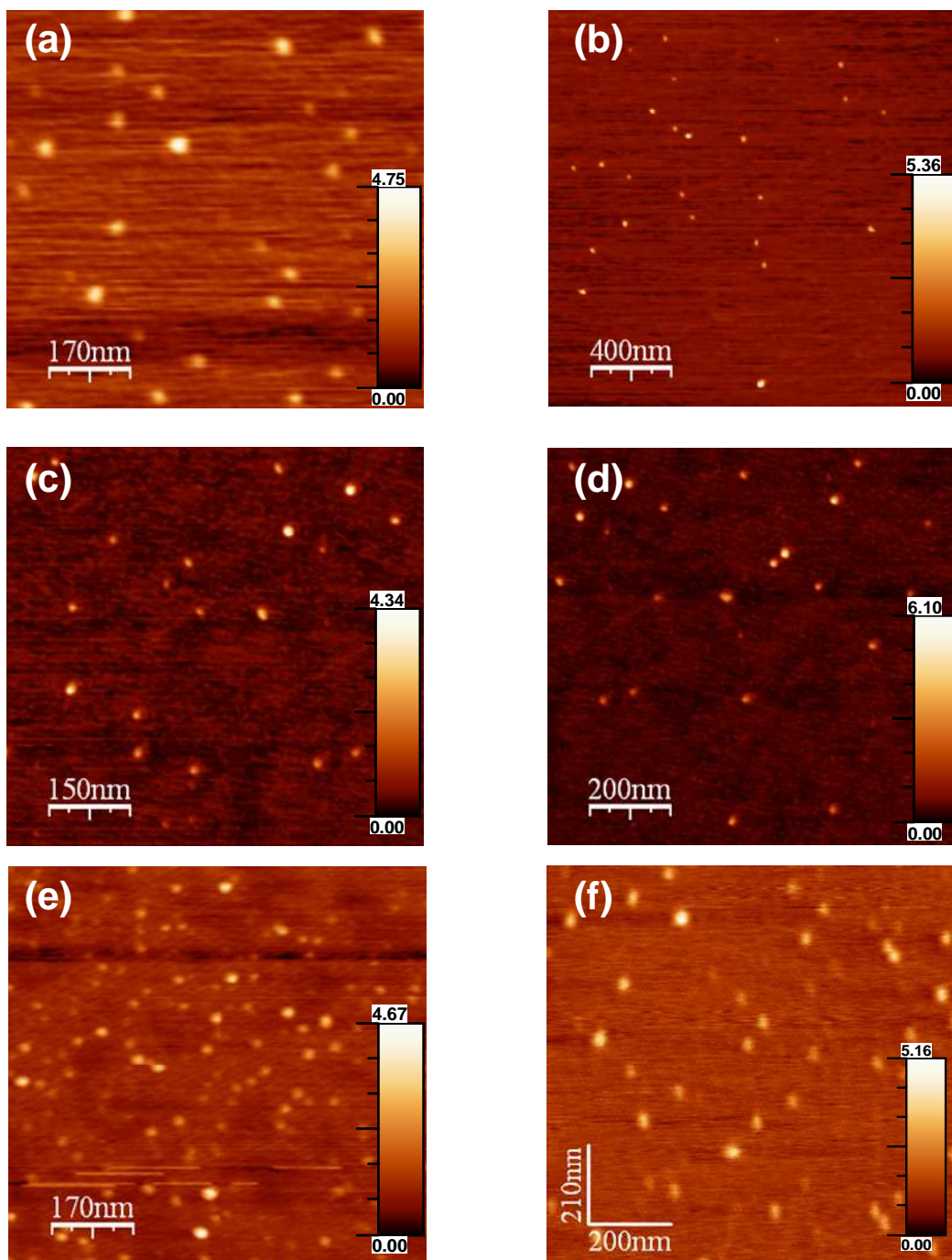


Figure S4. AFM images of (a) the CdTe/CdS core QDs and the same core with different thickness shells of ZnO. (b) Zn/Cd = 0.2, (c) Zn/Cd = 0.4, (d) Zn/Cd = 0.6, (e) Zn/Cd = 0.8, (f) Zn/Cd = 1.0.

DOI: 10.1002/ejic.200((will be filled in by the editorial staff))

Enhanced Photostability from CdSe(S)/ZnO Core/Shell Quantum Dots and their Use in Bio-Labeling

Fadi Aldeek,^[a,b] Christian Mustin,^[c] Lavinia Balan,^[d] Ghouti Medjahdi,^[e] Thibault Roques-Carmes,^[b] Philippe Arnoux,^[b] and Raphaël Schneider^{*,[b]}

Keywords: Quantum dots / Core/shell / Synthesis design / Fluorescence

We report on the preparation and on the photophysical and structural characterizations of alloyed CdSe(S) nanocrystals, which are covered by a ZnO shell. CdSe(S) QDs were prepared by reaction of CdCl₂ with NaHSe in the presence of 3-mercaptopropionic acid (MPA) under hydrothermal conditions. The sulfur incorporation arises from the surface-mediated MPA hydrolysis on the growing QD surface. Water-dispersible CdSe(S) QDs were successfully capped with a ZnO shell obtained by basic hydrolysis of Zn(OAc)₂.

The experimental results from transmission electron microscopy (TEM) imaging and powder X-ray diffractometry (XRD) analyses indicate that the core/shell CdSe(S)/ZnO QDs have a very small diameter (ca. 2.8 nm) and exhibit a face-centered cubic crystal structure. Our results show that core/shell CdSe(S)/ZnO QDs have a higher photostability than CdSe(S) cores. CdSe(S)/ZnO QDs have potential applications as fluorescent biological labels and were successfully used for imaging *Schewanella oneidensis* bacterial biofilms.

- [a] LCPME, UMR 7564, Nancy-University, CNRS, 405, rue de Vandoeuvre, 54506 Villers-lès-Nancy, France
[b] LRGP, UPR 3349, Nancy-University, CNRS, 1 rue Grandville, 54001 Nancy, France
E-mail: raphael.schneider@ensic.inpl-nancy.fr
[c] LMOS, UMR 7137, Nancy-University, CNRS, Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France
[d] IS2M, LRC 7228, 15 rue Jean Starcky, 68093 Mulhouse, France
[e] ILL, Nancy-University, CNRS, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

high-quality QDs.^[10] The nanocrystals thus prepared are however only soluble in non polar organic solvents, unless their surfaces are further modified with either thioacids or thioamines or that hydrophobic QDs are wrapped into micelles or polymers. The aqueous synthetic approach is an alternative strategy to directly prepare water-dispersed QDs. In addition, this method is cheaper, simpler, and less toxic. In recent years, methods for preparing CdSe or CdTe QDs in water solution either by heating at 100°C, by the hydrothermal method or by microwave-assisted synthesis have been significantly improved.^[11-17]

Introduction

Due to their unique size-dependent electrical and optical properties,^[1] II-VI semiconductor quantum dots (QDs) have attracted great attention in recent years for their potential applications in biological labelling^[2,3] and optoelectronic devices such as light emitting diodes and photovoltaic cells.^[4-9] QDs present many advantages compared to organic fluorophores such as high photoluminescence (PL) quantum yield (QY), tunable emission wavelength, multiplexing capabilities, and high photoresistance. Among all QDs' applications, biological labelling is currently of great interest. The prerequisite for the development of QD-based bioimaging systems is to gain access to water-dispersible and photostable nanocrystals.

The organometallic synthesis of QDs, injection of reagents into a coordinating solvent such as tri-*n*-octylphosphine oxide (TOPO) at high temperature (200-400°C), is an effective route to prepare

The surface passivation by growing an inorganic shell of a wider band gap semiconductor on II-VI QDs is an important parameter to improve the PL QY and the photo/thermal stability of these nanocrystals by decreasing non radiative recombination.^[18,19] Indeed, if the band gap of the core is enclosed by that of the shell, then the wave functions of electrons and holes are confined within the core region, thus reducing the probability of non radiative decay into surface states and trap sites.^[20,21] Various II-VI semiconductors have been investigated as shell material for CdSe QDs to improve the PL QYs and the chemical stability. However, core/shell CdSe/ZnS^[22,23] or CdSe/CdS^[24,25] or core/shell/shell or multishell CdSe/CdS/ZnS^[26-28] QDs are generally prepared by the successive ion layer adhesion and reaction (SILAR) technique.

In comparison with organometallic synthesis, little attention has been paid to the introduction of an inorganic shell on CdSe core QDs in aqueous solution until now. In this paper, we describe the epitaxial overcoat of a ZnO shell on the outlayer of alloyed

CdSe(S) nanocrystals to obtain CdSe(S)/ZnO core/shell heterostructures. The additional ZnO shell, with a substantially wide band gap, serves as a type I heterojunction (the band offsets among CdSe, CdS, and ZnO are shown in Figure 1). Our experimental results show that the quantum efficiency and the photostability were improved by adding the ZnO shell because of better surface passivation of the CdSe(S) cores. Core/shell CdSe(S)/ZnO QDs nanocrystals were successfully used as fluorescent probes for the labelling of bacterial biofilms.

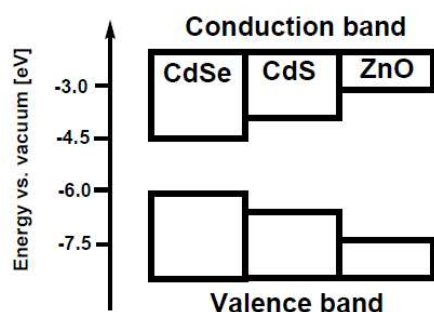
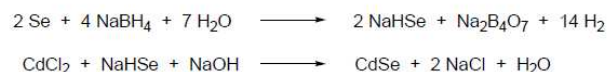


Figure 1. Energetic band positions of semiconductor material combinations used in this work.

Results and Discussion

Synthesis of MPA-capped core/shell CdSe(S)/ZnO nanocrystals

The CdSe core QDs were synthesized according to the following chemical reactions using 3-mercaptopropionic acid (MPA) as stabilizer.



We took advantage of an autoclave to obtain a high temperature (150°C) and pressure to accelerate the growth of CdSe nanocrystals. During the heating phase, a part of the MPA ligand is hydrolyzed, serves as sulfur source to produce alloyed CdSe(S) QDs with a gradient of sulfur from the inside to the surface of the nanocrystals depending on the competition between MPA decomposition and the rate of S^{2-} versus Se^{2-} addition to a growing QD surface.

The CdSe(S)/ZnO core/shell QDs were prepared by the slow injection of a 0.01 M aqueous solution of $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ to the crude CdSe(S) QDs under atmospheric pressure and further refluxing for 2 hours. At basic pH (the pH value measured at the end of the hydrothermal synthesis of CdSe(S) QDs was found to be 8.9), $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ is first hydrolyzed and converted into its hydroxide $\text{Zn}(\text{OH})_2$. Dehydration of $\text{Zn}(\text{OH})_2$ produces ZnO clusters that grow at the surface of CdSe(S) nanocrystals to form the ZnO shell (Figure 2).

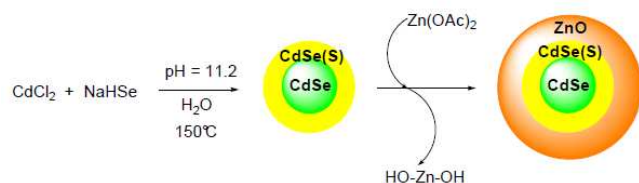


Figure 2. Schematic of the synthesis of water-soluble CdSe(S)/ZnO core/shell nanocrystals.

Size, shape, crystal structure and PL properties of CdSe(S)/ZnO nanocrystals

Figure 3a shows the typical UV-vis absorption and PL spectra of the CdSe(S) nanocrystals obtained by reaction of CdCl_2 with NaHSe in the presence of MPA under hydrothermal conditions (150°C, 1h). Compared to syntheses conducted under normal pressure at 100°C,^[14] the PL spectrum of the CdSe(S) cores did not show a shallow trap emission because of the incomplete passivation. The luminescence of MPA-capped CdSe(S) QDs is dominated by near-band-edge luminescence at 511 nm (PL QY of 11.5 %). The Stokes shift is small (15 nm) and the full-width-at-half-maximum (fwhm) is narrow (56 nm). The average diameter of CdSe(S) nanocrystals was calculated to be 2.2 nm using the first excitonic absorption peak of the UV-vis absorption spectrum.^[29] Figure 4a shows a typical TEM image of these nanocrystals. CdSe(S) cores are close to spherical and their average diameter is 2.5 ± 0.5 nm.

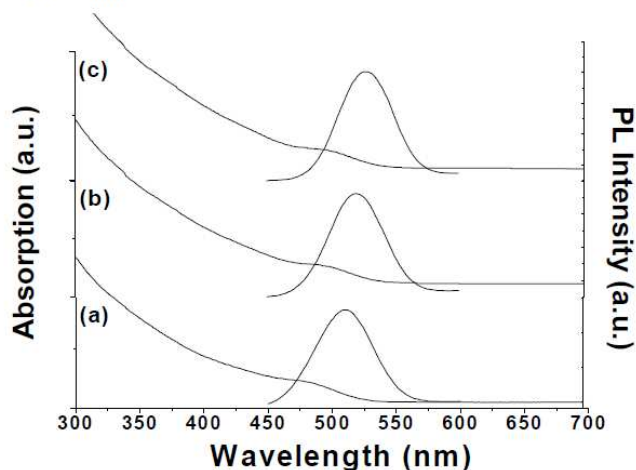


Figure 3. UV-vis absorption and PL spectra of (a) core CdSe/CdS QDs, (b) CdSe/CdS/ZnO QDs (Zn/Cd = 0.2), and (c) CdSe/CdS/ZnO QDs (Zn/Cd = 0.4).

After the addition of the ZnO shell under alkaline conditions, both absorption and PL spectra of QDs shift to higher wavelengths. As shown in Figures 3b and 3c, the excitonic peaks of the QD system shift to the red from 482 nm to 495 and 496, respectively for Zn/Cd ratios of 0.2 and 0.4. Meanwhile, the corresponding PL emission wavelengths shift from 511 nm to 522 nm and 527 nm and fwhms of PL spectra decrease from 56 nm for core CdSe(S) QDs to 53 and 47 nm respectively for CdSe(S)/ZnO core/shell QDs prepared with Zn/Cd ratios of 0.2 and 0.4. Compared with the PL QY of the core CdSe(S)@MPA crude solution (11.5%), the PL QY of the new core/shell QDs prepared with a Zn/Cd ratio of 0.2 is enhanced, about 1.4 times (16%), after refluxing for 2 h. Using a Zn/Cd ratio of 0.4, PL QY reached a plateau (15.6%). Similar observations were ascribed to the strain released through the formation of dislocations in the shell with increasing shell thickness, e.g. for core/shell CdSe/ZnS or core/shell/shell CdTe/CdS/ZnO QDs.^[26,28,30] Further increasing the Zn/Cd ratio to 0.6 caused aggregation of QDs and confirmed the saturation effect observed during PL QY measurements.

The TEM images of the core/shell CdSe(S)/ZnO QDs (Figures 4b and c) show that these nanocrystals have similar spherical morphologies than CdSe(S) cores. The average diameters of QDs

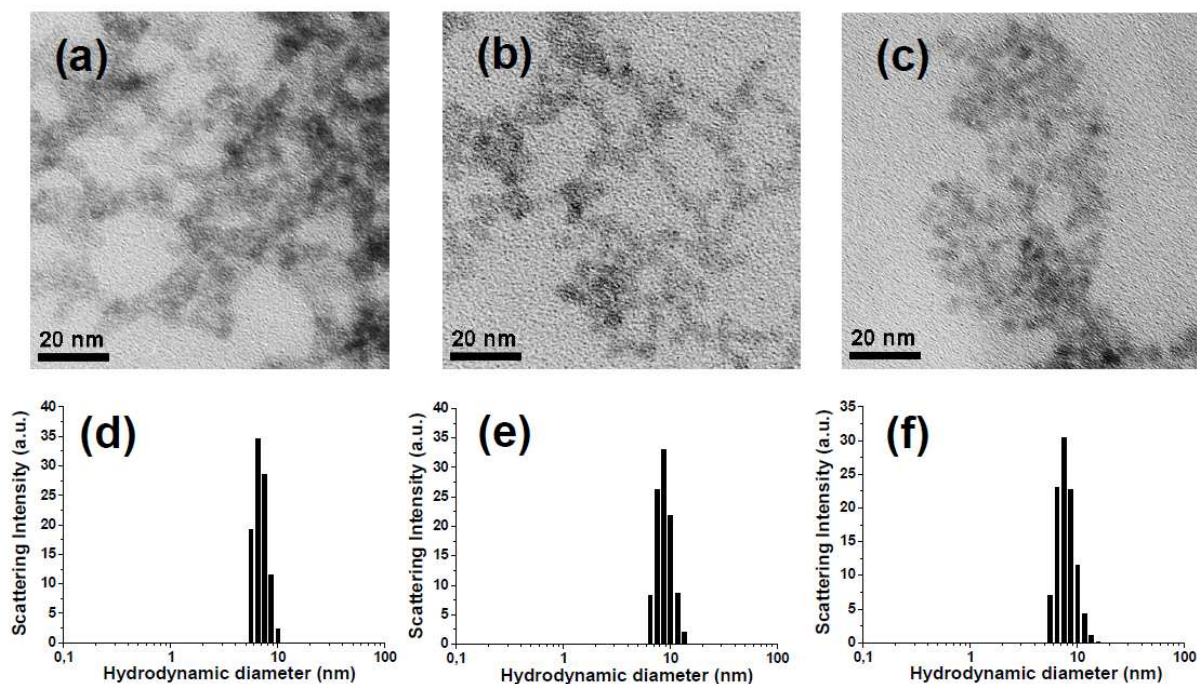


Figure 4. TEM images of (a) core CdSe(S) QDs, (b) CdSe(S)/ZnO QDs prepared with a Zn/Cd ratio of 0.2, (c) CdSe(S)/ZnO QDs prepared with a Zn/Cd ratio of 0.4, and (d), (e), and (f) the corresponding hydrodynamic sizes measured by DLS.

prepared with Zn/Cd ratios of 0.2 and 0.4 were determined to 2.8 ± 0.4 and 2.9 ± 0.7 nm, respectively, values close to those calculated from the absorption spectra and consistent with average diameters calculated by AFM (see Figure S1). Dynamic light-scattering (DLS) measurements indicate that the QDs are well-dispersed in water and that their hydrodynamic diameters range from ca. 7.5 to 10 nm (the average hydrodynamic diameters determined for CdSe(S) cores and core/shell QDs prepared with Zn/Cd ratios of 0.2 and 0.4 are 7.7 ± 1.7 , 9.1 ± 2.6 , and 9.9 ± 3.5 nm, respectively) (Figures 4d-f). The hydrodynamic diameter is larger than the diameter of the inorganic core due to the solvation layer around the QDs in aqueous solution.

The crystal form of the CdSe(S) alloyed core was characterized with XRD pattern and results are shown in Figure 5a. The broadness of the peaks was attributed to the small dimensions of the nanocrystals. The peaks at $2\theta = 26.2$, 43.4 and 51.4° correspond to the (111), (220), and (311) planes of the zinc blende phase of CdSe crystallising in the F-43m space group as shown by the bars in the upper part of the figure (JCPDS card, N° 19-0191). The crystallisation of CdSe in the cubic phase was possible due to the low growth temperature (150°C) employed for the synthesis of the CdSe nanocrystals and to the absence of phosphines in the reaction medium.^[31] The XRD reflexes are deviated to larger angles between the values of the cubic CdSe and the cubic CdS phases, which gives evidence that the nanocrystals cores are CdSe(S) alloyed QDs. The size obtained from the XRD pattern (2.5 ± 1.0 nm, see Figure S2) agrees well with that estimated from TEM and absorption spectrum. In the core /shell QDs (Figure 4b), no peak shift was observed as a result of the thin shell thickness (~ 0.5 - 1.0 nm) that does not contract the lattice of the CdSe(S) core.

Figure 6 shows the X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) spectra of CdSe(S)@MPA QDs. The typical peaks of Cd $3d_{5/2}$ at

405.0 eV, Cd $3d_{3/2}$ at 411.6 eV, Se $3d_{5/2}$ at 53.8 eV and S 2p at 161.6 eV confirmed the existence of cadmium, selenium and sulfur in the core QDs. Once these QDs treated with $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ in basic medium, a new peak originating from Zn $2p_{3/2}$ linked to oxygen atoms was observed at 1022.0 eV and confirmed the successful capping of the CdSe(S) cores by the ZnO shell (Figure 7).

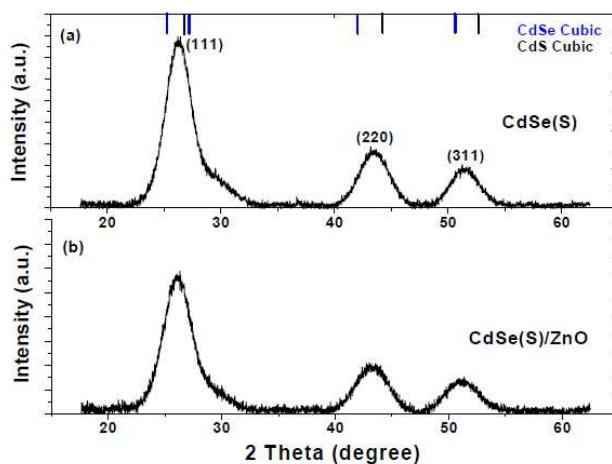


Figure 5. Powder XRD pattern of CdSe(S) nanocrystals (a) before and (b) after introduction of the ZnO shell (QDs prepared with a Zn/Cd of 0.4). The standard diffraction lines for zinc blende CdSe (above, blue) and zinc blende CdS (above, black) are also shown.

Photostability of CdSe(S)/ZnO QDs

Long-term stability of nanocrystal luminescence is one of the key problems for the application of QDs in light-emitting devices

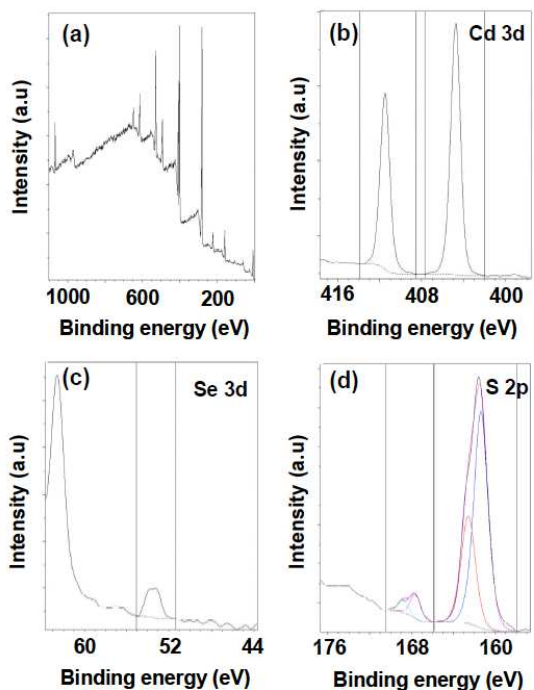


Figure 6. XPS spectra of CdSe(S) QDs. (a) XPS survey spectrum. Binding energy spectra of (a) Cd 3d, (b) Se 3d, and (d) S 2p.

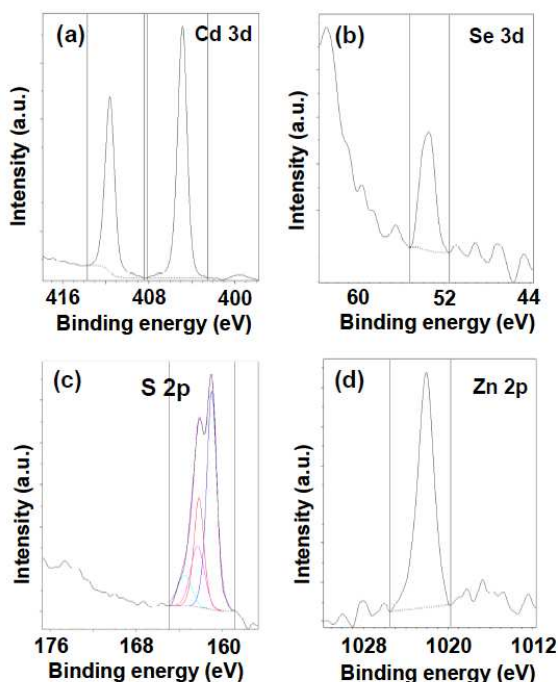


Figure 7. XPS spectra of core/shell CdSe(S)/ZnO QDs. (a) XPS survey spectrum. Binding energy of (b) Se 3d, (c) S 2p, and (d) Zn 2p.

or bio-imaging. Core/shell nanocrystals show significant enhancement of photochemical stability as compared to bare ones.

The photochemical instability of thioacid-capped CdSe QDs has already been studied. The photooxidation of the thioacid ligands in the presence of oxygen and light produces disulfides, thus decomposing the nanocrystals and leading to aggregation.^[32] As a result of this photooxidation, new surface defects are generated, the PL intensity decreases and finally the QDs are bleached.^[33-37] We

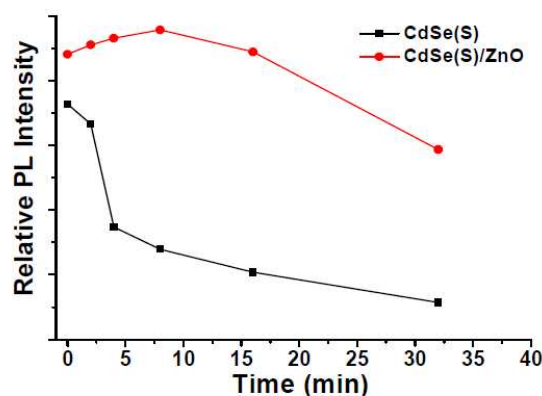


Figure 8. (a) Photobleaching experiment of CdSe(S) and CdSe(S)/ZnO QDs in aqueous solution during irradiation between 300 and 350 nm with a Hg-Xe lamp.

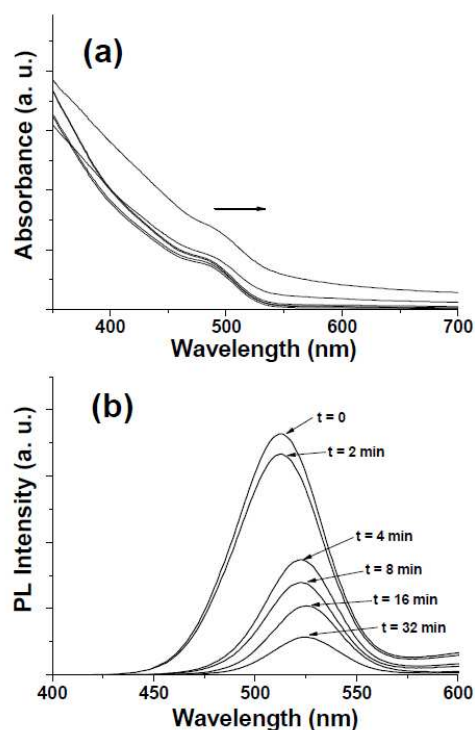


Figure 9. Time evolutions of (a) absorption spectra and (b) PL spectra of CdSe(S) QDs during irradiation between 300 and 350 nm with a Hg-Xe lamp.

compared the photostability of CdSe(S)/ZnO QDs with that of the parent CdSe(S) dots synthesized as in ref. 14. PL spectra of aliquots taken during the continuous and intensive excitation between 300 and 350 nm with a Hg-Xe lamp and at ambient conditions of the two kinds of nanoparticles are shown in Figure 8. As can be observed on Figure 8, the emission intensity of MPA-capped CdSe(S) QDs dropped rapidly and was reduced by ca. 60 % after 8 min. under the continuous irradiation. In the meantime, the emission wavelength λ_{em} is bathochromically shifted by ca. 20 nm (from 512 to 525 nm) (Figure 9b). The time evolution of the PL spectra observed in Figure 9b could be related to the decomposition of the MPA ligand leading to free sulfide ions, which subsequently associate with Cd^{2+} to form a CdS shell around

the CdSe(S) core. As observed with CdSe/CdS core/shell heterostructures,^[38,39] due to the partial leakage of the exciton into the CdS shell, the growth of the shell results in a shift of the first exciton peak from 483 to 490 nm (Figure 9a) and a corresponding shift of the PL emission peak from 512 nm to 525 nm (Figure 9b). This decomposition of the MPA ligand reduces QDs stability in water, and leads to aggregation and precipitation of the nanocrystals.

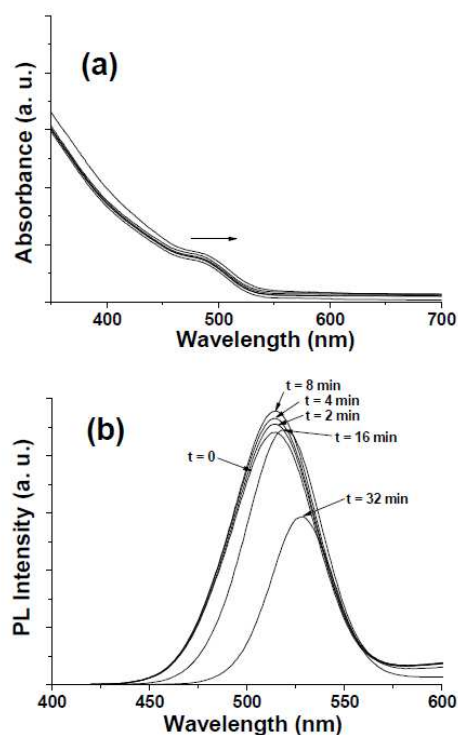


Figure 10. Time evolutions of (a) absorption spectra and (b) PL spectra of core/shell CdSe(S)/ZnO QDs during irradiation between 300 and 350 nm with a Hg-Xe lamp.

In contrast, core/shell CdSe(S)/ZnO QDs possess much better performance under the same experimental conditions as shown in Figure 10. A slight increase in emission intensity was observed during the first 8 min. of irradiation, indicating that these nanocrystals were very stable in aqueous solution (Fig. 10b). A red-shift of λ_{em} is only observed by further irradiating the sample ($\lambda_{em} = 519$ nm after 16 min, $\lambda_{em} = 528$ nm after 32 min). Finally, the luminescence intensity decreases significantly more slowly compared to the CdSe(S) cores.

To investigate the potential use in imaging applications, green-emitting core/shell CdSe(S)/ZnO QDs were used as staining probes of surface-attached microbial communities called biofilms. Biofilms are highly organized and structured microbial cells enmeshed in extracellular polymeric substances (EPS) of variable density and composition.^[40] The EPS produced by microbial communities include a variety of biopolymers like polysaccharides, proteins, nucleic acids and amphiphilic compounds with different functionalities.^[41] Because of their complexity, the EPS are challenging to image. Staining of the EPS matrix could advance the current understanding of the development process and structural organization of biofilms, which would be essential for designing novel and effective antibiofilm therapies. For imaging experiments,

biofilms of *Shewanella oneidensis* were grown for 48 h under the constant flow (200 μ L/min) of a LML medium^[42] supplemented with fumarate (0.5 mM) in flow cell systems that can be accommodated on a microscope set up. After the growth period, a 250 nM solution of CdSe(S)/ZnO QDs was injected via a syringe pump and incubation was performed for 5 min. Unbound QDs were removed by washing the biofilm with fresh culture medium. Figures 11a and 11b show, respectively, the transmission and the green channel confocal images of a typical live, hydrated *S. oneidensis* biofilm at a focal plane 30 μ m from the attachment substratum. As can be observed, MPA-capped CdSe(S)/ZnO QDs incorporate homogeneously into the biofilm and associate with the EPS matrix (higher magnification photograph show that the QDs do not stain the bacterial cells). Vertical scanning of the sample shows that the QDs allow imaging of the biofilm over the full z range. Figure 11c shows in details the fine three-dimensional structures of the labelled biofilm, including the mushroom-like protusions and the aggregates of around 50 μ m in thickness classically observed with such collections of surface-attached microorganisms.^[43]

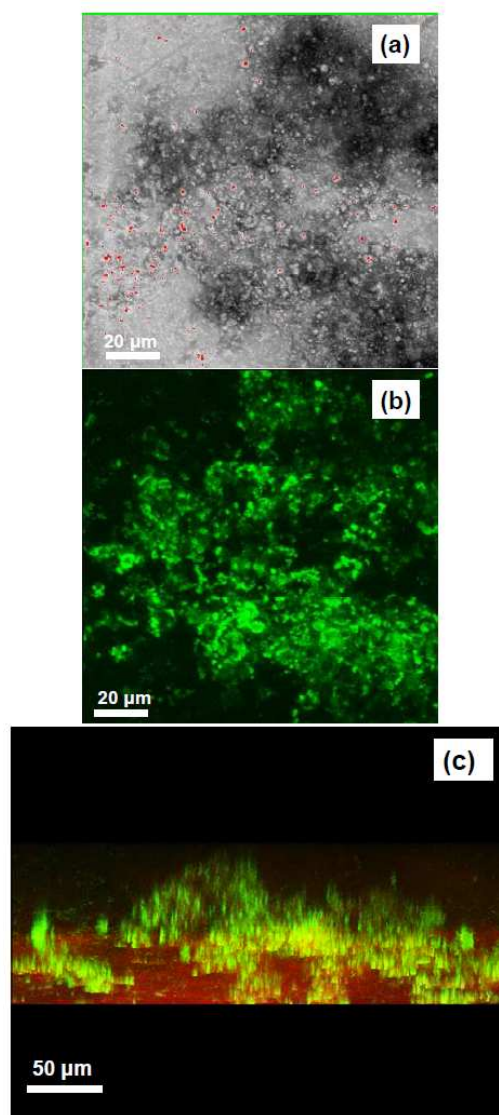


Figure 11. Confocal microscopy images of a *S. oneidensis* biofilm treated with CdSe(S)/ZnO QDs: (a) transmission image, (b) corresponding XY plane fluorescence image, and (c) sum of XY planes. Confocal microscopy images were obtained with laser excitation at 405 nm.

Conclusions

The synthesis of a novel type of fluorescent semiconductor nanocrystals consisting of a alloyed CdSe(S) core and a ZnO outer shell has been developed. The synthetic methodology developed features easy handling and large-scale capability with mild reaction conditions and great reproducibility. The Zn/Cd ratio used for the preparation of core/shell CdSe(S)/ZnO QDs was studied to evaluate the influence of this variable on particle size and luminescence. At the optimum ratios (Zn/Cd = 0.2 or 0.4), quantum yields of ca. 16% were achieved. The coating with the ZnO shell provides nanocrystals with more efficient and more stable luminescence than the starting CdSe(S) QDs. The potential of core/shell CdSe(S)/ZnO QDs for bioimaging applications was demonstrated by the labelling of *Schewanella oneidensis* bacterial biofilms.

Experimental Section

Chemicals: The chemicals used in the experiments included CdCl₂ · 2.5H₂O (99%), 3-mercaptopropionic acid (MPA, 99+%), sodium borohydride (96%), selenium powder (99.5%), Zn(OAc)₂ (99.99%), and *iso*-propanol (*i*-PrOH, HPLC grade). All chemicals were used without further purification. The water used in all experiments was deionized to a resistivity of 18.2 MΩ·cm⁻¹.

Preparation of Water-Soluble CdSe(S) QDs: The preparation of NaHSe was performed according to Klayman *et al.*^[44] with some modifications. 76 mg (2.009 mmol) of NaBH₄ was added to a small flask cooled with ice containing 1 mL of ultrapure water under a N₂ atmosphere. 79 mg (1.004 mmol) of selenium powder was then added and a small outlet was connected to the flask to discharge the hydrogen pressure generated by the reaction. After 3 h at 4°C, the black selenium powder disappeared and a clear NaHSe solution was obtained. Under inert atmosphere, the solution was diluted with 20 mL of N₂-degassed water. The concentration of the final NaHSe solution was 0.05 M.

The CdSe(S) QDs were prepared by reaction between CdCl₂ · 2.5H₂O and NaHSe in the presence of MPA as the stabilizing agent following the method described previously,^[14] with some modifications. The molar ratio of Cd²⁺/Se²⁻/MPA was 8/1/8. Briefly, CdCl₂ · 2.5H₂O and MPA were dissolved in 100 mL of nitrogen-saturated ultrapure water ([Cd²⁺] = 10.9 mM) and the pH was adjusted to 11.2 with 1 M NaOH. Then, the NaHSe solution was added to the above precursor solution. The complex solution with a faint yellow colour was put into a Teflon-lined stainless steel autoclave with a volume of 125 mL. The autoclave was maintained at 150°C for one hour and then cooled down to room temperature.

