



HAL
open science

Synthèse et modification chimique de la surface de nanoparticules de maghémite à des fins d'applications biomédicales

Stéphane Mornet

► **To cite this version:**

Stéphane Mornet. Synthèse et modification chimique de la surface de nanoparticules de maghémite à des fins d'applications biomédicales. Matériaux. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2002. Français. NNT: . tel-00128139

HAL Id: tel-00128139

<https://theses.hal.science/tel-00128139>

Submitted on 30 Jan 2007

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.

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE BORDEAUX I

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par **Stéphane MORNET**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : **PHYSICO-CHIMIE DE LA MATIERE CONDENSEE**

**Titre : Synthèse et modification chimique de la surface de nanoparticules
de maghémite à des fins d'applications biomédicales.**

Soutenue le 12 juillet 2002

Après avis de : **Mme V. CABUIL**, Professeur
Mme C. DUBERNET, Maître de conférences

Rapporteurs

Devant la commission d'examen formée de :

MM. J. ETOURNEAU, Professeur
J. LIVAGE, Professeur
J.-M. CAILLE, Professeur
J. PORTIER, Directeur de recherche
E. DUGUET, Maître de conférences

Président
Examineurs

A mes Parents,

A Sandra.

Je souhaite adresser mes plus sincères remerciements à :

- Monsieur le Professeur Jean Etourneau pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse et de m'avoir accueilli à l'Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux.

- Madame la Professeur Valérie Cabuil et madame Catherine Dubernet. Je tiens à leur exprimer toute ma gratitude d'avoir accepté la charge d'être rapporteur et d'avoir pris du temps pour examiner ce travail. Les discussions et leurs suggestions perspicaces ont été très constructives pour finaliser ce manuscrit.

- Monsieur le Professeur Jacques Livage à qui je prie de trouver ici le témoignage de ma respectueuse considération. Ses connaissances scientifiques et sa notoriété dans ce domaine des nanomatériaux pour la biologie sont pour moi une reconnaissance de cette étude.

- Monsieur le Professeur Jean-Marie Caillé, pour l'intérêt que vous avez montré envers cette étude et pour l'honneur que vous me faites en acceptant de participer à ce jury.

Je veux également remercier Josik Portier qui m'a accueilli dans son groupe « Matériaux hybrides » à l'ICMCB. Je voudrais lui témoigner ma reconnaissance pour m'avoir fait profiter de toute son expérience en recherche, de sa disponibilité et de son enthousiasme.

Je suis particulièrement redevable à Etienne Duguet qui a codirigé ma thèse. J'ai beaucoup appris à son contact en me montrant les potentialités de la science des matériaux, en particulier les matériaux hybrides, dans le domaine biomédical. J'ai apprécié aussi sa façon de travailler en me laissant une grande liberté de manœuvre mais en s'appuyant toujours sur des orientations et des analyses scientifiques rigoureuses. Les échanges permanents que nous avons eus ont soutenu ce travail et sont pour beaucoup dans sa réussite. Enfin, Je lui suis également très reconnaissant pour son aide lors de la rédaction de mon manuscrit.

Ma reconnaissance va également à Mona Treguer, Marie-Hélène Delville et Guy Campet pour les discussions scientifiques mais également pour leur convivialité au sein du groupe. Merci aussi à tous ceux qui à l'ICMCB ont consacré de leur temps à m'aider et à me conseiller. Je remercie notamment Stéphane Toulon pour l'aide précieuse qu'il m'a consacré lors de mes recherches bibliographiques, Olivier Nguyen, Christine Labrugère, Dominique Denux, Eric Lebraud, Francois Guillen, Leo Fournès, Alain Wattiaux pour les nombreuses caractérisations des produits.

Du fait du caractère pluridisciplinaire de ce travail, à l'interface entre la chimie et la biologie, j'ai été mené à interagir avec différents laboratoires de biologie de l'université Bordeaux 2 : le laboratoire de Résonance Magnétiques des Systèmes Biologiques, le Centre anticancéreux de Bergonié et le laboratoire de neurologie des affections de la myéline. Je souhaite adresser mes plus sincères remerciements à Antoine Vekris, Jacques Bonnet, Jean-Michel Franconi, Gisèle Clofent Sanchez, Pierre Voisin, Klaus Petry, Vincent Dousset et Alain Brisson pour les discussions et échanges permanents qui m'ont permis de plonger au cœur des problématiques relatives à l'utilisation des nanoparticules en biologie, et aidé à développer ce sujet.

Et c'est plein d'émotion que j'adresse aussi mes sincères remerciements à « l'hybrid team » pour l'atmosphère d'humour et de solidarité dans le travail qui a caractérisé l'équipe que formaient les "thésards" et stagiaires du laboratoire. Cela restera incontestablement un des souvenirs marquants de ces années de thèse. Je voudrais assurer de mon amitié Fabrice et Fabien, avec qui j'ai partagé mon bureau mais aussi Fabienne, Virginie, Cathy, Maher, Olive, Toulou, Mona, Nico, Stan et Lydia.

Merci à Sandra, mes parents, mes frères et mes amis pour leur soutien constant et leurs encouragements.

Je remercie également Alain Rousset, président du conseil régional d'Aquitaine, pour avoir accordé les subventions permettant le financement de cette thèse.

TABLE DES MATIERES

Introduction	1
CHAPITRE I	
LE CONTEXTE BIOMEDICAL ET LA STRATEGIE DE	
L'ETUDE	5
1. Les vecteurs et les stratégies de la vectorisation	5
1.1 Le concept de vectorisation	5
1.2 Les vecteurs particuliers	10
1.3 Les stratégies thérapeutiques mettant en œuvre des vecteurs magnétiques	14
2. L'IRM et les agents de contraste	17
2.1 Principe de l'Imagerie par Résonance Magnétique	17
2.1.1 Le contraste naturel	18
2.1.2 Pondération des temps de relaxation	19
2.2 Les produits de contraste en IRM	20
2.2.1 Effets des agents de contraste sur les vitesses de relaxation	20
2.2.2 Les agents de contraste paramagnétiques	22
<i>a. Le paramagnétisme</i>	22
<i>b. Les produits paramagnétiques utilisés en IRM</i>	24
2.2.3 Les agents de contraste superparamagnétiques	26
<i>a. Le superparamagnétisme</i>	26
<i>b. Description des processus de relaxation</i>	26
<i>c. Les produits superparamagnétiques utilisés en IRM</i>	28
3. Le devenir des vecteurs <i>in vivo</i>	32
3.1 Le système des phagocytes mononucléés (SPM)	32
3.2 Facteurs influençant la biodistribution des vecteurs	33
3.2.1 Influence de la taille du vecteur	33
3.2.2 Influence de la surface du vecteur	35
3.2.3 Influence de la concentration en particules	38
3.3 Distribution spécifique vers des organes ou des tissus	38
3.3.1 Ciblage par couplage de molécules effectrices ou d'anticorps	38
3.3.2 Marquage de cellules circulantes par des agents de contraste	40
3.4 Biocompatibilité des vecteurs	41
4. Problématiques de l'étude	42

4.1 Synthèse de vecteurs magnétiques à rémanence vasculaire aptes à transporter des substances bioactives	42
4.2 Vectorisation dans le cerveau de cellules macrophagiques chargées de nanoparticules magnétiques et fluorescentes en vue d'un double marquage IRM et histologique	44
4.3 Cahier des charges des vecteurs synthétisés dans le cadre de cette étude	46
4.4 Démarche adoptée	47
Références	50
CHAPITRE II	
SYNTHESE ET MODIFICATION DE LA SURFACE DE NANOPARTICULES DE MAGHEMITE	56
1. Synthèse et caractérisation des ferrofluides ioniques de maghémite	56
1.1 Généralités	56
1.2 Synthèse du ferrofluide ionique de base	59
1.3 Caractérisation des nanoparticules de maghémite	61
1.3.1 Détermination de la distribution en taille	61
<i>a. Microscopie électronique à transmission</i>	<i>62</i>
<i>b. Spectroscopie de corrélation de photons</i>	<i>64</i>
1.3.2 Caractérisation structurale par diffraction des rayons X	68
1.3.3 Comportement thermique	69
1.3.4 Dosage du Fer dans les ferrofluides	70
<i>a. Dosage analytique</i>	<i>70</i>
<i>b. Dosage spectrophotométrique</i>	<i>71</i>
1.3.5 Propriétés magnétiques	72
1.4 Stabilité des ferrofluides ioniques de maghémite	73
1.4.1 Description de la surface des nanoparticules	73
<i>a. Analyse thermogravimétrique</i>	<i>74</i>
<i>b. Spectrométrie de masse</i>	<i>76</i>
<i>c. Spectroscopie infrarouge par réflexion diffuse</i>	<i>77</i>
1.4.2 Comportement des sols ioniques de maghémite	79
<i>a. Origine des charges de surface</i>	<i>79</i>
<i>b. Modélisation de l'interface nanoparticule-solution</i>	<i>81</i>
<i>c. Stabilisation électrostatique</i>	<i>83</i>
<i>d. Détermination du potentiel zêta</i>	<i>86</i>
<i>e. Stabilité des sols ioniques de maghémite</i>	<i>88</i>
1.5 Conclusion	91
2. Modification de la surface des nanoparticules de maghémite par des agents de couplage silaniques aminés	94
2.1 Généralités	94
2.1.1 Réactions mises en jeu	95
<i>a. Hydrolyse</i>	<i>96</i>
<i>b. Condensation</i>	<i>96</i>

2.1.2	Choix de l'agent de couplage	97
2.1.3	Propriétés de l'APS en solution aqueuse	97
2.1.4	Interactions de l'APS en solution aqueuse avec la surface d'oxydes métalliques	98
2.2	Silanisation directe : essais préliminaires	100
2.2.1	Couplage du γ -aminopropyltriméthoxysilane à la surface de la maghémite	100
	<i>a. Couplage dans le toluène anhydre</i>	100
	<i>b. Couplage en milieu aqueux</i>	101
2.2.2	Mise en évidence de la modification de la surface par spectroscopie IR (DRIFT)	101
	<i>a. Spectre IR en transmission de l'APS pur</i>	101
	<i>b. Spectres DRIFT de la maghémite modifiées EF11, avant et après traitement acide</i>	103
2.2.3	Comportement du sol de maghémite modifiée	105
	<i>a. Détermination du PIE de la maghémite modifiée par l'APS (EF11)</i>	105
	<i>b. Détermination de la concentration limite de floculation en ion chlorures de la maghémite modifiée par l'APS (EF11)</i>	108
2.2.4	Conclusions	109
2.3	Optimisation du greffage par traitement thermique modéré sous vide	110
2.3.1	Mode opératoire	110
2.3.2	Evaluation de la densité surfacique de recouvrement de la maghémite	111
	<i>a. Analyse par spectrométrie de masse des gaz issus de la décomposition thermique de la maghémite modifiée par l'APS</i>	111
	<i>b. Analyse thermogravimétrique et analyse thermique différentielle</i>	113
	<i>c. Influence de la concentration en APS sur la densité de recouvrement</i>	115
	<i>d. Influence de la longueur du greffon sur la densité de recouvrement</i>	117
2.3.3	Détermination de la taille des nanoparticules modifiées	119
	<i>a. Microscopie électronique à transmission</i>	119
	<i>b. Spectroscopie de corrélation de photons</i>	119
2.3.4	Etude du comportement des sols colloïdaux fonctionnalisés	121
	<i>a. Effet du traitement thermique</i>	121
	<i>b. Influence de la concentration en γAPS sur le PCN et la zone de floculation</i>	123
	<i>c. Détermination des PIE des maghémites modifiées EDPS et DTSP</i>	124
	<i>d. Effet de la modification de surface sur la concentration limite de floculation en NaCl (en ion Cl⁻)</i>	126
2.3.5	Etude des dépôts de silanes par spectroscopie IR en réflexion diffuse	128
	<i>a. Effet du traitement thermique sur le dépôt de silane</i>	128
	<i>b. Influence du temps de déshydratation sous vide</i>	131
	<i>c. Influence du pH de la solution sur la stabilité chimique du dépôt</i>	132
2.3.6	Etude de spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X (XPS) de l'interface oxyde de fer-silane	134
	<i>a. Analyse des témoins</i>	135
	<i>b. Analyse des échantillons de maghémite modifiées APS, EDPS et DTSP</i>	137
	<i>c. Conclusion</i>	142
2.3.7	Etude par spectroscopie Mössbauer des nanoparticules modifiées par l'APS	144
	<i>a. Partie expérimentale</i>	144
	<i>b. Analyse à 4,2 K</i>	144
	<i>c. Analyse à 293 K</i>	148
	<i>d. Discussions</i>	150
2.4	Conclusions	151

3. Encapsulation des nanoparticules de maghémite dans une coque de silice par microémulsion inverse	153
3.1 Généralités	153
3.1.1 Introduction	153
3.1.2 Définition des microémulsions	155
3.1.3 Paramètres principaux des microémulsions inverse influençant la taille des nanoparticules	156
3.2 Synthèse des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$	157
3.2.1 Détermination des conditions opératoires	157
a. <i>Choix du système E/H/TA</i>	157
b. <i>Détermination des conditions de synthèse des nanoparticules core-shell</i>	158
c. <i>Mode opératoire</i>	160
3.2.2 Influence du pH sur la morphologie des nanoparticules	161
3.2.3 Synthèse des nanobulles de silice	162
3.3 Propriétés physicochimiques des nanoparticules	163
3.3.1 Propriétés des sols de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$	163
3.3.2 Comportement thermique	164
3.3.3 Propriétés magnétiques des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$	165
3.4 Conclusion	167
Références	168

CHAPITRE III

GREFFAGE DES MACROMOLECULES DE DEXTRAN ET HABILLAGE DES VECTEURS

1. Stabilisation des nanoparticules fonctionnalisées en milieu physiologique par greffage de dextran	171
1.1 Principe de la stabilisation stérique	171
1.2 Greffage du dextran sur les nanoparticules de maghémite aminées	173
1.2.1 Voie réactionnelle retenue	173
1.2.2 Activation du dextran	175
1.2.3 Greffage du dextran sur les nanoparticules de maghémite aminée	175
1.3 Influence de la masse molaire \overline{M}_w du dextran sur la taille des particules et le comportement des sols	177
1.4 Mise en évidence du greffage par spectroscopie DRIFT	179
1.5 Comportement du sol de nanoparticules couplées au dextran en fonction du pH et de la force ionique du milieu	180
2. « Habillage » des vecteurs par un poly(oxyde d'éthylène) fonctionnalisé et marquage par des fluorochromes	181
2.1 Greffage de la Jeffamine [®] ED2003 à la surface des nanoparticules de maghémite-APS-dextran	182

2.1.1 Greffage de la Jeffamine®	182
2.1.2 Détermination de la taille des nanoparticules couplées à la Jeffamine®	183
2.2 Marquage des nanoparticules aux fluorochromes	184
2.2.1 Greffage de fluorochromes	184
2.2.2 Détermination de la taille des nanoparticules marquées aux fluorochromes	186
3. Internalisation des nanoparticules magnétiques fluorescentes sur des lignées cellulaires macrophagiques (HEMC5)	188
3.1 Tests de cytotoxicité	188
3.2 Microscopie optique à épifluorescence	188
3.3 IRM des microglies marquées par les nanoparticules magnétiques fluorescentes.....	190
4. Conclusions	191
Références	192
CONCLUSION GENERALE	193
Annexe 1 Le phénomène physique de la RMN	196
Annexe 2 Le superparamagnétisme.....	201
Annexe 3 Tableau de filiation des ferrofluides synthétisés.....	204
Liste des tableaux et figures	205

INTRODUCTION

En raison des propriétés spécifiquement liées à leur taille, à leur rapport surface/volume élevé et à leur grande réactivité, les nanoparticules intéressent de nombreux domaines industriels tels que la catalyse¹, les céramiques et matériaux composites, la cosmétique et l'industrie agroalimentaire. D'autres phénomènes comme le confinement quantique confèrent à certains nanomatériaux des propriétés optiques et électroniques particulières². Par ailleurs, la diminution de la taille des particules ferromagnétiques ou ferrimagnétiques modifie considérablement les propriétés magnétiques par rapport au matériau massif du fait de l'augmentation relative du nombre d'atomes de surface qui contribuent au retournement du moment magnétique par activation thermique³. Ainsi, initialement utilisés pour le stockage d'informations, les ferrites d'oxydes de fer ont connu de nouvelles applications sous la forme de dispersions colloïdales magnétiques appelées ferrofluides : de la peinture anti-radar à l'imprimante à encre magnétique, on les retrouve aussi dans les bobines de haut-parleurs, des amortisseurs de vibrations ou dans des joints étanches sustentés magnétiquement⁴.

Depuis ces quinze dernières années, les nanoparticules magnétiques connaissent aussi un fort développement dans le domaine biomédical. En effet, l'association de composés de différentes natures comme l'incorporation de nanoparticules magnétiques dans des particules de latex fonctionnalisées, couplées avec des molécules biologiques comme des anticorps, des oligonucléotides ou des enzymes permet de conférer des propriétés mixtes déjà largement mises à profit dans les systèmes de purification d'ADN, de protéines⁵, de cellules ou encore dans les immunoessais magnétiques⁶.

Les dispersions colloïdales magnétiques sont aussi utilisées comme agents de contraste en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). Bien que cette technique d'imagerie médicale ne présente pas de réelle spécificité d'organe, on a recourt à ce type de marqueur pour améliorer la distinction entre une lésion et des tissus sains. Ces produits de contraste injectés par voie intraveineuse sont rapidement captés par le système des phagocytes mononucléés (SPM) ce qui permet de révéler les pathologies du foie et de la rate⁷. Un certain

nombre de travaux ont porté sur la modification de surface de ces agents de contraste à tropisme hépatique dans le but de les cibler vers d'autres organes⁸⁻¹².

Cette étude s'inscrit dans le cadre du groupement d'intérêt scientifique «Vectorisation *in vivo*» (GIS *vivo*) rassemblant le Groupe Matériaux Hybrides de l'Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux de l'université Bordeaux 1, le Groupe de Pharmacologie des Médicaments Anticancéreux de l'Institut Bergonié, le centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques et le Laboratoire de Neurobiologie des Affections de la Myéline de l'université Bordeaux 2.

La création de cette interface entre chimistes et physico-chimistes des matériaux, physiciens du signal IRM, biologistes (immunologistes, biochimistes, pharmacologues, neurobiologistes) et médecins (radiologues, neurologues) a pour objectif le développement de vecteurs magnétiques dont les caractéristiques peuvent varier selon le type d'application ou de stratégie thérapeutique envisagée.

Les matériaux nanocomposites réalisés dans le cadre de cette étude sont conçus pour être testés selon deux approches différentes :

- une approche diagnostique, dans le cadre d'une imagerie cellulaire, par phagocytose de nanoparticules magnétiques,
- une approche thérapeutique dans laquelle les vecteurs sont destinés à l'administration médicamenteuse par voie intraveineuse.

Dans les deux cas la structure de base du vecteur magnétique est identique. Seule les dernières étapes de greffage confèrent la fonctionnalité à l'ensemble. Cette structure commune est composée de trois éléments :

- une partie "active" qui peut être un fluorochrome pour l'imagerie histologique, des molécules cytotoxiques pour le traitement des cancers ou des viroses, des molécules d'acides nucléiques pour le transfert de gènes, des oligonucléotides pour la modulation de l'expression des gènes,
- un "véhicule" (nanoparticules magnétiques) qui a pour rôle de porter le principe actif, d'en limiter l'activité en dehors de la cible dans le cas d'une molécule bio-active, de servir d'agent de contraste en IRM ou d'agent nécrosant des cellules par hyperthermie,
- un agent de ciblage qui permet la fixation de l'ensemble de façon spécifique sur les cibles (cellules tumorales, virus...)

La réalisation de ces vecteurs nécessite le contrôle de chaque étape de synthèse. Les nanoparticules de magnétite, utilisées comme agents de contraste en IRM, sont généralement stabilisées par des macromolécules hydrophiles et biocompatibles, adsorbées à la surface par des liaisons hydrogène. Elles sont généralement synthétisées, selon la méthode mise au point par Molday et Mackenzie¹³, en coprécipitant les précurseurs en présence de macromolécules de dextran. Cependant, le sol de magnétite obtenu par cette voie n'est pas adapté aux procédés de modification chimique et de greffage, et les macromolécules ont tendance à se désorber de la surface de l'oxyde de fer. De plus, cette méthode ne permet pas réellement de contrôler tous les paramètres de synthèse.

Les objectifs de notre étude étaient les suivants :

1) améliorer la stabilité de l'édifice constitué de nanoparticules magnétiques et de dextran ; nous avons ainsi opté pour l'établissement de liaisons covalentes entre les composantes ce qui a nécessité de multiplier les étapes d'élaboration avec successivement la synthèse des nanoparticules, leur modification chimique de surface et enfin le greffage en surface des macromolécules de dextran préalablement activées,

2) limiter la taille des vecteurs à une cinquantaine de nanomètres pour leur permettre de franchir le maximum de membranes biologiques et par conséquent d'atteindre théoriquement le maximum d'organes ; en conséquence toute réaction chimique (ou autre étape du procédé) entraînant la floculation irréversible des nanoparticules est à proscrire. Ainsi toute la subtilité de la méthode retenue consiste à maintenir l'état de dispersion maximal du système, par le biais de répulsions électrostatiques en début de synthèse, puis de gérer leur conversion, en répulsions stériques via le greffage des macromolécules de dextran,

3) augmenter la demi-vie plasmatique des vecteurs (durée de circulation dans le sang) en les rendant «furtifs» vis-à-vis du SPM ; nous nous sommes ainsi intéressés au greffage d'une couche macromoléculaire supplémentaire constituée de chaînes de poly(oxyde d'éthylène) POE, de structure équivalente au poly(éthylène glycol) PEG, dont l'efficacité dans ce domaine n'est plus à démontrer,

4) prévoir à la surface extrême des vecteurs la présence de groupes organiques fonctionnels en nombre et en variété suffisants pour permettre le greffage ultérieur des molécules d'intérêt biologiques (peptides, médicaments, fluorochromes, ...).

Ce mémoire est divisé en trois chapitres :

- le premier présente le contexte biomédical et la stratégie de l'étude. La problématique et l'originalité de la démarche de recherche proposée seront notamment replacées dans le contexte d'une revue générale sur les vecteurs et les agents de contraste utilisés en IRM ;
- le deuxième chapitre, le plus volumineux, expose la synthèse de nanoparticules magnétiques de maghémite selon la méthode Massart¹⁴ ainsi que la modification chimique de leur surface par des agents de couplage silaniques aminés. L'encapsulation des nanoparticules magnétiques dans une coque de silice y est présentée comme une alternative ;
- le dernier chapitre est consacré à l'élaboration proprement dite des vecteurs, obtenus après greffages successifs de macromolécules de dextran et de poly(oxyde d'éthylène). Leur marquage par des fluorochromes et les premiers résultats concernant les tests biologiques y sont présentés.

Références

1. Angeletti E., Canepa C., Martinetti G., and Venturello P., *Tetrahedron Letters*, **29**(18), 2261-2264 (1988).
2. Van Blaaderen, A., *Mat. Res. Soc. Bull.*, 39-43 (1998).
3. Prene P., *Particules d'oxyde de fer spinelle. Physico-chimie des dispersions et comportement magnétique*, Thèse de l'Université Paris 6 (1995).
4. Raj, K. and Moskowitz, R., *J. Magn. Magn. Mater.*, **85**, 233-245 (1990).
5. Haukanes, B.-I. and Kvam, C., *Bio/Technology*, **11**, 60-63 (1993).
6. *Scientific and clinical applications of magnetic carriers*, Plenum Press: New York (1997).
7. Mendoca Dias, M. H. and Lauterbur, P. C., *Magn. Reson. Med.*, **3**, 328-330 (1986).
8. Reimer, P., Weissleder, R., Lee, A.S., Wittenberg, J., Brady, T.J., *Radiology*, **177**, 729-734 (1990)
9. Weissleder, R., Lee, A.S., Fischman, A.J., Reimer, P., Shen, T., Wilkinson, R., Callahan, R.J., Brady, T.J., *Radiology*, **181**, 254-249 (1991)
10. Tiefenauer, L. X., Tschirky, A., Kühne, G., and Andres, R. Y., *Magn. Reson. Imaging*, **14**(4), 391-402 (1996).
11. Kirpotin, D. B., Kinne, R., Milton, A., Palombo-Kinne, E., and Emmrich, F., *J. Magn. Magn. Mater.*, **122**, 354-359 (1993).
12. Okuhata, Y., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **37**, 121-137 (1999)
13. Molday, R.S., Mackenzie, D., *J. Immunol. Methods*, **52**, 353-367 (1982)
14. Massart, R., *IEEE Trans. Magn.*, **17**(2), 1247-1248 (1981)

CHAPITRE I

LE CONTEXTE BIOMEDICAL ET LA STRATEGIE DE L'ETUDE

1. Les vecteurs et les stratégies de la vectorisation

Selon le type d'administration, voie orale ou injection, les médicaments sont distribués dans l'organisme en fonction des propriétés intrinsèques liées à leur structure moléculaire. La quantité finale de médicaments atteignant un site ciblé correspond généralement à une faible proportion de la dose administrée. L'accumulation de ces substances dans des tissus, qui ne sont pas impliqués dans la maladie, peut provoquer des réactions et conduire à des effets secondaires indésirables. Pour remédier à ce type de problèmes, une approche consiste à l'application des médicaments directement aux sites d'action en utilisant des moyens d'administration locale (sprays, inhalateurs, crèmes, solutions nasales ou oculaires, etc.). Cependant, ceci n'est possible que dans la mesure où les tissus sont aisément accessibles.

Un exemple évident de thérapie qui réclame l'utilisation du ciblage de médicaments est la chimiothérapie anticancéreuse, car les médicaments utilisés sont cytotoxiques, les tumeurs, et surtout les métastases, souvent difficilement accessibles et les réactions secondaires sérieuses. De ce fait l'administration de ces substances est prise en compte en fonction de la balance risque/bénéfice. La vectorisation de médicament constitue alors un concept extrêmement séduisant, car elle consiste à apporter sélectivement les principes actifs, là où ils doivent agir dans l'organisme.

1.1 Le concept de vectorisation

Le problème de la vectorisation se pose au niveau de l'aptitude du vecteur de principes actifs à traverser les différentes **barrières physiologiques** pour atteindre la cible (organe, tissu, cellule, noyau cellulaire, etc.). De ce fait, de nombreuses stratégies de vectorisation vers des zones pathologiques ont été développées au cours de ces dernières années : de la

modification directe de la molécule médicamenteuse par conjugaison de protéine ou de peptides (immunotoxines, prodrogues, peptides chimériques, peptides de Troie) à l'utilisation de porteurs particuliers de principes actifs, conjugués ou non à des molécules de ciblage (protéines, peptides, vitamines).

Les **immunotoxines** sont composées d'une ou plusieurs molécules de médicament conjuguées à un agent de ciblage, généralement anticorps monoclonal, par le biais d'une liaison covalente. Après injection dans l'organisme, l'**anticorps** permet la fixation du conjugué anticorps-médicament sur les récepteurs **antigènes** exprimés spécifiquement par les tumeurs. Le principe actif est alors libéré au voisinage ou au sein de la cellule après une

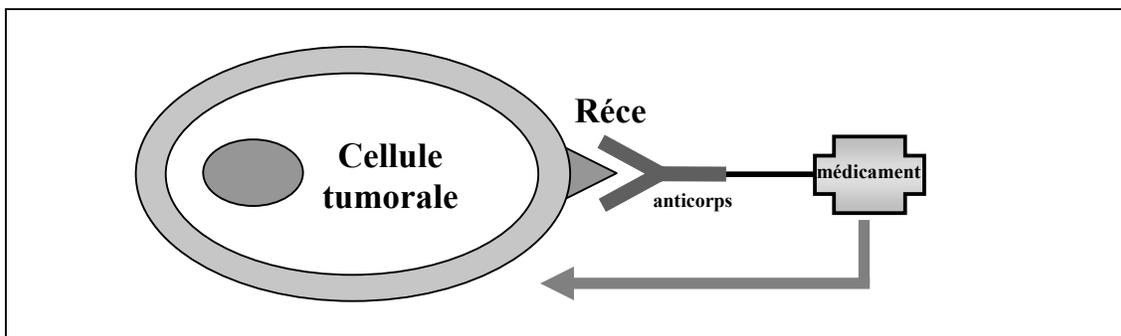


Figure 1.1. Représentation schématique de l'action des conjugués anticorps-drogue (immunotoxines) éventuelle internalisation (Fig. 1.1).

L'efficacité d'un tel concept a été démontrée *in vivo*. Par exemple, Embelton *et al.*¹ ont observé l'arrêt de la croissance d'un mélanome humain du type H2169 greffé chez la souris par traitement avec ce type de produit. Cependant l'application d'une telle stratégie se heurte à de nombreux problèmes :

- la quantité d'agent administrée reste limitée par le nombre de molécules fixées sur un anticorps ;
- l'injection d'une trop grande quantité de ce produit peut provoquer des réponses immunitaires ;
- le médicament est fixé de manière réversible de façon à permettre sa libération. Le principe actif peut donc être libéré au cours de sa diffusion dans l'organisme avant même d'atteindre les tissus pathologiques ;
- la plupart des conjugués sont éliminés par l'organisme avant même d'avoir atteint leurs cibles.

D'autres stratégies ont alors été mises en place. L'une d'elles, appelée ADEPT (Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy) a été proposée en 1987 par Bagshawe². Elle

consiste à injecter préalablement un conjugué anticorps-enzyme avant d'injecter une **prodrogue** dans un second temps. Le conjugué anticorps-enzyme se fixe alors sélectivement sur les antigènes exprimés par les tumeurs. La prodrogue est un composé pharmacodynamiquement inerte, de faible toxicité, qui sous l'effet catalytique de l'enzyme, génère localement un médicament pharmacologiquement actif (Fig. 1.2).

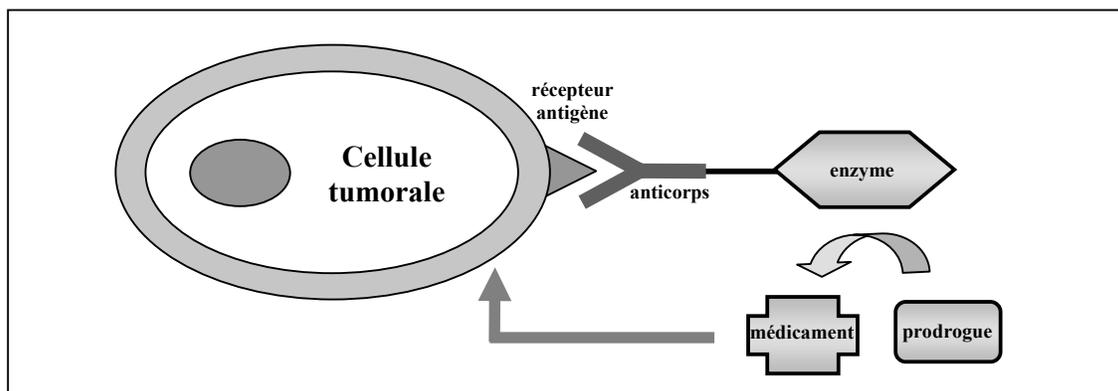


Figure 1.2. Représentation schématique du principe de l'ADEPT

Un exemple de prodrogue, la HMR 1826, résulte de l'association d'un sucre, le β -D-glucuronide lié à un bras espaçant de type nitrophényl, le tout étant lié à un agent antitumoral, la doxorubicine. Une enzyme, la β -D-glucuronidase, s'est révélée efficace pour ce type de prodrogue³. La cytotoxicité de HMR 1826 a été déterminée *in vitro* chez des souris. Cette prodrogue est 80 fois moins toxique que la doxorubicine pour deux raisons : le groupe espaçant est fixé sur la fonction amine de la doxorubicine, qui joue un rôle important au niveau de l'activité cytotoxique ; le glucuronide confère à la prodrogue une hydrophilie suffisante pour limiter sa pénétration à travers la membrane cellulaire⁴.

L'enzyme agit comme un catalyseur du mécanisme de décomposition de la prodrogue en libérant le principe cytotoxique en quantité importante et de façon sélective à proximité de la cellule. L'efficacité d'une telle stratégie va dépendre de plusieurs paramètres (toxicité de la drogue, vitesse de libération, stabilité et hydrophilie de la prodrogue, stabilité du conjugué anticorps-enzyme, etc.). Ce type de thérapie présente, néanmoins, certains inconvénients qui limitent encore son utilisation clinique. L'activité enzymatique décroît rapidement, diminuant de ce fait l'efficacité du traitement. De plus l'administration d'une quantité relativement importante de conjugués anticorps-enzyme induit souvent une réponse immunitaire chez les sujets traités.

Pour traverser les différentes barrières physiologiques de nouvelles stratégies consistant à associer un **cheval de Troie**, généralement une protéine ou un peptide, à un

cargo, une macromolécule thérapeutique, ont été récemment développées. Citons comme exemple les **peptides chimériques** et les **peptides de Troie**. Les peptides chimériques sont formés par conjugaison d'un peptide thérapeutique à un vecteur de transport qui est une protéine capable de traverser la **barrière hémato-encéphalique** (BHE) constituée de cellules endothéliales peu perméables (voir §3.2.1). La protéine de transport peut suivre deux mécanismes de transcytose à travers la BHE : par adsorption électrostatique, c'est le cas de l'albumine rendue cationique après couplage de molécules diamminées ; par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire comme l'anticorps monoclonal OX26 reconnu jusqu'à ce jour comme le plus actif des vecteurs de transport contre le récepteur transferrine présent en grande quantité à la surface des parois capillaires endothéliales de la BHE (pour plus d'informations, le lecteur pourra se reporter à la revue de Pardridge⁵). Dans le même ordre d'idée, les peptides de Troie (Trojan peptides), appelés ainsi en raison de leur capacité à traverser les membranes plasmiques, permettent de vectoriser des oligopeptides mais aussi des oligonucléotides vers le cytoplasme et le noyau cellulaire. Ils sont constitués de protéines messager comme les protéines homéodomaines qui possèdent des séquences d'acides aminés, citons comme exemple la troisième hélice de l'Antennapedia (facteur de transcription de la Drosophile, résidus 43-58, appelée pénétratine-1), responsables de l'internalisation vers le cytoplasme et le noyau des cellules. Ils peuvent être aussi formés de protéines d'origine virale capables de cibler les noyaux cellulaires, par exemple le TAT (Human Immunodeficiency Virus-1 transactivation factor) et une protéine de l'herpès, le VP22 (pour plus d'informations, lire les revues de Prochiantz *et al.*⁶⁻⁸). Cependant ces stratégies se heurtent à un certain nombre de limitations comme la longueur du cargo (le plus long nucléotide internalisé par cette technique connu jusqu'à présent ne fait guère que 55 bases) ou comme le taux intrinsèque de transcytose.

Le concept de vectorisation de porteurs ou cargos particuliers de principes actifs, que l'on appellera dans la suite de cet exposé, **vecteurs particuliers**, est voisin de ceux précédemment décrits. On retrouve en effet les notions de transport, de ciblage, de diminution de la toxicité en dehors des tissus ciblés et de libération du médicament à proximité ou à l'intérieur des cellules cibles. Les vecteurs particuliers sont des objets conçus pour transporter une grande quantité de principe actif tout en le protégeant et en limitant son activité pendant le trajet vers les zones ciblées. Ils doivent en outre améliorer leur pénétration intracellulaire⁹. L'adressage des particules peut suivre les mécanismes biologiques classiques de capture par le système des phagocytes mononucléés (SPM) dans le cadre du marquage du

foie, de la rate et de la moelle osseuse ; ou bien il peut se faire activement par l'intermédiaire

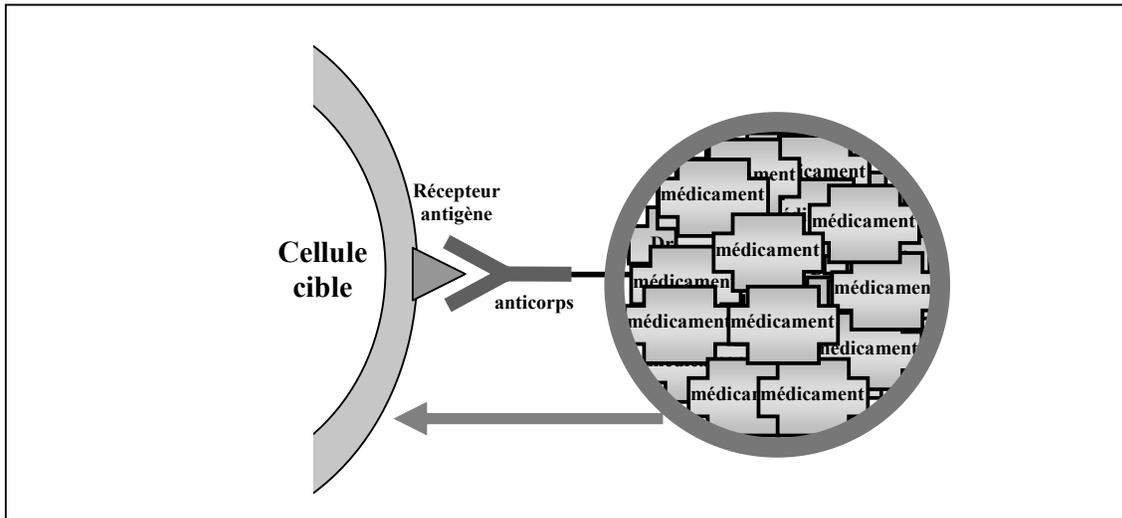


Figure 1.3. Représentation schématique du principe de la vectorisation d'une substance active vers une cellule cible.

d'une molécule de ciblage (Fig. 1.3).

Les critères qui définissent les caractéristiques du **vecteur particulaire idéal** sont les suivants :

- ✓ la liaison avec la substance active doit être suffisamment stable pour éviter sa libération prématurée. Le porteur doit, en outre, assurer sa protection contre toute dégradation pendant son transport et éliminer les interactions en dehors de la zone visée ;

- ✓ il doit posséder une grande spécificité vis-à-vis des cellules ciblées. Le **ciblage ou adressage** peut résulter, en fonction de la stratégie recherchée : de la conjugaison de protéines, généralement, des anticorps spécifiques d'un antigène exprimé à la surface des cellules cibles ; de vitamines dont les récepteurs sont surexprimés à la surface des cellules cancéreuses¹⁰ (acide folique : vitamine B9) ; de peptides (séquence tripeptide : RGD) ciblant les cellules endothéliales de tumeurs hypervasculaires¹¹ ; de protéines ou de peptides capables de traverser les parois cellulaires et nucléaires (OX26, pénétrines, TAT, VP22, etc.) ; du ciblage passif du SPM ; du guidage magnétique ; du ciblage d'organe par embolisation ; etc.;

- ✓ il doit limiter les interactions avec les biomolécules et notamment les protéines plasmatiques dans le cas d'une administration intraveineuse. Ces interactions, principalement de type électrostatique et hydrophobe, peuvent avoir des conséquences désastreuses tant sur l'état de dispersion, qui se traduit généralement par la formation d'agrégats, que sur la **demi-**

vie plasmatique (temps nécessaire à l'élimination de la moitié de la dose administrée) qui, dans certains cas, doit être suffisamment longue pour que le ciblage soit effectif;

✓ la libération du médicament à l'intérieur des cellules, des tissus ou des espaces extracellulaires doit être prédéterminée à travers une stratégie de couplage (rupture enzymatique, liaison réversible, sensibilité à une variation du milieu comme le pH, la température ou la force ionique) ;

✓ la taille doit permettre à la fois, le transport d'une quantité suffisante de principe actif et sa diffusion à travers certaines barrières physiologiques ;

✓ sa composition doit faire intervenir des composés chimiques relativement stables en milieu physiologique, mais biocompatibles et biodégradables de manière à faciliter leur élimination ultérieure ;

✓ enfin, il doit résister à la stérilisation et être aisément stocké et administré.

Le principe actif peut être de différentes natures selon le type de thérapie envisagée : il peut s'agir de molécules d'ADN ou d'oligonucléotides dans le cadre de la vectorisation de gènes ou « thérapie génique », d'agents anticancéreux pour la chimiothérapie, de facteurs de croissance, par exemple dans le cadre d'une thérapie réparatrice de lésions du système nerveux central ou encore de marqueurs radioactifs, magnétiques ou fluorescents en vue d'une application diagnostique.

1.2 Les vecteurs particuliers

On peut classer les vecteurs selon deux points de vue :

✓ **leur structure :**

• *Les vecteurs biomoléculaires* : ce sont généralement des protéines ou des peptides, les peptides chimériques et les peptides de Troie, cités précédemment.

• *Les vecteurs macromoléculaires synthétiques* hydrosolubles comme le dextran, la polylysine ou l'acide polyglutamique¹²⁻¹⁴. Ces macromolécules doivent être en particulier biocompatibles, biodégradables et hydrosolubles.

• *Les vecteurs particuliers* : ce sont généralement des liposomes, des micro ou nanocapsules, des micro ou des nanosphères polymériques.

✓ **leur cible** (classification proposée par Puisieux¹⁵ en 1986) :

Cette hiérarchie s'adresse exclusivement aux vecteurs particuliers qui constituera, l'objet principal de la suite de cet exposé. La classification présentée dans le

tableau 1.1 est directement liée à la taille des vecteurs en relation avec l'accessibilité des différents tissus ou cellules cibles.

Groupe	1 ^{er}	2 ^{ème}		3 ^{ème}
Cible	tissus	tissus		cellules
Diamètre	>1µm	<1µm		<1µm
Exemples	microsphères microcapsules	Ciblage Passif	Ciblage Actif	liposomes, nanosphères et nanocapsules couplés à des anticorps
		liposomes nanosphères nanocapsules	liposomes, nanosphères et nanocapsules magnétiques ou thermosensibles	
Principe	chimioembolisation	marquage du SRE	guidage assisté	reconnaissance de la cible

Tableau 1.1. Classification des vecteurs selon Puisieux¹⁵

Les vecteurs du premier groupe sont généralement des microsphères ou des microcapsules.

✓ Les **microsphères** sont des particules de polymère réticulé, dans lesquelles les substances médicamenteuses sont introduites via un solvant qui gonfle les particules. Certaines microsphères à base de polymère thermosensible sont hydrophobes et rétractées à 30°C. En revanche à 20°C, elles sont hydrophiles, expansées et permettent la libération du produit actif¹⁶. De tels matériaux seraient applicables à la vectorisation, à condition de pouvoir ajuster cette température de transition, appelée température critique limite de solubilité (LCST), entre les deux phases autour de 37°C. Des microsphères à base de polymère naturel existent aussi. Kramer *et al.*¹⁷ ont ainsi préparé des microsphères d'albumine en présence de médicaments de plusieurs classes. Les microsphères d'albumine peuvent être préparées notamment par chauffage d'une émulsion inverse (eau dans huile) d'albumine en présence de médicaments hydrosolubles. Les microsphères d'albumine sont obtenues en évaporant la phase aqueuse¹⁸. Cette méthode est néanmoins limitée par la stabilité thermique du médicament et le contrôle de sa quantité introduite dans les microsphères du fait de son fractionnement dans les deux phases.

✓ **Les microcapsules** peuvent être obtenues soit par un mécanisme de coacervation, soit par un procédé d'évaporation de solvant d'une suspension de gouttelettes polymériques contenant le médicament¹⁹. Elles sont constituées d'une enveloppe solide renfermant un liquide, un solide ou une substance pâteuse. Du fait de leur taille élevée (supérieure à 1 µm), elles sont surtout utilisées en chimioembolisation.

Les vecteurs de deuxième génération sont des systèmes nanoparticulaires, essentiellement des liposomes et des nanoparticules.

✓ Les **liposomes** sont les systèmes les plus abondamment étudiés parce qu'ils constituent au-delà des objectifs appliqués, des modèles de membranes biologiques. Ce sont des vésicules sphériques constituées d'une ou plusieurs bicouches concentriques, organisées en feuillet bimoléculaire de molécules **amphiphiles**, généralement des phospholipides et des systèmes protéines-lipides (protéoliposomes), renfermant un nombre équivalent de compartiments aqueux. Ces molécules possèdent une ou plusieurs chaînes lipidiques reliées à une ou plusieurs têtes hydrophiles permettant leur dispersion dans des phases aqueuses et huileuses. Les principes actifs liposolubles ou hydrosolubles peuvent alors se loger respectivement dans les bicouches lipidiques ou les compartiments aqueux. On distingue principalement trois types de liposomes²⁰ : les liposomes multilamellaires, les MLV (multilamellar vesicles), relativement stables, mais polydisperses (80 nm à 10 µm) ; les liposomes unilamellaires de petite taille, les SUV (small unilamellar vesicles) de distribution de taille plus étroite (20 à 50 nm), mais moins stables et de contenance faible ; le troisième type de liposomes, les LUV (large unilamellar vesicles) de diamètre moyen variant entre 0,2 à 1 µm, de plus grande capacité mais de préparation délicate.

Leur préparation par dialyse, par extrusion ou par ultrasonication des lipides en milieu tamponné²¹ ainsi que leur utilisation ont été largement décrites dans la littérature²². Les formulations de base se font à partir de phosphatidylcholine (DOPC), dont le point isoélectrique est pratiquement nul aux conditions physiologiques, de lipides anioniques comme la phosphatidylsérine (DOPS) et de cholestérol qui a pour rôle de fluidifier la membrane. Les formulations à partir de DOPC et de cholestérol conduisent à des liposomes neutres tandis que les formulations faisant intervenir la DOPS donnent des surfaces chargées négativement. Des liposomes chargés positivement ont été également synthétisés en incorporant de la stéarylamine ou de la phosphatidyléthanolamine (DOTAP). Les liposomes sont très largement étudiés mais leur instabilité *in vivo*, notamment du fait des interactions avec des lipoprotéines circulantes, leur taille hétérogène et la difficulté de les préparer à l'échelle industrielle sont des inconvénients que l'on ne retrouve pas avec d'autres systèmes de ciblage de médicaments²³.

Les **sphérulites**[®], sont des vésicules proches voisines des MLV. Ces microvésicules multilamellaires de 0,2 à 20µm de diamètre présentent une structure dite en oignon constituée d'un empilement concentrique de bicouches de tensioactifs et de compartiments aqueux. Elles sont préparées à partir d'un mélange de concentration supérieure à la concentration micellaire critique (CMC), de DOPC et de simulsol (alcool laurique éthoxylé) en phase aqueuse, de telle

sorte que ces molécules s'organisent en phase lamellaire dense constituée de membranes bidimensionnelles séparée par une couche d'eau, formant ainsi un cristal liquide. Le cisaillement de cette phase provoque une instabilité thermodynamique conduisant à la formation des sphérulites[®]. Les avantages de cette méthode sont multiples : rendement de l'encapsulation de principes actifs élevé (<80%), procédé de fabrication facile à mettre en œuvre à l'échelle industrielle et donc moins coûteux, grande stabilité de la structure multilamellaire. La faisabilité de l'encapsulation de principes actifs tels que des antigènes utilisés dans la fabrication de vaccins et des oligonucléotides utilisés en thérapie génique a été démontrée²⁴.

✓ Les **nanoparticules** à usage biologique sont des particules colloïdales solides de taille moyenne variant de 1 à 100 nm (selon l'IUPAC), dans lesquelles le principe actif est encapsulé, dissout, piégé et/ou adsorbé ou encore lié de façon covalente selon les cas²⁵. Elle peuvent être pleines (nanosphères) ou creuses (nanocapsules). Les **nanosphères** sont constituées de macromolécules enchevêtrées, réticulées ou non, formant un réseau poreux de grande surface spécifique, dans lequel le principe actif peut être internalisé. La matrice polymère peut être formée à partir de macromolécules synthétiques ou naturelles. Les **nanocapsules** sont constituées d'une enveloppe polymère sphérique renfermant un réservoir contenant le principe actif sous forme liquide, solide ou pâteuse. Des nanosphères de gélatine de taille moyenne égale à 280 nm ont été synthétisées par réticulation de gélatine mise en émulsion, sous sonication²⁶. Des nanosphères constituées de polymère synthétique, le poly(alkyl 2-cyanoacrylate) ou PACA [Couvreur *et al.*]²⁷ ont beaucoup attiré l'attention, pour leur utilisation en chimiothérapie, du fait de leur capacité à être biodégradées²⁸. Cette biodégradation peut être ajustée en fonction du monomère choisi initialement (2-cyanoacrylate de méthyle ou de butyle), de la masse molaire des macromolécules et de la taille des particules. Leur préparation^{29,30} consiste à ajouter le monomère dans une solution aqueuse sous forte agitation en présence d'un stabilisant comme le dextran ou un surfactant non ionique (poloxamers, Tween[®], etc.). Les particules de PACA sont formées par un mécanisme de polymérisation anionique des gouttelettes de monomère. La taille variable de ces particules, de 30 à 500 nm, peut être ajustée en contrôlant les paramètres expérimentaux comme le pH de la solution, la concentration en monomère, la concentration en électrolyte ou encore la température^{31,32}. Ces matériaux ont donné lieu à de nombreuses études concernant la biodistribution, la toxicité et la vectorisation de médicaments³³⁻³⁵. Récemment, un agent antitumoral et un agent immunodépresseur, la doxorubicine et la cyclosporin A, ont été co-

encapsulés dans des nanoparticules de PACA utilisées pour inhiber la croissance de cultures cellulaires résistantes³⁶. Une large gamme de polymère a été étudiée pour la conception de vecteurs de principes actifs comme les poly(aminoalkylméthacrylate)³⁷, les poly(alkylméthacrylate)³⁸, les poly(acide lactique)³⁸, les copolymères de lectine-HPMA (N-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide)³⁹. Ces nanosphères sont conçues également pour vectoriser de l'ADN (acide désoxyribonucléique) dans le cadre des travaux concernant la thérapie génique. L'ADN, globalement chargé négativement, a été adsorbé sur des nanosphères cationiques de poly(L-lysine)^{40,41} et de α,β -poly(asparthydrazide)⁴² dans le cadre d'une vectorisation de gènes. A l'heure actuelle, ces systèmes tendent à être optimisés, par exemple, en modifiant la surface des nanosphères au moyen de macromolécules neutres et hydrophiles, comme le poly(oxyde d'éthylène) ou le dextran, pour augmenter leur demi-vie plasmatique⁴³⁻⁴⁵.

Les vecteurs du troisième groupe sont des nanoparticules ou des liposomes qui présentent une spécificité d'un type cellulaire. Des agents de ciblage, couplés à leur surface, reconnus par les récepteurs membranaires des cellules cibles, permettent de donner une adresse au vecteur transportant le principe actif. Cet aspect est décrit dans la troisième partie de ce chapitre dans le cadre de la vectorisation de marqueurs magnétiques appelés, agents de contraste.

D'autres vecteurs de nature biologique comme les virus (adénovirus^{46,47}, rétrovirus⁴⁷), certaines cellules macrophagiques (lymphocytes T, microglies, etc.) et les cellules souches progénitrices dont les perspectives d'applications, notamment en thérapie cellulaire, sont extrêmement prometteuses, ne rentrent pas dans cette classification.

1.3 Stratégies thérapeutiques mettant en œuvre des vecteurs particuliers magnétiques

L'association de propriétés magnétiques dans des micro- ou nanoparticules présente plusieurs intérêts dans le domaine de la vectorisation. Les propriétés magnétiques de ces matériaux confèrent aux vecteurs une nouvelle fonctionnalité qui ouvre des perspectives vers de nouvelles applications thérapeutiques, comme la chimioembolisation magnétiquement assistée, le ciblage par guidage magnétique et la magnétocytolyse induite par hyperthermie, et diagnostiques, comme le contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM).

La **chimioembolisation** est une technique thérapeutique qui consiste à faire régresser une tumeur en oblitérant sélectivement par cathétérisme ses artères ou artérioles nourricières au moyen de particules chargées en agents anticancéreux. A l'effet mécanique d'obstruction, entraînant une hypoxie des tissus environnants, s'ajoute un effet chimiothérapeutique par diffusion *in situ* de l'agent anticancéreux des microcapsules vers la tumeur. Les propriétés magnétorhéologiques des fluides magnétiques ont été utilisées pour créer des embolies sous l'application d'un champ local⁴⁸. Les interactions dipôle-dipôle alignent les particules pour former des chaînes ce qui a pour effet d'augmenter radicalement la viscosité locale et donc de diminuer le flux sanguin au sein de la tumeur. A l'inverse, ces propriétés ont également été mises à profit pour traiter les thromboses (obstructions de vaisseaux artériels) en vectorisant magnétiquement des enzymes fibrinolytiques pour dégrader les thrombus⁴⁹.

Le **ciblage magnétique de médicament** (MDT, magnetic drug targeting) est une autre application des vecteurs magnétiques, abondamment étudiée ces dernières années⁵⁰⁻⁵³. Cette voie thérapeutique a déjà fait ces preuves chez la souris et chez l'homme. Elle consiste à injecter des vecteurs magnétiques (ferro- ou ferrimagnétiques) d'agent anticancéreux à proximité de la tumeur et à les y maintenir de façon concentrée, au moyen d'un champ magnétique extérieur généré à partir d'un aimant dur (de haute coercitivité et forte aimantation rémanente), généralement composé d'un alliage $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$. La force du champ magnétique est variable (de 0,2 à 0,8 Tesla) en fonction de la taille de la tumeur. Cependant, cette méthode reste délicate à exploiter, car les particules magnétiques peuvent être retenues dans des microvaisseaux de tissus sains et alors engendrer des embolies.

L'**hyperthermie** est une voie thérapeutique utilisée pour détruire les tumeurs par élévation de la température locale. Cette méthode consiste à chauffer les tissus tumoraux au-delà de 43°C (généralement 47°C) pour les détruire par nécrose, coagulation ou carbonisation (thermoablation). Elle est également utilisée à des essais destinés à limiter l'expression de transgènes aux zones irradiées, pour autant que cette expression soit sous le contrôle de promoteurs thermosensibles⁵⁴.

Plusieurs sources énergétiques sont utilisées telles que les ultrasons focalisés, les micro-ondes ou l'infrarouge, dans le cas de traitements superficiels comme les mélanomes. Dans le cas de l'hyperthermie induite par les fluides magnétiques (MFH, magnetic fluid hyperthermia), appelée aussi **magnétocytolyse**, la source énergétique se situe dans le domaine des radiofréquences (1-10 MHz). Cette technique s'appuie sur le fait que la relaxation des aimantations des particules ferro- ou ferrimagnétiques provoque une dissipation de l'énergie

magnétique en chaleur par effet Joule. Cette dissipation est d'autant plus élevée que le régime de pulsation est à la fréquence de résonance ferromagnétique⁵⁵. La première expérience date de 1957 : Gilchrist *et al.*⁵⁶ ont utilisé des particules de ferrite magnétique de taille micrométrique chez le chien. En utilisant des ganglions lymphatiques excisés, dans lesquels les particules sont concentrées à raison de 47 mg/g de tissu, placés dans l'entrefer entre deux bobines générant un champ magnétique alternatif, de 15 à 20 kA/m à la fréquence de 1-2 MHz, ils ont observé une augmentation de la température interne de 4,7°C. Depuis, les progrès réalisés dans la conception des sources magnétiques et des vecteurs ont permis d'atteindre des élévations de température de plus de 9°. Les particules utilisées, généralement à base de ferrites, sont le plus souvent des liposomes magnétiques^{57,58} ou des nanoparticules de magnétite stabilisées par du dextran⁵⁹. Cependant cette méthode n'est efficace que si les particules magnétiques sont concentrées en nombre suffisant et réparties de façon homogène dans la tumeur⁶⁰. Par ailleurs, la température et la durée de chauffe sont des facteurs à contrôler de manière à ne pas détruire les cellules saines avoisinantes.

C'est ainsi que des travaux sur des matériaux magnétiques à température de Curie (T_c) variable, ont vu le jour^{61,62}. La T_c est la température au delà de laquelle le matériau devient paramagnétique. Par conséquent, pour une température supérieure à T_c ajustée à 43-47°C dans le cadre de cette application, les particules magnétiques ne s'échauffent plus, se comportant ainsi comme un « fusible magnétique ».

Pour améliorer l'efficacité de cette méthode, les recherches s'orientent vers des vecteurs magnétiques de plus grande spécificité vis-à-vis des tumeurs, vers l'optimisation des champs magnétiques alternatifs à appliquer⁶³, et des propriétés magnétiques des particules (aimantation à saturation, T_c ajustée, etc.).

Des vecteurs magnétiques, appelés **agent de contraste superparamagnétiques**, ont été conçus pour des applications diagnostiques. Ces produits ont la faculté d'induire un contraste en IRM ce qui permet de révéler des pathologies dans les tissus ou les organes avec une meilleure résolution. Dans le chapitre suivant, le principe de l'IRM est exposé avec les agents de contraste développés dans le cadre de cette technique.

2. L'IRM et les agents de contraste

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique d'imagerie médicale de diagnostic clinique. Les images obtenues par IRM sont utilisées par les neurochirurgiens en préopératoire pour définir la trajectoire de leur sondes chirurgicales. Les neurologues et radiologues les utilisent, pour leur part, pour diagnostiquer et suivre l'évolution des troubles dégénératifs comme la sclérose en plaques. Les chercheurs dressent actuellement un atlas universel du cerveau humain grâce à des centaines de clichés IRM. Le développement de ces techniques a permis de visualiser l'anatomie cardiaque et d'étendre l'observation aux artères et aux veines grâce à l'angiographie par résonance magnétique. D'autres approches métaboliques (RMN ^1H , ^{31}P et ^{23}Na) ou fonctionnelles (volume sanguin cérébral, perfusion tissulaire) ont émergé de cette technique. Le développement de l'IRM est lié à l'apparition de matériaux à faible résistivité pour la conception d'aimants supraconducteurs et à l'amélioration des outils informatiques pour le stockage et le traitement des données. Les premiers essais en imagerie datent de 1973. Lauterbur^{64,65}, Mansfield et Damadian ont démontré la faisabilité de cette technique en utilisant les principes de la résonance magnétique nucléaire (RMN) pour concevoir les premiers imageurs, et réaliser les premières images d'un doigt en 1973 et d'un thorax en 1976. Depuis l'IRM est devenue une technique diagnostique de prédilection car elle a la capacité de distinguer les différences d'intensités entre les tissus mous normaux et pathologiques. Avant d'aborder le principe de l'IRM, le lecteur trouvera en Annexe 1, quelques rappels de base sur la RMN^{66,67}.

2.1 Principe de l'Imagerie par Résonance Magnétique

L'imagerie est obtenue en collectant les signaux RMN dans chaque volume élémentaire d'un échantillon, appelés voxels. Ceux-ci sont individualisés au moyen de séquences combinant des gradients de champs magnétiques et des impulsions radiofréquences (de 5 à 100 MHz) de façon à ce que, à chaque point de l'espace, corresponde une fréquence de résonance qui lui est propre. Les séquences impulsionnelles utilisées en imagerie sont les mêmes que celles utilisées en RMN (écho de spin, inversion/récupération ou écho de gradient). L'ensemble des mesures est ensuite collecté par un ordinateur qui, en appliquant une transformée de Fourier à deux dimensions, est en mesure de décoder en phase et en fréquence, pour les différents points du plan observé, et de restituer les amplitudes des signaux RMN, ou de l'écho, à chacun de ces points. Une image en échelle de gris

correspondant à une coupe de l'échantillon est ainsi reconstruite en fonction de l'intensité du signal de chacun des points (voir figure 2.1 en illustration).

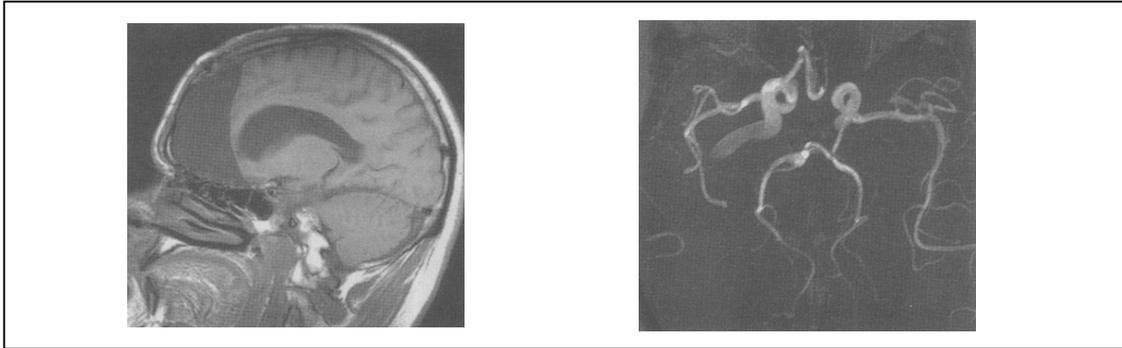


Figure 2.1. Image de gauche : IRM pondérée en T1 de la tête d'un patient après une lobectomie frontale vue en coupe sagittale de 5 mm d'épaisseur. Image de droite : angiogramme de la circulation intracrânienne. D'après U. Häfeli (ref. 68).

2.1.1 Le contraste naturel

Les variations d'intensité du signal de chaque voxel, qui définissent le contraste naturel de l'image, dépend de multiples facteurs :

- ✓ des paramètres instrumentaux (extrinsèques) :
 - intensité du champ B_0 (notamment, l'augmentation du champ a pour effet de diminuer le rapport signal/bruit),
 - paramètres des séquences d'acquisition (temps de répétition, temps d'écho, angle de basculement) ;
- ✓ des paramètres liés à la nature même des tissus (intrinsèques) :
 - temps de relaxation T1 et T2 ($T2^*$ dans le cas d'une séquence d'écho de gradient),
 - densité de noyau d'hydrogène $N(H)$,
 - vitesse de flux du liquide circulant,
 - paramètres diffusionnels tels que la viscosité ou la température.

Il faut noter que pour une image acquise lors d'une séquence donnée, les paramètres extrinsèques sont les mêmes pour tous les points de l'image. Le contraste naturel dépend donc essentiellement des paramètres intrinsèques (Fig. 2.2).

Du fait que la densité d'hydrogène $N(H)$ ne varie que très peu à travers les différents tissus, le contraste d'une image de tissus est principalement dû à des différences de temps de relaxation. En effet, la majeure partie du signal provient des protons de l'eau qui constituent 60 à 80% des tissus, le reste étant attribué aux lipides membranaires et aux protéines. Chaque

tissu possède sa propre valeur de temps de relaxation en fonction des conditions d'observation (séquences, champ magnétique...).

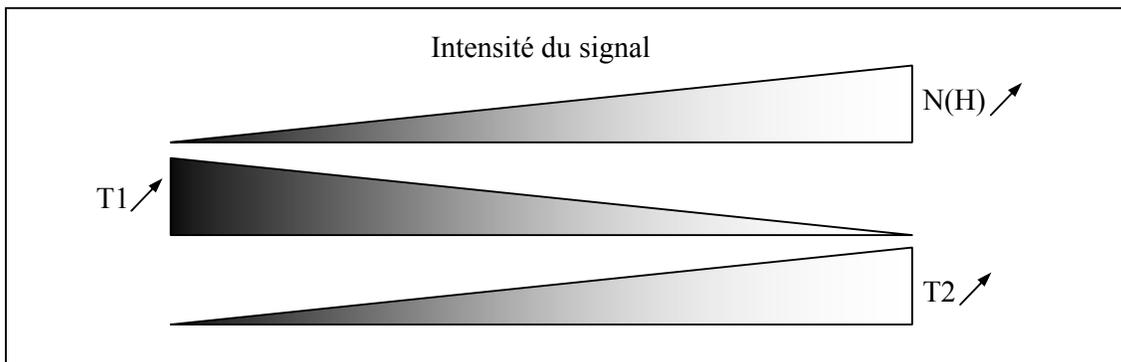


Figure 2.2. Evolution de l'intensité du signal en IRM en fonction des paramètres intrinsèques (densité de noyau d'hydrogène $N(H)$, temps de relaxation $T1$ et $T2$) dans les tissus biologiques.

2.1.2 Pondération des temps de relaxation

Néanmoins, lors d'une séquence d'écho de spin, il est possible de pondérer les contributions en $T1$ et/ou en $T2$ en ajustant les temps de répétition (TR) des impulsions et le temps d'écho (TE) de façon à rehausser le signal de certains tissus par rapport aux autres. Les images pondérées en $T2$ sont généralement plus sensibles que celles pondérées en $T1$ pour distinguer les variations de contraste liées à la présence de lésions au sein d'un tissu normal.

La figure 2.3 montre la différence de relaxation entre un tissu sain et un tissu tumoral.

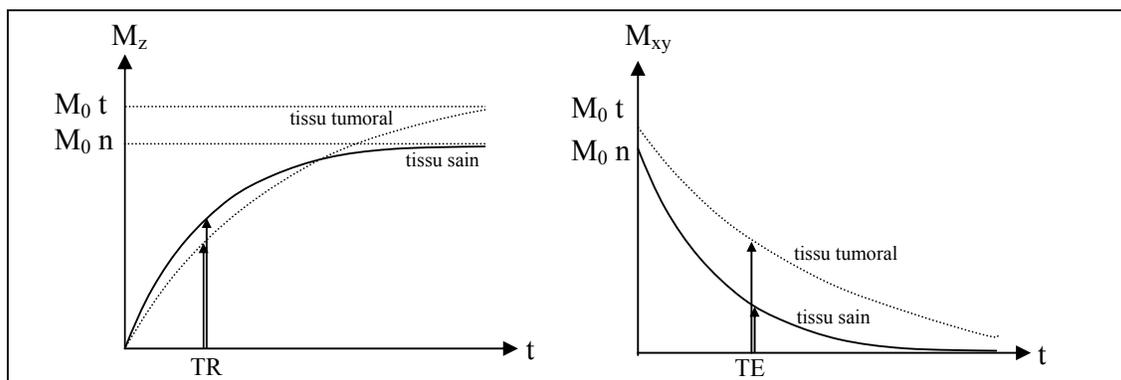


Figure 2.3. Pour une séquence écho de spin, le contraste entre le tissu tumoral et le tissu normal est plus net sur les images pondérées en $T2$ (M_{0t} plus grand, TE long) que sur les images pondérées en $T1$ (TR court).

La densité $N(H)$ étant plus importante dans le tissu tumoral que dans le tissu sain, les composantes longitudinales possèdent des aimantations résultantes M_0 plus élevées ($M_{0t} > M_{0n}$). D'autre part le $T1$ du tissu tumoral est plus long que celui du tissu sain. Les courbes de relaxation longitudinales sont finalement assez voisines et le contraste entre les deux tissus est quasiment nul. En observant la figure 2.2, on voit que ces deux effets

conjugués (augmentation de $N(H)$ et de $T1$ du tissu tumoral) se compensent et que le contraste qui en résulte est faible. Par contre le $T2$ du tissu tumoral étant plus long, la composante transversale décroît moins vite que dans le cas du tissu normal. L'augmentation du $T2$ et de la densité de noyau d'hydrogène $N(H)$ sont deux effets qui s'ajoutent cette fois-ci et contribuent à l'augmentation du signal du tissu tumoral par rapport au tissu sein comme le montre la figure 2.2.

S'il est possible de localiser des tumeurs ou des lésions en IRM, la caractérisation précise des pathologies de ces tissus reste néanmoins délicate. En vue d'améliorer la valeur diagnostique de ces images, des produits sont utilisés pour modifier le signal localement en rehaussant le contraste des régions observées.

2.2 Les produits de contraste en IRM

Le principe des agents de contraste est de modifier localement les paramètres intrinsèques des tissus. Contrairement aux produits de contraste iodés utilisés en tomodensitométrie (imagerie par absorption des rayons X), ce n'est pas le produit de contraste lui-même que l'on observe, mais ses effets sur l'aimantation des noyaux d'hydrogène qui se trouvent dans les tissus. Une première génération de produits de contraste, appelés agents de densité de spin, a permis de conférer une meilleure définition de l'image⁶⁹. Ces agents lipidiques agissent en modifiant localement la densité de noyaux d'hydrogène ce qui a pour effet de rehausser le signal. Récemment, se sont développés une deuxième génération d'agents de contraste, dont le mode d'action est de modifier les temps de relaxation des noyaux d'hydrogène. Ils peuvent être séparés en deux classes :

- ✓ les agents de contraste paramagnétiques globalement considérés comme des agents de contraste positifs, qui sont généralement des complexes de gadolinium ;
- ✓ les agents de susceptibilité magnétique, considérés comme des agents de contraste négatifs, qui sont constitués à partir de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques.

2.2.1 Effets des agents de contraste sur les vitesses de relaxation

Les produits de contraste diminuent les temps de relaxation $T1$ et/ou $T2$. On définit la vitesse de relaxation ou relaxivité (exprimée en $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) : $1/T_{1,2} = R_{1,2}$. Les vitesses de relaxation ($1/T1$ et $1/T2$) observées résultent de l'addition des vitesses intrinsèques tissulaires et de la contribution de l'augmentation des vitesses sous l'effet des agents de contraste :

$1/T_{\text{observé}} = 1/T_{\text{intrinsèque}} + 1/T_{\text{agent de contraste}}$. L'efficacité des produits sur le temps de relaxation est d'autant plus fort que la concentration est élevée. Cette relation permet de déterminer les relaxivités en fonction de la concentration en produit de contraste (Fig. 2.4):

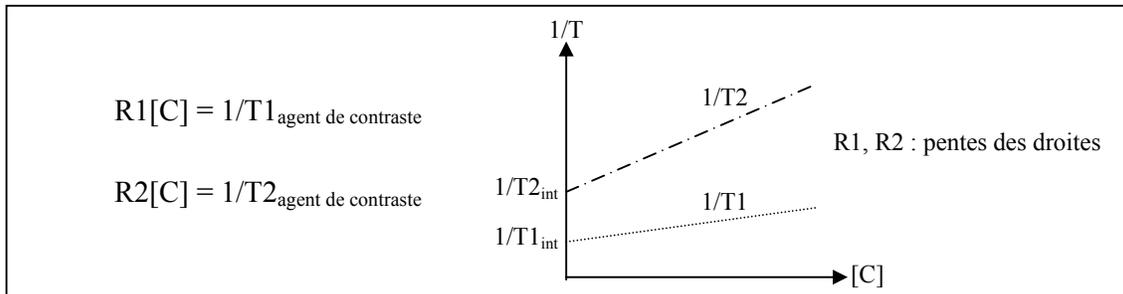


Figure 2.4. Principe de détermination graphique des relaxivités R1 et R2.

où R_1 et R_2 sont les relaxivités décrivant leurs effets sur les temps T_1 et T_2 des tissus et $[C]$ la concentration locale de l'agent de contraste. Toutefois il n'y a pas nécessairement proportionnalité entre la concentration en produit de contraste et le signal induit (voir Fig. 2.5).

Les agents paramagnétiques ont une relaxivité R_1 et R_2 du même ordre de grandeur (Tab. 2.1). Cependant ils présentent un effet T_1 prépondérant, car les T_1 des tissus sont beaucoup plus élevés que les T_2 (de l'ordre de 10 fois). Les agents paramagnétiques diminuent le T_1 des tissus ce qui revient à augmenter l'intensité du signal (hypersignal), d'où leur nom **d'agent de contraste positif**. Le contraste est d'autant plus fort que la pondération de la séquence en T_1 , en ajustant le temps de répétition (TR), est marquée.

Agents de contraste	$R1(\text{mM.s})^{-1}$	$R2(\text{mM.s})^{-1}$	$R2/R1$
Paramagnétique : Gd-DTPA	4,5	5,9	1,3
Superparamagnétique : AMI-25	23,9	98,3	4,1

Tableau 2.1. Relaxivités de produits de contraste commerciaux (mesurées à 37°C dans le plasma, 20MHz).

Les agents superparamagnétiques possèdent une relaxivité R_2 élevée et prépondérante par rapport à R_1 ($R_2/R_1=4,1$). La diminution du T_2 (ou l'augmentation du R_2) conduit à l'effondrement du signal (hyposignal). Ce contraste peut être amélioré en pondérant le T_2 par exemple en diminuant le TR ou en allongeant le TE. Ces agents de contraste, dont l'effet est prépondérant en T_2 , sont appelés **agents de contraste négatifs**. Toutefois il est possible d'obtenir un contraste positif au moyen d'une séquence pondérée en T_1 .

Bien que la concentration en produit de contraste soit proportionnelle aux vitesses de relaxation, la linéarité de la dose par rapport à l'intensité du signal ne se vérifie pas. Une simple extrapolation n'est pas valide pour la détermination de la dose optimale⁷⁰. En effet le signal fait intervenir les vitesses de relaxation de façon non linéaire et dépend des paramètres extrinsèques tels que les paramètres d'acquisition des séquences. La figure 2.5 représente l'allure de l'évolution du signal en fonction de la concentration. Les agents de contraste paramagnétiques et superparamagnétiques voient leur effet positif ou négatif sur le signal seulement dans une gamme de doses établies par l'expérience, ni trop faibles, ni trop fortes. Il est possible, par exemple, que les complexes du gadolinium entraînent un affaïssissement du signal lorsqu'ils se concentrent au niveau de la vessie lors de leur élimination rénale.

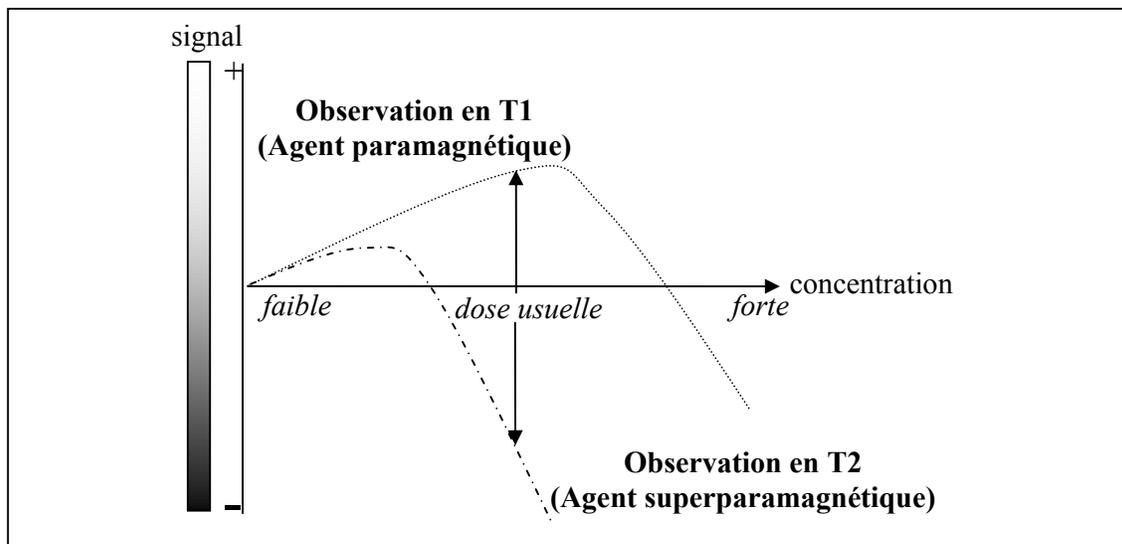


Figure 2.5. Représentation schématique de l'effet de la concentration en agent de contraste sur l'intensité du signal.

Les relaxivités R1 et R2 des agents paramagnétiques dépendent aussi de leur structure, de l'accessibilité des molécules d'eau autour des centres paramagnétiques et de leur dimension. Pour les agents superparamagnétiques, la susceptibilité magnétique et l'état d'agrégation des nanoparticules peuvent aussi modifier le signal. Toutes ces considérations sont à prendre en compte lors de l'élaboration des agents de contraste.

2.2.2 Les agents de contraste paramagnétiques

a. Le paramagnétisme

Les électrons, tout comme les noyaux, possèdent aussi un moment magnétique appelé spin électronique. Le déplacement du nuage électronique autour des noyaux génère un moment magnétique dipolaire permanent qui peut être :

- ✓ nul si les électrons de la couche externe de l'atome sont appariés : ces atomes ou molécules sont dits diamagnétiques ;
- ✓ non nul si la couche électronique externe possède des électrons non-appariés : c'est le cas de certains ions métalliques ou de molécules paramagnétiques.

Les matériaux diamagnétiques, qui composent la majorité des composés organiques ou inorganiques, soumis à un champ magnétique extérieur, possèdent une susceptibilité magnétique négative très faible. La majorité des molécules ou ions constituant la matière biologique, notamment l'eau, est diamagnétique et leurs effets en IRM sont négligeables.

Les matériaux **paramagnétiques** comme les molécules de dioxygène, les radicaux libres comme les nitroxydes ou certains ions métalliques (Fe^{3+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Gd^{3+} ...) présentent une susceptibilité positive lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique extérieur. En l'absence de champ, les moments dipolaires élémentaires prennent toutes les directions possibles et le moment résultant est nul. Sous l'effet d'un champ magnétique extérieur, ces moments magnétiques s'orientent dans sa direction pour former une aimantation résultante qui est directement proportionnelle à ce champ. La vitesse de relaxation des molécules d'eau ou des tissus contenant des noyaux d'hydrogène se situant au voisinage de composés paramagnétiques diminue sous l'effet de l'interaction dipolaire entre le moment magnétique nucléaire de chaque noyau d'hydrogène et le moment magnétique électronique de l'agent paramagnétique. Cette interaction dépend de la concentration en produit, de l'intensité du champ magnétique externe et de l'accessibilité des molécules d'eau au produit.

Notamment, les molécules d'eau peuvent être liées dans la première ou la deuxième couche de coordination et peuvent s'échanger avec la solution. Ces deux conditions sont prises en compte pour les relaxations de sphère interne et de sphère externe, décrites par les équations de Solomon-Bloembergen^{71,72}. Ces équations permettent d'ajuster les profils NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion) qui représentent l'évolution de la relaxivité en fonction de la fréquence ou de l'intensité du champ magnétique. Ces profils permettent d'étudier les valeurs des relaxivités du complexe paramagnétique en solution en fonction de la nature des ligands, de l'ion métallique et du taux de solvatation.

Il existe dans l'organisme des agents paramagnétiques naturels. L'hémoglobine en est un exemple. Elle est utilisée en IRM fonctionnelle pour déterminer les fonctions spécifiques du cerveau⁷³ (goût, odorat, lecture, écoute,...). L'oxyhémoglobine possède une faible

relaxivité tandis que la forme désoxygénée, la déoxyhémoglobine, est paramagnétique et possède une relaxivité plus forte. Cela permet de déterminer les zones du cerveau plus ou moins oxygénées et de mesurer les variations des débits sanguins.

b. Les produits paramagnétiques utilisés en IRM

Les premiers agents de contraste paramagnétiques testés sur l'animal étaient des sels métalliques. En 1978, Lauterbur *et al.*⁶⁵ injectèrent par voie intraveineuse du chlorure de manganèse (MnCl_2) chez le chien. Il observèrent alors une diminution des temps de relaxation des tissus du myocarde. D'autres sels minéraux (sels de Fe^{3+} , Cu^{2+} , La^{3+} , Ce^{3+} , Gd^{3+})⁷⁴ ont été testés depuis, mais la toxicité de ces agents était trop importante pour une utilisation chez l'homme⁷⁵. Notamment, ces sels se condensent au pH physiologique pour former des hydroxydes insolubles, qui ne sont pas biodégradés.

Les agents actuellement commercialisés sont constitués d'ions gadolinium Gd^{3+} , car ils possèdent le plus grand nombre d'électrons non-appariés (7), ce qui lui confère un moment magnétique plus élevé et donc une plus grande efficacité sur le signal. Le mode d'administration le plus couramment utilisé est l'injection par voie intraveineuse, car elle permet une distribution dans pratiquement tous les organes irrigués. De manière à diminuer la toxicité de ce lanthanide, une grande variété de chélates a été utilisée pour complexer cet ion. L'acide diéthylènetriaminopentaacétique (DTPA), complexé sur l'ion gadolinium (Fig. 2.6), prévient la précipitation de cet ion sous forme de chlorure et les risques inhérents à cet ion libre (blocage du système réticulo-endothélial, échanges avec des ions calcium endogènes). La constante d'affinité du chélate sur cet ion étant élevée, le risque de dissociation est d'autant plus faible. Ces constantes d'affinité ont été augmentées par l'utilisation de macromolécules cycliques comme le DOTA et le DO3A (Fig. 2.6).

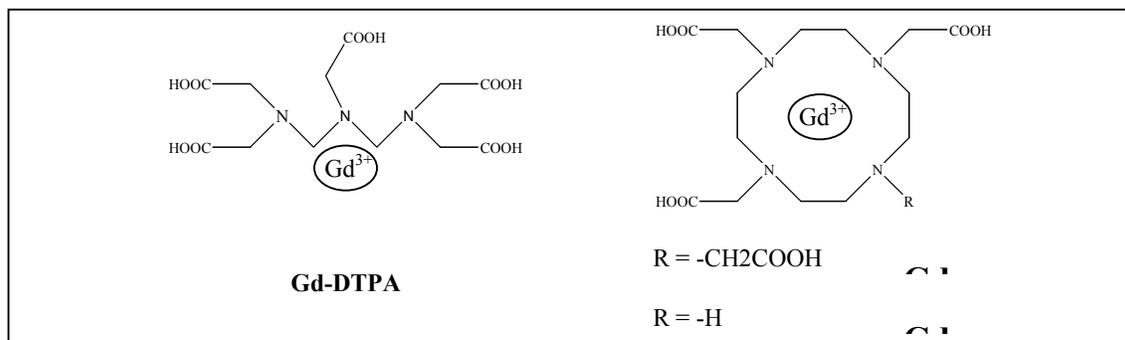


Figure 2.6. Structure des complexes du gadolinium.

Des dérivés du Gd-DTPA ont été conjugués avec des macromolécules comme l'albumine, le dextran ou la polylysine pour développer des agents de contraste

macromoléculaires. Les relaxivités des centres paramagnétiques de ces agents ont ainsi été multipliés parfois jusqu'à un facteur 10, ce qui a permis d'obtenir des relaxivités par molécule de l'ordre de $5800 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Quelques valeurs de ces relaxivités sont exposées à titre indicatif dans le tableau 2.2. Ces agents macromoléculaires permettent de prolonger le séjour dans le sang dans le but d'une imagerie des vaisseaux sanguins (angiographie)⁷⁶⁻⁸⁴.

Composés	Nombre de Gd/molécule	R1/Gd ($\text{mM} \cdot \text{s})^{-1}$)	R1/molécule ($\text{mM} \cdot \text{s})^{-1}$)	Références
Gd-DTPA	1	3,7	3,7	79
Dextran-Gd-DTPA	15	11	11	79
Gd-DTPA-24-cascade polymer	24	10	10	80
Gd-DTPA-polylysine	60	13	13	79
Gd-melanine polymer	40-80	20-40	20-40	81
6-dendrimer-Gd-DTPA	170	34	34	82

Tableau 2.2. Relaxivités de quelques agents de contraste paramagnétiques dérivés du Gd-DTPA

D'autres agents paramagnétiques sont développés dans le but de leur donner une spécificité hépatique et donc un contraste plus marqué au niveau du foie et de la rate. Ceux-ci se présentent généralement sous la forme de liposomes de taille moyenne égale à 100 nm, dans lesquelles est incorporé du Gd-DTPA. Cet aspect particulière permet, d'une part, de modifier la biodistribution de l'agent de contraste et, d'autre part, de diminuer les doses administrées du fait de la concentration élevée du Gd-DTPA à l'intérieur des vésicules⁸⁵. D'autres nanoparticules, les nanogels (250 nm), constitués à partir d'acide polygalacturonique et de manganèse ont permis d'augmenter le contraste hépatique et de détecter des métastases⁸⁶. Récemment des nanoparticules d'hydroxylapatite renfermant des ions Mn^{2+} et stabilisés par un polyéthylène glycol ont présenté des caractéristiques intéressantes (bonne stabilité dans le plasma, relaxivité R1 de $29 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et une taille moyenne égale à 10 nm) pour l'utilisation comme nouveaux agents de contraste paramagnétiques⁸⁷.

Néanmoins, la plupart des produits commercialisés, le Gd-DTPA sous le nom de Magnevist[®] par la société SCHERING et le Gd-DOTA sous le nom de Dotarem[®] par la société GUERBET S.A., n'ont pas de spécificité d'organe particulière et sont utilisés en clinique comme marqueurs d'espaces extracellulaires. Les réactions d'intolérance, qui peuvent être liées à l'hyperosmolalité (600 à 2000 mOsm/kg), sont généralement très rares, car les doses préconisées sont faibles (0,1 mM/kg) et leur élimination rénale est rapide (demi-vie plasmatique de l'ordre de 80 à 100 min).

2.2.3 Les agents de contraste superparamagnétiques

a. Le superparamagnétisme (voir annexe 2)

L'arrangement spatial d'entités paramagnétiques, ions ou molécules, dans un solide génère des interactions entre les différents moments magnétiques. Cette énergie d'interaction, appelée énergie d'échange, confère au solide des propriétés magnétiques particulières appelées ferro-, ferri-, ou antiferromagnétisme.

Dans le cas des composés antiferromagnétiques, le moment magnétique résultant est nul, car cette énergie favorise une orientation antiparallèle de deux spins voisins. Leur susceptibilité augmente avec la température, jusqu'à la température de Néel (T_n), au-dessus de laquelle le composé devient paramagnétique.

Dans le cas du ferromagnétisme, les spins sont alignés dans le même sens, du moins en dessous d'une certaine température, appelée température de Curie (T_c). Au-delà de T_c , l'agitation thermique détruit cet ordre magnétique, le composé devient alors paramagnétique. La susceptibilité magnétique des composés ferromagnétiques, décrite par la loi de Curie-Weiss, est très élevée.

Le ferrimagnétisme est un cas intermédiaire dans lequel les spins sont antiparallèles, mais ne se compensent pas. C'est le cas des solides possédant un ordre cristallin caractérisé par plusieurs sous-réseaux, comme dans les ferrites de structure spinelle, les hexaferrites ou les grenats. Il en découle une aimantation résultante non nulle, qui confère des propriétés similaires à celles des composés ferromagnétiques.

Lorsque les particules ferro- (ou ferri-) magnétiques utilisées sont de taille colloïdale, typiquement de 3 à 15 nm, les grains magnétiques deviennent monodomaines et portent chacun un moment magnétique résultant. Les nanoparticules ont un comportement superparamagnétique lorsque l'énergie d'agitation thermique kT est supérieure à l'énergie d'anisotropie kV . Le lecteur trouvera des précisions sur ce phénomène physique en annexe 2.

b. Description des processus de relaxation

Le moment magnétique de ces nanoparticules, injectées par voie intraveineuse, crée localement une grande hétérogénéité du champ magnétique à travers les molécules d'eau qui diffusent. Cette hétérogénéité du champ local a pour effet d'accélérer le déphasage des spins nucléaires de l'hydrogène et donc de diminuer le temps de relaxation transversale T_2^{88} .

Les premières études de relaxométrie des nanoparticules superparamagnétiques remontent à 1987. Gillis et Koenig⁸⁹ ont tenté d'expliquer les phénomènes de relaxation de ces particules au moyen des équations de Solomon-Bloembergen^{71,72}, utilisées normalement

pour décrire les phénomènes de relaxation des ions paramagnétiques. En 1992, Roch^{90,91} propose d'ajouter une contribution qui prend en compte l'alignement des moments superparamagnétiques le long du champ appliqué B_0 . La théorie qui résulte de ces travaux donne des résultats cohérents avec les particules AMI-25. Cependant Koenig et Kellar⁹² ont constaté que la prise en compte de l'aspect composite de ces particules, organisées sous la forme de clusters de cristaux de magnétite recouverts de dextran, devrait donner un meilleur accord avec l'expérience en considérant que les molécules d'eau ne peuvent pénétrer à l'intérieur de ces agrégats.

En 1997, Bulte et Brooks⁹³ ont suggéré d'ajouter une troisième composante qui prend en compte les effets de surface des nanoparticules. Ils ont choisi de vérifier leur modèle théorique sur des MION-46, car ces produits composés de nanoparticules de magnétite monocristallines de très faible taille (5 nm) développent une surface spécifique élevée et ont très peu tendance à s'agréger. Leur modèle propose les expressions des relaxivités des particules suivantes :

$$(1) : 1/T1_{Fe} = c p_S N_0 \gamma^2 \mu_S^2 \tau r^{-3} \{ [7J(\omega_S) + 3J(\omega)] [1 - L(\omega)^2] + 9J_\infty(\omega) L(\omega)^2 \}$$

$$(2) : 1/T2_{Fe} = c p_S N_0 \gamma^2 \mu_S^2 \tau r^{-3} \{ [6,5J(\omega_S) + 1,5J(\omega) + 2J(0)] [1 - L(\omega)^2] + [4,5J_\infty(\omega) + 6] L(\omega)^2 \} + c \tau \chi^2 (N_0 r^3)^{-1} [4,5J_\infty(\omega) + 6] \omega^2$$

où J est la fonction de densité spectrale de sphère interne qui rend compte de la probabilité par unité de temps pour qu'un mouvement aléatoire τ_S présente une pulsation ω :

$$J(\omega) = \tau_S / [1 + (\omega \tau_S)^2]$$

τ_S est le temps de relaxation électronique ; $J_\infty(\omega)$ correspond à la limite, lorsque τ_S tend vers l'infini ; $L(\omega)$ est la fonction de Langevin : $L(\omega) = \coth(\mu_S B_0 / kT) - kT / (\mu_S B_0)$ et représente l'évolution de l'aimantation des particules monodomaines à la pulsation ω ; $C = 32\pi \cdot 10^{-6} / 405$; N_0 est le nombre d'Avogadro ; γ est le rapport gyromagnétique du proton, μ_S est le moment superparamagnétique d'une particule ; p_S est le nombre de particule rapporté au nombre d'atome de Fer ; r est la distance minimale entre deux protons ; ω est la vitesse angulaire de Larmor des protons ; ω_S est la vitesse angulaire de Larmor des électrons ; T est la température absolue ; k est la constante de Boltzmann ; τ est le temps de diffusion ; χ est la susceptibilité (loi de Curie) ; B_0 est l'intensité du champ magnétique appliqué.

Les deux premiers termes dans les équations (1) et (2) représentent les expressions conventionnelles de la relaxation dipôle-dipôle due à la diffusion par sphère externe, diminuées du facteur $(1-L^2)$. L'autre terme proportionnel à L^2 représente la contribution des moments superparamagnétiques alignés. Le dernier terme quadratique de l'équation (2) représente la composante de susceptibilité magnétique, qui décrit le déphasage des moments nucléaires engendrés par le moment magnétique des ions Fe^{3+} partiellement alignés avec le champ. Ces équations permettent d'ajuster les données mesurées par un relaxomètre à champ variable avec un excellent accord, comme le montre les profils NMRD de la figure 2.7.

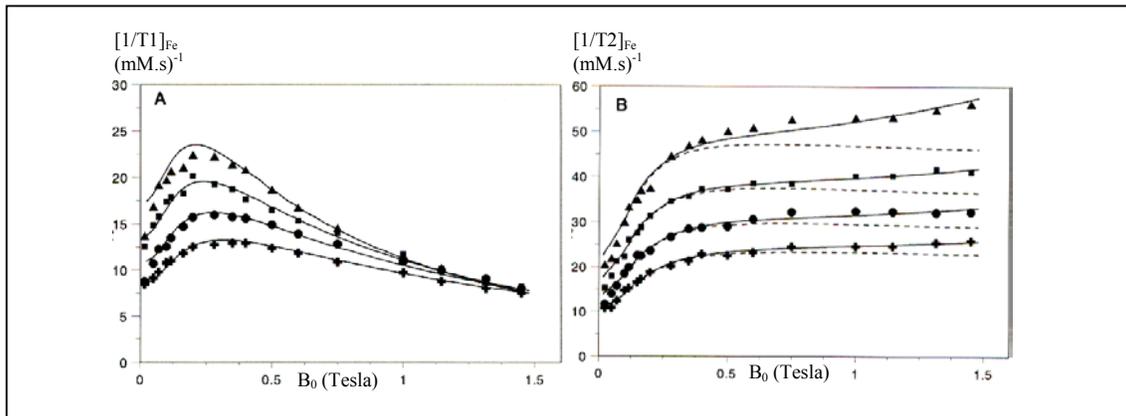


Figure 2.7. Profils NMRD représentant le comportement des relaxivités R1 et R2 d'un agent de contraste superparamagnétique (MION-46) en fonction de l'intensité du champ à 3(▲), 10(■), 23(●) et 37(⊕)°C. Les courbes en trait plein représentent le meilleur ajustement au moyen des équations (1) et (2). Les courbes en pointillés sur le graphe B représentent le résultat de l'ajustement sans la composante de susceptibilité de Curie. D'après J.W.M. Bulte et R.A. Brooks (ref. 93).

Lors de cette approche, Bulte et Brooks ont montré que la contribution de susceptibilité paramagnétique des ions Fe^{3+} permet un meilleur ajustement des courbes de lissage avec les données mesurées. Cette contribution est d'autant plus importante que l'intensité du champ magnétique est élevée. En d'autres termes, ils ont montré pour des petites particules monocristallines que le fer de surface joue un rôle important dans les processus de relaxation. La taille des nanoparticules, l'état d'agrégation, le revêtement polymère, le degré de solvation des nanoparticules superparamagnétiques sont autant d'autres paramètres susceptibles de modifier leurs relaxivités. Cet aspect multiparamétrique rend compte de la complexité des modèles de description des comportements de relaxation.

c. Les produits superparamagnétiques utilisés en IRM

Les agents de contraste superparamagnétiques les plus couramment utilisés en IRM au stade clinique ou en recherche sont constitués de monocristaux d'oxydes de fer ($Fe_2O_3-\gamma$, Fe_3O_4) de taille moyenne allant 5 à 20 nm recouverts par des macromolécules biocompatibles de natures diverses (dextran, albumine⁹⁴, amidon⁹⁵, chitosan⁹⁵, héparine⁹⁶...). Le dextran est

de loin le polymère le plus employé dans la conception de ces produits. En effet, il permet de prolonger la demi-vie plasmatique des nanoparticules *in vivo* par rapport à d'autres polysaccharides comme le mannose ou le galactose⁹⁷. Ces systèmes particuliers présentent des tailles variables qui conditionnent leur biodistribution. On distingue actuellement deux catégories d'agents de contraste superparamagnétiques formés à partir d'oxyde de fer et de dextran (Tab. 2.3):

✓ Les SPIO (Superparamagnetic Particles Iron Oxide) de taille comprise entre 30 et 100 nm. Parmi elles, le Feridex I.V.[®], anciennement appelé AMI-25 ou Endorem[®] (ADVANCED MAGNETICS et GUERBET S.A.), ont été les premiers commercialisés⁹⁸. Les SHU-555 (50 nm) sont réalisées à partir de carboxyméthyl-dextran⁹⁹ dans le but d'améliorer l'adhésion des macromolécules par complexation de groupes carboxyles à la surface des nanoparticules d'oxyde de fer. D'autres systèmes ont été testés *in vivo* sur des rats comme les DM (dextran-magnétite, 100 nm)⁹⁹ ou les MD (magnétite-dextran, 50 nm)¹⁰⁰ et ont montré une spécificité hépatique. Du fait de leur taille relativement élevée, ces produits subissent une capture par le système des phagocytes mononucléés (SPM, voir définition partie I.3) au niveau du foie, de la rate et de la moelle osseuse.

✓ Les USPIO (Ultrasmall SPIO) et les MION (Monocristalline Iron Oxide Nanocompound) de taille comprise entre 10 et 20 nm sont actuellement les systèmes magnétite-dextran de plus petites tailles. Les AMI-227[®] ou Sinerem[®], issues d'une séparation sur colonne des AMI-25, leur confèrent une taille voisine de 11 nm¹⁰¹. Réalisées par Weissleder¹⁰² en 1991, les MION-46 diffèrent des MION-37 par leur quantité relative de dextran par rapport au fer. De ce fait, les MION-46 plus riches en dextran ont une demi-vie plasmatique deux fois plus importante que les MION-37 (i.e. 180 mn)¹⁰³. Ces particules, tout comme les SPIO, subissent une capture par les cellules macrophagiques, mais les particules les plus petites peuvent migrer à travers l'interstitium et diffuser vers les ganglions lymphatiques, ce qui en fait des agents de contraste en lymphographie.

Composés	taille moyenne des particules (nm)	R2/R1
SPIO (AMI-25)	50-100	160/40
SPIO (SHU-555)	30-50	190/24
USPIO (AMI-227)	17-20	53/24
MION-46	18-24	35/16

Tableau 2.3. Caractéristiques de marqueurs superparamagnétiques (milieu aqueux ; 0,47T/37°C), d'après réf. 104.

En termes de biodistribution, ces produits ne sont pas des marqueurs des espaces extracellulaires comme le sont les agents paramagnétiques. Ce sont des marqueurs du SPM avec pour première application, l'imagerie hépatique. La figure 2.8 illustre les effets sur l'IRM au niveau du foie, de l'injection intraveineuse d'agents de contraste paramagnétiques et superparamagnétiques selon leur spécificité (hépatique ou vasculaire). La principale

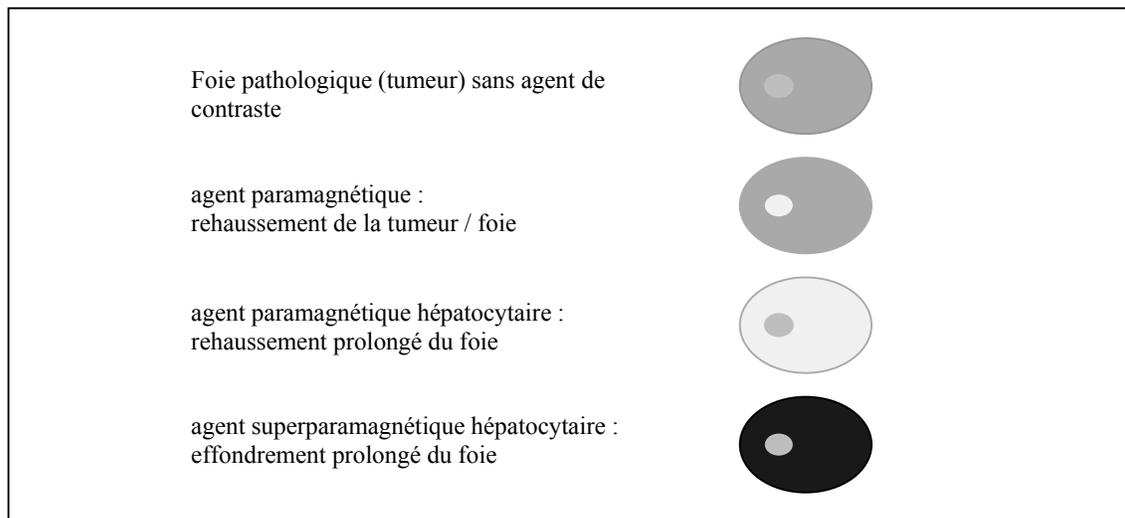


Figure 2.8. Illustration de la distribution des agents de contraste dans le foie selon leur spécificité de ciblage, modulée par la présence d'une tumeur.

application de ces agents de contraste est la détection des tumeurs hépatiques (hépatocarcinomes, lymphomes, hémangiomes) ou de certaines pathologies comme les cirrhoses du foie. Les nanoparticules concentrées dans les cellules macrophagiques du foie provoquent l'effondrement de l'intensité du signal (hyposignal) dans tout le parenchyme hépatique. La lésion ne contenant pas de nanoparticules reste en isosignal. Dans le cas d'agents paramagnétiques, la tumeur étant hypervascularisée, la concentration en agent de contraste est plus importante, par conséquent le contraste est plus intense (hypersignal) au niveau de celle-ci. Lorsque l'agent paramagnétique à une spécificité hépatique, le contraste ne se fait plus au niveau de la tumeur, mais au niveau du foie sain sous la forme d'un hypersignal.

Ces nanoparticules ont une demi-vie plasmatique variable (20-40 min pour les SPIO, plus de 180 min pour les USPIO) et leur clairance hépatique (vitesse d'épuration sanguine au sein du foie et de la rate) est de l'ordre 11 jours. La concentration minimale de magnétite ou de maghémite nécessaire pour engendrer un contraste en IRM dans différents types d'organes a été déterminée par marquage des produits au ^{59}Fe ou par dosage spectrophotométrique du fer dans les tissus des différents organes^{105,106}. Environ une dose de 1mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$,

administrée par voie intraveineuse, est suffisante pour l'imagerie du foie¹⁰⁷. Généralement, les doses préconisées d'injection par voie intraveineuse sont de 10 à 20 $\mu\text{molFe/Kg}$ et le fer biodégradé est intégré dans le « pool » de l'organisme et métabolisé sous formes diverses (transferrine, ferritine, hémosidérine et hémoglobine).

Ces agents de contraste peuvent être utilisés pour d'autres types d'IRM que celui du proton. Par exemple, le système magnétite dextran a permis d'examiner les configurations irrégulières des lésions et notamment des métastases dans le foie en IRM-³¹P lors d'une étude *in vivo*¹⁰⁸. Dans le cadre d'une étude physiopathologique par IRM-²³Na, ce même type de produit a permis de révéler des tumeurs et un œdème par effondrement du signal du sodium contenu dans le plasma et les tissus¹⁰⁹.

D'autres agents de contraste ont été conçus dans le cadre d'une administration par voie orale pour l'imagerie des organes gastro-intestinaux¹¹⁰⁻¹¹². Le Ferumoxsil (connu aussi sous les noms de AMI-121, Gastromark[®] ou Lumirem[®] commercialisé par ADVANCED MAGNETICS et GUERBET S.A.) est constitué de flocculats de nanoparticules de magnétite couplé à un silane aminé¹⁰¹. La taille de ces particules, 300 nm de diamètre moyen, ne permet pas une injection par voie intraveineuse. Une étude menée par d'Arienzo *et al.* a montré l'efficacité de cet agent pour la détection des ulcères du colon dont les résultats sont comparables à ceux obtenus par endoscopie¹¹³.

L'IRM est donc un outil diagnostique extrêmement puissant et non invasif qui permet de visualiser tous les tissus biologiques, sans risque d'irradiation, comme il en existe en tomographie. Pourtant la caractérisation de certaines pathologies requiert l'utilisation d'agents de contraste. Les agents de contraste superparamagnétiques sont particulièrement intéressants car, ils possèdent une forte relaxivité en T2, ce qui permet de diminuer les doses d'injection. Toutefois, l'utilisation de tels agents nanoparticulaires semble limité, selon leur taille, à certains organes (foie, rate, moelle osseuse, ganglions lymphatiques) du fait de la capture par le système immunitaire et de la présence de barrières qui isolent certains organes.

Les développements actuels vont vers des produits plus spécifiques ou mieux tolérés. Notamment, des agents de contraste immunospécifiques ont été développés de manière à cibler les nanoparticules vers des tissus d'autres organes, de tumeurs ou de lésions, à l'aide d'agents de ciblage, généralement des anticorps, couplés à ces produits. Ces anticorps sont reconnus spécifiquement par des récepteurs (antigènes) situés à la surface des membranes cellulaires ciblées. Les propriétés de ces produits sont évoquées dans le cadre de la description des phénomènes qui entrent en jeu dans les processus de biodistribution dans la partie

suyvante.

3. Le devenir des systèmes nanoparticulaires *in vivo*

Les systèmes nanoparticulaires administrés par voie intraveineuse sont reconnus comme des corps étrangers par les cellules du système immunitaire. Il convient donc de préciser les mécanismes d'élimination plasmatique des nanoparticules et les facteurs influençant la biodistribution, afin d'appréhender les moyens pour limiter ou retarder leur capture et de contrôler leur ciblage vers un organe, des lésions ou des tumeurs.

3.1 Système des phagocytes mononucléés (SPM)

Le système des phagocytes mononucléés, appelé aussi plus communément système réticulo-endothélial (SRE), joue un rôle primordial dans la défense de l'individu. Il constitue en quelque sorte la première ligne de défense immunitaire et participe activement à l'extravasation de tout corps étranger de nature infectieuse ou non du système sanguin. Il est composé de **macrophages** (ou phagocytes), libres ou fixés, dans de nombreux tissus, et notamment dans le foie, composé de 33% de cellules de Kupffer, qui représentent près de 90% des cellules macrophagiques de l'organisme¹¹⁴.

La **phagocytose** se produit lorsque le corps étranger a été reconnu comme tel. Le macrophage adhère alors à la surface du corps exogène (fig. 3.1), ce qui a pour effet d'induire un mécanisme au cours duquel des récepteurs membranaires activés transmettent des signaux à l'intérieur de la cellule pour initier la réponse¹¹⁵. Le macrophage s'ouvre alors pour envelopper le corps étranger et former ainsi un phagosome. Durant cette phase le macrophage va « digérer » le système, avant de relarguer les produits de dégradation.

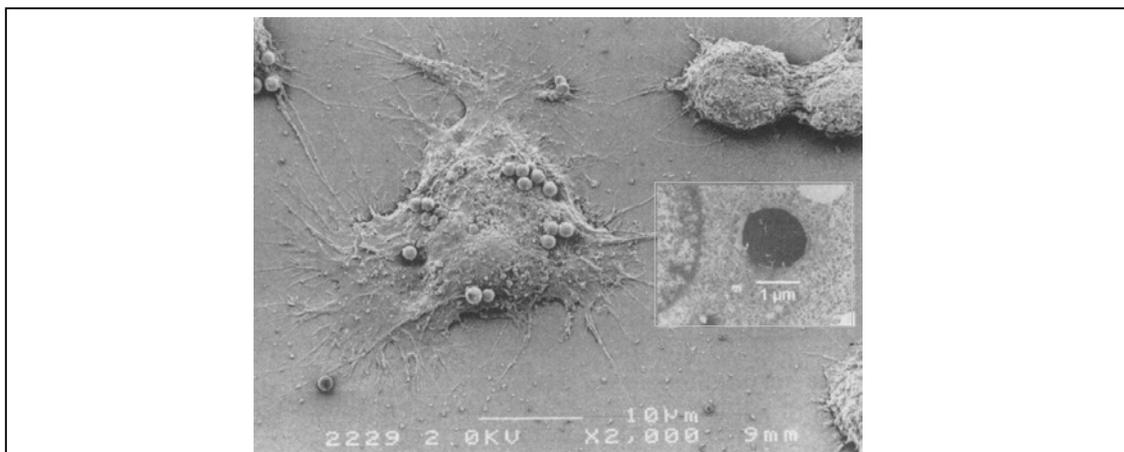


Figure 3.1. Image MEB de particules de magnétite (taille 1,4µm) adsorbées à la surface de macrophages J774A.1 de souris (barre = 10µm). En médaillon, image MET de particules phagocytées à l'intérieur d'un phagosome. D'après W.Möller *et al.*¹¹⁶

L'adhésion à la surface du phagocyte peut être :

- le fait d'interactions de surface attractives de type van der Waals, électrostatiques ou hydrophobes ;
- ou due à la formation de liaisons entre les récepteurs membranaires et des protéines circulantes, les opsonines, préalablement adsorbées à la surface des corps étrangers. Ce dernier phénomène, appelé **opsonisation**, est un processus qui permet aux macrophages de reconnaître sélectivement les surfaces recouvertes de ces protéines circulantes que sont les fibronectines, les immunoglobulines (IgG) ou le facteur C_{3b} du complément.

Parce que toutes les cellules sont alimentées par la circulation sanguine, les vecteurs administrés par voie intraveineuse (IV) peuvent être capturés par des cellules différentes des macrophages. On peut citer comme exemple, les cellules endothéliales qui possèdent une activité de capture non négligeable. D'autres mécanismes, comme la pinocytose, sont des phénomènes de ciblage passif qui peuvent se produire pour des particules de très petite taille.

3.2 Facteurs influençant la biodistribution des vecteurs

3.2.1 Influence de la taille du vecteur

La perméabilité des parois vasculaires par rapport à la taille des systèmes particuliers est un facteur déterminant de la biodistribution. Ces parois possèdent des capillarités plus ou moins grandes selon le type de tissus ou d'organes. Le lit capillaire des poumons filtre mécaniquement les particules de taille moyenne supérieure à 7 μm ^{117,118}. Les cellules de l'endothélium vasculaire de la plupart des tissus comme ceux des muscles ou des poumons possèdent des jonctions intercellulaires espacées d'environ 6 nm susceptibles d'être traversées par les nanoparticules de plus petites tailles vers l'espace extravasculaire. Les cellules des reins, des intestins ou de certaines glandes endocrines ou exocrines possèdent des fenêtres ou des ouvertures d'une cinquantaine de nanomètres de diamètre. Les capillaires sinusoïdaux du foie, de la rate et de la moelle osseuse ont un diamètre de l'ordre de 0,1 à 1 μm ¹¹⁹. Quant au système nerveux central, il est isolé par une barrière imperméable de cellules accolées, appelée **barrière hématoencéphalique** (BHE). Des expériences menées par Kreuter *et al* ont consisté à injecter par voie intraveineuse des systèmes particuliers, liposomes, microémulsions, niosomes ou nanoparticules, de tailles diverses et de comparer leur distribution dans les organes¹²⁰. Les plus grosses particules sont aussitôt filtrées par les vaisseaux capillaires des poumons. Quant aux plus petites, 10 minutes après l'injection, elles

sont capturées par le SPM et 60 à 90% d'entre elles sont localisées dans le foie, 2 à 20% dans la rate et 1% dans la moelle osseuse. Le tableau 3.1 rassemble les organe-cibles des agents de contraste nanoparticulaires en fonction de leur taille.

Classe	Composé	Taille (nm)	Organes ciblés	Stabilisant	Marqueur magnétique	Référence
SPIO	MION-46	18-24	SRE, ganglions lymphatiques	dextran	MION	121,122
	AMI-227	17-20	SRE, ganglions lymphatiques	dextran	USPIO	123,124-127,98
	SHU-555	30-50	SRE, foie	dextran	USPIO	128,99
	AMI-25	50-100	SRE, foie	dextran	SPIO	129
	PL/TA-SPIO ⁽¹⁾	50-80	Système sanguin	dextran	SPIO	130
Liposomes	Gd-DTPA-liposomes	30-50	SRE, foie	liposome	Gd-DTPA	131
	MION – liposomes	170-360	SRE, foie	liposome	MION	132

Tableau 3.1. Influence de la taille des agents de contraste sur le ciblage d'après [119]. (1) PL/TA-SPIO : SPIO encapsulé dans des micelles de phospholipides stabilisées par des tensioactifs.

De manière générale, les systèmes particuliers d'une taille supérieure à 50 nm sont phagocytés rapidement et se retrouvent localisés dans le foie, la rate et la moelle osseuse. Le composé magnétite-dextran, l'AMI-25, de la classe des SPIO, de taille moyenne de 80 nm, a été approuvé cliniquement pour l'utilisation comme agent de contraste à rémanence hépatique. Les plus fines particules USPIO ont une demi-vie plasmatique plus longue, 200 min pour l'AMI-227 et 180 min pour les MION-46, en comparaison avec l'AMI-25 et le SHU-555 qui possèdent des demi-vies respectives de 8 et 10 min¹¹⁹. Les USPIO sont donc susceptibles de traverser en partie l'espace interstitiel pour atteindre les vaisseaux lymphatiques. Leur utilisation en lymphographie a été démontrée¹³³.

Les tumeurs présentent généralement des anomalies de perméabilité. Leurs vaisseaux capillaires sont plus perméables que les vaisseaux continus et présentent souvent des fenêtres. Cette augmentation de perméabilité peut favoriser la diffusion de vecteurs munis d'agents de ciblage dans le cadre d'une thérapie. Les tumeurs possèdent, en outre, une hypervascularisation ce qui permet de les distinguer sans ambiguïté en IRM.

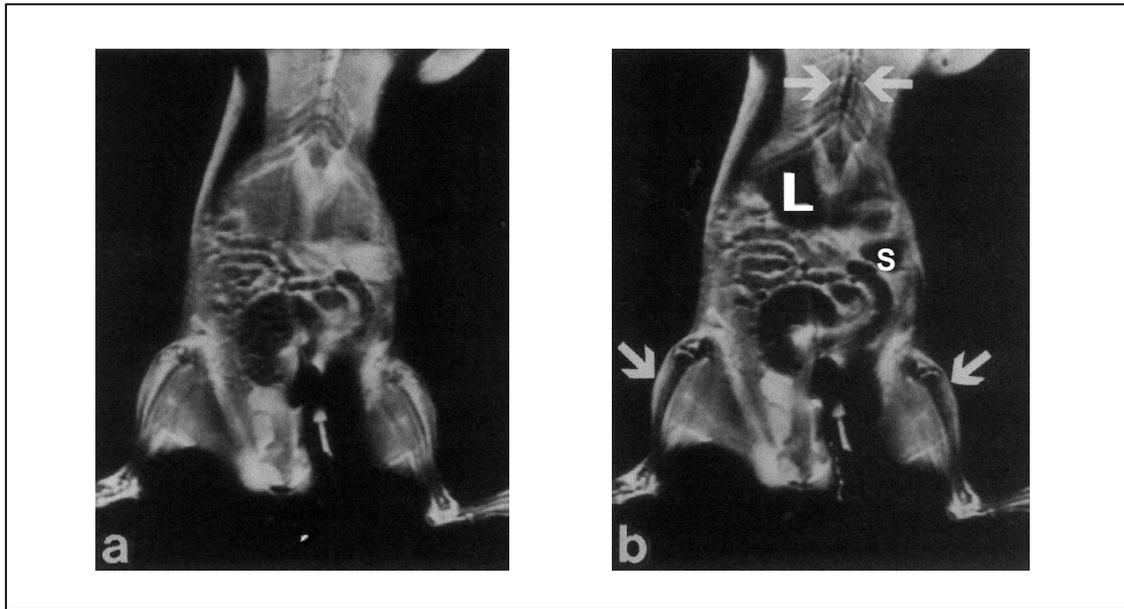


Figure 3.2. Images IRM d'un rat avant (a) et 1 h après (b) injection de magnétoliposomes ML-PEG (taille moyenne égale à 40 nm). Les flèches indiquent la localisation du contraste au niveau de la moelle osseuse des fémurs, des tibias et de l'iliaque. On peut remarquer les signaux négatifs du foie (L) et de la rate (S), qui indiquent la présence de magnétite dans ces organes. D'après J.W.M. Bulte *et al.*(ref. 149)

La taille du vecteur se présente donc comme un paramètre ajustable tant pour l'imagerie de tissus ciblés que dans le cadre d'une stratégie thérapeutique envisagée. Cependant ce n'est pas le seul facteur qui joue sur la biodistribution. En effet, on a pu remarquer (tab. 3.1) que les nanoparticules PL/TA-SPIO (ferrosomes), qui ont une taille comprise entre 50 et 80 nm, sont des agents de contraste à rémanence vasculaire car, contrairement aux autres, elles ne sont pas capturées rapidement par le SPM. A l'inverse, des magnétoliposomes (liposomes contenant des nanoparticules de magnétite) de 40 nm ont été capturé 1h après administration i.v. dans le rat (voir fig. 3.2). Ces deux cas montrent que la taille des particules n'est pas le seul paramètre qui définit leur biodistribution. En l'occurrence, ici, c'est bien la nature de la surface qui distingue le comportement des particules en milieu sanguin par rapport aux autres.

3.2.2 Influence de la surface du vecteur

La charge surfacique peut avoir un effet sur la clairance sanguine (vitesse d'épuration sanguine au sein d'un organe) des particules injectées par voie intraveineuse. L'expérience de Wilkins et Meyers¹³⁴, dans les années 60, faite sur des particules de polystyrène de 1,3 μm modifiées par de la gomme arabique chargée négativement ou de la polylysylgélatine chargée positivement a démontré cette prédisposition des particules chargées à être capturées plus

rapidement que les neutres. Des travaux similaires avec des liposomes ont montré que l'augmentation du potentiel de surface négatif par adsorption de phosphates augmente de manière importante la capture par les macrophages péritonéaux de souris. Cet effet a été attribué à l'opsonisation par le facteur C_{3b} du complément¹³⁵. D'autres études ont montré que des liposomes chargés négativement avaient des taux de clairance beaucoup plus élevés avec des concentrations dans le foie et la rate plus conséquents que dans le cas de liposomes neutres ou chargés positivement¹³⁶⁻¹⁴⁰. Cette relation entre potentiel de surface (ou potentiel zêta) et phagocytose est confirmée avec des particules d'albumine¹⁴¹ et des microsphères de cellulose¹⁴².

Dans le but d'augmenter la rémanence vasculaire des particules, les chercheurs se sont intéressés, dès le début des années 80, à l'adsorption de polymères neutres et hydrophiles. Illum et Davis¹⁴³ ont étudié l'influence de l'adsorption de poloxamers sur des latex de polystyrène (PS). Les poloxamers sont des copolymères à blocs de poly(oxyde de propylène) (POP) de nature hydrophobe et de poly(oxyde d'éthylène) (POE) de nature hydrophile. La longueur des chaînes est variable de manière à ce que la balance hydrophile-hydrophobe soit ajustable. L'adsorption de ces macromolécules a une double incidence sur la surface des particules de latex de PS : d'une part, il diminue le potentiel zêta vers une charge de surface nulle et donc les interactions de nature électrostatique^{144,145}; d'autre part, il diminue le caractère hydrophobe de cette surface réduisant ainsi les interactions avec les opsonines qui possèdent des chaînes à caractère amphiphile^{146,147}. Ces mêmes auteurs ont observé dans le cas du poloxamer 338 ($\overline{M}_w=14000$, 40% POE) une diminution de 70% de la capture hépatique par rapport aux particules natives. Ils ont constaté que le même type de revêtement sur des liposomes de 90 nm n'avait aucune incidence sur leur biodistribution¹⁴⁸. Dans ce cas là, il semble que l'adsorption n'ait pas été efficace et qu'un greffage covalent s'impose.

Plus récemment, Bulte *et al.*¹⁴⁹ ont mis au point des magnétoliposomes, les ML-PEG, constitués de nanoparticules de magnétite stabilisées par de l'acide laurique. En recouvrant ces liposomes par des surfactants non ioniques contenant des chaînes de POE, ils ont réussi à retarder la capture macrophagique, obtenant une demi-vie plasmatique de 53 min alors que leurs homologues non recouverts, chargés négativement, ont été phagocytés aussitôt après l'injection. Les POE et le poly(éthylène glycol) (PEG) sont des polymères reconnus par la *Food and Drug Administration* américaine comme étant non-toxiques. Ils ont en outre l'avantage d'être neutres, hydrophiles et biorésorbables sous réserve que leur masse molaire

soit inférieure à $20\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [ref.¹⁵⁰]. Enfin, ils possèdent un caractère non-immunogène. En effet, le greffage de chaînes de POE ou de PEG à la surface des particules génèrent des répulsions stériques qui rendent difficiles l'adsorption des opsonines. A l'heure actuelle, les POE constituent des macromolécules de choix pour le recouvrement de surface des nanoparticules injectées par voie intraveineuse¹⁵¹⁻¹⁵⁴.

Bien que moins efficaces, d'autres polymères hydrophiles comme le dextran, l'alcool polyvinylique, la carboxyméthylcellulose retardent la phagocytose¹⁴⁵. Les protéines comme l'albumine ne ralentissent que très peu la capture macrophagique du fait de la présence de charges anioniques portées par les carboxyles et cationiques portées par les amines⁹⁴. Dans tout les cas, le retard de la captation hépatique semble dépendre de la quantité de polymère adsorbé à la surface. Grüttner *et al.* ont étudié l'influence de la masse molaire moyenne en masse (\overline{M}_w) du dextran adsorbé sur la charge surfacique de nanoparticules de magnétite⁹⁵. Ils ont comparé la mobilité électrophorétique des particules en fonction du pH entre des nanoparticules stabilisées par du dextran de 15 kD et 40 kD (1 kD= $1000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Les mobilités mesurées correspondant aux particules stabilisées par le dextran de plus haut poids moléculaire sont décalées vers les valeurs négatives et sont plus faibles en valeur absolue que les particules stabilisées par le dextran de bas poids moléculaire ce qui semble montrer que le dextran de 40 kD recouvre mieux la surface. En outre, pour un mode d'adsorption identique, un polymère de haut poids moléculaire génère des répulsions stériques plus fortes vis-à-vis des opsonines qu'un polymère de bas poids moléculaire. Ces résultats expliquent que les nanoparticules de faible taille préparées avec des polymères neutres et hydrophiles de haut poids moléculaire sont lentement capturées par le SPM contrairement aux particules stabilisées par des polymères de faible poids moléculaire^{155,156}.