Preparation of Core/Shell CdSe(S)/ZnO QDs. The Zn²⁺ injection solution (0.01 M) was prepared by dissolving Zn(OAc)₂ in aqueous solution. The molar ratio of Zn/Cd was 0.2 or 0.4. Briefly, the crude CdSe(S) QDs were first diluted to a concentration of 1.09 · 10⁻³ M, added to a three-necked flask and heated under air at 100°C. For a Zn/Cd ratio of 0.4/1, 2.2 mL of the Zn(OAc)₂ solution was first injected at a speed of 0.3 mL/min into the solution and further refluxed 1 h. After that period, another 2.2 mL portion of the Zn(OAc)₂ solution was injected and the mixture was further heated for 1 h. The obtained CdSe(S)/ZnO QDs were precipitated by adding *i*-PrOH and centrifuged at 4000 rpm. QDs were dried *in vacuo* at room temperature and redissolved in water. Their concentration was estimated from the reported extinction coefficient per mole of particles (ε) by using the Beer-Lambert's law.^[29]

Characterization: All the optical measurements were performed at room temperature (20 ± 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 QY values were determined by the equation:

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

where F, A and n are the measured fluorescence (area under the emission peak), the absorbance at the excitation wavelength, and the refractive index of the solvent, respectively. PL spectra were spectrally corrected and quantum yields were determined relative to Rhodamine 6G in ethanol (QY = 94%).^[45]

To determine the morphology and the diameters of the nanoparticles, the samples were analyzed *ex situ* by Atomic Force Microscopy (AFM) and by Transmission Electron Microscopy (TEM). AFM characterization was carried out using a Digital Instruments Nanoscope III. AFM measurements were done by tapping mode using a Si₃N₄ tip with resonance frequency and spring constant being 100 kHz and 0.6 N.m⁻¹, respectively to provide surface topography. TEM images were taken by placing a drop of the particles in water onto a carbon film supported copper grid. Samples were studied using a Philips CM20 instrument with LaB₆ cathode operating at 200 kV. Dynamic light scattering (DLS) was performed at room temperature using a Malvern zetasizer HsA instrument with an He-Ne laser (4 · 10⁻³ W) at a wavelength of 633 nm. The QDs aqueous solutions were filtered through Millipore membranes (0.2 μm pore size). The data were analyzed by the CONTIN method to obtain the hydrodynamic diameter (d_H) and the size distribution in each aqueous dispersion of nanoparticles. XPS measurements were performed at a residual pressure of 10⁻⁹ mbar, using a KRATOS Axis Ultra electron energy analyser operating with an Al Kα monochromatic source. Powder (XRD) analyses were obtained using Panalytical X'Pert Pro MPD diffractometre using Cu Kα radiation. The crystalline grain sizes were obtained using the size broadening models built into Topas (Bruker) and using the Fundamental Parameters approach.

Acknowledgments

This work was financially supported by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR blanc 07, project DYNABIO). The authors thank Dr. Serge Corbel (LRGP, Nancy-University) and Marie-José Stebe (SRSMC, Nancy-University) for facilitating respectively photostability experiments and DLS measurements.

- [1] Q. J. Sun, Y. A. Wang, L. S. Li, D. Y. Wang, T. Zhu, J. Xu, C. H. Yang, Y. F. Li, *Nat. Photonics* **2007**, *1*, 717-722.
- [2] M. Bruchez Jr, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A.P. Alivisatos, *Science* **1998**, *281*, 2013-2016.
- [3] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Science* **2005**, *307*, 538-544.
- [4] V. L. Colvin, M. C. Schlamp, A. P. Alivisatos, *Nature* **1994**, *370*, 354-357.
- [5] S. Coe, W. K. Woo, M. Bawendi, V. Bulovic, *Nature* **2002**, *420*, 800-803.
- [6] A. L. Rogach, N. Gaponik, J. M. Lupton, C. Bertoni, D. E. Gallardo, S. Dunn, N. L. Pira, M. Paderi, P. Repetto, S. G. Romanov, C. O. Dwyer, C. M. S. Torres, A. Eychmuller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6538-6549.
- [7] A. J. Nozik, *Phys. E* **2002**, *14*, 115-120.
- [8] I. Gur, N. A. Fromer, M. L. Geier, A. P. Alivisatos, *Science* **2005**, *310*, 462-465.
- [9] P. V. Kamat, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 18737-18753.
- [10] L. H. Qu, X. G. Peng, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2049-2055.

Chapitre III : Tentatives d'amélioration des propriétés photophysiques des quantum dots CdTe et CdSe à caractère amphiphile par introduction d'une coquille

- [11] A. L. Rogach, A. Kornowski, M. Gao, A. Eychmuller, H. Weller, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 3065-3069.
- [12] B. Nikoobakht, C. Burda, M. Braun, M. Hun, M. A. El-Sayed, *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 591-597.
- [13] P. Zhong, Y. Yu, J. Wu, Y. Lai, B. Chen, Z. Long, C. Liang, *Talanta* **2006**, *70*, 902-906.
- [14] F. Aldeek, L. Balan, J. Lambert, R. Schneider, *Nanotechnology* **2008**, *19*, 475401.
- [15] J. V. Williams, N. A. Kotov, P. E. Savage, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, *48*, 4316-4321.
- [16] F. Aldeek, L. Balan, G. Medjahdi, T. Roques-Carnes, J. -P. Malval, C. Mustin, J. Ghanbaja, R. Schneider, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 19458-19467.
- [17] J. Coulon, I. Thouvenin, F. Aldeek, L. Balan, R. Schneider *J. Fluoresc.* **2010**, *20*, 591-597.
- [18] L. P. Balet, S. A. Ivanov, A. Piryatinski, M. Achermann, V. Klimov, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1485-1488.
- [19] H. Yang, P. H. Holloway, *Adv. Func. Mater.* **2004**, *14*, 152-156.
- [20] T. Mokari, U. Banin, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 3955-3960.
- [21] E. A. Meulenkamp, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 5566-5572.
- [22] D. V. Talapin, A. L. Rogach, A. Kornowski, M. Haase, H. Weller, *Nano Lett.* **2001**, *1*, 207-211.
- [23] M. A. Hines, P. Guyot-Sionnest, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 468-471.
- [24] D. Pan, Q. Wang, S. Jiang, X. Ji, L. An, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 5661-5666.
- [25] J. Zhang, X. Zhang, J. Y. Zhang, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 3904-3908.
- [26] D. V. Talapin, I. Mekis, S. Götzinger, A. Kornowski, O. Benson, H. Weller, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 18826-18831.
- [27] S. J. Lim, B. Chon, T. Joo, S. K. Shin, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 1744-1747.
- [28] R. Xie, U. Kolb, J. Li, T. Basché, A. Mews, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7480-7488.
- [29] W. W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2854-2860.
- [30] B. O. Dabboussi, J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen, M. G. Bawendi, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 9463-9475.
- [31] Z. Deng, L. Cao, F. Tang, B. Zou, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 16671-16675.
- [32] J. Aldana, Y.A. Wang, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8844-8850.
- [33] M. Nirmal, B. O. Dabboussi, M. G. Bawendi, J. J. Macklin, J. K. Trautman, T. D. Harris, L. E. Brus, *Nature* **1996**, *383*, 802-804.
- [34] H. M. W. G. J. van Sark, L. T. Patrick, M. Frederix, D. J. Van den Heuvel, H. C. Gerritsen, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 8281-8284.
- [35] N. Myung, Y. Bae, A. J. Bard, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 747-749.
- [36] Y. Wang, Z. Y. Tang, M. A. Correa-Duarte, I. Pastariza-Santos, M. Giersig, M. Kotov, N. A. Liz-Marzan, L. M. J. *Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 15461-15469.
- [37] Y. Zhang, J. He, P. -N. Wang, J. -Y. Chen, Z. -J. Lu, D. -R. Lu, J. Guo, C. -C. Wang, W. -L. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13396-13401.
- [38] G. Morello, M. Anni, P. D. Cozzoli, L. Manna, R. Cingolani, M. De Giorgi, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 10541-10545.
- [39] J. Zhang, X. Zhang, J. Y. Zhang, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 3904-3908.
- [40] S. S. Branda, S. Vik, L. Friedman, R. Kolter, *Trends Microbiol.* **2005**, *13*, 20-26.
- [41] M. Martin-Cereceda, B. Perez-Zu, S. Serrano, A. Guinea, *Water Sci. Technol.* **2002**, *46*, 199-206.
- [42] T. K. Teal, D. P. Lies, B. J. Wold, D. K. Newman, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 7324-7330.
- [43] D. de Beer, P. Stoodley, F. Roe, Z. Lewandowski, *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 1131-1138.
- [44] D. L. Klayman, T. S. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 197-199.
- [45] M. Fischer, J. Georges, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *260*, 115-118.

Supporting Information

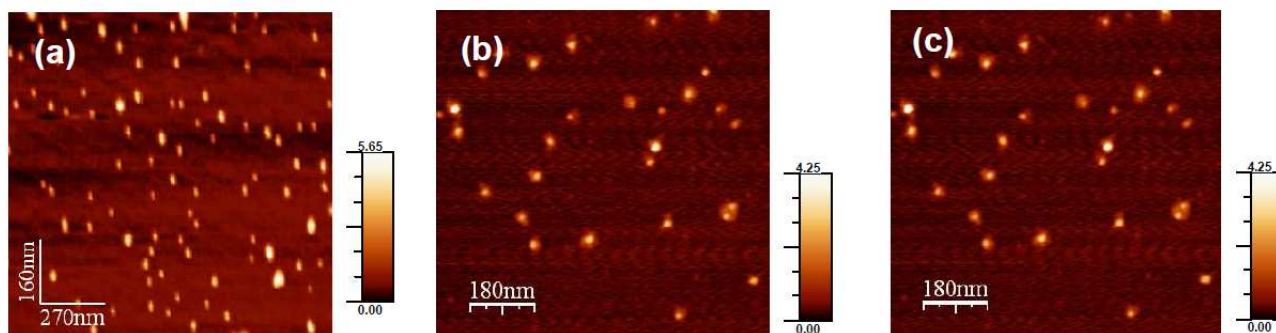


Figure S1. AFM images of (a) core CdSe(S) QDs, (b) CdSe(S)/ZnO QDs prepared with a Zn/Cd ratio of 0.2, (c) CdSe(S)/ZnO QDs prepared with a Zn/Cd ratio of 0.4.

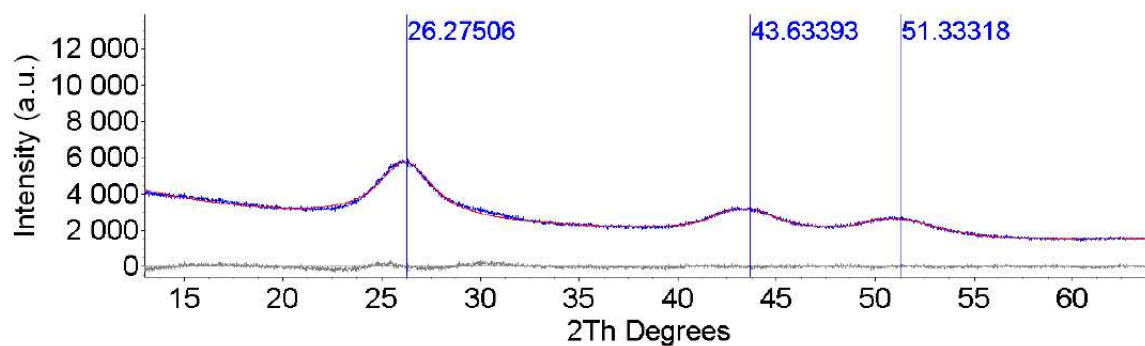


Figure S2. A Rietveld refinement result (red curve) of the powder XRD data of CdSe(S)/ZnO QDs (blue curve) using the cubic phase of CdSe. The black curve below illustrates the difference between data and simulation.

Chapitre IV

Des Quantum Dots amphiphiles pour la localisation de microdomaines hydrophobes au sein de biofilms bactériens

IV.1. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons réalisé avec succès par voie hydrothermale la synthèse de QDs CdTe et CdSe passivés par une coquille ZnO. Cette méthodologie n'a cependant donné de bons résultats qu'avec les QDs CdTe/CdS ou CdSe(S) stabilisés par des petits thioacides hydrophiles tels que l'acide 3-mercaptopropionique (MPA). Les nanocristaux cœur/coquille/coquille CdTe/CdS/ZnO@MPA ou cœur/coquille CdSe(S)/ZnO@MPA obtenus possèdent de très bonnes propriétés photophysiques permettant leur utilisation dans l'imagerie de biofilms bactériens. Ces QDs s'associent avec les biopolymères et leur distribution est homogène dans le biofilm.

L'objectif principal de cette thèse est cependant la préparation des nanocristaux fluorescents (QDs) fonctionnalisés par des ligands amphiphiles capables de marquer et d'identifier les microdomaines hydrophobes des **ExoPolymèreS** (EPS) entourant la communauté bactérienne emprisonnée au sein de biofilms. Dans ce chapitre, nous allons décrire les stratégies de synthèses utilisées pour préparer ces nanocristaux amphiphiles ainsi que leur utilisation pour l'imagerie de biofilm bactériens.

IV.2. Choix du ligand

La matrice EPS est essentiellement composée d'eau, de protéines, des polysaccharides, de lipides, d'acides nucléiques, de protéines et d'hétéropolymères (glycolipides, glycoprotéines, lipopolysaccharides, etc).¹

La littérature décrit les zones hydrophobes des EPS comme constituées de séquences peptidiques de faible polarité, de lipoprotéines et de liposaccharides.²⁻⁴ Ces microdomaines hydrophobes pourraient également contenir des unités mannose, sucre qui possède une face non hydroxylée, dite hydrophobe.⁵ Ces zones hydrophobes ainsi que les cations Mg^{2+} et Ca^{2+} jouent un rôle très important pour la cohésion et le maintien de la matrice EPS.

Même si l'identification des microdomaines hydrophobes reste à ce jour partielle, plusieurs techniques ont permis de les mettre en évidence.

On peut citer :

- le passage des EPS sur des résines hydrophobes telle que la résine XAD-8 qui a permis d'isoler une fraction de substances hydrophobes, principalement des protéines,⁶
- l'extraction chimique des lipides et lipopolysaccharides,⁴

- la spectroscopie de fluorescence : variation du spectre d'émission du pyrène piégé dans les agrégats bactériens,⁷
- la microscopie de fluorescence : accumulation de composés hydrophobes tels que le pyrène, le toluène, le benzène, le phénanthrène, ou les sulfonates d'alkylbenzène dans les zones marquées par le fluorophore organique hydrophobe Nile Red,⁸⁻¹² accumulation d'antibiotiques cationiques composés de petites séquences peptidiques à caractère hydrophobe (comportant notamment les motifs Leucine, Phénylalanine ou Tryptophane) dans de petits domaines préalablement marqué par l'ANS (1-anilinonaphtalène-8-sulfonate).²

Afin de marquer les microdomaines hydrophobes à l'aide de QDs, nous avons choisi de fonctionnaliser ces derniers par des acides aminés amphiphiles tels que la Leucine ou la Phénylalanine.

IV.3. Stratégie A

La première stratégie qui nous avons développée est la fonctionnalisation des QDs CdTe/CdS/ZnO@MPA par les acides aminés Phe et Leu. Un couplage covalent a été réalisé par traitement avec le chlorhydrate du *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N*-éthylcarbodiimide (EDC) et l'activant *N*-hydroxysuccinimide (NHS) (Figure 1).

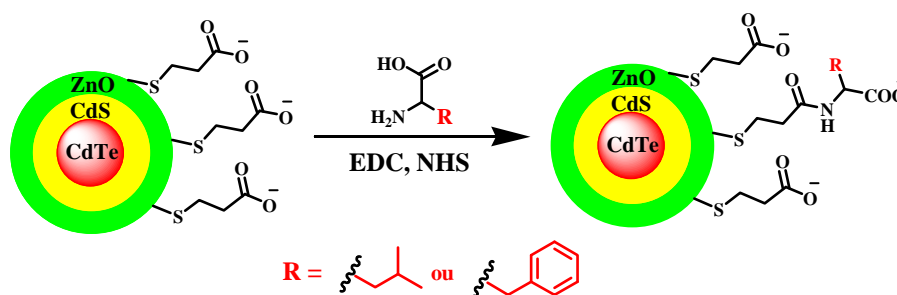


Figure 1. Couplage des QDs CdTe/CdS/ZnO@MPA avec les acides aminés Leu ou Phe.

Les QDs ont été dispersés dans un tampon borate $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (pH = 9) ou PBS (pH = 7,4) de manière à obtenir une absorbance de 0,1. L'acide aminé, l'EDC et le NHS sont ajoutés et le mélange est agité pendant 3 h à température ambiante sous atmosphère inerte. Les QDs ont ensuite été précipités par addition d'*iso*-propanol, et récupérés par centrifugation.

L'électrophorèse sur bande d'acétate de cellulose (milieu tampon borate pH = 9, différence de potentiel de 100 V) a été utilisée afin de suivre les différences de mobilité et confirmer que le couplage avait réussi.^{12,13}

Différentes conditions réactionnelles ont été évaluées avec les QDs CdTe/CdS/ZnO@MPA et les résultats obtenus décrits dans le tableau ci-dessous.

Rapport molaire QDs/Acide aminé/EDC/NHS	Résultats
1/50000/10000/5000	Perte totale de la fluorescence et agrégation des QDs.
1/5000/5000/5000	Perte totale de la fluorescence et agrégation des QDs.
1/1000/1000/1000	Réduction de la mobilité électrophorétique et chute du rendement quantique de fluorescence quel que soit l'acide aminé (2% pour Phe et 3 % pour Leu).
1/1000/500/500	Réduction de la mobilité électrophorétique et chute du rendement quantique de fluorescence quel que soit l'acide aminé (0,1% pour Phe et 0,4 % pour Leu).

Les résultats obtenus après les couplages ont montré une forte baisse de l'intensité de fluorescence (rendement quantique de fluorescence < à 3% après le couplage alors qu'il était à 27% avant le couplage) accompagnée d'un décalage des spectres de fluorescence vers le bleu (Figure 2).

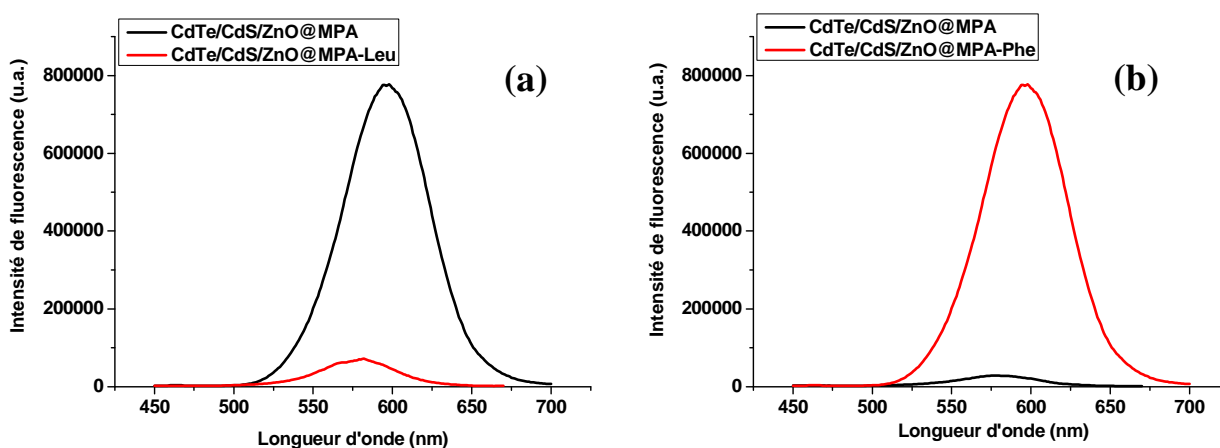


Figure 2. Spectres d'émission de fluorescence des QDs CdTe/CdS/ZnO@MPA avant et après couplage avec les acides aminés (a) Leu et (b) Phe.

IV.4. Stratégie B

Les résultats décevants obtenus par la stratégie A nous ont conduit à revoir la préparation des nanocristaux fonctionnalisés par des acides aminés hydrophobes.

Afin d'avoir une couverture maximale des QDs avec des ligands amphiphiles, nous avons choisi de préparer les nanocristaux par voie organométallique et les rendre hydrodispersibles via un échange de ligands mettant en jeu l'acide dihydrolipoïque (DHLLA) couplé aux acides aminés Leu ou Phe (Figure 3).

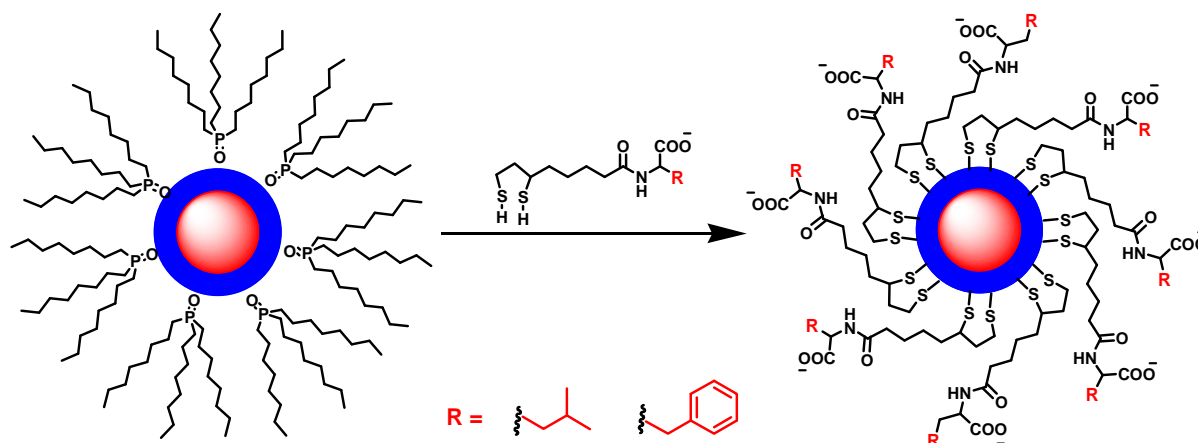


Figure 3. Echange de ligands à la surface des QDs CdSe/ZnS@TOPO par traitement avec le DHLLA couplé aux acides aminés Leu ou Phe.

Dans la suite de ce chapitre, nous allons détailler :

- La synthèse des ligands DHLLA-Leu et DHLLA-Phe à partir de l'acide lipoïque (LA).
- La synthèse des QDs CdSe/ZnS par voie organométallique ainsi que leur fonctionnalisation.
- Le marquage de biofilms bactériens à l'aide de ces sondes fluorescentes.
- Les traitements des images de fluorescence et les calculs géostatistiques qui nous ont permis de comparer la localisation/distribution spatiale de ces sondes fluorescentes amphiphiles par rapport à des QDs fonctionnalisés par des ligands hydrophiles tel que l'acide 3-mercaptopropionique (MPA).

Bibliographie

- [1] H. -C. Flemming, J. Wingender, *Nature Rev. Microbiol.* **2010**, 8, 623-633.
- [2] H. Kuo, C. Chan, L. L. Burrows, C. M. Deber, *Chem. Biol. Drug. Des.* **2007**, 69, 405-412.
- [3] C. Chan, L. L. Burrows, C. M. Deber, *J. Peptides Res.* **2005**, 65, 343-351.
- [4] A. Conrad, M. Kontro (Suutari), M. M. Keinanen, A. Cadoret, P. Faure, L. Mansuy-Huault, J. -C. Block, *Lipids* **2003**, 28, 1093-1105.
- [5] C. Chan, L. L. Burrows, C. M. Deber, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 38749-38754.
- [6] F. Jorand, F. Boué-Bigne, J. C. Block, V. Urbain, *Water Sci. Technol.* **1998**, 37, 307-315.
- [7] V. Ganaye, K. Keiding, T. M. Vogel, M.L. Viriot, J. C. Block, *Environ. Sci. Technol.* **1997**, 31, 2701-2706.
- [8] G. M. Wolfaardt, J. R. Lawrence, R. D. Roberts, D. E. Caldwell, *Microb Ecol.* **1998**, 35, 213-223.
- [9] R. Späth, H. -C. Flemming, S. Wuertz, *Water Sci. Technol.* **1998**, 37, 207-210.
- [10] G. G. Leppard, D. T. Flannigan, D. Mavrocordatos, C. H. Marvin, D. W. Bryant, B. E. McCarry, *Water, Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32, 3633-3639.
- [11] W. C. Steen, S. W. Karickhoff, *Chemosphere* **1981**, 10, 27-32.
- [12] J. Struijs, J. Stoltenkamp, D. Van de Meent, *Water Res.* **1991**, 25, 891-900.
- [13] F. Aldeek, L. Balan, J. Lambert, R. Schneider, *Nanotechnology* **2008**, 19, 475401.
- [14] J. A. Kloepper, R. E. Mielke, J. L. Nadeau, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, 71, 2548-2557.

IV.5. Surface-engineered quantum dots for the labeling of hydrophobic microdomains in bacterial biofilms

Surface-engineered quantum dots for the labeling of hydrophobic microdomains in bacterial biofilms

Fadi Aldeek,^{†‡} Christian Mustin,[§] Lavinia Balan,[#] Thibault Roques-Carmes,[‡] Marie-Pierre Fontaine-Aupart,[§] Raphaël Schneider^{†}*

LRGP, Nancy-University, CNRS, 1 rue Grandville, 54001 Nancy Cedex, France

LCPME, Nancy-University, CNRS, 405 rue de Vandoeuvre, 54506 Villers-lès-Nancy, France

LIMOS, Nancy-University, CNRS, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

IS2M, LRC 7228, 15 rue Jean Starcky, 68093 Mulhouse, France

ISMO, FRE 3363, 91405 Orsay Cedex, France

* To whom correspondence should be addressed. Phone: +33 3 83 17 50 53. E-mail: raphael.schneider@ensic.inpl-nancy.fr

[†] LRGP, Nancy-University

[‡] LCPME, Nancy-University

[§] LIMOS, Nancy-University

[#] IS2M, Université de Haute Alsace

[§] ISMO, Université Paris Sud

Quantum dots (QDs) nanoprobe are emerging as alternatives to small-molecule fluorescent probes in biomedical technology. This paper reports an efficient and rapid method of producing highly dispersed and stable CdSe core QDs with a hydrophobic gradient. Amphiphilic core/shell CdSe/ZnS QDs were prepared by ligand exchange at the surface of lipophilic CdSe/ZnS QDs using the dihydrolipoic acid (DHLLA) dithiol ligand linked to Leucine or Phenylalanine aminoacids. Contact angle relaxations on a hydrophobic surface and surface tension measurements indicated that aqueous dispersions of CdSe/ZnS@DHLLA-Leu or CdSe/ZnS@DHLLA-Phe QDs exhibit increased hydrophobicity compared to CdSe-core QDs capped by the hydrophilic 3-mercaptopropionic acid (MPA) ligand. We found that the surface functional groups and the ligand density at the periphery of the QDs prepared significantly dictated their interactions with a complex biological matrix called biofilm. Using fluorescence confocal microscopy and an autocorrelation function (semi-variogram), we demonstrated that MPA-capped QDs were homogeneously associated to the biopolymers, while amphiphilic CdSe/ZnS@DHLLA-Leu or CdSe/ZnS@DHLLA-Phe QDs were confined in microdomains. Results obtained clearly point out that the final destination of QDs in biofilms can properly be controlled by an appropriate design of surface ligands.

Introduction

In aqueous environments, microbial cells grow in association with surfaces, leading to the formation of assemblages of microorganisms that are embedded in a complex matrix of extracellular polymeric substances (EPS) that are called biofilms.¹ EPS have been shown to be a rich matrix of polymers, including polysaccharides, proteins, glycoproteins, nucleic acids, phospholipids and humic acids.^{2,3} The three-dimensional structure of the EPS is typically reported to aid in the formation of a gel-like network that keeps bacteria together in biofilms, allows the adherence of biofilms to surfaces, and protects cells against noxious environmental conditions.⁴ For gram-negative bacteria, EPS are mainly neutral or anionic polysaccharides.⁵ The three-dimensional organization and the stability of the EPS is ensured through hydrophobic interactions, e.g. Van der Waals interactions between low polarity amino acids or peptide sequence, and cross-linking by multivalent cations such as calcium and magnesium.⁶ Given the great diversity of microbial communities that form biofilms, it is however difficult to make generalizations about biofilm EPS structure, composition, and physiological function.

Although some beneficial effects for the human health have been assigned to the EPS (e.g. cholesterol-lowering, antitumoral or immunomodulating activities),⁷ biofilms mainly act as harbour sites for microorganisms on food and equipment surfaces. Once a community of biofilms established, cross-contamination of foods and food processing environments through cell sloughing can take place.⁸ The formation of biofilms enhances also the activity of microorganisms and provides a protective shield that reduces their susceptibility to environmental stresses such as sanitizers routinely used in the food industry.

Biofilm formation and architecture were found to be significantly dependent on environmental conditions.⁹ The role of EPS as diffusion matrix or reaction barrier has been established to protect cells against stresses. Under nutritional stresses for example, the production of EPS is increased to promote hydrophobic interactions for sorption onto solid surfaces.¹⁰ Increased EPS production is also observed to retard, prevent the diffusion or trap lipophilic compounds such as hydrocarbons, sanitizers, peptides or antibiotics which results in limited delivery of active forms to cells embedded in the biofilm.¹¹

Understanding the role of the EPS and especially of its hydrophilic/hydrophobic balance on attachment, on biofilm formation and on the protection of cells would provide fundamental information of practical importance for the control and the elimination of microorganisms, especially pathogens. Although there are many techniques to demonstrate the presence and to characterize hydrophobic interactions within biofilms (e.g. extraction, ATR-FTIR spectroscopy),¹²

fluorescence microscopy has emerged as a powerful tool for understanding the structure, the organization, and dynamic properties of biological systems under *in vivo* conditions. To date, a variety of hydrophobic organic fluorescent probes such as pyrene,¹³ phenanthrene,¹⁴ 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate (ANS),¹⁵ Nile red¹⁶ or Alexa 633 coupled to concanavalin¹⁷ have been used to label hydrophobic microdomains in biofilms.

In recent years, semiconductor nanocrystals (also referred to quantum dots, QDs) have drawn significant attention due to their unique structural, electronic, and optical properties originating from their large surface-to-volume ratio and quantum confinement effect.¹⁸⁻²³ Compared to organic dyes, QDs are characterized by continuous absorption bands, narrow fluorescence emission spectra, and high chemical and photobleaching stability.²⁴⁻²⁹ QDs can also be engineered with specific coatings for biocompatibility, conjugated to bioactive moieties to target specific cells, or fabricated with adequate functionality enabling conjugation to a biorecognition element. Numerous recent studies have shown that QDs functionalized with bioaffinity probes such as antibodies, peptides, or other small molecules could achieve cell-specific targeting and labelling.^{21,30-33}

We demonstrate herein that QDs-capped by the hydrophilic thioacid 3-mercaptopropionic acid or by hydrophobic aminoacids like leucine or phenylalanine strongly associate with the biofilm produced by gram-negative *Shewanella oneidensis* bacterium and that their distribution within the biofilm is dependent on surface hydrophobicity. Hydrophilic QDs were found to distribute homogeneously in the whole biofilm, while amphiphilic QDs strongly accumulate in microdomains. Results obtained using confocal fluorescence microscopy were confirmed by geostatistical analyses.

Experimental section

Chemicals. The chemicals used in the experiments included selenium powder (99.5%), CdCl₂·2.5H₂O (99%), NaBH₄ (96%), 3-mercaptopropionic acid (MPA, 99+%), cadmium oxide (99.99%), stearic acid (97%), trioctylphosphine oxide (TOPO, 99%), 1-hexadecylamine (HAD, 90%), trioctylphosphine (TOP, 90%), zinc stearate (technical grade), sulphur powder (99%), oleylamine (70%), hexamethyldisilathiane (98%), diethylzinc (1.0 M in heptane), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC, 98%), *N*-hydroxysuccinimide (NHS, 98%), HEPES sodium salt (99.9%), (±)- α -lipoic acid (>99%), L-leucine (>99%), L-phenylalanine (>99%), phthaldialdehyde (>97%), and 2-mercaptoethanol (>99%). All chemicals were used without further purification.

Synthesis of quantum dots. Full experimental details describing the synthesis of QDs using hydrothermal or organometallic procedures, ligands syntheses, and cap exchanges are provided in

the Supplementary Material. The concentration of QDs in solution was estimated from the reported extinction coefficient per mole of particles (ϵ) by using the Beer-Lambert's law.³⁴

Characterization. All the optical measurements were performed at room temperature (20 ± 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 QY values were determined by the equation: $QY(\text{sample}) = (F_{\text{sample}}/F_{\text{ref}})(A_{\text{ref}}/A_{\text{sample}})(n_{\text{sample}}^2/n_{\text{ref}}^2)QY_{(\text{ref})}$, where F, A and n are the measured fluorescence (area under the emission peak), the absorbance at the excitation wavelength, and the refractive index of the solvent, respectively. PL spectra were spectrally corrected and quantum yields were determined relative to Rhodamine 6G in ethanol (QY = 94%).³⁵

To determine the morphology and the diameters of the nanoparticles, the samples were analyzed by Transmission Electron Microscopy (TEM). TEM images were taken by placing a drop of the particles in water onto a carbon film supported copper grid. Samples were studied using a Philips CM20 instrument with LaB₆ cathode operating at 200 kV. XPS measurements were performed at a residual pressure of 10^{-9} mbar, using a KRATOS Axis Ultra electron energy analyser operating with an Al K α monochromatic source. Electrophoretic mobilities (i.e. the zeta potential) and dynamic light scattering (DLS) were performed at room temperature using a Malvern zetasizer HsA instrument with an He-Ne laser ($4 \cdot 10^{-3}$ W) at a wavelength of 633 nm. The QD aqueous solutions were filtered through Millipore membranes (0.2 μm pore size). The data were analyzed by the CONTIN method to obtain the hydrodynamic diameter (d_H) and size distribution in each aqueous dispersion of nanoparticles. For fluorescence correlation spectroscopy (FCS) experiments, the fluorescence output were focused on a PicoHarp300 module (PicoQuant, Germany) equipped with a Single Photon Avalanche Diode detector (SPAD, time resolution of 250 ps). Data acquisition was performed with the SymPhoTime software which computes on-line the correlation function of fluorescence fluctuations. To measure the translational diffusion time with 10% to 20% accuracy, data recording times 30 s (number of iterations 10) for both solution acquisition. The data were analyzed using both using the SymPhoTime software and an in-house routine which enabled: (i) the selection and averaging of chosen successive acquisitions, (ii) the adaptation of different diffusion models to analyze the autocorrelation function, and (iii) the calculation of associated standard deviations. The incident laser energy was attenuated to less than 1 mW at the sample in order to reduce the risk of photobleaching both types of QDs.

Two measurements were made to characterise the amphiphilic properties of the functionalized QDs: surface tension and contact angle measurements. The pendant drop technique (DataPhysics,

series OCA) was used to measure the equilibrium liquid/vapor surface tensions of the QDs dispersions. A pendant drop was formed on the edge of the needle of a syringe using a motor driven syringe its shape was recorded using a CCD camera. The drop volume was 5 μ L. The QDs concentration was 1000 nM unless stated otherwise. We measure the contact angle of aqueous QDs dispersion onto a hydrophobic fluoropolymer surface for indirect determination of the hydrophobicity of the QDs. The substrate was a glass sheet bearing a thin fluoropolymer layer. This layer was formed by dip-coating of a fluoropolymer solution (AF 1600, Dupont) dissolved in perfluoro-2-butyl tetrahydrofuran (FC-75, Acros) on the substrate according to the procedure of Seyrat and Hayes.³⁶ The glass plate was immersed in the coating solution, which consisted of 4 wt. % AF 1600, and withdrawn at a velocity of 1 mm/s which resulted in a coating thickness of 1.5 μ m. The contact angle measurements were performed using a DataPhysics OCA 20 contact angle measuring device. For that purpose, 5 μ L droplets of QDs solution in water were deposited at 25°C on a hydrophobic fluoropolymer surface and contact angles were measured 1 min after deposition since the contact angle variation was less than 0.5° after that period. A videocamera was focused on the droplet, and a baseline on the videoscreen was adjusted to coincide with the base of the drop. All measurements were repeated 10 times on different position of the surface and the data presented below were the averages of the repeated results.

Preparation and labeling of *Shewanella oneidensis* MR1 Biofilms. Biofilms were grown in flow cells previously used by Paris *et al.*³⁷ Briefly, the setup consisted of a Plexiglas® block, a silicon gasket ($e = 0.512$ mm) and a glass slide (70 x 44 x 0.19-0.21 mm; PolyLabo, France) fastened by means of vacuum suction. The dimensions of the test channel were 45 x 15 x 0.512 mm. A 1.5 mL volume of the LB medium-grown stationary phase culture of *Shewanella oneidensis* MR1 suspension was inoculated by syringe injection. A culture lactate + fumarate medium (LML + F) prepared according to Teal *et al.*³⁸ was aerated by sterile air bubbling (dissolved di-oxygen around 6.5 mg O₂/L) and pumped into the flow-cell at a flow rate of 0.2 mL/min. Biofilms were grown at 30°C for 72 hours on average. After the growth period, a 250 nM solution of QDs was injected via a syringe pump, and incubation was performed for 15 min before confocal microscope observations.