La nature des macromolécules, la taille ou l'épaisseur de la couche polymère ne sont pas les seuls paramètres qui influencent la biodistribution des nanoparticules. Le mode de greffage et la nature de la liaison entre les macromolécules et la surface des particules sont autant de paramètres à prendre en compte lors de l'assemblage de ces systèmes. En effet, pour favoriser la stabilisation stérique de ces dispersions colloïdales et limiter l'adsorption des opsonines, la couche polymère doit être aussi dense que possible de façon à générer une extension maximale de ses chaînes. D'autre part, l'adsorption de macromolécules résulte d'un équilibre qui peut être déplacé en milieu physiologique en faveur de la déplétion. Les particules peuvent perdre leur revêtement lors de leur diffusion dans le milieu sanguin, ce qui

a pour effet de favoriser la capture macrophagique, voire même de faire flocculer la dispersion colloïdale¹⁵⁷. De ce point de vue, des efforts doivent être entrepris pour améliorer l'adhésion du polymère à la surface des nanoparticules.

3.2.3 Influence de l'injection d'une forte dose de nanoparticules

Afin d'augmenter la rémanence vasculaire des systèmes particulaires, certains chercheurs ont envisagé de bloquer le SPM en injectant des doses importantes de matériel. La présence d'un grand nombre de particules peut affecter le taux de clairance initial, cependant la distribution à l'intérieur du SPM ne semble pas altérée¹⁵⁸. Par contre, l'injection d'une large dose ou de plusieurs doses répétées peut permettre de saturer le SPM. C'est de cette manière que Illum¹⁵⁹ *et al.* ont diminué la capture hépatique du polystyrène de 90% à 30% en injectant préalablement du dextran sulfaté 500. Récemment, Dousset *et al.*¹⁶⁰ ont constaté que l'injection d'une large dose d'AMI-227 (300 $\mu\text{mol/kg}$) sur des rats Lewis augmente considérablement la demi-vie des USPIO dans le système sanguin (de 5 à 6 heures) en comparaison avec les doses humaines recommandées en lymphographie (45 $\mu\text{mol/kg}$ de corps).

Toutefois, cette approche ne peut pas être utilisée en clinique, car elle peut causer des effets plus ou moins graves comme l'atténuation de l'activité du système immunitaire, la création d'embolies du fait de l'adsorption locale sur les parois des vaisseaux capillaires de particules sous forme d'agrégats, la toxicité due à une surdose de fer biodégradé...

3.3 Distribution spécifique vers des organes ou des tissus

3.3.1 Ciblage par couplage de molécules effectrices ou d'anticorps

La liaison de certaines molécules reconnues par des récepteurs de surface cellulaires, comme des sucres, des lectines et des protéines hormonales peut être utilisée pour cibler les vecteurs vers des types cellulaires. La reconnaissance spécifique, ou le ciblage actif, par les récepteurs membranaires aboutit à une internalisation des vecteurs à l'intérieur de ces cellules. Ainsi, les hépatocytes (cellules sanguines) qui possèdent les récepteurs membranaires spécifiques de résidus de galactose, les asialoglycoprotéines, ont été ciblés par des MION et des USPIO couplés avec un polysaccharide, l'arabinogalactane^{161,162}. Par ailleurs, des protéines hormonales telles que la cholécystokinine et la sécrétine, qui favorisent la sécrétion des sucs digestifs et des hormones du pancréas, ont été greffées sur des MION afin de cibler

le parenchyme pancréatique^{163,164}. Les cellules tumorales expriment, elles aussi, des récepteurs membranaires susceptibles d'être ciblées. Par exemple, l'acide folique est connu comme agent de ciblage spécifique pour 90% des tumeurs des ovaires¹⁶⁵.

Les anticorps se présentent comme un choix idéal pour la vectorisation de systèmes particuliers vers des cellules cibles du fait de leur haute spécificité vis-à-vis des antigènes qui peuvent être des récepteurs membranaires. Leur couplage sur des particules superparamagnétiques a été développé pour détecter les zones inflammatoires. Dans ce but, des MION ont été couplés avec des anticorps monoclonaux, les immunoglobulines G (IgG)¹⁰². Injectés à des animaux sains, les MION-IgG se sont localisés dans le foie, la rate et la moelle osseuse. Par contre sur des animaux porteurs de lésions inflammatoires, les particules se sont concentrées, 1 h après l'injection, au niveau de ces lésions.

Suzuki *et al.*¹⁶⁶ ont développé des agents de contraste immunospécifiques à base de magnétite et de POE, les Mab-magnétite. Des anticorps G-22 reconnus par des cellules de tumeurs du cerveau (gliomes) sont couplés aux particules magnétiques. 48 h après l'injection de ces particules, administrées par une dose de 100 $\mu\text{mol Fe/kg}$, 50% de l'intensité du signal en T2 diminue (hyposignal) au niveau des tumeurs.

Des SPIO couplés par des anticorps monoclonaux mab 610 ont été ciblées vers des cellules cancéreuses (HT-29, lignée du cancer du colon chez l'homme) sur des souris¹⁶⁷. Seulement un à deux anticorps par particule ont suffi pour que le ciblage soit effectif. La biodistribution de ces agents de contraste en a été totalement bouleversée. En effet, un effondrement de 42% du signal a été constaté au niveau de la tumeur, alors qu'une baisse de seulement 3% a été mesurée au niveau du système hépatique.

Tiefenauer *et al.*¹⁶⁸ ont développé des agents de contraste à base de nanoparticules de magnétite enrobées par un copolymère acide polyglutamique-lysine-tyrosine (PEKY) couplés par un anticorps (AB_{CEA}) spécifique de l'antigène carcinoembryonique (CEA). Les tests *in vitro* ont montré une adsorption non spécifique des antigènes C4 du facteur du complément. Les tests *in vivo* sur des souris avec tumeurs ont montré une élimination complète et rapide du produit magnétite-PEKY- AB_{CEA} vers les organes hépatiques. Cependant ces mêmes expériences, reproduites avec le produit magnétite-PEKY recouvert de PEG, ont permis d'augmenter sensiblement le ciblage vers la tumeur.

D'autres anticorps ont été couplés à des agents de contraste dans des contextes thérapeutiques différents. On peut citer en exemple, les anticorps OX35 anti-rat CD4 (spécifiques de l'arthrite) couplés sur des agents de contraste DM¹⁶⁹, les mab (spécifiques des cellules cancéreuses de l'œsophage) couplés sur des nanoparticules FML (magnétite-

lignosulfonate)¹⁷⁰ et les 436G10 (spécifiques du mélanome) couplés sur des nanoparticules de magnétite¹⁷¹.

Les agents de contraste immunospécifiques ont également été développés pour le marquage spécifique de cellules circulantes.

3.3.2 Marquage de cellules circulantes par des agents de contraste

Une approche récente consiste à marquer par des agents de contraste (AMI227, MION), les globules blancs (leucocytes) et plus particulièrement certains macrophages, les monocytes et les lymphocytes, afin d'étudier la migration de ces cellules en lymphographie¹⁷²⁻¹⁷⁴. Ces cellules du système immunitaire ont la particularité de se concentrer autour des lésions ce qui en fait de bons candidats tant pour la vectorisation de marqueurs magnétiques, radioactifs ou fluorescents que pour la vectorisation de substances thérapeutiques. Ce mode de ciblage est effectif si des lésions sont présentes, car celles-ci stimulent le système immunitaire en augmentant l'activité macrophagique. Les premiers travaux réalisés par Chan *et al.*¹⁷⁵ ont démontré la possibilité d'induire un contraste en IRM autour d'un abcès, après injection intraveineuse de cellules macrophagiques migratrices marquées par des oxydes de fer recouverts par des lipides (ferrosomes).

Des USPIO injectées par voie intraveineuse ont permis de révéler des lésions de deux types de néphropathies, affections caractérisées par des lésions diffuses d'un ou des deux reins, la glomérulonéphrite et l'hydronéphrite¹⁷⁶. Dans le premier cas, une diminution de l'intensité du signal a été observée uniquement dans la zone inflammatoire, c'est-à-dire au niveau du cortex rénal. Dans le cas de la deuxième pathologie, la diminution du signal a été observée dans tous les compartiments du rein dont les lésions diffuses de l'espace interstitiel. Cette différence de ciblage est due au fait que, dans la glomérulonéphrite, l'activité macrophagique prédomine dans le cortex rénal tandis que, dans l'hydronéphrite, elle se situe au niveau de l'interstitium du rein. La microscopie électronique a ensuite permis d'attribuer la capture des nanoparticules par les cellules macrophagiques et les cellules glomérulaires (cellules endothéliales). Ces expériences montrent la grande spécificité du ciblage macrophagique autour de lésions issues de pathologies différentes dans un même organe.

Dernièrement des cellules autres que les globules blancs, comme les cellules neurales souches embryonnaires (cellules prélevées au stade de neurulation embryonnaire débutant à 18-19 jours chez la femme enceinte, sur la plaque neurale, ébauche du système nerveux, d'un

embryon) et des cellules cancéreuses de poumons, ont été marquées par des magnétodendrimères¹⁷⁷. Lewin et Carleso¹⁷⁸ ont réalisé des nanoparticules superparamagnétiques CLIO (CrossLinked superparamagnetic Iron Oxide) doublement marquées par des peptides (HIV-Tat) couplés à un fluorochrome (FITC) et un isotope radioactif (¹¹¹In). Ces nanoparticules ont été internalisées dans des cellules hématopoïétiques (CD34⁺) et des cellules souches neurales progénitrices à raison de 10-30 pg d'oxyde de fer par cellule. La présence de ces marqueurs n'a affecté ni la différenciation, ni la viabilité de ces cellules. Une fois injectées sur une souris immunodéficiente, ces cellules se différencient dans la moelle osseuse. Après localisation par IRM, les cellules injectées ont été séparées des autres sur des colonnes magnétiques. Cette étude de faisabilité, qui démontre que ces cellules marquées gardent leur capacité de différenciation, peuvent être visualisées par IRM et peuvent être extraites des autres cellules, constitue une avancée dans l'utilisation des cellules souches embryonnaire en vue d'une utilisation thérapeutique, par exemple pour réparer certaines lésions du système nerveux central.

3.4 Biocompatibilité des vecteurs

Etant donné le caractère exogène des nanoparticules injectées par voie intraveineuse, celles-ci doivent subir divers tests de toxicité avant de pouvoir être utilisées. Notamment, il faut vérifier que ces matériaux ne sont pas susceptibles d'interagir avec le sang et qu'ils n'induisent pas d'effets thrombogènes ou immunogènes. Par exemple, des ferrofluides ioniques de magnétite et de maghémite stabilisés ou non par des tartrates, injectés par voie intraveineuse dans des souris, se sont avérés hautement toxiques. Ces dispersions ont engendré des réactions inflammatoires sévères, des morts cellulaires et se sont révélées mutagènes¹⁷⁹. Afin d'éviter cette déconvenue, le choix initial des matériaux et notamment des macromolécules utilisées dans la fabrication des vecteurs et des agents de contraste doit être fait en prenant soin de vérifier leur hémocompatibilité. Des tests de cytotoxicité *in vitro* doivent aussi être envisagés pour vérifier l'inertie des particules vis-à-vis des cellules et particulièrement par rapport aux cellules endothéliales, situées à l'interface entre le sang circulant et le tissu vasculaire, qui jouent un rôle clef dans les mécanismes de coagulation du sang¹¹⁴.

4. Problématiques de l'étude

Les matériaux nanocomposites réalisés dans le cadre de notre étude sont conçus à partir d'une structure de base identique, seule les dernières étapes d'habillage de ces vecteurs sont modulées selon l'application recherchée.

La première application (§ 4.1) s'inscrit dans un contexte d'approche thérapeutique dans laquelle les vecteurs sont destinés à l'administration par voie intraveineuse.

La deuxième application (§ 4.2) se situe dans le cadre d'une approche diagnostique qui utilise l'imagerie cellulaire, par phagocytose de nanoparticules magnétiques.

4.1 Synthèse de vecteurs magnétiques à rémanence vasculaire aptes à transporter des substances bioactives

L'administration d'agents anticancéreux dans l'organisme est un moyen efficace pour enrayer certaines maladies comme les leucémies, les lymphomes, le cancer des testicules ou les tumeurs malignes. Cette méthode est souvent associée à plusieurs thérapies comme la chirurgie et la radiothérapie qui donnent de meilleurs résultats que ces thérapies seules. Néanmoins, la chimiothérapie ne permet pas de guérir la majorité des cancers courants. Détruisant de nombreuses cellules saines, elle entraîne d'importants effets secondaires (anémie, diarrhées, nausées, vomissements, ...) et engendre des phénomènes de résistance pléiotropique (MDR : Multi Drug Resistance) conduisant à une inefficacité du traitement¹⁸⁰.

L'utilisation des vecteurs en chimiothérapie présente de nombreux intérêts. D'une part, ce moyen permettrait de diminuer les effets secondaires pour deux raisons : la liaison du médicament anticancéreux sur le vecteur empêcherait son activité cytotoxique et elle permettrait de diminuer les doses en ciblant le médicament, là où il doit agir. D'autre part, le ciblage d'une grande quantité d'agents anticancéreux vers des cellules tumorales augmenterait l'efficacité du traitement et permettrait d'éviter les phénomènes de biorésistance. L'association de médicaments anticancéreux et d'agents de ciblage de cellules cancéreuses à un vecteur magnétique permettrait de suivre l'évolution de la tumeur au cours du traitement et donc de faire un suivi diagnostique par IRM.

Dans le cadre de notre étude, des vecteurs seront synthétisés selon la structure décrite dans le schéma (Fig. 4.1). Ils seront constitués notamment : de nanoparticules superparamagnétiques générant un contraste en IRM ; de macromolécules permettant la stabilisation de ces systèmes colloïdaux en milieu physiologique et le greffage d'agents

anticancéreux ; de chaînes de POE augmentant la rémanence vasculaire de l'ensemble et d'un agent de ciblage (peptide) qui permettra la reconnaissance de récepteurs spécifiques situés à la surface des cellules cibles.

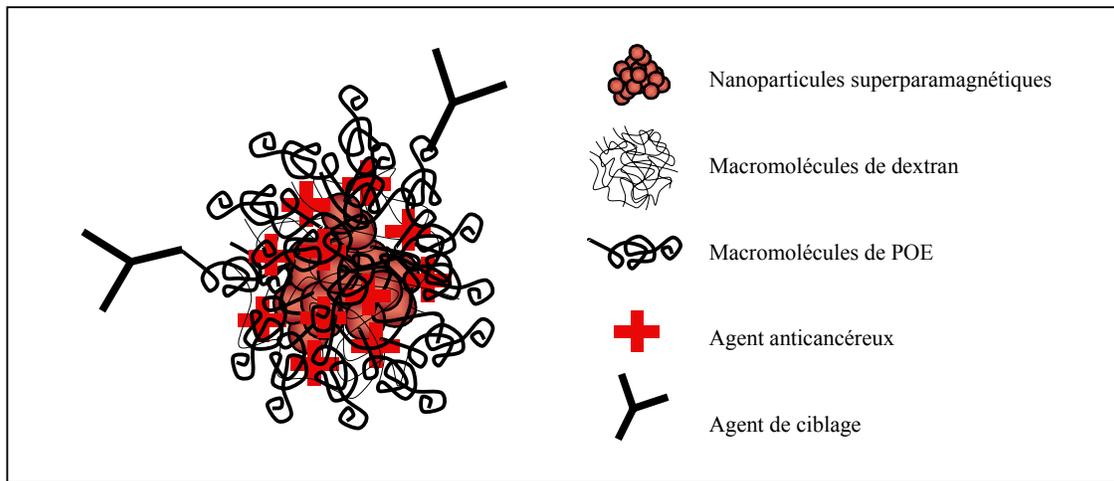


Figure 4.1. Représentation schématique des vecteurs magnétiques recherchés dans le cadre de cette étude.

L'agent anticancéreux utilisé dans un premier temps sera la doxorubicine qui fait partie de la famille des camptothécines, de la classe des topoisomères II qui agit en s'intercalant entre la double hélice de l'ADN des cellules. D'autres médicaments pourront être utilisés pour accroître l'efficacité des traitements. Des agents de ciblage pourront être couplés à la surface des vecteurs sur les extrémités des chaînes de POE. Arap, Pasqualini et Ruoslahti ont isolé des peptides pour cibler un agent antitumoral, la doxorubicine, spécifiquement vers le système vasculaire de tumeurs humaines greffées chez des souris¹¹. Le système vasculaire des tumeurs est une cible intéressante pour le traitement des cancers, car il est composé de cellules endothéliales génétiquement stables qui ne mutent pas en variante résistante au médicament^{181,182}. De plus ces cellules sont plus accessibles aux médicaments et possèdent un mécanisme intrinsèque d'amplification, qui fait que l'élimination d'une seule cellule endothéliale peut inhiber la croissance de 100 cellules tumorales¹⁸³. Des expériences *in vivo*, réalisées sur des souris possédant des tumeurs, ont montré qu'après 35 jours, 100% des souris pour lesquelles l'immunotoxine a été administrée, ont survécu tandis qu'au bout de 28 jours, toutes les souris traitées par la doxorubicine sont mortes. Ces agents de ciblage ont permis, en augmentant la spécificité du traitement, d'augmenter l'efficacité du médicament tout en diminuant sa toxicité. De tels agents de ciblage permettraient de vectoriser spécifiquement les nanoparticules magnétiques munies de médicaments vers les récepteurs exprimés par les cellules endothéliales du système vasculaire des tumeurs.

4.2 Vectorisation dans le cerveau de cellules macrophagiques chargées de nanoparticules magnétiques et fluorescentes en vue d'un double marquage IRM et histologique

La sclérose en plaques (SEP), qui est la maladie neurologique la plus fréquente (1:1000) chez le jeune adulte (20 à 40 ans), représente un véritable problème de santé publique. Environ 60.000 personnes en France sont atteintes par cette maladie dont la physiopathologie n'est pas élucidée. Cette maladie du SNC se déclare par une destruction graduelle de la myéline, la substance blanche et lipidique qui enveloppe les fibres nerveuses, ce qui entraîne de multiples lésions dans le cerveau et la moelle épinière. Elle est en outre, associée avec une atteinte plus ou moins complète de cellules nerveuses, les oligodendrocytes, une remyélinisation le plus souvent incomplète, des lésions axonales et une gliose astrocytaire.

Afin de répondre aux problématiques de la SEP, des radiologues, neurobiologistes et neurologues ont focalisé leurs recherches sur les mécanismes d'initiation de la phase inflammatoire et démyélinisante du SNC, dont l'interaction des cellules mononucléaires phagocytaires circulantes avec les cellules du SNC joue un rôle clé dans le développement et le maintien de la maladie. Cette interaction fait intervenir notamment la barrière hémato-encéphalique (BHE) comme frontière entre les deux systèmes.

L'injection d'USPIO sur des modèles animaux proches de la SEP humaine comme l'encéphalomyélite auto-immune (EAE) chez le rat Lewis a permis d'élucider certaines interactions entre l'activation des cellules du SNC et le SPM de l'organisme. Les USPIO (AMI-227) injectées par voie intraveineuse ont permis de révéler par IRM la présence de ces nanoparticules dans des phagocytes mononucléaires à l'intérieur des sites inflammatoires du SNC contrairement aux complexes du Gadolinium (Gd-DOTA) qui n'ont induit aucun contraste au niveau de ces lésions¹⁶⁰. Cette expérience a suscité de nombreuses questions quant aux mécanismes de diffusion des nanoparticules à travers la BHE. En effet, trois hypothèses ont été évoquées pour expliquer le passage des nanoparticules magnétiques à travers la BHE¹⁸⁴: i) les nanoparticules USPIO traversent la BHE rompue et sont ensuite capturées par les macrophages du SNC. Cette hypothèse a été rejetée car le Gd-DOTA aurait diffusé à travers les ouvertures de cette barrière également ; ii) les nanoparticules traversent l'endothélium puis l'espace interstitiel avant d'être capturées par les microglies (macrophages du SNC) ; iii) les nanoparticules sont capturés par des macrophages périphériques comme les

monocytes du sang ou les macrophages des ganglions lymphatiques qui traversent la BHE pour migrer vers les lésions du SNC.

Pour tenter de répondre à cette question, notre objectif sera de marquer des cellules hématopoïétiques Sca1+ (cellules progénitrices de la moelle osseuse ou leurs cellules dérivées macrophagiques équivalentes de CD34+ et CD14+ humain) *ex vivo* par des nanoparticules magnétiques et fluorescentes (Fig. 4.2) de manière à ce qu'elles soient visibles en IRM et par observation classique des coupes histologiques au microscope à épifluorescence.

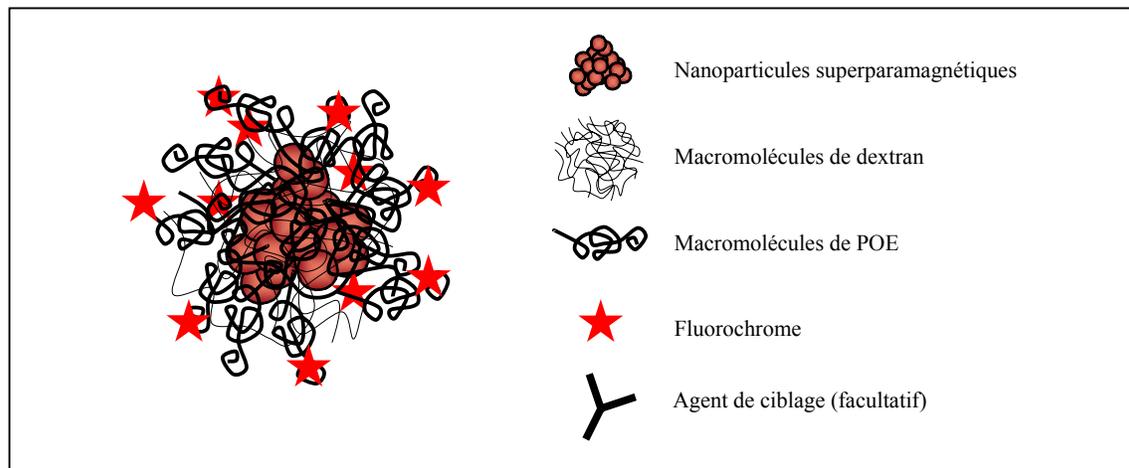


Figure 4.2. Double marqueurs superparamagnétiques et fluorescents synthétisés dans le cadre de cette approche.

Les avantages de ce double marquage sont multiples : il permet de suivre la migration et le ciblage de ces cellules vers les lésions du SNC par deux techniques différentes. En l'occurrence l'IRM servira à localiser les cellules marquées dans une région d'un organe et la fluorescence donnera des indications plus précises sur cette localisation au niveau tissulaire. Ces doubles marqueurs constituent donc un nouvel outil diagnostique, qui peut faciliter la compréhension des mécanismes de migration des nanoparticules ou des cellules macrophagiques à travers la BHE vers les lésions du SNC. Par ailleurs, ces expériences permettront de valider le concept de vectorisation de substances bioactives dans le cerveau. Dans l'avenir, cela autoriserait à envisager de vectoriser par l'intermédiaire de ces cellules hématopoïétiques, des composantes thérapeutiques soit directement couplées aux nanoparticules magnétiques, soit à des gènes immunomodulateurs qui seront spécifiquement exprimés après l'arrivée de la cellule dans le site inflammatoire.

4.3 Cahier des charges des vecteurs synthétisés dans le cadre de cette étude

Sur la base de la présentation des agents de contraste en IRM, des vecteurs et de leur devenir *in vivo*, nous sommes en mesure de dresser le cahier des charges des vecteurs magnétiques nécessaires aux deux problématiques définies précédemment :

➤ *Composante minérale des vecteurs* : elle doit être constituée de nanoparticules superparamagnétiques afin d'engendrer un contraste en IRM ;

➤ *Stabilisation des sols en milieu physiologique* : les nanoparticules doivent être stabilisées par des macromolécules hydrophiles, biocompatibles et biodégradables, comme le dextran, de façon à générer des répulsions stériques permettant d'éviter la floculation en milieu physiologique. D'autre part, il sera nécessaire de maîtriser la synthèse et le contrôle de la stabilisation des sols colloïdaux lors des différentes étapes de greffage ;

➤ *Adhésion des macromolécules à la surface des nanoparticules* : celle-ci doit être améliorée de manière à autoriser le greffage de molécules bio-actives comme des peptides, des agents anticancéreux ou des fluorochromes. Cette amélioration passe par une étape préalable de fonctionnalisation de la surface de ces nanoparticules qui doit permettre le couplage des macromolécules par des liaisons covalentes ;

➤ *Homogénéité de la fonctionnalisation de surface* : la modification chimique de la surface des nanoparticules doit se faire en respectant les conditions de stabilité des sols de manière à fonctionnaliser toute la surface des nanoparticules et non celle des floes, et de garantir une bonne reproductibilité de greffage des macromolécules ultérieurement ;

➤ *Prolongation de la demi-vie plasmatique des vecteurs dans le système sanguin* : il existe au moins deux conditions nécessaires pour augmenter la rémanence vasculaire des systèmes particuliers : (i) retarder l'adsorption des opsonines ; (ii) délimiter la taille du vecteur en dessous de 50 nm pour ralentir la capture par le SPM et au-dessus de 10 nm pour éviter les phénomènes de pinocytose. La prolongation des vecteurs dans le système sanguin augmente leur probabilité de ciblage vers des cellules-cibles, tumorales ou autre. En outre, dans le cas où l'activité macrophagique induite par des lésions est importante, l'augmentation de la demi-vie plasmatique des nanoparticules magnétiques peut modifier leur distribution dans le SPM, par exemple, en privilégiant la capture par des cellules macrophagiques circulantes, susceptibles de migrer vers des lésions, au détriment des cellules de Kupffer du foie ;

➤ *Tolérance des vecteurs* : les vecteurs synthétiques doivent être biocompatibles et en particulier hémocompatibles et non cytotoxiques.

D'un point de vue plus réaliste, l'élaboration des matériaux doit satisfaire les prérogatives industrielles. En outre, la projection éventuelle de la mise sur le marché des produits optimisés requiert que les composantes utilisées lors de l'élaboration de ces matériaux soient connues du milieu biomédical et, si possible, que leur biocompatibilité soit validée, peu onéreuses et que le procédé de mise en œuvre soit réalisable à l'échelle industrielle. Ce dernier doit notamment, être conçu en limitant au maximum le nombre d'étapes de synthèse menant à l'élaboration du produit final.

4.4 Démarche adoptée

Ce cahier des charges est extrêmement restrictif car il conjugue des contraintes à la fois physiques (magnétisme, stabilité des colloïdes, ...), chimiques (fonctionnalisation de surface, greffages covalents de macromolécules, contrôle de la taille des nanoparticules, ...) et biologiques (toxicité, hémocompatibilité, biodégradabilité, interactions avec le SPM, ...). Parmi les différentes voies d'élaboration des ferrofluides, deux d'entre-elles ont attiré notre attention au début de cette recherche.

La première consiste à coprécipiter par voie alcaline les sels précurseurs, les chlorures de fer ferreux et ferriques, en présence de dextran en solution (fig. 4.3). Cette voie, proposée en 1982 par Molday et Mackenzie¹⁸⁵ conduit directement au sol de nanoparticules de magnétite, stabilisées par le dextran qui génère des répulsions stériques.

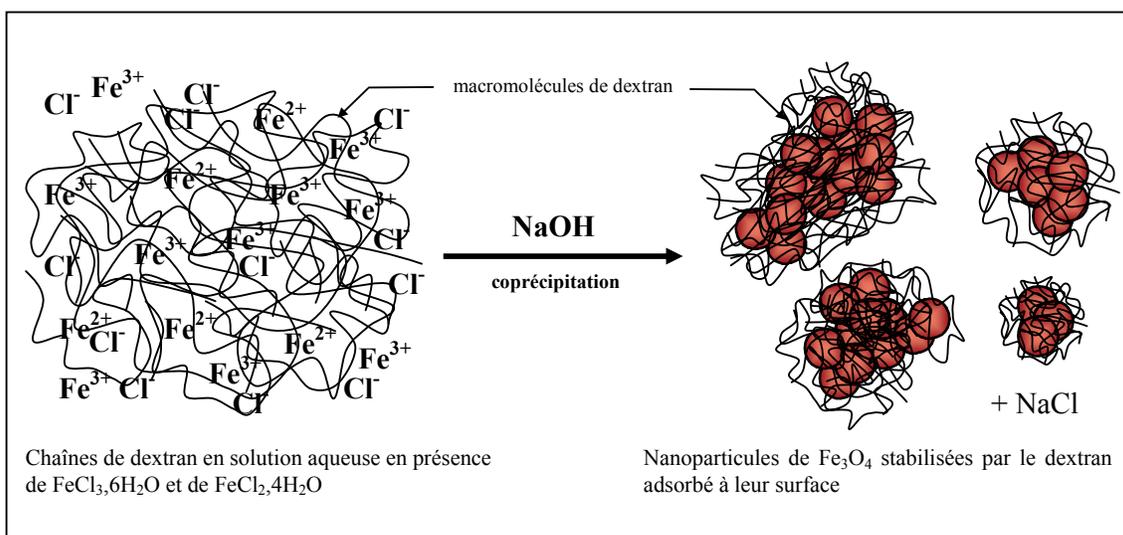


Figure 4.3. Schéma de la synthèse de nanoparticules de magnétite stabilisées par le dextran.

Cependant le dextran est adsorbé à la surface des nanoparticules de magnétite par des liaisons hydrogène ce qui n'est pas satisfaisant. En effet, ce mode d'adhésion ne supporte pas les différents traitements chimiques employés lors du greffage d'autres molécules sur le polymère ce qui provoque le décrochage, par déplétion, des macromolécules de la surface d'oxyde de fer.

La seconde voie constitue le point de départ de cette étude. Une méthode, mise au point par Massart *et al.*¹⁸⁶ en 1980, permet d'obtenir des nanoparticules de maghémite stabilisées en sol cationique ou anionique (Fig. 4.4).

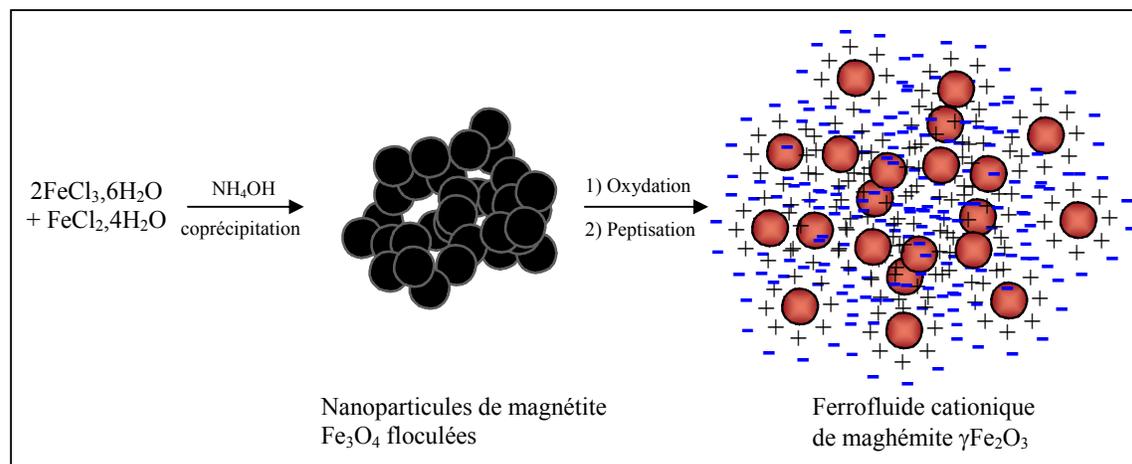


Figure 4.4. Schéma de la synthèse de nanoparticules de maghémite stabilisées par des charges électrostatiques.

Une étude des conditions de stabilité des ferrofluides synthétisés selon ce protocole est nécessaire pour établir les conditions de greffage en fonction de ces critères.

Notre expérience au laboratoire en matière de modification de surface de particules d'oxydes métalliques par des agents de couplage silaniques¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ nous a conduit à expérimenter cette méthode sur la surface des nanoparticules d'oxyde de fer. L'idée d'utiliser des agents de couplage silaniques aminés est de permettre la fonctionnalisation de la surface tout en conservant les charges nécessaires à la stabilisation des sols ioniques. L'étude de cette modification de surface constitue l'objet principal du deuxième chapitre. L'encapsulation de nanoparticules de maghémite dans une coque de silice constitue une voie secondaire d'élaboration de nanoparticules magnétiques fonctionnalisées. Cependant la présence d'une couche de silice, inerte chimiquement, dans de tels systèmes remet en question un certain nombre de problèmes d'ordre biologique comme la biodégradabilité de ces matériaux.

La stabilisation de ces nanoparticules en milieu physiologique est réalisée à partir du greffage de chaînes de dextran préalablement modifiées pour créer des liaisons covalentes avec la surface. L'étude du greffage de macromolécules de dextran sur les nanoparticules de maghémite fonctionnalisées est présentée au troisième chapitre. Dans le but d'augmenter la rémanence vasculaire de ces vecteurs, des chaînes de POE sont couplées par la suite sur ces macromolécules de dextran. Dans le cadre de notre étude nous avons choisi d'utiliser des copolymères d'hydrophilie contrôlée de POE et de POP ($\approx 90\%$ de POE) aminotéléchéliques. La présence de fonctions amines résiduelles à la surface de ces vecteurs nous a permis de greffer des fluorochromes et de réaliser ainsi les doubles marqueurs.

Les produits synthétisés subiront différents tests (vérification de la stabilité en milieu physiologique et dans les milieux de culture, cytotoxicité *in vitro*) avant d'être testés *in vivo*, notamment injectés par voie intraveineuse dans des rats Lewis (EAE aiguë), modèle de sclérose en plaques. La dernière partie du troisième chapitre est consacré à la présentation des premiers résultats concernant les différents tests biologiques de cytotoxicité, le (double) marquage de cellules microgliales macrophagiques HEMC5 *in vitro*.

La synthèse de ces matériaux fait appel à des techniques de caractérisation diverses : la taille des objets synthétisés est déterminée par microscopie électronique à transmission (MET) et par spectroscopie de corrélation photonique (PCS) à l'aide d'un granulomètre laser ; la caractérisation et la validation des différents greffages sont réalisées par spectroscopie infrarouge en mode réflexion diffuse (DRIFT) et par spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X (XPS) ; les taux de greffage sont déterminés par analyse thermogravimétrique (ATG) ; les propriétés magnétiques des nanoparticules sont déterminées à partir de mesures de susceptométrie et de SQUID (Superconducting QUantum Interferometric Devices). Les mesures de potentiel zêta donnent des renseignements sur l'évolution de l'état de surface des nanoparticules tout au long des différentes étapes. D'autres techniques sont employées de manière plus ponctuelle, comme la diffraction des rayons X, les mesures calorimétriques, la spectroscopie Mössbauer, la spectrophotométrie UV-vis, la spectrométrie de flamme, la microscopie à épifluorescence ou la spectrométrie de masse.

Références

- 1 Embleton, M.J., Rowland, G.F., Simmonds, R.G., Jacobs, E., Mardsen, C.H., Baldwin, R.W., *Br. J. Cancer*, **47**, 43-49 (1983)
- 2 Bagshawe, K.D., *Br. J. Cancer*, **56**, 531-532 (1987)
- 3 Tomino, S., Paigen, K., *J. Boil. Chem*, **250**, 8503-8509 (1975)
- 4 Papot, S., *Etude de prodrogues glucuronylées pour chimiothérapie anticancéreuse*, Thèse de l'université de Poitiers (1998)
- 5 Bickel, U., Yoshikawa, T., Pardridge, W.M., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **46**, 247-279 (2001)
- 6 Derossi, D., Chassaing, G., Prochiantz, A., *Trends Cell. Biol.*, **8**, 84-87 (1998)
- 7 Prochiantz, A., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 400-406 (2000)
- 8 Lindgren, M., Hällbrink, M., Prochiantz, A. and Langel, Ü., *TiPS*, **21**, 99-103 (2000)
- 9 Couvreur, P., dans *Vecteurs nanoparticulaires de médicaments, formes pharmaceutiques nouvelles*, Buri, P., Puisieux, P., Doelker, E., Benoit, J.P., Eds., Lavoisier, 577-611 (1985)
- 10 Sudimack, J., Lee, R.L., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **41**, 147-162 (2000)
- 11 Arap, W., Pasqualini, R., Ruoslahti, E., *Science*, **279**, 377-380 (1998)
- 12 Sesaki, H., Hashida, M., *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **1**, 1 (1985)
- 13 Kitao, T., Hattori, K., *Nature*, **265**, 81 (1977)
- 14 Varga, J.M., Asato, N., in *Targeted Drugs*, Goldberg, E.P., Ed., Wiley-Interscience, New York, 73 (1983)
- 15 Puisieux, F. *Industrie Santé*, **116**, 21-25 (1986)
- 16 Yoshida, R., Sakai, K., Okano, T., Sakurai, Y., Han Bae, Y., Kim, S.W., *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, **3**(2), 155-162 (1991)
- 17 Kramer, P.A., *J. Pharm. Sci.*, **63**, 1646 (1974)
- 18 Sokolowski, T.D., Roger, G.P., in *Microspheres and drug therapy*, Davis, S.S., Illum, L., McVie, J.G., Tomlinson, E., Eds., Elsevier/North Holland, Amsterdam, 295 (1984)
- 19 Dubernet, C., Benoit, J.P., *Actual. Chim.*, 19-28, déc. (1986)
- 20 Weinstein, J.N., Leserman, L.D., *Pharm. Ther.*, **24**, 207 (1984)
- 21 Hope, M.J., Bally, M.B., Webb, G., Cullis, P.R., *Biochim. Biophys. Acta*, **812**, 55-65 (1985)
- 22 Szoka, F.C., Papahadjopoulos, D., *Ann. Rev. Biophys., Bioeng.*, **9**, 465 (1980)
- 23 Poste, G., Kirsh, R., *Biotechnology*, **1**, 869 (1983)
- 24 Mignet, N., *Nucleic Acids Res.*, **28**(16), 3134-3142 (2000)
- 25 Kreuter, J., *Pharm. Acta Helv.*, **58**, 196 (1983)
- 26 Yoshioka, T., Hashida, M., Muranishi, S., Sezaki, H., *Int. J. Pharm.*, **8**, 131, (1981)
- 27 Couvreur, P., Kante, B., Roland, M., Guiot, P., Baudhuin, P., Speiser, P., *J. Pharm. Pharmacol.*, **31**, 331 (1979)
- 28 Leonard, F., Kulkarni, R.K., Brandes, G., Nelson, J., Cameron, J.J., *J. Appl. Polym. Sci.*, **10**, 259 (1966)
- 29 Couvreur, P., Roland, M., Speiser, P., *Biodegradable particles containing a biologically active substance*, Brevet U.S. No 4,329,332 (1982)
- 30 Kreuter, J., *Methods Enzymol.*, **112**, 129 (1985)
- 31 Douglas, S.J., Illum, L., Davis, S.S., Kreuter, J., *J. Colloid Interface Sci.*, **101**, 149 (1983)
- 32 Douglas, S.J., Illum, L., Davis, S.S., *J. Colloid Interface Sci.*, **103**, 154 (1985)
- 33 Kante, B., Couvreur, P., Lenaerts, V., Guiot, P., Roland, M., Baudhuin, P., Speiser, P., *Int. J. Pharm.*, **7**, 45 (1980)
- 34 Mori, S., Ota, K., Takata, M. Inou, T., *J. Biomed. Mater. Res.*, **1**, 55 (1987)
- 35 Couvreur, P., Kante, B., Grislain, L., Roland, M., Speiser, P., *J. Pharm. Sci.*, **71**, 790 (1982)
- 36 Soma, C.E., Dubernet, C., Bentolila, D., Benita, S., Couvreur, P., *Biomaterials*, **21**, 1-7 (2000)
- 37 Zobel, H.P.; Zimmer, A.; Atmaca-Abdel Aziz, S.; Gilbert, M.; Werner, D.; Noe, C.R.; Kreuter, J.; Stieneker, F., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **47**, 203-213 (1999)

- 38 Kreuter, J., *J. Anat.*, **189**, 503-505 (1996)
- 39 Wroblewski, S., Kopeckova, P., Rihova, B., Kopecek, J., *Macromol. Chem. Phys.*, **199**, 2601-2608 (1998)
- 40 Maruyama, A., Ishihara, T., Kim, J.S., Kim, S.W., Akaike, T., *Bioconjugate Chem.*, **8**, 735-742 (1997)
- 41 Toncheva, V., Wolfert, M.A., Dash, P.R., Oupicky, D., Ulbrich, K., Seymour, L.W., Schacht, E.H., *Biochem. Biophys. Acta*, **1380**, 354-368 (1998)
- 42 Giammona, G., Cavallara, G., Pitarresi, G., Pedone, E., *Colloid Polym. Sci.*, **278**, 69-73 (2000)
- 43 Quellec, P., Gref, R., Perrin, L., Dellacherie, E., Sommer, F., Verbavatz, J.M., Alonso, M.J., *J. Biomed. Mater. Res.*, **42**, 45-54 (1998)
- 44 Quellec, P., Gref, R., Dellacherie, E., Sommer, F., Tran, M.D., Alonso, M.J., *J. Biomed. Mater. Res.*, **47**, 388-395 (1999)
- 45 Rouzes, C., Gref, R., Leonard, M., De Sousa Delgado, A., Dellacherie, E., *J. Biomed. Mater. Res.*, **50**, 557-565 (2000)
- 46 Ross, B.D., Kim, B., Davidson, B.L., *Clin. Cancer Res.*, **1**, 651-657 (1995)
- 47 Braas, G.M.F., Walker, S.G., Lyddiatt, A., *J. Chromatogr.*, **742**, 409-419 (2000)
- 48 Liu, J., Flores, G.A., Sheng, R., *J. Magn. Magn. Mater.*, **225**, 209-217 (2001)
- 49 Rusetski, A.N., Ruuge, E.K., *J. Magn. Magn. Mater.*, **85**, 299-302 (1990)
- 50 Lübbe, A.S., Berger, G., Brock, J., McClure, D.G., *J. Magn. Magn. Mater.*, **194**, 149-155 (1999)
- 51 Ruuge, E.K., Rusetski, A.N., *J. Magn. Magn. Mater.*, **122**, 335-339 (1993)
- 52 Senyei, A., Widder, K., Czerlinski, G., *J. Appl. Phys.*, **49(6)**, 3578-3583 (1978)
- 53 Gupta, P.K., Hung, C.T., *Life Sciences*, **44**, 175-186 (1989)
- 54 Vekris, A., Maurange, C., Moonen, C., Mazurier, F., De Verneuil, H., Canioni, P., Voisin, P., *J. Gene. Med.*, **2(2)**, 89-96 (2000)
- 55 Bacri, J.C., Da Silva, M., Perzynski, R., Pons, J.N., Roger, J., Sabolovic, D., Halbreich, A., in *Scientific and clinical applications of magnetic carriers*, **44**, 597-606, Plenum Press, New York (1997)
- 56 Gilchrist, R.K., Medal, R., Shorey, W.D., Hanselman, R.C., Parrott, J.C., Taylor, C.B., *Ann. Surg.*, **146**, 596-606 (1957)
- 57 Shinkai, M., Yanase, M., Honda, H., Wakabayashi, T., Yoshida, J., Kobayashi, T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **87**, 1179-1183 (1996)
- 58 Yanase, M., Shinkai, M., Honda, H., Wakabayashi, T., Yoshida, J., Kobayashi, T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **88**, 630-632 (1997)
- 59 Chan, D.C.F., Kirpotin, D.B., Bunn, P.A., in *Scientific and clinical applications of magnetic carriers*, **45**, 607-618, Plenum Press, New York (1997)
- 60 Jordan, A., Wust, P., Scholz, R., Faehling, H., Krause, J., Felix, R., in *Scientific and clinical applications of magnetic carriers*, **43**, 569-595, Plenum Press, New York (1997)
- 61 Sato, T., Masai, A., Ota, Y., Sato, H., Matuski, H., Yananda, T., Sato, M., Komada, N., Minakawa, A., *IEEE trans. Magn.*, **29(6)**, 3325-3330 (1993)
- 62 Grasset, F., Mornet, S., Demourgues, A., Portier, J., Bonnet, J., Vekris, A., Duguet, E., *J. Magn. Magn. Mater.*, **234**, 409-418 (2001)
- 63 Jordan, A., Scholz, R., Maier-Hauff, K., Johannsen, M., Wust, P., Nadobny, J., Schirra, H., Schimdt, H., Deger, S., Loening, S., Lanksch, W., Felix, R., *J. Magn. Magn. Mater.*, **225**, 118-126 (2001)
- 64 Lauterbur, P.C., *Nature*, **242**, 191 (1973)
- 65 Lauterbur, P.C., Mendoca-Dias, M.H., Rudin, A.M., in *Frontiers of biological energetics*, **1**, 752-759, Academic Press, New York (1978)
- 66 Bloch, F., Hansen, W.W., Packard, M., *Phys. Rev.*, **70**, 474-485 (1946)
- 67 Purcell, E.M., Torrey, H.C., Pound, R.V. *Phys. Rev.*, **69**, 37-43 (1946)
- 68 Häfeli, U., in *Scientific and clinical applications of magnetic carriers*, Häfeli, U., Schütt, W., Teller, J., Zborowski, M., Eds., **1**, 1-10, Plenum Press, New York (1997)
- 69 Beall, P.T., *Physio. Chem. Phys. Med. NMR*, **16**, 129 (1984)
- 70 Mendoca-Dias, M.H., *Proc. Soc. Mag. Reson. Med.*, 4th annual meeting, New York (1985)
- 71 Bloembergen, N., *J. Chem. Phys.*, **27**, 572-573 (1957)
- 72 Solomon, I., *Phys. Rev.*, **99**, 559-565 (1955)
- 73 Okuhata, Y., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **37**, 121-137 (1999)

- 74 Runge, V.M., Stewart, R.G., Clanton, J.A., Jones, M.M., Lukewart, C.M., Partain, C.L., James, A.E., *Radiology*, **147**, 789 (1983)
- 75 Watson, A.D., Rocklage, S.M., Carvlin, M.J., in *Magnetic resonance imaging*, Stark, D., Bradley, W.G., Eds., **1(14)**, 372-437 (1992)
- 76 Ogan, M.D., Schmiedl, U. Moseley, M.E., Grodd, W., Paajanen, H., Brasch, R.C., *Invest. Radiol.*, **22**, 665-671 (1987)
- 77 Rebizak, R., Schaefer, M., Dellacherie, E., *Bioconjug. Chem.*, **8**, 605-610 (1997)
- 78 Rebizak, R., Schaefer, M., Dellacherie, E., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **7**, 243-248 (1999)
- 79 Rongved, P., Fritzell, T.H., Strande, P., Klaveness, J., *Carbohydr. Res.*, **287**, 77-89 (1996)
- 80 Lim, T.H., Lee, D.H., Kim, Y.H., Park, S.W., Park, P.H., Seo, D.M., Kim, S.T., Lee, T.K., Mun, C.W., *Radiology*, **189**, 765-768 (1993)
- 81 Brasch, R.C., *Magn. Reson. Med.*, **22**, 282-287 (1991)
- 82 Adam, G. Neuerburg, J., Spuntrup, E., Muhler, A., Scherer, K., Gunther, R.W., *J. Magn. Reson. Imaging*, **4**, 462-466 (1994)
- 83 Orang Khadivi, K., Pierce, B.L., Ollom, C.M., Floyd, L.J., Siegle, R.L., Williams, R.F., *Breast Cancer Res. Treat.*, **32**, 119-135 (1994)
- 84 Wierner, E.C., Brechbiel, M.W., Brothers, H., Magin, R.L., Gansow, O.A., Tomalia, D.A., Lauterbur, P.C., *Magn. Reson. Med.*, **31**, 1-8 (1994)
- 85 Unger, E., Tilcock, C., Ahkong, Q.F., Fritz, T.A., *Invest. Radiol.*, **25**, S65-S66 (1990)
- 86 Unger, E., Shen, D.K., Fritz, T.A., Kulik, B., Palestrant, D., Blatner, G., Croxell, M., New, T.E., *Proc. Soc. Magn. Reson. Imaging*, 11th annual meeting, Berlin, 1418 (1992)
- 87 Fallis, S., Beaty-Nosco, J., Dorshow, R.B., Adzamlı, K., *Invest Radiol.*, **33(12)**, 847-852 (1998)
- 88 Bauer, W.R., Schulten, K., *Proc. Soc. Magn. Reson. Med.*, 9th annual meeting, New York, 744 (1990)
- 89 Gillis, P., Koenig, S.H., *Magn. Reson. Med.*, **5**, 323-345 (1987)
- 90 Roch, A., Muller, R.N., *Proc. Soc. Magn. Reson. Med.*, 11th annual meeting, New York, 1447 (1992)
- 91 Roch, A., *Etudes théoriques et expérimentales des phénomènes de relaxation protonique induits par les nanoparticules superparamagnétiques, nouveaux agents de contraste pour l'IRM*, Thèse de l'université de Mons-Hainaut (1994)
- 92 Koenig, S.H., Kellar, K.E., *Magn. Reson. Med.*, **34**, 227-233 (1995)
- 93 Bulte, J.W.M., Brooks, R.A., in *Scientific and clinical applications of magnetic carriers*, **40**, 527-543, Plenum Press, New York (1997)
- 94 Chan, T. W., Eley, C., Liberti, P., and Kressel, H. Y., *Investigative Radiology*, **27**, 443-449 (1992)
- 95 Grüttner, C.; Teller, J.; Schütt, W.; Wesphal, F.; Schümichen, C.; Paulke, B.-R., in *Scientific and clinical applications of magnetic carriers*, **4**, 53-67, Plenum Press, New York, (1997)
- 96 Sjögren, C.E., Johansson, C., Naevestad, A., Sontum, P.C., Briley-Saebo, K., Fahlvik, A.K., *Magn. Reson. Imaging*, **15(1)**, 55-67 (1997)
- 97 Reimer, P., Shen, T., Lee, A.S., Brady, T.J., Wittenberg, J., Weissleder, R., *Proc. Soc. Reson. Med.*, 11th annual meeting, New York, 3224 (1992)
- 98 Bengel, H. H., Palmacci, S., Rogers, J., Jung, C. W., Crenshaw, J., and Josephson, L., *Magn. Reson. Imaging*, **12(3)**, 433-442 (1994)
- 99 Kawamura, Y., Endo, K., Watanabe Y., Saga, T., Nakai, T., Hikita, H., Kagawa, K., Konishi, J., *Radiology*, **174**, 357-360 (1990)
- 100 Pouliquen, D., Le Jeune, J.J., Perdrisot, R., Ermias, A., Jallet, P., *Magn. Res. Imaging*, **9**, 275-283 (1991)
- 101 Jung, C.W., Jacobs, P., *Magn. Reson. Imaging*, **13(5)**, 661-674 (1995)
- 102 Weissleder, R., Lee, A.S., Fischman, A.J., Reimer, P., Shen, T., Wilkinson, R., Callahan, R.J., Brady, T.J., *Radiology*, **181**, 254-249 (1991)
- 103 Bogdanov, A., Papisov, M., Weissleder, R., Shen, T., Brady, T. J., *Proc. Soc. Magn. Reson. Med.*, 11th annual meeting, New York, 864 (1992)
- 104 Enochs, W.S., Weissleder, R., in *Clinical magnetic resonance imaging*, 2nd Ed., Saunders, W.B., Philadelphia, 192-220 (1996)
- 105 Renshaw, P.F., Owen, C.S., McLaughlin, A.C., Frey, T.G., Leigh, J.S., *Magn. Reson. Med.*, **3**, 217-225 (1986)
- 106 Majumdar, S., Zoghbi, S., Christopher, F., Pope, C.F., Gore, J.C., *Radiology*, **169**, 653-655 (1988)

- 107 Mendoca Dias, M.H., Lauterbur, P.C., *Magn. Reson. Med.*, **3**, 328-330 (1986)
- 108 Römer, Von T., Gewiese, B., Stiller, D., Plötz, M., Lawaczek, R., Wolf, K.-J., *Fortschr. Röntgenstr.*, **153(1)**, 79-84 (1990)
- 109 Summers, R.M., Joseph, P.M., Renshaw, P.F., Kundel, H.L., *Magn. Reson. Med.*, **8**, 427-439 (1988)
- 110 Pels Rijken, T.H., Davis, M.A., Ros, P.R., *Magn. Reson. Imaging*, **4**, 291-300 (1994)
- 111 Brown, J.J., *Magn. Reson. Imaging Clin. N. Am.*, **4**, 25-35 (1996)
- 112 Briggs, R.W., Wu, Z., Mladinich, C.R., Stoupis, C., Gauger, J., Liebig, T., Ros, P.R., Ballinger, J.R., Kubilis, P., *Magn. Reson. Imaging*, **15**, 559-566 (1997)
- 113 D'Arienzo, A., Scaglione, G., Vicinanza, G., Manguso, F., Bennato, R., Belfiore, G., Imbriaco, M., Mazzacca, G., *Am. J. Gastroent.*, **95(3)**, 720-724 (2000)
- 114 Chouly, C., *Etude des relations structure-biodistribution et biocompatibilité de nanoparticules de magnétite-dextran (MD) utilisables pour l'IRM*, Thèse de l'université d'Angers (1993)
- 115 Van Oss, C. J., *Methods. Enzymol.*, **132**, 3-15 (1986)
- 116 Möller, W., Scheuch, G., Sommerer, K., Heyder, J., *J. Magn. Magn. Mater.*, **225**, 8-16 (2001)
- 117 Illum, L., *J. Parent. Sci. Tech.*, **36**, 242 (1982)
- 118 Kanke, M., *J. Pharm. Sci.*, **69**, 755 (1980)
- 119 Okuhata, Y., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **37**, 121-137 (1999)
- 120 Kreuter, J., *Pharm. Acta. Helv.*, **58**, 242-250 (1983)
- 121 Papisov, M. I., Bogdanov, A., Schaffer, B., Nossiff, N., Shen, T., Weissleder, R., and Brady, T. J., *J. Magn. Magn. Mater.*, **122**, 383-386 (1993)
- 122 Weissleder, R., Heautot, J. F., Schaffer, B. K., Nossif, N., Papisov, A., Bogdanov, A., and Brady, T. J., *Radiology*, **191**, 225-230 (1994)
- 123 Weissleder, R., Elizondo, G., Wittenberg, J., Rabito, C. A., Bengel, L., and Josephson, L., *Radiology*, **175**, 489-493 (1990)
- 124 Guimaraes, R., Clement, O., Bittoun, J., Carnot, F., and Frija, G., *Am. J. Roentgenol.*, **162**, 201-207 (1994)
- 125 Vassallo, P., Matei, C., Heston, W. D., Koutcher, J. A., and Castellino, R. A., *Radiology*, **193**, 501-506 (1994)
- 126 Saini, S., Edelman, R. R., Sharma, P., Li, W., Mayo Smith, W., Slater, G. J., Eisenberg, P. J., and Hahn, P. F., *Am. J. Roentgenol.*, **164**, 1147-1152 (1995)
- 127 Tanoura, T., Bernas, M., Darkazanli, A., Elam, E., Unger, E., Witte, M. H., and Green, A., *Am. J. Roentgenol.*, **159**, 875-881 (1992)
- 128 Hamm, B., Staks, T., Taupitz, M., Maibauer, R., Speidel, A., Huppertz, A., Frenzel, T., Lawaczek, R., Woff, K. J., and Lange, L., *Magn. Reson. Imaging*, **4**, 659-668 (1994)
- 129 Weissleder, R., Stark, D. D., Engelstad, B. L., Bacon, B. R., Compton, C. C., White, D. L., Jacobs, P., and Lewis, J., *Am. J. Roentgenol.*, **152**, 167-173 (1989)
- 130 Pochon, S., Hyacinthe, R., Terettaz, J., Robert, F., Schneider, M., and Tournier, H., *Acta Radiol. Suppl.*, **412**, 69-72 (1997)
- 131 Kabalka, G.W., Davis, M.A., Moss, T.H., Buonocore, E., Hubner, K., Holmberg, E., Maruyama, K., Huang, L., *Magn. Reson. Med.*, **19**, 406-415 (1991)
- 132 Bogdanov, A., Martin, C., Weissleder, R., and Brady, T. J., *Biochem. Biophys. Acta*, **1193**, 536-542 (1994)
- 133 Kresse, M.; Wagner, S.; Taupitz, M. In *Scientific and clinical applications of magnetic carriers*, **41**, 545-559, Plenum Press, New York (1997)
- 134 Wilkins, D. J. and Meyers, P. A., *Brit. J. Pathol.*, **47**, 568-576 (1966)
- 135 Roerdink, F., Wassef, N. M., Richardson, E. C., and Alving, C. R., *Biochem. Biophys. Acta*, **734**, 33 (1983)
- 136 Juliano, R. L. and Stamp, D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 651 (1975)
- 137 Senior, J., Crawley, J. C. W., and Gregoriadis, G., *Biochem. Biophys. Acta*, **839**, 1 (1985)
- 138 Watanabe, Y., Kondo, T., Miyamoto, M., and Jasakawa, S., *Chem. Pharm. Bull.*, **32(7)**, 2788-2794 (1984)
- 139 Yasukawa, J., Ohshima, H., Muramatsu, N., and Kondo, T., *J. Microencapsulation*, **7(2)**, 179-184 (1990)
- 140 Sano, T., Muramatsu, N., and Kondo, T., *J. Microencapsulation*, **3(4)**, 265-273 (1986)

- 141 Kissel, T. and Rosser, M., *Control. Rel. Bioact. Mater.*, **18**, 275-276 (1991)
- 142 Tabata, Y. and Ikada, Y., *Biomaterials*, **9**, 356-362 (1988)
- 143 Illum, L. and Davis, S. S., *FEBS lett.*, **167**, 79-82 (1984)
- 144 Illum, L., Jacobsen, L. O., Müller, R. H., Mak, E., and Davis, S. S., *Biomaterials*, **8**, 113-117 (1987)
- 145 Kayes, J. B. and Rawlins, D. A., *Colloid Polym. Sci.*, **257**, 622-629 (1979)
- 146 Elwing, H., Welin, S., Askendal, A., Nilsson, U., and Lundström, I., *J. Colloid Interface Sci*, **119**(1), 203-210 (1986)
- 147 Göllander, C. G., Lin, Y. S., Hlady, V., and Andrade, J. D., *Colloids Surf.*, **49**, 289-302 (1990)
- 148 Illum, L. and Davis, S. S., *Life Science*, **40**, 1553-1560 (1987)
- 149 Bulte, J. W.M., de Cuyper, M., Despres, D., and Frank, J. A., *J. Magn. Magn. Mater.*, **194**, 204-209 (1999)
- 150 Yamaoka, T., Tabata, Y., and Ykada, Y., *J. Pharm. Sci.*, **83**, 601-606 (1994)
- 151 Lasic, D. D., Martin, F. J., Gabizon, A., Huang, S. K., and Papahadjopoulos, D., *Biochem. Biophys. Acta*, **1070**, 187-192 (1991)
- 152 Allen, T. M., Hansen, C., and Rutledge, J., *Biochem. Biophys. Acta*, **981**, 27-35 (1989)
- 153 Quellec, P., Gref, R., Perrin, L., Dellacherie, E., Sommer, F., Verbavatz, J. M., and Alonso, M. J., *Biomed. Mater. Res.*, **42**, 45-54 (1998)
- 154 Quellec, P., Gref, R., Dellacherie, E., Sommer, F., Tran, M. D., and Alonso, M. J., *Biomed. Mater. Res.*, **47**, 388-395 (1999)
- 155 Müller, R. H., Mehnert, W., Lucks, J. S., Schwartz, C., zur Mühlen, A., Weyers, H., Freitas, C., and Rühl, D., *Eur. J. Biopharm.*, **41**, 62-69 (1995)
- 156 Papisov, M. I., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **16**, 127-139 (1995)
- 157 Dévoldère, L., *Synthèse et caractérisation de nanoparticules superparamagnétiques utilisables comme agents contrastant pour l'Imagerie par Résonance Magnétique (I.R.M.)*, Thèse de l'université Paris 6 (1995)
- 158 Benacereff, B., Biozzi, G., Halpern, B. N., Stiffel, C., in *Physiology of the reticuloendothelial system*; Halpern, B. N.; Benacereff, B.; Delafresnaye, J. F. Eds.; Oxford, pp. 52 (1975)
- 159 Illum, L., Hunneyball, I. M., and Davis, S. S., *Int. J. Pharm.*, **29**, 53-65 (1986)
- 160 Dousset, V., Delalande, C., Ballarino, L., Quesson, B., Seilhan, D., Coussemaq, M., Thiauldière, E., Brochet, B., Canioni, P., Caillé, J.M., *Magn. Reson. Med.*, **41**, 329-333 (1999)
- 161 Reimer, P., Weissleder, R., Lee, A.S., Wittenberg, J., Brady, T.J., *Radiology*, **177**, 729-734 (1990)
- 162 Rosen, B.R., Brady, T.J., *J. Comput. Assist. Tomogr.*, **17**, 536-542 (1993)
- 163 Reimer, P., Weissleder, R., Shen, T., Knoefel, W.T., Brady, T.J., *Radiology*, **193**, 527-531 (1994)
- 164 Shen, T., Bogdanov, A., Bogdanova, A., Poss, K., Brady, T.J., Weissleder, R., *Bioconjug. Chem.*, **7**, 311-316 (1996)
- 165 Sudimack, J., Lee, R.J., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **41**, 147-142 (2000)
- 166 Suzuki, M., Honda, H., Kobayashi, T., Wakabayashi, T., Yoshida, J., Takahashi, M., *Brain Tumor Pathol.*, **13**, 127-132 (1996)
- 167 Cerdan, S., Lotscher, H.R., Kunnecke, B., Seeling, J., *Magn. Reson. Med.* **12**, 151-163 (1989)
- 168 Tiefenauer, L.X., Tschirky, A., Kühne, G., Andres, R.Y., *Magn. Reson. Imaging*, **14**(4), 391-402 (1996)
- 169 Kirpotin, D.B., Kinne, R., Milton, A., Palombo-Kinne, E., Emmrich, F., *J. Magn. Magn. Mater.*, **122**, 354-359 (1993)
- 170 Suwa, T., Ozawa, S., Ueda, M., Ando, N., Kitajima, M., *Int. J. Cancer*, **75**, 626-634 (1998)
- 171 To, S.Y.C., Castro, D.J., Lufkin, R.B., Soudant, J., Saxton, R.E., *Laser Surg. Med.* 159-169, June (1992)
- 172 Weissleder, R., Cheng, H.C., Bogdanova, A., Bogdanov, A., *J. Magn. Reson. Imaging*, **7**, 258-263 (1997)
- 173 Yeh, T.C., Zhang, W., Ildtad, S.T., Ho, C., *Magn. Reson. Med.*, **30**, 617-625 (1993)
- 174 Bulte, J. W. M., Ma, L.D., Magin, R.L., Kamman, R.L., Hulstaert, C.E., Go, K.G., The, T.H., de Leij, L., *Magn. Reson. Med.*, **29**, 32-37 (1993)
- 175 Chan, T.W., Eley, C., Liberti, P., So, A., Kresel, H.Y., *Invest. Radiol.*, **27**, 443-449 (1997)
- 176 Hauger, O., Delalande, C., Deminière, C., Fouqueray, B., Ohayon, C., Trillaud, H., Combe, C., Grenier, N., *Radiology*, **217**, 819-826 (2000)

- 177 Bulte, J. W. M., Douglas, T., van Gelderen, P., Lewis, B.K., Frank, J.A., *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.*, **9**, 52 (2001)
- 178 Lewin, M., Carlesso, N., Tung, C.-H., Tang, X.-W., Cory, D., Scadden, D.T., Weissleder, R., *Nature Biotech.*, **18**, 410-414 (2000)
- 179 Lacava, Z. G. M., Azevedo, R. B., Lacava, L. M., Martins, E. V., Garcia, V. A. P., Rébula, C. A., Lemos, A. P. C., Sousa, M. H., Tourinho, F. A., Morais, P. C., and Da Silva, M. F., *J. Magn. Magn. Mater.*, **194**, 90-95 (1999)
- 180 Ford, J.M., Hait, W. N., *Pharm. Rev.*, **42**, 155-199 (1990)
- 181 Denekamp, J., *Br. J. Radiol.*, **66**, 181 (1993)
- 182 Burrows, F.J., Thorpe, P.E., *Pharmacol. Ther.*, **64**, 155 (1994)
- 183 Forkman, J., in *Cancer : principles and practice of Oncology*, DeVita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A., Eds., Philadelphia, 3075-3085 (1997)
- 184 Dousset, V., Ballarino, L., Delalande, C., Coussemacq, M., Canioni, P., Petry, K. G., Caillé, J.-M., *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, **20**, 223-227 (1999)
- 185 Molday, R.S., Mackenzie, D., *J. Immunol. Methods*, **52**, 353-367 (1982)
- 186 Massart, R., *IEEE Trans. Magn.*, **17(2)**, 1247-1248 (1981)
- 187 Turner, M.R., Duguet, E., Labrugère, C., *Surf. Interface Anal.*, **25**, 917-923 (1997)
- 188 Abboud, M., *Ciments pour le scellement de prothèses articulaires à base de monomères (méth)acryliques et d'alumine modifiée*. Thèse de l'université Bordeaux I (1998)
- 189 Morvan, F., *Elaboration, caractérisation et développement de nouveaux grades de pigments aluminium*. Thèse de l'université Bordeaux I (2002)

CHAPITRE II

SYNTHESE ET MODIFICATION CHIMIQUE DE LA SURFACE DE NANOPARTICULES DE MAGHEMITE

1. Synthèse et caractérisation des ferrofluides ioniques de maghémite

1.1 Généralités

Les **ferrofluides** sont des dispersions colloïdales stables de nanoparticules magnétiques dans un fluide porteur. Ce sont des liquides qui, d'un point de vue macroscopique, sont monophasiques et réagissent uniformément sous l'action d'un champ magnétique. La stabilisation des nanoparticules dans le solvant est assurée, soit par la présence de charges de surface créant des interactions électrostatiques répulsives, soit par stabilisation stérique générée par un agent dispersant (tensioactif ou macromolécules) adsorbé ou greffé à leur surface. Les colloïdes utilisés sont généralement des ferrites ferrimagnétiques ou des métaux ferromagnétiques à la température de l'application. Les particules de Fe- α et de Co- α sont les métaux les plus souvent utilisés du fait de leur aimantation élevée. Cependant se détériorent par oxydation à l'air ou en milieu aqueux et cette instabilité chimique limite fortement leur application.

Les **ferrites**, de formule générique ($M^{II}Fe_2O_4$, $M^{II} = Fe^{II}, Co^{II}, Ni^{II}, Cd^{II}, Mn^{II}, Zn^{II}$ ou Mg^{II}) sont des oxydes ferriques de métal divalent M^{II} , qui peut également représenter un mélange de deux espèces métalliques. Elles cristallisent en une structure cubique, spinelle, de groupe de symétrie $Fd3m$. La structure est dite spinelle normal (ou direct) ou inverse selon

que les cations divalents M^{2+} occupent respectivement les sites tétraédriques ou octaédriques du réseau cubique à faces centrées (cfc) d'oxygène. Les ferrites spinelles de Fe^{II} , Co^{II} , Ni^{II} sont inverses, tandis que ceux de Cd^{II} , Mn^{II} , Zn^{II} sont directs. Quant à la ferrite de Mg^{II} , elle est en situation intermédiaire : c'est une ferrite mixte. D'autres ferrites, les hexaferrites, de type magnétoplombite ($M^{II}Fe_{12}O_{19}$, $M^{II} = Ba^{II}$, Sr^{II} , Pb^{II}) présentent une structure hexagonale. La très forte anisotropie magnétocristalline des hexaferrites leur confère une aimantation rémanente élevée et une forte coercivité. Ces matériaux sont utilisés pour la fabrication d'aimants permanents.

La **magnétite** (Fe_3O_4) est la ferrite la plus utilisée pour les applications biologiques, car ses produits de biodégradation ne sont pas toxiques. Les ions ferreux et la moitié des ions ferriques occupent la moitié des sites octaédriques (sites B) du réseau cfc légèrement distordu de l'oxygène. L'autre moitié des ions ferriques occupe le huitième des sites tétraédriques (sites A) (Fig. 1.1). Le contenu de la maille peut s'écrire $[Fe^{III}]_A[Fe^{III}Fe^{II}]_B O_4$.

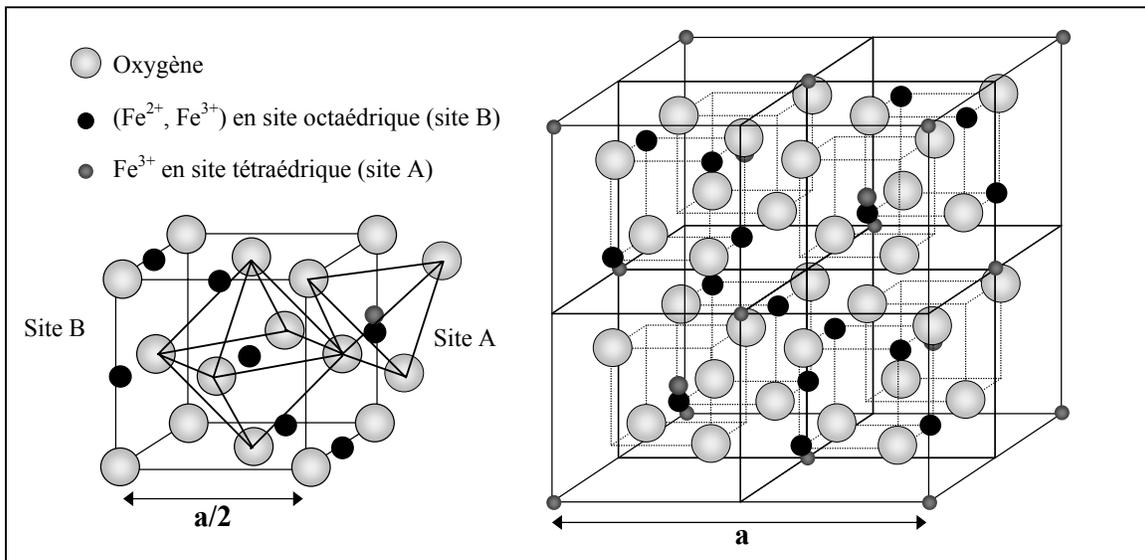


Figure 1.1. Représentation de la structure spinelle inverse de la magnétite.

La magnétite est un oxyde de fer de couleur noire, commun dans la nature que ce soit dans le granite ou dans les roches volcaniques comme le basalte. La présence de ce minéral, appelé communément pierre d'aimant, dans de nombreuses laves a permis notamment d'étudier l'évolution du champ magnétique terrestre et de dater des terres cuites en mesurant leur aimantation acquise lors de leur refroidissement¹. La première synthèse de la magnétite a été due à l'instigation de Le Fort², qui en 1852, prépara de la magnétite colloïdale par coprécipitation alcaline de sels ferreux et ferriques.

Les premiers ferrofluides de magnétite ont été synthétisés beaucoup plus tard. C'est en effet, en 1938 que Elmore³ a obtenu une dispersion de magnétite en phase aqueuse en lavant plusieurs fois de la magnétite colloïdale par une solution d'acide chlorhydrique à 0,01 N. Puis, en 1966, Rosenweig⁴ a présenté une autre méthode qui consiste à broyer le matériau massif jusqu'à l'obtention de grains de taille submicronique, dispersés ensuite dans un solvant organique, par l'intermédiaire d'un tensioactif. Cependant cette méthode lente (plusieurs semaines) et donc coûteuse est mal adaptée pour la production à l'échelle industrielle. Plus tard, Reimers et Khalafalla⁵ ont développé des ferrofluides stabilisés dans des hydrocarbures (alcanes, kérosène) au moyen de tensioactifs comme l'acide oléique.

Puis, Massart⁶ a établi le procédé chimique reposant sur la méthode esquissée par Elmore, 43 ans auparavant, qui permet d'obtenir des liquides magnétiques stables, en milieu aqueux, sans l'intervention d'agent de stabilisation organique. Les dispersions colloïdales de magnétite, préparées par coprécipitation alcaline de chlorures ferreux et ferriques, sont alors obtenues après peptisation par un acide (HCl, HNO₃, HClO₄) ou par une base (N(CH₃)₄OH).

Depuis, la synthèse des ferrofluides s'est diversifiée tant en ce qui concerne l'utilisation des solvants comme fluide porteur (xylène, toluène, polyglycols, polyphényléthers, etc.) que des agents de stabilisation^{7,8}.

Une voie découverte plus récemment consiste à préparer les sols de magnétite en milieu hétérogène comme les microémulsions inverses (eau dans huile). Les précurseurs ferreux et ferriques sont dissous dans des microgouttelettes d'eau, stabilisées par un tensioactif dans un solvant organique. Les précurseurs sont ensuite coprécipités par l'ajout d'une base dans le milieu ou par addition d'une microémulsion contenant la base⁹. Cette méthode présente l'avantage de réduire la largeur de la distribution en taille des nanoparticules.

D'autres procédés ont permis d'obtenir de la magnétite comme l'oxydation de sels de Mohr (FeSO₄) par du nitrite de sodium¹⁰, l'oxydation de gels d'hydroxydes ferreux en milieu alcalin par l'air¹¹ ou par les ions nitrates¹² ou encore par réaction des ions ferreux sur la lépidocrocite γ -FeOOH¹³.

L'utilisation de macromolécules hydrophiles comme le dextran^{14,15} ou l'alcool polyvinylique¹⁶, permet aussi d'obtenir des ferrofluides stables, soit directement par coprécipitation des précurseurs dans le milieu contenant les macromolécules solubilisées, soit par leur adsorption à la surface des particules d'oxyde stabilisées en milieu aqueux.

Les propriétés semiconductrices de la magnétite proviennent d'un échange électronique rapide à température ambiante entre le Fe^{II} et le Fe^{III}. Cette forte mobilité électronique fait de la magnétite un oxyde à valence mixte. En effet, des mesures de spectroscopie Mössbauer, à température ambiante, révèlent des cations octaédriques de charge +2,5, d'où la formule $[\text{Fe}^{3+}]_A[\text{Fe}_2^{2,5+}]_B\text{O}_4$ ¹⁷. Cependant, la magnétite a tendance à s'oxyder facilement par chimisorption d'oxygène à l'air ou bien en suspension neutre ou alcaline. Elle peut s'oxyder également en suspension acidifiée, par élimination des ions ferreux du réseau de la particule. Dans ce dernier cas, c'est la mobilité des électrons dans le réseau qui est responsable du renouvellement des sites ferreux de surface¹⁷. De ce fait, la magnétite est souvent sous-stoechiométrique en Fe^{II}; la composition se situant dans le domaine de $[\text{Fe}^{III}]_A[\text{Fe}^{III}\text{Fe}^{II}]_B\text{O}_4$ à $[\text{Fe}^{III}]_A[\text{Fe}_{5/3}^{III}\square_{1/3}]_B\text{O}_4$ (où \square , symbolise les lacunes cationiques du sous-réseau octaédrique). Cette dernière, la **maghémite** ou sesquioxyde cubique ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) de couleur marron-rouge, conserve la même structure que la magnétite et, elle aussi, est ferrimagnétique.

Les réactions acido-basiques de surface et l'adsorption de cations peuvent entraîner une réponse rédox du cœur des colloïdes et des transferts d'ions et d'électrons à travers l'interface oxyde-solution¹⁷. Par conséquent, afin de prévenir ces réactions de surface qui pourraient engendrer des effets néfastes sur les greffages ultérieurs, nous nous sommes uniquement intéressés à la synthèse de ferrofluides de maghémite, plus stable que la magnétite vis-à-vis de l'oxydation, et à l'étude de la modification de surface de ces nanoparticules.

1.2 Synthèse du ferrofluide ionique de base

Tout les lots de ferrofluides nécessaires à l'étude ont été synthétisés selon la méthode mise au point par Massart^{6,8}. Ce protocole permet d'obtenir le matériau de base nécessaire à cette étude, en grande quantité et avec une bonne reproductibilité au vu des données de la littérature^{8,18,19,31}. La synthèse se compose en quatre étapes décrites dans la figure 1.2 :

Mode opératoire du ferrofluide acide (Fig. 1.2):

✓ **Etape 1 : Formation de la magnétite :** le nombre de moles de chlorure ferreux, dissous dans 170 ml d'acide chlorhydrique 1,5 M, est versé dans un bêcher de 5 L contenant le chlorure ferrique dissous dans 3,5 L d'eau, en proportion stœchiométrique (rapport initial Fe^{II}/Fe^{III}=0,5). Les sels de fer sont alors coprécipités par l'ammoniaque, à température ambiante, sous forte agitation, menant à la formation de la magnétite colloïdale. Les floculats de magnétite sont laissés à décanter sur une plaque magnétique, puis le surnageant est éliminé.

✓ **Etape 2 : Désorption des contre-ions ammonium, oxydation de surface** : après l'élimination du surnageant et les étapes successives de lavage, la surface des particules de magnétite est traitée à l'acide nitrique.

✓ **Etape 3 : Oxydation du cœur des nanoparticules** : elle consiste à ajouter à ébullition, une solution de nitrate ferrique sur l'oxyde magnétique. Après une demi-heure, le floculat de maghémite est décanté magnétiquement et le surnageant éliminé

✓ **Etape 4 : Peptisation des nanoparticules de maghémite** : pour obtenir le ferrofluide acide, la maghémite floculée est traitée par un acide dont le contre-ion est non floculant (voir § 1.4.2.c) comme l'acide nitrique (HNO₃) ou l'acide perchlorique (HClO₄). Après le traitement acide, la maghémite est décantée magnétiquement et lavée successivement trois fois à l'acétone pour éliminer l'excès d'acide ou de base. L'acétone étant un solvant volatil, on prend soin de ne pas sécher le floculat au risque de ne pas pouvoir le peptiser. La dispersion à l'état de sol se produit alors au moment où le floculat de maghémite est placé dans un volume d'eau déionisée (500 ml). L'acétone résiduelle est éliminée par évaporation sous vide à 40°C. Le ferrofluide est ensuite ramené à un volume d'un litre.

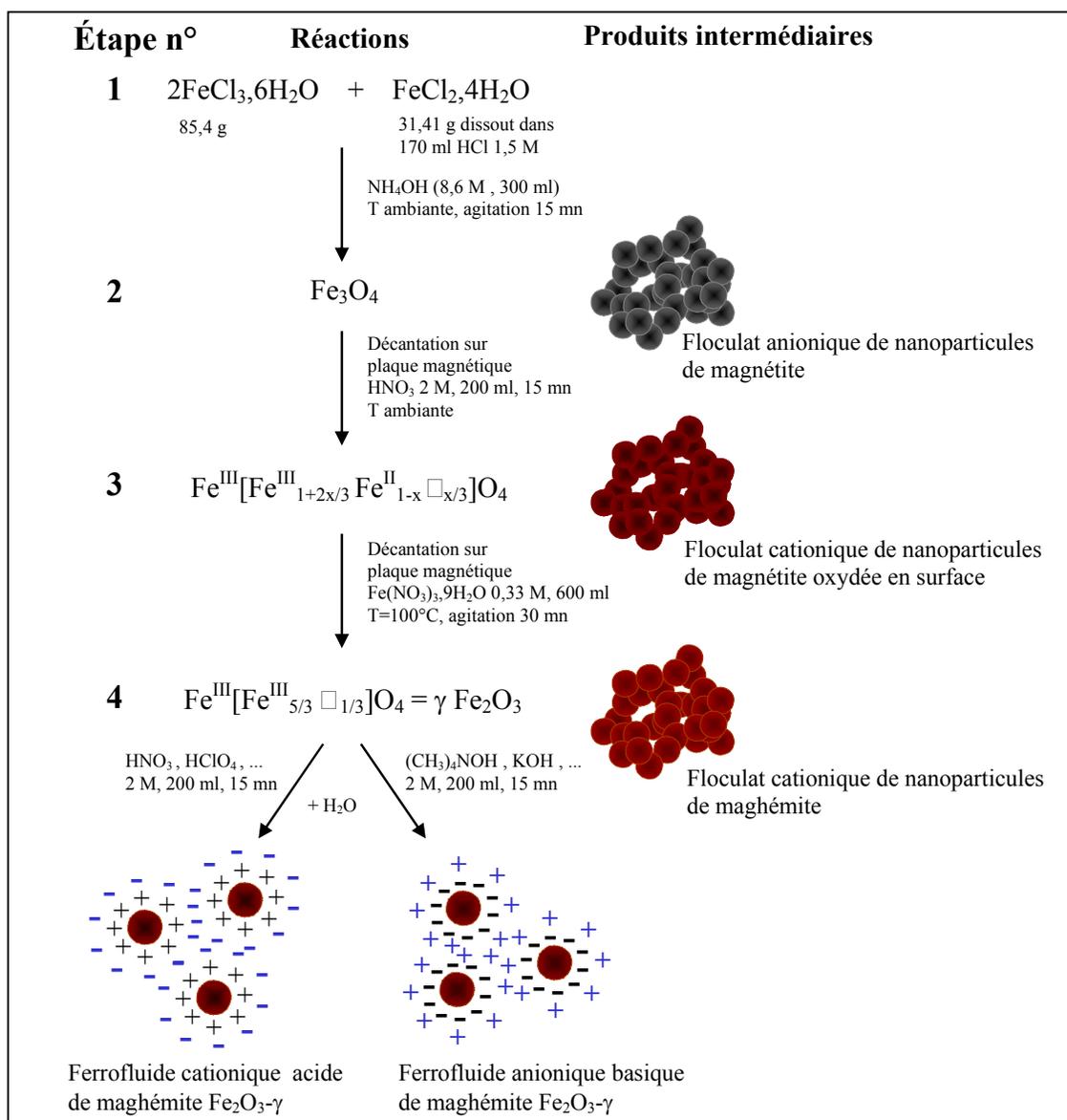


Figure 1.2. Représentation schématique des conditions expérimentales de l'élaboration du ferrofluide ionique de maghémite.

La première étape conditionne le rendement de la synthèse et la taille des particules. La fraction molaire en Fe^{2+} , conduisant au meilleur rendement en magnétite, est celui des conditions stœchiométriques, i.e. 0,33.

La deuxième étape permet à la fois d'acidifier la surface des nanoparticules en désorbant les contre-ions flocculants ammoniums NH_4^+ remplacés par les ions nitrates et de solubiliser les ions ferreux par oxydation superficielle.

Dans la troisième étape de synthèse, l'apport des ions Fe^{3+} en solution provoque l'oxydation du Fe^{II} des particules, car le potentiel redox du couple $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ en solution est supérieur à celui du même couple dans l'oxyde. Cette oxydation totale conduit à la phase maghémite $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$.

Lors de la quatrième étape, les protons (ions hydronium) apportés par l'acide s'adsorbent à la surface de l'oxyde. La surface des nanoparticules se charge par adsorption de protons présents dans la solution apportant ainsi les charges surfaciques nécessaires à la répulsion électrostatique entre les particules. La **peptisation** (i.e. la « redispersion » du flocculat) peut se faire également par voie basique en utilisant une base forte, comme l'hydroxyde de tétraméthylammonium ou la potasse, dont le contre-ion est non flocculant vis-à-vis de la surface de l'oxyde. Les particules de maghémite sont alors entourées d'ions tétraméthylammonium, l'ensemble formant un sol isoélectrique. La particularité de ce cation provient du fait qu'il n'est pas polarisant (tout comme K^+) de part la présence des quatre groupements méthyle électrodonneurs.

Le rendement, déterminé par dosage analytique du fer (§ 1.3.4a), pour un ferrofluide peptisé à l'acide nitrique est de l'ordre de 70%. Cette limitation est principalement due aux étapes d'oxydation et de peptisation des nanoparticules (2-4) à l'issue desquelles une partie de l'oxyde de fer est solubilisée dans le milieu acide. Le sol obtenu possède un pH égal à 2,5 et une concentration massique en maghémite d'environ 28 g/l.

1.3 Caractérisation des nanoparticules de maghémite

1.3.1 Détermination de la distribution en taille

Nous avons vu que la taille du vecteur est un des facteurs qui conditionne leur biodistribution (voir Chap. I § 3.2.1), d'où la nécessité de contrôler la taille des nanoparticules et l'état d'agrégation à l'issue de chaque étape de synthèse.

Deux méthodes granulométriques ont été utilisées dans le cadre de cette étude, la microscopie électronique à transmission (MET) et la spectroscopie de corrélation photonique (PCS). La première donne des informations sur la taille et la morphologie des nanoparticules. Cependant, à l'exception de certains cas qui nécessitent une préparation particulière des échantillons, l'image rendue des nanoparticules déposées sur les grilles de MET ne reflète pas leur état de dispersion en milieu aqueux. La deuxième technique est complémentaire de la première, car elle nous renseigne sur la distribution en taille des nanoparticules dispersées en milieu liquide. La valeur moyenne du diamètre mesuré est différente car elle correspond à la taille des particules solvatées et varie fortement en fonction de l'état de floculation du système.

a. Microscopie électronique à transmission

Préparation des grilles de microscopie : Une goutte de ferrofluide, dilué au 1/1000^e, est placée sur une grille de cuivre recouverte d'une membrane de collodion. Les particules sont alors séchées sur la grille laquelle est ensuite enfermée dans un portoir à l'abri de toute poussière. Les mesures sont réalisées sur un microscope électronique à transmission JEOL 2000 FX, de 1 nm de résolution, opérant à 200 kV.

Les clichés montrent les particules de maghémite relativement sphériques et plus ou moins agglomérées (fig. 1.3). Un histogramme en tailles est réalisé pour chaque préparation sur environ 500 particules (fig. 1.4). Les nanoparticules synthétisées présentent une distribution en taille qui est bien décrite par une loi log-normale :

$$P(d) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma d} \exp\left[-\frac{\ln^2(d/d_0)}{2\sigma^2}\right]$$

où d_0 est le diamètre médian (ou moyenne géométrique) et σ l'écart type des $\ln d$. L'écart type rend compte de la dispersion des valeurs des diamètres des nanoparticules autour de la valeur la plus probable d_p . Si l'écart type est faible, les valeurs des diamètres des nanoparticules sont regroupées autour de d_p ; s'il est important, elles sont en revanche très dispersées. Le diamètre le plus probable est relié à d_0 et σ par la relation : $d_p = d_0 \exp(-\sigma^2)$. La moyenne des diamètres s'écrit : $\bar{d} = d_0 \exp(\sigma^2/2)$. Cette dernière correspond au diamètre moyen en nombre \bar{d}_n .

La distribution en taille est unimodale. Le diamètre le plus probable d_p est de 7 nm, le diamètre médian d_0 égal à 7,5 nm, la moyenne des diamètres \bar{d} égal à 7,8 nm et l'écart type σ égal à 0,27.

Il faut noter que de nombreux travaux ont porté sur l'optimisation de cette méthode de synthèse visant à réduire la taille des nanoparticules ou à diminuer la largeur de la

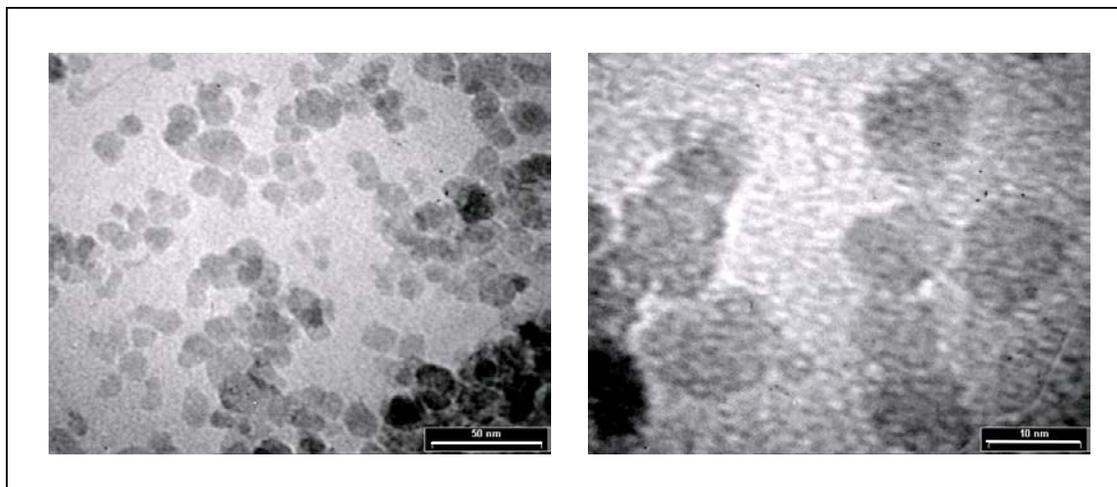


Figure 1.3. Clichés de MET de nanoparticules de maghémite (exp. FF10).

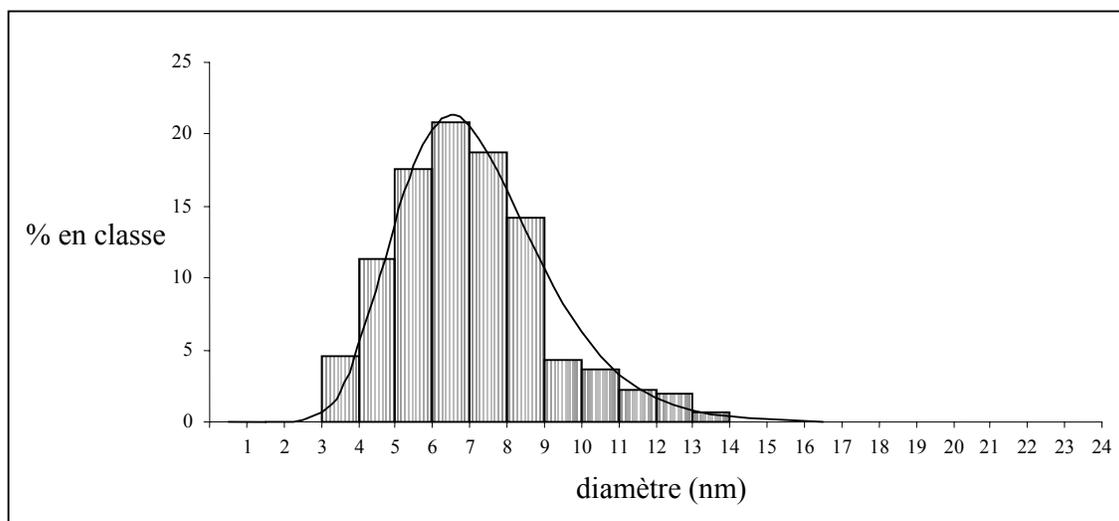


Figure 1.4. Histogramme en taille des nanoparticules de maghémite et distribution de type log-normale corrélée (exp. FF10).

distribution. Les principaux paramètres intervenant pour le contrôle de la distribution en taille sont la nature de la base utilisée, le ratio initial $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ou le mode d'introduction et de mélange des réactifs. De plus, l'addition d'un électrolyte dans le mélange réactionnel privilégie la formation de nanoparticules de plus petite taille en favorisant la nucléation au détriment de la croissance des grains^{19,20}. Par exemple, le mélange de chlorures ferreux et ferriques ajouté goutte-à-goutte dans un grand volume de base en présence de nitrate de sodium, sous forte agitation, permet de réduire au final la taille moyenne des nanoparticules de maghémite à 2,7 nm, après oxydation de la magnétite par l'acide perchlorique²¹.

D'autres travaux ont montré que les différentes classes en taille d'une distribution granulométrique peuvent être fractionnées par floculation du ferrofluide à l'acide nitrique¹⁸. La présence d'un excès d'ions nitrate dans le milieu a pour effet de diminuer les interactions

électrostatiques répulsives (stabilisantes) par écrantage des charges de surface des nanoparticules. Les particules les plus petites décanent moins rapidement que les plus grandes ce qui permet de les séparer. Cette technique a permis d'obtenir des ferrofluides constitués de nanoparticules de taille moyenne égale à 6,5 nm et d'écart type $\sigma = 0,1$.

Cependant, afin de limiter le nombre d'étapes de synthèse dans le cadre de cette étude, nous nous sommes exclusivement intéressés à la modification de surface des nanoparticules de maghémite de base et à leur comportement en solution après fonctionnalisation. Néanmoins nous gardons à l'esprit que la taille du cœur magnétique constituant les matériaux réalisés pourra être ajustée en vue d'une optimisation au cours d'études futures.

b. Spectroscopie de corrélation de photons

La granulométrie par spectroscopie de photons est une technique fondée sur la mesure du mouvement brownien des particules (mouvement aléatoire des particules provoqué par les impacts des molécules de solvant sur la surface de la particule). Cette méthode permet de mesurer les dimensions des particules de suspensions colloïdales de 1 nanomètre à quelques micromètres.

La vitesse de déplacement des particules est définie par le coefficient de diffusion translationnel D qui, d'après l'équation de Stokes-Einstein, est lui-même proportionnel au diamètre hydrodynamique de la particule sphérique :

$$r(H) = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

où $r(H)$ est le rayon hydrodynamique, D le coefficient de diffusion, η la viscosité, k la constante de Boltzmann et T la température.

Physiquement, le rayon hydrodynamique représente le cœur de la particule entouré de sa double couche de contre-ions (couches de solvation). En augmentant la force ionique du milieu environnant, on comprime cette double couche ionique au point de faire varier le diamètre hydrodynamique. Les mesures sont donc réalisées en absence d'électrolyte. La température dans la cellule doit être stabilisée avec précision sinon des courants de convection peuvent avoir lieu et induire un mouvement parasite superposé au mouvement brownien que l'on mesure. La viscosité doit aussi être connue et dépend elle-même de la température. Les sols doivent rester stables durant la mesure, sinon le mouvement vertical des agglomérats se superpose aux mouvements browniens et la mesure devient inexploitable. En outre, il est nécessaire de travailler avec des suspensions extrêmement propres, car d'après la théorie de

Rayleigh, l'intensité diffusée est proportionnelle au (diamètre de la particule)⁶ : une particule de 100 nm diffuse un million de fois plus qu'une particule de 10 nm. Tous les échantillons sont donc filtrés (filtres PTFE 0,2 µm) avant la mesure.

Appareillage utilisé et principe de fonctionnement : Les mesures ont été effectuées avec un instrument Zetasizer 3000HS de Malvern qui combine un spectroscope de corrélation de photons avec une méthode de mesure de potentiel zêta (décrite dans la partie 1.4.2.d). Le spectroscope est constitué d'un montage optique (Fig. 1.5) comprenant : une source laser He-Ne ($\lambda = 633 \text{ nm}$) équipé d'un filtre spatial et d'une optique de focalisation du faisceau au milieu d'une cellule de mesure ; un photomultiplicateur placé à 90° du faisceau incident permet la mesure d'intensités diffusées très faibles générées par des particules de très petites tailles.

Le signal mesuré par le photomultiplicateur correspond aux fluctuations de la lumière diffusée dues aux mouvements Browniens des particules. Ce signal est ensuite traité par un corrélateur numérique, afin d'obtenir la fonction d'autocorrélation du signal. Les conditions opératoires sont fixées depuis un logiciel de commande.

Mode opératoire de la préparation des échantillons et des mesures PCS : 100 µl de ferrofluide fraîchement préparé est dilué 1000 fois, le pH égal à 2,5, étant maintenu constant par addition d'acide nitrique dilué. Trois mL de ce sol sont versés dans une cellule en quartz. La température est ajustée à 25°C in situ par un Peltier et une viscosité de 0,89 cP est saisie dans le logiciel pour les calculs.

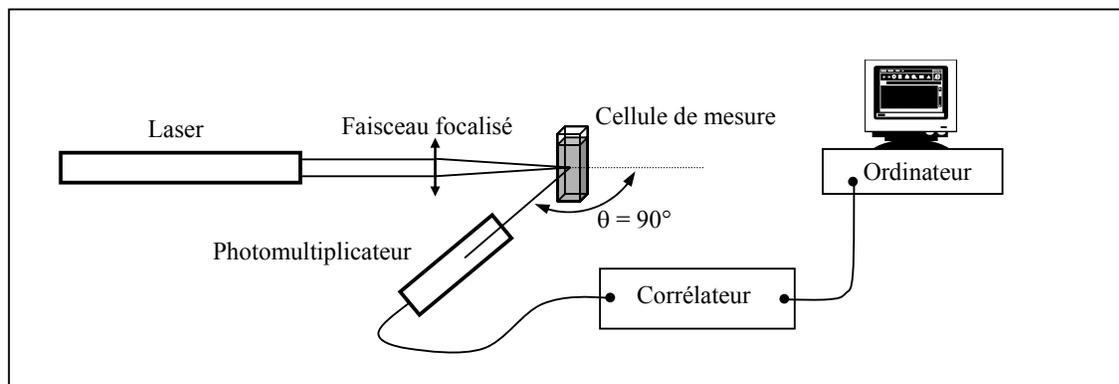


Figure 1.5. Représentation schématique du montage optique.

La figure 1.6 montre l'histogramme des diamètres en nombre obtenu par PCS comparé à celui issu des clichés de MET. Le diamètre moyen en nombre, égal à 8,5 nm, est supérieur d'un nanomètre par rapport à celui obtenu en MET du fait de la présence de la couche de solvation. De plus, nous constatons que la distribution s'est élargie, l'écart type σ étant égal à 0,51. Cet élargissement peut être attribué à la présence de particules plus ou moins agglomérées.

Cette méthode permet aussi de calculer les moyennes pondérées en volume et en intensité dont les expressions et les résultats sont réunis dans le tableau 1.1. Le diamètre moyen en intensité, connu sous le nom de diamètre de Stokes ou diamètre PCS, est une fonction du diamètre physique élevé à la puissance 6. C'est un diamètre moyen pondéré par l'intensité diffusée (ce n'est pas un moment pondéré en nombre ou en volume). De ce fait,

cette valeur moyenne est très sensible à la présence d'agglomérats dans la solution et a tendance à biaiser la mesure des tailles en intensité en faveur des particules les plus grandes. Néanmoins, cette mesure reste la plus fiable que l'on puisse obtenir par PCS. En effet, les particules et les agglomérats possèdent une forme irrégulière qui a pour conséquence d'affecter les algorithmes de calcul des diamètres établis pour des particules sphériques. La figure 1.7 montre les distributions pondérées obtenues pour un ferrofluide stabilisé à pH 2,5.

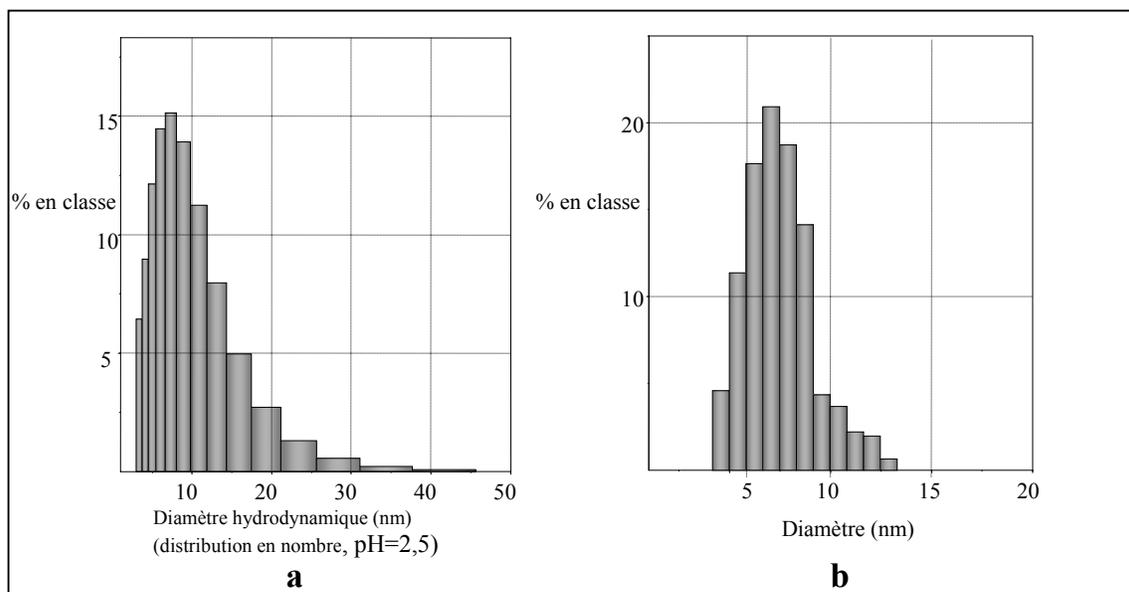


Figure 1.6. Histogrammes PCS (a) et MET (b) des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ (exp. FF10).

Appellation	Définition	Facteur pondéré	$\bar{d} \pm \Delta d$ (nm)	σ
Diamètre moyen en nombre	$\bar{d}_n = \frac{\sum n_i d_i}{\sum n_i}$	Classe en nombre	$8,5 \pm 10$	0,52
Diamètre moyen en volume	$\bar{d}_v = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$	Classe en volume	18 ± 21	0,53
Diamètre PCS	$\bar{d}_z = \frac{\sum n_i d_i^6}{\sum n_i d_i^5}$	Intensité de la lumière diffusée	40 ± 46	0,52

Tableau 1.1. Diamètres moyens calculés, issus des mesures de PCS, des nanoparticules de maghémite dispersées en milieu acide (Δd et σ représentent la largeur à mi-hauteur et l'écart-type des distributions lognormales).

Généralement, $\bar{d}_z \geq \bar{d}_v \geq \bar{d}_n$ et la différence entre les différents diamètres moyens augmente avec la polydispersité.

Il faut noter ici que ces distributions correspondent à une valeur de pH du ferrofluide particulière (i.e. pH = 2,5). En effet, le pH est un paramètre essentiel pour le contrôle de l'état d'agrégation des sols ioniques de maghémite (voir § 1.4.2.e).

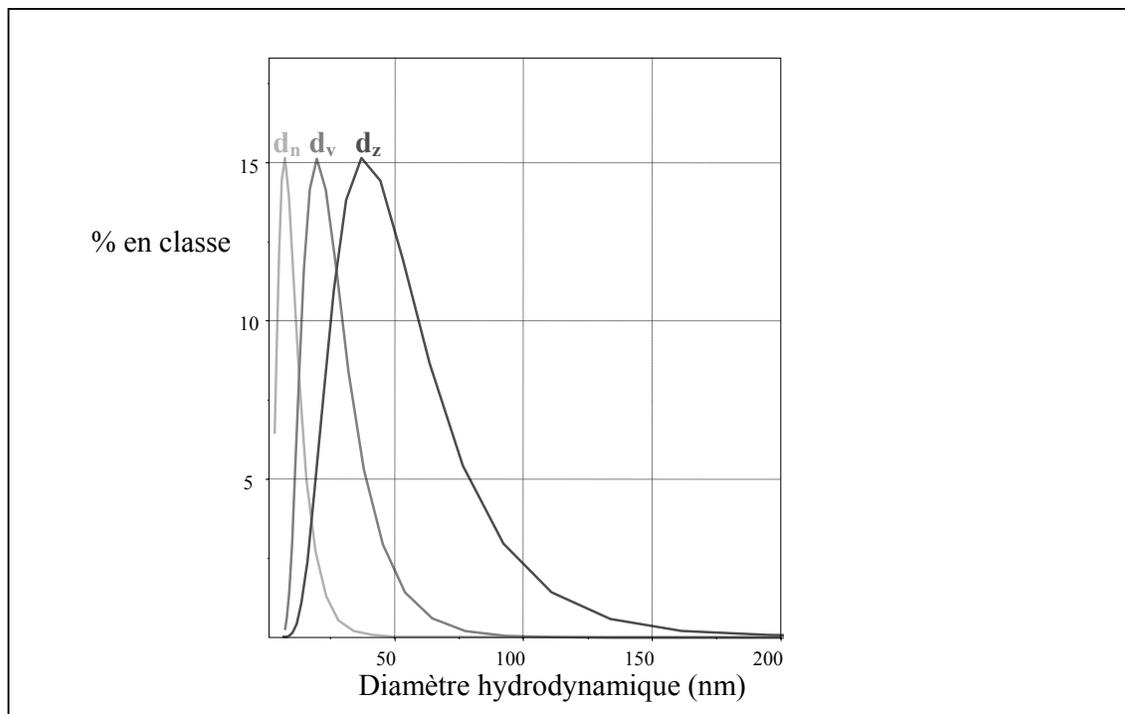


Figure 1.7. Distributions lognormales des diamètres pondérés en nombre d_n , en volume d_v et en intensité d_z pour la maghémite colloïdale à pH 2.

La diffraction des rayons X (DRX) permet également de déduire la taille moyenne des nanoparticules en mesurant la largeur à mi-hauteur du profil de la raie de diffraction la plus intense, injectée ensuite dans la formule de Scherrer. Toutefois cette méthode ne donne aucun renseignement sur la distribution en taille. De plus le diamètre moyen donné par DRX est souvent supérieur à celui obtenu par MET, car il est entaché d'une erreur significative due au fait que l'appareillage et le taux de microdéformations de l'échantillon contribuent aussi à l'élargissement du profil.

D'autres méthodes comme les mesures d'aimantation permettent d'obtenir les paramètres de la distribution en taille, c'est-à-dire le diamètre moyen et l'écart type. En effet, la forme de la courbe d'aimantation d'un système superparamagnétique est conditionnée par la distribution en taille des nanoparticules. Cependant le diamètre mesuré correspond à celui des domaines magnétiques qui est généralement inférieur d'environ 10% au diamètre réel des nanoparticules mesuré par MET. Cette différence provient de la présence d'une couche de passivation de la surface des nanoparticules, désorganisée et non magnétique¹⁸. Dans le cadre de notre étude nous avons donc utilisé exclusivement et de façon systématique les techniques de PCS et de MET qui apportent suffisamment d'informations sur les distributions en taille des nanoparticules en solution ou par voie sèche.

1.3.2 Caractérisation structurale par diffraction des rayons X

Préparation des échantillons de maghémite pour la DRX : Les diffractogrammes de poudre sont effectués avec un diffractomètre Philips PW 1710 utilisant une radiation $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Un échantillon de nanoparticules de maghémite, obtenu par évaporation de l'eau contenue dans le ferrofluide, est séché puis broyé avant d'être déposé sur un support en aluminium.

La figure 1.8 montre le diffractogramme indexé par les indices de Miller correspondant aux réflexions observées.

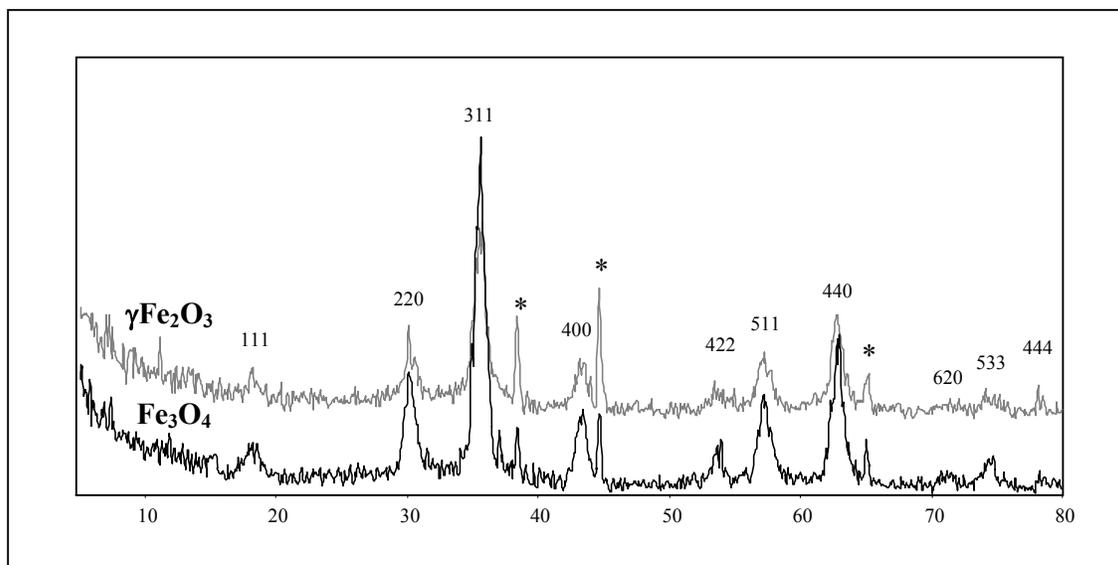


Figure 1.8. Diffractogramme de poudre de la maghémite synthétisée (* raies de l'aluminium du porte échantillon).

L'observation de ces diffractogrammes donne quelques informations sur la cristallinité de la maghémite colloïdale. D'une part, l'absence de raies de surstructure montre que l'échantillon est désordonné. En effet, ces raies sont généralement observées aux faibles angles dans le cas de maghémites bien cristallisées, indiquant une répartition ordonnée des lacunes et des cations²². D'autre part, l'aspect diffus des raies de diffraction X indique que cette maghémite est mal cristallisée. Cet effet d'élargissement des raies est d'autant plus marqué que les particules sont petites.

Comme il n'existe qu'une différence faible entre les valeurs des paramètres de maille de la magnétite et de la maghémite (8,38 et 8,33 \AA respectivement), les diffractogrammes de magnétite et de maghémite sont particulièrement identiques. Dans le cas présent, la transformation $\text{Fe}_3\text{O}_4 \rightarrow \gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ est donc indécélable par DRX.

Le paramètre de maille, déduit de la loi de Bragg (1) et de l'expression établie pour une maille cubique (2), est égal à 8,35 \AA ce qui est en accord avec les valeurs de la littérature (8,33-8,35 \AA)^{21,22}.

$$(1) : d_{hkl} = \frac{\lambda}{2\sin\theta} \quad (2) : a = d_{hkl} \sqrt{h^2+k^2+l^2}$$

La densité de la maghémite déduite du contenu de la maille cristallographique ($\text{Fe}_{21,33}\text{O}_{32} = 8\{[\text{Fe}^{\text{III}}]_{\text{A}}[\text{Fe}_{5/3}^{\text{III}}\square_{1/3}]_{\text{B}}\text{O}_4\}$, $a = 8,35\text{\AA}$), est donc égale à $4,87 \text{ g/cm}^3$.

A partir de la forme du profil de raie de diffraction, il est possible d'extraire la taille moyenne des cristallites (ou grains) de maghémite. Dans le cas présent, la taille des cristallites correspond à la taille des nanoparticules puisque celles-ci sont monocristallines. La formule de Scherrer (3) permet de façon très approximative d'obtenir cette valeur moyenne :

$$(3) : t = \frac{K\lambda}{\beta\cos\theta}$$

où t est la taille apparente des grains, K le facteur de forme égal à 0,89 pour une sphère, θ l'angle de Bragg, et β la largeur corrigée de la contribution instrumentale : $\beta = \sqrt{B^2+b^2}$, où B est la largeur à mi-hauteur d'une raie de diffraction de la maghémite colloïdale (on choisit la plus intense, i.e. la 311, pour une précision meilleure) et b cette même largeur d'un échantillon de maghémite de référence bien cristallisée. Après élimination de l'élargissement due à la diffraction de la raie $K\alpha_2$ et ajustement parabolique de la ligne de base, la largeur à mi-hauteur de la raie la plus intense est déterminée par le logiciel *Profile Diffrac AT* de Philips. La taille moyenne des nanoparticules mesurée par cette méthode est de 9 nm. Compte tenu des approximations impliquées dans ces déterminations, l'accord avec la valeur obtenue par MET est tout-à-fait satisfaisant. En outre, cette méthode ne prend pas en compte les contraintes et les défauts structuraux liés au processus d'oxydation qui contribuent à l'élargissement des raies.

1.3.3 Comportement thermique

La maghémite est instable thermiquement et se transforme irréversiblement par chauffage, en la forme rhomboédrique, l'hématite $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$. La température de transformation dépend du mode de préparation de la maghémite. Dans le cas de systèmes colloïdaux, la transformation peut se produire en dessous de 300°C avec des effets cinétiques marqués²³. Ce changement de phase, observé par DRX (Fig. 1.9), a lieu vers 400°C . La transition s'étale anormalement sur une plage de température allant de 400 à 500°C à cause de l'existence d'un gradient de température au niveau de l'échantillon et de la différence de conductivité thermique entre le porte-échantillon (en Cu) et la maghémite. Cette température de transition sera déterminée plus précisément par mesures calorimétriques dans la partie 1.4.1a.

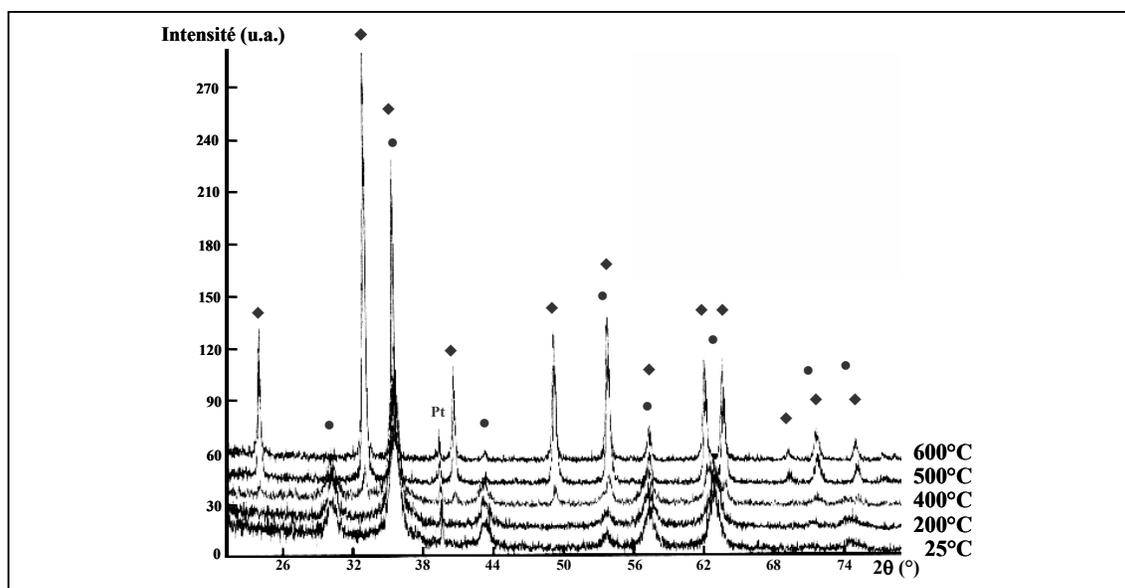


Figure 1.9. Diffractogrammes de rayons X de la maghémite colloïdale traitée à différentes températures (● raies de la maghémite, ◆ raies de l'hématite, Pt porte échantillon en platine).

L'adsorption ou le greffage d'espèces thermiquement stables comme les silanes (voir § 2.3.2b), ou l'encapsulation des nanoparticules dans des billes de silice (voir § 3.3.2), empêchant le frittage, permettent de retarder la transformation $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3 \rightarrow \alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ jusqu'à plus de 1000°C^{24} . L'hématite étant antiferromagnétique, cette transformation peut aussi être observée par des mesures d'aimantation en température.

1.3.4 Dosage du fer dans les ferrofluides

Deux méthodes ont été utilisées pour déterminer la quantité de fer constituant le ferrofluide, l'analyse chimique et la spectrophotométrie.

a. Dosage analytique

Le ferrofluide est dégradé par l'acide chlorhydrique concentré. Cette solution de Fe^{3+} est ensuite pré-réduite par le chlorure stanneux SnCl_2 avant d'être dosée par le dichromate de potassium $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. L'excès de SnCl_2 , qui pourrait interférer sur le dosage du fer, est préalablement éliminé par oxydation au chlorure mercurique HgCl_2 . Pour détecter le point de fin de titrage, on ajoute un indicateur coloré, l'acide diphénylaminosulfonique. La forme oxydée de l'indicateur est violette et sa forme réduite est pratiquement incolore. Le virage observé dans le titrage direct est le passage du vert des ions Cr^{3+} au violet.

Les traces de Fe^{II} résiduels contenues au cœur des nanoparticules de maghémite ont pu être dosées par ce moyen. Dans ce cas, l'échantillon de ferrofluide est dégradé à l'acide

chlorhydrique 10 M puis dosé directement par le $K_2Cr_2O_7$. Le dosage montre alors que la maghémite a été pratiquement oxydée en sa totalité puisque le rapport $[Fe^{II}]/[Fe]_{total} \approx 0,05\%$.

b. Dosage spectrophotométrique

Cette technique permet de doser la quantité de fer pour des sols dilués en maghémite ($[Fe] \leq 10^{-1} \text{ mol.l}^{-1}$). En outre, elle présente l'intérêt d'être non destructive. Les sols de maghémite possèdent un palier d'absorption à 480 nm (Fig. 1.10) qui permet au moyen d'une droite d'étalonnage (Fig. 1.11) de déduire la concentration en fer en appliquant la loi de Beer-Lambert : $D.O. = \varepsilon.C_{Fe}.l$, où $D.O.$ est la densité optique, ε le coefficient d'extinction molaire de la maghémite ($420 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), C_{Fe} la concentration en fer et l la largeur de la cuve (1 cm).

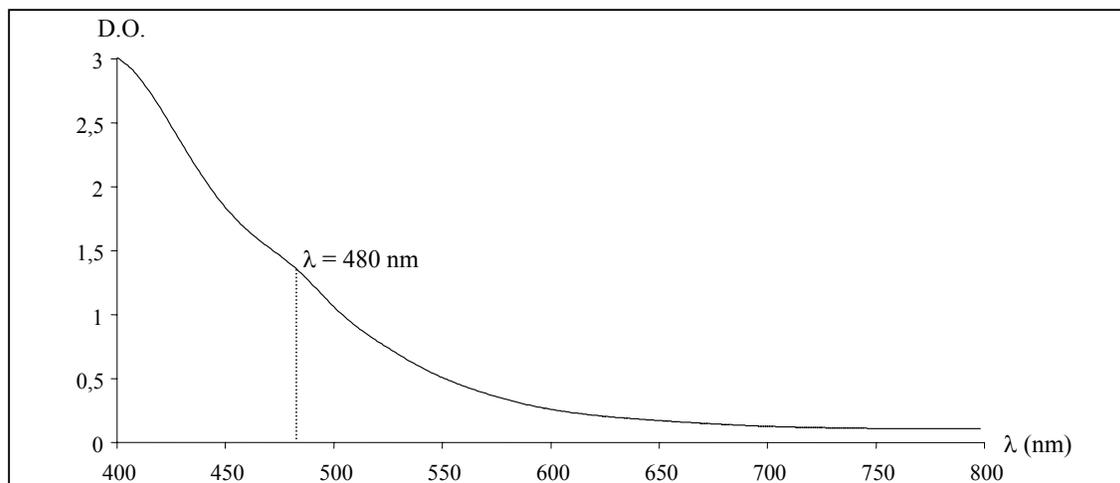


Figure 1.10. Spectre d'absorption d'un ferrofluide de maghémite dilué à $3,3.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ en Fe.

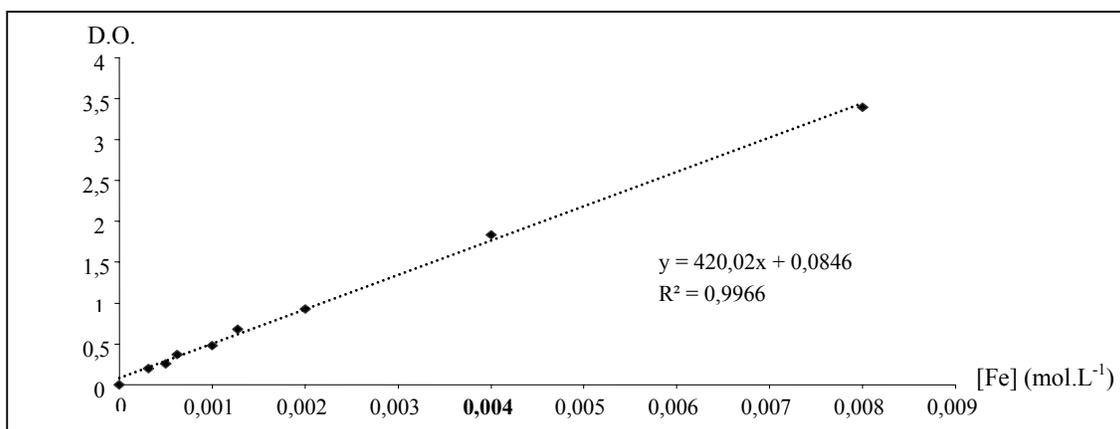


Figure 1.11. Droite d'étalonnage du dosage spectrophotométrique du fer dans les sols de maghémite (en pointillés : droite de tendance avec son équation et le coefficient de corrélation).