Variogram analysis. As previously described,^{39,40} informations given by variograms are powerful to point out spatial patterns included in experimental data points of images. In the present work, the semi-variogram $\gamma(h)$ was used to describe the degree of spatial correlation between pairs of pixels in QDs-stained biofilms, i.e. the spatial continuity of both QDs staining patterns. The variogram is a measure of spatial autocorrelation that numerically characterize QDs patterns without postulating models for staining processes or particule-matrix interactions.^{41,42} The spatial

variance between the digital numbers of any two distinct pixels would depend on their separation distance (h). The semivariance, $\gamma(h)$ of the fluorescence intensity (F), between any two pixels at a distance h can be expressed as:

$$\gamma_{(h)} = \frac{1}{2} \text{Var}(F(x_i) - F(x_i + h)) = \frac{1}{2n(h)} \sum_{i=1}^{n(h)} [F(x_i) - F(x_i + h)]^2 \quad (\text{Eq.1})$$

where: $\gamma_{(h)}$ is the semivariance at lag distance h; $F(x_i)$ is the fluorescence level (digital value) of the pixel at location x_i . The method of variograms, which assigns a spatial correlation structure to the data was applied to equally spaced confocal data as described below. A spherical model (most commonly used) fitted through the experimental data points was used to quantify spatial patterns (plateau, range and nugget variance). The plateau corresponds to the overall variance in the dataset and the range is the maximum distance of spatial autocorrelation. The nugget variance is the positive intercept of the variogram at the origin and can be caused by spatial sources of variation at distances smaller than pixel size (sampling interval). Assuming that the spatial correlation between pixels also depends on the direction of orientation, semi-variograms were computed from lines and columns of pixel grid (direction 0, $\pi/2$) and from diagonal transects (direction $3\pi/4$, $\pi/4$). To estimate the spatial correlation of QDs fixed in biofilm structure, the variograms were computed exclusively on several representative regions (300 x 300 pixels², pixel size = 0.168 μm) randomly distributed in biofilm polymeric matrix. In this case, the range and the maximum variance values are characteristic of the QDs staining patterns inside the the biofilm.

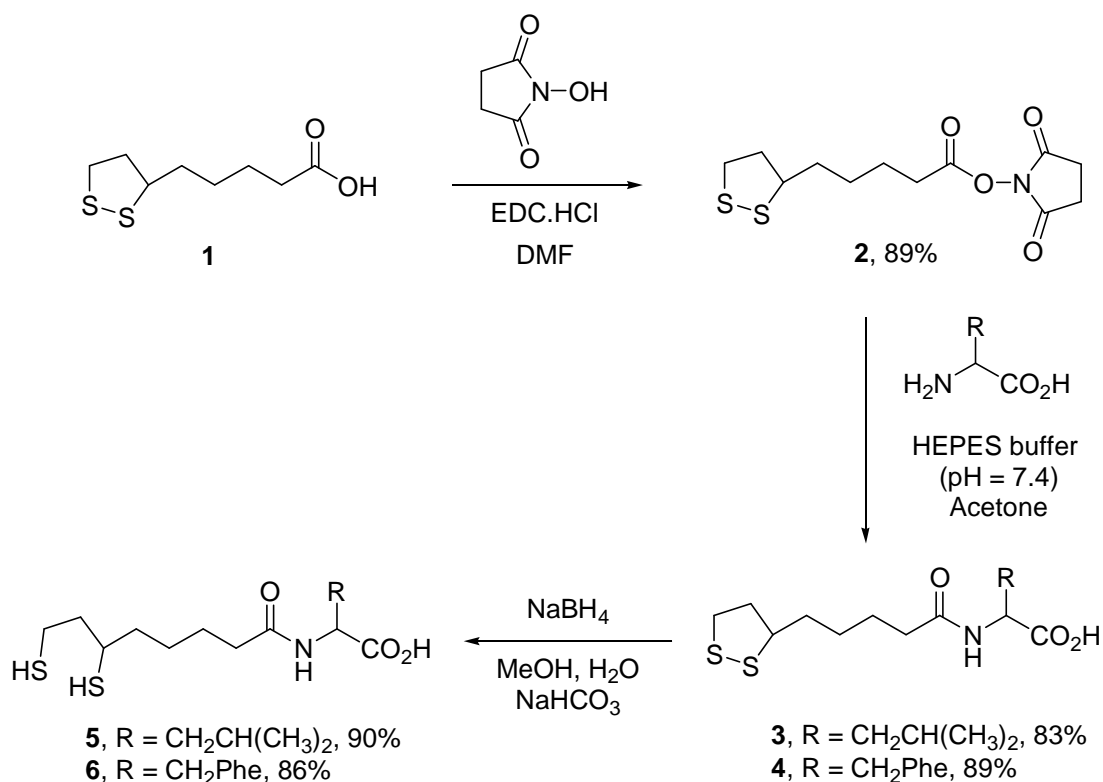
Results and discussion

Synthesis of quantum dots and of surface ligands.

MPA-capped green-emitting alloyed CdSe(S) QDs with a photoluminescence quantum yield (PL QY) of 24% were synthesized under hydrothermal conditions at 150°C as previously reported.⁴³ TOPO-capped core/shell CdSe/ZnS QDs were prepared by reacting organometallic precursors at high temperature in a coordinating solvent mixture (TOP/TOPO/HDA).⁴⁴ Two batches of QDs were prepared using this synthetic method. Green-emitting CdSe/ZnS QDs ($\lambda_{\text{em}} = 524 \text{ nm}$) with a PL QY of 65% and red-emitting CdSe/ZnS QDs ($\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$) with a PL QY of 37% in chloroform. Details of the synthetic procedures are provided in the Supplementary Material.

We have chosen to anchor Leu and Phe at the surface of CdSe/ZnS QDs using dihydrolipoic acid (DHLLA) as linker because bidentate ligands like DHLLA have a greater affinity than simple thioacids for the surface of QDs and afford nanocrystals with higher colloidal stability in aqueous media.⁴⁵

The synthetic route to DHLA-Leu and DHLA-Phe ligands starting from lipoic acid **1** is outlined in Scheme 1.



Scheme 1. Synthesis of QDs ligands **5** and **6**

Coupling of Leu or Phe with *N*-hydroxysuccinimide-activated lipoic acid **2** afforded amides **3** and **4** in 83 and 89% yield, respectively. Subsequent reduction of the 1,2-dithiolane ring with sodium borohydride yielded the targeted ligands **5** and **6**, which were used without purification for the surface functionalization of TOPO-capped CdSe/ZnS QDs.

Size, Composition, PL Properties and Colloidal Stability of Quantum Dots.

Cap exchange of the native TOPO and HDA ligands on the QDs with ligands **5** or **6** effectively promoted the transfer of nanocrystals in aqueous media. Fig. 1 shows absorption and normalized PL spectra of the DHLA-Leu and DHLA-Phe functionalized green- and red-emitting CdSe/ZnS QDs and of the parent TOPO-capped QDs. As can be seen on Figure 1b, red-emitting QDs retain the spectroscopic properties of the starting nanocrystals with respect to light absorption and photoluminescence, indicating that ligand exchange does not result in deterioration of the nanocrystals inorganic cores. A 6 nm red-shift from 520 to 526 nm was observed for the PL emission spectra after the ligand exchange at the surface of green-emitting QDs. These occasional

small changes in the optical properties of QD's following transfer into aqueous solutions are commonly observed.^{18,46} The PL QYs of DHLA-Leu and DHLA-Phe-stabilized CdSe/ZnS QDs were found to decrease after transfer in water, which has been known when thiols-based ligands are assembled on the surface of CdSe/ZnS and transferred into a high polarity solvent like water.⁴⁷ The PL QYs are 10% and 8% for the 600-nm-QDs coated with DHLA-Leu and DHLA-Phe, respectively, and 13% and 12% for the 524-nm-QDs coated with DHLA-Leu and DHLA-Phe, respectively.

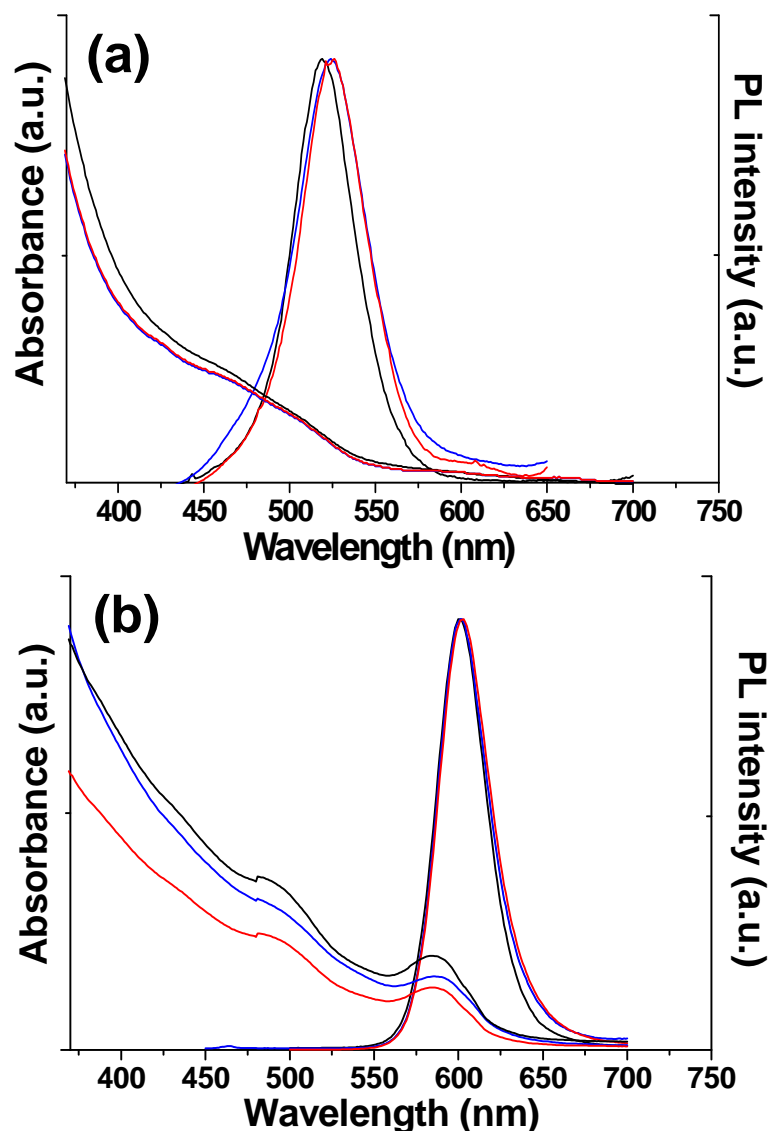


Fig. 1. Absorption and photoluminescence spectra of (a) green-emitting CdSe/ZnS QDs before and after ligand exchange, and (b) red-emitting CdSe/ZnS QDs before and after ligand exchange. Black line: native TOPO-capped QDs, blue line: CdSe/ZnS@DHLA-Leu QDs, and red line: CdSe/ZnS@DHLA-Phe QDs.

We used several techniques to characterize the structure and the composition of the prepared particles. The elemental composition of the QDs was first analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Figure 2 shows the typical XPS spectra of 600 nm-emitting CdSe/ZnS@DHLA-Phe QDs, where panel a is the survey spectrum and panels b-e are the high-resolution binding energy spectra for Cd and N, Se, Zn and S species, respectively. According to the survey spectrum, the elements Cd, Se, Zn, S, Na, O, C and N were detected. The typical peaks of Cd 3d_{5/2} at 404.5 eV, Cd 3d_{3/2} at 441.0 eV, Se 3d at 53.2 eV, Zn 2p_{3/2} at 1021.7 eV, S 2p_{3/2} at 161.1 eV, S 2p_{1/2} at 162.3 eV, Na 1s at 1071.7 eV, O 1s at 531.3 eV and N 1s at 399.4 eV confirmed the proposed structure of the QDs.

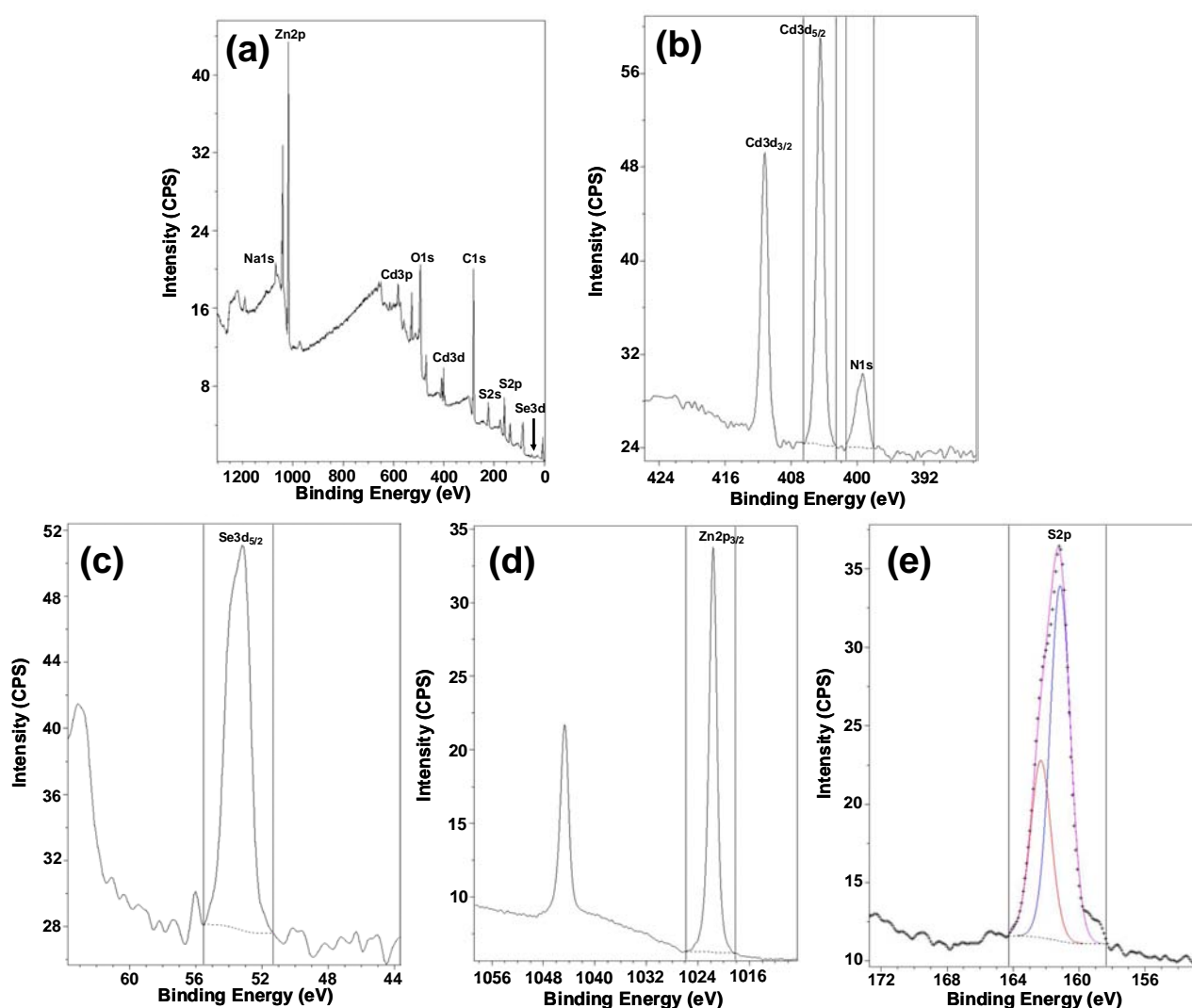


Figure 2. XPS spectra of 600 nm-emitting CdSe/ZnS@DHLA-Phe QDs. (a) XPS survey spectrum. Binding energy spectra of (b) Cd 3d and N 1s, (c) Se 3d, (d) Zn 2p, and (e) S 2p.

Figure 3 shows TEM images of the CdSe-core nanocrystals prepared either under hydrothermal conditions or via the organometallic approach. All nanocrystals appeared relatively monodisperse. We calculated mean diameters of 2.4 ± 0.6 nm for MPA-capped CdSe/CdS QDs (Figure 2a), 2.6 ± 0.5 and 2.7 ± 0.6 nm for green-emitting CdSe/ZnS capped with DHLA-Leu and DHLA-Phe ligands, respectively, (Figures 3b and 3c), and 3.9 ± 0.6 and 4.0 ± 0.5 nm for red-emitting CdSe/ZnS capped with DHLA-Leu and DHLA-Phe ligands, respectively (Figures 3d and 3e). The average diameters were obtained by averaging the sizes of 100 particles from the TEM images. The diameters estimated from TEM micrographs were found to be coherent with those calculated using the published sizing curve and size-dependent molar extinction coefficient at the first absorption maximum.³⁴

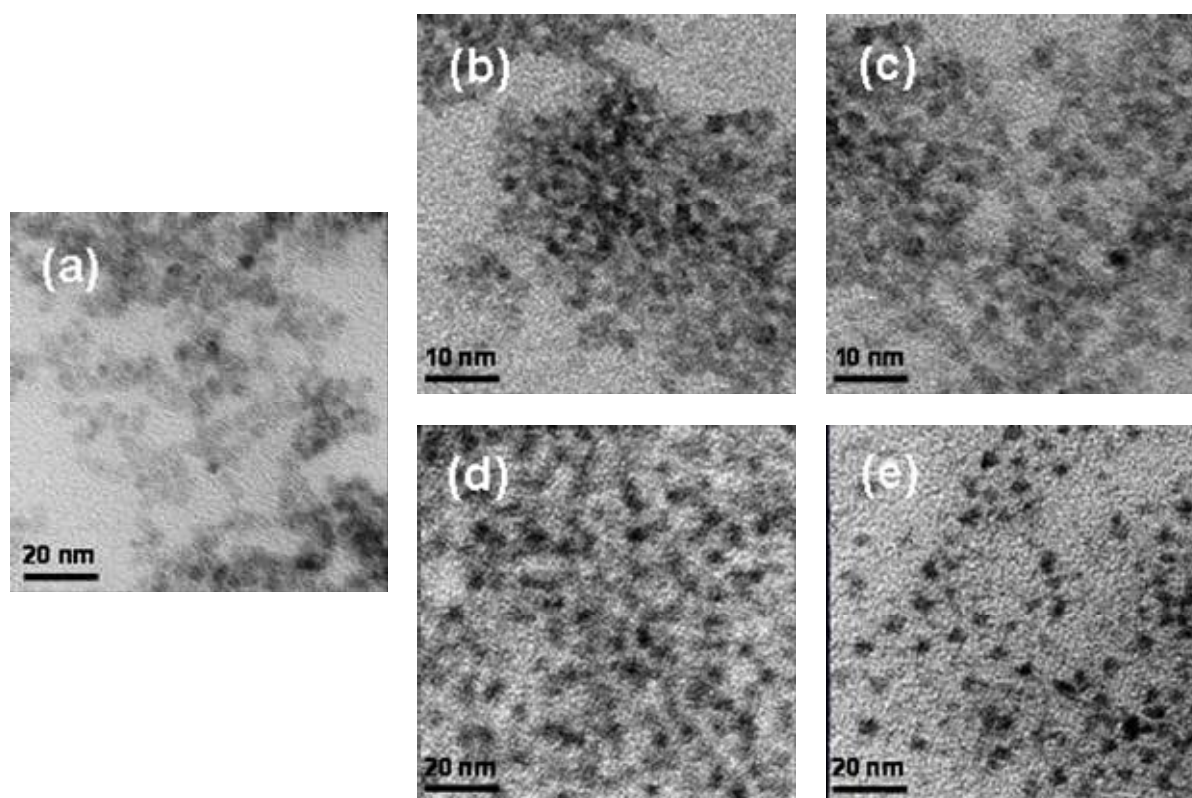


Figure 3. TEM micrographs of (a) CdSe(S)@MPA, (b) 526 nm-emitting CdSe/ZnS@DHLA-Leu, (c) 526 nm-emitting CdSe/ZnS@DHLA-Phe, (d) 600 nm-emitting CdSe/ZnS@DHLA-Leu, and (e) 600 nm-emitting CdSe/ZnS@DHLA-Phe QDs.

To further study the sizes and size distributions of the QDs prepared in aqueous solution, dynamic light scattering experiments were first conducted. Indeed, the hydrodynamic diameter of QDs is a very important parameter since only small-sized QDs are suited for *in vivo* applications. As can be seen in Table 1, diameters obtained from DLS experiments are higher than those calculated from

TEM photographs (see the supplementary material for the scattering intensity distribution of QDs). This can be explained by the thiol ligands outspread in aqueous solution while they are highly contractive after drying on copper grids and by the solvation layer around the QDs in aqueous media. All QDs appear well-dispersed in water and no obvious aggregation at concentrations up to 1000 nM was detected. The electric potential, referred to as zeta potential ζ , which controls the colloidal stability and interparticles interactions, was also determined for the 5 sets of QDs (Table 1). ζ values obtained confirmed the presence of negative charges on the surfaces of the QDs, due to the carboxylate end group of the MPA ligand or to the Leu or Phe aminoacids.

Table 1. Hydrodynamic diameters determined by DLS and zeta potential of QDs.

QDs	D_H (nm)	ζ (mV)
CdSe(S)@MPA	8.9 ± 2.1	-33.0 ± 2
526-nm-CdSe/ZnS@DHLA-Leu	17.5 ± 5.2	-33.4 ± 3
526-nm-CdSe/ZnS@DHLA-Phe	21.0 ± 7.2	-31.0 ± 3.5
600-nm-CdSe/ZnS@DHLA-Leu	21.7 ± 9.2	-36.0 ± 3.5
600-nm-CdSe/ZnS@DHLA-Phe	25.1 ± 9.7	-39.0 ± 2.5

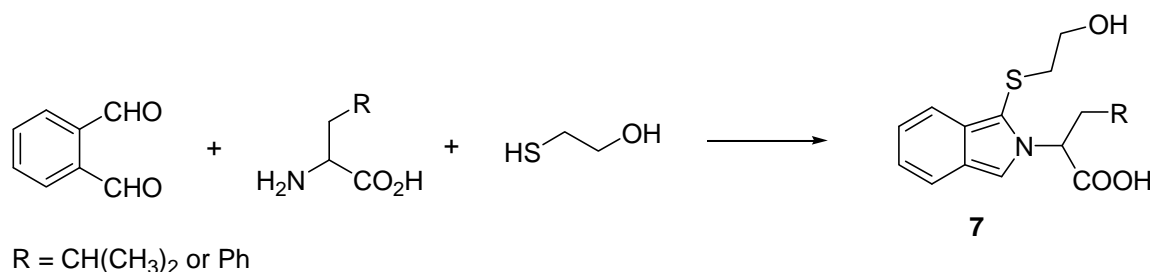
Hydrodynamic diameters measurements obtained by DLS were confirmed using fluorescence correlation spectroscopy (FCS). FCS is an ultrasensitive technique that uses statistical analysis of the fluctuation of fluorescence emitted from a small, optically well-defined open-volume. The conceptual and theoretical basis of FCS has been well established⁴⁸ and the important equations for FCS data evaluation are described in the Supplementary Material. To date, the autocorrelation curve obtained from FCS has become an important tool for characterizing the average number of luminescent particles in the open volume element, the coefficient of diffusion, or the hydrodynamic diameters of nanoparticles.⁴⁹ The average diffusion times τ_D , diffusion coefficient D and hydrodynamic diameters D_H of freely diffusing QDs in ultrapure water containing 40 nM of nanoparticles are described in Table 2. Two fluorescence components fit of the correlation function was used for aqueous dispersion of QDs. FCS measurements showed that fluorescing signals belong to the diffusion of QDs, thus demonstrating that no other aggregation or structure stabilization occurred. As DLS averages the whole sample content while FCS averages only the fluorescent sample content in the optically open-volume ($1 \mu\text{m}^3$), the small increase of hydrodynamic diameters obtained by DLS is not surprising. D_H data of Tables 1 and 2 are in good agreement and show that all QDs are well-dispersed in aqueous solution.

Table 2. Diffusion times τ (ms), diffusion coefficients D (m^2/s) and hydrodynamic diameters of QDs calculated by FCS^a

QDs	τ_I (ms)	D_{FCS} (m^2/s)	D_H (nm)	Monomeric %
CdSe/CdS@MPA	0.18 ± 0.02	$7.3 \pm 1.3 \cdot 10^{-11}$	6.0 ± 1.1	96
526-nm-CdSe/ZnS@DHDLA-Leu	0.28 ± 0.03	$4.8 \pm 0.4 \cdot 10^{-11}$	9.0 ± 1.4	70
526-nm-CdSe/ZnS@DHDLA-Phe	0.34 ± 0.02	$4.0 \pm 0.6 \cdot 10^{-11}$	10.6 ± 1.7	80
600-nm-CdSe/ZnS@DHDLA-Leu	0.59 ± 0.05	$2.2 \pm 0.2 \cdot 10^{-11}$	18.0 ± 1.8	85
600-nm-CdSe/ZnS@DHDLA-Phe	0.55 ± 0.05	$2.4 \pm 0.3 \cdot 10^{-11}$	17.5 ± 2.5	74

^a τ_D is the diffusion time obtained from FCS fit procedure, D_{FCS} is the diffusion coefficient related to fluoresceine used as standard (D_{FCS} diffusion coefficient is obtained from the tow components fit procedure and extrapolation to $q = 0$), and D_H is the hydrodynamic diameter of QDs.

The quantification of Leu and Phe units at the surface of CdSe/ZnS QDs was achieved by complete hydrolysis using 12N HCl at 160°C for 12h of the ligands surrounding the dots. Leu and Phe aminoacids thus produced were next reacted with o-phthaldialdehyde (OPA) in the presence of 2-mercaptoethanol to yield a fluorescent isoindole **7** which was detected at 450 nm (Scheme 2).⁵⁰ Comparison of the fluorescence intensities measured after acid hydrolysis with those of a calibration curve built up with free Leu and Phe aminoacids showed that green-emitting CdSe/ZnS (average diameter of ca. 2.6 nm) and red-emitting QDs (average diameter of ca. 4.0 nm) were functionalized by ca. 340 and 450 Leu and Phe ligands, respectively. These values indicate that the ligand density is relatively homogeneous when TOPO-capped CdSe/ZnS QDs of a given diameter are functionalized with DHDLA-Leu **5** or DHDLA-Phe **6** ligands, and correlate well with ζ measurements described in Table 1. An increase of the nanoparticle diameter is accompanied by increases of the ligand and of charge densities at the nanoparticle surface.



Scheme 2. Synthesis of fluorescent isoindole **7** used for the quantification of Leu and Phe aminoacids at the periphery of QDs.

Hydrophobic/Hydrophilic Balance of Quantum Dots

Recent studies have demonstrated that accumulation of nanoparticles at the water-air interface is responsible for the decrease of surface tension observed for nanofluids (liquids containing nanoparticles, nanotubes, ...).⁵¹ We assumed that, a given concentration of nanoparticles, amphiphilic QDs will be more driven at the water-air interface and thus reduce more effectively the surface energy than hydrophilic ones. Surface tension measurements obtained with the 5 sets of QDs prepared are reported in Table 3. In the absence of QDs, the air/water surface tension γ_{LV} was measured to be 73 mN/m. The relatively high γ_{LV} value measured for CdSe(S)@MPA QDs (65 mN/m) shows that the surface activity of these nanoparticles is negligible and that they do not exhibit amphiphilic properties. γ_{LV} values obtained for aqueous dispersions of CdSe/ZnS QDs capped by DHLA-Leu and DHLA-Phe ligands was markedly reduced, thus demonstrating that these QDs are more effectively trapped at the air/water interface than CdSe(S)@MPA QDs. For a given surface ligand, QD diameter had little effect on γ_{LV} . Green- or red-emitting QDs capped by DHLA-Leu or DHLA-Phe ligands have similar γ_{LV} values (57-56 mN/m and 51-49 mN/m for QDs capped by DHLA-Leu and DHLA-Phe, respectively). Finally, the surface tension of CdSe/ZnS@DHLA-Phe QDs is lower than that of CdSe/ZnS@DHLA-Leu QDs, probably due to the increased hydrophobic character of the aromatic ring compared to the *i*-Bu group.

Table 3. Surface tension (γ_{LV}), and contact angles θ of QDs aqueous dispersions on fluoropolymer surface^a

	γ_{LV} (mN/m)	θ (degree)	θ (degree)
	[C] = 1000 nM	[C] = 1000 nM	[C] = 250 nM
CdSe(S)@MPA	65 ± 1.6	100 ± 0.7	105 ± 2.2
524-nm-CdSe/ZnS@DHLA-Leu	57 ± 1.6	94 ± 1.4	n.d. ^b
524-nm-CdSe/ZnS@DHLA-Phe	51 ± 2.5	88 ± 1.5	n.d. ^b
600-nm-CdSe/ZnS@DHLA-Leu	56 ± 2.0	90 ± 2.5	102 ± 2.7
600-nm-CdSe/ZnS@ DHLA-Phe	49 ± 1.7	81 ± 1	96 ± 2.2

^a C is the concentration of QDs in aqueous solution. ^b n.d. = not determined

Contact angles of aqueous dispersions of the QDs onto fluoropolymer surface were also measured. Fig. 4 shows representative photographs of the droplets containing the 5 QDs studied on a fluoropolymer surface. All the contact angle results are listed in Table 3. Due to the high hydrophobicity of the fluoropolymer, a droplet of distilled water exhibits a high contact angle of $\theta =$

115°. Contact angle relaxation occurred for drops of all QDs solutions used in this study and was found to be strongly influenced by the ligand at the periphery of QDs. For CdSe(S)@MPA QDs at a concentration of 1000 nM, the contact angle remains high ($\theta = 100^\circ$) (Figure 4a) but decreases markedly to 94 and 88° for green-emitting CdSe/ZnS capped by DHLA-Leu and DHLA-Phe ligands, respectively (Figures 4b and 4c). For larger red-emitting QDs with a higher ligand coverage, contact angles were reduced to 90 and 81.5° for DHLA-Leu and DHLA-Phe ligands, respectively. Finally, comparison of contact angle values obtained for QDs concentrations of 1000 and 250 nM indicate that the contact angle relaxations increased with increasing QDs concentration, which is consistent with observations made with surfactant solutions.⁵² Results obtained suggest that hydrophobic groups of DHLA-Leu and DHLA-Phe ligands interact with the fluoropolymer surface and that the hydrophobic carbon tails are outward from the cores. This configuration should be beneficial to study the ligand dependent association of QDs with bacterial biofilms.

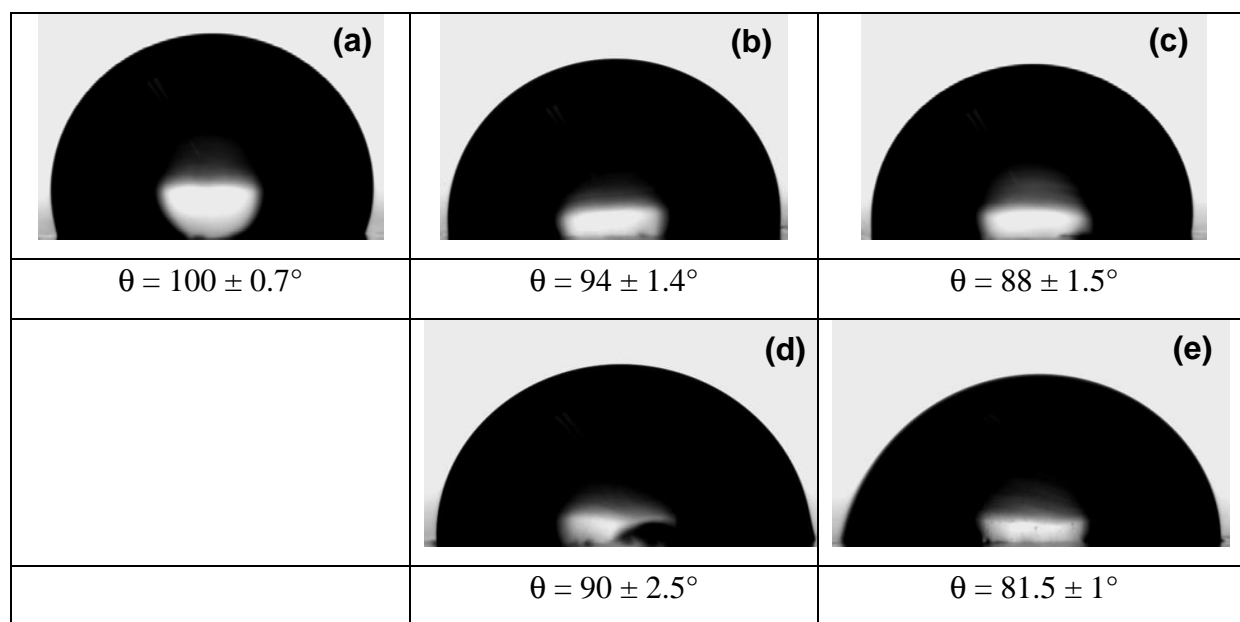


Figure 4. Photographs and contact angle on hydrophobic surface (Teflon) of droplets of (a) CdSe(S)@MPA, (b) 524-nm-CdSe/ZnS@DHLA-Leu, (c) 524-nm-CdSe/ZnS@DHLA-Phe, (d) 600-nm-CdSe/ZnS@DHLA-Leu and (e) 600-nm-CdSe/ZnS@DHLA-Phe respectively. All aqueous dispersions of QDs were used at a concentration of 1.10^{-6} M.

Biofilms of *Shewanella oneidensis* were grown for 48 h under the constant flow (200 μ L/min) of a LML medium³⁸ supplemented with fumarate (0.5 mM) in flow cell systems that can be accommodated on a microscope set up. After the growth period, biofilm coverage on glass slide surfaces ranged from monolayers comprised of randomly located bacteria to complex aggregates and microcolonies. Biofilm thickness after 72 h growth at 30°C did not exceed 100 μ m. In

preliminary results, we found that the autofluorescence of *S. oneidensis* biofilms was weak and could completely be suppressed due to the bleaching effect of the strong excitation light of the confocal microscope. 250 nM solutions of CdSe(S)@MPA and 600 nm-CdSe/ZnS@DHLA-Leu QDs were injected in the biofilm via a syringe pump and incubation was performed for 5 min. Unbound QDs were removed by washing the biofilm with fresh culture medium. A dual color image of the biofilm stained by these two probes is shown in Figure 5a; this image clearly shows the bacterial aggregates in the biofilm, and spaces. These spaces form part of a network of channels that allow communication between the substratum of the biofilm and the outer fluid phase. These channels and the three-dimensional structures of the labeled biofilm, including the mushroom-like protusions and the aggregates of around 100 μm in thickness classically observed with such collections of surface-attached microorganisms,⁵³ are best seen in the 3-D reconstruction of the biofilm shown in Figure 5b. As can be seen in Figure 5a, the more hydrophilic CdSe(S)@MPA QDs were found to be homogeneously distributed in the whole biofilm, which is not surprising for such aggregates of microorganisms composed of up to 90% of water.^{6e,f}

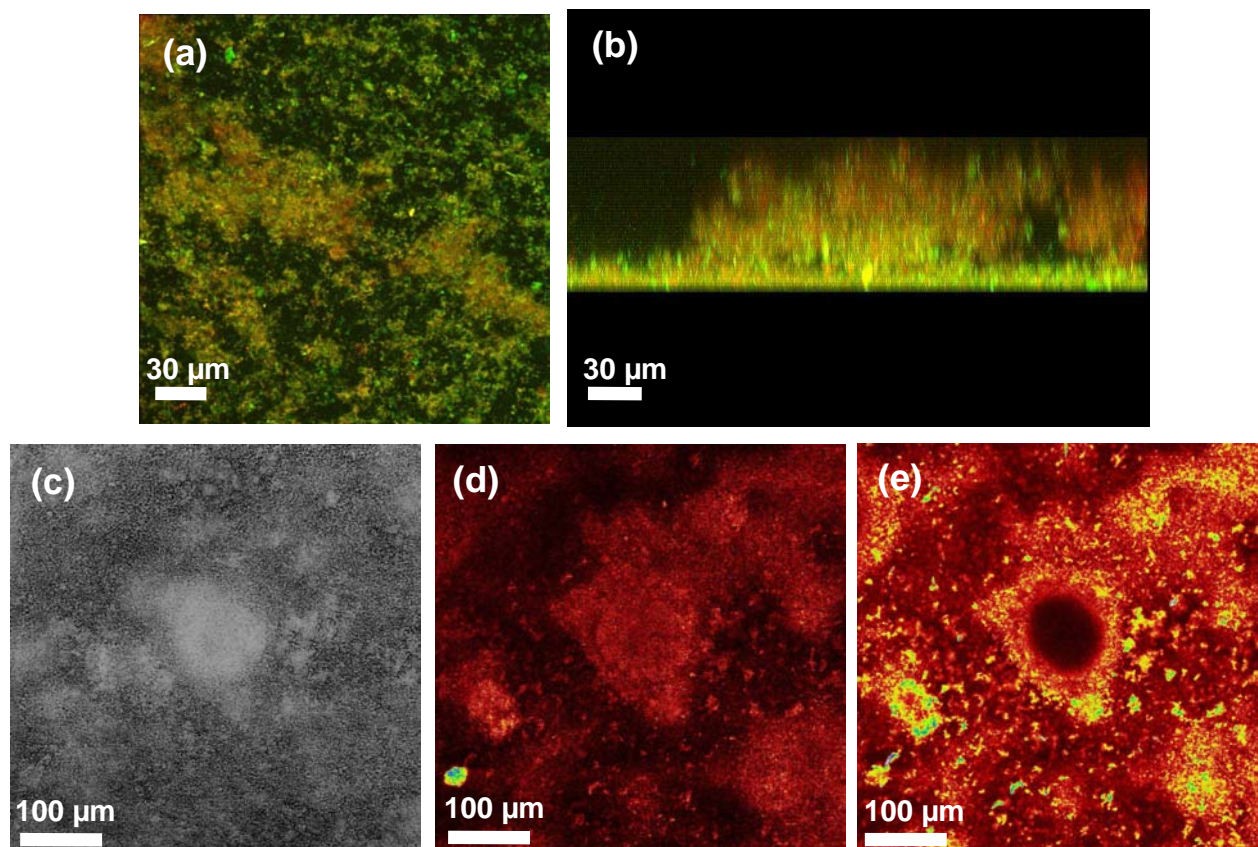


Figure 5. Confocal microscopy images of a live, hydrated *S. oneidensis* biofilm treated with CdSe(S)@MPA and 600 nm-CdSe/ZnS@DHHLA-Leu QDs: (a) merge of green and red channel fluorescence in a XY focal plane 30 μm from the bottom glass slide, (b) projection (ZY) of X sections, (c) transmission image of a randomly selected region of the biofilm, the corresponding fluorescence images obtained with (d) CdSe(S)@MPA QDs and (e) CdSe/ZnS@DHHLA-Leu QDs, showing the distribution heterogeneity of QDs and the clustering obtained with CdSe/ZnS@DHHLA-Leu QDs. Images d and e were stored in 8 bits format (256 grey levels) and were displayed in a pseudo-color look up table (LUT) to express QDs' density within the biofilm. All confocal microscopy images were obtained with laser excitation at 405 nm.