1.3.5 Propriétés magnétiques

Les mesures magnétiques sont réalisées sur un magnétomètre SQUID MPMS-5S de Quantum Design. Un des traits caractéristiques des ferrofluides est le comportement superparamagnétique montré par la courbe d'aimantation (Fig. 1.12) qui se distingue par l'absence du cycle d'hystérésis à 290K. L'aimantation apparaît comme une sigmoïde symétrique bien décrite par le formalisme de Langevin (annexe 2).

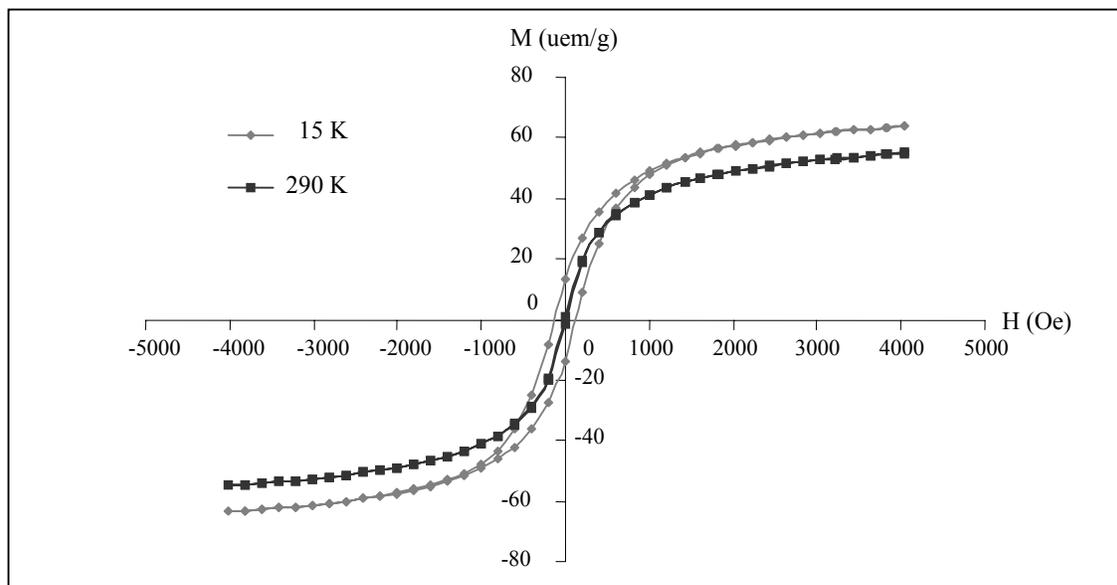


Figure 1.12. Hystérésis de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ à 15K et à 290K.

D'après la littérature²¹, l'aimantation à saturation à 0 K est égale à 85 uem.g^{-1} . Dans le cas présent, la valeur maximale de l'aimantation, à 15 K est seulement de 70 uem.g^{-1} ce qui montre que le système n'est pas saturé. Il faudrait appliquer, en fait, un champ magnétique beaucoup plus élevé (de l'ordre de 10 teslas) pour saturer le système. Ceci s'explique du fait que la maghémite possède une constante d'anisotropie magnétique relativement élevée ($K_1 = -4,64.10^4 \text{ erg.cm}^{-3}$) et qu'il faut donc apporter davantage d'énergie magnétique au système pour pouvoir orienter tous les moments dans la direction de facile aimantation. On peut observer aussi que le système sature moins vite à 290 K, car il faut en plus « contrecarrer » l'énergie d'activation thermique (kT).

En outre, à basse température, le champ coercitif, bien que très faible, est non nul, ce qui indique que l'énergie d'anisotropie magnétocristalline (KV) devient supérieure à kT. Ce phénomène est attribué à la présence des particules plus grandes qui se sont magnétisées.

1.4 Stabilisation des ferrofluides ioniques de maghémite

Les particules de maghémite formées par coprécipitation sont de taille colloïdale. Leur surface spécifique étant élevée, le comportement des sols de maghémite est donc gouverné par les caractéristiques physico-chimiques de leur surface. Il semble donc nécessaire de caractériser la surface des nanoparticules, afin de mieux comprendre les phénomènes d'agrégation et d'appréhender les conditions opératoires pour la réalisation des greffages. A la suite de cette description, nous rappellerons les critères intervenant dans la stabilisation des sols, ainsi que les paramètres qui permettent le contrôle de la stabilité.

1.4.1 Description de la surface des nanoparticules

Une dispersion de nanoparticules de maghémite dans un milieu liquide constitue un système biphasique à l'échelle nanoscopique. La surface des particules d'oxyde est donc le lieu d'échange de matière entre les deux phases. Les cations de surface, qui étaient initialement mobiles en solution, sont soumis après coprécipitation, aux contraintes structurales du cristal. Ils gardent cependant leurs propriétés physico-chimiques initiales (caractère acido-basique, possibilité d'échange de ligands) puisqu'une partie de leur sphère de coordination est toujours en contact avec le milieu d'origine, c'est-à-dire la solution. Pour des raisons d'ordre cinétique (faible mobilité des ions dans le solide) et thermodynamique (produit de solubilité), la migration de cations vers la phase liquide et la dissolution de l'oxyde n'ont pas lieu. La présence d'une couche d'eau chimisorbée permet d'abaisser la différence de potentiel chimique de l'oxygène entre les deux phases. La coordinence des derniers cations Fe^{3+} de surface est donc satisfaite par la présence de groupements hydroxyle ou de molécules d'eau adsorbées (Fig. 1.13).

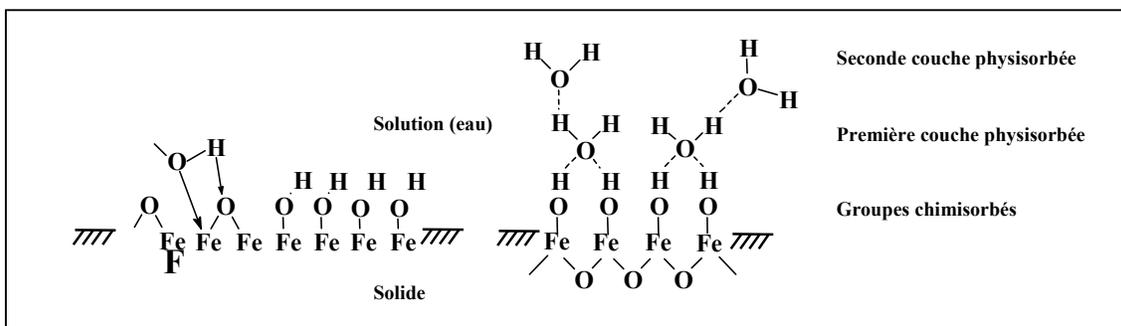


Figure 1.13. Représentation schématique de l'adsorption de l'eau sur la surface d'un oxyde de Fer.

Les groupes de surface, fortement polarisés, développent des interactions très fortes avec l'eau et exercent un effet structurant très marqué avec le liquide. Ainsi de grandes quantités d'eau de solvation peuvent s'organiser autour de la surface, cet arrangement s'atténuant progressivement avec la distance à la surface. La présence de ces couches d'eau physisorbées par liaisons hydrogène et chimisorbées explique en partie les écarts entre les mesures des diamètres des nanoparticules par MET et par PCS.

Cette eau de surface a pu être quantifiée par analyse thermogravimétrique (ATG) et mise en évidence par spectrométrie de masse. Cette dernière méthode a permis de révéler en plus de l'eau sorbée, les espèces chimiques présentes à la surface. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion diffuse (DRIFT) confirme la présence de ces espèces et nous renseigne sur l'état de la surface des nanoparticules.

a. Analyse thermogravimétrique

La maghémite colloïdale a été préalablement floculée à pH = 7 par addition de soude, puis lavée et séchée. Elle est placée dans un creuset en platine puis pesée à l'aide d'une microbalance. Le creuset est ensuite installé sur une microthermobalance MTB18 SETARAM. Les mesures d'ATG sont réalisées dans un domaine de température allant de l'ambiante à 900°C à la vitesse de 2°C/min.

La perte de masse observée par ATG sous air peut être attribuée essentiellement à la présence des couches d'eau adsorbées sur la maghémite (les autres espèces adsorbées sont largement minoritaires). L'ATG révèle la présence d'eau jusqu'à des températures supérieures à 600°C (Fig. 1.14).

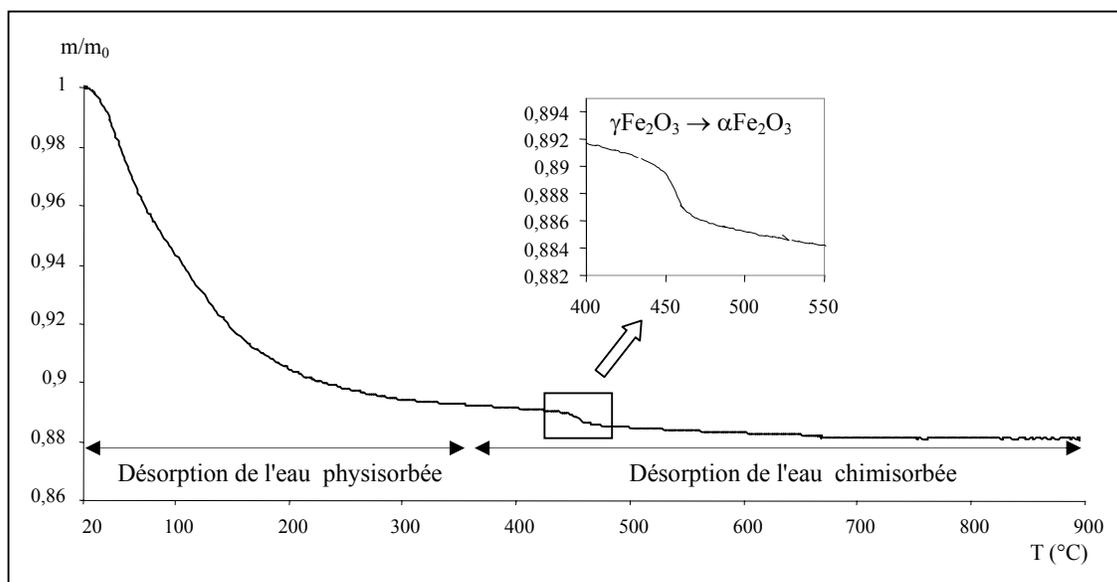


Figure 1.14. Courbe ATG des nanoparticules de maghémite (FF10).

Les couches d'eau physisorbées qui représentent près de 99% de l'eau de solvation sont éliminées jusqu'à 300°C. A partir de 400°C, c'est le processus inverse de chimisorption de l'eau qui s'opère : les groupes hydroxyles adjacents réagissent pour reformer une molécule d'eau qui s'élimine. Puis vers 460°C la transformation de la maghémite en hématite devient suffisamment importante pour que l'on observe l'élimination d'une grande quantité d'eau chimisorbée, due à la réorganisation des atomes de fer de surface en structure rhomboédrique. Ce comportement a été vérifié en couplant la mesure d'ATG à l'analyse enthalpique différentielle (AED) avec un calorimètre SETARAM (TAG 24) équipé d'une thermobalance symétrique (Fig. 1.15). Le pic de transformation de phase $\gamma \rightarrow \alpha$ à 466°C coïncide précisément avec la perte de masse observée.

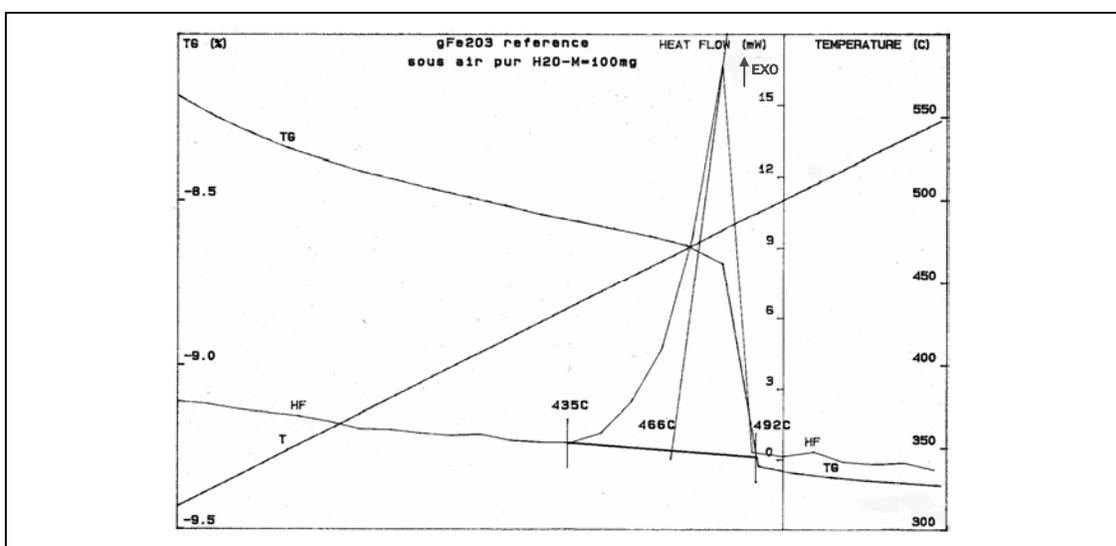


Figure 1.15. Courbes ATG/DSC montrant la perte de masse de la maghémite (FF10) lors de sa transformation en hématite.

Au delà de 700°C, les groupes hydroxylés se déshydratent tant qu'ils sont adjacents. Puis vers 800°C, la déshydratation s'effectue par la formation de ponts oxo entre les atomes de fer (frittage) qui résultent de la combinaison de groupes hydroxyle diffusant à la surface de l'oxyde. Ce résultat illustre bien la capacité de l'eau à développer des liaisons fortes avec la surface des nanoparticules d'oxyde de fer et qu'il paraît, de ce fait, peu concevable de l'éliminer complètement sans modifier les propriétés physico-chimiques (taille, structure, propriétés de surface) de la maghémite. Le taux de recouvrement en hydroxyles a pu être ainsi quantifiée en ne considérant que la perte de masse due à l'élimination des molécules d'eau au-delà de 400°C à partir de la relation suivante :

$$d_{(OH)} = \frac{2 \times \Delta m}{18 \times S_{sp} \times m_0}$$

où Δm est la perte de masse entre 400°C et 900°C, m_0 la masse initiale prise à 400°C, le facteur 18 la masse molaire de l'eau et le facteur 2 signifie que la formation d'une molécule d'eau nécessite le départ de deux hydroxyles. S_{sp} est la surface développée par gramme de maghémite, mesurée par absorption d'azote (méthode BET) sur un appareillage Micromeritics ASAP 2010. Les nanoparticules de maghémite possèdent une surface spécifique de l'ordre de 130 m²/g. La densité $d_{(OH)}$ ainsi mesurée est de 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ ce qui correspond à une densité moléculaire surfacique de 6 Fe=OH/nm². Ce résultat est en accord avec les valeurs trouvées dans la littérature (5,9 Fe=OH/nm² mesurée avec la méthode Karl Fischer²⁵). Cependant il faut noter que cette valeur ne prend pas en compte l'élimination d'autres espèces éventuellement chimisorbées.

b. Spectrométrie de masse

Les mesures d'ATG peuvent aussi être couplées avec un spectromètre de masse. L'appareillage utilisé est un spectromètre quadripolaire (masse 0-300) Pfeiffer Balzer. Le couplage de ces deux méthodes nous permet d'attribuer les pertes de masses aux espèces physisorbées et chimisorbées présentes à la surface de la maghémite en fonction de la température (Fig. 1.16a).

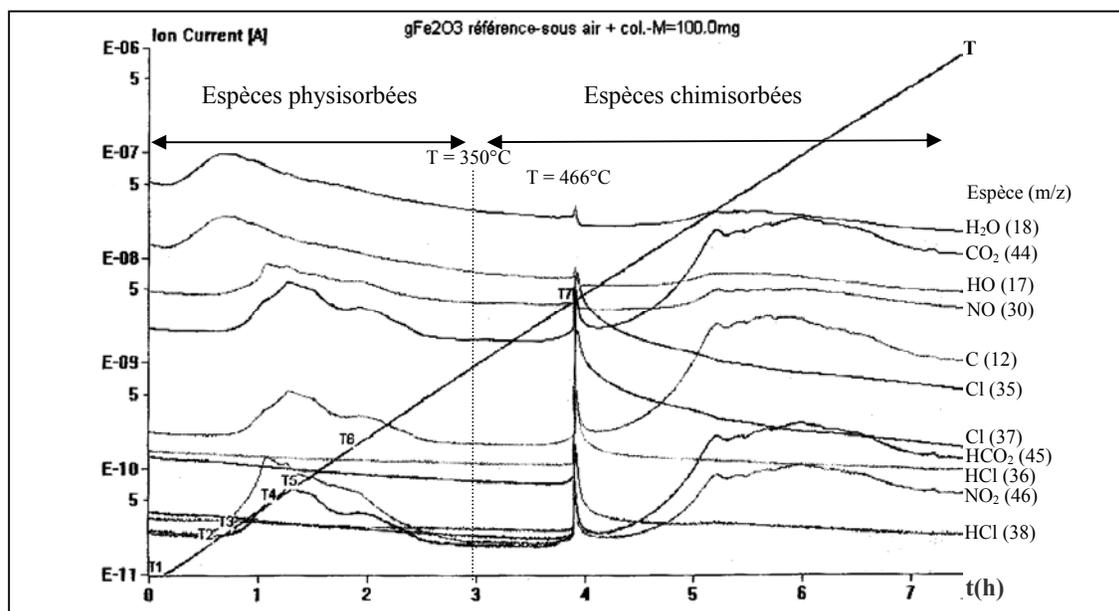


Figure 1.16a. Spectre de masse de la maghémite en fonction de la température.

De nouvelles espèces ont ainsi pu être révélées. On observe notamment la présence des ions chlorure ($m/z = 35, 36, 37, 38$) provenant des sels précurseurs, les contre-ions nitrate

($m/z = 30, 46$) et des contaminants comme les carbonates de l'air ($m/z = 12, 44, 45$) qui se sont adsorbés lors du séchage de la maghémite.

Le spectre de masse est caractérisé par deux régions. La première partie, de 20°C à 350°C, correspond aux espèces physisorbées comme l'eau largement majoritaire, puis les nitrates et les carbonates. Au-dessus de 350-400°C, le spectre correspond à l'élimination des espèces chimisorbées de la surface, notamment au niveau du pic à 466°C correspondant à la transformation de la maghémite en hématite.

La figure 1.16b montre un détail du spectre de masse des ions chlorure. Jusqu'à la température de transformation, on n'observe pas d'élimination de chlore. Ce n'est qu'à 466°C que cette espèce ionique se désorbe, lors du réarrangement des atomes de surface. Cet effet montre que comme l'eau, le chlore est fortement lié à la surface. Ceci peut s'expliquer du fait que la polarisabilité des ions chlorures est telle que des liaisons fortes (covalentes) peuvent se créer avec les sites de surface (voir § 1.4.2c).

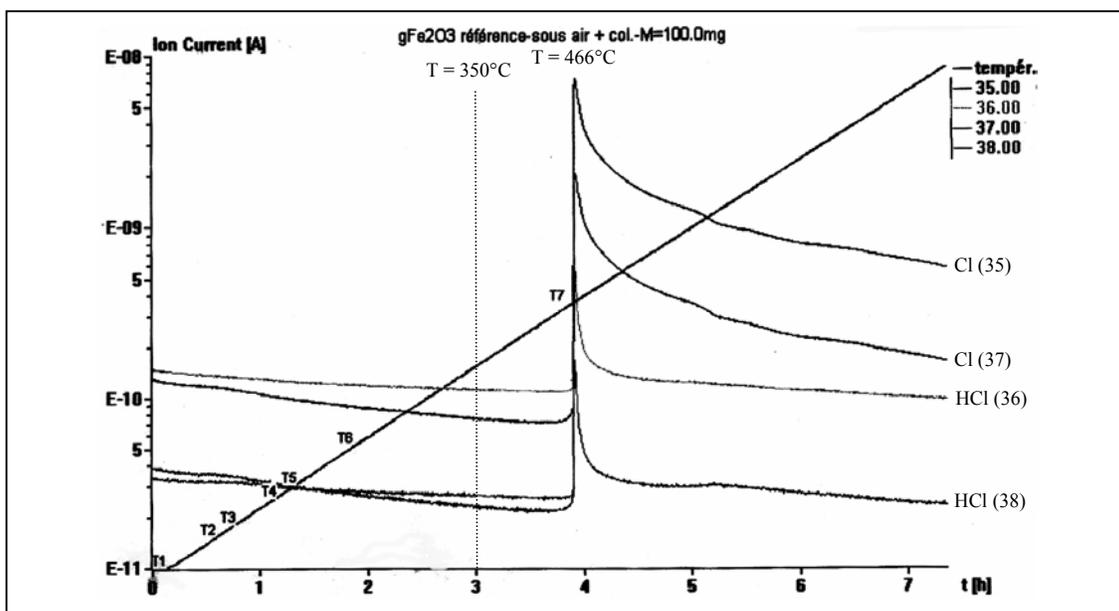


Figure 1.16b. Détail du spectre de masse de la maghémite montrant la désorption des ions chlorures lors de la transformation en hématite à 466°C.

La densité de sites de surface ne dépend pas seulement de la surface spécifique, de la structure ou de la nature du matériau mais aussi de son histoire. Dans le cas présent, après plusieurs lavages et traitements à l'acide nitrique, une quantité non-négligeable d'ions chlorure résiduels provenant des sels précurseurs reste chimisorbée à la surface des nanoparticules de maghémite.

c. Spectroscopie infrarouge par réflexion diffuse

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion diffuse (DRIFT) permet de caractériser les différentes espèces adsorbées et/ou greffées à la surface des nanoparticules et d'identifier les liaisons covalentes avec les sites de surface.

Un échantillon de ferrofluide à $pH = 2$ est déstabilisé à l'acétone, lavé, séché puis broyé en présence de bromure de potassium (3,33 % massique de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$). Le mélange est placé dans un portoir conique. Les mesures sont effectuées sur un spectromètre Bruker IFS Equinox 55 muni d'une cellule de réflexion Selector Graseby Specac. Les spectres sont obtenus après 120 accumulations pendant 1 minute et possèdent une résolution de 4 cm^{-1} .

Le spectre obtenu (Fig. 1.17a) est typique des oxydes de structure spinelle désordonnés caractérisé par deux larges bandes vibrationnelles Fe-O à 636 et 586 cm^{-1} .

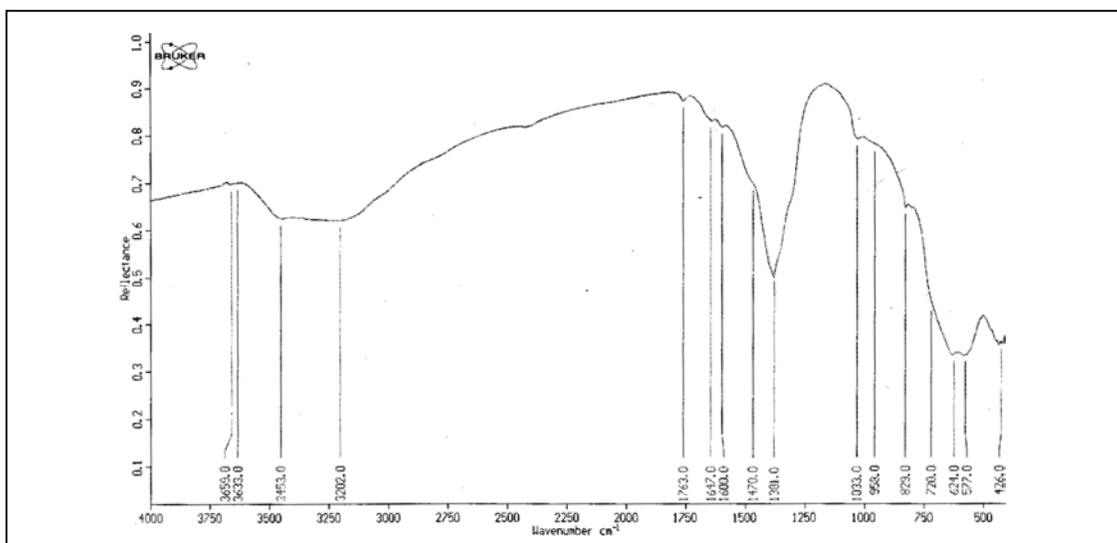


Figure 1.17a. Spectre DRIFT de la maghémite.

En effet, le spectre de la maghémite bien cristallisée présente un nombre élevé de bandes d'absorption plus ou moins diffuses dans ces domaines de nombre d'onde, caractéristiques d'un certain ordre de répartition des lacunes et des cations²⁶. La bande située vers $820\text{-}830\text{ cm}^{-1}$, caractéristique des groupes hydroxyle de la surface, correspond au mode d'élongation $\nu_s(\text{FeOH})$.

La figure 1.17b montre le spectre IR de la maghémite avant et après traitement thermique à 300°C (2h). On peut remarquer l'apparition d'une série de bandes d'absorption vibrationnelles (728 , 695 et 584 cm^{-1}) sur le spectre de la maghémite traitée, signe d'une réorganisation du fer de surface et des lacunes en structure spinelle inverse.

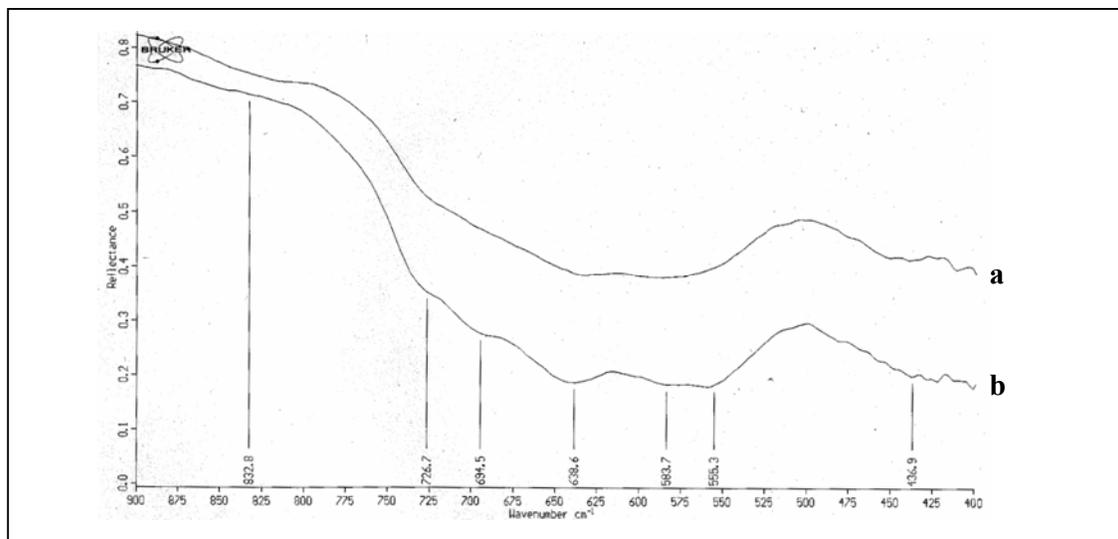


Figure 1.17b. Spectres DRIFT de la maghémite colloïdale avant (a) et après (b) traitement thermique à 300°C.

Ce résultat montre que la surface des nanoparticules est désordonnée et présente vraisemblablement de nombreux défauts tels que des marches, des troncatures ou des insertions de molécules d'eau à l'intérieur même de la structure. La série de bandes vers 1600 cm^{-1} confirme la présence de l'eau chimisorbée. Les bandes à 3430 et 3200 cm^{-1} correspondent aux modes de vibration d'élongation OH provenant de l'eau physisorbée perturbée par des ponts hydrogène intramoléculaires. L'existence de l'eau physisorbée empêche l'observation des deux bandes de vibrations d'élongation des hydroxyles de surface normalement associés aux cations Fe^{3+} des sites octaédriques et tétraédriques situés respectivement à 3690 et 3630 cm^{-1} (25). La bande large à 1338 cm^{-1} est attribuée au mode d'élongation des nitrates, tandis que celle vers 850 cm^{-1} correspond au mode de déformation O-N-O des contre ions nitrate physisorbés.

1.4.2 Comportement des sols ioniques de maghémite

Dans cette partie, nous posons les bases nécessaires pour l'étude et la compréhension des comportements des sols ioniques en faisant ressortir les paramètres déterminants pour le contrôle de leur stabilité. Les critères de stabilité du ferrofluide de maghémite sont ensuite déterminés en fonction de ces paramètres.

a. Origine des charges de surface

La stabilité des sols est déterminée par la présence de charges surfaciques générant des interactions électrostatiques répulsives entre les particules. Ces charges de surface sont issues

de la polarisation de la densité électronique de l'oxygène par le métal entraînant un affaiblissement de la liaison OH. Ceci explique le comportement acido-basique de type Brönstedt des oxydes, dont les groupes de surface s'ionisent au contact de l'eau. Dans le cas de la maghémite :



La charge électrique de surface dépend donc de l'acidité du milieu. La modification du pH entraîne alors une variation de la densité globale de charge nette :

$$\sigma_0 = (F/A)([\text{Fe}\equiv\text{OH}_2^+] - [\text{Fe}\equiv\text{O}^-])$$

où A est l'aire totale des nanoparticules de maghémite ($\text{m}^2.\text{L}^{-1}$), F la constante de Faraday (96500 C.mol^{-1}), le deuxième terme représente la concentration en sites chargés (mol.l^{-1}). σ_0 la densité de charge nette est une grandeur mesurable par potentiométrie. Dans le cas de la maghémite colloïdale, la valeur maximale de σ_0 , correspondant à la dissociation complète des groupes hydroxyle de surface, serait de $80 \mu\text{C.cm}^{-2}$. Cependant cette valeur n'est jamais atteinte, car le nombre de sites chargés est limité par leur répulsion électrostatique mutuelle. Dans la pratique, une densité de charge de l'ordre de $10 \mu\text{C.cm}^{-2}$ positive ou négative est suffisante pour obtenir un sol de maghémite stable²⁷.

Le **point de charge nulle (PCN)** est défini par le pH pour lequel la charge σ_0 s'annule. Il est aussi défini comme la demi-somme des logarithmes des constantes de dissociation des sites de surface:

$$\text{PCN} = \frac{\text{pK}^+ + \text{pK}^-}{2}$$

A $\text{pH} < \text{PCN}$, la surface est chargée positivement et à $\text{pH} > \text{PCN}$, elle est négative. Le PCN dépend de plusieurs facteurs comme la polarisation des cations de surface, l'affinité du contre-ion avec la surface, la structure et la morphologie des particules ou comme l'histoire des particules (mode de préparation, traitements thermiques,...). Les valeurs des constantes de dissociation ont été déterminées pour une magnétite colloïdale préparée par coprécipitation²⁸ : $\text{pK}^+ = 4,6$ et $\text{pK}^- = 8,2$ (détermination par calcul à partir du modèle de la couche diffuse). Dans ce cas, le PCN calculé est égal à 6,4 ce qui est proche de la valeur expérimentale égale à 6,3. Pour la maghémite, on doit s'attendre à une valeur du PCN proche de celle-ci, car la magnétite s'oxyde en milieu acide.

On doit distinguer le PCN du **point isoélectrique (PIE)** qui sont des notions différentes. La charge de surface peut s'annuler soit par l'absence de charges positives ou

négatives (PCN) soit par la compensation exacte des charges. La différence réside en la fraction de sites ionisés. Lorsque la différence $\Delta pK = pK^- - pK^+$ est élevée (cas de la plupart des oxydes), il s'agit d'un PCN. Lorsque ΔpK est faible (cas des solides ioniques comme AgI), c'est la notion de PIE qui est utilisée.

Le PCN peut être déterminé expérimentalement par titrage acido-basique en faisant varier la concentration en électrolyte dans le milieu. Le point d'intersection des différentes courbes $\sigma_0 = f(\text{pH})$ correspond alors au PCN^{27,29}. Il faut noter ici l'importance du rôle de l'électrolyte et de l'influence de la **force ionique** ($I = 1/2 \sum z_i^2 c_i$) dans le comportement des sols. L'augmentation de la concentration en électrolyte dans le milieu a pour effet d'augmenter l'écrantage des répulsions électrostatiques entre les sites chargés. L'atténuation des répulsions par les contre-ions adsorbés dans la couche de solvation permet alors d'augmenter la fraction de sites ionisés et donc la densité surfacique. Ce phénomène, appelé effet de sel, est mis à profit pour évaluer le PCN car à cette valeur particulière de pH, les électrolytes n'ont aucun effet sur la surface.

La représentation ci-dessus, qui n'implique qu'un seul type de site superficiel, est très schématique. En effet, il est peu probable que tous les groupes hydroxyles de surface soient amphotères du fait des contraintes électrostatiques et structurales notamment dues à l'existence de sites octaédriques et tétraédriques possédant leurs propres propriétés acido-basiques. Le PCN correspond alors à l'absence de charge sur certains sites et à la compensation exacte sur d'autres. Le manque d'information concernant les détails structuraux de la surface entraîne que les modèles permettant d'évaluer la densité de charge de surface reposent généralement sur le comportement moyen des groupes hydroxyles.

b. Modélisation de l'interface nanoparticule-solution

La surface des nanoparticules de maghémite possède une couche d'eau fortement structurée (couche de Stern) dans laquelle les ions H^+ ou OH^- peuvent diffuser pour générer des charges en protonant ou déprotonant les sites $Fe \equiv OH$ de surface. Ces ions nommés IDP, **ions déterminant le potentiel**, forment une première couche séparée d'une deuxième enveloppe ionique par le plan interne de Helmholtz (IHP). Cette deuxième couche est constituée de contre-ions spécifiquement adsorbés qui écrantent partiellement la charge de surface. La limite de la couche de Stern avec le solvant est matérialisée par un plan de cisaillement, nommé plan externe de Helmholtz (OHP).

La figure 1.18 montre la variation du potentiel électrostatique en fonction de la distance à la surface, selon le modèle simple de Gouy-Chapman. Ce modèle reste limité, car il donne une description approximative des comportements des colloïdes, notamment il ne prédit pas de manière réaliste la position du plan de cisaillement. Il permet néanmoins de donner une description qualitative satisfaisante de l'interface oxyde solution.

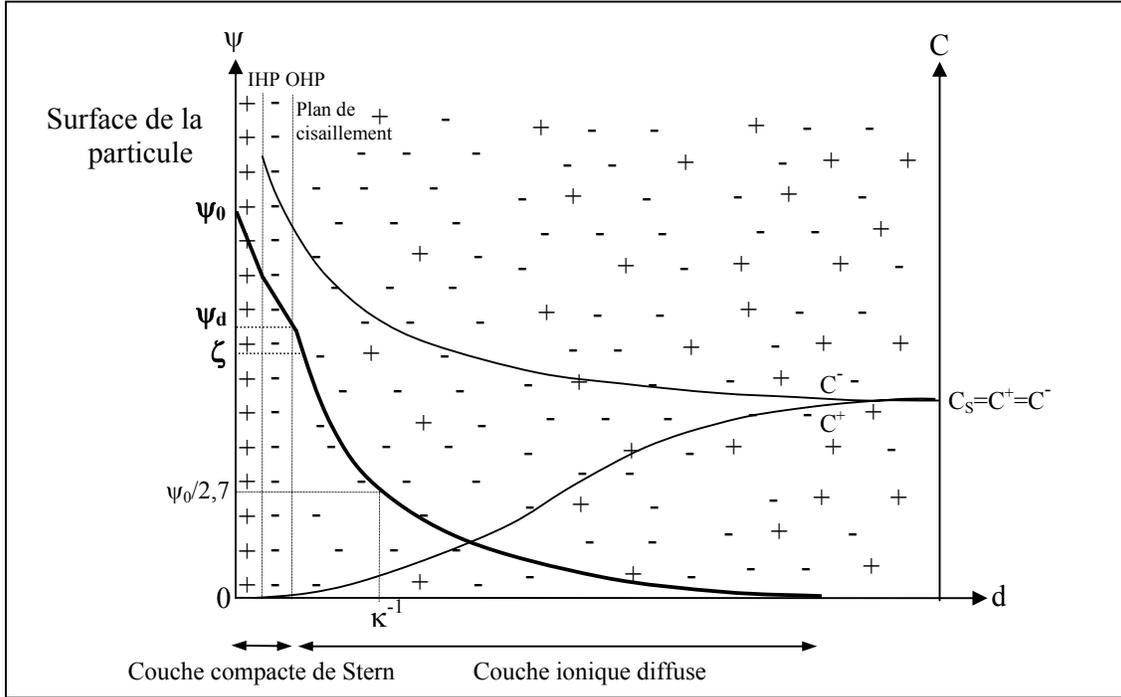


Figure 1.18. Représentation schématique de la variation du potentiel électrique et de la concentration ionique en fonction de la distance à l'interface dans le modèle de la double couche électrique de Gouy-Chapman (ψ_0 représente le potentiel de surface, ψ_d le potentiel électrostatique au niveau de l'OHP, ζ le potentiel électrocinétique, κ^{-1} la longueur réciproque de Debye, C^+ et C^- les concentrations respectives en cations et en anions de la solution, C_s la concentration totale en électrolyte dans la solution, + et - représentent les ions de la solution, IDP et contre-ions). D'après réf. 30.

A partir de l'OHP, le potentiel électrostatique ψ décroît en fonction de la distance à la surface. Cette région, où les contre-ions soumis au potentiel de surface sont distribués en fonction de la distance, est appelée couche diffuse. La **longueur de Debye**, κ^{-1} , est définie comme la distance à laquelle ψ décroît de $\psi_d/2,718$, ψ_d étant le potentiel électrique au niveau de l'OHP.

La longueur de Debye, qui dépend de la force ionique, s'exprime par : $\kappa = \left(\frac{2000F^2I}{\epsilon RT} \right)^{1/2}$

L'augmentation de la concentration en contre-ions entraîne donc une diminution de κ^{-1} , qui se traduit par la compression de la double couche et la diminution de l'épaisseur de la couche diffuse.

c. *Stabilisation électrostatique*

La stabilité des sols colloïdaux, décrite par la théorie DLVO (Deryagin et Landau, 1941 ; Verwey et Overbeek, 1948), est déterminée par la balance entre les forces répulsives et attractives. La stabilisation est dite électrostatique lorsque les forces répulsives sont générées par la présence de charges à la surface. Le bilan des forces agissant entre les particules permet de déterminer la hauteur de la barrière énergétique susceptible d'éviter l'état d'agrégation. C'est en ce sens que la stabilité des dispersions colloïdales est dite *cinétique*. Ces forces, qui concourent à la (dé)stabilisation des ferrofluides, sont de natures diverses. On distingue celles issues d'un champ de forces extérieures telles que la gravité et le champ magnétique, et les forces d'interaction interparticules comme les forces de London-Van der Waals (interactions dipolaires électriques attractives), les forces magnétostatiques (interactions dipolaires magnétiques attractives) et les forces répulsives électrostatiques. Dans la pratique, on ne considère que les forces attractives de London-Van der Waals contre les forces électrostatiques répulsives, les autres termes étant négligeables pour des particules inférieures à 10 nm. Au-delà de ce diamètre, les interactions magnétostatiques ne sont plus négligeables¹⁸ (illustration Fig. 1.25).

✓ Forces de London-Van der Waals : elles résultent des fluctuations dipolaires au niveau moléculaire et ne dépendent que de la nature des matériaux en présence. L'énergie potentielle d'interaction de paires entre objets macroscopiques varie selon une loi en r^{-2} . Dans le cas de deux sphères identiques de rayon a , dont les surfaces sont distantes de D et de distance centre à centre $R=D+2a$, l'énergie potentielle d'interaction s'écrit¹⁷ :

$$V_A = -\frac{A}{6} \left(\frac{2a^2}{R^2 - 4a^2} + \frac{2a^2}{R^2} + \ln \frac{R^2 - 4a^2}{R^2} \right)$$

où A est la constante effective de Hamaker. En première approximation V_A est insensible aux conditions physico-chimiques et ne dépend pas de la concentration en électrolyte.

✓ Forces électrostatiques : l'énergie de répulsion électrostatique dans les cas-limites de potentiel et charge constants, pour de faibles potentiels de surface et pour des distances d'approche assez grandes ($D \gg \kappa^{-1}$), s'écrit²⁹ :

$$V_R \approx 2\pi\epsilon\epsilon_0 \psi_d^2 \exp(-\kappa D)$$

dans laquelle ϵ est la permittivité du milieu. L'énergie potentielle V_R varie avec le pH et la force ionique à travers la valeur de ψ_d et de la longueur de Debye κ^{-1} .

Le potentiel électrostatique ψ_d , qui gouverne les interactions répulsives entre les particules dues à la charge de surface, peut être assimilé au potentiel électrocinétique appelé aussi **potentiel zêta** ζ (Fig. 1.18). Il correspond à la valeur du potentiel mesuré au niveau du plan de cisaillement. Le potentiel ζ paraît alors être un bon indice pour mesurer l'étendue des interactions répulsives entre les particules. Il est, en outre, le seul potentiel de surface accessible expérimentalement pour des particules d'oxyde.

La stabilité de la dispersion dépend de la valeur du maximum V_T^0 de l'énergie potentielle totale d'interaction, $V_T = V_A + V_R$, représentant la hauteur de la barrière d'énergie cinétique (Fig. 1.19).

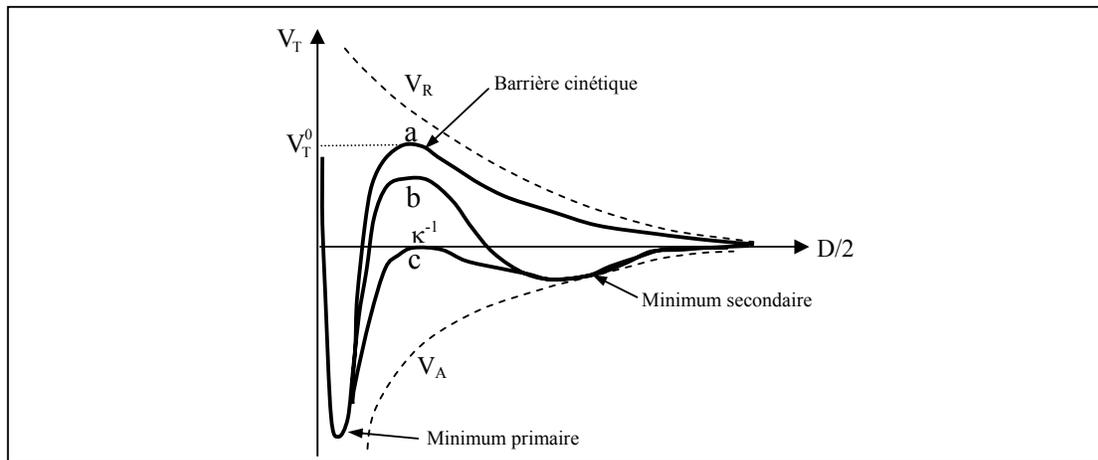


Figure 1.19. Représentation schématique de l'énergie d'interaction totale $V_T = V_A + V_R$ en fonction de la distance. (a) cas des potentiels électrostatiques élevés, les particules se repoussent fortement ; (b) cas des potentiels faibles, les particules partiellement agrégées, sont en équilibre stable dans le minimum secondaire ; (c) les surfaces, en équilibre instable donnent lieu à une agrégation limitée et une floculation lente des particules ; Lorsque $V_T = V_A$ les particules floculent rapidement en absence de potentiel électrostatique répulsif.

La hauteur de cette barrière énergétique est régie essentiellement par la charge de surface, la concentration et la charge de l'électrolyte. En effet, l'augmentation de la force ionique et de la valence z provoque la diminution du potentiel de surface (Fig. 1.19.c) par abaissement de la longueur de Debye κ^{-1} (κ est proportionnel à \sqrt{I}). Par conséquent, le recouvrement des couches diffuses, issu des collisions interparticulaires, diminue ce qui entraîne l'abaissement de la distance d'approche.

La forte dépendance de la charge sur la **concentration limite de floculation** C_{lim} est illustrée par la règle de Schulze et Hardy indiquant que le produit $C_{lim} \cdot z^6$ est constant. Cette règle est établie à partir des conditions $d(V_T) = 0$ et $V_T = 0$ (situation de la courbe c, Fig. 1.19). La concentration limite est alors donnée par²⁹ :

$$C_{\text{lim}} = \frac{(4\pi\epsilon_0)^3 0,107 D^3 (kT)^5 \gamma^4}{N_A A^2 (ze)^6}$$

où N_A est la constante d'Avogadro, ϵ_0 la permittivité du vide, D la constante diélectrique de l'eau (à 25°C, $D=80 \text{ F.m}^{-1}$) et γ un paramètre qui dépend de la charge de surface (pour un potentiel élevé, $\gamma=1$) et A la constante d'Hamaker. Finalement la règle de Schulze et Hardy s'écrit :

$$C_{\text{lim}} = 87,4.10^{-40} / z^6 A^2$$

Cette relation nous montre que le pouvoir flocculant d'ions multivalents est considérablement plus élevé que celui des ions monovalents. On peut noter aussi que pour des potentiels de surface élevés, l'évaluation de la concentration limite de floculation (en mol.l^{-1}) permet d'accéder à la valeur de la constante d'Hamaker (en J). Néanmoins, les valeurs obtenues sont plus élevées que celles obtenues par les calculs, du fait des nombreuses approximations et pour des potentiels faibles, $C_{\text{lim}} \propto \psi_d^4 / z^2$.

Le pouvoir flocculant des ions dépend aussi de leur nature. Par exemple, dans le cas d'ions monovalents, les phénomènes d'adsorption spécifique sont d'autant plus marqués que les contre-ions sont polarisants^{17,29}. Ainsi les ions NH_4^+ , Na^+ , Li^+ , Cl^- , Br^- (**ions structurants**) ne permettent pas la dispersion des nanoparticules de maghémite respectivement en milieu basique et acide, alors que les ions $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$, K^+ , NO_3^- , ClO_4^- (**ions indifférents**) conduisent à la formation de sols anioniques et cationiques stables. Ce comportement explique notamment la présence d'une quantité d'ions chlorure résiduels provenant des sels précurseurs, malgré les traitements successifs réalisés à l'acide nitrique pour charger la surface des nanoparticules de maghémite.

La charge de surface et la concentration en électrolyte, respectivement liées au pH et à la force ionique, sont donc les deux paramètres déterminants pour le contrôle de la stabilité des sols ioniques. V_A , et par conséquent la constante d'Hamaker, est fixé pour un système donné, car il ne dépend que de la nature du matériau. On peut remarquer cependant que V_A augmente en valeur absolue avec la taille (le rayon a) des particules. Par conséquent, dans le cas de dispersions possédant une distribution en taille élevée, on peut observer une floculation partielle due à la présence des particules de plus grande taille quelles que soient les conditions de pH.

Le potentiel zêta est apparu comme étant une grandeur physique observable bien adaptée pour l'étude de la stabilisation des sols colloïdaux. Dans le paragraphe suivant, un rappel succinct sur la détermination de cette grandeur, est présentée.

d. Détermination du potentiel zêta

Les nanoparticules, entourées de leur double couche de solvation, constituent des unités chargées glissant dans un fluide (newtonien). Le potentiel électrocinétique ζ situé au niveau du plan de cisaillement, enveloppant la couche de solvation, est calculé à partir de la mesure de la mobilité électrophorétique μ_E (vitesse par unité de champ électrique). L'équation de Smoluchowski associe la mobilité électrophorétique au potentiel zêta³⁰ :

$$\mu_E = (4\pi\epsilon_0) \frac{D\zeta}{4\pi\eta} = \frac{\epsilon\zeta}{\eta}$$

où μ_E est la mobilité électrophorétique ($\mu\text{m.s}^{-1}/\text{V.cm}^{-1}$), ϵ la permittivité diélectrique de l'eau ($\epsilon = \epsilon_0 D = 8,854.10^{-12} \times 79 \text{ F.m}^{-1}$), η la viscosité de l'eau (à 25°C, $\eta = 8,95.10^{-4} \text{ N.m}^{-2}.\text{s}$) et ζ le potentiel zêta (mV).

En 1924, Hückel, en réexaminant le problème pour le cas des électrolytes forts, a obtenu une relation avec une différence significative³⁰ :

$$\mu_E = \frac{2\epsilon\zeta}{3\eta}$$

Afin d'étudier l'effet de la variation de l'épaisseur de la double couche sur la mobilité, Henry proposa en 1931, de calculer μ_E en prenant en compte l'influence des phénomènes de friction responsables de la diminution de la vitesse de migration des particules. La formule résultante de la mobilité électrophorétique dans le cas d'une particule sphérique s'écrit alors³⁰ :

$$\mu_E = (4\pi\epsilon_0) \frac{D\zeta}{6\pi\eta} f_1(\kappa a) = \frac{2\epsilon\zeta}{3\eta} f_1(\kappa a)$$

La fonction f_1 rend compte du retard électrophorétique du fait de la présence des ions de la double couche qui entraînent le fluide dans la direction opposée des particules. C'est un facteur de correction, compris entre 1 et 1,5, qui dépend à la fois de la forme de la particule, de la taille (a étant le rayon de la particule) et de l'épaisseur de la double couche (κ étant le paramètre de Debye).

Pour une sphère, lorsque $\kappa a > 1$: $f_1(\kappa a) = \frac{3}{2} - \frac{9}{2\kappa a} + \frac{75}{2\kappa^2 a^2} - \frac{330}{\kappa^3 a^3}$

et pour $\kappa a < 1$: $f_1(\kappa a) = 1 + \frac{(\kappa a)^2}{16} - \frac{5(\kappa a)^3}{48} - \frac{(\kappa a)^4}{96} + \frac{(\kappa a)^5}{96} - \left[\frac{(\kappa a)^4}{8} - \frac{(\kappa a)^6}{96} \right] e^{\kappa a} \int_{\infty}^{\kappa a} \frac{e^{-t}}{t} dt$

Les mesures de potentiel ζ sont réalisées sur un appareil Zétasizer 3000HS de la société Malvern Instruments qui utilise une méthode d'électrophorèse capillaire associée à un interféromètre laser à effet Doppler (Fig. 1.20).

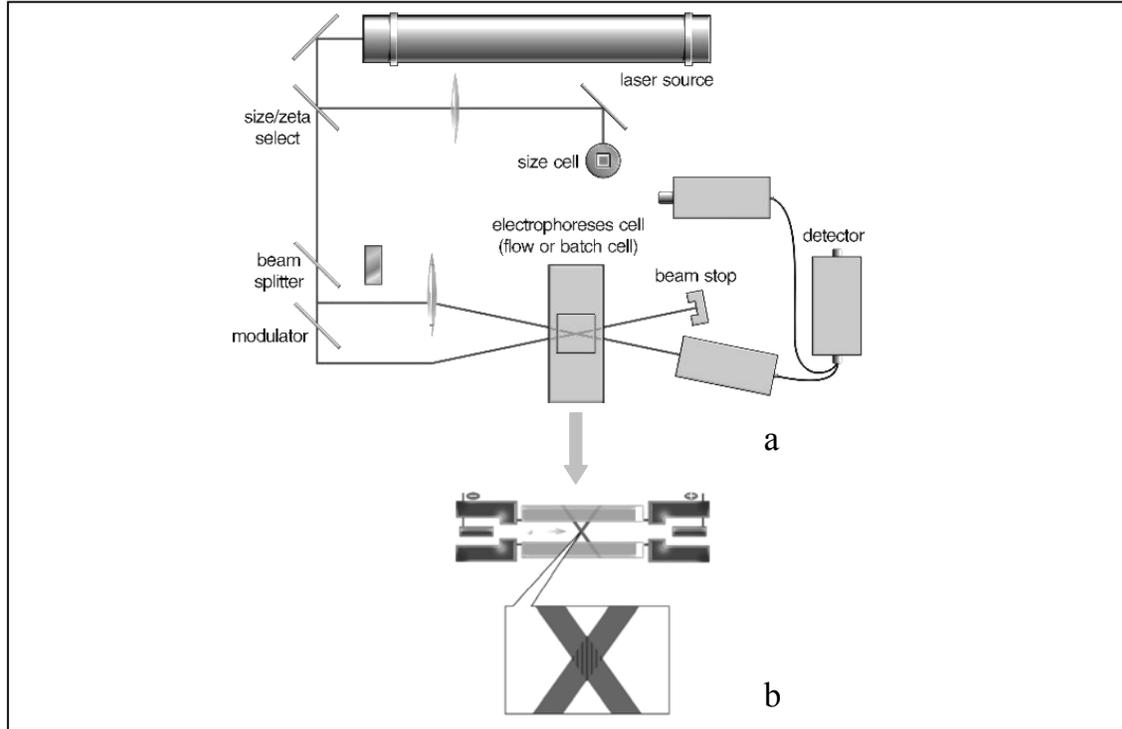


Figure 1.20. Dispositif de mesure du potentiel zêta. (a) vue d'ensemble ; (b) détail sur la cellule capillaire. La dispersion de nanoparticules est injectée dans la cellule capillaire parallélépipédique dans laquelle on applique un champ électrique impulsif. Au centre de la cellule, deux faisceaux laser s'entrecroisent, créant ainsi des franges d'interférences. Les vitesses des particules traversant les franges brillantes sont mesurées par effet Doppler, en fonction du champ appliqué.

Le logiciel d'exploitation PCS v1.41 de Malvern calcule ζ en se plaçant par défaut dans le cas où $\kappa a \rightarrow \infty$ (c'est à dire pour des épaisseurs $1/\kappa$ très faibles devant la taille des particules), qui correspond au cas d'un sol de concentration élevée en sels comprimant la double couche. Dans ce cas, $f_1(\kappa a) \approx 1,5$ et $\mu_E = \frac{\epsilon \zeta}{\eta}$. Par conséquent, à 25°C le potentiel zêta est relié à la mobilité électrophorétique par la relation simple :

$$\zeta \text{ (mV)} = 12,8 \mu_E \text{ (}\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}\text{)}$$

Les mesures de mobilité électrophorétique ont été réalisées tout au long de l'étude sur des sols exempts d'électrolyte ajouté. Les valeurs de $f_1(\kappa a)$ n'étant pas connues, les mesures des valeurs du potentiel ζ selon cette méthode sont certainement entachées d'une erreur pouvant atteindre 33% dans le cas des couches diffuses étendues ($\kappa a \rightarrow 0$). Cependant, pour

étudier le comportement du ferrofluide en fonction du pH, il est nécessaire d'ajouter un acide ou une base dans le milieu. Par conséquent, leur addition augmente inévitablement la force ionique du ferrofluide ce qui fait tendre $f_1(\kappa a)$ vers 1,5.

e. Stabilité des sols ioniques de maghémite

Préparation des échantillons pour les mesures de potentiel zêta : un volume de 500 ml de ferrofluide ($[Fe]=10^{-2} \text{ mol.l}$, $pH=2,5$) est placé dans un bêcher. Quelques gouttes de KOH 1M sont ajoutés dans le sol et des prélèvements de 5 mL sont effectués à différents pH. Le pH des échantillons est à nouveau mesuré 1 heure après, le temps que les valeurs se stabilisent, puis les échantillons sont injectés dans l'appareil de mesure de ζ .

La figure 1.21 représente la variation de ζ en fonction du pH pour le sol de maghémite à température ambiante.

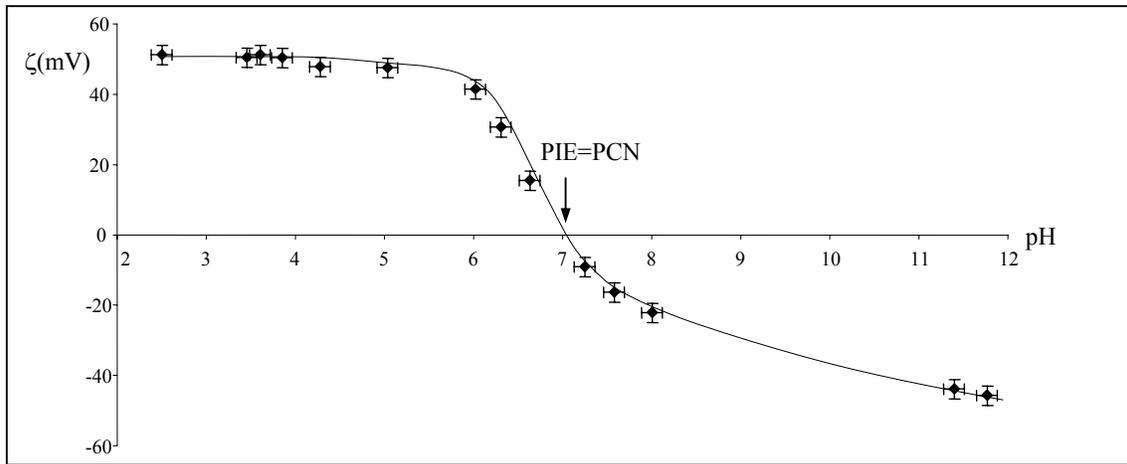


Figure 1.21. Variation isotherme du potentiel zêta des nanoparticules de maghémite en fonction du pH du milieu.

Le potentiel ζ s'annule vers $pH=7$. C'est un point isoélectrique qui correspond à l'annulation des charges à l'intérieur de la double couche ionique. Cette valeur de PIE est fiable, car elle ne dépend pas de la fonction f_1 . Les contre-ions (NO_3^- et K^+) présents dans le sol étant des ions indifférents pour la maghémite, leur concentration n'interfère pas sur la valeur du PCN de la maghémite. Le PIE est donc, dans le cas présent, égal au PCN. Le PCN de la maghémite ionique, égal à 7, est en accord avec celles trouvées dans la littérature (7 à 7,2)^{8,20,31}. L'addition de la potasse déstabilise le ferrofluide vers $pH=5$, car la densité de charge de surface, et donc le potentiel V_R , devient insuffisant pour contrecarrer les forces attractives de Van der Waals (voir Fig. 1.25). Puis vers $pH=9$, le ferrofluide est peptisé à nouveau du fait de l'apport suffisant d'ions hydroxyle, qui génèrent des charges négatives en déprotonant la surface. Les bornes du domaine de floculation peuvent être déterminées précisément en mesurant la densité optique de chaque échantillon au niveau de la bande de diffusion située vers 800 nm (Fig. 1.22). Pour déterminer la limite de floculation basique, les

mesures ont été réalisées à partir d'un ferrofluide basique stabilisé par addition de potasse, le pH étant alors ajusté à l'acide nitrique.

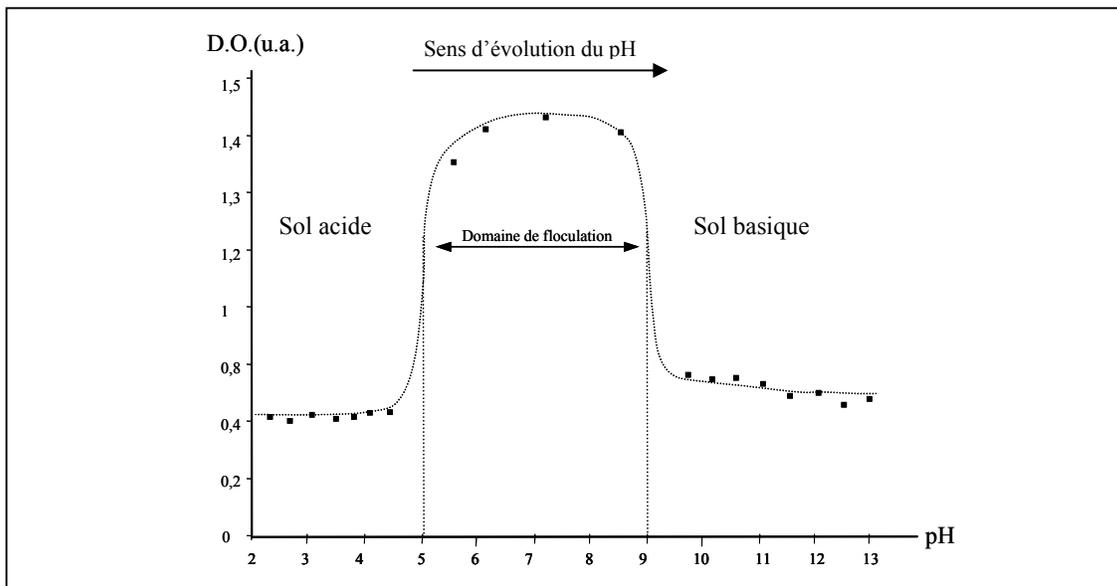


Figure 1.22. Détermination du domaine de stabilité du ferrofluide de maghémite en fonction du pH par spectrophotométrie ($[Fe]=10^{-2}M$, $\lambda=800\text{ nm}$).

On distingue deux domaines de stabilité du ferrofluide de part et d'autre de la zone de floculation. Les nanoparticules sont cependant plus agrégées dans les sols anioniques que dans les sols cationiques. Cela tient à la plus forte polarisation des sites cationiques et à une structuration de la couche de Stern plus importante dans le cas du ferrofluide acide.

La floculation des nanoparticules n'est pas aussi violente que le suggère la figure 1.22. L'addition de la base dans le ferrofluide acide abaisse progressivement la barrière de stabilisation cinétique du fait de la diminution de la charge de surface. Cela entraîne la formation de chaînes plus ou moins longues²¹ stabilisées dans le minimum secondaire. La taille des agrégats dépend donc du pH comme le montrent les mesures granulométriques réalisées à différents pH (Fig. 1.23a et 1.23b). En outre, sur la figure 1.23b, on observe que l'écart des valeurs moyennes des diamètres en nombre, en volume et en intensité, augmente avec le pH. Cela indique que la polydispersité est de plus en plus importante au fur et à mesure que le pH se rapproche du point de floculation.

Les ferrofluides ioniques sont stables à basse température (4°C) pendant de longues périodes et résistent à 100°C à l'ébullition. Il est donc possible de les concentrer en réalisant une évaporation sous vide sans altérer l'état de dispersion. Cependant lorsqu'elles sont agrégées, les nanoparticules doivent rapidement être peptisées par traitement acide du fait des phénomènes de relaxation de la couche de solvation (mûrissement d'Ostwald). De même

lorsque les agrégats ont été desséchés, des liaisons fortes se forment de manière irréversible entre les nanoparticules.

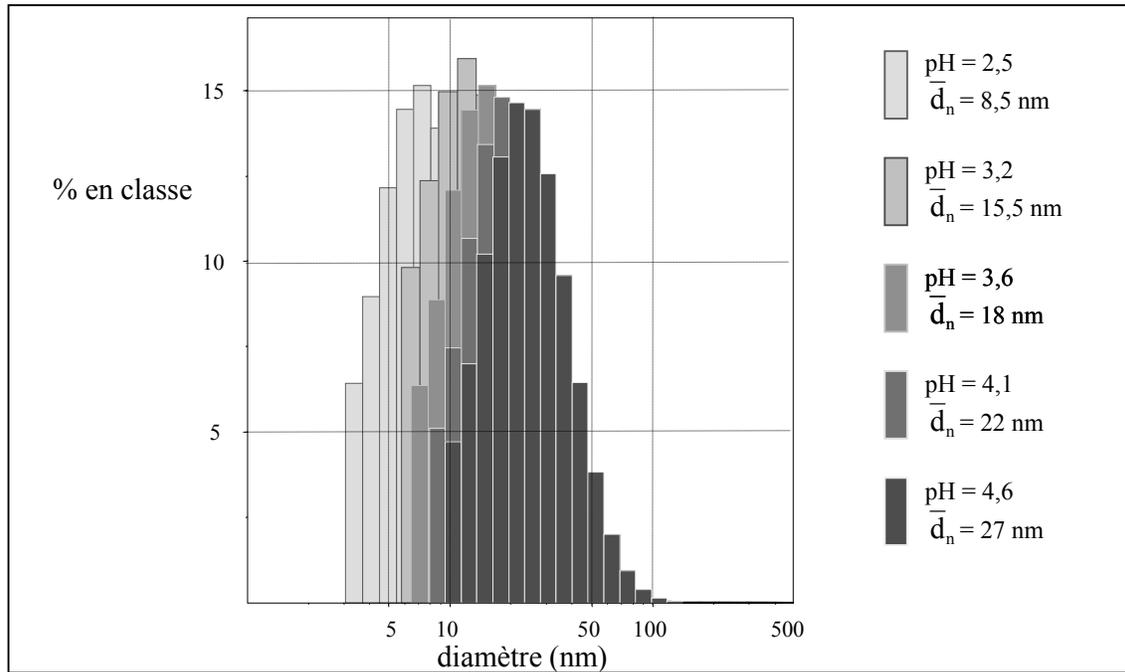


Figure 1.23a. Evolution de la taille des agrégats de nanoparticules en fonction du pH (distribution en nombre).

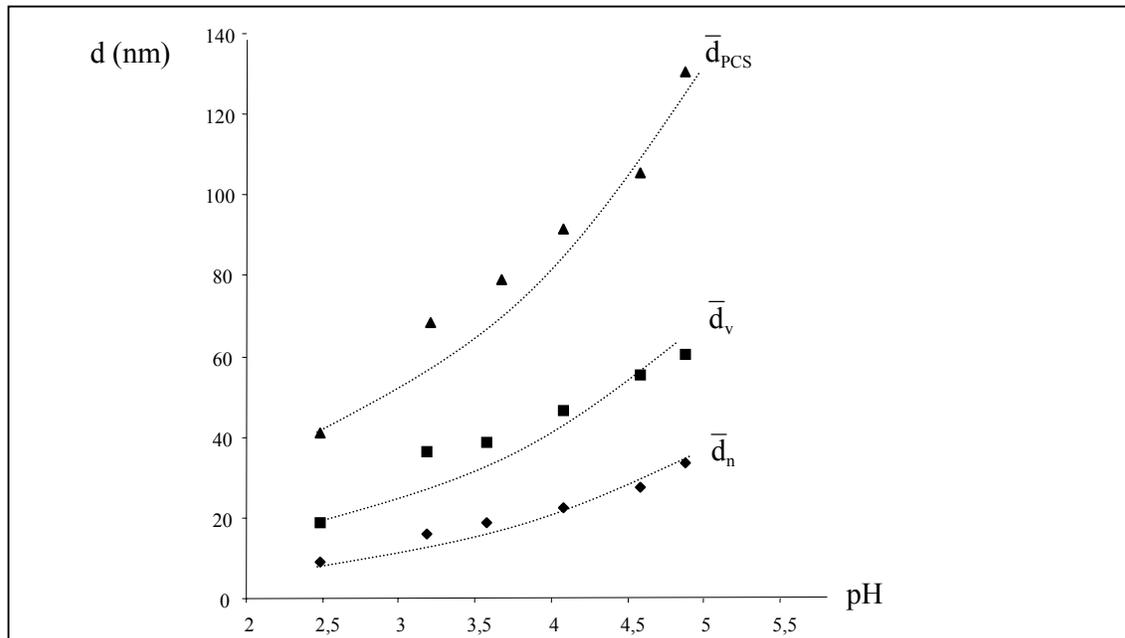


Figure 1.23b. Variation des diamètres pondérés en nombre, en masse et en intensité (PCS) en fonction du pH. \bar{d}_{PCS} et \bar{d}_v sont plus sensibles à l'aggrégation que \bar{d}_n , leur croissance est donc plus forte.

Les milieux physiologiques comme le plasma sanguin contiennent une grande quantité de sels (Tab. 1.2). Le plasma sanguin, à 37°C possède un pH d'environ 7,2 et une osmolalité élevée (300 milliosmoles).

Ions	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ⁻	SO ₄ ²⁻
Concentration (mM)	142,0	5,0	2,5	1,5	147,8	4,2	1,0	0,5

Tableau 1.2. Concentrations ioniques du plasma sanguin humain (d'après ref. 32).

La concentration limite de floculation en ions Cl⁻ à pH=3 a été mesurée par spectrophotométrie (figure 1.24).

Une dilution sérielle d'une solution concentrée en NaCl est réalisée à l'eau ultrapure (R=10MΩ). Le ferrofluide est ajouté en proportion égale dans chaque échantillon. La floculation est observée pour une concentration en Cl⁻ égale à 5.10⁻² mol.L⁻¹.

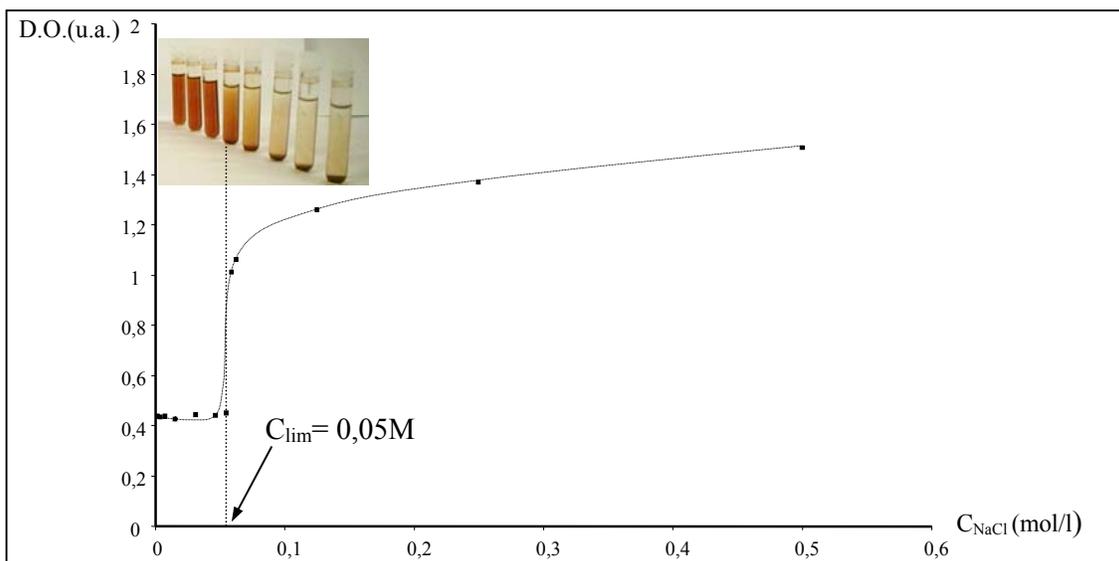


Figure 1.24. Détermination de la concentration limite en NaCl du ferrofluide de maghémite ([Fe]=10⁻²mol.L⁻¹, pH=3, λ=800nm).

On comprend alors que les ferrofluides de maghémite ne sont pas stables dans les sérums physiologiques, étant donnés le pH et la force ionique de tels milieux.

1.5 Conclusion

La méthode de synthèse de la maghémite colloïdale décrite dans cette première partie nous permet de disposer du matériau de base, en grande quantité, de manière fiable et reproductible. Bien que la caractérisation de la surface soit difficile, nous avons pu dégager quelques aspects en utilisant des méthodes couplant plusieurs techniques comme l'ATG avec

la DSC et la spectrométrie de masse. Les caractéristiques du ferrofluide de maghémite précurseur sont reportées dans le tableau 1.3.

Techniques d'analyse	Caractéristiques	résultats
Dosage chimique	[Fe] du sol stock	0,35 mol/L
	$[Fe^{II}]/[Fe]_{Total}$	0,05%
Spectrophotométrie	ϵ	420 L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹
	λ_{abs}	480 nm
Microscopie électronique à transmission	\bar{d}_n (MET)	7,5 nm
	σ	0,27
Spectroscopie de corrélation de photons	\bar{d}_n (PCS)	8,5 nm
	σ	0,52
Diffraction des rayons X	\bar{d} (RX)	9 nm
	ρ	4,87 g/cm ³
Calorimétrie	Stabilité thermique	T _{γα} = 466°C
B.E.T	S _{sp}	130 m ² /g
ATG/spectrométrie de masse	d _{OH}	8,25 μmol/m ²
Mesure du potentiel zêta	PCN	7
pHmétrie/spectrophotométrie	Domaine de floculation	5 < pH < 9
Spectrophotométrie	C _{lim} ^{Cl} (mol/L)	0,05 M/NaCl (à pH 3)

Tableau 1.3. Caractéristiques du ferrofluide de base.

Les critères de stabilité du ferrofluide en fonction de paramètres comme le pH et la force ionique ont été déterminés. On n'a pu constater que la stabilisation électrostatique n'est pas adaptée à l'injection des nanoparticules stabilisées par cette voie en milieu physiologique. Le passage à un autre mode de stabilisation est donc nécessaire. Le greffage de macromolécules hydrophiles comme le dextran génère des répulsions stériques empêchant les nanoparticules de floculer en milieu physiologique. De tels systèmes décrits dans le cadre du premier chapitre ne sont cependant pas très stables d'un point de vue chimique. Les liaisons intervenant entre les macromolécules et la surface d'oxyde de fer sont généralement des

liaisons hydrogène ou de complexation régies par des équilibres plus ou moins stables en milieu physiologique.

Afin d'améliorer l'adhésion du dextran sur les nanoparticules, nous proposons de modifier la surface en greffant des agents de couplage silaniques fonctionnalisés. Les critères de stabilité doivent être pris en compte dans l'établissement des conditions initiales de modification de surface par les silanes. En effet, si l'on souhaite obtenir des vecteurs de taille minimale, la stabilité des sols obtenus après chaque étape de synthèse doit être contrôlée et maîtrisée. En outre la modification de la surface des nanoparticules de maghémite par des agents de couplage silaniques ne doit pas altérer l'état de dispersion.

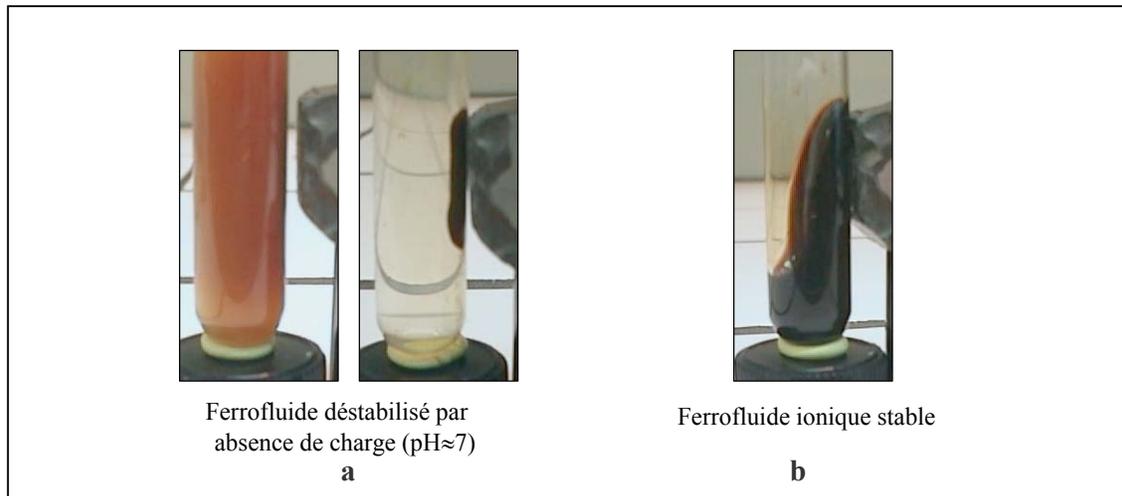


Figure 1.25. Photographies illustrant le comportement de dispersions de maghémite en milieu aqueux sous l'action d'un champ magnétique permanent. Dans la situation (a), le potentiel électrostatique est pratiquement nul, les particules flocculent et sédimentent. La sédimentation est accélérée ici, sous l'action d'un champ magnétique extérieur. Lorsque les forces électrostatiques sont suffisantes, le ferrofluide reste stable, même sous l'action d'un champ magnétique extérieur (b). Les particules s'alignent selon la direction des lignes de champ entraînant avec elles, le fluide porteur.

2. Modification de la surface des nanoparticules de maghémite par des agents de couplage silaniques aminés.

2.1 Généralités

Une voie couramment utilisée pour modifier la surface des nanoparticules est l'adsorption de ligands, complexés avec les sites de surface. Généralement les groupes complexants sont des carboxylates (acide citrique^{8,33,35}, gluconique^{8,33}, dimercaptosuccinique^{34,35}...), même si d'autres groupes comme les phosphates³⁵ et les phosphonates (diphosphonates de polyoxyalkylene³⁶) ont aussi été testés.

Une autre approche consiste à utiliser un agent de couplage silanique de structure générale R_nSiX_{4-n} ou X représente un groupe hydrolysable ($X=Cl, OR', \dots$). Le silanol, issu de l'hydrolyse, se condense avec un groupe hydroxyle de surface du substrat ou avec un silanol d'une molécule voisine pour former un film polysiloxane. R est un groupe organofonctionnel non hydrolysable qui peut former des liaisons covalentes ou interagir (interactions hydrophobes ou électrostatiques) avec des espèces organiques moléculaires ou macromoléculaires. Ainsi en modifiant les propriétés physico-chimiques (mouillabilité, tension de surface, fonctionnalité,...) de surface de substrats inorganiques, les organosilanes permettent d'améliorer l'adhésion interfaciale avec le polymère (Fig. 2.1).

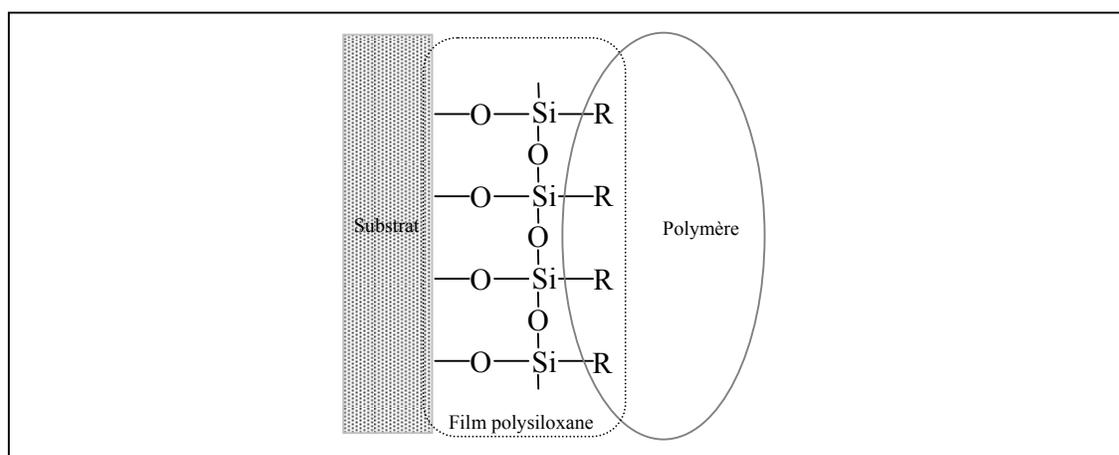


Figure 2.1. Représentation schématique du couplage d'un polymère à la surface d'un substrat inorganique par l'intermédiaire d'un organosilane.

Initialement introduits vers 1940, dans le domaine des matériaux polymères, les organosilanes sont utilisés lors de l'ensimage des fibres de verre pour améliorer l'adhésion entre les renforts et la matrice polymère^{37,38}. La silanisation s'est ensuite étendue sur plusieurs

domaines utilisant des micro- et nanoparticules de silice comme, par exemple, dans la préparation des phases stationnaires en chromatographie^{39,40}, lors de l'élaboration de support en catalyse^{41,42}, ou en biocatalyse, pour l'immobilisation d'enzymes⁴³ ou encore en biologie, pour le greffage d'ADN⁴⁴ et de protéines. Il existe, actuellement, une grande variété d'agents de couplage disponibles commercialement et la nature des substrats s'est diversifiée vers d'autres oxydes tels que les oxydes de zirconium, de titane, d'aluminium ou de fer.

2.1.1 Réactions mises en jeu

Le mécanisme général de greffage des alkoxy-silanes à la surface d'un oxyde en solution aqueuse est décrit en trois étapes⁴⁵ (Fig. 2.2) :

✓ *La réaction d'hydrolyse en solution aqueuse (étape 1) :* La réaction conduit, d'une part, à la formation de silanol et, d'autre part, à l'alcool correspondant à l'alkoxy.

✓ *La condensation intermoléculaire des silanols, menant à la formation de siloxanols (étape 2) :* Cette réaction peut se poursuivre si le silane possède plusieurs fonctions hydrolysables. Dans ce cas, des oligosiloxanols de différentes tailles sont obtenus.

✓ *La condensation des silanols sur les sites hydroxyles de la surface du substrat inorganique menant à la formation de liaisons covalentes (étape 3) :* Ce dernier processus est en réalité une réaction équilibrée à l'interface, expliquant les phénomènes de désorption des silanes exposés à une chaleur humide^{46,47}.

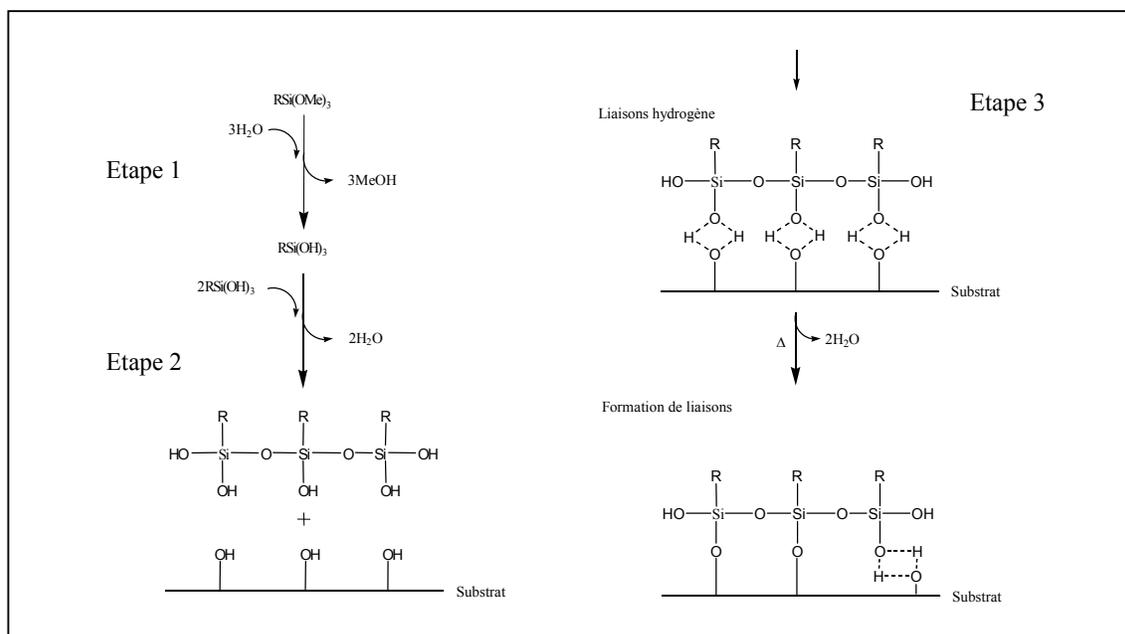


Figure 2.2. Mécanisme de greffage des alkoxy-silanes sur un substrat oxyde métallique.

La réaction de condensation des silanols en solution (réaction 2) constitue une étape déterminante préalable à l'établissement des liaisons à la surface du substrat. Il est en effet nécessaire de contrôler les paramètres réactionnels permettant à la fois l'hydrolyse du silane et la stabilisation des silanols en solution jusqu'à la mise en présence du substrat.

La quantité de silanols résulte d'une compétition des réactions d'hydrolyse et de condensation intermoléculaires^{45,48}. Les principaux paramètres gouvernant les mécanismes réactionnels mis en jeu et les cinétiques des réactions d'hydrolyse et de condensation en solution des alkoxyxilanes sont typiquement le pH, la température, la nature du solvant, celle de la fonction organique non-hydrolysable et celle des groupements hydrolysables.

a. Hydrolyse

Leyden *et al.* ont montré par spectroscopie infrarouge en réflexion sur le méthyltriméthoxysilane (MTMS), l'éthyltriméthoxysilane (ETMS) et le triméthylmonométhoxysilane (TMMS) que les mécanismes réactionnels mis en jeu lors de l'hydrolyse sont catalysés en milieu acide et basique⁴⁹. La réaction décrite est du second ordre relativement à la concentration en silane et en eau, l'étape déterminante étant la réaction d'attaque nucléophile du groupe alkoxyde formant un bon groupe partant. Cependant Osterholtz et Pohl ont montré pour l'hydrolyse catalysée en milieu basique que la réaction est du premier ordre relativement à la concentration en silane⁴⁸.

Les cinétiques d'hydrolyse sont également très sensibles à la nature et à la taille des groupements alkoxydes partant. Par exemple, le tétraméthoxysilane s'hydrolyse 20 fois plus rapidement que le tétraéthoxysilane⁵⁰.

b. Condensation

De la même manière, la réaction de condensation est catalysée en milieu acide et basique, bien qu'elle soit plus lente pour les pH acides. Ainsi vers pH 4-5 la réaction d'hydrolyse est rapide et la condensation plutôt lente, favorisant la stabilisation des silanols en solution. La réaction s'opère par la protonation des silanols, la molécule d'eau devenant ainsi un bon groupe partant. La condensation est une réaction du second ordre relativement à la concentration en silanols. Leyden a observé dans le cas du MTMS, une condensation significative qu'après une hydrolyse exhaustive des groupes méthoxy⁴⁹.

Cependant d'autres facteurs tels que l'augmentation de la taille de la chaîne carbonée substituant le silicium et son degré de branchement diminue la vitesse de condensation³⁷.

La concentration initiale des solutions de silane joue un grand rôle dans la stabilité des espèces silanols. Pour la plupart des silanes, il existe une concentration-seuil au-delà de

laquelle les silanols s'agrègent par liaisons hydrogène pour conduire rapidement aux condensats. Ainsi les solutions de vinyltriéthoxysilane étudiées par Ischida *et al* par spectrométrie IR contiennent essentiellement des silanols jusqu'à une concentration de 10% en masse⁵¹. Pour des concentrations supérieures, les espèces condensées prédominent. L'utilisation d'une concentration à 1% en poids permet donc d'obtenir dans la plupart des cas des solutions stables de silanols après hydrolyse.

2.1.2 Choix de l'agent de couplage

Il existe une grande variété d'agents de couplage organofonctionnels conférant aux substrats modifiés des propriétés physicochimiques de surface diverses. Cependant, aux contraintes imposées dans le cahier des charges dressé lors du premier chapitre, viennent s'ajouter celles qui conditionnent la stabilité des sols colloïdaux. De plus, le silane choisi doit posséder une réactivité adaptée à notre système avec des vitesses d'hydrolyse et de condensation élevées. Enfin, l'utilisation de catalyseurs aminés (n-propylamine ou pyridine) est proscrite pour des raisons évidentes d'applications biomédicales du matériau final.

Notre choix s'est porté sur les agents de couplage aminés, et tout particulièrement sur le γ -aminopropyltriméthoxysilane (APS : $X=OCH_3$, $R=CH_2CH_2CH_2NH_2$) pour plusieurs raisons : l'amine de l'APS permet de maintenir la surface hydrophile ; elle constitue un site protonable en vue de la peptisation des sols de maghémite modifiée ; l'activité autocatalytique du groupe aminopropyle vis-à-vis de l'hydrolyse et de la condensation permet de réduire les temps de réaction et la température du milieu réactionnel ; tout en restant chimiquement greffé et donc non-toxiques, les amines présentent un grand choix de réactions chimiques mettant en jeu des liaisons covalentes (imines, liaison amide, thiourée, isourée...) donnant des perspectives intéressantes pour le couplage de macromolécules. Enfin, cet agent de couplage a été abondamment étudié du fait de ces propriétés singulières en solution.

2.1.3 Propriétés de l'APS en solution aqueuse

Des solutions aqueuses d'aminopropyltriméthoxysilane ont été étudiées par spectrométrie Raman par Ishida *et al*, montrant un comportement particulier de cet agent de couplage silanique⁵². A pH naturel, tel qu'obtenu par la mise en solution de l'APS en solution dans l'eau pure, ils ont observé des vitesses d'hydrolyse et de condensation très élevées, autocatalysées par la fonction amine. Pour des solutions de concentration massique à 10% en masse de silane, ils n'observent que des siloxanes. A 1% en masse, la concentration en

silanols remonte, et c'est seulement pour des concentrations inférieures à 0,25% que les solutions sont majoritaires en espèces hydrolysées.

En milieu acide, l'effet catalytique de l'amine est inhibé, et après l'hydrolyse, les solutions en silanols sont extrêmement stables. Ce phénomène est lié à la structure particulière de l'APS dans ce milieu (Fig. 2.3). En effet l'amine a tendance à former une liaison hydrogène intramoléculaire avec un groupe silanol : l'hydrogène labile du silanol est mis en commun avec le groupe amine polaire dans une structure résonante. Le transfert du proton sur l'amine peut être partiel ou total selon le pH de la solution. Cette cyclisation de l'APS sous sa forme hydrolysée, initialement proposée par Moses *et al*, confère aux solutions acides d'APS hydrolysés, une stabilité particulière vis-à-vis de la condensation⁵³.

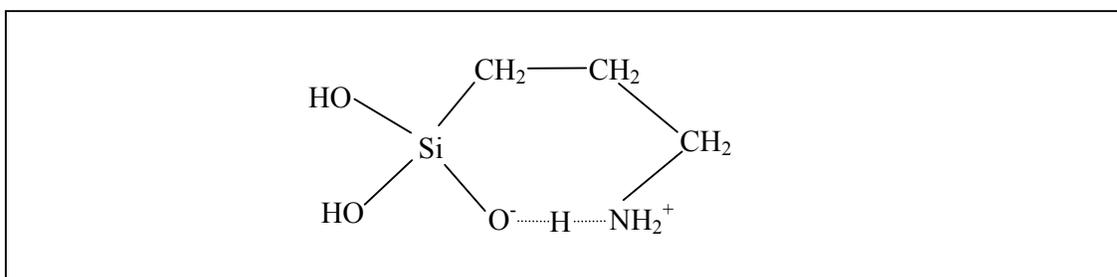


Figure 2.3. Structure résonante conduisant à la cyclisation de l'aminopropylsilanetriol en milieu acide.

2.1.4 Interactions de l'APS en solution aqueuse avec la surface d'oxydes métalliques

Les travaux menés par divers auteurs sur les aminosilanes et en particulier l'APS, montrent que ces agents de couplage se comportent aussi singulièrement vis-à-vis du greffage sur les substrats qu'en solution, du fait du caractère polaire et basique de la fonction amine. Les propriétés catalytiques de l'amine permettent en effet à l'APS, de s'adsorber rapidement sur les hydroxyles de surface en formant des liaisons hydrogène, favorisées en milieu aqueux. L'existence d'une interaction directe entre le groupement amine et les hydroxyles de surface est un phénomène connu qui a été observé sur de nombreux substrats inorganiques comme la silice poreuse⁵⁴, le zinc⁵⁵, l'alumine⁵⁶ et l'oxyde de fer⁵⁷.

Vrancken et al ont étudié l'adsorption de l'APS sur des gels de silice⁵⁸. Ils ont observé une monocouche adsorbée à la surface par liaisons siloxanes, mais également par interaction entre le groupement amine et les hydroxyles de la silice. 22% de ces interactions résultent d'un transfert de charge des hydroxyles vers la silice et environ 10% d'une liaison hydrogène. Cependant, ils ont montré que la plupart de ces interactions disparaissent par chauffage modéré sous vide. Ce traitement, en favorisant à la fois la condensation intermoléculaire des

silanols, et leur condensation avec les hydroxyles de surface, a permis d'obtenir le greffage de l'APS sous la forme bidendate. Il est connu que le séchage à 110°C sous vide, favorise un fort degré de condensation des silanols en siloxanes³⁷, mais le résultat le plus intéressant est l'observation, après condensation, du retournement des groupes aminopropyle vers l'extérieur du film polysiloxane. Le chauffage modéré sous vide permet donc de libérer les amines.

Peu d'études concernant le greffage de l'APS sur des nanoparticules de maghémite ou de magnétite ont été reportées dans la littérature⁵⁹⁻⁶⁵. Bien souvent, les modes opératoires mis au point pour des substrats de silice, comme les fibres de verre, ne sont pas adaptés aux systèmes colloïdaux d'oxyde de fer, conduisant à la floculation irréversible des particules.

Ainsi le procédé de silanisation des nanoparticules de magnétite décrit par Whitehead⁵⁹ conduit à la formation de floculats, de diamètres hydrodynamiques variant de 561 à 803 nm. Il consiste à modifier les nanoparticules, préalablement traitées à la soude, par les agents de couplage en milieu aqueux et de déshydrater leur surface dans le glycérol de manière à faciliter la condensation des silanols. Ce procédé, a été légèrement modifié par différents auteurs en réalisant le couplage des nanoparticules sous ultrasons⁶⁰⁻⁶². Après déshydratation, Lesniak *et al.* ont obtenu une dispersion de nanoparticules de magnétite (de 10 à 15 nm) modifiées par l'APS⁶¹. Cependant ce procédé reste lent (72 h) et une partie des particules agrégées doit être éliminée par centrifugation. Les particules de Ferumoxsil, composées de nanoparticules de magnétite modifiée par le N-(β -éthyl)- γ -aminopropyltriméthoxysilane, possèdent un diamètre hydrodynamique de 300 nm¹⁵. D'autres nanoparticules de maghémite modifiée par l'APS dans le toluène ou en milieu aqueux, ont été reportées, mais les tailles obtenues après modification ne sont pas mentionnées⁶³⁻⁶⁵.

Compte tenu des propriétés spécifiques des aminosilanes vis-à-vis des substrats d'oxydes métalliques, les objectifs, dans le cadre de notre étude, sont :

- ✓ d'adapter les procédés de silanisation classiques de façon à ce que la maghémite soit peptisable après modification ;
- ✓ d'optimiser la quantité de fonctions amines libres pour favoriser la peptisation et augmenter leur réactivité vis-à-vis des greffages ultérieurs de macromolécules.

La partie suivante expose les essais préliminaires dans laquelle nous évoquons les problèmes d'interaction entre l'amine de l'APS et la surface de la maghémite. Après avoir proposé un mode opératoire permettant de redisperser les nanoparticules modifiées, nous présentons dans une troisième partie, un procédé permettant d'optimiser le greffage par un

traitement thermique modéré sous vide. Plusieurs techniques de caractérisation, en particulier les mesures de potentiel zêta, la spectrométrie IR en réflexion diffuse, l'XPS et la spectroscopie Mössbauer sont mises à profit pour contrôler les dépôts des aminosilanes.

2.2 Silanisation directe : essais préliminaires

2.2.1 Couplage du γ -aminopropyltriméthoxysilane à la surface de la maghémite

a. Couplage dans le toluène anhydre

Ce mode opératoire classique, dans le domaine de la modification des particules d'oxyde métallique⁶⁶⁻⁶⁸, s'appuie sur le fait qu'après séchage sous vide des nanoparticules, il reste des couches d'eau susceptibles d'hydrolyser le silane. L'hydrolyse dépend alors directement de la quantité d'eau chimisorbée. La condensation est accélérée par chauffage du milieu réactionnel. Cependant, dans le cas du couplage de l'APS, l'hydrolyse et la condensation sont autocatalysées de part la présence du groupe aminopropyle⁶⁹⁻⁷⁰.

Couplage de l'APS dans le toluène (code d'expérience EF01) : 10 g de maghémite, préalablement floculée au PCN (pH 7) et lavée à l'acétone, est placée dans un ballon de 500 mL et séchée sous vide à 110°C pendant 12 h. Une fois la maghémite refroidie, le ballon est rempli d'argon. Un volume de 200 mL de toluène anhydre (HPLC grade, Aldrich) est versé dans le réacteur. Un volume de 6,5 mL d'APS correspondant à un excès d'environ 300% par rapport à la densité de groupes hydroxyle est ajouté dans la suspension, sous agitation magnétique et sous atmosphère inerte (Ar). Le mélange réactionnel est laissé 12 h au reflux du toluène. Après refroidissement, la maghémite est décantée magnétiquement. Le surnageant est ensuite éliminé, et le floculat lavé à l'acétone (3×400 mL) puis à l'eau ultrapure (2×400mL, 10M Ω).

Suite à ce traitement et malgré plusieurs traitements acides et sonication, la maghémite modifiée ne se redisperse pas. Cet effet est dû à l'étape de séchage qui stabilise l'état d'agrégation. L'élimination de l'eau entraîne la formation de liaisons fortes (pont oxo entre deux sites $\equiv\text{FeOH}$) qui rendent la floculation des particules irréversible. Le couplage des agents silaniques se fait alors à la surface de ces agrégats.

Ce mode opératoire conduit à des particules modifiées de taille beaucoup trop élevée (floculats) en vue des applications *in vivo* (voir § 2.3.4b) et a par conséquent été abandonnée. Néanmoins, il serait peut être intéressant dans le cadre d'applications faisant intervenir des procédés de séparation magnétique.

b. Couplage en milieu aqueux

Fort du constat précédent, il a fallu développer un mode opératoire permettant de préserver la possibilité de peptisation du sol après greffage. Le greffage en milieu aqueux nous

a paru être la meilleure solution pour une raison évidente : le ferrofluide initial est stable dans ce milieu. Afin d'améliorer l'élimination du groupe partant (groupe méthoxy), la réaction est réalisée en milieu aqueux contenant 50% de méthanol : celui-ci, en solvatant les groupes méthoxy à l'état de transition, doit favoriser leur départ en faveur de l'hydrolyse. L'acidité du ferrofluide pourrait favoriser l'hydrolyse autour des nanoparticules. Cependant, le greffage se faisant en large excès d'APS, le pH du milieu varie de pH 2,5 à pH 10,5 de façon quasiment instantanée. L'hydrolyse et la condensation ont donc lieu en milieu basique, autocatalysées par le groupe aminopropyle.

Couplage de l'APS en milieu aqueux (code d'expérience EF11) : La réaction de greffage est conduite dans un mélange eau/méthanol 1:1. Un volume de 200 mL de ferrofluide de maghémite de concentration $[Fe^{3+}] = 0,35 \text{ mol.L}^{-1}$ et de pH 2,5 est placé dans un bêcher à col long de 800 mL. Le ferrofluide est placé sur un agitateur magnétique à une vitesse de 300 rpm. Nous choisissons un barreau aimanté en forme de prisme qui forme un vortex régulier sur toute la hauteur du bêcher et garantit ainsi l'homogénéisation rapide des espèces dans tout le volume du mélange. 100 mL de méthanol technique sont alors ajoutés. Une deuxième solution de 100 mL de méthanol contenant 17,6 mL d'APS (98%, Aldrich) est versé dans le ferrofluide. La réaction est laissée ainsi 12 heures sous agitation. Le mélange est versé dans un bêcher à col long placé sur une plaque magnétique. La maghémite est alors laissée à décanter. Le surnageant est éliminé au moyen d'une trompe à eau et le floculat est lavé, sous agitation magnétique et décantation, avec un mélange eau-acétone 30:70 (3x400 mL ; eau ultrapure) de façon à éliminer les restes d'oligomères de silanes et de méthanol. Nous veillons à ce qu'entre chaque étape de lavage, le floculat ne sèche pas, auquel cas il serait difficile à peptiser.

Peptisation de la maghémite modifiée EF11 : Après l'élimination du dernier surnageant, on ajoute 400 mL d'eau ultrapure. Le pH relevé (pH naturel) est environ égal à 9, attestant de la présence des fonctions amines à la surface de la maghémite. De façon à préserver l'adhésion du film polysiloxane à la surface de la maghémite, l'acidification se fait progressivement par pas d'une unité de pH, en ajoutant quelques gouttes d'acide nitrique 1M, sous agitation vive. Le sol est alors ajusté à pH 3 et laissé sous agitation pendant une journée. Le pH est à nouveau mesuré et réajusté à 3. La concentration en fer est ensuite évaluée par dosage chimique.

2.2.2 Mise en évidence de la modification de la surface par spectroscopie IR (DRIFT)

Les spectres IR de réflexion diffuse permettent de confirmer la présence des espèces adsorbées à la surface de la maghémite. Afin d'évaluer l'influence de la peptisation par voie acide, les spectres DRIFT de la maghémite EF11 avant et après traitement acide sont comparés avec le spectre IR du silane pur en transmission.

a. Spectre IR en transmission de l'APS pur

Le spectre en transmission du silane pur non hydrolysé (120 accumulations, résolution 4 cm^{-1}) est présenté dans la figure 2.4 et le tableau 2.1 donne les attributions des bandes caractéristiques.

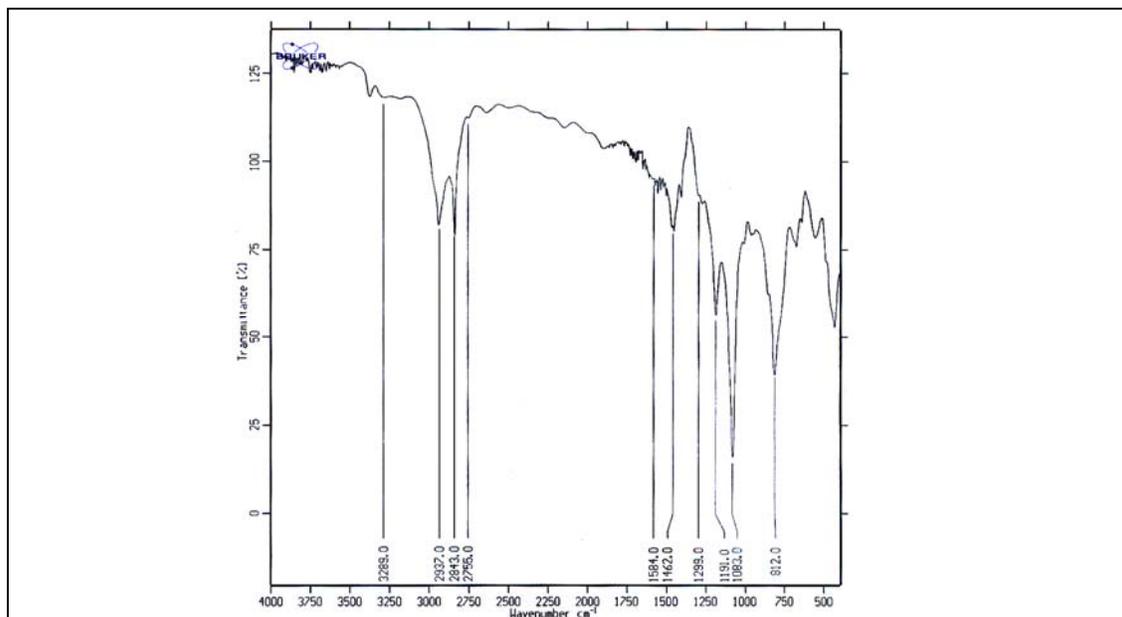


Figure 2.4. Spectre infrarouge en transmission de l'APS pur, entre 450 et 4000 cm^{-1} .

$\nu(\gamma\text{-APS})$ en cm^{-1}	intensité	attributions
3380	m	$\nu_{\text{as}}(\text{NH})$
3289	f	$\nu_{\text{s}}(\text{NH})$
2937	F	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$
2843	F	$\nu_{\text{s}}(\text{O-CH}_3)$
2755	f	$\nu_{\text{s}}(\text{CH})$
1584	m	$\delta(\text{NH}_2)$
1462	m	$\delta(\text{CH}_2)$
1299	m	$\omega(\text{CH}_2)$
1191	F	$\rho(\text{O-CH}_3)$
1083	TF	$\nu_{\text{as}}(\text{Si-O-C})$
812	F	$\nu_{\text{s}}(\text{Si-O-CH}_3)$

Tableau 2.1. Fréquences d'absorption IR caractéristiques de l'APS pur. Abréviations : f, intensité faible ; m, moyenne ; F, forte ; TF, très forte ; ν_{s} , élongation symétrique ; ν_{as} , élongation asymétrique ; δ , cisaillement ; ω , hochement ; ρ , balancement.

Les bandes à 3380, 3289 et 1584 cm^{-1} sont attribuées aux modes d'élongation et de cisaillement de la fonction amine. Les bandes de vibration à 2843, 1191, 1083 et 812 cm^{-1} attestent de la présence du groupe méthoxy de l'APS pur non hydrolysé. Enfin les bandes de

vibration caractéristiques de la chaîne hydrocarbonée sont aussi observées à 2937, 2755, 1462 et 1299 cm^{-1} . La bande de vibration correspondant à la liaison Si-CH₂(CH₂CH₂) située entre 1220 et 1170 est occultée par la bande Si-OCH₃ de forte intensité.

b. Spectres DRIFT de la maghémite modifiée EF11, avant et après traitement acide.

Un échantillon de maghémite modifié dans les conditions opératoires EF11, est peptisé à l'acide nitrique à pH 2,5, puis floculé à pH 8,5 par addition de KOH et lavé à l'eau ultrapure et à l'acétone, avant d'être séché à 40°C. Le deuxième échantillon, correspond à la maghémite EF11 floculée à son pH naturel, non traitée à l'acide. Les échantillons pour la spectrométrie sont préparés selon le mode opératoire décrit dans le paragraphe 1.4.1c.

Les spectres DRIFT de la maghémite modifiée EF11 avant et après traitement acide sont présentés en figure 2.5. Le spectre correspondant à la différence (maghémite modifiée APS) – (maghémite) est donné en figure 2.24 (§ 2.3.5a).

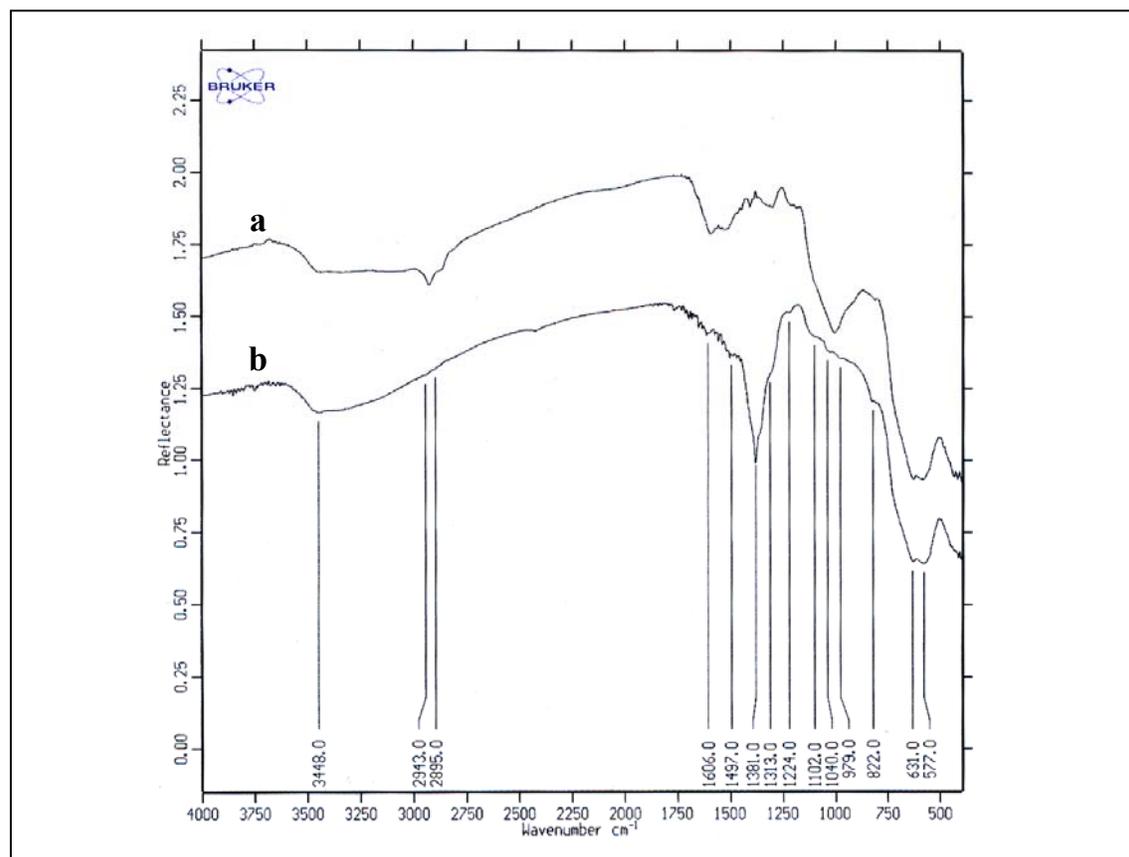


Figure 2.5. Spectre infrarouge DRIFT entre 450 et 4000 cm^{-1} , de la maghémite modifiée par l'APS (EF11) avant (a) et après (b) peptisation à l'acide nitrique à pH 2,5.

Le spectre EF11 non traité (a) montre des bandes indiquant la présence de l'APS. Les fortes bandes de vibration caractéristiques des groupes méthoxy, observées dans le silane pur

ont disparu ce qui montre que l'APS a été hydrolysé en sa totalité. Les bandes d'élongation $\nu(\text{CH})$ à 2895 et 2943 cm^{-1} sont dues à la chaîne méthylénique du silane. La bande faible correspondant aux vibrations d'élongation, $\text{Si-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, indécélable dans le cas de l'APS, est révélée à 1224 cm^{-1} . Cette bande est accolée à celle de hochement des groupes CH_2 ($\omega(\text{CH}_2)$).

La large bande à 1040 cm^{-1} et son épaulement à 1102 cm^{-1} caractérisent le mode de déformation des liaisons Si-O-Si attestant que la couche de silane est polymérisée. La largeur et le nombre de bandes situées dans la région entre 1000 et 1130 cm^{-1} dépendent du degré de polymérisation du film polysiloxane⁷¹. Dans le cas présent, la largeur de la bande indique que les polysiloxanes formés sont d'un degré de polymérisation élevé.

Cependant, la présence de l'épaulement vers 920 cm^{-1} ($\nu_s(\text{Si-OH})$) et la large bande à 3448 cm^{-1} (Si-OH libres) indique que le film polysiloxane n'est pas complètement condensé. Cette observation coïncide avec la présence de la bande à 822 cm^{-1} attribuée aux groupes hydroxyle de la surface de la maghémite ($\nu(\text{FeOH})$).

La bande de moyenne intensité à 1606 cm^{-1} correspond à la forme amine libre ($\delta(\text{NH}_2)$) tandis que celle située à 1524 cm^{-1} indique la présence de la forme protonée ($\delta(\text{NH}^+)$). De plus, la faible bande d'absorption à 2150 cm^{-1} suggère le transfert partiel du proton du silanol vers l'amine, dans la structure résonante⁵² $\text{SiO}\cdots\text{H}\cdots\text{NH}_2^+$.

Le spectre de la maghémite EF11 traitée à l'acide nitrique montre une bande supplémentaire à 1381 cm^{-1} , de très forte intensité, attribuée au mode d'élongation O-N-O des ions nitrate adsorbés à la surface. Les bandes de vibration à 631 et 577 cm^{-1} caractérisent les liaisons FeO de la maghémite, visibles sur les deux spectres. Nous observons les mêmes bandes d'absorption, que pour l'EF11 non traité. Cependant, elles sont beaucoup moins intenses à l'image de la bande des siloxanes dans la zone des nombres d'onde située à 1000-1130 cm^{-1} . Ce résultat montre que le traitement acide a altéré le dépôt du silane, détachant une partie du film polysiloxane de la surface.

La spectrométrie IR en mode réflexion diffuse a montré que l'APS forme un film polymérisé à la surface de la maghémite. Les amines primaires du silane développent des interactions avec les silanols non condensés et vraisemblablement, les hydroxyles de la surface. La surface de la maghémite modifiée EF11 peptisée à l'acide nitrique, a résisté à ce traitement. Néanmoins une partie du polysiloxane s'est désorbée montrant que le film développe peu d'interactions avec la surface de la maghémite.

2.2.3 Comportement du sol de maghémite modifiée

Le greffage de l'APS sur les nanoparticules de maghémite a modifié les propriétés physicochimiques de leur surface. Ces modifications se répercutent sur le comportement des sols de maghémite fonctionnalisés, notamment au niveau des PIE (ou PCN) et des concentrations limites de floculation des ions. Les mesures de potentiel zêta et de spectrophotométrie en fonction du pH ou de la force ionique permettent d'étudier ces phénomènes.

a. Détermination du PIE de la maghémite modifiée par l'APS (EF11)

Des mesures de potentiel zêta en fonction du pH du milieu permettent d'accéder au PIE du sol EF11.

Mode opératoire : Un volume de 200 mL de EF11 ($[Fe] = 0,0125 \text{ mol.L}^{-1}$) à pH=3 est placé dans un bêcher à col long en présence d'une électrode à pH. Quelques gouttes de KOH 1 M sont versés dans le sol de manière à déplacer le pH. Des prélèvements de 20 mL sont réalisés environ toutes les 0,5 unités de pH. Chaque prélèvement est ensuite injecté dans la cellule capillaire à l'aide d'une seringue. Avant chaque mesure, le capillaire est rincé à l'eau distillé puis avec la solution à injecter.

La figure 2.6 présente les mesures de potentiel zêta pour les sols EF11 et FF10.

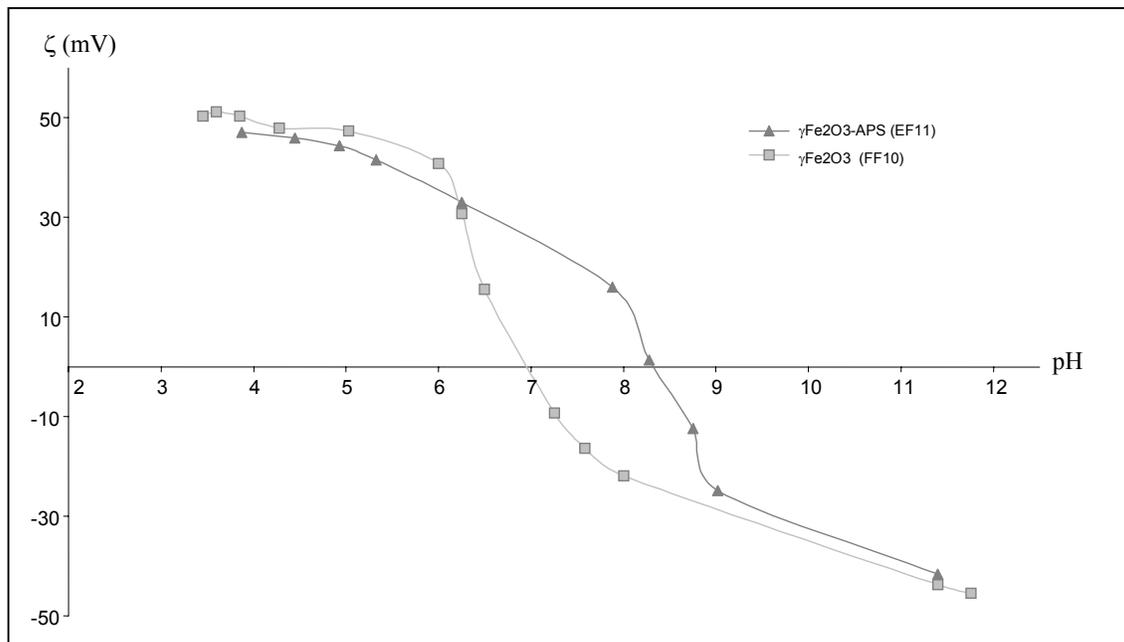


Figure 2.6. Variations isothermes du potentiel zêta des nanoparticules de maghémite de référence et modifiées en surface par le 3-aminopropyltriméthoxysilane (EF11) en fonction du pH ($T=25^{\circ}\text{C}$).

En comparant les deux graphes ci-dessus, on peut constater que le PCN de la maghémite a été déplacé vers le domaine des pH basiques de pH=7 à pH=8,5. Le domaine de floculation a aussi été déplacé. Il se situe entre pH 6 et 10 alors qu'il était compris entre pH 5

et 9 pour la maghémite d'origine. Cette nouvelle valeur de PIE atteste de la présence des amines à la surface de l'oxyde de fer. En effet, les amines apportées par la condensation d'APS à la surface constituent de nouveaux sites protonables. Le pK_a de l'aminopropyle étant égal à 10,4, la forme ammonium prédomine par rapport à celle des amines primaires jusqu'à cette valeur de pH, d'où le déplacement du PCN vers les valeurs basiques. Xu *et al.* ont obtenu des PIE similaires pour des maghémites modifiées dans l'eau (8,5) et dans le toluène (9,2) à 100 et 110°C, par le γ -aminopropyltriéthoxysilane⁶⁴. La différence entre les deux valeurs des PIE a été attribuée à l'orientation des molécules à la surface de la maghémite. En effet, dans le cas de la maghémite silanisée en milieu aqueux, davantage d'amines interagissent avec la surface, et le nombre de porteur de charges positives diminue tandis que le nombre de porteur de charges négatives augmente, relativement à la maghémite modifiée dans le toluène.

Ces résultats suscitent cependant des interrogations sur la qualité du greffage de l'aminosilane à la surface de la maghémite. En effet, le PIE de la maghémite recouverte de fonctions amines, aurait dû être proche ou égal à 10,4. Cette faible valeur de PIE laisse supposer qu'il existe d'autres sites, chargés négativement, conformément aux observations de Xu *et al.*, tels que les groupes silanols acides (SiOH) qui ne se sont pas condensés. Le pK_a des silanols étant compris entre 2 et 3 selon l'environnement du silicium³⁷, leur déprotonation entraîne la neutralisation d'une grande partie des ammoniums. Par conséquent, au fur et à mesure que le pH augmente, le nombre de sites chargés négativement (SiO⁻ et FeO⁻) augmente, pendant que le nombre de sites chargés positivement (NH₃⁺) diminue. Le pH pour lequel le potentiel zêta s'annule, correspond bien à un point isoélectrique (et non plus à un point de charge nulle) du fait de la neutralisation de l'ensemble des sites porteurs de charge. D'autres raisons peuvent justifier la faible valeur du PIE, comme la présence d'interactions entre les amines et la surface de l'oxyde de fer ou des liaisons hydrogène avec des silanols ou encore un recouvrement hétérogène du film polysiloxane.

Afin d'élucider ce problème, nous avons utilisé un témoin, le polysiloxane correspondant à la polycondensation du 3-aminopropyltriméthoxysilane. Ce polymère, que nous avons nommé polyAPS, est l'analogue du film polysiloxane du produit EF11, dépourvu de maghémite.

Préparation du polyAPS : 5 mL de 3-aminopropyltriméthoxysilane est ajouté goutte-à-goutte dans un bécher contenant 50 mL d'une solution d'eau et de méthanol dans les proportions 1:1, de concentration 1 M en HNO₃ sous agitation vive. Le pH, égal à 1, est maintenu pendant l'opération par addition de quelques gouttes d'acide nitrique. La solution est laissée 1 heure, afin d'hydrolyser l'ensemble des groupes méthoxy. Puis un volume de 50 mL de solution alcaline de KOH 1 M est versé

rapidement dans le mélange. Un précipité blanc apparaît instantanément. Le précipité est extrait par centrifugation puis lavé 5 fois avec une solution d'acétone-eau (90:10) afin d'éliminer le nitrate de potassium, provenant de la neutralisation de l'acide nitrique avec la potasse, et deux fois à l'acétone pur. Le précipité est ensuite séché et pesé ($m=2,3$ g).

200 mL d'une solution de concentration massique égale à 1 g/l de polyAPS sont placés dans un bêcher à col haut. Les échantillons, pour les mesures de potentiel zêta, sont alors préparés de la même manière que pour la maghémite modifiée.

La figure 2.7 montre les mesures de potentiel zêta en fonction du pH, pour le polyAPS.