Hydrophobic microdomains that may be constituted of liposaccharides, small peptide sequences, deoxy-carbohydrates (e.g. fucose or rhamnose) or acetylated and methylated sugars are present in all biofilms.^{6e-f} As a consequence, the distribution of the more hydrophobic 600 nm-CdSe/ZnS@DHHLA-Leu QDs within the biofilm was found to be less homogeneous than that observed for CdSe(S)@MPA QDs. After staining with CdSe/ZnS@DHHLA-Leu QDs, highly fluorescent and localized clusters can be observed on confocal microscopy images, suggesting the confinement of these QDs in a more hydrophobic environment.

This confinement was analyzed ratiometrically based on CdSe(S)@MPA QDs and images were displayed in a pseudo-color look up table (LUT) to express QDs' density within the biofilm in Figures 5d-e. Specifically, distribution of CdSe(S)@MPA QDs is homogeneous (red), both horizontally and vertically, as revealed by the small variation in top and side maximum-intensity projections (data not shown). Compared to CdSe(S)@MPA QDs, the confinement/clusterisation of CdSe/ZnS@DHHLA-Leu is markedly more pronounced. Many microdomains, located at the periphery of dense aggregates or inside loose aggregates, where these dots strongly accumulate can be observed in Figure 5e (yellow).

However, there are limitations, particularly to the chemical interpretation of fluorescent probe binding patterns, in complex environments such as biofilms. Thus, there is a requirement for additional informations about the QDs distributions and spatial continuity of clustering observed previously. Spatial distribution/accumulation of the QDs in biofilm was quantified by using autocorrelation function such semi-variogram calculation (see Eq. 1 in the Experimental Section). Semi-variograms $\gamma(h, \alpha)$ obtained from a biofilm stained with amphiphilic CdSe/ZnS@DHHLA-Phe QDs (Figure 6a) are shown in Figure 6b. It was found that the $\gamma(h, 0^\circ)$ increased accordingly to up to h values comprised between 2 and 6 μm , after which they levelled monotonically at $\gamma(h)_{\text{max}} = 400 \pm 50$. Fluctuations provide valuable information about the non-systematic variability of QDs distribution in biofilms. This preferential clustering of data is due to the presence of pseudo-periodic patterns in the whole biofilm architecture. Subsequently, the range h (i.e. the lag distance at the first peak) gives an indication of the average extent of the QDs clusters, which is about 8 μm . The distance from the peak to trough is about 5 μm . Moreover, as the peaks are not attenuated and the cyclicity is not damped, this defines spatially regular clusters. For the four directions tested, the staining exhibits a low variation in the range values.

The variograms (Figure 6b) obtained from biofilms labelled with CdSe(S)@MPA QDs (Figure 6a) were different. It was found that the semi-variances $\gamma(h, 0^\circ)$ increased according, to up to $h = <1.2 \mu\text{m}$, after which they leveled monotonically at $\gamma(h)_{\text{max}} = 200 \pm 3$. As the variance is different from zero at the origin, there is a nugget effect, which could be linked to unresolved structures of a size lower than the pixel resolution (i.e. $< 170 \mu\text{m}$). Because ranges remain constant whatever the azimuth, the geometrical heterogeneity of QDs clusters was not detectable. In contrast to results obtained with CdSe/ZnS@DHHLA-Phe QDs, $\gamma(h)_{\text{max}}$ values fluctuate with a high frequency. The characteristic distance of hole effect could not be determined, which is consistent with the small, regular and closely spaced patterned clusters observed on confocal microscopy images. Informations obtained through semi-variograms with red-emitting CdSe/ZnS@DHHLA-Leu QDs (see Supplementary Material Figure. S14) are consistent with those of CdSe/ZnS@DHHLA-Phe

QDs. Once injected in the biofilm, pseudo-periodic structures, indicative of the formation of microaggregates of QDs, can be observed.

To assess the role of the inorganic core and of the surface ligand density on the clusterisation observed with QDs capped by DHLA-Leu and DHLA-Phe ligands, confocal imaging experiments were also conducted with green-emitting CdSe/ZnS QDs with an average diameter of ca. 2.6 nm and capped by ca. 340 ligands (*vide supra*). Representative confocal fluorescence labelling images and the corresponding semi-variograms are provided in the Supplementary Material. Imaging studies illustrate again that dispersion of the probes within the biofilm is sensitive to their amphiphilicity. As previously observed with red-emitting CdSe/ZnS QDs, their green-emitting counterparts accumulate in microdomains. Pseudo-periodic patterns were observed through semi-variogram analyses, but the “nugget effect” characteristic of the formation of clusters with a size lower than the pixel resolution and previously observed only for CdSe QDs capped by the hydrophilic MPA thiol, was also detected. So, green-emitting CdSe/ZnS QDs capped by DHLA-Leu or DHLA-Phe ligands demonstrate intermediate behaviour CdSe(S)@MPA QDs and red-emitting CdSe/ZnS QDs. All the results obtained show that surface functional groups and surface ligand density dictate the dispersion and/or the segregation of nanosized-fluorescent probes like quantum dots in biofilms.

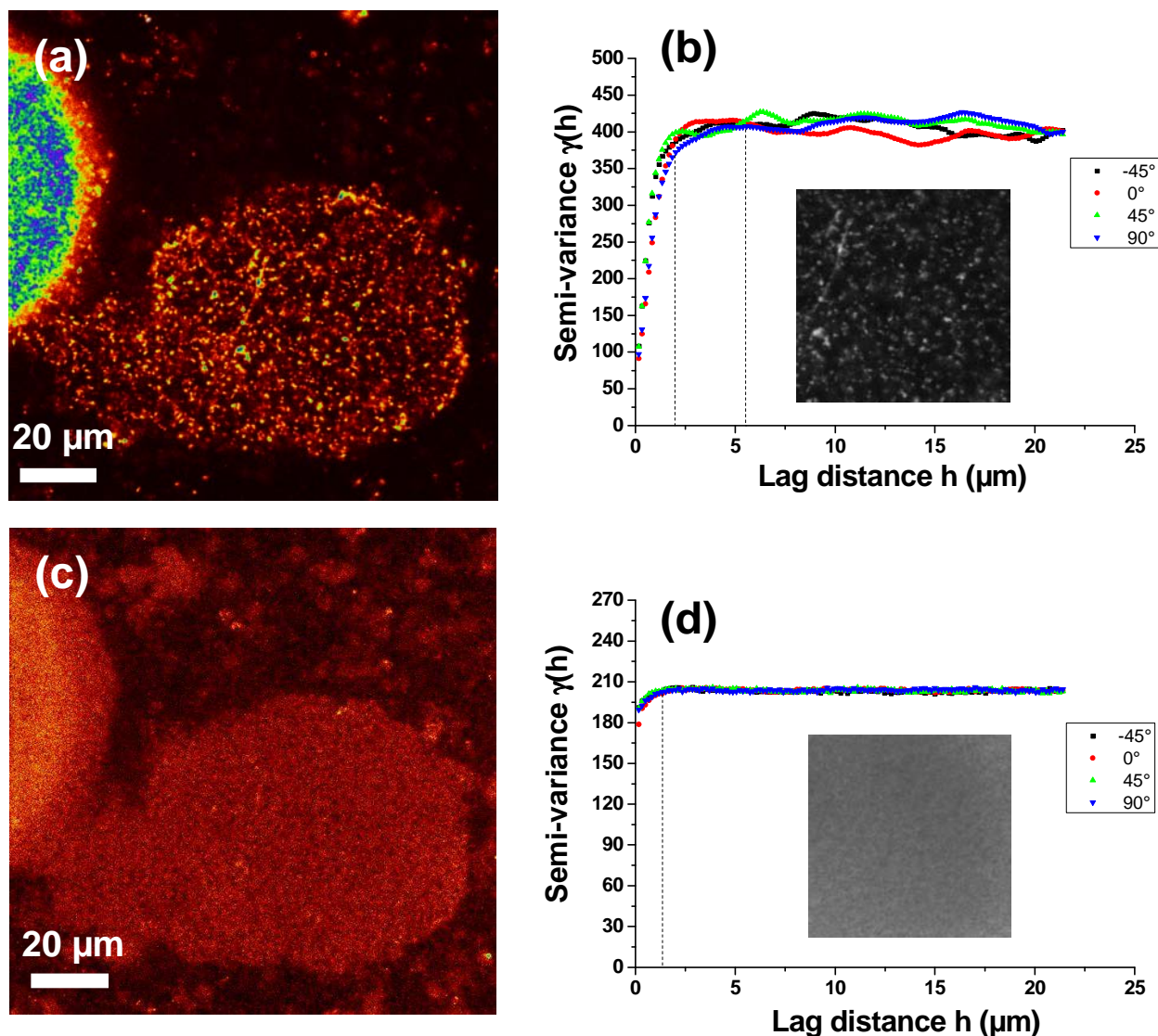


Figure 6. (b) and (d) Semi-variograms $\gamma(h, \alpha)$ obtained from confocal microscopy images (a) and (c), respectively. The images inserted in variograms correspond to the cropped areas. (a) and (c) are confocal microscopy images of a biofilm labelled with CdSe/ZnS@DHHLA-Phe and CdSe(S)@MPA QDs, respectively. Images a and c were stored in 8 bits format (256 grey levels) and were displayed in a pseudo-color look up table (LUT) to express QDs' density within the biofilm. All confocal microscopy images were obtained with laser excitation at 405 nm.

Conclusion

In conclusion, we have reported the design, the synthesis, and the characterization of a new set of core/shell CdSe/ZnS quantum dots capped by the dithiol DHLA ligand linked to amphiphilic Leu and Phe aminoacids. After coating, the quantum dots preserve their optical properties and colloidal stabilities, as demonstrated by DLS and FCS. Leu and Phe aminoacids were introduced at the periphery of the dots to tune the amphiphilicity of the nanocrystals. CdSe/ZnS QDs capped by

DHLA-Leu and DHLA-Phe ligands significantly reduce the surface tension and the contact angle on a hydrophobic surface of their aqueous dispersions compared to CdSe QDs capped by the hydrophilic 3-mercaptopropionic acid ligand. Using confocal fluorescence microscopy, we demonstrated that surface functional groups significantly influenced the QDs' interaction with *S. oneidensis* bacterial biofilms. Hydrophilic MPA-capped QDs were found to be homogeneously distributed in the whole biofilm, while amphiphilic QDs were confined in small microdomains. We infer that these new fluorescent probes may be of great use to understand the development and the reorganization of complex biological matrix like biofilms.

Acknowledgement. This work was financially supported by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR blanc 07, project DYNABIO).

Supporting Information Available: Experimental details describing the synthesis and the characterization of QDs and of DHLA-Leu and DHLA-Phe ligands, cap exchange, quantification of number of ligands bound to the surface of QDs, intensity-hydrodynamic size distributions of QDs obtained by DLS, FCS auto-correlation functions of QDs, XPS data of QDs, confocal microscopy images and semi-variograms obtained for red-emitting CdSe/ZnS@DHLA-Leu QDs and green-emitting CdSe/ZnS@DHLA-Leu and CdSe/ZnS@DHLA-Phe QDs. This material is available free of charge via the internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) Flemming, H.C.; Neu, T.R.; Wozniak, D.J. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 7945-7947.
- (2) Sutherland, I.W. *Adv. Microb. Physiol.* **1972**, *8*, 143-212.
- (3) Beach, I.; Hanjagsit, L.; Kalaji, M.; Neal, A.L.; Zinkevich, V. *Microbiology* **2009**, *145*, 1491-1497.
- (4) Wingender, J.; Neu, T.R.; Flemming, H.-C. Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure, and function. In J. Wingender, T.R. Neu and H.-C. Flemming (ed.). Springer, Berlin, Germany, p 1-20.
- (5) Neal, A.L.; Dublin, S.N.; Taylor, J.; Bates, D.J.; Burns, J.L.; Apkarian, R.; Dichristina, T. *Biomacromolecules.*, **2007**, *8*, 166-174.
- (6) (a) Ahimou, F.; Semmens, M.J.; Novak, P.J.; G. Haugstad, G. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2007**, *73*, 2897-2904. (b) Späth, R.; Flemming, H.-C.; Wuertz, S. *Water Science and Technology.*, **1998**, *37*, 207-210. (c) Yu. L.; Shu-Fang, Y.; Joo-Hwa, T.; Qi-Shan, L.; Lei, Q.;

- Yong, L. *Enzym. Microb. Technol.*, **2004**, *34*, 371-379. (d) Bruus, J.H.; Nielsen, P.H.; Keiding, K. *Water Res.*, **1992**, *26*, 1597-1604. (e) Donlan, R.M.; Costerton, J.W. *Clin. Microb. Rev.* **2002**, *15*, 167-193. (f) Flemming, H.-C.; Wingender, *Nature Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 623-633.
- (7) (a) Kitazawa, H.; Toba, T.; Itoh, T.; Kumano, N.; Adachi, S.; Yamaguchi, T. *Anim. Sci. Technol.* **1991**, *62*, 277-283. (b) Nakajima, H.; Suzuki, Y.; Kaizu, H.; Hirota, T. *J. Food Sci.* **1992**, *57*, 1327-1329. (c) Oda, M.; Hasegawa, H.; Komatsu, S.; Kambe, M.; Tsuchiya, F. *Agric. Biol. Chem.* **1983**, *47*, 1623-1625.
- (8) Chmielewski, R.A.N.; Frank, J.F. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2003**, *2*, 22-32.
- (9) (a) Vu, B.; Chen, M.; Crawford, R.J.; Ivanova, E.P. *Molecules* **2009**, *14*, 2535-2554. (b) Pal, A.; Paul, A.K. *Indian J. Microbiol.* **2008**, *48*, 49-64.
- (10) Shang, X.; Ting, Y.P.; Pehkonen, S.O. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *321*, 256-264.
- (11) (a) Ryu, J.-H.; Beuchat, L.R. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 247-254. (b) Kang, Y.-S.; Park, W. *J. Biosci. Bioeng.* **2010**, *109*, 118-123. (c) Kuo, H.H.; Chan, C.; Burrows, L.L.; Deber, C.M. *Chem. Biol. Drug Des.* **2007**, *69*, 405-412. (d) Joubert, L.-M.; Wolfaardt, G.M.; Botha, A. *Microb. Ecol.* **2006**, *52*, 187-197. (e) Wolfaardt, G.M.; Lawrence, J.R.; Robarts, R.D.; Caldwell, D.E. *Microb. Ecol.* **1998**, *35*, 213-223. (f) Wolfaardt, G.M.; Lawrence, J.R.; Robarts, R.D.; Caldwell, D.E. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 152-158. (g) Chan, C.; Burrows, L.L.; Deber, C.M. *J. Peptide Res.* **2005**, *65*, 343-351.
- (12) (a) Comte, S.; Guibaud, G.; Baudu, M. *J. Hazard, Mater.*, **2007**, *140*, 129-137. (b) Dignac, M.F.; Urbain, V.; Rybacki, D.; Bruchet, A.; Snidaro, D.; Scribe, P. *Water. Sci. Technol.*, **2001**, *43*, 87-95. (c) Neal, L.; Dublin, N.; Taylor, J.; Bates, J.; Burns, L.; Apkarian, R.; DiChristina, *J. Biomacromolecules* **2007**, *8*, 166-174.
- (13) Ganaye, V.; Keiding, K.; Vogel, T.M.; Viriot, M.L.; Block, J.C. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 2701-2706.
- (14) Rodrigues, A.C.; Wuertz, S.; Brito, A.G.; Melo, L.F. *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, *90*, 281-289.
- (15) Hunter, R.C.; Beveridge, T.J. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 2501-2510.
- (16) Wolfaardt, G.M.; Lawrence, J.R.; Robarts, R.D.; Caldwell, D.E. *Microb. Ecol.* **1998**, *35*, 213-223.
- (17) McLean, J.S.; Pinchuk, G.E.; Geydebekht, O.V.; Bilskis, C.L.; Zakrajsek, B.A.; Hill, E.A.; Saffarini, D.A.; Romine, M.F.; Gorby, Y.A.; Fredrickson, J.K.; Beliaev, A.S. *Environ. Microbiol.* **2008**, *10*, 1861-1876.
- (18) Bruchez, Jr, M.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A. *P. Science* **1998**, *281*, 2013-2016.

- (19) Chan, W.C.W.; Nie, S. *Science* **1998**, *281*, 2016-2018.
- (20) Han, M.; Gao, X.; Su, J.Z.; Nie, S. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 631-635.
- (21) Medintz, I. L.; Uyeda, H. T.; Goldman, E. R. Mattoussi, H. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 435-446.
- (22) Weng, J.; Ren, J. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 897-909.
- (23) Sun, Q. J.; Wang, Y. A.; Li, L. S.; Wang, D. Y.; Zhu, T.; Xu, J.; Yang, C. H.; Li, Y. F. *Nat. Photonics* **2007**, *1*, 717-722.
- (24) Jamieson, T.; Bakhshi, R.; Petrova, D.; Pocock, R.; Imani, M. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4717-4732.
- (25) Romero, M. J.; van de Lagemaat, J.; Mora-Sero, I.; Rumbles, G.; Al-Jassim, M. M. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 2833-2837.
- (26) Yong, K. -T.; Roy, I.; Pudavar, H. E.; Bergey, E. J.; Tramposch, K. M.; Swihart, M. T.; Prasad, P. N. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 1412-1417.
- (27) Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L.A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S. Weiss S. *Science* **2005**, *307*, 538-544.
- (28) Hild, W. A.; Breunig, M.; Goepferich, A. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *68*, 153-168.
- (29) Xu, G.; Yong, K. -T.; Roy, I.; Mahajan, S. D.; Ding, H.; Schwartz, S. A.; Prasad, P. N. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1179-1185.
- (30) Gao, X.; Yang, L.; Petros, J.A.; Marshall, F.F.; Simons, J.W.; Nie, S. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 63-72.
- (31) Wang, Y.; Tang, Z.; Kotov, N.A. *NanoToday* **2005**, 20-31.
- (32) Pellegrino, T.; Kudera, S.; Liedl, T.; Munoz Javier, A.; Manna, L.; Parak, W.J. *Small* **2005**, *1*, 49-63.
- (33) Gill, R.; Zayats, M.; Willner, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7602-7625.
- (34) Yu, W. W.; Qu, L. H.; Guo, W. Z.; Peng, X. G. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2854-2860.
- (35) Fischer, M.; Georges, J. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *260*, 115-118.
- (36) Seyrat, E.; Hayes, R.A. *J. Appl. Phys.* **2001**, *90*, 1383-1386.
- (37) Paris, T.; Skali-Lami, S.; Block, J.-C. *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *97*, 1550-1551.
- (38) Teal, T. K.; Lies, D. P.; Wold, B. J.; Newman, D. K. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 7324-7330.
- (39) Denis, F.A.; Hanarp, P.; Sutherland, D.S.; Gold, J.; Mustin, C.; Rouxhet, P.G.; Dufrêne, Y.F. *Langmuir* **2002**, *18*, 819-828.
- (40) Zegeye, A.; Mustin, C.; Jorand, F. *Geobiology* **2010**, *8*, 209-222.
- (41) Matheron, G. *Economic Geology* **1963**, *58*, 1246-1266.
- (42) Watson, G.S. *Mathematical Geology* **1971**, *3*, 215-226.

- (43) (a) Aldeek, F.; Balan, L.; Lambert, J.; Schneider, R. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 475401. (b) Aldeek, F.; Balan, L.; Medjahdi, G.; Roques-Carnes, T.; Malval, J.-P.; Mustin, C.; Ghanbaja, J.; Schneider, R. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 19458-19467.
- (44) (a) Qu, L.; Peng, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2049-2055. (b) Chen, Y.; Ji, T.; Rosenzweig, Z. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 581-584. (c) Breus, V.V.; Heyes, C.D.; Nienhaus, G.U. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 18589-18594. (d) Mulder, W.J.M.; Koole, R.; Brandwijk, R.J.; Storm, G.; Chin, P.T.K.; Strijkers, G.J.; de Mello Donega, C.; Nicolay, K.; Griffioen, A.J. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1-6.
- (45) (a) Mattoussi, H.; Mauro, J.M.; Goldman, E.R.; Anderson, G.P.; Sundar, V.C.; Mikulec, F.V.; Bawendi, M.G. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12142-12150. (b) Stewart, M.H.; Susumu, K.; Mei, B.C.; Medintz, I.L.; Delehanty, J.B.; Blanco-Canosa, J.B.; Dawson, P.E.; Mattoussi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9804-9813, and references cited therein.
- (46) Uyeda, H.T.; Medintz, I.L.; Jaiswal, J.K.; Simon, S.M.; Mattoussi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3870-3878.
- (47) (a) Smith, A.M.; Duan, H.; Rhyner, M.N.; Ruan, G.; Nie, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 3895-3903. (b) Liu, W.; Choi, H.S.; Zimmer, J.P.; Tanaka, E.; Frangioni, J.V.; Bawendi, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14530-14531.
- (48) (a) Hess, S.T.; Huang, S.H.; Heikal, A.A.; Webb, W.W. *Biochemistry* **2002**, *41*, 697-705. (b) Hausteiner, E.; Schwille, P. *Methods* **2003**, *29*, 153-166.
- (49) (a) Larson, D.R.; Zipfel, W.R.; Williams, R.M.; Clark, S.W.; Bruchez, M.P.; Wise, F.W.; Webb, W.W. *Science* **2003**, *300*, 1434-1436. (b) Dong, C.; Qian, H.; Fang, N.; Ren, J. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 11069-11075. (c) Pons, T.; Tetsuo Uyeda, H.; Medintz, I.L.; Mattoussi, H. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 20308-20316. (d) Dong, C.; Qian, H.; Fang, N.; Ren, J. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 7918-7923. (e) Briandet, R.; Lacroix-Gueu, P.; Renault, M.; Lecart, S.; Meylheuc, T.; Bidnenko, E.; Steenkeste, K.; Bellon-Fontaine, M.-N.; Fontaine-Aupart, M.-P. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 2135-2143.
- (50) Callul, M.; Fabregas, J.; Marcé, R.M.; Borul, F. *Chromatographia* **1991**, *31*, 272-276.
- (51) (a) Vafaei, S.; Purkayastha, A.; Jain, A.; Ramanath, G.; Borca-Tasciuc, T. *Nanotechnology* **2009**, *20*, 185702. (b) Sear, R.P.; Chung, S.-W.; Markovich, G.; Gelbart, W.M.; Heath, J.R. *Phys. Rev. E* **1999**, *59*, R6255-R6258.
- (52) Cipriano, B.H.; Raghavan, S.R.; McGuiggan, P.M. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* **2005**, *262*, 8-13.
- (53) de Beer, D.; Stoodley, P.; Roe, F.; Lewandowski, Z. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 1131-1138.

Supporting Information

Surface-engineered quantum dots for the labeling of hydrophobic microdomains in bacterial biofilms

Fadi Aldeek,^{1,2} Christian Mustin,³ Lavinia Balan,⁴ Thibault Roques-Carnes,¹ Marie-Pierre Fontaine-Aupart,⁵ Raphaël Schneider^{1,*}

¹ LRGP, Nancy-University, CNRS, 1 rue Grandville, 54001 Nancy Cedex, France

² LCPME, Nancy-University, CNRS, 405 rue de Vandoeuvre, 54506 Villers-lès-Nancy, France

³ LIMOS, Nancy-University, CNRS, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

⁴ IS2M, LRC 7228, 15 rue Jean Starcky, 68093 Mulhouse, France

⁵ ISMO, FRE 3363, 91405 Orsay Cedex, France

Preparation of MPA-capped CdSe(S) Quantum dots:

Preparation of sodium hydrogen selenide. The preparation of NaHSe was performed according to F. Aldeek *et al.*¹ Briefly, 76 mg (2.009 mmol) of sodium borohydride were added to a small flask cooled with ice containing 1 mL of ultrapure water under a N₂ atmosphere. 79 mg (1.004 mmol) of selenium powder were added in the flask and a small outlet was connected to the flask to discharge the hydrogen pressure. After 3 h at 4 °C, the black selenium powder disappeared and a clear NaHSe solution was obtained. This solution was diluted with 20 mL of N₂-degassed water under nitrogen for the preparation of CdSe QDs. The typical concentration of NaHSe was 0.05 M.

Preparation of aqueous colloidal CdSe(S) solutions. CdSe(S) QDs were prepared using the reaction between Cd²⁺ and NaHSe solution at pH = 11.2 with thiol stabilizer 3-mercaptopropionic acid (MPA). CdCl₂ · 2,5H₂O [Cd²⁺] = 10.9 mM and the thiol stabilizer were dissolved in 100 mL of degassed ultrapure water followed by adjustment of the pH to 11.2 by addition of 1 M NaOH solution. The typical molar ratio of Cd²⁺:NaHSe:MPA used in our experiments is 8:1:8. The mixture was further deaerated by N₂ bubbling for 30 min. Then, 2.75 mL of the freshly prepared NaHSe solution was quickly injected into the mixture under vigorous stirring. The mixture was heated at 150°C into a Teflon-lined stainless autoclave during 1 h.

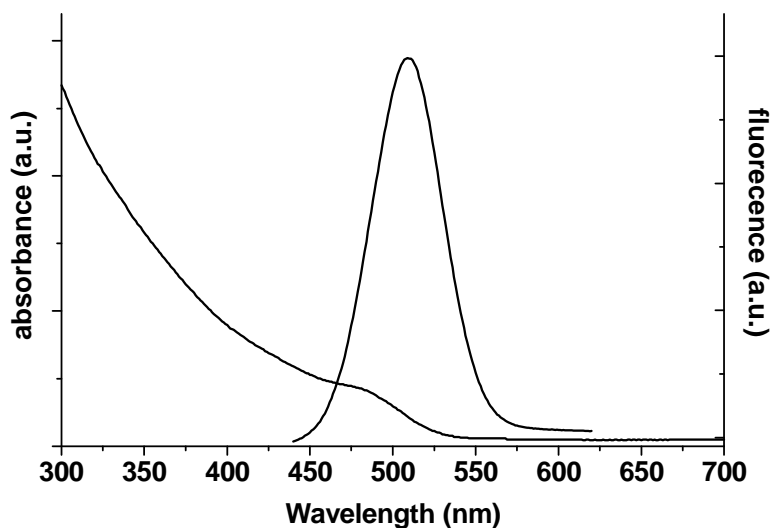


Figure S1. Absorption and fluorescence spectra of MPA capped CdSe(S) QDs in water ($\lambda_{\text{ex}}=400\text{nm}$).

¹ Aldeek, F.; Balan, L.; Lambert, J.; Schneider, R. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 475401.

Preparation of TOPO-capped 600-nm-CdSe/ZnS Core/Shell QDs. CdO (25 mg) and stearic acid (0.3 g) were poured into a round bottom flask under argon atmosphere. The mixture was heated at 190-210°C under stirring until a colorless solution was obtained. Trioctylphosphine oxide (TOPO) (0.84 g) and hexadecylamine (HDA) (0.4 g) were then added, and the mixture was heated at 270°C. A selenium (16 mg) solution in 1 mL of trioctylphosphine (TOP) was prepared and quickly injected in the reaction mixture at 270°C. The nanocrystal growth is stopped immediately after the injection by decreasing the temperature with a water bath. Chloroform (20 mL) was then added. The QDs were precipitated by adding 45 mL of methanol and isolated by centrifugation (4000 rpm for 10 min).

Shell synthesis. TOPO (3.4 g), HDA (1.7 g), zinc stearate (0.9 g) and stearic acid (1.3 g) were mixed and heated at 150°C during 15 min under vacuum. The mixture was then cooled at 60°C and the core CdSe QDs solution in 1 mL of toluene was added. A sulfur (40 mg) solution in 2.15 mL of oleylamine was then added dropwise over 30 min to the reaction mixture heated at 200°C. QDs were then diluted in 20 mL of chloroform, precipitated by the addition of methanol and recovered by centrifugation (4000 rpm for 10 min).

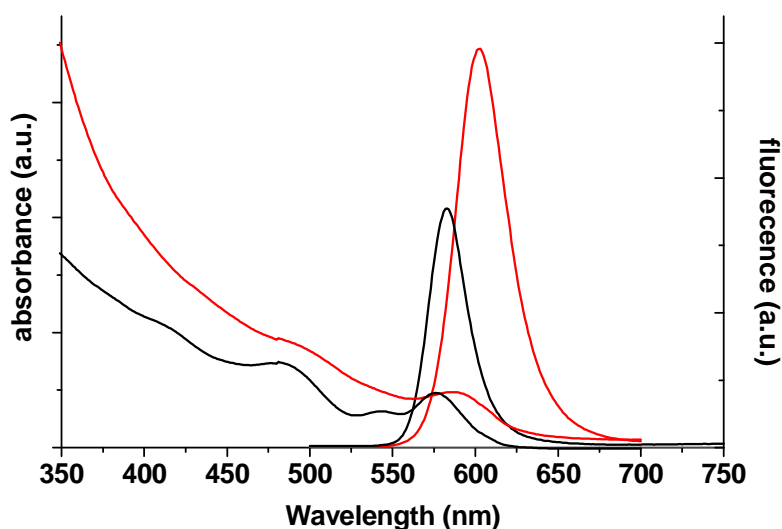


Figure S2. Absorption and fluorescence emission spectra of red-emitting CdSe core QDs (black) and core/shell CdSe/ZnS QDs (red) recorded in chloroform ($\lambda_{\text{ex}} = 400$ nm).

Preparation of TOPO-capped 524-nm-CdSe/ZnS Core/Shell QDs. CdO (50 mg) and stearic acid (0.3 g) were poured into around bottom flask under argon atmosphere. The mixture was heated at 190-210°C under stirring until a colorless solution was obtained. Trioctylphosphine oxide (2 g) and hexadecylamine (2 g) were added and the mixture was heated at 230°C. A selenium (30 mg) solution in 2 mL of trioctylphosphine was prepared and quickly injected to the reaction mixture. The nanocrystal growth is stopped immediately after the injection by decreasing the temperature with a water bath. Chloroform (20 mL) was then added. The obtained QDs were precipitated by adding 45 mL of methanol and isolated by centrifugation (4000 rpm for 10 min).

Shell synthesis. TOPO (3 g) was poured into around-bottom flask and heated at 150°C during 15 min under vacuum. After cooling to 60°C, the CdSe QDs solution in 1 mL of toluene was added. A Hexamethyldisilathiane (70 μ L) and diethylzinc (400 μ L) solution in 2 mL of trioctylphosphine was then added dropwise over 30 min to the mixture at 160°C. QDs were then diluted with 20 mL of chloroform, precipitated and washed with methanol, and recovered by centrifugation (4000 rpm for 10 min).

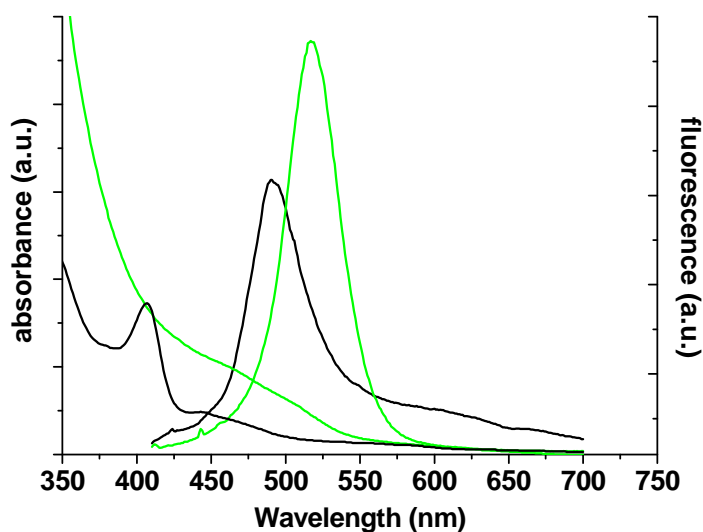


Figure S3. Absorption and fluorescence spectra of green-emitting core CdSe QDs (black) and core/shell CdSe/ZnS QDs (green) recorded in chloroform ($\lambda_{\text{ex}}=400$ nm).

Synthesis of DHLA-Leu and DHLA-Phe ligands.

Lipoic acid-*N*-hydroxysuccinimide ester 2. Lipoic acid (LA) (2.62 mmol, 0.540 g), *N*-hydroxysuccinimide (2.88 mmol, 0.330 g), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (2.88 mmol, 0.550 g) were added to anhydrous DMF (10 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 4 h under argon atmosphere. The solution was diluted with EtOAc (50 mL) and washed with H₂O (50 mL), sat. aq. NaHCO₃, and H₂O (50 mL x 2). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered off, and concentrated in vacuo. Purification by recrystallization (EtOAc/hexane) afforded 0.710 g (89 %) of lipoic acid-*N*-hydroxysuccinimide ester as a light yellow crystal. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.58 (q, *J* = 7 Hz, 1H), 3.11-3.17 (m, 2H), 2.84 (s, 4H), 2.63 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 2.45-2.48 (m, 2H), 1.53 -1.97 (m, 10H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 169.90, 168.84, 56.51, 40.56, 38.92, 34.81, 31.17, 28.73, 26, 24.75.

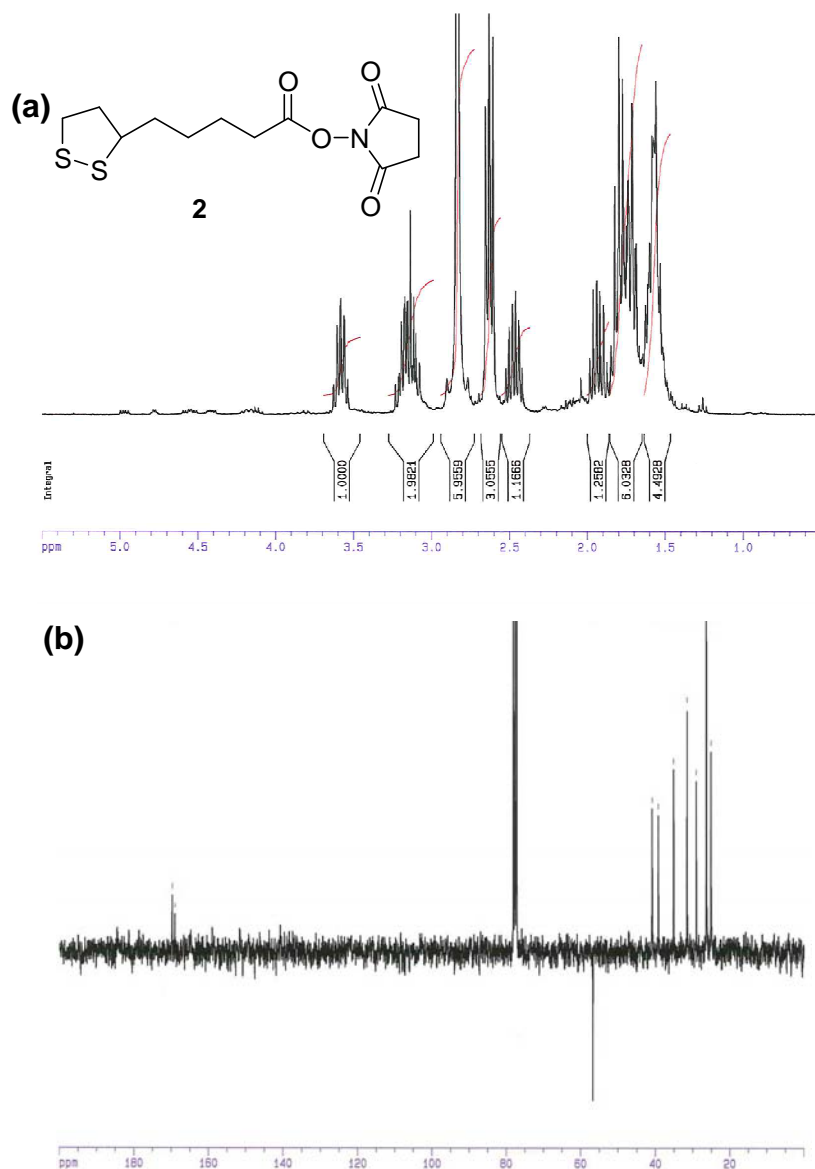


Figure S4. ¹H (a) and ¹³C (b) NMR spectra of lipoic acid-*N*-hydroxysuccinimide ester **2**.