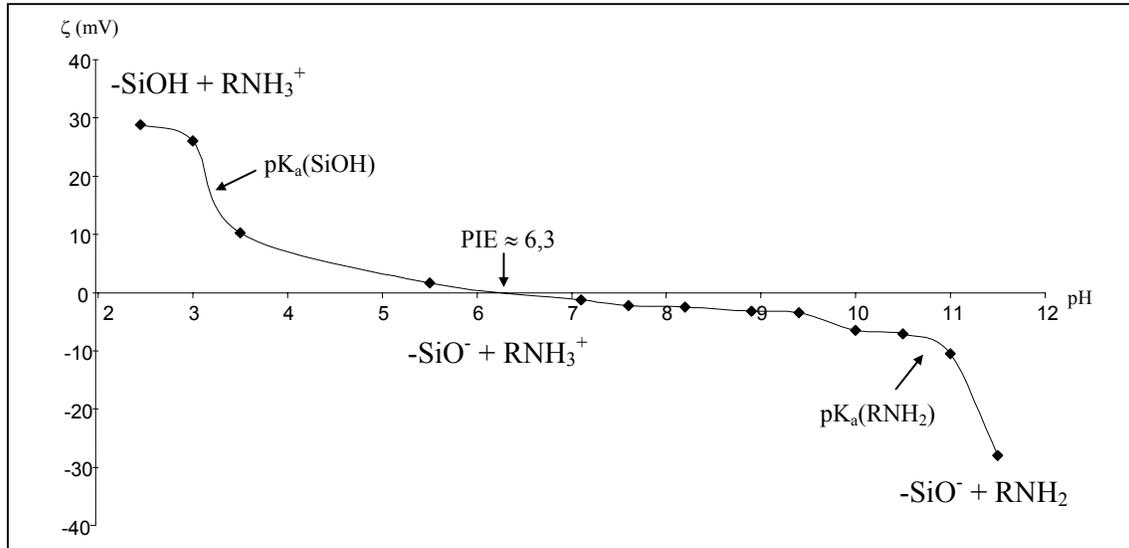


Figure 2.7. Variations isothermes du potentiel zêta du Poly(APS) en fonction du pH ($T=25^\circ\text{C}$). Les espèces prépondérantes, pour un pH donné, sont indiquées sur le graphe.

Le graphe $\zeta=f(\text{pH})$ du polyAPS présente un point d'intersection avec l'axe des abscisses à $\text{pH}=6,3$, correspondant à son PIE. Dans le domaine de pH compris entre 4 et 11, on constate que le potentiel zêta reste faible en valeur absolue, ne dépassant pas $\pm 10\text{mV}$. A $\text{pH}=3$, on observe un saut du potentiel, correspondant à l'annulation des charges négatives apportées par les groupes silanols acides. Vers $\text{pH}=11$, on observe un autre saut, vers les potentiels négatifs correspondant au pK_a des aminopropyles. La faible valeur du PIE montre que les amines interagissent avec les groupes SiO^- . La structure zwitterionique de l'APS en milieu acide a été observée par de nombreux auteurs^{37,72} (Fig. 2.8).

Cette forme cyclique qui assure la neutralité électrique du polyAPS, prédomine dans un domaine de pH compris entre 4 et 6. Comme nous l'avons mentionné dans la première partie, c'est cette conformation particulière qui explique notamment la bonne stabilité des silanols en milieu acide vis-à-vis de la condensation.

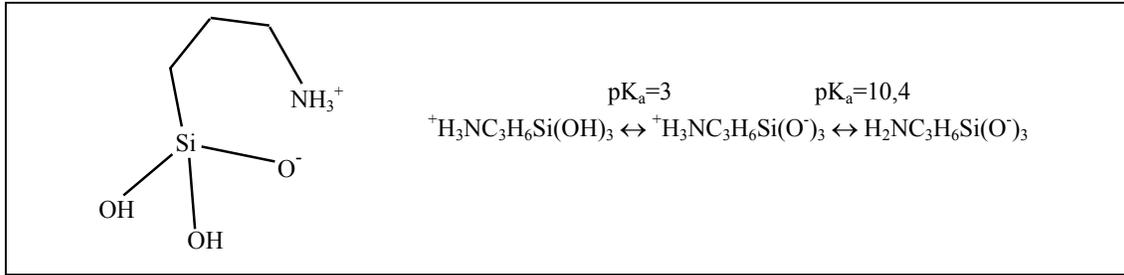


Figure 2.8. Représentation de la forme zwitterionique du γ -aminopropylsilanetriol.

On pouvait s’attendre dans le cas du polysiloxane condensé, à obtenir un PCN égal à 10,4. Or une partie des silanols, stabilisée dans la conformation cyclique décrite ci-dessus, ne se sont pas condensés. Ce phénomène explique l’abaissement du PIE à pH 6,3. Dans le cas de la maghémite modifiée EF11, tout nous porte à croire que ce même phénomène s’est produit à la surface de l’oxyde de fer, avec certainement d’autres interactions mettant en jeu les amines de l’APS polycondensé et les hydroxyles de surface, qui contribuent aussi à la diminution du PIE.

b. Détermination de la concentration limite de floculation en ion chlorure de la maghémite modifiée par l’APS (EF11)

Mode opératoire : Des dilutions sérielles de NaCl sont réalisées à l’eau ultrapure (10 M Ω), dans des tubes à hémolyse de 4mL. Chaque tube contient un volume de 1 mL de solution aqueuse saline de concentration ajustée entre 1 et 0,05 mol.L⁻¹. Un volume de 1 mL de sol EF11 (APS), et FF10 (pH 3 et [Fe]=10⁻² mol.L⁻¹) est placé dans les tubes pour chaque série. Les solutions sont agitées au vortex et reposées une heure. Chaque échantillon est ensuite placé dans un tube en quartz pour la spectrophotométrie.

La figure 2.9 présente les résultats obtenus pour les deux séries FF10 et EF11.

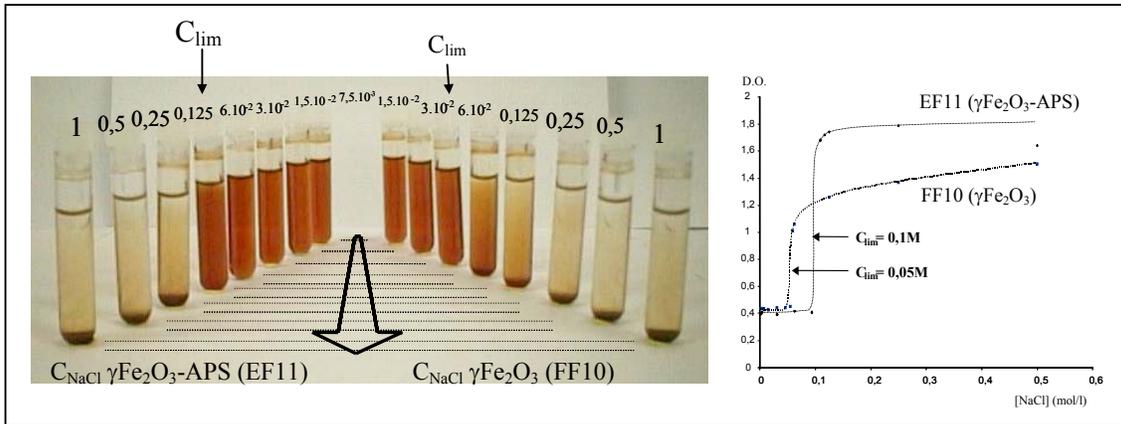


Figure 2.9. Photographie présentant les séries de dilutions de solutions de NaCl en présence de maghémite et de maghémite modifiée EF11, à pH = 3. A droite, graphique représentant la variation de la densité optique en fonction de la concentration en NaCl ($\lambda = 800\text{nm}$).

La $C_{lim}(Cl)$ du produit EF11 est de l’ordre de 0,1 mol.L⁻¹ tandis qu’elle est de 0,05 mol.L⁻¹ pour la maghémite. Cette augmentation de la concentration limite de floculation en

ion chlorure montre que les propriétés de surface de la maghémite modifiée sont différentes de celle de la maghémite d'origine. Une interprétation de ce phénomène est donnée dans la partie 2.4.2d.

2.2.4 Conclusions

La silanisation directe de la maghémite par le γ -aminopropyltriméthoxysilane, par catalyse basique en milieu aqueux, conduit au dépôt d'un film polysiloxane à la surface des nanoparticules. La modification de surface, dans ces conditions, autorise la peptisation des nanoparticules modifiées. Cependant la spectrométrie IR en réflexion diffuse et les mesures de potentiel zêta ont révélé la présence d'interactions intramoléculaires, développées par les amines de l'APS avec les groupes silanols non condensés du film polysiloxane et les hydroxyles de surface. Ces interactions sont préjudiciables pour plusieurs raisons : elles perturbent l'adhésion du film polysiloxane sur les hydroxyles de surface ; elles inhibent la réactivité des amines vis-à-vis du greffage ultérieur de macromolécules (voir Chap. III).

La peptisation semble affecter en partie la cohésion du dépôt de silane, même si les mesures de potentiel zêta montrent qu'après peptisation de la maghémite modifiée, celle-ci possède toujours une surface basique. De plus, la concentration-limite de floculation en ions chlorure, mesuré à pH acide, a augmenté ce qui montre que le silane reste adsorbé à la maghémite en milieu acide.

Néanmoins, du fait des interactions développées par l'agent de couplage, il semblerait que le film polysiloxane soit adsorbé, et non greffé de façon covalente, à la surface de la maghémite (voir Fig. 2.2 étape 3). En effet, la spectrométrie IR n'a pas permis de révéler la présence de liaisons Fe-O-Si, mais a montré, au contraire, que la surface contient des silanols et des groupes hydroxyle de surface non-condensés.

D'après ces observations, il nous a donc paru nécessaire d'optimiser le greffage des aminosilanes à la surface de la maghémite, l'enjeu étant de trouver un moyen pour rompre les interactions développées par les amines. Les travaux de Vranken⁵⁸ *et al.*, cités au début de cette partie, ont montré qu'un traitement thermique modéré sous vide permet d'éliminer ces interactions en favorisant la condensation intramoléculaire des silanols et la condensation avec les hydroxyles de surface. Lesniak *et al.*, en modifiant la magnétite par l'APS sous ultrasons et en déshydratant le produit obtenu dans le glycérol ont obtenu un PIE égal à 9,5 mesuré par zétamétrie⁶¹. Nous avons donc complété notre protocole expérimental par un procédé de traitement thermique modéré sous vide dans le glycérol, de telle sorte qu'il améliore la qualité du greffage à la surface sans remettre en cause la possibilité de peptisation

ultérieure des nanoparticules modifiées. Le glycérol, qui possède un point d'ébullition à 290°C, sert d'agent de mouillage lors de la déshydratation. Son utilisation permet de prévenir de la floculation irréversible des nanoparticules lors de la déshydratation de leur surface.

2.3 Optimisation du greffage par déshydratation au moyen d'un traitement thermique modéré sous vide

2.3.1 Mode opératoire

Les protocoles concernant le couplage de l'agent silanique et la peptisation sont analogues à celui décrit dans le paragraphe 2.2.1. La deuxième partie concerne le traitement thermique modéré sous vide de la maghémite greffée. Dans le but de déterminer la concentration optimale en agent de couplage silanique, plusieurs échantillons sont préparés dans une gamme de concentration s'étalant de 0,04% à 3,8% en poids d'APS.

Couplage de l'APS en milieu aqueux (code d'expérience EF18) : la réaction de greffage est conduite dans un mélange eau/méthanol 50:50. Un volume de 200 ml de ferrofluide de maghémite de concentration $[Fe^{3+}] = 0,35 \text{ mol.L}^{-1}$ et de pH 2,5 est placé dans un bêcher à col long de 800 mL. Le ferrofluide est placé sur un agitateur magnétique à une vitesse de 300 rpm. 100 ml de méthanol technique sont alors ajoutés. Une deuxième solution de 100 mL de méthanol contenant x ml ($x = 0,182 ; 0,456 ; 0,913 ; 1,372 ; 2,765 ; 9,150 ; 17,580$) de γ -aminopropyltriméthoxysilane (98%, Aldrich) est versé dans le ferrofluide. La réaction est laissée ainsi 12 heures sous agitation.

Déshydratation par traitement thermique modéré sous vide : au bout de 12 heures environ, on verse un volume de 200 mL de glycérol (99,9%, Aldrich) et la dispersion est homogénéisée pendant quelques minutes, sous vive agitation (500 rpm). Le mélange est ensuite versé dans un ballon d'un litre et installé sur un évaporateur rotatif afin d'extraire le méthanol et l'eau contenus dans le milieu. L'extraction se fait à 40°C pour le méthanol puis à 80°C pour l'eau, sous vide primaire pendant une heure. Le ballon contenant la dispersion de maghémite modifiée dans le glycérol et l'excès de silane, est installé dans un bain d'huile, et connecté à une rampe à vide qui donne sur un piège immergé d'azote liquide dans un dewar. Le traitement thermique est prolongé sous vide secondaire à l'aide d'une pompe à palettes pendant 2 h avec une température de consigne fixée à 100°C.

Extraction, lavages : après refroidissement, le mélange est versé dans un bêcher à col long dans lequel on ajoute 100 mL d'éthanol puis 200 mL d'acétone sous agitation lente (100 rpm) de façon à précipiter l'excès de silane et la maghémite modifiée. L'éthanol sert à améliorer la solubilité de l'acétone dans le glycérol tandis que l'acétone précipite l'excès de silanes oligomérisés. Après décantation de la maghémite modifiée sous une plaque magnétique, les oligomères de silane suspendus sous forme laiteuse sont éliminés. Le floculat de maghémite modifiée est alors lavé avec un mélange acétone-eau 70-30 (3x400 ml ; eau ultrapure) de façon à éliminer les restes d'oligomères de silanes et de glycérol. Nous veillons à ce qu'entre chaque étape de lavage, le floculat ne sèche pas, auquel cas il serait difficile à peptiser.

Peptisation de la maghémite modifiée APS : Après l'élimination du dernier surnageant, on ajoute 400 mL d'eau ultrapure (10 M Ω). Le pH relevé (pH naturel) est alors égal à 10,4, attestant de la présence des fonctions amines à la surface de la maghémite. De façon à préserver l'adhésion du film polysiloxane à la surface de la maghémite, l'acidification se fait progressivement par pas d'une unité de pH, en ajoutant quelques gouttes d'acide nitrique 1M, sous agitation vive. Vers les pH acides (i.e. pH 6), la maghémite commence à se disperser. Le sol est alors ajusté à pH 3 et laissé sous agitation pendant une journée. Le pH est à nouveau mesuré et réajusté à 3. La concentration en fer est ensuite évaluée par dosage chimique ou par spectrophotométrie ($\epsilon_{EF}=575 \text{ L/mol.cm} > \epsilon_{FF}$).

Les codes d'expérience des échantillons correspondant aux différentes concentrations en APS sont répertoriés dans le tableau suivant (Tab. 2.2, voir aussi schéma de filiation des ferrofluides en Annexe 3) :

Code exp.	Expérience	V _{APS} (mL)	%wt APS	d _{aj} (μmol.m ⁻²)
FF10	Ferrofluide γFe ₂ O ₃ de base	0	0	0
EF01	γFe ₂ O ₃ -APS/toluène/110°C	6,5	3,4	29,6
EF11	γFe ₂ O ₃ -APS/eau-méthanol/Tamb	17,580	3,9	148,3
EF12	γFe ₂ O ₃ -APS/eau-méthanol/Tamb + déshydratation sous vide dans glycérol	0,182	0,04	1,5
EF13		0,456	0,1	3,7
EF14		0,913	0,2	7,4
EF15		1,372	0,3	11,1
EF16		2,765	0,6	22,2
EF17		9,150	2	74,1
EF18		17,580	3,9	148,3

Tableau 2.2. Codes d'expérience adoptés pour les échantillons de maghémite de différentes concentrations initiales en APS. d_{aj} correspond à la concentration en APS rapportés par la surface développée par la maghémite contenue dans le milieu.

2.3.2 Evaluation de la densité surfacique de recouvrement des nanoparticules de maghémite

a. Analyse par spectrométrie de masse des gaz issus de la décomposition thermique de la maghémite modifiée par l'APS

Le couplage de la spectrométrie de masse avec l'analyse thermogravimétrique et l'analyse thermique différentielle permet d'attribuer les pertes de masse lors de la dégradation sous air des espèces présentes à la surface, en fonction de la température. L'analyse des spectres de masse permet ainsi de déterminer les conditions optimales pour l'exploitation des mesures d'ATG.

100 mg de maghémite modifiée par l'APS (EF18), préalablement floculée à son pH naturel (i.e. 10,4), lavée à l'acétone puis séchée à 40°C, sont placés dans un creuset en alumine. Les gaz sont alors acheminés par un conduit isolé sous vide secondaire, du four vers la chambre d'ionisation du spectromètre. La dégradation du produit est réalisée, sous air, de la température ambiante jusqu'à 800°C à la vitesse de 2°C/min.

La figure 2.10 montre le spectre de masse de la maghémite modifiée APS selon les conditions EF18. Nous pouvons observer un premier départ d'espèces physisorbées correspondant à l'eau (m/z = 18, 17) et les carbonates (m/z = 44, 12), entre la température ambiante et 115°C, déjà observée pour la maghémite d'origine. Nous pouvons constater un second départ d'espèces jusqu'à 400°C qui n'était pas observé, à cette température, sur le spectre de masse de la maghémite d'origine (Fig. 1.16a).

d'oxyde de fer enrobé d'une fine couche de silice comme ce qui a pu être observé lors de travaux antérieurs sur des nanoparticules d'alumine⁶⁸.

b. Analyse thermogravimétrique et analyse thermique différentielle

La spectrométrie de masse nous a renseignés sur la température de départ des espèces présentes à la surface de la maghémite modifiée. L'ATG et l'ATD couplées à la spectrométrie de masse, doivent nous permettre de vérifier la température à laquelle nous devons relever la masse correspondant au départ de l'aminopropyle, afin d'évaluer le taux de recouvrement. Le thermogramme correspondant est montré en figure 2.11.

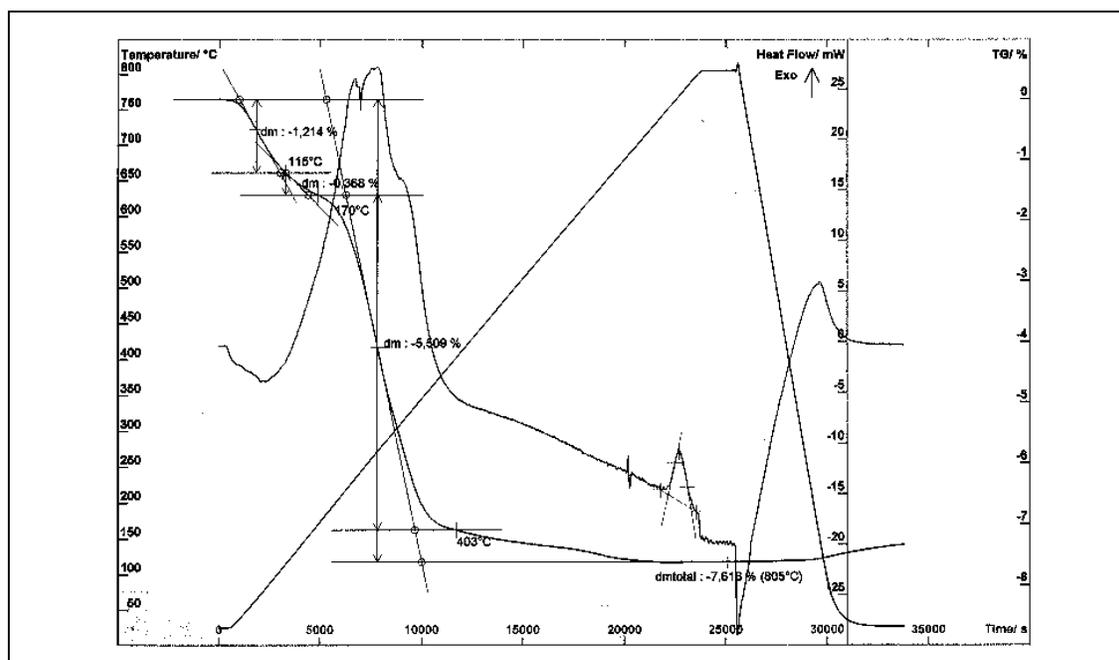


Figure 2.11. Thermogramme montrant la perte de masse de la maghémite modifiée APS et la transformation de la maghémite en hématite.

On remarque la présence d'un pic exothermique, entre 115°C et 403°C, issu de la combustion des greffons aminopropyle. La perte de masse, associée à ce pic de dégradation débute vers 160-170°C et se termine vers 400°C. La masse diminue faiblement, au-delà de cette température, jusqu'à 700°C environ.

A 770°C, nous observons un deuxième pic exothermique qui correspond à la transformation de la maghémite en hématite. Le diffractogramme de rayons X (Fig. 2.12) du produit final, chauffé sous air jusqu'à 800°C, montre que toute la maghémite a été transformée en hématite. La présence du film polysiloxane, dégradé lui-même en silice, à la surface des nanoparticules de maghémite a donc retardé (car il doit s'agir, sûrement, d'un effet cinétique) la transformation en hématite en agissant comme un agent « antifrittage ».

Nous pouvons noter qu'aucune perte de masse n'est associée à cette transformation contrairement à ce qui avait été observé pour la maghémite d'origine (Fig. 1.15). En effet à cette température, la majeure partie de l'eau chimisorbée a déjà été éliminée (voir § 1.4.1a).

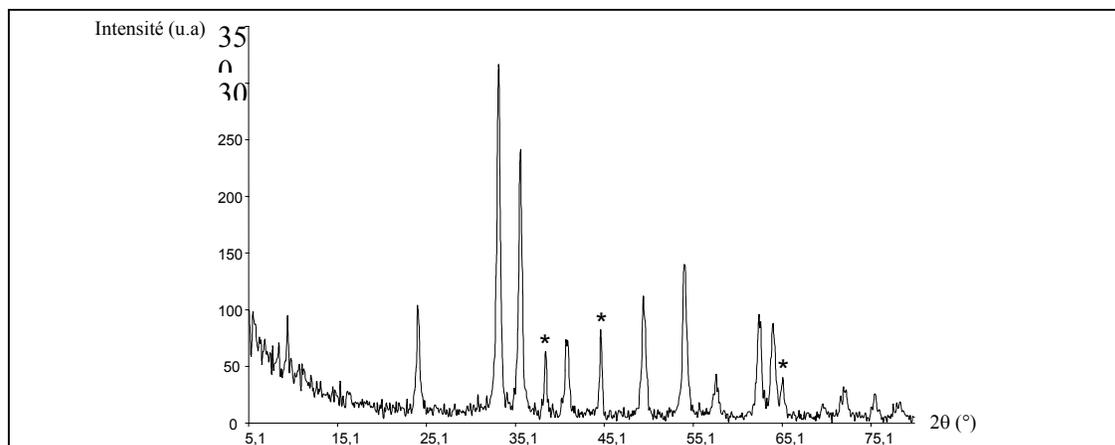


Figure 2.12. Diffractogramme du produit résultant de la dégradation thermique de la maghémite modifiée APS. (* raies du porte-échantillon en aluminium)

La figure 2.13 représente les thermogrammes de la maghémite et de la maghémite modifiée par l'APS (EF18).

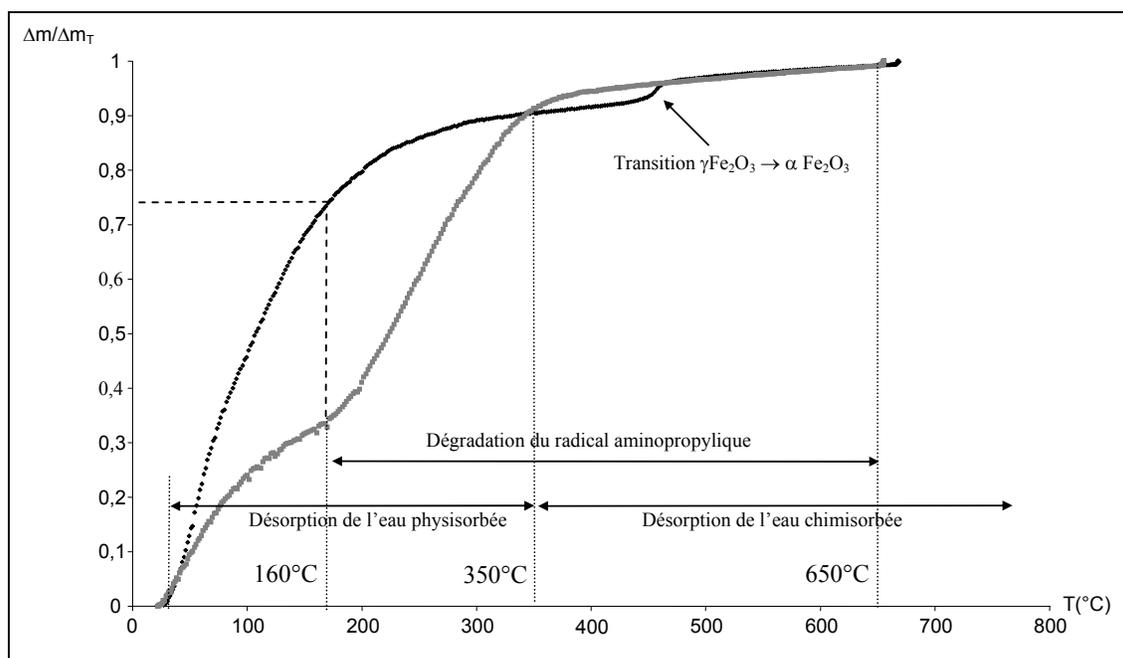


Figure 2.13. Thermogramme de la maghémite colloïdale d'origine et de cette même maghémite modifiée par l'APS (La perte de masse Δm est rapportée à la perte de masse totale Δm_T).

Les deux produits ont été préparés dans les mêmes conditions de séchage. Le calcul du taux de recouvrement, ou densité surfacique de greffage en APS, peut se faire en considérant la perte de masse relative $\Delta m/m_0$ entre 160°C et 650°C. A 160°C, on peut observer que la

maghémite a éliminé plus de 83% de l'eau physisorbée à sa surface. Même si l'on considère que la surface de la maghémite greffée possède moins d'eau physisorbée, du fait de la présence du film polysiloxane, les taux de recouvrement ainsi mesurés sont surestimés. Pour les plus faibles taux de greffage, cette surestimation peut être de l'ordre de 27%.

La densité de recouvrement est calculée à partir de la relation suivante :

$$d_{(APS)} = \frac{\Delta m}{S_{sp} \times m_0 \times 58}$$

où Δm est la perte de masse entre 160°C et 650°C, m_0 la masse initiale de maghémite modifiée, S_{sp} la surface spécifique de la maghémite et 58 la masse molaire du greffon aminopropyle. Dans ce calcul nous négligeons volontairement la (faible) contribution en eau physisorbée, des silanols non condensés ainsi que le départ de méthanol dans l'hypothèse où les groupes méthoxyle ne seraient pas totalement hydrolysés.

La mesure du taux de recouvrement des maghémites modifiées à des concentrations différentes en APS, nous permet de déduire la concentration optimale de greffage.

c. Influence de la concentration en APS sur la densité de recouvrement

Chaque échantillon de maghémite modifiée, préalablement floculée à son pH naturel, lavée à l'acétone puis séchée à 40°C, est réduit en poudre avant la pesée. Une masse de 60 mg est placée dans un creuset en platine. Chaque mesure est réalisée, sous air, dans un domaine de température compris entre l'ambiante et 650°C à la vitesse de 2°C/min.

La figure 2.14 représente la variation de la densité de greffage surfacique en fonction de la concentration en APS par rapport à la surface développée par la maghémite. Les résultats sont reportés dans le tableau 2.3.

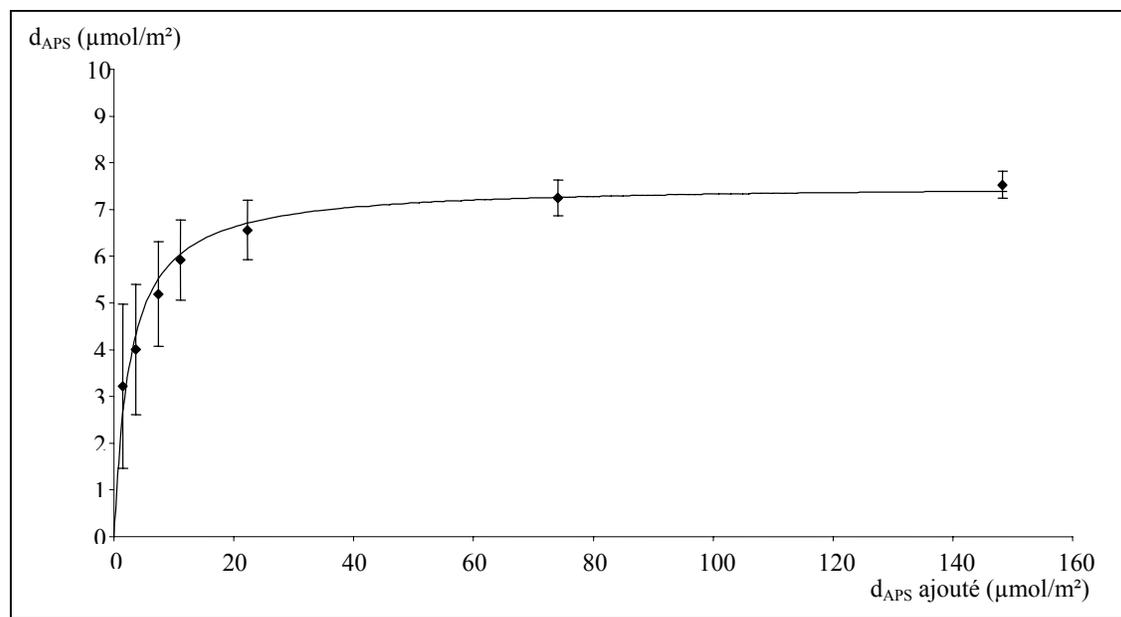


Figure 2.14. Influence de la concentration initiale d'APS sur la densité surfacique de greffage en APS à la surface de la maghémite. La courbe suit les variations d'un isotherme de type Langmuir.

Exp.	d_{aj} ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	% en poids (APS ajouté)	m_0 (mg) à 160°C	m_1 (mg) à 650°C	d_{APS} ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)
EF12	1,5	0,04%	41,9706	40,9766	3,2
EF13	3,7	0,1%	45,8777	44,5302	4,0
EF14	7,4	0,2%	40,7342	39,1994	5,2
EF15	11,1	0,3%	68,6567	65,7197	5,9
EF16	22,2	0,6%	56,5831	53,9190	6,5
EF17	74,1	2,0%	60,7686	57,6166	7,2
EF18	148,3	3,9%	57,1573	54,0899	7,5

Tableau 2.3. Influence de la concentration en APS sur la densité de recouvrement à la surface des nanoparticules de maghémite

La courbe de densité de greffage croît rapidement pour des concentrations faibles en APS. Elle atteint ensuite un palier de saturation, correspondant à une densité de greffage de $7,5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$, pour des concentrations élevées en APS. Pour une concentration massique de 3,9%, il y aurait donc 0,45 molécule d'APS condensée par groupe hydroxyle ($d_{\text{OH}} = 10\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$, voir § 1.4.1a), dans l'hypothèse où le film polysiloxane formerait une monocouche. Pour les concentrations faibles, les densités de recouvrement sont surestimées, car le greffage du silane n'est certainement pas homogène (formation d'îlots d'agrégats) et l'eau physisorbée doit contribuer de façon significative sur ces valeurs.

Les recouvrements en APS reportés dans la littérature sont variables selon la nature du substrat et le mode opératoire adopté³⁷. Une des raisons qui peut expliquer ces écarts est qu'il existe de nombreuses interactions entre la surface et l'aminosilane impliquées dans le greffage. Dans le cas de copeaux de fer, Boerio *et al* ont reporté que le recouvrement peut atteindre 4 à 6 couches siloxanes⁷³.

Les points expérimentaux peuvent être ajustés par une équation qui s'apparente à une isotherme de Langmuir établie pour décrire l'adsorption d'une monocouche de gaz sur un substrat :

$$d_{\text{APS}} = d_{\text{APS}}^{\text{max}} \times \frac{k d_{\text{aj}}}{(1 + k) d_{\text{aj}}}$$

où $d_{\text{APS}}^{\text{max}}$ ($=7,5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$) est la densité de greffage à saturation, k une constante ($0,368 \text{ m}^2\cdot\mu\text{mol}^{-1}$), d_{aj} la concentration surfacique d'APS et d_{APS} la densité de recouvrement correspondant. Le facteur limitant la densité de recouvrement semble être l'encombrement

stérique des groupes aminopropyle greffés à la surface. Cet effet, a déjà été observé dans le cas du greffage de γ -méthacryloylpropyltriméthoxysilane à la surface de poudres d'alumine, où les mesures d'ATG avaient permis de mettre en évidence la présence de 3 couches siloxanes⁶⁸. Dans le cas présent, l'encombrement stérique des groupes aminopropyle accumulés en 2 ou 3 couches, empêcherait l'accès de nouvelles molécules d'APS aux hydroxyles susceptibles de les fixer. Cette hypothèse est vérifiée dans le paragraphe suivant.

d. Influence de la longueur du greffon sur la densité de recouvrement

Dans le cadre de cette étude, deux autres agents de couplage silaniques aminés ont été greffés à la surface des nanoparticules de maghémite, l'EDPS et le DTSP de formule développée :

- ✓ EDPS : N- β -(aminoéthyl)- γ -aminopropyltriméthoxysilane



- ✓ DTSP : N'- β -(aminoéthyl)-N- β -(aminoéthyl)- γ -aminopropyltriméthoxysilane



Le mode opératoire adopté est le même que celui utilisé précédemment pour le greffage de l'APS dans les conditions EF18 (§ 2.3.1), c'est-à-dire que l'on se place directement dans les conditions de saturation pour ces deux agents de couplage. La figure 2.15 montre les ATG des maghémities modifiées par l'APS (EF18), l'EDPS (EF19) et le DTSP (EF20).

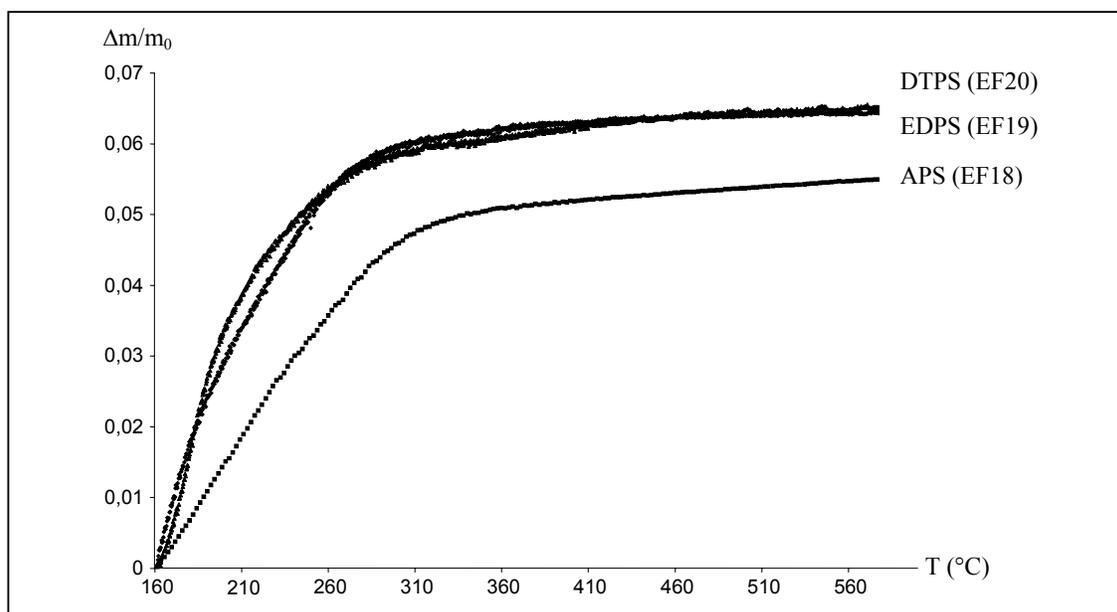


Figure 2.15. Thermogrammes des maghémities modifiées APS (EF18), EDPS (EF19) et DTSP (EF20).

Les densités surfaciques de recouvrement en EDPS et DTSP sont évaluées à partir des relations suivantes :

$$d_{(EDPS)} = \frac{\Delta m}{S_{sp} \times m_0 \times 101} \text{ et } d_{(DTSP)} = \frac{\Delta m}{S_{sp} \times m_0 \times 144}$$

où Δm est la perte de masse entre 160°C et 650°C, m_0 la masse initiale de maghémite modifiée, S_{sp} la surface spécifique de la maghémite. Les sous-facteurs 101 et 144 représentent les masses molaires respectives des greffons N- β -(aminoéthyl)- γ -aminopropyle et N'- β -(aminoéthyl)-N- β -(aminoéthyl)- γ -aminopropyle. Les valeurs des densités sont répertoriées dans le tableau 2.4.

Exp.	EF18(APS)	EF19(EDPS)	EF20(DTSP)
d ($\mu\text{mol.m}^{-2}$)	7,5	4,9	3,5
$S_{sp}/\text{molécule} (\text{\AA}^2)$	22	34	47

Tableau 2.4. Densités surfaciques de recouvrement des maghémites modifiées par les agents de couplages APS, EDPS et DTSP et surfaces développées respectives.

La densité de recouvrement en groupements organiques de la maghémite EF18 est 2,1 fois plus élevée que celle de l'EF20 et 1,5 fois plus élevée que celle du produit EF19. Toutefois, ces valeurs sont surestimées du fait du greffage en multicouche de l'APS et vraisemblablement, de l'EDPS. Par conséquent, le DTSP et l'EDPS développent une surface beaucoup plus grande que l'APS. Ce résultat confirme que la densité de recouvrement diminue lorsque l'encombrement stérique augmente. Pour une surface de silice, Plueddeman⁷⁴ a évalué la densité de recouvrement en EDPS à 3 $\mu\text{mol.m}^{-2}$. Pour une même surface, Ishida⁷⁵ a trouvé une valeur de 1,5 $\mu\text{mol.m}^{-2}$. Il en a conclu que les amines de l'EDPS développent des interactions de type liaisons H avec les groupes hydroxyle de surface d'origine, et que l'EDPS présente une conformation « couchée » sur la surface de la silice.

Il est intéressant de noter, par ailleurs, que le greffage de ces deux agents de couplage selon le mode opératoire EF11 conduit à des maghémites modifiées qui ne sont pas (ou peu) peptisables. Ce phénomène peut être vraisemblablement attribué à la conformation couchée des groupes aminoalkyles qui augmenterait le caractère hydrophobe de la surface de la maghémite. Le traitement thermique sous vide, en brisant les liaisons hydrogène développées entre les amines et les groupes hydroxyle de surface, réorientent les amines vers l'extérieur du film, rendant ainsi les maghémites modifiées peptisables. On peut envisager à l'avenir, de vérifier cette hypothèse par des mesures de tension de surface⁷⁶.

2.3.3 Détermination de la taille des nanoparticules modifiées.

a. Microscopie électronique à transmission

Les grilles de microscopie des échantillons EF18, 19 et 20 sont préparées selon la méthode décrite dans le paragraphe 1.3.1.a.

La figure 2.16 montre les clichés de MET pour ces trois produits. Si on compare ces clichés avec ceux obtenus pour la maghémite (Fig. 1.3), on n'observe aucune différence que ce soit au niveau de la taille ou de la morphologie des nanoparticules. La couche de silane est trop fine pour qu'elle puisse être décelée par cette technique. Néanmoins l'observation de ces clichés n'a révélé aucune hétérogénéité de greffage comme la présence d'amas de polysiloxane. Conformément à ce qui avait été observé pour la maghémite, le séchage des échantillons donne un aspect globalement agrégé des nanoparticules.

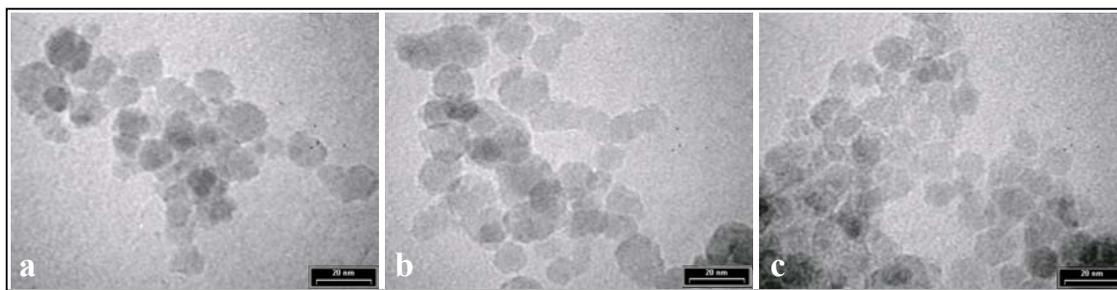


Figure 2.16. Clichés MET de maghémites modifiées a) APS (EF18); b) EDPS (EF19); c) DTSP (EF20) montrant des morphologies équivalentes. Barre d'échelle = 20 nm

b. Spectroscopie de corrélation de photons (PCS)

Les sols de maghémite EF18, 19 et 20 sont dilués à une concentration d'environ 10^3 mol.L^{-1} de fer dans de l'eau ultrapure, le pH étant maintenu constant à 2,5 par addition de quelques gouttes d'acide nitrique dilué. 3 mL de chaque solution sont alors versés dans les cellules en quartz. Les conditions opératoires sont les mêmes que celles décrites dans le paragraphe 1.3.1b.

La figure 2.17 montre les histogrammes des diamètres hydrodynamiques en nombre obtenus par PCS des sols de maghémite modifiée. Les valeurs des diamètres mesurés sont rassemblées dans le tableau 2.5.

L'histogramme du produit EF01, qui correspond à la maghémite séchée et modifiée par l'APS dans le toluène, est aussi présenté pour comparaison. Cette suspension est fortement agrégée, la taille des flocs atteignant le micromètre. On peut constater que le mode opératoire EF01 n'est pas adapté dans le but de préserver l'état de dispersion du sol. Les divers traitements thermiques ont stabilisé l'état d'agrégation et la maghémite, ainsi modifiée, ne peut plus être dispersée. La valeur du diamètre moyen en nombre n'est d'ailleurs pas très

fiable du fait que pour ces tailles, la sédimentation des agrégats perturbe la mesure des mouvements browniens autocorrélés.

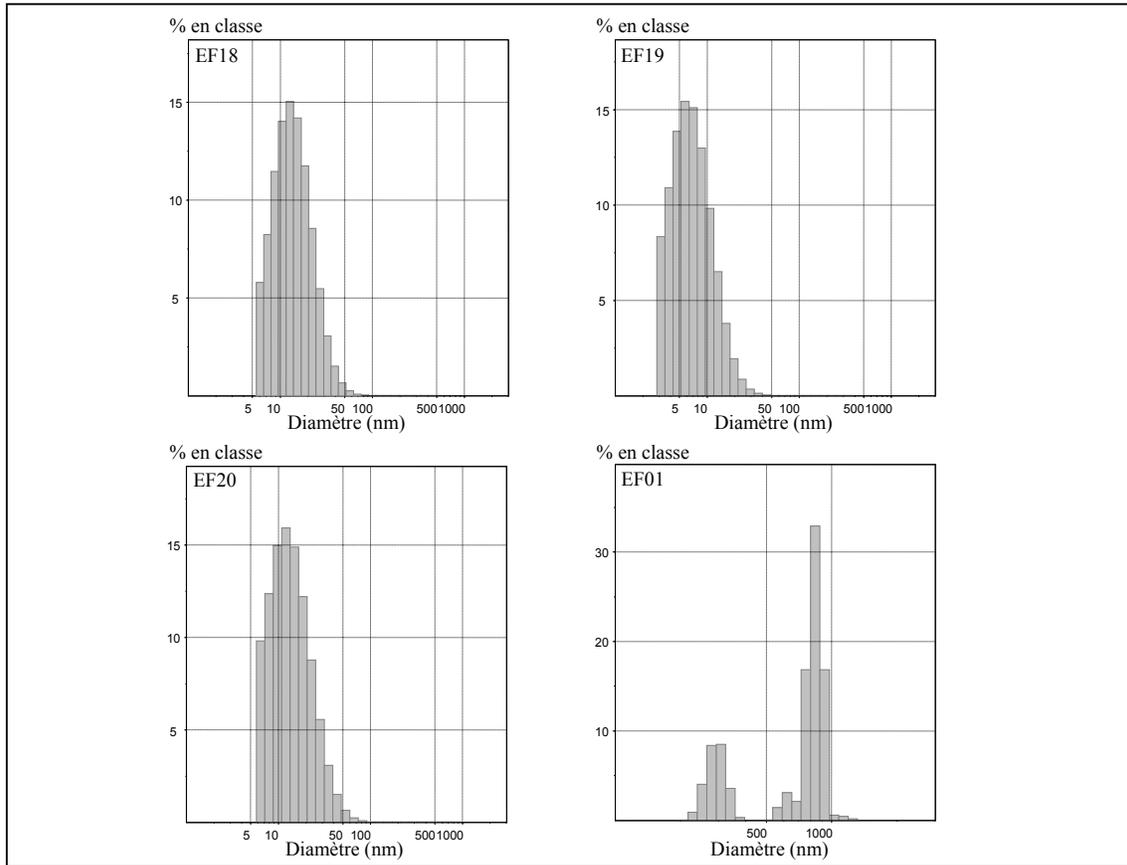


Figure 2.17. Distributions lognormales des diamètres hydrodynamiques pondérés en nombre des maghémite modifiées APS (EF18), EDPS (EF19) et DTPS (EF20) à pH 2,5. L’histogramme en bas à droite correspond à la distribution des diamètres en nombre de particules de maghémite modifiées par l’APS selon le mode opératoire EF01 (Séchage préalable de la maghémite et greffage de l’APS dans le toluène).

Exp	$\bar{d}_n \pm \Delta d$ (nm)	\bar{d}_z (PCS)	σ	Ref
($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) FF10	8 ± 10	40 ± 46	0,52	-
($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ -APS) EF18	15 ± 17	59 ± 75	0,50	-
($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ -EDPS) EF19	8 ± 8	37 ± 52	0,54	-
($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ -DTPS) EF20	15 ± 16	85 ± 120	0,57	-
($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ -APS) EF01	690 ± 320	484 ± 650	0,69	-
Ferumoxsil	-	300 ± 50	0,16	15,57
Fe_3O_4 -APS	-	612	-	59
Fe_3O_4 -EDPS	-	561	-	59
Fe_3O_4 -APS	10-15	-	-	61

Tableau 2.5. Valeurs des diamètres moyens en nombre et écart-type des maghémite modifiées et de la maghémite d’origine, comparées à celles trouvées dans la littérature.

Le diamètre moyen en nombre de la maghémite modifiée APS (EF18) est plus élevé que celui de la maghémite modifiée EDPS. Cela est certainement dû aux agrégats résiduels générés lors des phases de lavage, présents dans le sol. Le diamètre moyen des nanoparticules EF20 est légèrement plus élevé, peut être du fait d'une moins bonne stabilisation du sol. Globalement, les valeurs des diamètres et la largeur des distributions restent comparables à celles obtenues pour la maghémite ce qui montre que la réaction de greffage n'a pas (ou peu) altéré l'état de dispersion des nanoparticules.

Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules de maghémite modifiées par l'EDPS (EF19) est plus faible que celui de la maghémite. Les agents de couplage silaniques organofonctionnels sont connus pour leur faculté de désagglomérer les particules en abaissant leur énergie de surface⁶¹, ce qui pourrait expliquer ce résultat. Le diamètre des nanoparticules EF19 peut être comparé aux analogues commerciaux ou brevetés : le Ferumoxsil, plus connu sous le nom d'AMI-121, est un agent de contraste superparamagnétique administrable par voie orale. Il est composé de nanoparticules de magnétite modifiée par l'EDPS et calibrée par séparation magnétique ; les particules de magnétite modifiées par des aminosilanes (APS, EDPS...) décrites dans le brevet de Whitehead *et al.* possèdent des tailles supérieures à 500 nm, limitant ainsi leurs applications biologiques à des dispositifs de séparation magnétique *in vitro*.

Le diamètre PCS de l'EF19 est 8 à 15 fois plus faible selon les cas, celui de l'EF18 est comparable au produit de la référence [61], ce qui montre que la qualité de la dispersion a été améliorée par notre procédé de greffage sans avoir eu recours à l'utilisation des ultrasons.

La modification de surface des nanoparticules de maghémite par les agents de couplage silaniques aminés n'a donc pas affecté leur taille et leur morphologie. De plus, cette modification n'a pas altéré l'état de dispersion des nanoparticules en milieu aqueux, en comparaison aux protocoles classiques de silanisation.

2.3.4 Etude du comportement des sols colloïdaux fonctionnalisés

La comparaison des mesures de potentiel zêta en fonction du pH et des concentrations limites en ion chlorure, des différents sols doit nous apporter quelques éléments qui nous aideront dans la caractérisation de la surface des nanoparticules modifiées.

a. Effet du traitement thermique

Lors de l'étude des propriétés du sol EF11, on a pu constater que le PIE de la maghémite modifiée par l'APS était égal à 8,5 alors que le pK_a de la chaîne aminopropyle est

égal à 10,4. A la vue de ce résultat, nous avons émis l'hypothèse de l'existence d'interactions de type liaisons hydrogène ou ioniques, développées par les amines à la surface de l'oxyde de fer et à l'intérieur même du film polysiloxane. Les mesures de potentiel zêta du sol EF18 sont représentées sur la figure 2.18. La préparation des échantillons pour les mesures est identique à celle décrite dans le paragraphe 2.2.3a.

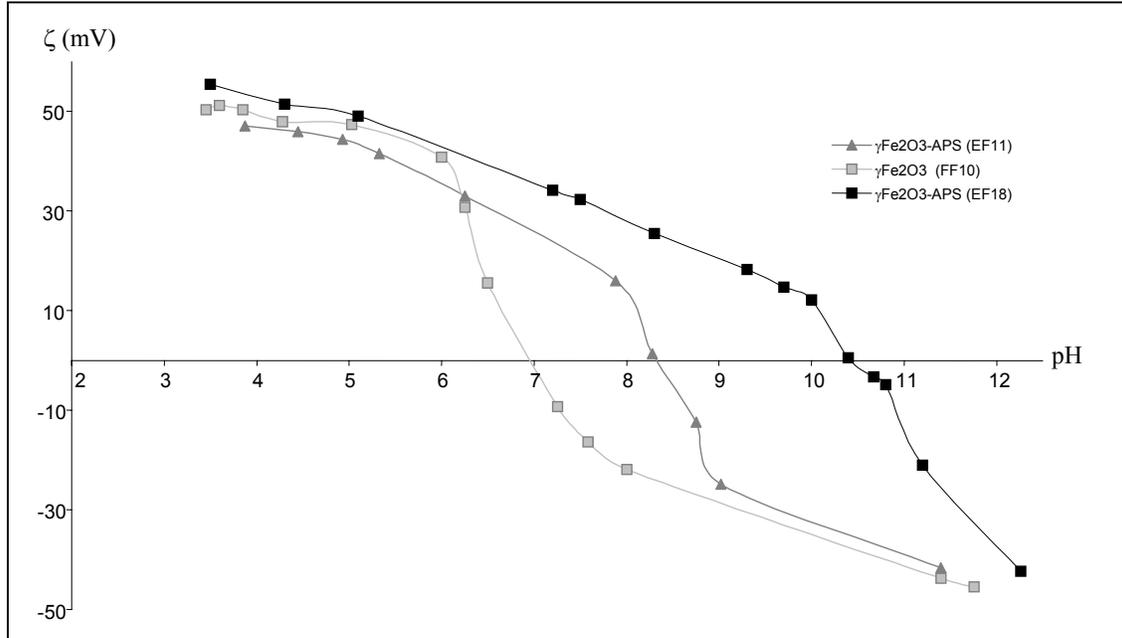
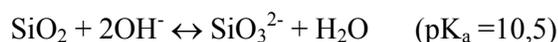


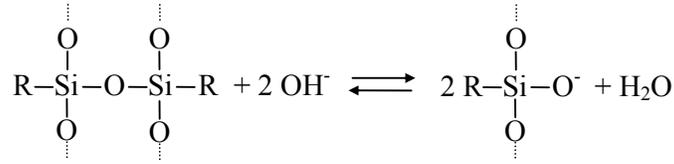
Figure 2.18. Variations isothermes, en fonction du pH du sol, du potentiel zêta des nanoparticules de maghémite d'origine et modifiées en surface par le 3-aminopropyltriméthoxysilane, avant (EF11) et après traitement thermique modéré sous vide (EF18).

Le point isoélectrique de l'échantillon EF18 est mesuré à pH 10,4. Ce résultat montre, d'une part, que le traitement thermique sous vide a augmenté le nombre d'amines libres à la surface et d'autre part, que seuls les groupes amines de surface gouvernent le comportement du sol. En effet, comme le PIE est égal au pK_a de l'aminopropyle, les porteurs de charge majoritaires présents à la surface, sont les fonctions amines issues de la condensation de l'APS. La majeure partie des groupes silanols acides résiduels se trouvent à l'intérieur du film siloxane, en interaction avec d'autres amines.

Cependant, pour des valeurs de pH supérieures à 10,4, le potentiel zêta devient négatif. L'apparition de charges négatives ne peut alors s'expliquer que par la seule présence des silanolates. La détérioration du film polysiloxane selon l'équilibre observé dans le cas de la silice en milieu basique⁷⁷ doit conduire à l'apport de charges négatives supplémentaires :



soit pour un film polysiloxane,



La rupture des liaisons siloxane s'accompagne alors de la formation de deux charges négatives. De plus, la dégradation du film polysiloxane découvre la surface de l'oxyde de fer qui, à ce pH, est chargée négativement. La contribution de ces deux effets explique la forte décroissance du potentiel zêta pour les pH élevés.

b. Influence de la concentration en APS sur le PCN et la zone de floculation

Des échantillons des sols de maghémite modifiés par l'APS correspondant aux synthèses EF12-18 sont préparés pour les mesures de potentiel zêta selon le mode opératoire décrit dans le paragraphe 2.2.3a.

La figure 2.19 montre les variations de potentiel zêta des sols de maghémite modifiée en fonction de leur densité surfacique de greffage en APS.

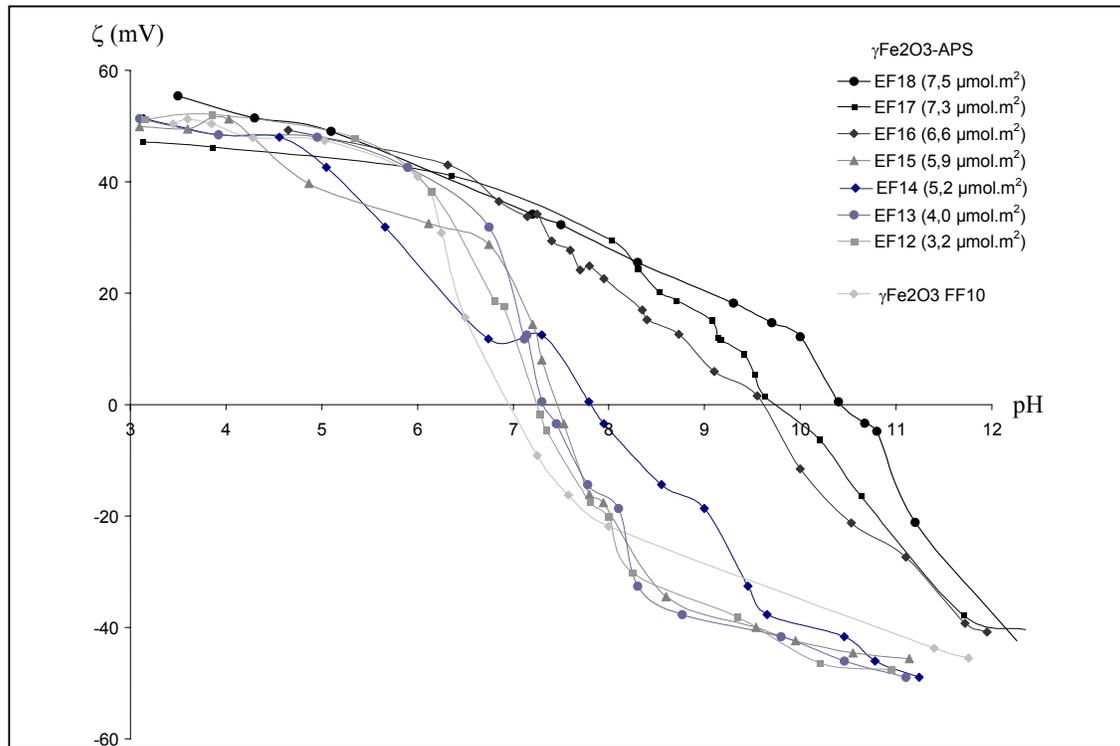


Figure 2.19. Variations du potentiel zêta des sols de maghémite modifiée APS pour différentes densités de greffage.

On constate que les PIE des maghémites modifiées augmentent de façon monotone avec la densité surfacique de maghémite greffée (voir aussi Fig. 2.20). On peut noter que pour les faibles taux de recouvrement (compris entre 3 et 6 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, EF12-15), le PIE varie peu, tandis qu'il augmente brutalement lorsque la surface commence à être saturée en APS (EF16-

18). Par conséquent, tant que la surface n'est pas saturée, les chaînes aminopropyle interagissent avec la surface de la maghémite et les silanols libres. Ce résultat montre que pour des surfaces saturées en APS, les premières couches greffées interagissent d'abord avec la surface de la maghémite et ce sont seulement les dernières couches externes qui en s'orientant vers l'extérieur, conditionnent le comportement du sol.

Les domaines de floculation se décalent avec les PIE des sols de maghémite modifiée. Cependant, quel que soit le taux de recouvrement en APS, la largeur du domaine de floculation ne varie que très peu ($\Delta\text{pH} \approx 4$), ce qui peut paraître surprenant si l'on compare les valeurs des potentiels aux différentes bornes des domaines de floculation. Une interprétation de ce phénomène est donnée dans le paragraphe 2.4.2d. La figure 2.20 représente le diagramme de phases du système colloïdal $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ - γ APS dans lequel le pH du sol est porté en fonction de la densité surfacique de recouvrement.

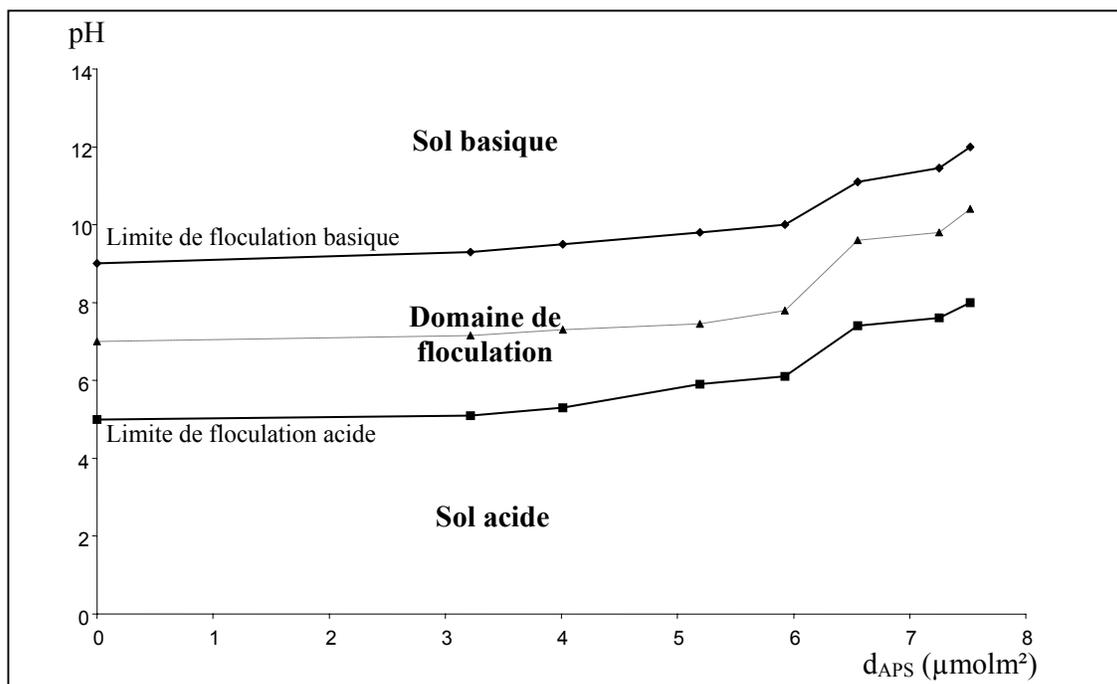


Figure 2.20. Diagramme de phase $\text{pH} = f(d_{\text{APS}})$ du système maghémite-3-aminopropyltriméthoxysilane (à température ambiante) montrant l'évolution du domaine de floculation en fonction de la densité surfacique de recouvrement en APS. En pointillés, variations du PIE en fonction de d_{APS} .

c. Détermination des PIE des maghémites modifiées EDPS et DTSPS

Des échantillons des sols de maghémite modifiés par l'EDPS et le DTSPS, correspondant respectivement aux synthèses EF19 et EF20, sont préparés pour les mesures de potentiel zéta selon le mode opératoire décrit dans le paragraphe 2.2.3a.