Synthesis of lipoic acid coupled to Leucine, 3. A Leucine (0.98 mmol, 0.128 g) solution in HEPES buffer (20 mM, pH = 7.4, 30 mL) was added to a lipoic acid-*N*-hydroxysuccinimide ester **2** (0.82 mmol, 0.25 g) solution in acetone (30 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 day (the pH was adjusted to 7 with 0.2 M aq. NaOH after 4 h reaction). The pH of the reaction mixture was then acidified to 3 with 0.2 M aq. HCl and the solution extracted with EtOAc (60 mL x 2). The organic layers were combined and washed with H₂O (60 mL), brine (60 mL), dried over Na₂SO₄, filtered off, and concentrated in vacuo and afforded 0.220 g of **3** (83 %) as a light yellow solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5.99 (s, 1H), 4.62 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.55 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.10-3.16 (m, 2H), 2.44-2.46 (m, 2H), 2.25 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.46-1.94 (m, 10H), 0.94 (2d, *J* = 7.2 Hz, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 176.9, 174.39, 57.06, 51.60, 41.73, 40.92, 39.18, 36.80, 35.27, 29.43, 25.75, 23.53, 22.54.

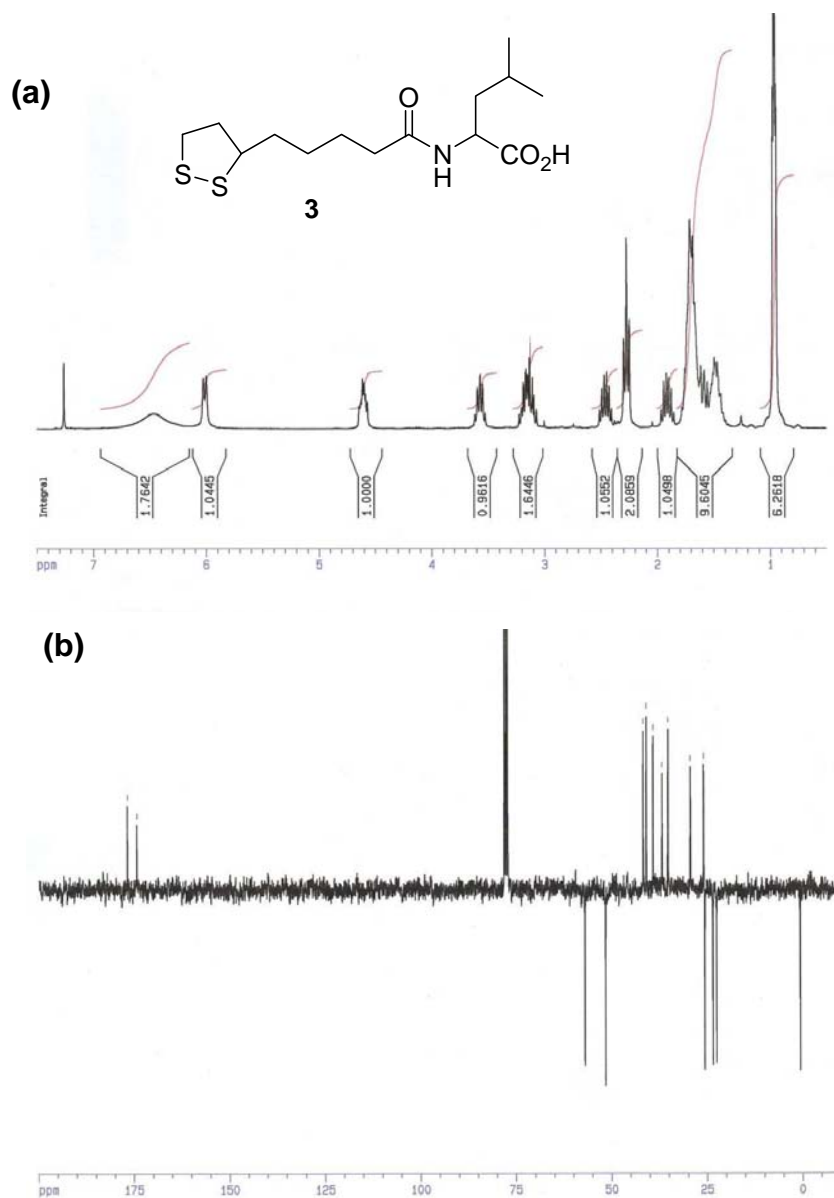


Figure S5. ¹H (a) and ¹³C (b) NMR spectra of compound **3**.

Synthesis of lipoic acid coupled to Phenylalanine, 4. A Phenylalanine (0.98 mmol, 0.161 g) solution in HEPES buffer (20 mM, pH= 7.4, 30 mL) was added to a solution of **2** (0.82 mmol, 0.25 g) in acetone (30 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 1 day (the pH was adjusted to 7 with 0.2 M aq. NaOH after 4 h reaction). The pH of the reaction mixture was then acidified to 3 with 0.2 M aq. HCl and the solution extracted with EtOAc (60 mL x 2). The organic layers were combined and washed with H₂O (60 mL), brine (60 mL), dried over Na₂SO₄, filtered off, and concentrated in vacuo to afford 0.260 g of **4** (89 %) as a yellow oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.17-7.30 (m, 5H), 4.67 (dd, *J* = 5 Hz, 1H), 3.56 (q, *J* = 8 Hz, 1H), 3.1-3.5 (m, 4H), 2.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.3-1.95 (m, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 175.91, 174.98, 138.65, 130.34, 129.54, 127.87, 57.63, 54.95, 41.34, 39.42, 38.54, 35.78, 34.87, 29.73, 26.65.

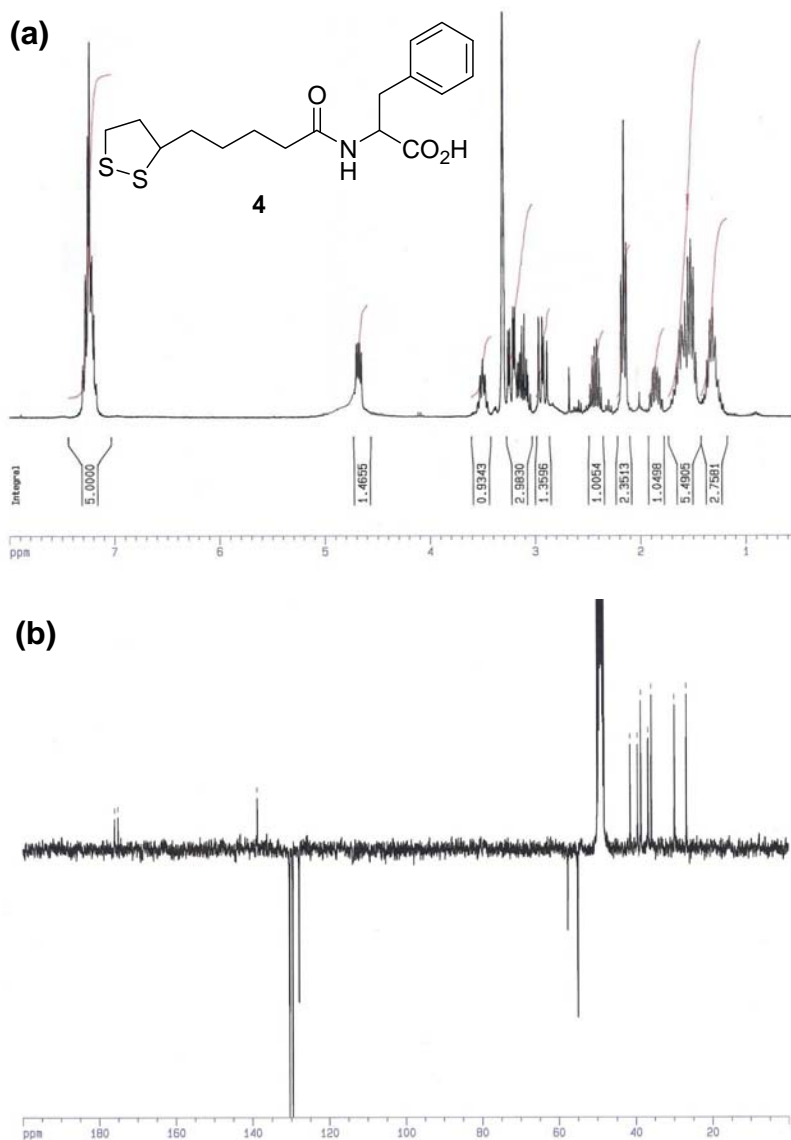


Figure S5. ¹H (a) and ¹³C (b) NMR spectra of compound **4**.

Synthesis of ligand 5. **3** (0.47 mmol, 0.150 g) was dissolved in 1 mL of methanol and 3 mL of 0.25 M aqueous NaHCO₃ solution and the mixture cooled at 0°C with an ice bath. NaBH₄ (1.8 mmol) was slowly added and the mixture stirred for 2 h. The reaction mixture was acidified with 6 M HCl to pH 1 and extracted with toluene (3 x 5 mL). The combined organic phases were dried over Na₂SO₄ and filtered. Evaporation of the solvent yielded 90% of compound **5**. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5.87 (s, 1H), 4.62 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 2.87-2.95 (m, 1H), 2.68-2.73 (m, 2H), 2.27 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.45 -1.97 (m, 9H), 1.33 (t, *J* = 8 Hz, 1H), 1.30 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 0.96 (2d, *J* = 7.2 Hz, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 176.8, 174.30, 51.56, 43.45, 41.73, 40.01, 39.41, 36.91, 27.21, 25.82, 25.63, 23.53, 22.98, 22.56.

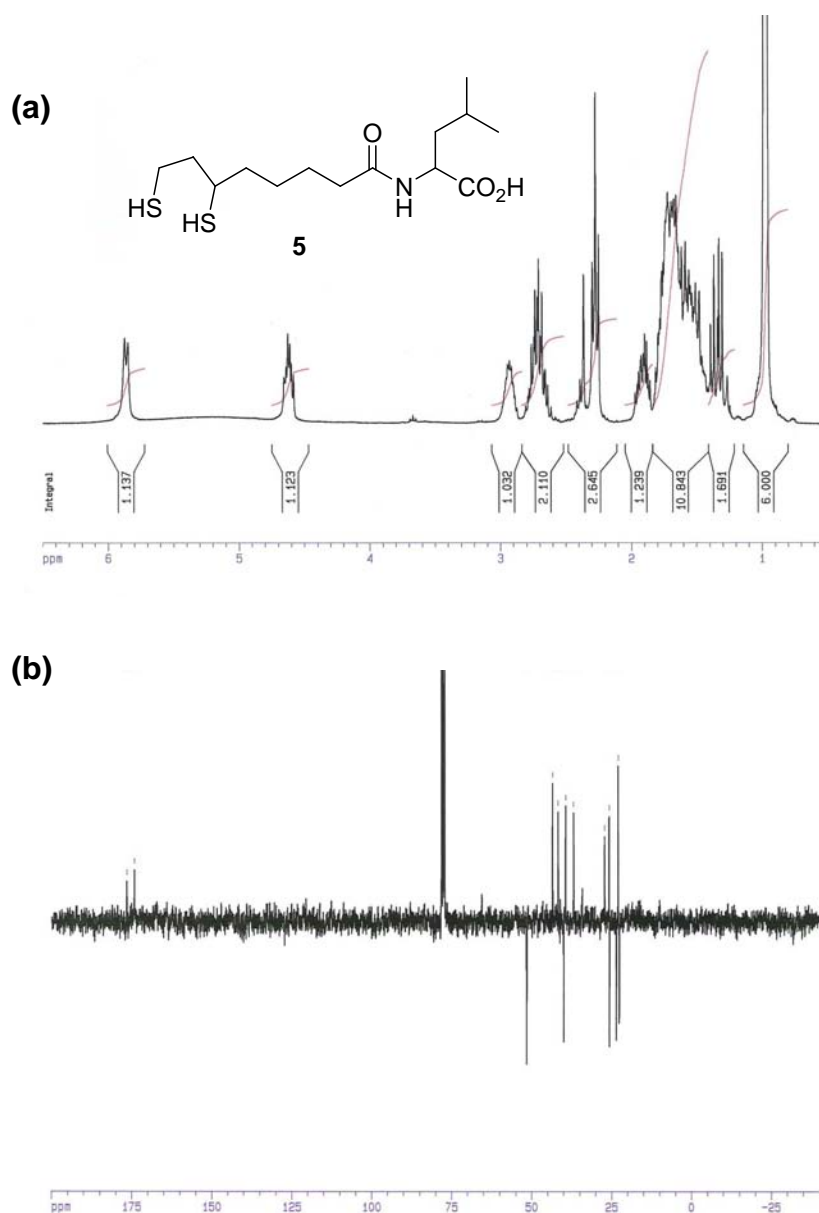


Figure S6. ¹H (a) and ¹³C (b) NMR spectra of compound **5**.

Synthesis of ligand 6. **4** (0.47 mmol, 0.166 g) was dissolved in 1 mL of methanol and 3 mL of aqueous 0.25 M NaHCO₃ solution and the mixture cooled to 0°C with an ice bath. NaBH₄ (1.8 mmol) was slowly added and the mixture stirred for 2h. The reaction mixture was acidified with 6 M HCl to pH 1 and extracted with EtOAc (3 x 5 mL). The combined organic phases were dried over Na₂SO₄ and filtered. Evaporation of the solvent yielded 86% of ligand **6**. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.18-7.30 (m, 5H), 4.67 (dd, *J* = 5 Hz, 1H), 2.83-3.31 (m, 4H), 2.64-2.67 (m, 2H), 2.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.3 -1.95 (m, 10H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 176.10, 174.97, 138.71, 130.38, 129.59, 127.93, 55.23, 44.26, 40.15, 39.97, 38.55, 36.75, 27.59, 26.63, 22.87.

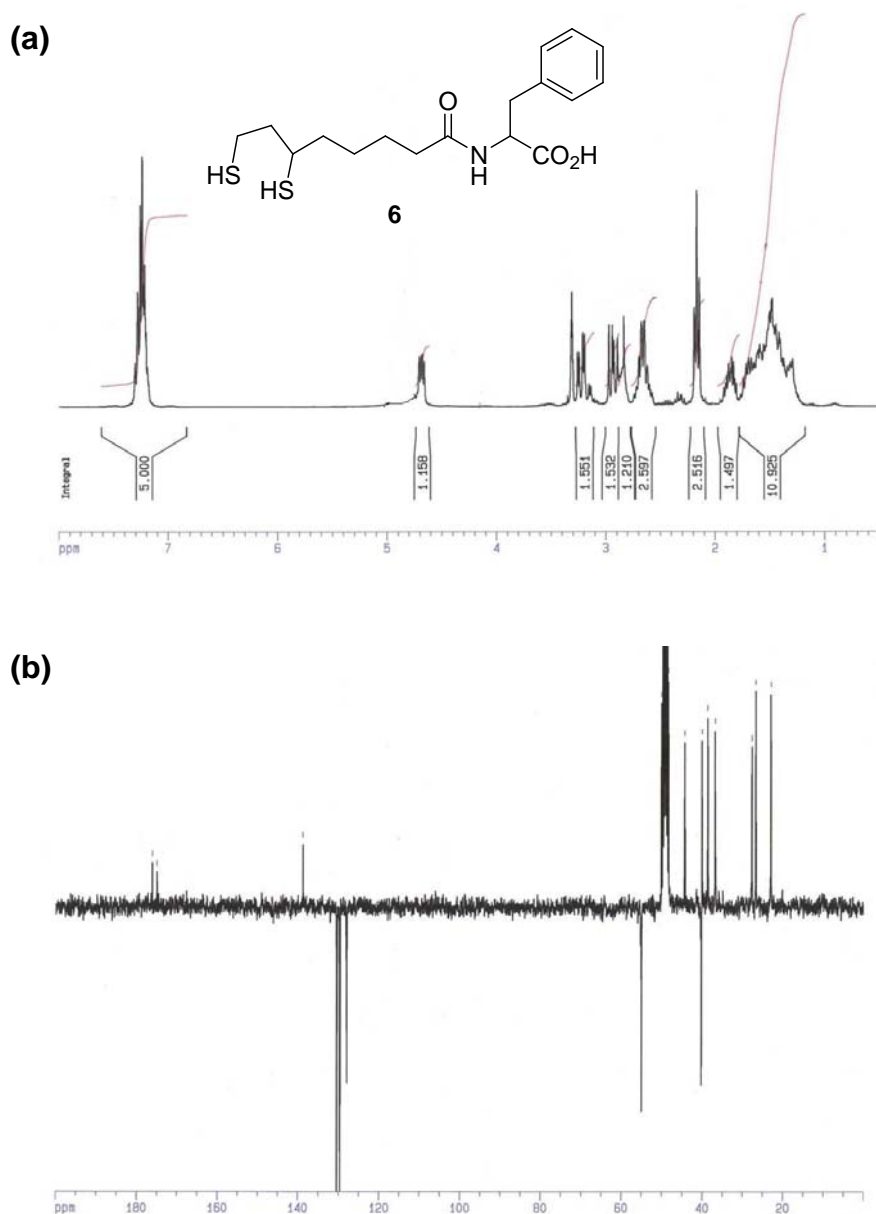


Figure S7. ¹H (a) and ¹³C (b) NMR spectra of ligand **6**.

Surface functionalization of core/shell CdSe/ZnS QDs with ligands 5 or 6. A CdSe/ZnS QDs solution in chloroform (1 mL) (1.10^{-6} M) is mixed with 1.10^5 equivalents of ligands 5 or 6 and the mixture heated to ca. 70°C for 15 h. During this period, the ligand-exchanged QDs precipitated. The solution was then centrifuged, the supernatant discarded and the precipitate washed three times with chloroform and one time with methanol. The precipitate was then dispersed in borate buffer (pH = 9) followed by re-precipitation with methanol and QDs were recovered by centrifugation (4000 rpm for 10 min).

Quantification of Leu and Phe α -amino acids bound at the surface of QDs.

- A disodium EDTA (37 mg) solution in 80 mL of borate buffer (0.35 M, pH = 10.5) was prepared.
- A solution of o-phthaldialdehyde (OPA) (80 mg) and 2-mercaptoethanol (90 μ L) in 5 mL of ethanol (95%) was prepared.

The two solutions were mixed and completed to 100 mL with borate buffer.

- Leucine or Phenylalanine mother solutions (1 mM) were prepared in 0.1 mM HCl. 100 μ L of Phe or Leu aminoacids solutions (diluted up to 1/1000) were added to 900 μ L of the OPA + 2-mercaptoethanol + EDTA solution and the fluorescence intensity measured. A calibration curve was obtained using different amounts of Leu or Phe solutions (adj. R-squares = 0.99).
- CdSe/ZnS QDs capped by ligands 5 or 6 (1 mL, 125 nM in water) were hydrolyzed in 12 N HCl (1 mL) at 160°C for 15 h. The reaction mixture was then evaporated to dryness and re-dispersed in 0.1 N HCl (1 mL). 100 μ L of this solution were added to 900 μ L of the OPA + 2-mercaptoethanol + EDTA solution and the mixture analyzed by fluorescence spectroscopy.

The fluorescence intensity was compared to the calibration curve and the amount of ligand bound to the surface of QDs calculated.

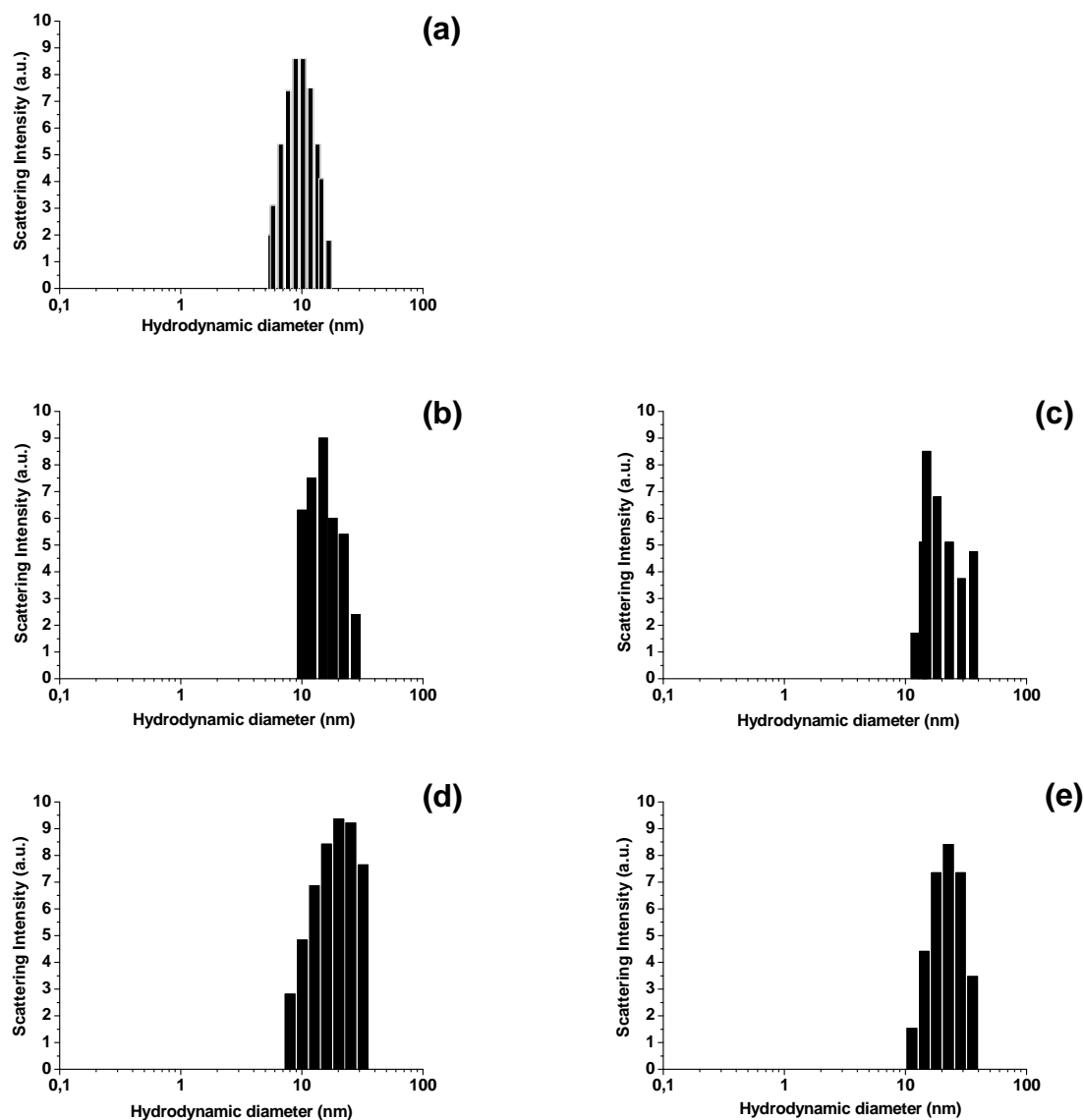


Figure S8. Hydrodynamic size distributions of CdSe(S)@MPA (a), 524-nm-CdSe/ZnS@DHLeu (b), 524-nm-CdSe/ZnS@DHLeu-Phe (c), 600-nm-CdSe/ZnS@DHLeu (d) and 600-nm-CdSe/ZnS@DHLeu-Phe (e) QDs determined by dynamic light scattering (DLS).

Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS). In FCS, we measured the number of fluorescence photons emitted during a defined time interval and perform this counting on a substantial number of intervals to obtain a vector of intensity curve showing the temporal fluctuation of fluorescence intensity. The normalized autocorrelation function derived from these fluctuations is to compared the function of fluorescence $I(t)$ with its self shifted by a time τ and expressed by the relationship (1).

$$g(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} \quad (1)$$

Where the symbol $\langle \rangle$ stands for the ensemble mean value and τ the time delay. Assuming that the excitation intensity profile could be approximated using a three dimensional Gaussian distribution, the fluorescence correlation curve ($g(\tau)$) for the free Brownian motion of fluorescents nanoparticles could be fitted using the following normalized autocorrelation function (2).

$$g(\tau) = 1 + \frac{1}{\sqrt{8N}} \left(\frac{1}{1 + (\tau/\tau_D)} \right) \left(\frac{1}{1 + (\omega_0/z_0)^2 (\tau/\tau_D)} \right)^{1/2} \quad (2)$$

Where N is average number of fluorescent nanoparticles in the excitation volume, τ_D the characteristic diffusion time of fluorescent particles, ω_0 and z_0 are the beam-waist at the confocal point and z_0 the focal depth and the $\omega_0/z_0 = 0.23 \mu\text{m}$. The τ_D diffusion time obtained in equation (2) is related with diffusion coefficient D (3).

$$\tau_D = \omega_0^2 / 4D_t \quad (3)$$

Assuming spherical particles, it's possible to calculate the hydrodynamic radius of nanoparicles using the Stokes-Einstein relationship (4).

$$D_t = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (4)$$

Where k is Boltzmann constant ($1.38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T the temperature (K), and η is the viscosity of the solution (Pa s).

In a medium which contain tow populations the autocorrelation function can be written as follows.

$$g(\tau) = 1 + \frac{1}{\sqrt{8N}} \left(1 + \frac{T}{1-T}\right) \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_r}\right) a \left(\frac{1}{1+(\tau/\tau_D)}\right) \left(\frac{1}{1+(\omega_0/z_0)^2(\tau/\tau_{D1})}\right)^{1/2} + (1-a) \left(\frac{1}{1+(\tau/\tau_D)}\right) \left(\frac{1}{1+(\omega_0/z_0)^2(\tau/\tau_{D2})}\right)^{1/2} \quad (5)$$

where T the fraction of fluorescent nanoparticles in triplet state with a life time τ_r , a and $1-a$ are the fractions of molar concentrations of the two diffusive species and τ_{D1} and τ_{D2} are their respective translational diffusion times. All fluorescence curves were fitted only using two components model.

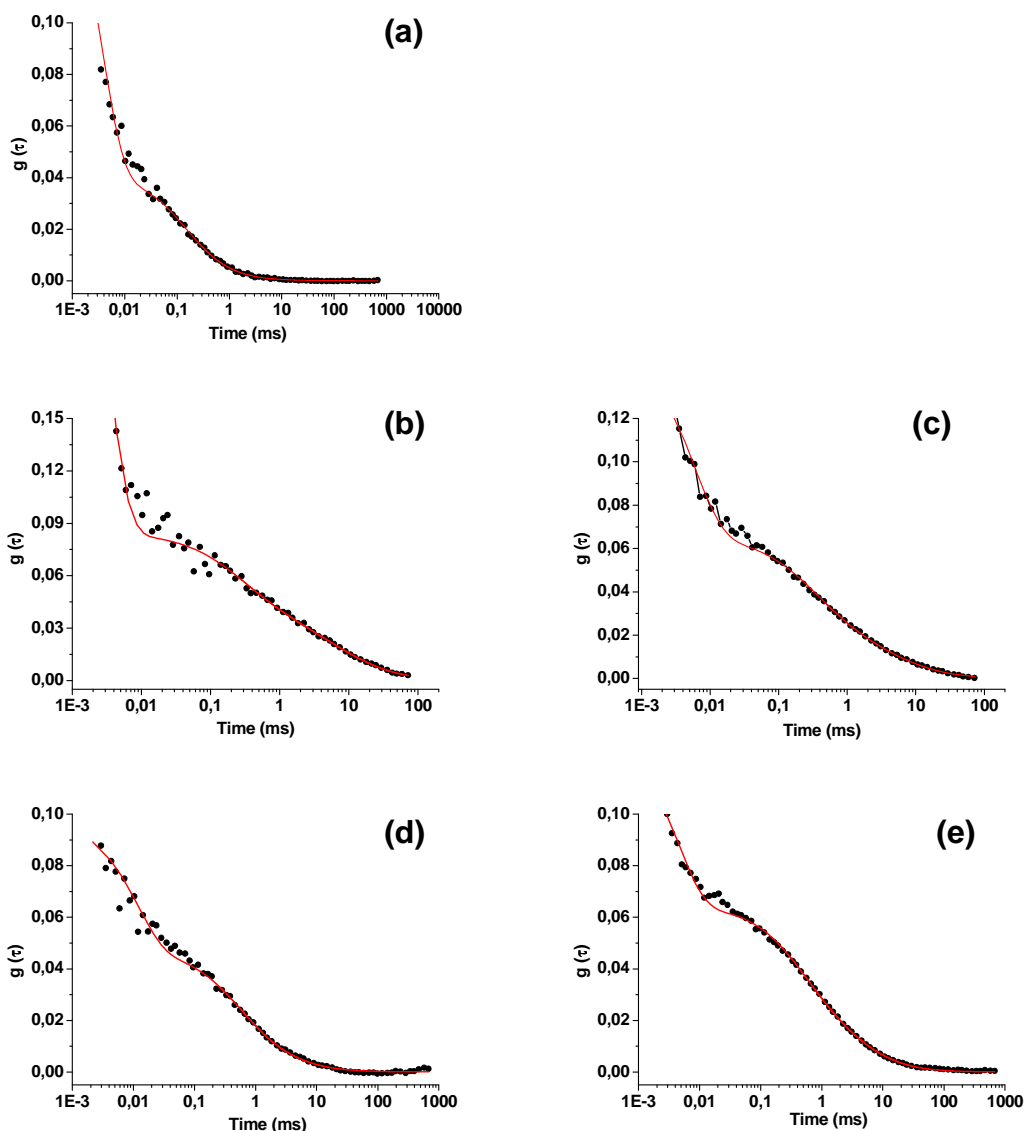


Figure S9. FCS curves of CdSe(S)@MPA (a), 524-nm-CdSe/ZnS@DHLA-Leu (b), 524-nm-CdSe/ZnS@DHLA-Phe (c), 600-nm-CdSe/ZnS@DHLA-Leu (d) and 600-nm-CdSe/ZnS@DHLA-Phe (e) QDs, respectively. The open squares correspond to the experimental data, while the red solid line represents the fit according to Eq (5).

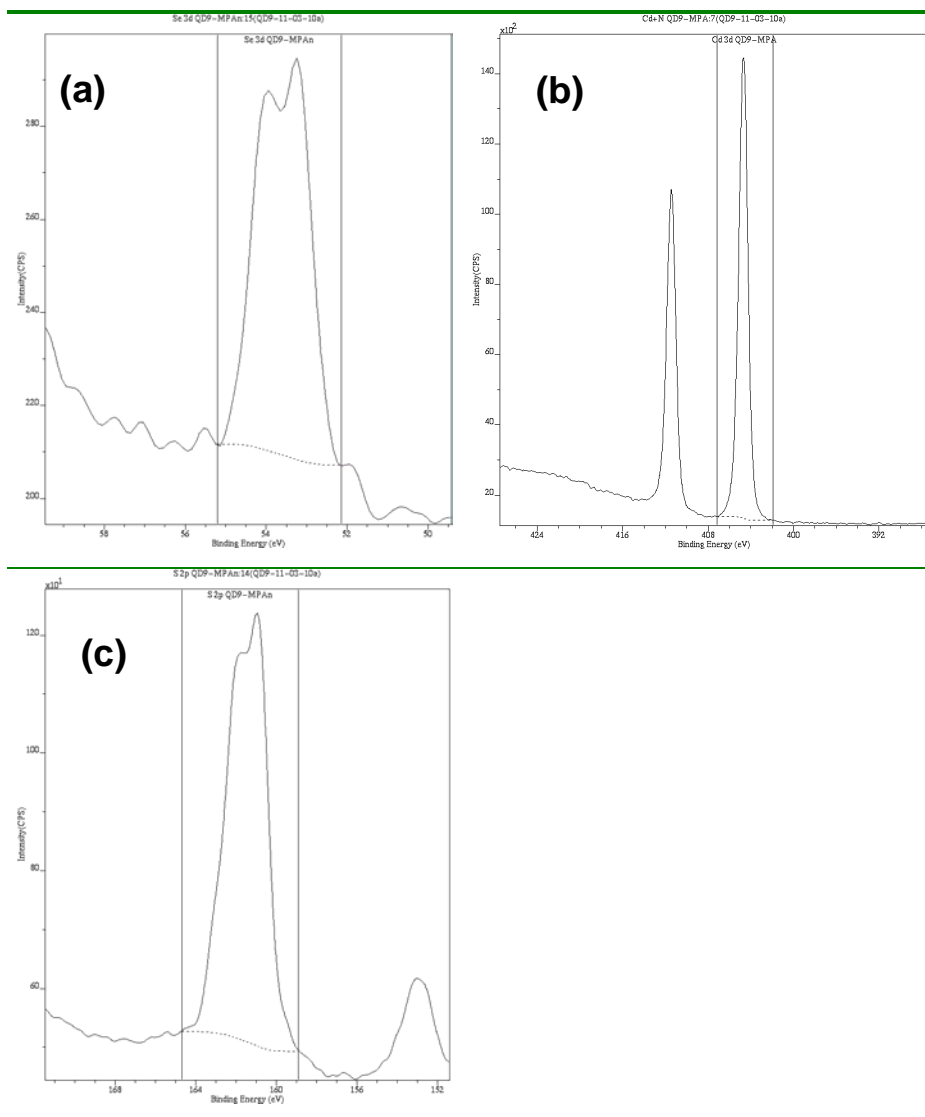


Figure S10. Se3d (a), Cd3d (b) and c) S2p X-ray photoelectron spectra of CdSe(S)@MPA QDs.

Quantification Report
 /C=/data/ENSIC/Fadi/Mars 2010/QD9-11-03-10a.dset Fri Mar 12 11:00:59 2010

Peak	Position BE (eV)	FWHM (eV)	Raw Area (CPS)	RSF	Atomic Mass	Atomic Conc %	Mass Conc %
<i>cd 3d QD9-MPA</i>	404.650	0.977	14652.2	3.974	112.422	6.79	36.64
<i>C 1s QD9-MPA</i>	284.550	1.216	10603.8	0.278	12.011	70.23	40.49
<i>Na 1s QD9-MPA</i>	1071.150	1.496	753.3	1.685	22.990	0.67	0.74
<i>O 1s QD9-MPA</i>	531.850	2.467	7180.2	0.780	15.999	16.81	12.91
<i>S 2p QD9-MPA</i>	160.950	2.263	1762.5	0.668	32.065	5.16	7.94
<i>Se 3d QD9-MPA</i>	53.250	1.583	134.7	0.853	78.982	0.34	1.27

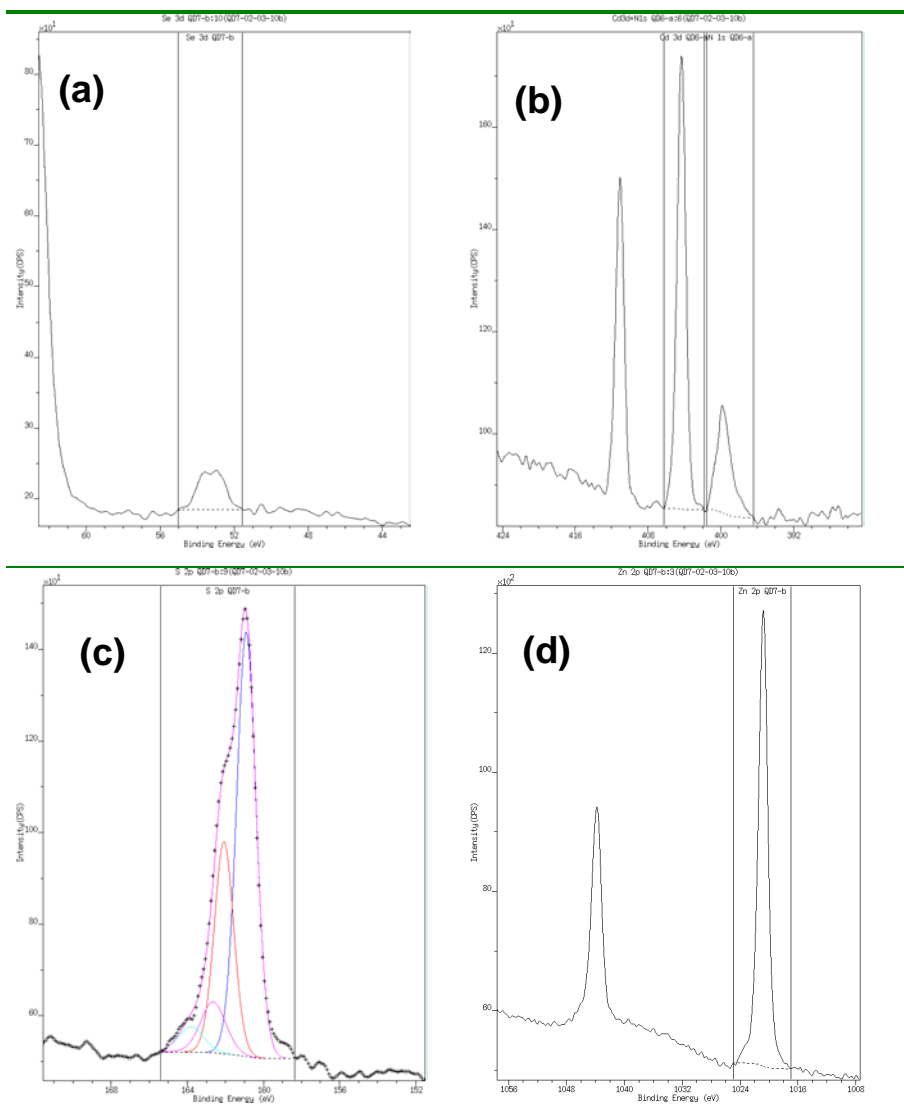


Figure S11. Se3d (a), Cd3d and N1s (b), S2p (c) and Zn2p (d) X-ray photoelectron spectra of 600-nm-CdSe/ZnS@DHLA-Leu QDs.

<i>Peak</i>	<i>Position BE (eV)</i>	<i>FWHM (eV)</i>	<i>Raw Area (CPS)</i>	<i>RSF</i>	<i>Atomic Mass</i>	<i>Atomic Conc %</i>	<i>Mass Conc %</i>
<i>Na 1s QD8-c</i>	<i>1071.700</i>	<i>1.611</i>	<i>2766.6</i>	<i>1.685</i>	<i>22.990</i>	<i>1.35</i>	<i>1.46</i>
<i>Zn 2p QD8-c</i>	<i>1021.700</i>	<i>1.388</i>	<i>44900.4</i>	<i>3.726</i>	<i>65.387</i>	<i>10.37</i>	<i>32.04</i>
<i>O 1s QD8-c</i>	<i>531.200</i>	<i>1.792</i>	<i>6190.2</i>	<i>0.780</i>	<i>15.999</i>	<i>7.93</i>	<i>6.00</i>
<i>Cd 3d QD8-c</i>	<i>404.500</i>	<i>1.017</i>	<i>3955.0</i>	<i>3.974</i>	<i>112.422</i>	<i>1.00</i>	<i>5.33</i>
<i>N 1s QD8-c</i>	<i>399.400</i>	<i>1.579</i>	<i>1030.9</i>	<i>0.477</i>	<i>14.007</i>	<i>2.18</i>	<i>1.44</i>
<i>C 1s QD8-c</i>	<i>284.600</i>	<i>1.150</i>	<i>18757.7</i>	<i>0.278</i>	<i>12.011</i>	<i>67.97</i>	<i>38.57</i>
<i>S 2p QD8-c</i>	<i>161.200</i>	<i>2.066</i>	<i>5396.4</i>	<i>0.668</i>	<i>32.065</i>	<i>8.64</i>	<i>13.10</i>
<i>Se 3d QD8-c</i>	<i>53.200</i>	<i>1.686</i>	<i>404.3</i>	<i>0.853</i>	<i>78.982</i>	<i>0.55</i>	<i>2.06</i>

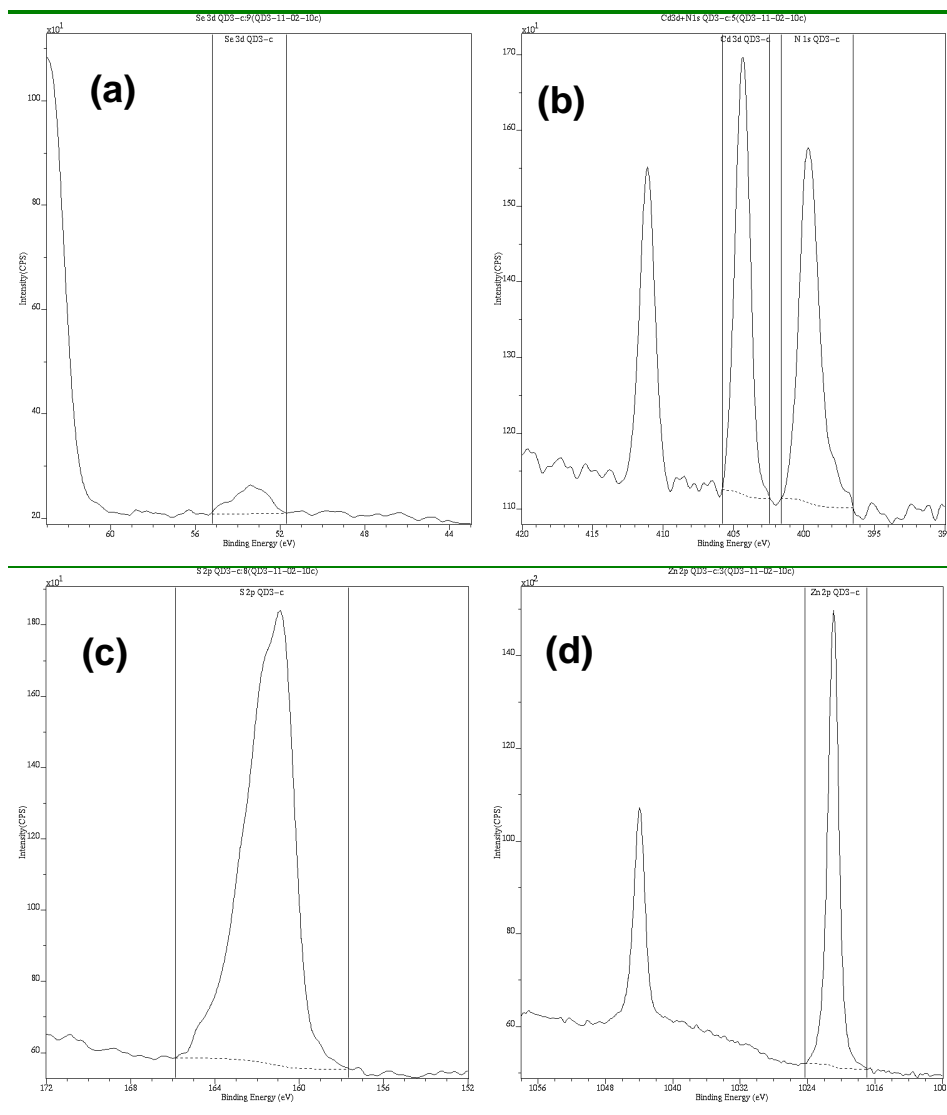


Figure S12. Se3d (a), Cd3d and N1s (b), S2p (c) and Zn2p (d) X-ray photoelectron spectra of 524-nm-CdSe/ZnS@DHLA-Leu QDs.

Peak	Position BE (eV)	FWHM (eV)	Raw Area (CPS)	RSF	Atomic Mass	Atomic Conc %	Mass Conc %
<i>Na 1s QD3-c</i>	<i>1071.000</i>	<i>1.555</i>	<i>19588.3</i>	<i>1.685</i>	<i>22.990</i>	<i>10.32</i>	<i>12.91</i>
<i>Zn 2p QD3-c</i>	<i>1020.900</i>	<i>1.432</i>	<i>16469.6</i>	<i>3.726</i>	<i>65.387</i>	<i>4.11</i>	<i>14.62</i>
<i>O 1s QD3-c</i>	<i>531.300</i>	<i>1.993</i>	<i>26650.1</i>	<i>0.780</i>	<i>15.999</i>	<i>36.88</i>	<i>32.11</i>
<i>Cd 3d QD3-c</i>	<i>404.300</i>	<i>1.211</i>	<i>731.5</i>	<i>3.974</i>	<i>112.422</i>	<i>0.20</i>	<i>1.23</i>
<i>N 1s QD3-c</i>	<i>399.700</i>	<i>1.545</i>	<i>822.0</i>	<i>0.477</i>	<i>14.007</i>	<i>1.88</i>	<i>1.43</i>
<i>C 1s QD3-c</i>	<i>284.650</i>	<i>1.445</i>	<i>10309.0</i>	<i>0.278</i>	<i>12.011</i>	<i>40.35</i>	<i>26.37</i>
<i>S 2p QD3-c</i>	<i>160.900</i>	<i>2.538</i>	<i>3535.1</i>	<i>0.668</i>	<i>32.065</i>	<i>6.12</i>	<i>10.67</i>
<i>Se 3d QD3-c</i>	<i>53.400</i>	<i>1.830</i>	<i>104.4</i>	<i>0.853</i>	<i>78.982</i>	<i>0.15</i>	<i>0.66</i>

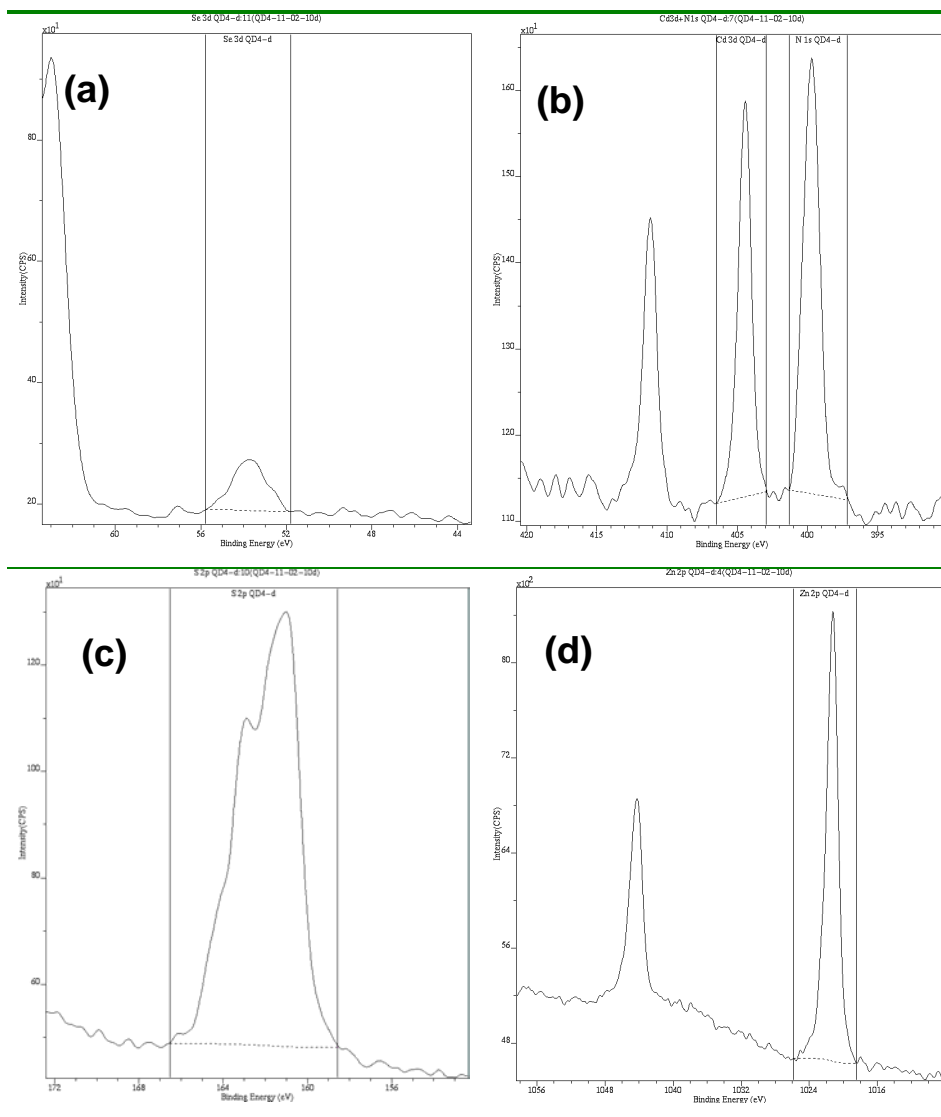


Figure S13. Se3d (a), Cd3d and N1s (b), S2p (c) and Zn2p (d) X-ray photoelectron spectra of 524-nm-CdSe/ZnS@DHLA-Phe QDs.

<i>Peak</i>	<i>Position BE (eV)</i>	<i>FWHM (eV)</i>	<i>Raw Area (CPS)</i>	<i>RSF</i>	<i>Atomic Mass</i>	<i>Atomic Conc %</i>	<i>Mass Conc %</i>
<i>Na 1s QD4-d</i>	<i>1071.500</i>	<i>1.764</i>	<i>15113.6</i>	<i>1.685</i>	<i>22.990</i>	<i>8.12</i>	<i>11.26</i>
<i>Zn 2p QD4-d</i>	<i>1021.300</i>	<i>1.563</i>	<i>7012.9</i>	<i>3.726</i>	<i>65.387</i>	<i>1.79</i>	<i>7.04</i>
<i>O 1s QD4-d</i>	<i>531.500</i>	<i>2.025</i>	<i>24595.9</i>	<i>0.780</i>	<i>15.999</i>	<i>34.73</i>	<i>33.52</i>
<i>Cd 3d QD4-d</i>	<i>404.400</i>	<i>1.051</i>	<i>546.3</i>	<i>3.974</i>	<i>112.422</i>	<i>0.15</i>	<i>1.04</i>
<i>N 1s QD4-d</i>	<i>399.700</i>	<i>1.364</i>	<i>706.4</i>	<i>0.477</i>	<i>14.007</i>	<i>1.64</i>	<i>1.39</i>
<i>C 1s QD4-d</i>	<i>284.600</i>	<i>1.292</i>	<i>12123.1</i>	<i>0.278</i>	<i>12.011</i>	<i>48.42</i>	<i>35.09</i>
<i>S 2p QD4-d</i>	<i>161.000</i>	<i>3.312</i>	<i>2777.9</i>	<i>0.668</i>	<i>32.065</i>	<i>4.91</i>	<i>9.49</i>
<i>Se 3d QD4-d</i>	<i>53.700</i>	<i>1.783</i>	<i>163.4</i>	<i>0.853</i>	<i>78.982</i>	<i>0.25</i>	<i>1.17</i>

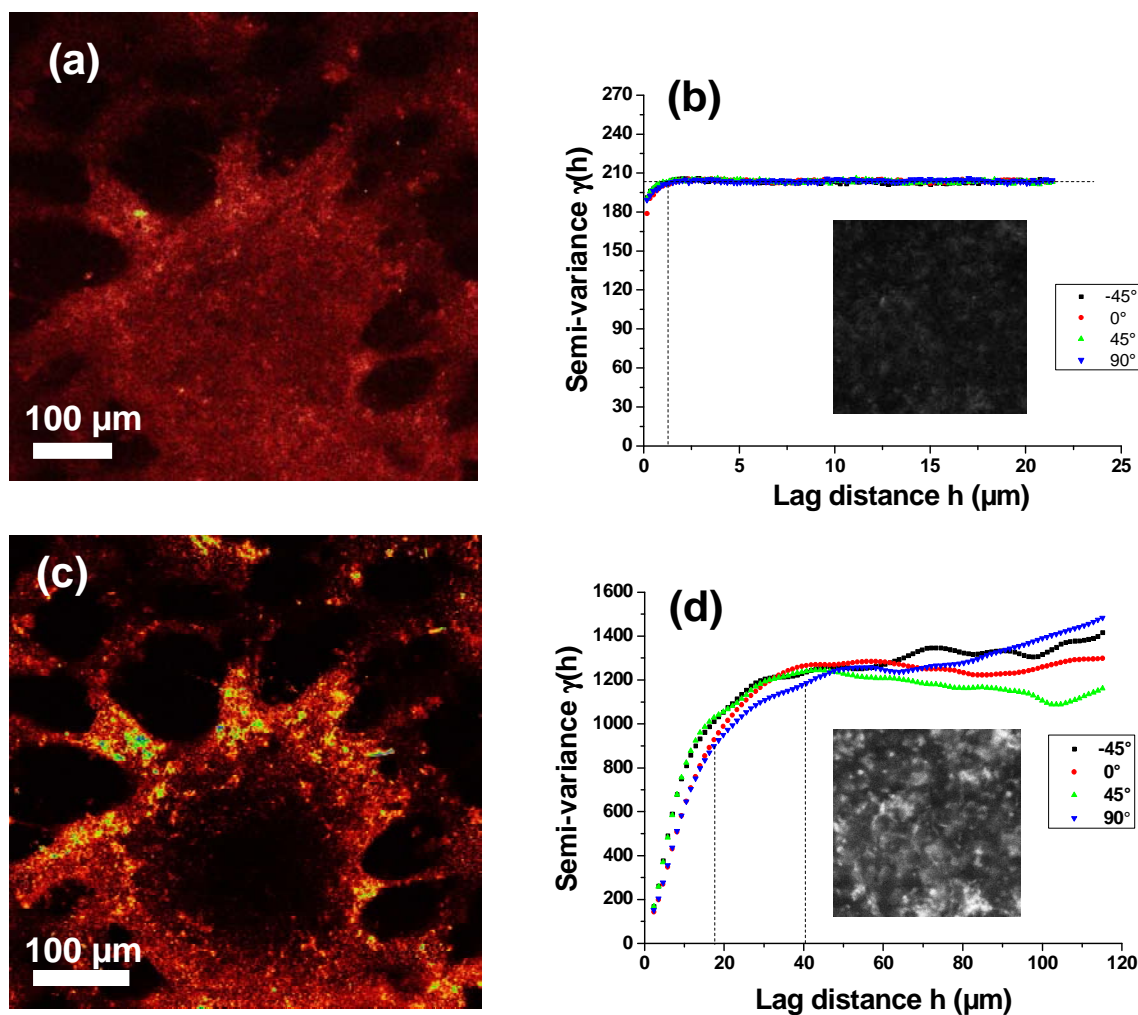


Figure S14. (b) and (d) Semi-variograms $\gamma(h, \alpha)$ obtained from confocal microscopy images (a) and (c), respectively. The images inserted in variograms correspond to the cropped areas. (a) and (c) are confocal microscopy images of a biofilm labelled with CdSe(S)@MPA and CdSe/ZnS@DHHLA-Leu QDs, respectively. Images a and c were stored in 8 bits format (256 grey levels) and were displayed in a pseudo-color look up table (LUT) to express QDs' density within the biofilm. All confocal microscopy images were obtained with laser excitation at 405 nm.

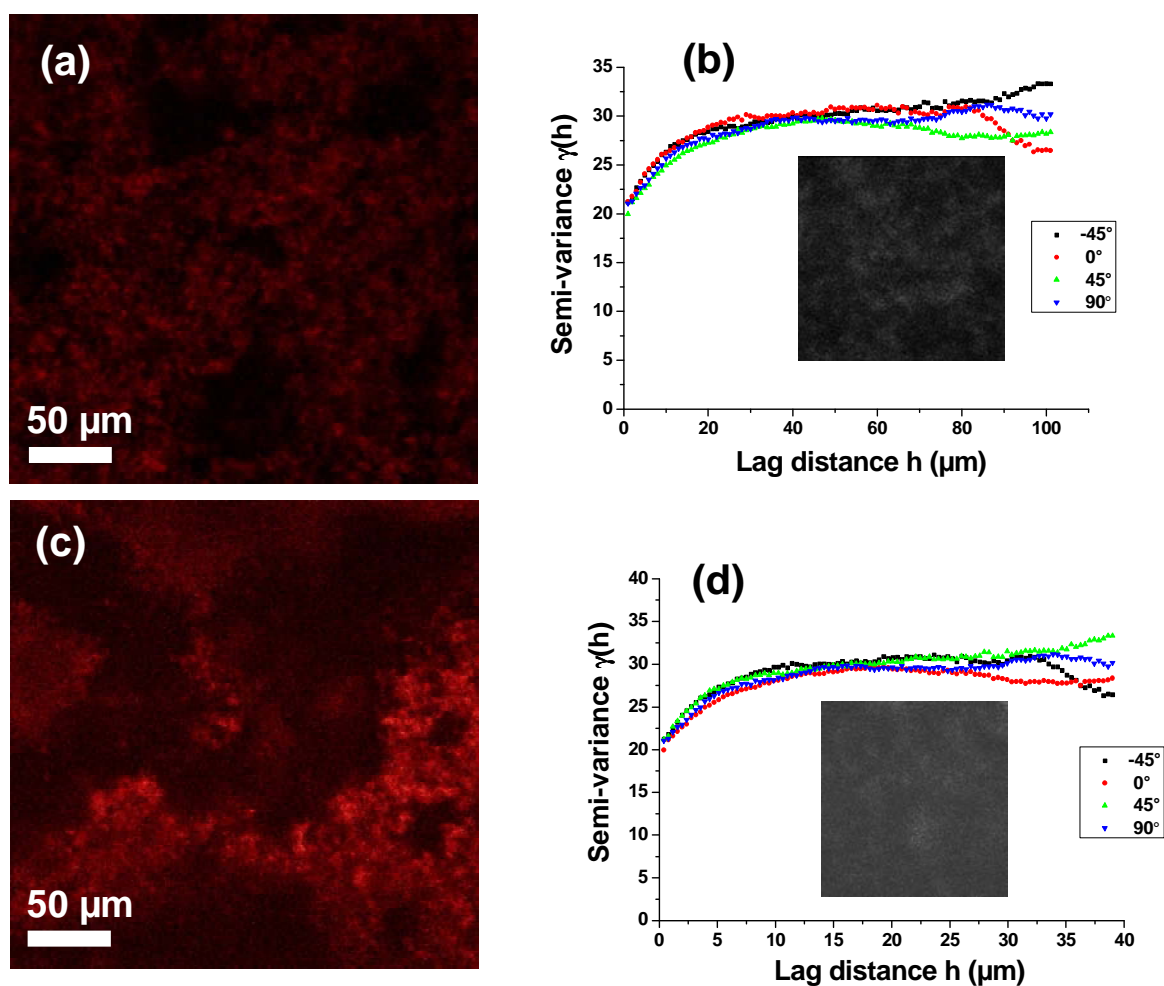


Figure S15. (b) and (d) Semi-variograms $\gamma(h, \alpha)$ obtained from confocal microscopy images (a) and (c), respectively. The images inserted in variograms correspond to the cropped areas. (a) and (c) are confocal microscopy images of biofilms labelled with green-emitting CdSe/ZnS@DHHLA-Leu and CdSe/ZnS@DHHLA-Phe QDs, respectively. Images a and c were stored in 8 bits format (256 grey levels) and were displayed in a pseudo-color look up table (LUT) to express QDs' density within the biofilm. All confocal microscopy images were obtained with laser excitation at 405 nm.

Chapitre V

Diffusion et accumulation des QDs dans l'espace extracellulaire polymérique (EPS)

V.1. Introduction

Au cours du chapitre précédent, nous avons montré qu'il était possible de préparer des QDs possédant un gradient d'hydrophobie. Ce dernier est fonction de la structure des ligands de surface et du diamètre de la nanoparticule. Les QDs hydrophiles et amphiphiles s'associent au biofilm et permettent son marquage. Par microscopie confocale, nous avons observé une dispersion homogène des QDs hydrophiles et une « clustérisation » des QDs amphiphiles dans des microdomaines que nous supposons hydrophobes.

La première partie de ce chapitre vise la compréhension des phénomènes de diffusion et d'accumulation des QDs CdSe(S)@MPA et CdSe/ZnS@DHLA-Phe au sein de biofilms. Nous avons tenté de relier les résultats obtenus à la fonctionnalisation ainsi qu'à la charge de surface, à la composition chimique et au diamètre hydrodynamique des nanocristaux. Les expériences de microscopie confocale de fluorescence en temps réel ont été complétées par les mesures de spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS). Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec des nanoparticules organiques fluorescentes type billes de latex chargées négativement.

Dans la deuxième partie, nous avons démontré, via un double marquage réalisé à l'aide de Syto 9, que les QDs amphiphiles CdSe/ZnS@DHLA-Phe s'accumulaient dans des microdomaines de l'EPS du biofilm de la bactérie *Shewanella oneidensis* MR-1. La FCS a été utilisée pour étudier l'association des QDs avec le biofilm et avec les cellules bactériennes cultivées en mode planctonique.

Dans la dernière partie, nous avons essayé de suivre la réorganisation de l'espace extracellulaire (EPS), et surtout des microdomaines hydrophobes, dans le biofilm lors d'un stress oxydant généré par O₂. Pour cela, les biofilms ont été préparés en conditions aérobie ou micro-aérobie et marqués par les QDs amphiphiles CdSe/ZnS@DHLA-Phe et hydrophiles CdSe(S)@MPA. La structure des biofilms a été étudiée par microscopie confocale associée au traitement d'image géostatistique (semi-varigramme) que nous avons déjà abordé dans le chapitre précédent.

V.2. Diffusion limited sorption of functionalized nanoparticles (Quantum Dots) in *Shewanella oneidensis* biofilms

Abstract:

The study of diffusion and accumulation of fluorescent nanoparticles (QDs) in biological matrices such as biofilms is a key parameter to approach their properties especially their hydrophilic/hydrophobic nature and dynamics. The interactions between quantum dots such as CdSe(S) coated with the hydrophilic 3-mercaptopropanoic acid ligand or core/shell CdSe/ZnS coated with an amphiphilic ligand (dihydrolipoic acid coupled with the phenylalanine amino-acid) and *Shewanella oneidensis* MR-1 cells and laboratory-grown biofilms were investigated using fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and confocal fluorescence microscopy. Our results show that, at neutral pH, negatively charged CdSe QDs do not interact with planktonic bacteria cells but strongly associate to the bacterial biofilm of *Shewanella oneidensis*. The interactions of nanoparticles within the biofilm were found to be dependent on their hydrophilic/hydrophobic balance and hydrodynamic diameter. The diffusion-limitation of nanoparticles (QDs) in biofilms can be considered as an approach to determine matrix structure and porosity.

Introduction

Quantum dots (QDs) are nanoparticles of semiconductors (CdSe, CdTe, PbS, ZnSe, ...) or metals whose excitons are confined in all three dimensions. QDs have gained a great interest in recent years to fundamental studies and technical applications, such as light-emitting devices, fluorescent biosensors, and biolabelling, as well as solar cells [1-6]. Compared to conventional organic dyes, QDs possess many advantages, including high quantum yields, photobleaching stability, continuous absorption band, and size-tuned photoluminescence. QDs have recently been used for the labelling and the detection of bacteria in biofilms [7-10]. Their surface can be functionalised with different ligands to target specific biopolymers (DNA, ...), pathogenic microorganisms, or biofilm domains (see chapter IV). As their hydrodynamic size is around few nanometers, QDs should be able to diffuse easily in the biofilms. However nanoparticle behavior is dependent on its specific properties (e.g., size, shape, chemical composition, surface charge, hydrophobicity and coating with ligands), of the surrounding solution chemistry (e.g., pH, ionic strength, ionic composition, natural organic matter content) [11], and the Hamaker constant of the particle fluid-collector [12]. That is a major point as particle-particle interactions and particle-surface interactions play a key role in controlling the deposition behavior of nanoparticles in aquatic environments and in porous media such as biofilms.

Biofilms represent organized and structured communities of microbial cells embedded in extracellular polymeric substances (EPS) of variable density and composition [13]. The EPS produced by microbial communities include a variety of biopolymers like polysaccharides, proteins, glycoproteins, glycolipids, e-DNA which expression is controlled by many parameters and very variable (as an example in environmental biofilms, polysaccharides are frequently a minor component) [14]. EPS govern the 3D-architecture of the biofilms and explain the cohesiveness of the whole as well as the presence of dense clusters, open spaces or vacuoles, and channels [15]. As a consequence biofilms appear as porous medium [16], in which nanoparticules will diffuse more or less quickly depending on their potential interactions with the biopolymers working as a collector surface. The transport and deposition of nanoparticles in saturated porous media are generally governed by Brownian diffusion which is more efficient as the size of particles is low [17].

Macromolecules or phages diffusion in biofilms may be slowed down because of their interactions with the matrix [18-21]. The same is expected for nanoparticles which have been functionalised with hydrophobic ligands for labelling hydrophobic domains of the biofilms (see chapter V.3).

The diffusion of such nanoparticles which have been shown to accumulate into biofilm should be retarded by interaction with (sorption to) biofilm polymers.

In order to assess the contribution of nanoparticles surface functionalization and chemical composition to variations in their transport within the biofilm, we compared the behaviour of three negatively charged water-dispersible nanoparticles such as CdSe(S) QDs capped with 3-mercaptopropionic acid (MPA), CdSe/ZnS core/shell QDs capped with lipoic acid coupled with the amphiphilic phenylalanine amino acid (DHLA-Phe) and carboxylate-modified latex beads used as reference. This qualitative investigation has been carried out using fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). This was accomplished by the injection of the nanoparticles in a flow cell containing a 72-hours grown *S. oneidenis* MR-1 biofilm.

Material and methods

Fluorescent nanoprobes

- Anionic carboxylate-modified fluorescents latex beads of 20-nm diameter obtained from Molecular Probes were used as reference. The suspensions of fluorescent probes were sonicated and filtered before each experiment to eliminate aggregates. Concentrations of 40 nM (in water) to 200-250 nM (in biofilms) were used in all experiments.

- The synthesis of core/shell QDs of cadmium selenide (CdSe(S), CdSe/ZnS) was carried out by hydrothermal or by organometallic route. These QDs were functionalized with ligands bearing hydrophilic moieties such as 3-mercaptopropionic acid (CdSe/S@MPA), or amphiphilic moieties such as phenylalanine amino-acid (CdSe/ZnS@DHLA-Phe) (see chapter IV).

Bacterial suspensions of *Shewanella oneidenis* MR-1

Bacterial suspensions were grown to the stationary phase (15 h) in Miller and Luria broth (LB) at 30°C, washed twice by centrifugation-suspension in MgSO₄ solution (0.1 M), and finally treated with an aqueous solution of QDs (250 nM) or latex beads (200 nM).

Biofilms of *Shewanella oneidensis* MR-1

Bacterial biofilms were grown in flow cells previously used by Paris *et al.* [22]. Briefly, the setup consisted of a Plexiglas[®] block, a silicon gasket ($e = 0.512$ mm) and a glass slide (70 x 44 x 0.19-0.21 mm; PolyLabo, France) fastened by means of vacuum suction. The dimensions of the test channel were 45 x 15 x 0.512 mm. A 1.5 mL volume of the LB medium-grown stationary phase culture of *Shewanella oneidensis* MR1 suspension was inoculated by syringe injection. A culture lactate + fumarate medium (LML+F) prepared according to Teal *et al* [23] was pumped into the flow-cell at a flow rate of 0.2 mL/min. Biofilms were grown at 30°C for 72 hours on average.

FCS set-up and diffusion analysis

The determination and analysis of fluorescence correlation curves in the case of free Brownian motion of molecules have been described in detail elsewhere [24-26] (see chapter IV).

Results

CdSe(S) QDs capped with MPA and CdSe/ZnS core/shell QDs capped with DHLA-Phe had an average diameter of 2.4 ± 0.6 nm and 4.0 ± 0.5 , respectively. These values are coherent with those calculated using the published sizing curve and the size-dependent molar extinction coefficient at the first absorption maximum ($\lambda_{\text{abs}} = 485$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 510$ nm) for CdSe/CdS@MPA and ($\lambda_{\text{abs}} = 585$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 600$ nm) for CdSe/ZnS@DHLA-Phe QDs [27]. Negatively charged organic latex nanoparticles were used as reference. The three probes tested in this study were negatively charged, but they were clearly different in terms of hydrodynamic diameter, zeta potential, coefficient of diffusion, chemical composition and surface functionalization (Table 1).

Table 1. Main characteristics of the nanoprobe tested for their diffusion in the biofilm (n.d. not determined).

Nanoparticules	CdSe(S)@MPA	CdSe/ZnS@DHLA-Phe	Latex beads
$D_{\text{(TEM)}} \text{ (nm)}$	2.4 ± 0.6	4.0 ± 0.5	n.d.
$D_{\text{(Hydrodynamic)}} \text{ (nm)}$	6.0 ± 1.1	17.5 ± 2.5	26.0 ± 2.3
Surface ligands	MPA	DHLA-Phe	carboxylates
Chemical composition	CdSe(S) Inorganic	CdSe/ZnS Inorganic	Organic
Zeta Potential (ζ) (mV)	-33 ± 2	-39 ± 2.5	-44 ± 5
Coefficient of diffusion $D \text{ (m}^2 \cdot \text{s}^{-1}\text{)}$	$7.3 \cdot 10^{-11}$	$2.4 \cdot 10^{-11}$	$1.6 \cdot 10^{-11}$
Diffusion time in solution (τ) (ms)	0.18	0.55	0.83
Hydrophobicity	+	++	n.d.

Before testing the behaviour of the nanoprobe in biofilms, controls were carried out with bacterial suspensions. *S. oneidensis* MR-1 cell suspensions were incubated with anionic latex beads, CdSe(S)@MPA or CdSe/ZnS@DHLA-Phe QDs at a concentration of 250 nM (Figure 1). The diffusion time of latex beads was slightly increased compared to the value obtained in water ($D = 6.26 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $\tau = 2.11$ ms), indicating an association of beads with *S. oneidensis* cells. With CdSe(S)@MPA and CdSe/ZnS@DHLA-Phe QDs, no significant changes were observed in FCS curves and diffusion times compared to water, indicating that QDs did not interact with bacterial cells.

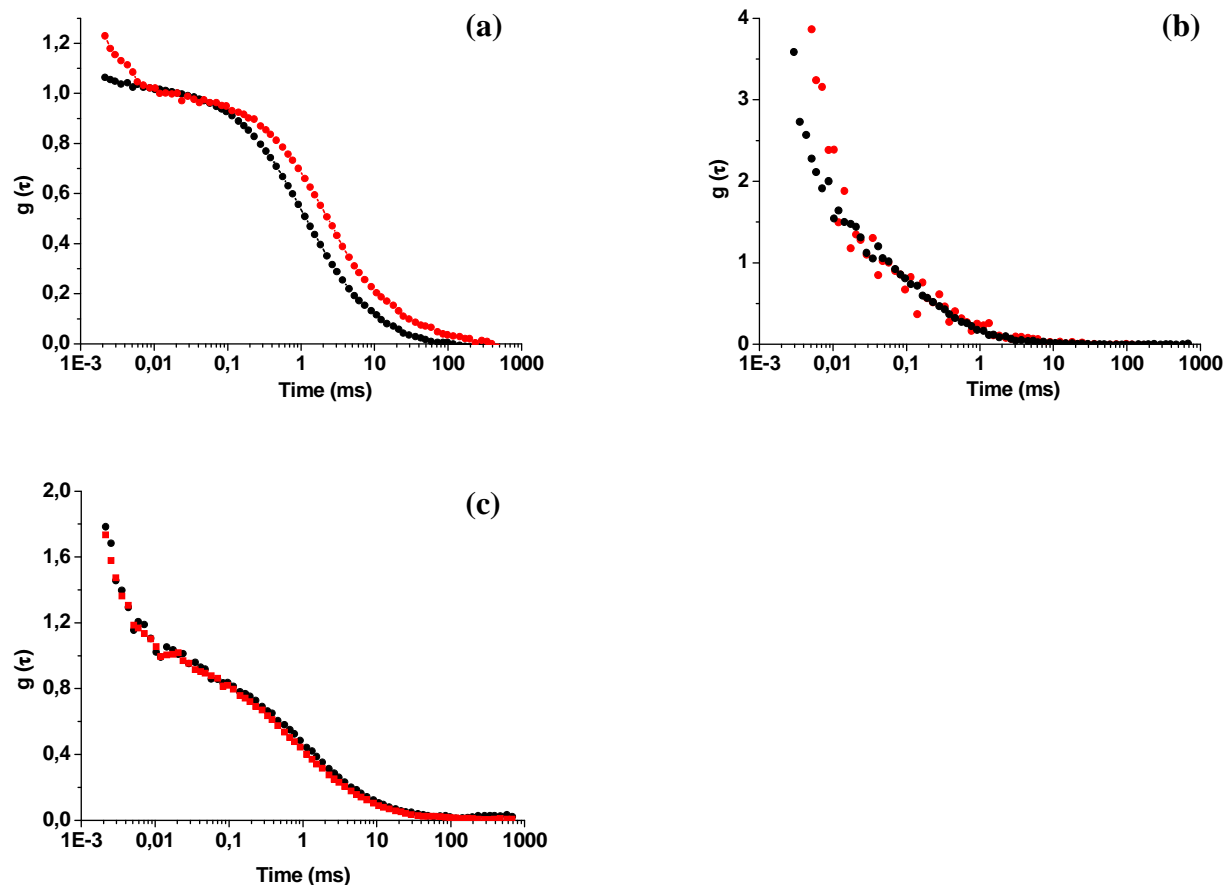


Figure 1. Fluorescence correlation curves of (a) anionic latex beads, (b) CdSe(S)@MPA QDs and (c) CdSe/ZnS@DHHLA-Phe QDs in pure water (black curve) and in the presence of bacterial cells (red curve).

Assays on biofilms were carried on 72-hours biofilms of *S. oneidensis* MR-1 grown at 30°C under the constant flow (200 $\mu\text{L}/\text{min}$) of aerated LML medium supplemented with fumarate (0.5 mM) in flow-cell systems that can be accommodated on a microscope set up.

Latex beads injected in biofilms diffused “easily” without apparent interactions with the EPS matrix or the cell surfaces. Indeed, similar FCS curves as those obtained in water were obtained for latex beads in the course several horizontal scans and at different depths within the biofilm indicating that these beads spread perfectly in the biofilm without any limitation caused by biopolymers (EPS) (Figure 2). Curves profiles were not dependent upon local biofilm structures and could satisfactorily be fitted using eq. 5 (p.175) indicating that latex beads only weakly associate with the EPS. The average diffusion coefficient D value obtained for beads in the biofilm was found to be $1.33 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

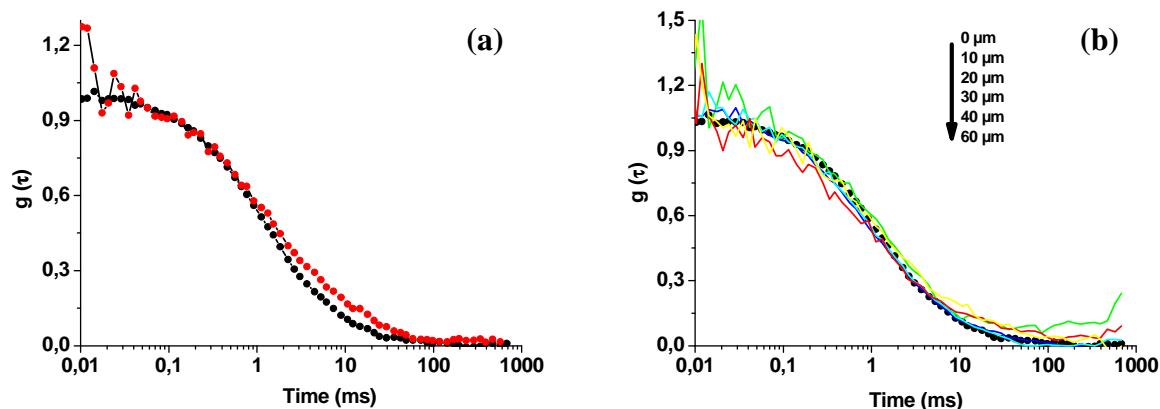


Figure 2. Fluorescence correlation curves of anionic latex beads at various points (XY plane) of the biofilm (red curve) (a) and different depths (colors curves) (b) and in pure water (black curve).

When the same experiment was carried out with CdSe(S)@MPA and CdSe/ZnS@DHHLA-Phe QDs, the intensity vector indicated good fluctuations of fluorescence (not shown) but the fluorescence correlation curves of CdSe@MPA and CdSe/ZnS@DHHLA-Phe QDs were highly distorted compared to those obtained in water. These distortions prevented the acquisition of any correlation curves, indicating a strong association of these nanoparticles with the biofilm (Figure 3).

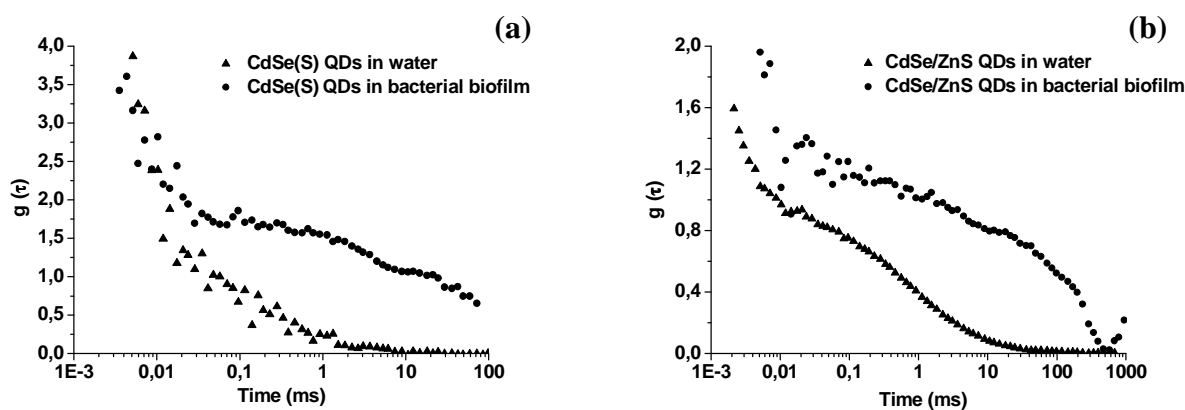


Figure 3. Experimental fluorescence correlation curves of CdSe(S)@MPA (a) and CdSe/ZnS@DHHLA-Phe (b) QDs in bacterial biofilm ● and in pure water ▼.

This strong association and accumulation of CdSe(S)@MPA and CdSe/ZnS@DHHLA-Phe QDs with the biofilm polymers was confirmed in additional assays for several spatio-temporal measurements (Figure S1 - Supplementary information).

Injected CdSe(S)@MPA and CdSe/ZnS@DHLA-Phe QDs accumulated efficiently in biofilms in a few minutes with more or less inhomogeneous distribution throughout the biomass. A preferential accumulation was observed on the side of the biofilm cluster exposed to the nanoparticles flux (apparent homogeneous distribution for CdSe(S)@MPA QDs (Figure 4a) and heterogeneous distribution (accumulation looked more pronounced) for CdSe/ZnS@DHLA-Phe QDs (Figure 4b)), probably due to the different hydrophilic/hydrophobic balance of these nanoparticles in the heterogeneous structure of the bacterial biofilm.

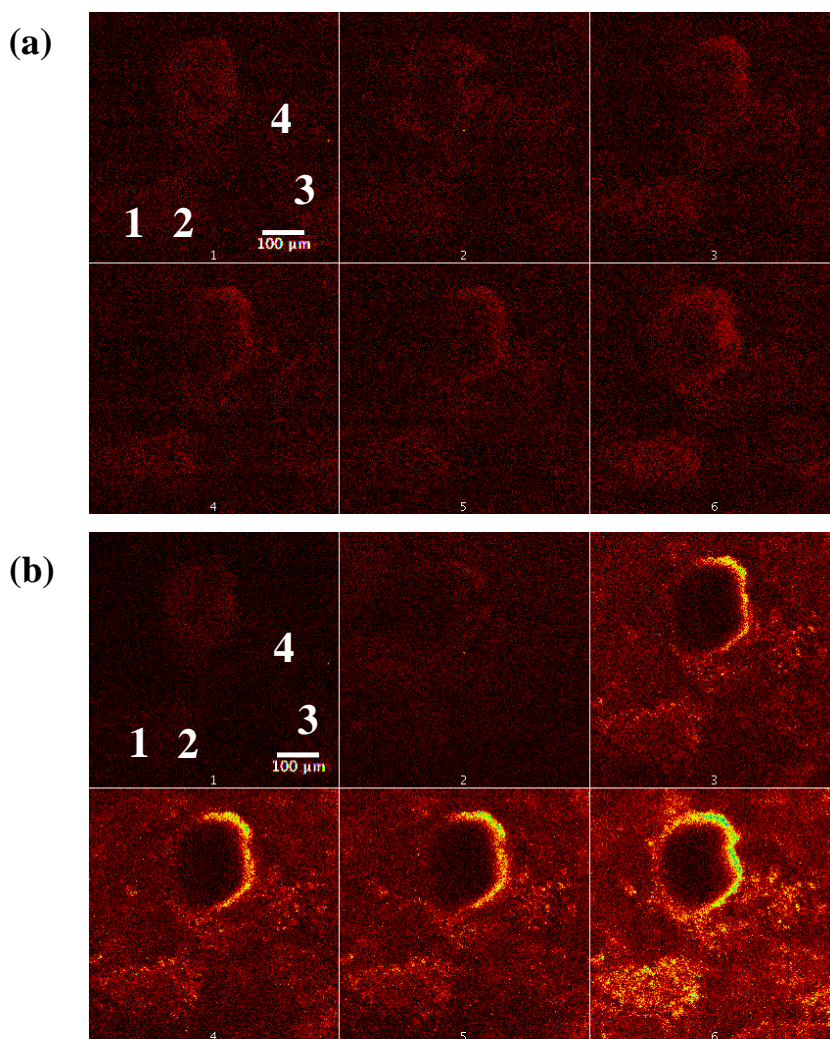


Figure 4. Confocal microscopy images of a *S. oneidensis* biofilm stained both with CdSe(S)@MPA (a) and CdSe/ZnS@DHLA-Phe QDs (b) (dual injection in the flow-cell). Images were taken at times 0 min, 10 min, 25 min, 35 min, 45 min and 75 min (the QDs flux was moving from the right to the left part of the flow cell) respectively. Bacterial cells were first labelled with Syto 9 to determine the focal plane used for the accumulation study of QDs in the biofilm in real time. An aqueous dispersion of the two QDs (2 mL, 250 nM) was first injected during 20 minutes and then stopped for 25 min. A second injection was performed at $t = 45$ min during 20 min and finally stopped.

The kinetics of QDs accumulation in the 4 studied zones of the biofilm are shown on Figure 5 and table 2.

Amphiphilic CdSe/ZnS@DHLA-Phe QDs associated efficiently to the biomass and a strong increase of fluorescence intensities were observed in the 4 zones suggesting that these QDs interact quickly with the biomass after their injection in the biofilm (Figure 4b, and figure 5b). When the injection was stopped, the increase of fluorescence intensity was far less pronounced and nanoparticles accumulation rates decreased ca. 10-fold (Table 2).

The weak increase of fluorescence intensity observed on Figure 5b, as soon as the injection is stopped may be explained by the low quantity of QDs in the flow-cell (comparatively to the period of continuous injection). CdSe/ZnS@DHLA-Phe nanocrystals stained first the periphery of the biofilm aggregates and then progressively moved inward toward the center of the aggregates (Figure 4b and Figure 6b).

The fluorescence intensities measured in the 4 zones seemed in relation to the biomass density, estimated in the 4 zones by the transmission image (data not shown) (Table 2 and Figure 5). Indeed, during the first injection and after a lag phase corresponding to the dead volume above the flow-cell, the staining speed curves showed at least two steps (16-20 min), the highest being quite equivalent in the 4 zones (around $30 \text{ PL(I)/s} \cdot 10^{-3}$) (Table 2). However, the quantity of QDs accumulated was 1.5 higher in zone 1 comparatively to zone 3. In the course of the non-injection period (23-45 min), staining speeds were lower but similar in the 4 zones considered (around $3.3 \text{ PL(I)/s} \cdot 10^{-3}$). During the second injection (50-65 min), the staining speed was found to be the highest in zones 2 and 4. Additionally, this kinetic was lower than the kinetic measured during the first injection. By the end of the second injection period, zones 2 and 4 showed the highest fluorescence intensity. We assume a saturation of QDs in zone 1 during the second injection period (65-75 min) because this effect was not observed in the other zones.

The increases of fluorescence intensities were markedly less pronounced with hydrophilic CdSe(S)@MPA QDs and could clearly only be observed after the second injection (Figure 5). The labelling seems more homogeneous (periphery and core of the aggregates) along the whole experiment (Figure 6a).

The data obtained with MPA-capped CdSe(S) QDs have to be taken with precaution as the fluorescence intensity of these nanocrystals was weak during the whole course of this biofilm imaging (Figures 4a and 5a), which has never been observed in any other experiment performed during our work.

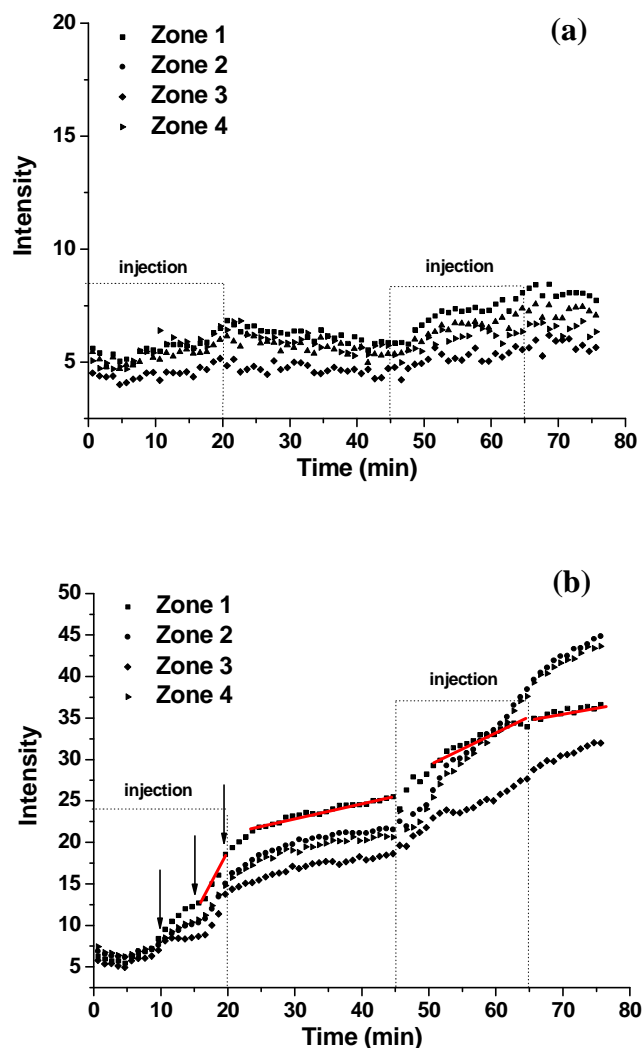


Figure 5. Kinetics of accumulation of CdSe(S)@MPA QDs (a) and CdSe/ZnS@DHHLA-Phe QDs (b) in 4 different zones of *Shewanella* biofilms.

Table 2. Staining speed of CdSe/ZnS@DHHLA-Phe QDs in the 4 zones of the biofilm.

Zone	<i>First injection</i>	<i>No injection</i>	<i>Second injection</i>	<i>No injection</i>
	<u>t = 16 to 20 min</u>	<u>t = 23 to 45 min</u>	<u>t = 50 to 65 min</u>	<u>t = 65 to 75 min</u>
	(PL(I)/s(10 ⁻³)) ^a	(PL(I)/s(10 ⁻³)) ^a	(PL(I)/s(10 ⁻³)) ^a	(PL(I)/s(10 ⁻³)) ^a
1	30.3	3.6	6.8	2.6
2	30.8	3.4	16.2	6.8
3	27.8	3.2	6.7	5.5
4	29.2	2.7	18.7	6.5

a. PL(I) : photoluminescence intensity

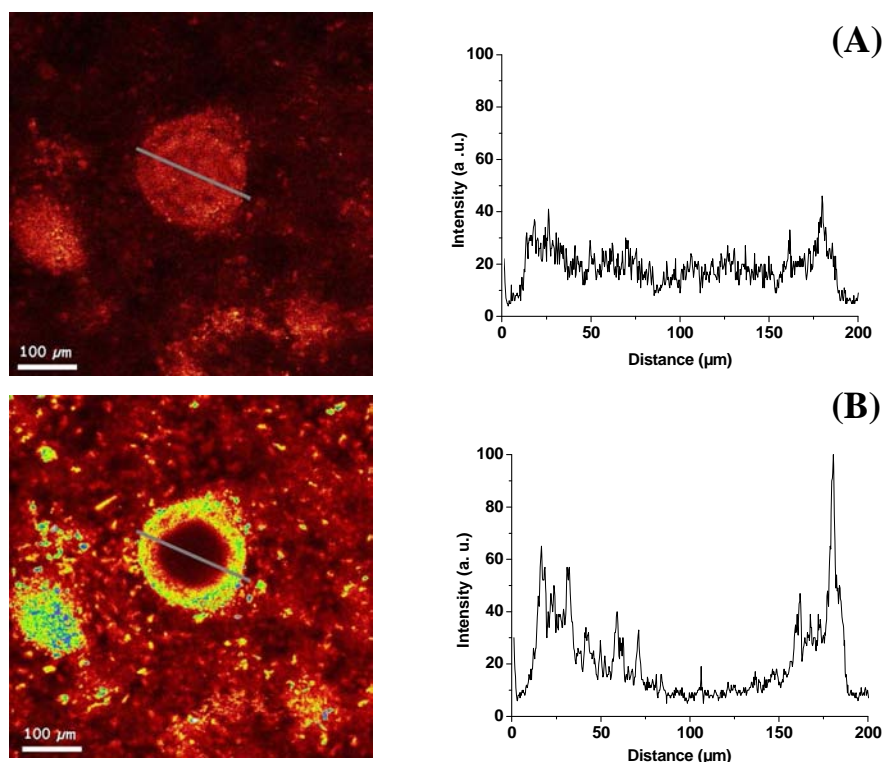


Figure 6. Confocal microscopy images of a *S. oneidensis* biofilm treated with CdSe/CdS@MPA (a) and CdSe/ZnS@DHHLA-Phe QDs (b) and their fluorescence intensity distribution in aggregate measured 200 μm in diameter.

Discussion

The purpose of this study was to contribute to a clearer understanding of the diffusion/sorption of nanoparticles when they come into contact with the bacterial biofilm.

Before discussing the behaviour of individual nanoparticles within the biofilm, it is important to understand the chemical nature of biofilm which is a community of adhering microorganisms embedded in an extracellular polymeric substance (EPS) matrix. The EPS are polyanionic, due to the presence of a great number of negatively charged functional groups and are varying in the composition (ADN, ARN, polysaccharides, proteins, aspartic and glutamic acid, uronic acids or ketal linked pyruvate) [28-29].

The negatively charged nanoparticles should only weakly associate with the biofilm. Anionic latex beads interacted weakly within *Shewanella oneidensis* biofilm, in accordance with previous results on *Stenotrophonas maltophilia* biofilms [18]. However, the behavior of QDs is very different. FCS measurements indicate no interaction of CdSe(S) or CdSe/ZnS quantum dots with bacterial cells grown in liquid medium. Similar observations were recently made when core/shell

CdSe/ZnS QDs coated by poly(ethylene glycol)s coupled to carboxyl- and amine-terminal groups were exposed to *Cupriavidus metallidurans* CH34 cells at a density of 10^4 or 10^5 cell.mL⁻¹ [30]. Additionally, microscopic images showed no staining of the planktonic cells (data not reported).

Furthermore, inorganic nanoparticles (QDs) interact strongly with bacterial biofilm compared to organic latex nanoparticles. According to the EPS composition and charge, the accumulation of QDs could be justified by different types of complexation of metallic salts composing the inorganic nanoparticles [31-32]. In our case, the EPS matrix of biofilm may interact with the chemical surface of CdSe(S) or CdSe/ZnS QDs by complexation, chelation or adsorption.

This point suggests that the chemical composition of nanoparticles is an important parameter for their diffusion and sorption in bacterial biofilms.

Indeed, the second interesting parameter is the surface functionalization of nanoparticles. In order to understand the influence of the QDs' ligand on the accumulation, we injected CdSe(S)@MPA (hydrophilic) and CdSe/ZnS@DHHLA-Phe (amphiphilic) QDs in the biofilm to observe their accumulation in real time. CdSe(S)@MPA QDs interact homogeneously with the totality of the aggregates composing the biofilm because of their highly hydrated properties (up to 90% of water). Amphiphilic CdSe/ZnS@DHHLA-Phe QDs are supposed to interact with the hydrophobic microdomains. The dynamic association of these QDs with the biopolymers was observed in 4 zones (Figure 5b). Data obtained confirmed the heterogeneity of the biofilm structure. The association of the fluorescent nanoparticles was dependent on the density of EPS (for example, marked accumulation in zone 2, Figure 4b).

Conclusions

Using fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence confocal microscopy, we have demonstrated that the diffusion or sorption of nanoparticles in bacterial biofilm is dependent on their chemical composition, ligands, and hydrodynamic diameter.

CdSe QDs coated with hydrophilic or amphiphilic ligands do not interact with planktonically grown *S. oneidensis* MR1 cells but strongly with the bacterial biofilm. Nanoparticles accumulation depends not only on their specific properties but also the structure, the density, and the presence of hydrophobic domains in bacterial biofilm.

References

- [1] R. E. Bailey, A.M. Smith, S. Nie, *Physica E*. **2004**, 25, 1-12.
- [2] I. L. Medintz, H. Tetsuo Uxeda, E. R. Goldman, H. Mattoussi, *Nature Mater.* **2005**, 4, 435-446.
- [3] T. Pellegrino, S. Kudera, T. Liedl, A. Munoz Javier, L. Manna, W. J. Parak, *Small*. **2005**, 1, 48-63.
- [4] J. M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Trends Anal. Chem.* **2006**, 25, 207-218.
- [5] J. Lim, S. Jun, E. Jane, H. Biak, H. Kim, J. Cho, *Adv. Mater.* **2007**, 19, 1927-1937.
- [6] I. Robel, V. Subtamanian, M. Kuno, P.V. Kamat, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2385-2393.
- [7] N. I. Chalmers, R. J. Palmer, Jr, L. Du-Thumm, R. Sullivan, W. Shi, P. E. Kolenbrander, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, 73, 630-636.
- [8] N. I. Chalmers, R. J. Palmer, Jr, J. O. Cisar, P. E. Kolenbrander, *J. Bacteriol.* **2008**, 190, 8145-8154.
- [9] M. E. Davey, *J. Bacteriol.* **2008**, 190, 7869-7870.
- [10] J. Lee, I. S. Kim, H. -W. Yu, *Anal. Chem.* **2010**, 82, 2836-2843.
- [11] S. J. Klaine, P. J. J. Alvarez, G. E. Batley, T. F. Fernandes, R. D. Handy, D. Y. Lyon, S. Mahendra, M. J. McLaughlin, J. R. Lead, *Environ. Toxicol. Chem.* **2008**, 27, 1825-1851.
- [12] A. R. Petosa, D. P. Jaisi, I. R. Quevedo, M. Elimelech, N. Tufenkji, *Environ. Sci. Technol.* **2010**, 44, 6532-6549.
- [13] S. S. Branda, S. Vik, L. Friedman, R. Kolter, *Trends Microbiol.* **2005**, 13, 20-26.
- [14] H.-C. Flemming, T. R. Neu, D. J. Wozniak, *J. Bacteriol.* **2007**, 189, 7495-7497.
- [15] W. J. Drury, P. S. Stewart, W.G. Characklis, *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, 42, 111-117.
- [16] Z. Lewandowsky, Evans LV, editor. *Biofilm: recent advances in their study and control*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; **2000**. p. 1-17.
- [17] H. F. Lecoanet, J. Y. Bottero, M. R. Wiesner, *Environ. Sci. Technol.* **2004**, 38, 5164-5169.
- [18] E. Guiot, P. Georges, A. Brun, M. P. Fontaine-Aupart, M. N. Bellon-Fontaine, R. Briandet, *Photochem. Photobiol.* **2002**, 75, 570-579.
- [19] R. Briandet, P. Lacroix-Gueu, M. Renault, S. Lecart, T. Meylheuc, E. Bidnenko, K. Steenkests, M. -N. Bellon-Fontaine, M.-P. Fontaine-Aupart, *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, 74, 2135-2143.
- [20] F. Waharte, K. Steenkeste, R. Briandet, M.-P. Fontaine-Aupart, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, 76, 5860-5869.

- [21] S. Takenaka, B. Pitts, H. M. Trivedi, P. S. Stewart, *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, 75, 1750-1753.
- [22] T. Paris, S. Skali-Lami, J. -C. Block, *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, 97, 1550-1561.
- [23] T. K. Teal, D. P. Lies, B. J. Wold, D. K. Newman, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, 72, 7324-7330.
- [24] D. Magde, E. L. Elson, W. W. Webb, *Phys. Rev. Lett.* **1972**, 29, 705-708.
- [25] E. L. Elson, D. Magde, *Biopolymers* **1974**, 13, 1-27.
- [26] R. Rigler, U. Metz, J. Widengren, P. Kask, *Eur. Biophys. J.* **1993**, 22, 169-175.
- [27] W. W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng, *Chem. Mater.* **2003**, 15, 2854-2860.
- [28] I. W. Sutherland, *Microbiology* **2001**, 147, 3-9.
- [29] R. M. Donlan, *Emerg. Infect. Diseases.* **2002**, 8, 881- 890.
- [30] V. I. Slaveykova, K. Startchev, J. Roberts, *Environ. Sci. Technol.* 2009, 43, 5117-5120.
- [31] J. W. Moreau, P. K. Weber, M. C. Martin, B. Gilbert, I. D. Hutcheon, J. F. Banfield, *Science* **2007**, 316, 1600-1603.
- [32] M. A. Kiser, H. Ryu, H. Jang, K. Hristovski, P. Westerhoff, *Water res.* **2010**, 44, 4105-4114.

Supporting information

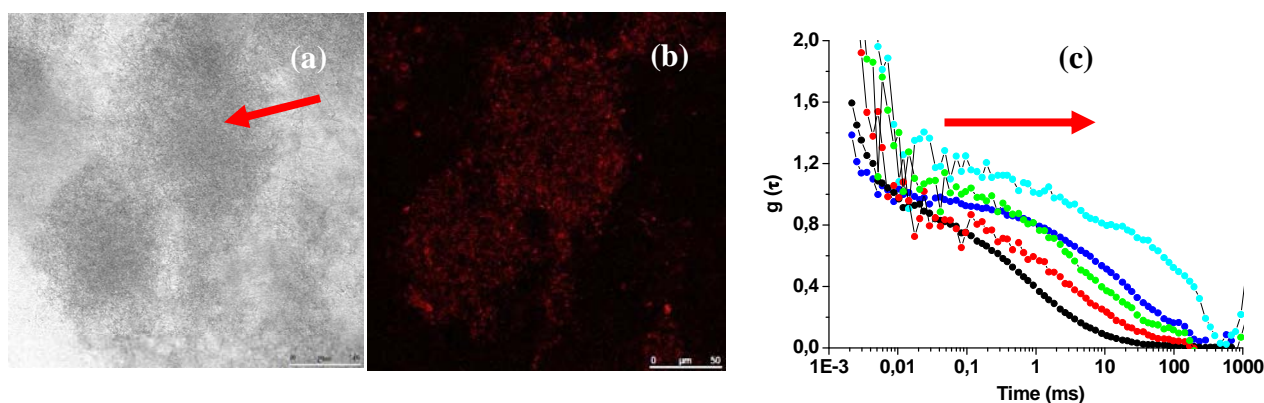


Figure 1. Confocal microscopy images of a *S. oneidensis* biofilm treated with CdSe/ZnS@DHHLA-Phe QDs: transmission image (a) and corresponding XY plane fluorescence image (b). Confocal microscopy images were obtained with laser excitation at 488 nm and corresponding experimental fluorescence correlation curves of CdSe/ZnS@DHHLA-Phe QDs (c) in 4 points of biofilm with a step of 10 μm and in pure water (black curve).

V.3. Probing hydrophobic domains of the intercellular space in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms using functionalized nanoprobles (QDs)

Abstract:

Hydrophobic “stickers” are expected to be present in hydrophilic, polyanionic biofilms in order to bring the cohesiveness of these systems grown on surfaces immersed in water. Here we proposed the use of quantum dots (CdSe/ZnS@DHLA-Phe) as amphiphilic fluorescent nanoparticles and *in situ* microscopic observations to explore the intercellular space properties of *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) confirmed the effective trapping of the quantum dots used. Besides, the unevenly distributed hydrophobic material was observed associated to the EPS matrix and not to the cell surfaces.

Introduction

The structure and cohesiveness of bacterial biofilms, which consist of an organized population of micro-organisms adhering to surfaces in any natural or man-made system, are the result of a highly hydrated, visco-elastic matrix made up of organic exopolymeric substances (EPS) [1-3]. This intercellular matrix, along with the bacterial surfaces, constitutes the true interface between the cells and their environment and can be regulated differentially [4-7]. The extraction of such exopolymers has been for a long time carried out with invasive procedures (using ultrasounds, chemicals, etc), - the yields of which are unknown - and is made difficult by cell surfaces polymers which may contaminate the samples [8]. *In situ* non-destructive analytical techniques appear as much more promising as they do respect the system's integrity. As an example, fluorescent staining of extracellular matrix material combined with confocal microscopy was used to identify polysaccharides targeted with lectines [9-11]. More recently, combining Raman and confocal microscopies allowed good EPS identification [12,13]. What is known today is that the EPS matrix is mainly composed of proteins, polysaccharides, lipids, nucleic acids, and heteropolymers such as glycoconjugates, glycolipids, glycoproteins, and lipopolysaccharides [14,15]. Its composition is governed by many factors including bacterial species and physiology as well as environmental conditions.

The EPS matrix has properties that are essential to the functioning of biofilms (as well as of bacterial aggregates in general), such as water retention, mechanical bridging of cells, protection against toxics, oxidants and predators, stabilization of hydrolytic enzymatic activities, redox activity, and so on [16,17,2]. Therefore exploring this physical microenvironment could provide information on the matrix's functions and dynamics and explain, for example, how bacteria stick or bridge within the biofilms.

The stability of the matrix appears to be provided by hydrophobic interactions, cross-linking by multivalent cations, and entanglements of the exopolymeric biopolymers [18,2]. The characterization of hydrophobic interactions within biofilms was the purpose of our work. Indeed hydrophobicity is one of the key parameters controlling the 3D-architecture of these highly hydrated structures, the efficient trapping of some biodegradable macromolecules and finally the cohesiveness of biofilms [18,19]. The hydrophobicity of planktonic cell surfaces has long been recognized as a determining factor in the initial adhesion of cells on substratum [20-22]. But little is known about its expression in biofilm apart from the work reported by Zhang *et al.* which showed that deleting *ycfR* affected outer membrane proteins and converted the cells from hydrophilic to

hydrophobic [23]. Additionally the pioneer work undertaken by Wolfaardt *et al.*, where they measured the accumulation of diclofop or Nile Red, showed a non-uniform distribution of hydrophobic regions within biofilms [24].

In this work, we probed *in situ* the hydrophobic domains of the intercellular space in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by using confocal microscopy combined with fonctionnalized water-soluble amphiphilic Quantum Dots (QDs) (Figure 1). Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) was also used to study the dynamic properties of diffusion of fluorescent nanoparticles in water or in biological matrix [25-28].

Quantum dots were previously reported as interesting probes for detecting bacteria in cells suspensions or in biofilms but not for EPS matrix characterization [29-32]. In our work, new QDs (CdSe(S) or CdSe/ZnS nanocrystals) were functionalized with ligands bearing moieties such as 3-mercaptopropionic acid (MPA) or phenylalanine (Figure 1).

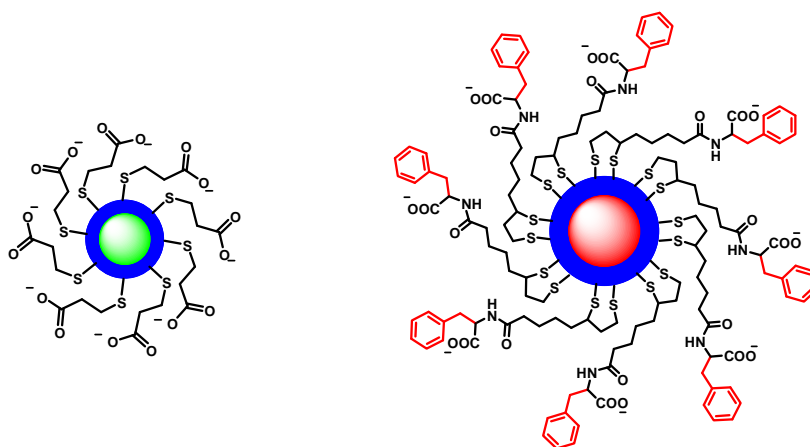


Figure 1. Schematic representation of the two types of amphiphilic QDs used in this study:

CdSe(S)@MPA (left) and CdSe/ZnS@DHLA-Phe (right).

Three objectives were defined and experimental results are reported here: (i) labeling the intercellular matrix within *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms but not the cells; (ii) showing the presence of hydrophobic domains among the EPS matrix with QDs, and (iii) finally, proving the existence of a strong interaction between these amphiphilic QDs and the matrix by using FCS technique.

Results

Biofilm growth of *Shewanella oneidensis* MR-1

Shewanella oneidensis MR-1 biofilm were grown on a glass slide in flow-cells continuously fed with lactate and fumarate supplemented nutritive medium (LML+F), at 30°C with approximately 6 mg/L O₂. After a 72 h growth period, the resulting biofilms covered about 76% of the substratum, and their maximal thickness was measured to be between 70 to 100 μm. The absence of autofluorescence of these biofilms was checked (λ_{ex} 405 nm and 488 nm). Cells ranged from 1 to 5 μm in length.

Labelling hydrophobic domains and matrix in *Shewanella* biofilms

The two QDs used in this study accumulated in the biofilm as observed by their fluorescence 15 minutes after their injection (Figure 2). MPA-capped QDs (the relatively less hydrophobic ones) accumulated quite evenly within the biofilm (Figure 2A), While the more hydrophobic CdSe/ZnS@DHLA-Phe QDs associated only to some microzones (Figure 2C).

In some cases, a high peripheral accumulation was observed suggesting a diffusion-limited accumulation of the amphiphilic QDs (data not reported). Control imaging with the hydrophobic organic probe Nile Red also showed an uneven distribution (Figure S1; Supporting Information).

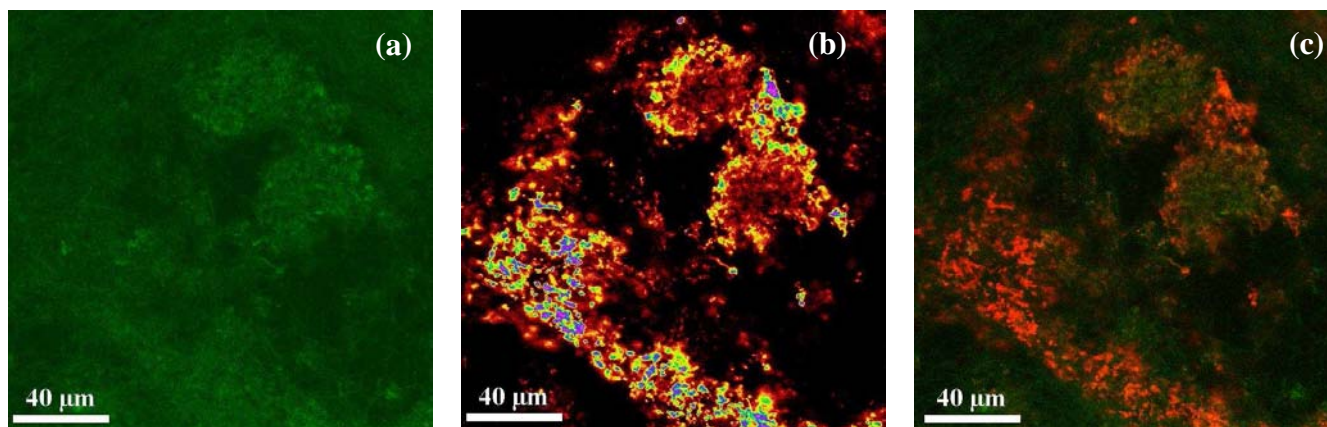


Figure 2. Biofilm imaging by confocal microscopy at about 30 μm from the bottom after staining with CdSe(S)@MPA (a), CdSe/ZnS@DHLA-Phe (b) and superposition (c) ($\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm). Biofilm depth was determined manually using the computer-controlled focusmeter of the CSLM system and defined with respect to the cover slit surface (*i.e.* at the attachment of the biofilm); the top layer of the biofilm (~70 -100 μm from the glass cover slit) corresponds to the interface with the flowing growth medium.

Additionally, we carried out dual staining, with on the one hand, the Syto 9 nucleic acid dye for staining cell nucleic acid, and on the other hand amphiphilic DHLA-Phe capped QDs. As shown in Figure 3, QDs did not stain the cells, which are easy to recognize thanks to Syto 9 green fluorescence, but accumulated into the extracellular space in a non-uniform way. Imaging on bacterial suspensions grown in LML+F liquid medium and stained by CdSe/ZnS@DHLA-Phe QDs for 15 min (not reported) did not show any fluorescence associated to the cells. Moreover, FCS measurements confirms the non-association of the QDs to and/or penetration in the bacteria. This observation corroborates the fact that biofilm-related EPS material was composed in part of hydrophobic polymers which could be organized in more or less dense clusters for greater stability in the hydrated matrix.

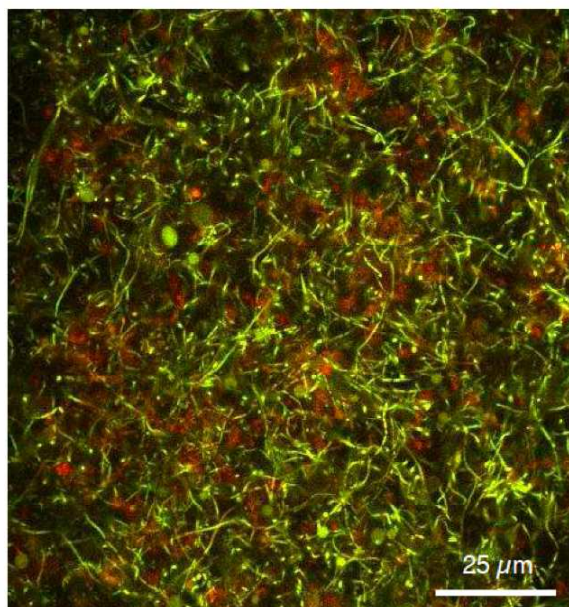


Figure 3. Confocal imaging of biofilm at approximately 30 μm after dual staining of *Shewanella* biofilm with 2.5 μM Syto 9 (green) and 250 nM amphiphilic CdSe/ZnS@DHLA-Phe QDs (red).

Diffusion of QDs into *Shewanella* biofilms by using fluorescence correlation spectroscopy

As gentle washing with new medium of the biofilms did not affect the distribution of QDs' fluorescence (results not shown), this raised another question as to their diffusion and association to EPS. FCS technique was used to analyze the inhibition of QDs' mobility in the intercellular space throughout the biofilm following a horizontal transect (at 30 nm from the bottom of the biofilm).

Before applying the technique to bacterial cultures, FCS measurements were performed in deionized water under the same conditions at room temperature. The FCS curves of CdSe/ZnS@DHHLA-Phe QDs are shown in Figure 4. Their analysis considering a Brownian motion of the QDs allows to determine a diffusion coefficient and a hydrodynamic size for QDs ($D=2.4 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ and $R= 17.5 \text{ nm}$). Controls done with carboxylated latex beads gave respective values of 26 nm and $1.6 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ in good agreement with the manufacturer specifications.

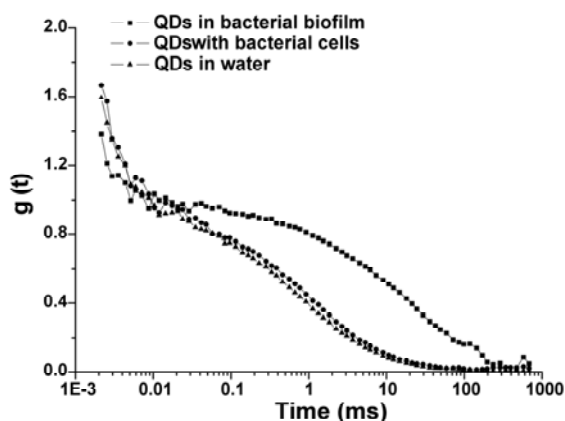


Figure 4. Experimental fluorescence correlation curves of hydrophobic CdSe/ZnS@DHHLA-Phe QDs in biofilm, suspended cells, and water.

A control was done with also a *Shewanella oneidensis* MR-1 cell suspension incubated with anionic latex beads and amphiphilic CdSe/ZnS@DHHLA-Phe QDs for 15 min before FCS measurements. In both cases, the FCS curves obtained in the presence of the bacterial suspension were at most slightly distorted in comparison with those obtained in pure water confirming the near absence of interactions between beads and QDs with planktonic bacterial cells.

After incubating the biofilms with 250 nM QDs, the correlation curve obtained for this probe in the bacterial biofilm was compared to those obtained in pure water. Figure 4 shows that the FCS curve of QDs in the biofilm was distorted in comparison with those obtained in aqueous solution and no satisfactorily fit of the correlation curves with one or two diffusing components was possible. Two hours after injecting QDs in the biofilm, we repeated FCS measurements to observe their distribution. No diffusion curves were obtained although the intensity vector indicated a good fluorescence response (data not shown). These results demonstrate the strong association of QDs to some of the extracellular polymers for which the chemical nature remains to be elucidated.

Discussion

The main goal of our study was to demonstrate directly (*i.e.* without any extraction step) the hydrophobic character of the EPS matrix, which structures the aerobic biofilms of *Shewanella*. Indeed hydrophobic “stickers” are expected to be present in the very hydrophilic, polyanionic biofilm matrix (made in part of water-soluble polymers such as polysaccharides) in order to make the system cohesive and viscoelastic. It may be assumed, in agreement with the hypothetical representation proposed by Miquelard-Garnier *et al.* (Figure 5), that hydrophobic clusters act in our matrix as reticulating material and that such a material should trap hydrophobic probes [33].

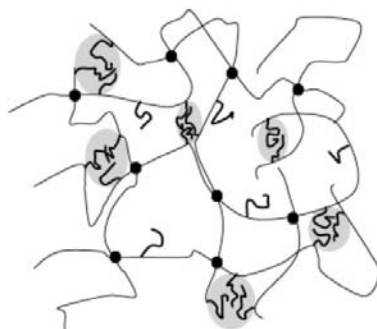


Figure 5. Schematic structure of a hydrophobically modified hydrogel (grey zones represent hydrophobic clusters/micelles) [33].

Interestingly, the two QDs used in this study were not able to label the surface of laboratory-grown planktonic *Shewanella oneidensis* even if one cannot exclude the presence of some hydrophobic zones/biopolymers in the outer- and cytoplasmic membranes of these bacteria [34].

The long-range electrostatic forces of the bacteria, which may be relatively high, could have limited the sorption of QDs onto the envelopes [35].

On the contrary, labelling the *Shewanella oneidensis* biofilm matrix with amphiphilic QDs was relatively rapid but the two QDs did not show the same distribution pattern. Their reactive-diffusion into the matrix should have been limited both by the porosity of the matrix and by their interaction with the hydrophobic clusters and also later by probe-probe interactions. In this latter case, the highly uneven distribution of the DHLA-Phe QDs could be explained by such interactions: the hydrophobic character of the probe contributing to its accumulation and to its high density in some microdomains. The presence of water-filled channels could not be omitted but, as pointed out by Stewart, such structures could not drive molecules into dense bacterial clusters [36]. The strong interaction of the QDs with EPS was confirmed both by the confocal imaging (accumulation of a huge number of QDs is needed for fluorescence measurements) and FCS analysis which by default

showed no « motion » of the nanoparticles soon after their diffusion into the matrix. Rare observations by Wolfaardt *et al.* and our assays with Nile Red were consistent with the images of an uneven distribution of hydrophobic zones even within the intercellular space [24].

Which EPS of the *Shewanella* biofilm matrix are hydrophobic is not known. Indeed Vinogradov *et al.* have analyzed the composition of the lipopolysaccharides from *Shewanella oneidensis* but the intercellular space may also accumulate glycoproteins, nucleic acids, etc during biofilm aging, which may modify significantly the physical properties of the matrix [37]. More recently, Ras *et al.* showed the presence from weak to strong, of hydrophobic exopolymers, confirming indirectly the chemical diversity of hydrophobic EPS [38].

Conclusions

To sum up, whatever the rigidity or density of the EPS matrix of *Shewanella* biofilms, amphiphilic QDs are able to diffuse into the biofilm before their association to some extracellular polymers but not to the bacteria. Hydrophobic clusters which were labeled by QDs are inhomogeneously distributed in between the bacterial cells. Such hydrophobic material is not detected by QDs in planktonic bacterial suspensions and appears as a key component of cohesive biofilms.

References

- [1] R. C. Hunter, T. J. Beveridge, *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 7619-7630.
- [2] H. -C. Flemming, T. R. Neu, D. J. Wozniak, *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 7945-7947.
- [3] X. Jiao, G. D. Cody, A. K. Harding, P. Wilmes, M. Schrenk, K. E. Wheeler, J. F. Banfield, M. P. Thelen, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 2916-2922.
- [4] S. S. Branda, A. Vilks, L. Friedman, R. Kolter, *Trends Microbiol.* **2005**, *13*, 20-26.
- [5] J. Wingender, T. Neu, H. -C. Flemming, (eds) (1999). *Bacterial extracellular polymeric substances*. Springer Heidelberg, Berlin.
- [6] P. S. Stewart, M. J. Franklin, *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 199-210.
- [7] S. Vilain, J. M. Pretorius, J. Theron, V. S. Brözel, *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 2861-2868.
- [8] F. Jorand, F. Zartarian, F. Thomas, J. -C. Block, J.Y. Bottero, G. Villemin, V. Urbain, J. Manem, *Wat. Res.* **1995**, *29*, 1639-1647.

- [9] J. R. Lawrence, G. D.W. Swerhone, G. G. Leppard, T. Araki, X. Zhang, M. M. West, A. P. Hitchcock, *Appl. Envir. Microbiol.* **2003**, *69*, 5543-5554.
- [10] T. R. Neu, J. R. Lawrence, *Methods Enzymol.* **1999**, *310*, 145-152.
- [11] T. R. Neu, G. D.W. Swerhone, J. R. Lawrence, *Microbiology* **2007**, *147*, 299-313.
- [12] M. Wagner, N. P. Ivleva, C. Haisch, R. Niessner, H. Horn, *Water Res.* **2008**, *43*, 1-14.
- [13] N. P. Ivleva, M. Wagner, H. Horn, R. Niessner, C. Haisch, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 197-206.
- [14] T. R. Neu, K. C. Marshall, *J. Biomater. Appl.* **1990**, *5*, 107-133.
- [15] P. H. Nielsen, A. Jahn, (1999). In: Wingender, J., Neu, T. R., Flemming, H. -C. (Eds.), *Microbial extracellular polymeric substances*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 49-72.
- [16] P. Bossier, W. Verstraete, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *45*, 1-6.
- [17] J. H. Priester, S. G. Olson, S. M. Webb, M. P. Neu, L. E. Hersman, P. A. Holden, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 1988-1996.
- [18] F. Ahimou, M. J. Semmens, P. J. Novak, G. Haugstad, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 2897-2904.
- [19] R. Späth, H. -C. Flemming, S. Wuertz, *Water Sci. Technol.* **1998**, *37*, 207-210.
- [20] D. G. Allison, M. R. W. Brown, D. E. Evans, P. Gilbert, *FEMS Microbiol. Lett.* **1990**, *71*, 101-104.
- [21] H. J. Busscher, H. C. Van Der Mei, *Adv. Dent. Res.* **1997**, *11*, 24-32.
- [22] R. J. Palmer Jr, A. A. Arrage, H. C. van der Mei, D. C. White, *Biofouling* **1998**, *13*, 213-231.
- [23] X. -S. Zhang, , R. Garcia-Contreras, T. K. Wood, *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 3051-3062.
- [24] G. M. Wolfaardt, J. R. Lawrence, R. D. Robarts, D. E. Caldwell, *Microb Ecol.* **1998**, *35*, 213-223.
- [25] M. J. Murcia, D. L. Shaw, E. Long, C. A. Naumann, *Optics Communications* **2007**, *28*, 1771-1780.
- [26] E. Guiot, P. Georges, A. Brun, M. -P. Fontaine-Aupart, M. -N. Bellon-Fontaine, R. Briandet, *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 570-578.
- [27] P. Lacroix-Gueu, R. Briandet, S. Lecart, S. Lévêque-Fort, M.-N. Bellon-Fontaine, M.-P. Fontaine-Aupart, *C. R. Biologies.* **2005**, *328*, 1065-1072.

- [28] R. Briandet, P. Lacroix-Gueu, M. Renault, S. Lecart, T. Meylheuc, E. Bidnenko, K. Steenkests, M.-N. Bellon-Fontaine, M.-P. Fontaine-Aupart, *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 2135-2143.
- [29] F. Aldeek, L. Balan, G. Medjahdi, T. Roques-Carmes, J. -P. Malval, C. Mustin, J. Ghanbaja, R. Schneider, *J. Phys. Chem. C.* **2009**, *113*, 19458-19467.
- [30] J. B. Morrow, R. D. Holbrook, C. J. Zeissler, NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show - NSTI Nanotech **2006** Technical Proceedings, 1, 286-289.
- [31] N. I. Chalmers, R. J. Palmer, Jr, J. O. Cisar, P. E. Kolenbrander, *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 8145-8154.
- [32] M. G. Hahn, P. C. Keng, T. D. Krauss, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 864-872.
- [33] G. Miquelard-Garnier, C. Creton, D. Hourdet, *Macromol. Symp.* **2007**, *256*, 189-194.
- [34] A. Korenevsky, T. J. Beveridge, *Microbiology* **2007**, *153*, 1872-1883.
- [35] F. Gaboriaud, M. L. Gee, R. Strugnell, J. F. L. Duval, *Langmuir* **2008**, *24*, 10988-10995.
- [36] P. S. Stewart, *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 1485-1491.
- [37] E. Vinogradov, A. Korenevsky, T. J. Beveridge, *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 1991-1997.
- [38] M. Ras, N. Derlon, E. Paul, D. Lefebvre, E. Girbal-Neuhauser. **2008**, A hydrophobic EPS fingerprint investigation of biofilm diversity. 3rd International Conferences Biofilms III, Munich, G.

Supporting information

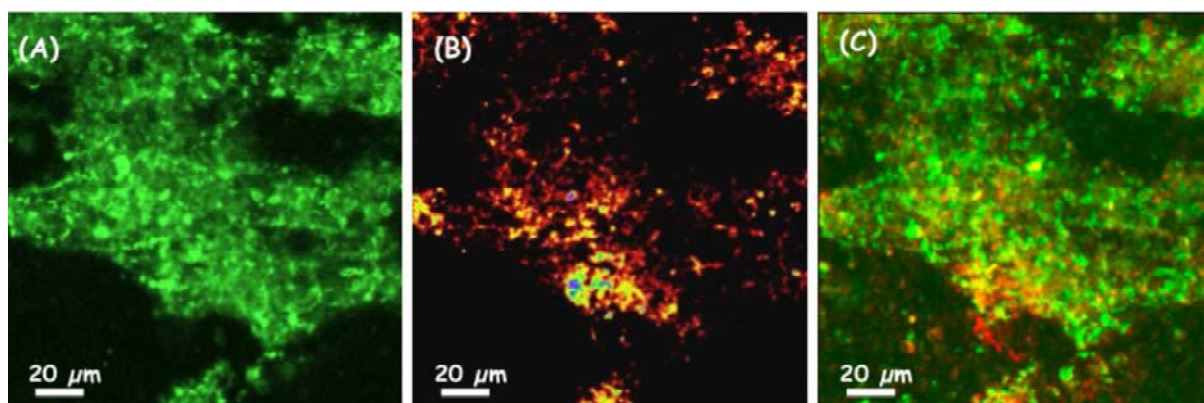


Figure S1: *Shewanella* biofilm stained with (a) hydrophilic CdSe(S)@MPA quantum dots, (b) Nile Red, and (c) overlap of the two images (a) and (b), $\lambda_{\text{ex}} = 405$ nm. Nile Red ($C = 2.3 \cdot 10^{-4}$ M) was used as a hydrophobic probe for staining hydrophobic zones in the biofilm according to Macedo *et al.*

V.4. Hydrophilic/hydrophobic balance of the intercellular space in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms under low and high di-oxygen flux.

Introduction

Shewanella biofilms have been explored for many years and especially their exopolymers (EPS) matrix. *Shewanella* has a highly developed and regulated network for controlling the biosynthesis of extracellular structures that, in turn, affect cell surface properties and facilitate cell interactions. Characterizations of these EPS show extracellular DNA, proteins, and glycoconjugates [1]. Convergent evidences suggest a permanent re-organization of this matrix as an adaptative response of the microbial community toward changing environment. Indeed, in response to external changes, bacteria may consume and/or produce a variety of organic exo-heteropolymers (EPS) with different physico-chemical properties, which may act as a defensive barrier against aggressive environmental parameters. In this project, we have selected di-oxygen (O₂) as an effective and representative environmental stressor. The central metabolism of *Shewanella oneidensis* appears to be robust to environmental changes [2]. However, we postulate that the oxidative stress caused by an elevated O₂ concentration would determine the production of even subtly different exo-polymers/molecules, which could cause a major re-organization of the matrix properties such as modifications of the hydrophilic/hydrophobic balance, redox status of the intercellular space, and architecture of the biofilm.

Such hypotheses are only partly documented through different studies:

- As an example EPS content in biofilm can differ in quantity and character as a result of environmental factors including oxygen [3].
- According to McLean *et al.*, highly aerobic conditions trigger formation of a multicellular morphotype (autoaggregation) and aggregation could be a way of detoxification against reactive oxygen species [1].
- Oxygen-limited biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* also exhibit a higher extracellular polymer-carbon/cell-carbon ratio throughout biofilm development [4].
- *Shewanella* cells grown under anaerobic conditions appear less electronegative and more hydrophilic than aerobic cells, which could be the mean to control cell adhesion or aggregation [5].
- High dissolved oxygen concentration was linked to polysaccharide production in a multispecies biofilm [6].

Similar observations were previously reported with microbial aggregates from activated sludge process [7-9].

In our work, we aimed to characterize such di-oxygen environmental driven changes in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilm. Biofilms were grown in flow cells continuously fed with appropriate medium with low dissolved di-oxygen (around 1 mg/L O₂) and high dissolved di-oxygen (around 6.5 mg/L O₂). We have definitively privileged the use of methods allowing non-invasive *in situ* observations of such variations of the matrix by using nanoprobe as opposed to more classical but invasive methods such as extraction of polymers. We probed *in situ* the *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms with fonctionnalized water soluble amphiphilic Quantum Dots (QDs). These QDs (CdSe(S) or CdSe/ZnS nanocrystals which were functionalized with ligands such as 3-mercaptopropionic acid (MPA), dihydrolipoic acid (DHLLA) coupled to phenylalanine (DHLLA-Phe) (chapter IV). Imaging biofilms was carried out with confocal laser scanning microscopy (CLSM). The images were treated geostatistically in order to give a quantitative analysis for characterizing the architecture of the biofilm. Quantitative information on the spatial continuity of the biofilm was obtained by semi-variogram calculation. As previously shown by Denis *et al.* and Zegeye *et al.*, informations given by variograms are powerful to point out spatial patterns included in experimental data points of images [10-11].

Results

Confocal images of biofilms grown under low or high di-oxygen concentrations and stained either with hydrophilic CdSe(S)@MPA, and amphiphilic CdSe/ZnS@DHHLA-Phe QDs are show in Figure 1.

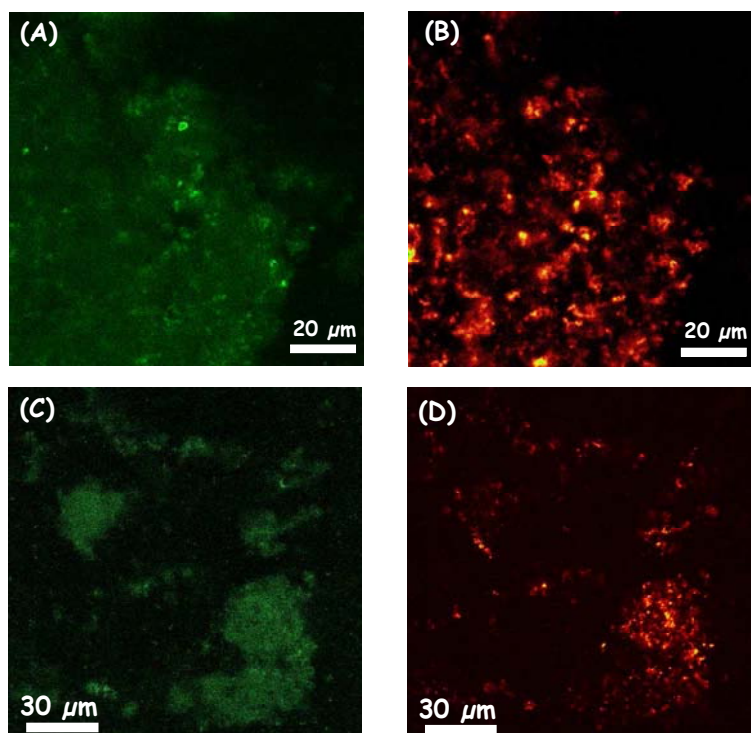


Figure 1. Confocal imaging of *Shewanella* biofilms at approximately 30 μm from the substratum after staining with 250 nM hydrophilic CdSe(S)@MPA (A and C), and amphiphilic CdSe/ZnS@DHHLA-Phe QDs (B and D). A and B are images of a biofilm grown under high O_2 concentration while C and D are images under low O_2 concentration. LML + fumarate medium was bubbled by a sterile gas mixture of $\text{O}_2 / \text{CO}_2 / \text{N}_2$ (20.9 % / 0.035 % / 79.065 %) for high O_2 conditions and by a gas mixture of CO_2 / N_2 (0.035 % / 99.965 %) for low O_2 conditions.

The apparent global staining of the biopolymers by the two QDs was similar to that observed during real time imaging experiments described previously in this chapter. An homogenous labelling for MPA-capped CdSe(S) QDs and clustering for CdSe/ZnS QDs capped by phenylalanine were observed.

We have tried to qualify the distribution of QDs fixed in high- or low- O_2 biofilm using semi-variograms (Figure 2).

- for biofilms grown under aerobic or anaerobic conditions and stained with CdSe(S)@MPA QDs, the $\gamma(h)$ values increased to up $h < 1.5 \mu\text{m}$ after which they levelled monotonically at $\gamma(h)_{max} = 150$ to 200. As the variance is different from zero at the origin, there is a nugget effect, which could be linked to unresolved structures with a size lower than the pixel resolution (*i.e.* $< 170 \mu\text{m}$).
- for biofilms grown under high- or low- O_2 conditions and stained with CdSe/ZnS@DHLA-Phe QDs, the $\gamma(h)$ values increased stepper to up $h = 2$ to $6 \mu\text{m}$. Beyond that point, the local relative variogram plateau also reveals a hole effect marked by irregular fluctuations of $\gamma(h)$ around 400 and 350 for high- or low- O_2 conditions, respectively. Regular clusters of QDs with an average size of ca. $4 \mu\text{m}$ and spatially separated by ca. $5 \mu\text{m}$ were determined for both variograms.

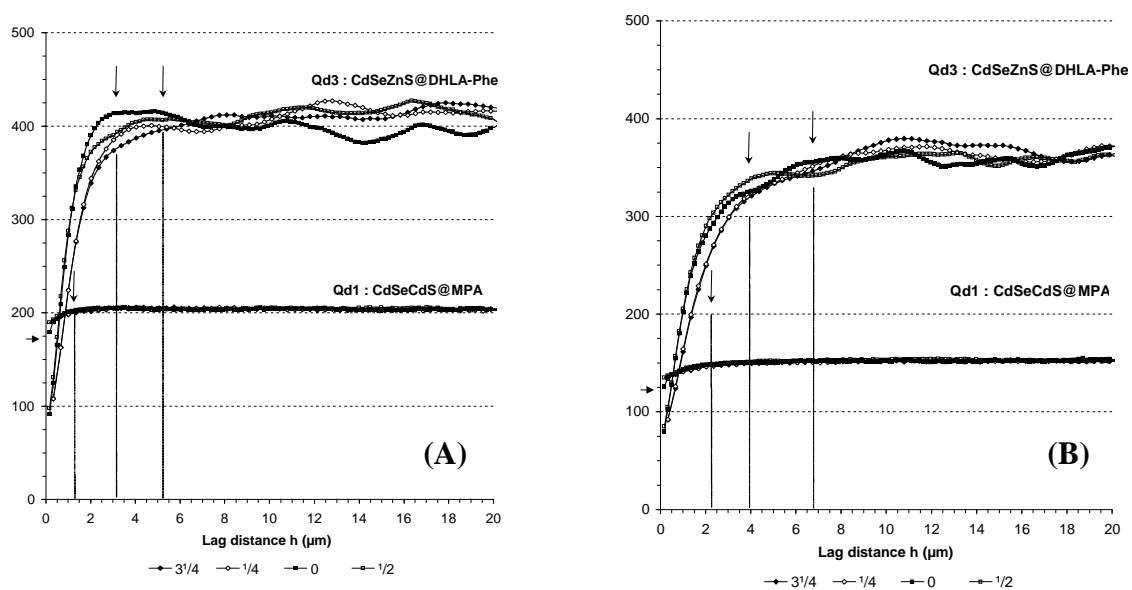


Figure 2. Statistical analysis of fluorescence images obtained for a QDs-stained biofilm in flow-cells under (A) high O_2 conditions, or (B) low O_2 conditions. Semi-variance ($\gamma(h)$) was calculated in four directions ($0, \pi/4, \pi/2, 3\pi/4$) as a function of the distance (h). The arrows indicate the positions of range and nugget variance.

Discussion

A few studies reported that high levels of oxygen promote the production of polysaccharides and the autoaggregation of bacterial biofilms leading to significant physiological and morphological changes [1,3,6].

In our study biofilm 3D-architecture in high- or low- O_2 conditions was clearly not the same as can be observed on confocal fluorescence microscopy images using QDs as fluorescent probes (Figure 1). As previously observed by McLean *et al.*, Ahimou *et al.*, Li *et al.* [1,6,12], aggregation of the biofilm matrix is far less pronounced under low oxygen conditions because cells do not need to develop a tight barrier for their protection against noxious agents (O_2 , reactive oxygen species, ...).

Our hypothesis is that, under an oxidative stress, the bacterial community embedded in the biofilm responds by re-organizing the intercellular space in order to protect the cells from O_2 and reactive oxygen species (ROS). We assume that the cells will change the properties of their EPS matrix, making them more hydrophobic, which could result in O_2 diffusion limitation.

In the chapter IV, we have demonstrated that amphiphilic CdSe/ZnS@DHPLA-Phe QDs strongly associate with biopolymers composing the biofilm grown under high O_2 conditions (6.5 mg O_2 /L) and that these nanoparticles were segregated in microdomains.

We assumed that under low O_2 conditions, both association and segregation within the biofilm should be less pronounced. However, auto-correlation function (semi-variogram) analysis of confocal microscopy images of biofilms prepared under aerobic and anaerobic conditions showed the presence of clusters of QDs (ca. 5 μm -sized) in both cases.

The concentrations of dissolved O_2 in our biofilms (6.5 and 1.0 mg/L for high O_2 and low O_2 conditions, respectively) are higher than those measured by McLean *et al.* (3.5 mg/L and no detected O_2 for aerobic and anaerobic conditions, respectively).

We assume that the preparation of biofilms in our low O_2 conditions was not sufficient to reduce significantly the oxidative stress caused by O_2 . It is also likely that the semi-variogram analyses have not the required sensitivity to detect the differentiation in QDs' clusterisation in biofilms grown under aerobic and anaerobic conditions.

References

- [1] J. S. Maclean, G. E. Pinchuk, O. V. Geydebrekht, C. L. Bilskis, B. A. Zakrajsek, E. A. Hill, D. A. Saffarini, M. F. Romine, Y. A. Gorby, J. K. Fredrickson, A. S. Beliaev, *Environ. Microbiol.* **2008**, *10*, 1861-1876.
- [2] H. Wong, K. Hollywood, R. M. Jarvis, J. R. Lloyd, R. Goodacre, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 6266-6276.
- [3] A. S. Bayer, F. Eftekhari, J. Tu, C. C. Nast, D. P. Speert, *Infect. Immun.* **1990**, *58*, 1344-1349.
- [4] D. H. Applegate, J. D. Bryers, *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *37*, 17-25.
- [5] A. Korenevsky, T. J. Beveridge, *Microbiology.* **2007**, *153*, 1872-1883.
- [6] F. Ahimou, M. J. Semmens, G. Haugstad, P. J. Novak, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 2905-2910.
- [7] P. Bossier, W. Verstraete, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *45*, 1-6.
- [8] F. Jorand, P. Guicherd, V. Urbain, J. Manem, J. -C. Block, *Water Sci. Technol.* **1994**, *30*, 211-218.
- [9] R. Palmgren, P. H. Nielsen, P. H., F. Jorand, J. -C. Block, *Water Sci. Tech.* **1998**, *37*, 349-352.
- [10] F. A. Denis, P. Hanarp, D. S. Sutherland, J. Gold, C. Mustin, P. G. Rouxhet, Y. F. Dufrêne, *Langmuir* **2002**, *18*, 819-828.
- [11] A. Zegeye, C. Mustin, F. Jorand, *Geobiology* **2010**, *8*, 209-222.
- [12] T. Li, R. Bai, J. Liu, *J. Biotechnol.* **2008**, *135*, 52-57.

Conclusion Générale et Perspectives

Conclusion Générale et Perspectives

Les biofilms rencontrés dans les environnements naturels ou industriels sont constitués d'une communauté de microorganismes emprisonnés dans une matrice de polymères organiques extracellulaires (EPS) et adhérente à une surface. Ces EPS sont généralement des hétéropolymères comme des glycoprotéines, des lipopolysaccharides, ou des acides nucléiques et constituent un milieu très hydraté, plus ou moins poreux, dont la cohésion est assurée par des microdomaines hydrophobes ou/et des cations divalents.

Malgré le rôle crucial joué par ces microdomaines hydrophobes sur l'organisation tridimensionnelle de l'EPS et donc des biofilms, peu de travaux ont porté sur leur localisation.

L'objectif principal de cette thèse était de synthétiser des nanoparticules fluorescentes appelées Quantum Dots (QDs) à caractère amphiphile capables de marquer les microdomaines hydrophobes de l'EPS.

Nous avons, tout d'abord, étudié la synthèse de QDs amphiphiles par voie hydrothermale. Des QDs à cœur CdSe ou CdTe stabilisés par des thioacides à caractère hydrophile tel que l'acide 3-mercaptopropionique (MPA) ou amphiphile tels que l'acide 6-mercaptophexanoïque (MHA) ou l'acide 11-mercaptoundécanoïque (MUA) ont été préparés pour la première fois via ce procédé de synthèse. Nous avons notamment démontré que la longueur de la chaîne alkyle jouait un rôle crucial sur la croissance ainsi que sur les propriétés photophysiques des QDs préparés. L'émission de fluorescence est large et les rendements quantiques modestes pour les QDs CdSe et CdTe stabilisés par les ligands MHA ou MUA si on compare ces QDs aux nanocristaux avec ligands tels que le MPA.

Des tentatives d'amélioration des propriétés optiques des QDs stabilisés par des ligands amphiphiles ont conduit au développement de nanocristaux de type cœur/coquille/coquille CdTe/CdS/ZnO et cœur/coquille CdSe(S)/ZnO. Ces travaux constituent les premières synthèses en milieu aqueux de QDs passivés par une coquille ZnO. Les nouvelles hétérostructures CdTe/CdS/ZnO et CdSe(S)/ZnO répondent aux critères recherchés pour leur utilisation en imagerie de fluorescence (bons rendements quantiques de fluorescence, spectres d'émission fins, ...) et possèdent une photostabilité très supérieure aux matériaux CdSe et

CdTe de cœur. Parmi les trois ligands évalués (MPA, MHA et MUA), l'introduction de la coquille ZnO est limitée aux QDs stabilisés par le ligand MPA.

Notons finalement que tous les QDs hydrophiles CdSe(S)@MPA ou CdSe(S)/ZnO@MPA ont été utilisés avec succès pour l'imagerie de fluorescence de biofilms de la bactérie *Shewanella oneidensis*. Ces nanocristaux marquent de manière relativement homogène le biofilm.

Afin de disposer de nanocristaux avec un gradient d'amphiphilie, nous avons préparé des QDs par voie organométallique et réalisé un échange de ligand avec l'acide dihydrolipique (DHLA) couplé aux acides aminés Leu et Phe. Cette stratégie nous a donné accès à 4 QDs cœur/coquille CdSe/ZnS émettant soit dans le vert soit dans le rouge et stabilisés par les ligands DHLA-Leu ou DHLA-Phe. Les dispersions aqueuses de ces QDs présentent une tension de surface plus faible ainsi qu'une affinité plus grande pour les surfaces hydrophobes comparativement aux QDs hydrophiles CdSe(S)@MPA, preuve de l'amphiphilie plus marquée des QDs CdSe/ZnS@DHLA-Leu et CdSe/ZnS@DHLA-Phe. Les propriétés amphiphiles sont plus marquées pour les QDs émettant dans le rouge, de diamètre supérieur aux QDs émettant dans le vert et sont sans doute dépendante du nombre et de la densité de ligands à la surface des nanoparticules.

Quel que soit le ligand de surface, les QDs sont associés aux biopolymères et ne marquent pas les cellules bactériennes du biofilm. Les QDs amphiphiles CdSe/ZnS@DHLA-Leu et CdSe/ZnS@DHLA-Phe ont cependant un comportement très différent des QDs hydrophiles CdSe(S)@MPA lorsqu'ils sont injectés dans le biofilm. La formation de clusters de 5-10 μm associés à des microdomaines du biofilm que nous supposons hydrophobes a été observée pour les QDs CdSe/ZnS@DHLA-Leu et CdSe/ZnS@DHLA-Phe. Cette organisation en clusters n'a pas été détectée pour les QDs hydrophiles CdSe(S)@MPA ce qui renforce l'idée que la distribution des nanoparticules dans le biofilm est fonction de la structure du ligand.

L'ensemble de ces travaux a montré que les quantum dots constituaient des sondes de choix pour l'exploration par microscopie de fluorescence de milieux biologiques hétérogènes et complexes tels que les biofilms. Par un choix judicieux des ligands de surface et du diamètre de la nanoparticule, nous avons préparé des nanocristaux avec un gradient d'amphiphilie capables de marquer soit l'intégralité du biofilm, soit des microdomaines hydrophobes.

Nous souhaitons valoriser ces QDs dans des expériences d'imagerie en dynamique permettant de comprendre la réorganisation des EPS du biofilm lors d'un stress oxydant généré par le dioxygène. Nous espérons, par la suite, étendre l'utilisation de ces sondes à d'autres matrices biologiques procaryotes et eucaryotes susceptibles de développer des microdomaines hydrophobes pour se protéger des espèces réactives de l'oxygène.

La mise au point de sondes fluorescentes avec un gradient d'amphiphilie pour l'exploration de tissus *in vivo* nécessitera cependant l'emploi de QDs peu ou pas toxiques, paramètre dont nous n'avons pas tenu compte au cours de cette thèse. L'élimination du cadmium, élément de classe A, de la composition des nanocristaux est incontournable. De nombreux travaux ont montré que les QDs à base de zinc (ZnO, ZnS et ZnSe, éventuellement dopés par des métaux comme le manganèse ou le cuivre) constituaient une alternative aux QDs à base de cadmium en raison de leur faible cytotoxicité et de leurs propriétés optiques compétitives par rapport aux chalcogénures de cadmium. Nous espérons pouvoir fonctionnaliser des QDs ZnS et ZnSe préparés par voie organométallique par les ligands DHLA-Leu et DHLA-Phe. L'ancrage de modules amphiphiles à la périphérie de nanocristaux de ZnO nécessitera la mise au point de nouveaux ligands comportant un motif siloxane.

Déterminer et comprendre la nature des interactions entre les différents QDs que nous avons développés et les polymères du biofilm constitue également un prolongement naturel de nos travaux. Pour atteindre cet objectif, des études seront menées à la fois sur des biopolymères modèles de synthèse ou naturels tels que des lipopolysaccharides et des glycoprotéines ainsi que sur des matrices EPS extraites de biofilms.

Comme montré dans la dernière partie de ce mémoire, les EPS peuvent également constituer des matrices susceptibles de piéger des nanomatériaux toxiques tels que les QDs s'il advenait que ces derniers soit libérés accidentellement dans l'environnement. Nos premières études ont démontré que le cœur de la nanoparticule (inorganique *vs* organique) est un paramètre clé de l'accumulation de nanoparticules dans les EPS. Des travaux complémentaires avec des QDs de différentes compositions et substitués par des ligands anioniques, cationiques ou neutres restent cependant nécessaires afin de comprendre l'influence de ces différents paramètres sur l'association de nanoparticules et leur piégeage par les biofilms.

Synthèse et fonctionnalisation de nanocristaux fluorescents (Quantum Dots) pour l'imagerie et la caractérisation des propriétés hydrophobes/hydrophiles de biofilms bactériens

Résumé :

Les biofilms sont des communautés de microorganismes emprisonnés dans une matrice de polymères organiques extracellulaires (EPS) permettant de stabiliser ces édifices tridimensionnels. La cohésion des EPS polyanioniques dans un environnement hydraté est assurée par des microdomaines hydrophobes. La localisation de ces sites hydrophobes est très importante pour comprendre la variabilité ainsi que la réactivité des EPS. Notre travail vise la synthèse de nouvelles sondes fluorescentes hydrophiles ou amphiphiles capables de marquer les EPS. Dans ce but, nous avons synthétisé une série de nanocristaux fluorescents à coeur CdSe, appelés Quantum Dots (QDs), modifiés à leur périphérie par des ligands hydrophiles (acide 3-mercaptopropionique) ou amphiphiles (acide dihydrolipoïque couplé à des acides aminés hydrophobes tels que la Leucine ou la Phénylalanine).

Par microscopie confocale de fluorescence et spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS), nous avons montré que les QDs fonctionnalisés s'associaient fortement aux EPS des biofilms de la bactérie *S. oneidensis*. La distribution de ces nanoparticules dans les EPS est dépendante de la structure du ligand et de sa densité à la périphérie des QDs. Une dispersion homogène des QDs hydrophiles dans l'ensemble du biofilm et une clusterisation des QDs amphiphiles dans des microdomaines hydrophobes ont notamment été observés. Les nouvelles sondes fluorescentes développées dans ce travail permettront de suivre le développement ainsi que la réorganisation de matrices biologiques complexes telles que les biofilms.

Mots clés: Biofilm, EPS, Quantum Dots, Fonctionnalisation de Surface, Hydrophile, Amphiphile, FCS, Imagerie de Fluorescence.

Synthesis and functionalization of fluorescent nanocrystals (Quantum Dots) for imaging and characterization of hydrophobic properties / hydrophilic bacterial biofilms

Abstract:

Microorganisms predominantly live in communities, such as biofilms, in which extracellular polymeric substances (EPS) form the matrix and stabilize the three-dimensional structure. Hydrophobic microdomains allow the cohesiveness of these hydrophilic, polyanionic systems. The localization of these hydrophobic sites is very important to understand the variability and the reactivity of the EPS. The objective of our work was to engineer new fluorescent probes with amphiphilic or hydrophilic properties able to label the EPS. For that purpose, we have synthesized a series of fluorescent CdSe-core nanocrystals, also called Quantum Dots (QDs), modified at their periphery with hydrophilic (3-mercaptopropionic acid) or amphiphilic ligands (dihydrolipoic acid coupled to hydrophobic aminoacids like Leucine or Phenylalanine).

Using confocal fluorescence microscopy and fluorescence correlation spectroscopy (FCS), we demonstrated that the functionalized QDs strongly associated with the EPS of *S. oneidensis* biofilms and allow imaging of these microbial communities. The location of these probes within the EPS was dependent on the surface ligand structure and on its density at the periphery of QDs. A homogeneous dispersion of hydrophilic QDs in the whole biofilm was observed, while amphiphilic QDs clustered in the small hydrophobic domains. These new fluorescent probes will be of great use to understand the development and the reorganization of complex biological matrix like biofilms.

Keywords: Biofilm, EPS, Quantum Dots, Surface Functionalization, Hydrophilic, Amphiphilic, FCS, Fluorescence Imaging.