La figure 2.21 montre les résultats obtenus pour les sols EF19 et EF20 comparés au sol EF18.

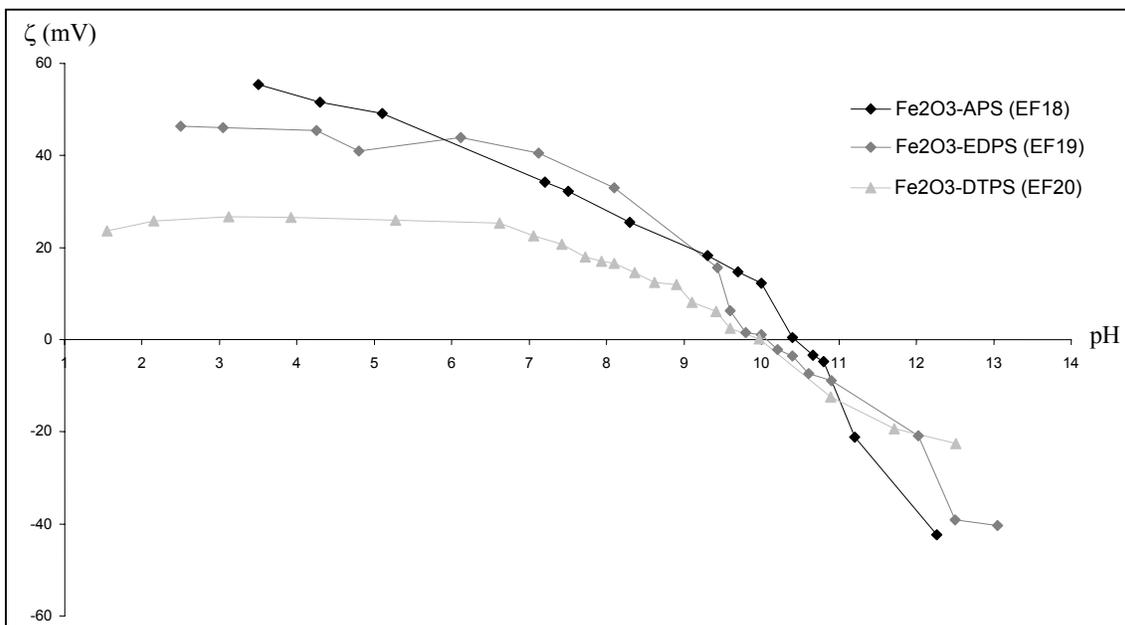


Figure 2.21. Mesures de potentiel zêta en fonction du pH de la maghémite modifiée par des agents de couplages silaniques aminés.

Les PIE des produits EF19 et EF20 (respectivement 10,1 et 10) sont plus faibles que celui de l'EF18. Cet écart est dû au fait que le pK_a des amines secondaires est plus faible (de l'ordre de 9,5-10) et qu'il reste des groupes silanolates contribuant à la diminution de la valeur du PIE. Les répulsions stériques générées par les bras aminoalkyles, plus importantes dans le cas des agents de couplage EDPS et DTSP, peuvent rendre la condensation difficile, du fait de l'accessibilité réduite des silanols.

De plus, on remarque que les valeurs de potentiel zêta du EF20 (DTSP) sont environ deux fois plus faibles, en milieu acide, que celles de l'EF19 et l'EF18. Le DTSP possède 3 amines susceptibles de porter des charges positives ce qui devrait compenser sa faible densité surfacique de recouvrement. Cependant les répulsions électrostatiques font que le DTSP ne possède jamais 3 amines protonées à la fois ce qui explique les faibles valeurs de potentiel zêta, en milieu acide, de l'EF20 en comparaison avec les maghémites EF18 et EF19.

En milieu basique les valeurs de potentiel zêta sont du même ordre. Les porteurs de charges négatives sont des silanols résiduels, puis pour des pH supérieurs à 10,5, le film polysiloxane commence à se détériorer, laissant apparaître les charges négatives provenant des hydroxyles de surface de la maghémite déprotonées.

Ces mesures ont été réalisées plus de 12 heures après la peptisation par voie acide. Il est intéressant de noter que les différents traitements acido-basiques n'ont pas dénaturé la surface de la maghémite modifiée. Si le film polysiloxane n'était pas solidement ancré à la surface de la maghémite, les PIE de ces produits seraient proches du PCN de la maghémite.

Cette observation est vérifiée lors de l'étude des dépôts par spectrométrie IR en réflexion diffuse.

d. Effet de la modification de surface sur la concentration-limite de floculation en NaCl (en ion Cl⁻)

Dans le cadre de cette étude comparative des comportements des sols de maghémite modifiée, nous avons examiné l'effet de la concentration d'un électrolyte (1:1), à pH acide fixé, sur la floculation.

Des dilutions sérielles de NaCl sont réalisées à l'eau ultrapure (10 MΩ), dans des tubes à hémolyse de 4 mL. Chaque tube contient un volume de 1 mL de solution aqueuse saline de concentration ajustée entre 1 et 0,05 mol.L⁻¹. Un volume de 1 mL de sol EF18 (APS), EF19 (EDPS) et EF20 (DTPS) (pH = 3 et [Fe] = 3.10⁻² mol.L⁻¹) est placé dans les tubes pour chaque série. Les solutions sont agitées au vortex et reposées une heure. Chaque échantillon est ensuite placé dans un tube en quartz pour la spectrophotométrie.

Les trois séries sont représentées sur la photographie (Fig. 2.22). On observe une évolution, visible à l'œil nu : le produit EF18 flocule à partir d'une concentration en NaCl comprise entre 0,1 et 0,15 mol.L⁻¹ tandis que l'EF19 se déstabilise entre 0,15 et 0,2 mol.L⁻¹, et l'EF20 entre 0,2 et 0,25 mol.L⁻¹. Cette augmentation de la concentration limite est aussi observée par spectrophotométrie UV-visible (Fig. 2.23).

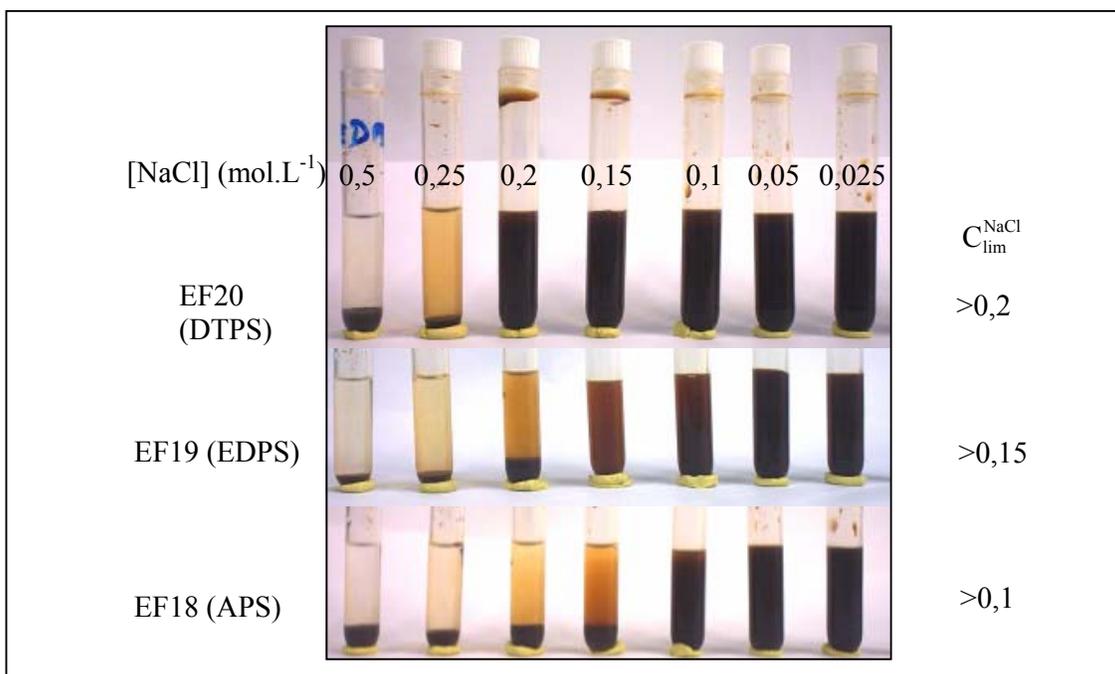


Figure 2.22. Photographies montrant l'évolution de la concentration limite en ion Cl⁻, à pH=3, en fonction de la nature de la chaîne aminoalkyle.

Les concentrations limites en ion Cl⁻ respectives pour des dispersions EF18, 19 et 20, déterminées par spectrophotométrie UV-vis, sont à peu près égales à 0,14 M, 0,17 M et 0,21

M. Les concentrations limites de floculation des ferrofluides FF10 ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) et EF11 (APS) déterminés par cette méthode (§ 2.2.3) ont été reportées, pour comparaison, dans le tableau 2.6.

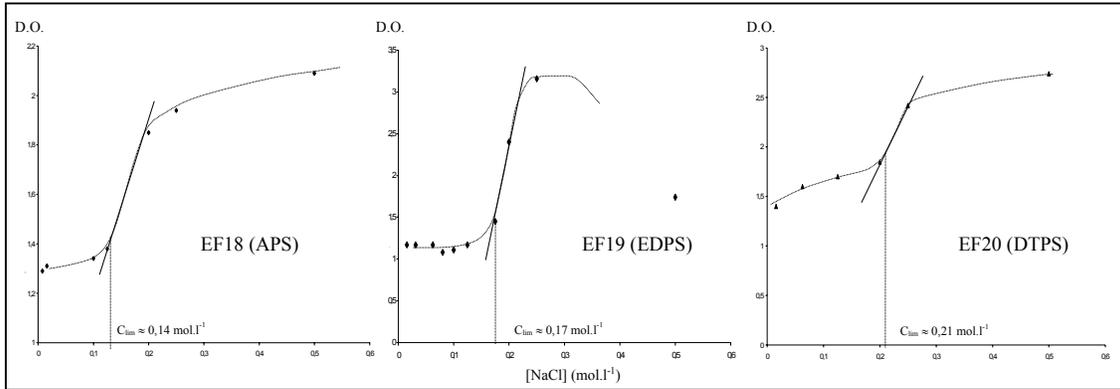


Figure 2.23. Evaluation de la concentration limite en Cl^- , à $\text{pH} = 3$, par spectrophotométrie UV-vis ($\lambda=800\text{nm}$).

	$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ (FF10)	$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ -APS (EF11)	$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ -APS (EF18)	$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ -EDPS (EF19)	$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ -DTSPS (EF20)
$C_{\text{lim}}^{\text{Cl}^-}$ (mol/L)	0,05	0,10	0,14	0,17	0,21
A (J)	$4,2 \cdot 10^{-19}$	$2,9 \cdot 10^{-19}$	$2,5 \cdot 10^{-19}$	$2,2 \cdot 10^{-19}$	$2,0 \cdot 10^{-19}$

Tableau 2.6. Valeurs des concentrations limites de floculation en ions Cl^- et des constantes d'Hamaker des maghémites modifiées.

A partir de la relation de Schulze et Hardy, on peut évaluer les constantes d'Hamaker des maghémites modifiées (Tab. 2.6). Elles sont de l'ordre de 10^{-19} J, ce qui est conforme aux données de la littérature²⁹. Néanmoins, compte tenu des nombreuses approximations impliquées, tant dans la méthode de mesure que sur le modèle utilisé, nous accorderons peu de crédit à ces valeurs. En effet, les concentrations-limites de floculation mesurées sont susceptibles d'évoluer lors du vieillissement des différents sols et la relation qui permet d'accéder aux valeurs des constantes d'Hamaker est établie dans le cas de potentiels élevés. Cependant, une discussion qualitative sur l'évolution de ces valeurs permet d'apporter des explications sur le comportement de ces sols.

L'observation de valeurs différentes de A pour chaque produit montre que la nature de la surface de la maghémite a été modifiée. Ces valeurs diminuent en fonction de la longueur de la chaîne aminoalkyle. La présence de la chaîne organique diminue la polarisabilité de la surface de l'oxyde minéral. L'abaissement de A entraîne celui du potentiel attractif V_A (en valeur absolue) et donc l'augmentation de la hauteur de la barrière de stabilisation cinétique (Fig. 1.19). Cet effet peut expliquer que malgré la diminution du potentiel zêta pour les

maghémite greffées par rapport à la maghémite d'origine, la largeur ΔpH du domaine de floculation reste pratiquement constante et égale à 4. La diminution du potentiel zêta, et donc du potentiel répulsif V_R est compensée par la diminution du potentiel attractif V_A .

On a constaté, par ailleurs, que la maghémite modifiée par le DTSP, bien qu'elle semble légèrement plus agrégée (voir Tab. 2.5), reste stable en milieu acide, malgré les valeurs de potentiel zêta deux fois plus faibles que celle de la maghémite modifiée par l'APS. Ce résultat peut s'expliquer à nouveau par l'abaissement du potentiel attractif V_A ($A_{DTSP} < A_{APS}$) qui compense la diminution du potentiel répulsif V_R ($\zeta_{DTSP}(3,5) < \zeta_{APS}(3,5)$), mais aussi par un effet stérique du fait de l'allongement du bras aminoalkyle de l'agent de couplage silanique.

De plus, en comparant les constantes d'Hamaker des produits modifiés par la polycondensation de l'APS, avant et après le traitement thermique modéré sous vide (EF11 et EF18), on constate que $A_{APS}^{EF11} > A_{APS}^{EF18}$. Le traitement thermique modéré sous vide a eu pour effet de briser les interactions des amines de surface de type liaisons hydrogène avec les silanols ou les groupes hydroxyle de surface. En libérant les groupes aminopropyle vers l'extérieur, la surface est devenue plus « organophile », d'où l'abaissement de la valeur de A_{APS}^{EF18} . Cette hypothèse est soutenue par la comparaison des mesures de potentiel zêta de ces deux produits. En effet, l'augmentation du PIE de la maghémite modifiée par l'APS de 8,3 à 10,4 (pK_a de l'aminopropyle), ne peut s'expliquer que par l'augmentation de la densité d'amines libres à la surface.

2.3.5 Etude des dépôts de silanes par spectrométrie IR en réflexion diffuse.

a. Effet du traitement thermique sur le dépôt de silane

Les échantillons de maghémite modifiée par l'APS avant et après traitement thermique sont préparés selon le mode opératoire décrit dans le paragraphe 1.4.1c. La figure 2.24 montre les spectres DRIFT correspondant aux deux échantillons EF11 et EF18 ainsi que les spectres respectifs représentant la différence avec le spectre de la maghémite (Fig. 1.17a).

La comparaison de ces deux spectres conduit à l'observation de différences notables concernant les bandes de vibration communes $\nu(\text{CH})$ à 2936 et 2882 cm^{-1} , $\delta(\text{CH}_2)$ à 1456 cm^{-1} et $\nu(\text{Si-CH}_2)$ à 1218 cm^{-1} . Ces bandes sont, en effet, beaucoup plus intenses dans la maghémite EF18, ce qui laisse suggérer que la concentration surfacique en groupes

aminopropyle est plus élevée sur cet échantillon. Les bandes intenses, caractéristiques des groupements méthoxy à 2843 cm^{-1} ($\nu_s(\text{O-CH}_3)$), 1191 cm^{-1} ($\rho(\text{O-CH}_3)$) et 812 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}(\text{Si-O-C})$), ont disparues, libérant la zone spectrale de 1000 à 1150 cm^{-1} . Dans cette région, nous pouvons déceler la présence d'une deuxième bande de vibration (Si-O-Si) à 1108 cm^{-1} , en plus de celle située à 1040 cm^{-1} , pratiquement absente dans le spectre de la maghémite EF11. La présence de ces deux bandes distinctes dans le cas de l'EF18, suggère que le degré de polycondensation du film polysiloxane de cet échantillon est plus élevé (liaisons bidendates contre monodendates) que celui de l'EF11.

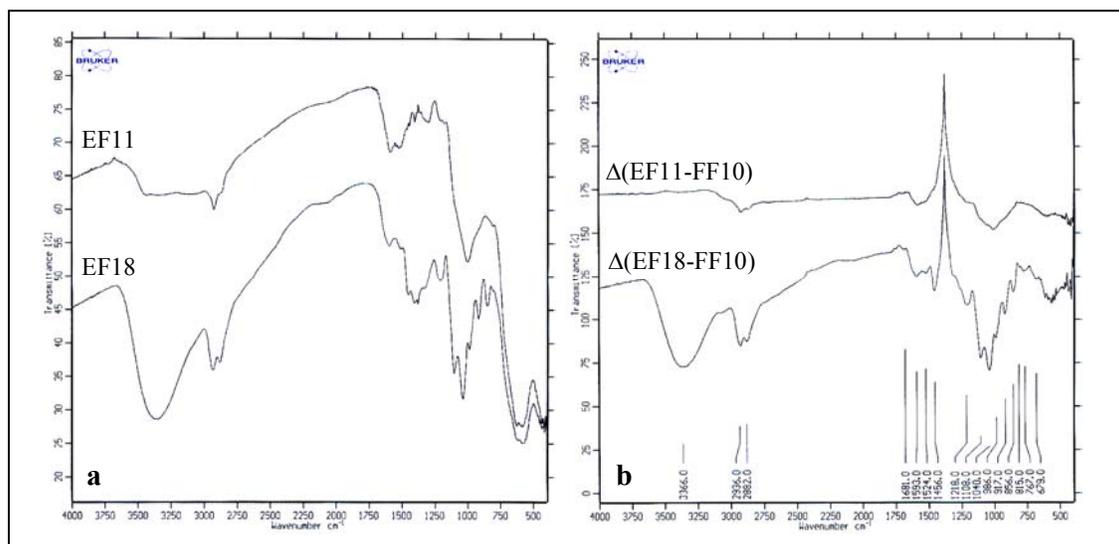


Figure 2.24. Spectres DRIFT : (a) de la maghémite modifiée APS avant (EF11) et après traitement thermique modéré sous vide (EF18) ; (b) différences respectives avec le spectre de la maghémite d'origine (FF10).

Le spectre EF18 présente d'autres bandes supplémentaires : les bandes moyennes à 917 cm^{-1} et 866 cm^{-1} partiellement masquées par la large bande de vibration des liaisons siloxane dans le spectre EF11, sont caractéristiques des vibrations $\nu(\text{Si-O})$ des silanols résiduels⁷². Cela montre que malgré le traitement thermique, une faible quantité de silanols, n'a donc réagi ni avec le substrat, ni avec d'autres silanols du film polysiloxane. Deux raisons peuvent expliquer leur présence : la stabilisation par liaisons hydrogène avec les amines ; lors de la polycondensation, une certaine fraction de silanols se trouve piégée dans le réseau rigide polysiloxane, rendant impossible la rencontre avec un autre silanol ou un hydroxyle de surface.

Deux autres bandes situées vers 679 cm^{-1} et 856 cm^{-1} sont présentes sur le spectre de l'échantillon EF18. Elles ne peuvent être attribuées ni au film polysiloxane, ni au réseau de la maghémite. Plusieurs auteurs ont évoqué l'existence de liaisons Fe-O-Si dans les zéolites de ferrisilicates ou sur divers substrats d'oxyde ferriques recouverts de silane. Ainsi, la bande de

vibration Fe-O-Si a été attribuée à 900 cm^{-1} pour les zéolites ZSM5⁷⁸, à 656 cm^{-1} pour le mode $\nu_s(\text{Fe-O-Si})$ et entre 850 et 1000 cm^{-1} pour le mode $\nu_{as}(\text{Fe-O-Si})$ dans ces mêmes zéolites⁷⁹, entre 650 et 750 cm^{-1} dans des minerais de ferri-phlogopite⁸⁰, à 1016 cm^{-1} dans le cas du ferumoxsil⁵⁷ et à 995 cm^{-1} dans le cas d'une monocouche d'APS polycondensée sur un substrat d'acier poli⁸¹. Dans tous les cas, aucune des attributions ne coïncident entre elles, tant les environnements du fer et du silicium sont différents. Par conséquent, nous ne sommes pas en mesure d'affirmer avec certitude que ces bandes correspondent respectivement aux modes de vibration $\nu_s(\text{Fe-O-Si})$ et $\nu_{as}(\text{Fe-O-Si})$ comme le suggèrent Szostak *et al.*⁷⁹, même si elles apparaissent de façon systématique après traitement thermique sous vide. Le problème des attributions des modes vibrationnels pour ce type de liaison dans le cas de polysiloxanes condensés sur un substrat d'oxyde de fer reste donc entièrement ouvert.

Les bandes à 1593 et 1524 cm^{-1} indiquent la présence d'amines libres et d'une fraction d'amines en interaction avec des silanols malgré le traitement thermique. En outre, nous venons d'observer la présence de silanols résiduels dans le film polysiloxane. Ce résultat nous laisse suggérer que seules les amines de la surface du film polysiloxane ont pu être libérées, et que celles situées à l'intérieur du film interagissent.

Les spectres DRIFT des maghémites modifiées par l'EDPS (EF19) et le DTPS (EF20) sont présentés en figure 2.25. Nous observons peu de différences notables avec l'EF18 si ce n'est la présence d'une seule bande de cisaillement des amines $\delta(\text{NH}_2)$ à 1593 cm^{-1} pour l'EF19 et 1586 cm^{-1} pour l'EF20 ce qui montre que la fraction d'amine libre est plus élevée pour ces deux échantillons.

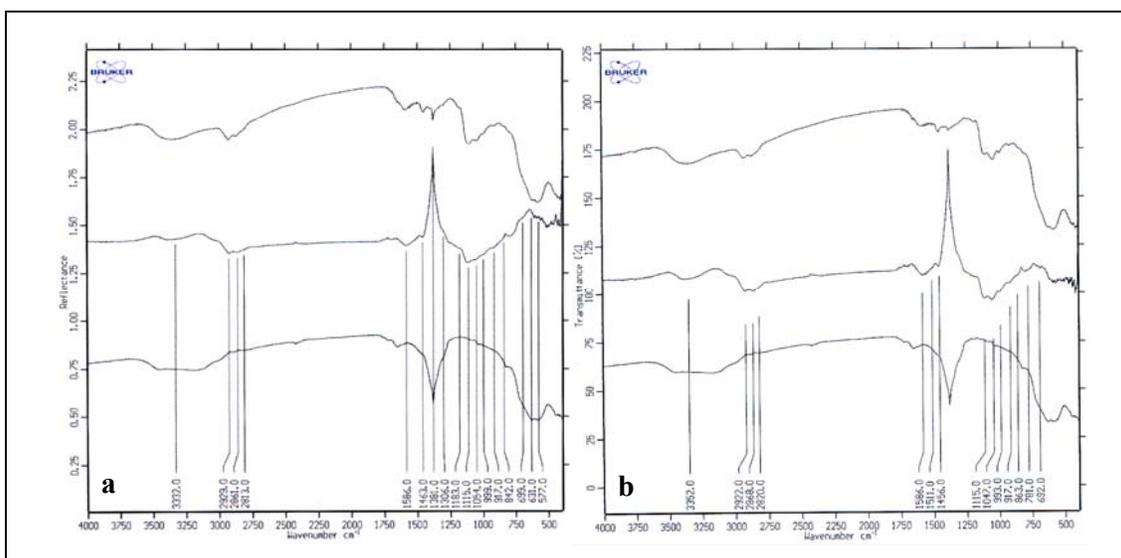


Figure 2.25. Spectres DRIFT de la maghémite modifiée par (a) l'EDPS (EF19) et (b) le DTPS (EF20).

b. Influence du temps de déshydratation sous vide

Plusieurs échantillons de maghémite modifiée selon les conditions opératoires EF18, ont été préparés à divers temps de traitement. Les spectres correspondant sont montrés en figure 2.26.

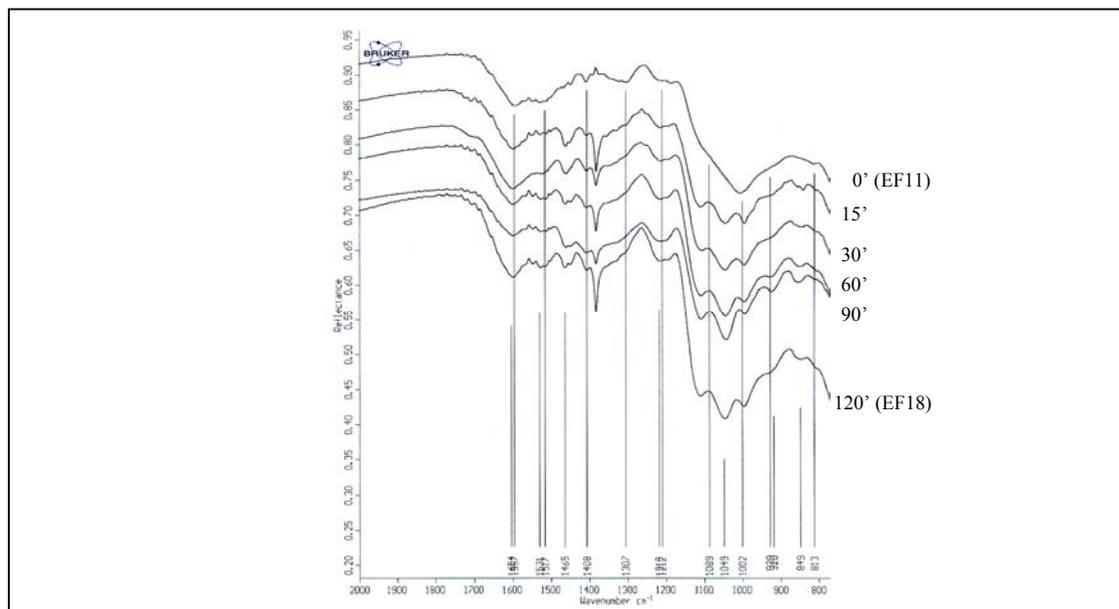


Figure 2.26. Spectres DRIFT d'échantillon de maghémite modifiée APS à différents temps de traitement thermique sous vide.

Les spectres des maghémites traitées ne montrent pas de différences significatives en ce qui concerne la position et l'intensité des bandes. D'une part, cela montre que la polycondensation se fait rapidement, avant 15 minutes de traitement. D'autre part, cette expérience nous renseigne sur le mécanisme de condensation du film polysiloxane. En effet, le fait que l'on n'observe aucune différence au niveau des spectres des échantillons traités 15' et 120', montre que le film polysiloxane ne peut pas provenir de condensats ou d'oligomères présents dans la solution en excès. Le film polysiloxane condensé provient de la couche de silane adsorbée lors de la première étape (EF11) qui se forme dès les premières minutes à la surface de la maghémite. La saturation de la surface crée alors suffisamment de gênes stériques pour repousser l'excès de silanes de la solution.

On peut aussi noter, la présence de la bande vers $849\text{-}860\text{ cm}^{-1}$, de plus en plus intense lorsque le temps du traitement augmente, et absente dans le cas de l'EF11. Dans l'hypothèse où cette bande correspondrait aux vibrations de ponts Fe-O-Si, son évolution dans le temps serait logique puisque la formation de ces liaisons seraient favorisées par le traitement thermique.

c. Influence du pH de la solution sur la stabilité chimique du dépôt

Le ferrofluide EF18 est ajusté à différents pH, par addition de KOH ou de HNO₃, pendant plus de 12 heures. Les échantillons sont ensuite lavés à l'acétone et séchés à 40°C à l'étuve (Le produit traité à pH 3,1 est déstabilisé par addition de KNO₃).

Les spectres des maghémites EF18 traitées sont montrés en figure 2.27.

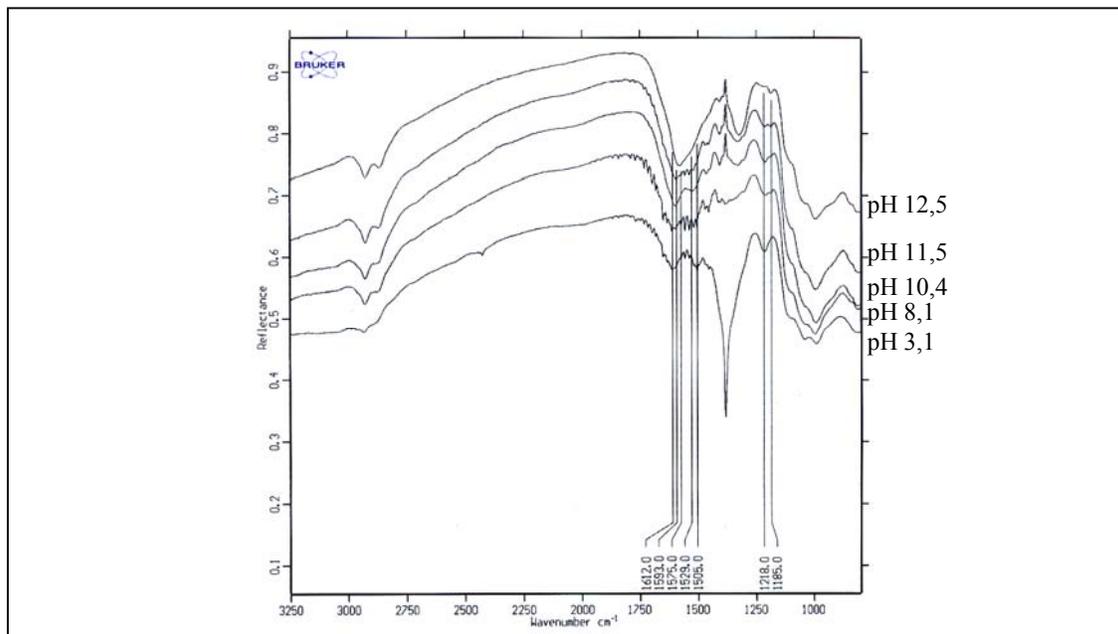


Figure 2.27. Spectres de la maghémite EF18 traitée à différents pH.

L'observation de ces spectres montre que le dépôt de silane polycondensé n'est pas affecté par les traitements acido-basiques. En effet, les bandes caractérisant les liaisons siloxanes sont identiques à celles identifiées précédemment. La présence de ces liaisons atteste de l'existence du film polysiloxane après traitements et lavages ce qui montre que le film est fortement lié à la surface de la maghémite.

L'examen des bandes de cisaillement $\delta(\text{NH}_2)$ et d'élongation $\nu(\text{Si-CH}_2)$ montre qu'elles présentent cependant quelques différences notables. A pH 3,1, l'échantillon produit deux bandes distinctes à 1612 ($\delta(\text{NH}_2)$) et 1505 cm^{-1} ($\delta(\text{NH}^+)$) caractérisant les amines libres et protonées^{72,82}. A pH 12,5, l'échantillon ne présente plus qu'une seule bande large à 1575 cm^{-1} avec un épaulement à 1529 cm^{-1} , montrant qu'une partie des amines interagissent avec les silanolates⁷². Plueddemann⁷⁴ a attribué le déplacement de la bande de cisaillement à 1575 cm^{-1} à la coordination de l'amine sur l'atome de silicium, formant à nouveau une structure cyclique. Cette observation est confirmée par le dédoublement de la bande d'élongation des groupes (Si-CH₂) à 1218 et 1185 cm^{-1} montrant deux conformations distinctes pour le bras aminopropyle. L'une à 1185 cm^{-1} correspond au retournement du bras vers un silanolate selon le schéma présenté en figure 2.3, et l'autre à 1218 cm^{-1} correspond à la forme amine libre. Cet

effet s'atténue lorsque le pH du sol diminue. A pH 3,1, il ne reste plus qu'une seule bande à 1218 cm^{-1} montrant que la forme amine libre protonée, prédomine.

La complexité de ce système repose sur la conjugaison des équilibres ($\text{SiOH} \leftrightarrow \text{SiO}^- + \text{H}^+$ et $\text{RNH}_3^+ \leftrightarrow \text{RNH}_2 + \text{H}^+$), des interactions intramoléculaires ($\text{SiO}^- \cdots \text{H} \cdots \text{NH}_2^+ \text{R}$) et des interactions avec les hydroxyles de surface ($\text{FeO} \cdots \text{H} \cdots \text{NH}_2^+ \text{R}$). Notamment, il est difficile d'affirmer si un groupe ammonium résulte d'un transfert de proton d'un silanol ou bien s'il est le fait du pH de la solution. L'analyse par RMN ^1H des silanols, préalablement marqués par deutériation, pourrait répondre à ce type de question.

L'adhésion du film polysiloxane n'est pas le seul fait des interactions des amines avec la surface de l'oxyde de fer. En effet, l'adsorption des amines à la surface de la maghémite ne résiste pas à une attaque acide. La figure 2.28 montre le spectre de la maghémite qui a été mise en présence d'un excès de propylamine à pH 10,4. Après plusieurs lavages à l'eau ultrapure, on peut constater que la propylamine reste adsorbée à la surface. On retrouve notamment, les bandes de cisaillement des amines à 1529 cm^{-1} et 1600 cm^{-1} et les bandes de d'élongation $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ à 2955 cm^{-1} . Après traitement à l'acide nitrique à pH 3,1 et lavages, dans les mêmes conditions que pour l'EF18, toutes ces bandes ont disparues, montrant que la propylamine s'est désorbée de la surface. Cette expérience témoin suggère que le film polysiloxane est lié à la surface de la maghémite par des liaisons plus fortes que celles qui interviennent lors de l'adsorption des amines avec la surface.

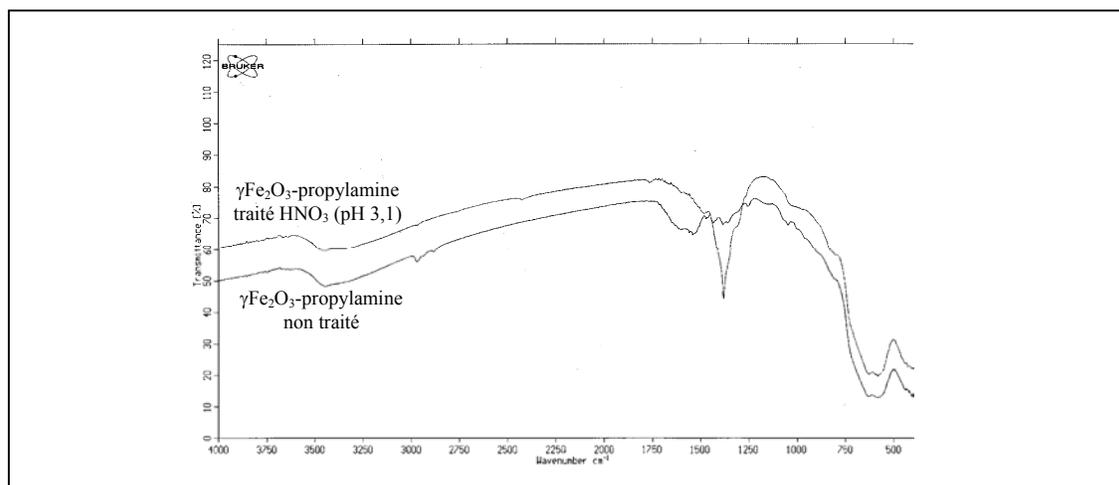


Figure 2.28. Spectres DRIFT de la maghémite-aminopropane avant et après traitement acide.

L'appui d'une autre technique comme l'XPS doit nous permettre de quantifier les différentes espèces présentes à la surface de l'oxyde et éventuellement d'élucider certaines questions soulevées lors de cette étude par spectroscopie IR.

2.3.6 Etude de la surface des nanoparticules de maghémite modifiée par les agents de couplage silaniques par spectroscopie de photons induits par rayons X (XPS)

Appareillage et exploitation des spectres XPS : Les analyses XPS sont réalisées sur un instrument ESCALAB 220i-XL. La source est composée d'une anode en magnésium à 200 W, émettant un rayonnement X monochromatique (raie $K\alpha$ du Mg, $h\nu = 1253,6$ eV). Les photoélectrons proviennent d'une zone de 150 μm de diamètre sur l'échantillon et les spectres haute résolution sont enregistrés en opérant à une énergie de passage de 20 eV, dans l'analyseur (CHA). Les spectres ont été recalés par rapport au carbone C_{1s} pris dans une gamme d'énergie égale à 284,5 eV. Les opérations de désomation des raies d'énergie sont réalisées en utilisant des fonctions combinant des composantes Lorentziennes et Gaussiennes à partir du logiciel V.G Scientific commercial.

Préparation des échantillons : Chaque échantillon de maghémite, floculé à leur PIE, lavé à l'acétone, est placé dans un mortier puis mélangé en présence d'acétone. La dispersion pâteuse est alors étalée sur le portoir. Après l'évaporation complète du solvant, l'échantillon est placé dans l'enceinte sous ultravide. Ce mode de préparation permet d'obtenir une fine couche homogène directement sur le portoir conducteur. Le polyAPS, réduit en poudre, est pressé sur le portoir et retenu par un adhésif en carbone.

Les spectres généraux de la série des maghémites modifiées (Fig. 2.29) montrent une quantité significative de silicium (Si_{2p} à 102,6 eV) et d'azote (N_{1s} vers 400 eV), absents dans la maghémite pure ce qui laisse suggérer la présence d'une fine couche de polysiloxane organofonctionnel sur ces échantillons.

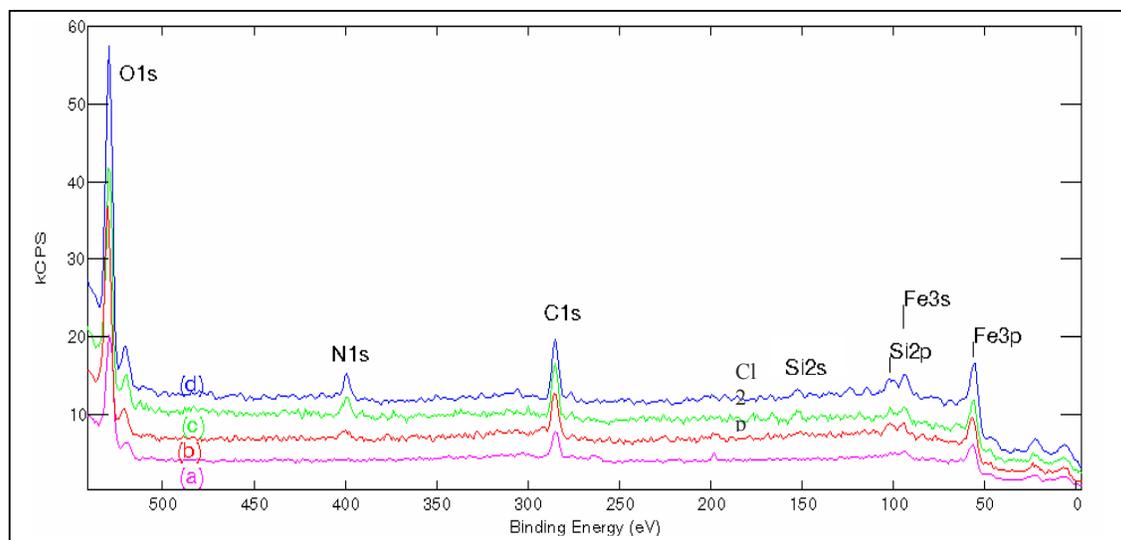


Figure 2.29. Spectres XPS généraux de la maghémite colloïdale (a), de la maghémite modifiée APS (b), EDPS et DTPS (d).

Le tableau 2.7 résume les pourcentages atomiques et énergies de liaison (E_b) des éléments présents à la surface de la maghémite et des maghémites modifiées.

Synthèse et modification chimique de la surface de nanoparticules de maghémite

Exp.	Pic	E_b (eV) \pm 0,2 eV	%[At]	Attributions
EF18 (APS)	Fe2p3	709,8	18,9	Fe ^{III} -O
		528,7		Fe-O-Fe
	O1s	529,5	52,7	Fe-O-Si (*)
		530,5		Si-O-Si
	N1s	398,3	4,2	RNH ₂
		400,2		H...NH ₂ , H...NHR
	C1s	401,4	19,6	RNH ₃ ⁺
284,5		C-C méthyléniques		
Si2p	102,6	4,6	O ₃ Si-C	
EF19 (EDPS)	Fe2p3	710,0	20,9	Fe ^{III} -O
		528,7		Fe-O-Fe
	O1s	529,5	47,7	Fe-O-Si (*)
		530,5		Si-O-Si
	N1s	398,5	6,4	R ₂ NH/RNH ₂
		400,5		H...NH ₂ , H...NHR
	C1s	284,5	21,3	C-C méthyléniques
Si2p	102,6	3,7	O ₃ Si-C	
EF20 (DTPS)	Fe2p3	709,9	22,2	Fe ^{III} -O
		528,8		Fe-O-Fe
	O1s	529,6	49,8	Fe-O-Si (*)
		530,6		Si-O-Si
	N1s	398,5	6,3	R ₂ NH/RNH ₂
		400,5		H...NH ₂ , H...NHR
	C1s	284,5	19,2	C-C méthyléniques
Si2p	102,6	2,5	O ₃ Si-C	
FF10 (γ Fe ₂ O ₃)	Fe2p3	710,0	14,2	Fe ^{III} -O
	O1s	529,0	45,9	Fe-O-Fe
		532,2		C=O (pollution)
	C1s	284,5	36,4	C-C (alkyle)
		288,9		COOR (pollution)
Cl2p	198,4	3,5	Fe-Cl (impuretés)	
PolyAPS	Si2p	102,6	12	O ₃ Si-C
	O1s	530,6	24,1	Si-O-Si
		532,4		Si-O ⁻ -H ₃ ⁺ NR / H...NH ₂ , H...NHR
	N1s	398,6	10,0	RNH ₂
		400,2		Liaisons H
C1s	401,3	52	RNH ₃ ⁺	
		284,5		C-C méthyléniques

Tableau 2.7. Pourcentages atomiques et énergies de liaison (E_b) des éléments présents à la surface de la maghémite et des maghémites modifiées. Ces valeurs sont obtenues par intégration des raies XPS les plus intenses du spectre général. (*) Hypothétique.

a. Analyse des témoins

- γ Fe₂O₃ (exp. FF10) : La maghémite présente une contamination de surface résultant essentiellement de l'adsorption carbonée lors du séchage sous air. Une faible quantité de chlore résiduelle provenant des sels précurseurs est aussi observée. Ces impuretés avaient déjà été mises en évidence par spectrométrie de masse (Chap. II § 1.4.1b).

Le pic d'émission Fe2p₃ à 710,0 eV est attribué aux liaisons Fe-O-Fe du réseau^{57,63-64}. Le dédoublement du pic O1s en deux raies à 529,0 et à 532,2 eV correspond aux liaisons Fe-O du réseau et aux formes oxydées de carbones de pollution.

- **PolyAPS** : On observe sur le spectre XPS général les 4 éléments constituant le polysiloxane issu de la polycondensation de l'APS. Le pic O1s présente deux composantes à 530,6 et 532,4 eV : la première correspond aux liaisons siloxane issues de la condensation des silanols ; la raie à 532,4 eV représente les interactions mettant en jeu le transfert du proton d'un silanol vers une amine (SiO⁻...H...NH₂⁺R).

La désommission de la raie N1s (Fig 2.30) peut se faire en trois composantes distinctes centrées à 398,6, 400,2 et 401,3 eV indiquant trois environnements différents pour l'azote : la première correspond à l'amine primaire libre, la seconde est attribuée aux liaisons hydrogène avec les silanols et la dernière aux groupements amine protonés⁵⁷.

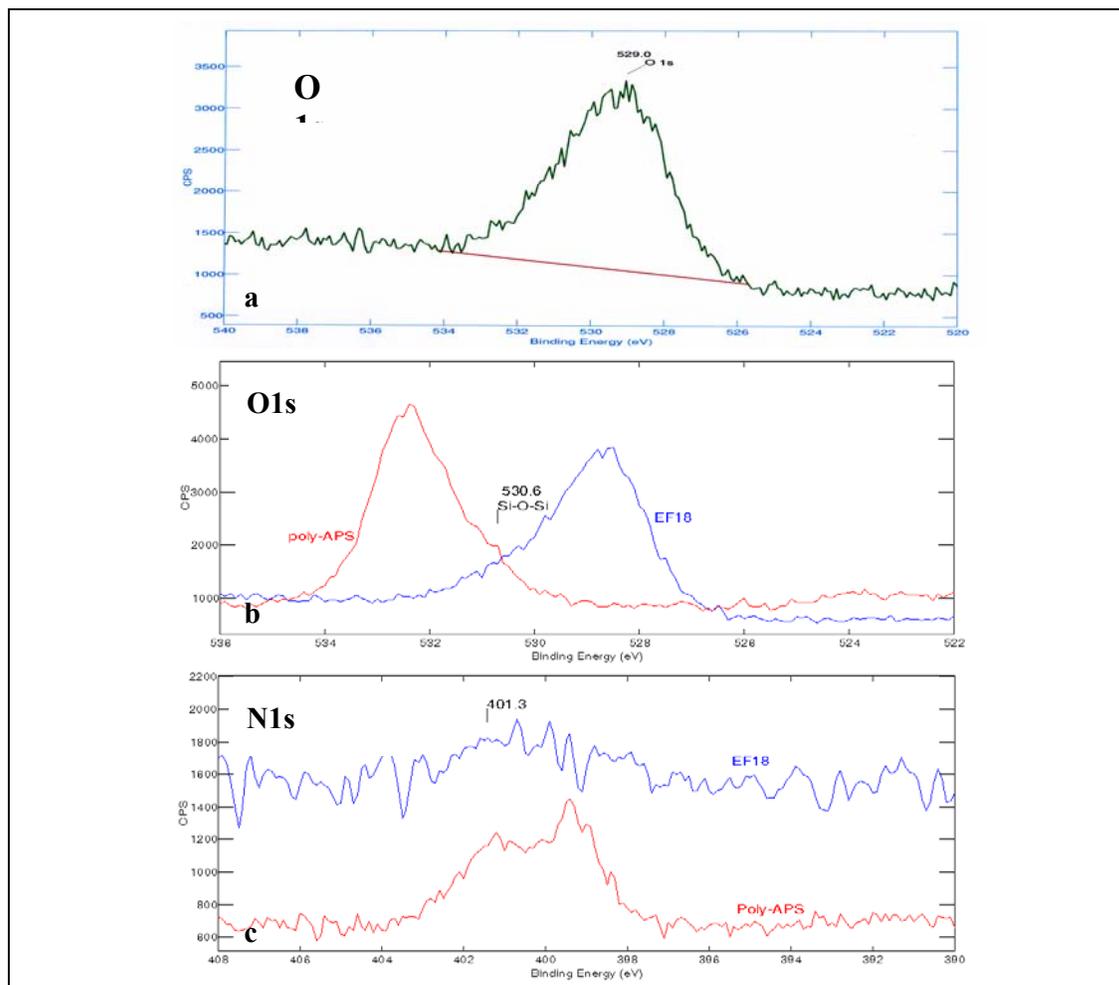


Figure 2.30. Spectres XPS des témoins : (a) O1s de la maghémite de référence ; (b) O1s du polyAPS superposé à celui de la maghémite modifiée APS ; (c) N1s du polyAPS comparé au spectre N1s de la maghémite modifiée APS.

Le spectre Si2p du silicium est centré sur 102,6 eV. Il peut être attribué aux liaisons de type O₃Si-C⁸³. Le carbone présente un pic C1s à 284,5 eV provenant des liaisons entre les groupes méthyléniques. Le pourcentage atomique du carbone, qui devrait être trois fois celui du silicium ou de l'azote, est surestimé du fait d'une probable pollution de l'échantillon. Le rapport Si/N est proche de 1 ce qui indique que les groupes aminopropyle n'ont subi aucune détérioration lors de la polycondensation. Pour que l'APS soit totalement condensé, il faut un rapport O/Si égal à 1,5 or ici il est égal à 2. Cela montre que 2 silanols sur 3 se sont condensés pour former des liaisons siloxane.

b. Analyse des échantillons de maghémite modifiées APS, EDPS et DTPS.

Les échantillons de maghémite modifiée par les silanes sont faiblement contaminés et aucun signal du Cl2p n'est observé sur le spectre XPS général. Dans tous les cas, le fer est détecté ce qui indique que l'épaisseur de la couche polysiloxane est inférieure à la profondeur analysée, de l'ordre de 30 à 50 Å (distance correspondant au libre parcours moyen des électrons), conditionnée par le libre parcours moyen des électrons. Néanmoins, le pourcentage de Fe diminue lorsque la longueur de la chaîne aminoalkyle du silane augmente, ce qui montre que l'épaisseur du film polysiloxane issu de la condensation de l'APS, est plus épais que ceux issus de l'EDPS et du DTPS. Le tableau 2.8 indique les rapports des éléments détectés à la surface des produits greffés.

Exp.	C/Si	N/Si	C/N	Si/Fe
EF18 (APS)	4,26 (3)	0,91 (1)	4,66 (3)	0,24
EF19 (EDPS)	5,75 (5)	1,73 (2)	3,33 (2,5)	0,18
EF20 (DTPS)	7,68 (7)	2,52 (3)	3,05 (2,33)	0,11

Tableau 2.8. Rapports des aires sous pic obtenus par intégration des raies Fe2p₃, O1s, N1s, C1s et Si2p du spectre XPS général. () Ratios stœchiométriques du silane pur.

Les valeurs des rapports C/Si, N/Si et C/N sont proches des rapports stœchiométriques du silane pur ce qui indique que les groupes aminoalkyles n'ont pas été altérés par le procédé de couplage.

Les rapports Si/Fe rendent compte du taux de greffage des organosilanes à la surface de la maghémite et confirment les résultats obtenus par ATG ($d_{APS} > d_{EDPS} > d_{DTPS}$). En effet

les ratios Si/Fe coïncident avec les rapports des densités surfaciques de greffage mesurées par ATG (tableau 2.9). Ce résultat est directement lié à l'encombrement stérique des organosilanes qui se différencie seulement par la longueur de la chaîne aminoalkyle.

XPS			ATG		
$\frac{\text{Si/Fe(APS)}}{\text{Si/Fe(EDPS)}}$	$\frac{\text{Si/Fe(APS)}}{\text{Si/Fe(DTPS)}}$	$\frac{\text{Si/Fe(EDPS)}}{\text{Si/Fe(DTPS)}}$	$\frac{d_{\text{APS}}}{d_{\text{EDPS}}}$	$\frac{d_{\text{APS}}}{d_{\text{DTPS}}}$	$\frac{d_{\text{EDPS}}}{d_{\text{DTPS}}}$
1,33	2,18	1,64	1,53	2,14	1,40

Tableau 2.9. Comparaison des proportions d'agents silaniques greffés à la surface de la maghémite, évalué par XPS et par ATG.

- **Fe2p₃.** Les 3 échantillons présentent un pic Fe2p₃ vers 710 eV provenant des liaisons Fe-O-Fe du réseau de maghémite.

- **Si2p.** Chaque échantillon (sauf le FF10) présente un pic à 102,6 eV correspondant aux liaisons Si O₃C⁸³.

- **O1s.** Pour chaque échantillon, les raies ont été désommées en trois composantes (Fig. 2.31). L'une à 528,7eV, proche du spectre O1s de la maghémite de référence, est attribuée aux liaisons Fe-O-Fe du réseau de maghémite. La deuxième à 530,6 eV se situe au niveau de l'épaule de cette raie. Comparé au spectre O1s du polyAPS (Fig. 2.30b), on observe que ces deux raies possèdent une composante commune à 530,6 eV correspondant aux liaisons Si-O-Si.

Pour améliorer l'ajustement du profil des raies O1s, on envisage une troisième composante, intermédiaire, à 529,5 eV, qui correspondrait aux liaisons Fe-O-Si. Cette hypothèse avait déjà été émise par Turner *et al.*⁸⁴ dans le cas de poudres d'oxyde de zirconium modifiées par le γ -métacryloxypropyltriméthoxysilane pour identifier les liaisons Zr-O-Si.

On peut noter l'absence de la raie correspondant aux liaisons Si-O⁻ à 532,4 eV observée pour le polyAPS (Fig. 2.30b). Cette absence de groupes Si-O⁻, issus de la déprotonation des silanols résiduels, montre que le film polysiloxane est bien condensé.

Le tableau 2.10 rassemble les proportions respectives des différentes composantes, exprimées par les rapports de leur aire sous pic. On peut noter que la composante intermédiaire (Fe-O-Si) du produit EF20 a tendance à s'écrouler tandis que les deux autres restes stables. Les rapports des aires des pics Si-O-Si/Fe-O-Fe sont comparables aux rapports Si/Fe. Ce résultat montre que les attributions sont correctes et que la contribution des liaisons

Fe-O-Si est dérisoire pour chaque échantillon, du fait de la faible quantité de silane condensé à la surface de la maghémite.

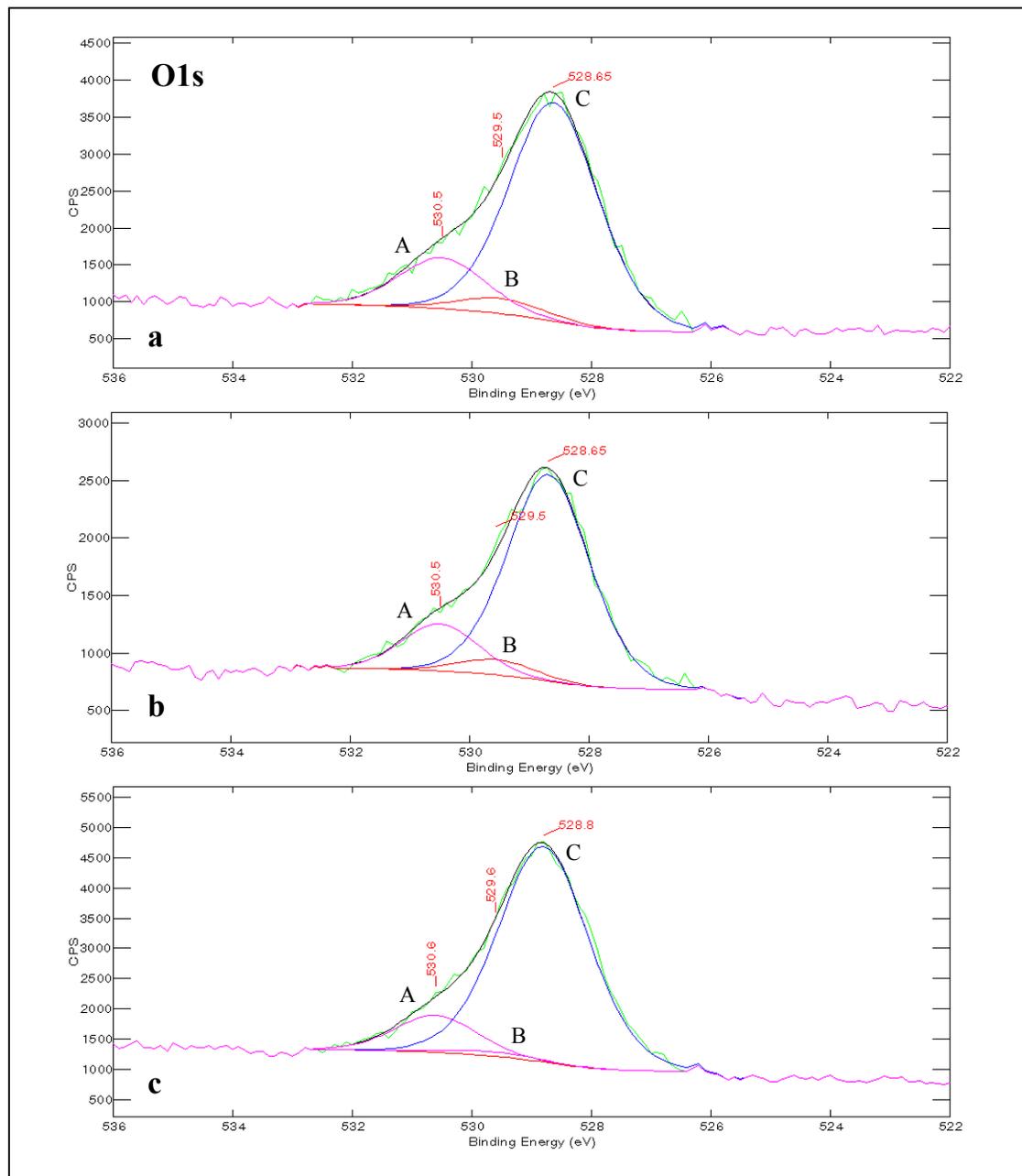


Figure 2.31. Spectres XPS O1s de la maghémite modifiée (a) APS, (b) EDPS et (c) DTPS (expériences EF18, EF19 et EF20).

Cette hypothèse est confirmée par les valeurs des aires des pics Fe-O-Si. Néanmoins, en comparant le poids de ces liaisons par rapport à la totalité des liaisons Si-O-M ($B/(A+B)$), on peut constater que la contribution des liaisons Fe-O-Si atteint 23 à 25% pour l'APS et l'EDPS et seulement 11% pour le DTPS. La faible contribution pour le DTPS peut s'expliquer par le fort encombrement stérique développé par le groupe N'-(β -aminoéthyl)-N-

(-(β -aminoéthyl)- γ -aminopropyle diminuant la densité surfacique de greffage de façon significative.

Exp.	pic	E_b (eV)	aire	B/(A+B)	A/C	Si/Fe
EF18 (APS)	A (Si-O-Si)	530,5	1224			
	B (Si-O-Fe)	529,5	373	0,23	0,22	0,24
	C (Fe-O-Fe)	528,6	5459			
EF19 (EDPS)	A (Si-O-Si)	530,5	638			
	B (Si-O-Fe)	529,5	212	0,25	0,20	0,18
	C (Fe-O-Fe)	528,7	3162			
EF20 (DTPS)	A (Si-O-Si)	530,6	1022			
	B (Si-O-Fe)	529,6	124	0,11	0,15	0,11
	C (Fe-O-Fe)	528,8	6721			

Tableau 2.10. Positions et valeurs des aires des composantes issues de la désomation des pics O1s des maghémites modifiées. Les ratios B/B+A et A/C donnent une indication sur le poids des quantités respectives Si-O-Fe et Si-O-Si par rapport à Si-O-Si et Fe-O-Fe.

• **N1s.** La désomation des spectres XPS N1s (Fig. 2.32) des produits EF19 et EF20 conduit à deux composantes distinctes situées à 398,5 et 400,5 eV. La première correspond à la forme amine libre, primaire ou secondaire⁵⁷. La deuxième composante est attribuée à l'existence de liaisons hydrogène qui peuvent s'établir avec les hydroxyles de surface ou des silanols libres. Pour le produit EF18, on doit envisager une troisième composante de plus forte énergie, à 401,4 eV, qui peut être attribuée à la forme protonée de l'amine primaire. Le pic N1s de l'EF18 est plus large que celui de l'EF19 et de l'EF20. L'élargissement de ce pic est dû aux interactions des amines avec la surface de la maghémite et le film polysiloxane. On peut noter que les trois composantes du polyAPS (Fig. 2.30c) coïncident avec celles du produit EF18 ce qui confirme ces attributions.

Le tableau 2.11 indique les positions et les proportions de chaque composante des pics N1s de ces trois produits. De part la nature basique des fonctions amines, les proportions d'amine libre ($-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}$), de liaisons hydrogène ($\text{H}\dots\text{NH}_2$, $\text{H}\dots\text{NHR}$) ou de forme protonée ($-\text{NH}_3^+$, $-\text{RNH}^+$) varient avec le pH. Dans le cas présent tous les produits ont été préparés au pH naturel des aminosilanes (i.e 10,4). La forme amine libre devrait donc être prépondérante avec celle qui met en jeu des liaisons hydrogène. C'est ce que l'on observe effectivement pour les produits EF19 et EF20 pour lesquels la proportion d'amine libre correspond à 70 et 75% respectivement. La forte proportion de liaisons hydrogène laisse

suggérer que les amines n'interagissent pas seulement avec des silanols résiduels ou des molécules d'eau présentes dans le film polysiloxane, mais aussi avec des groupes hydroxyle de surface (FeOH).

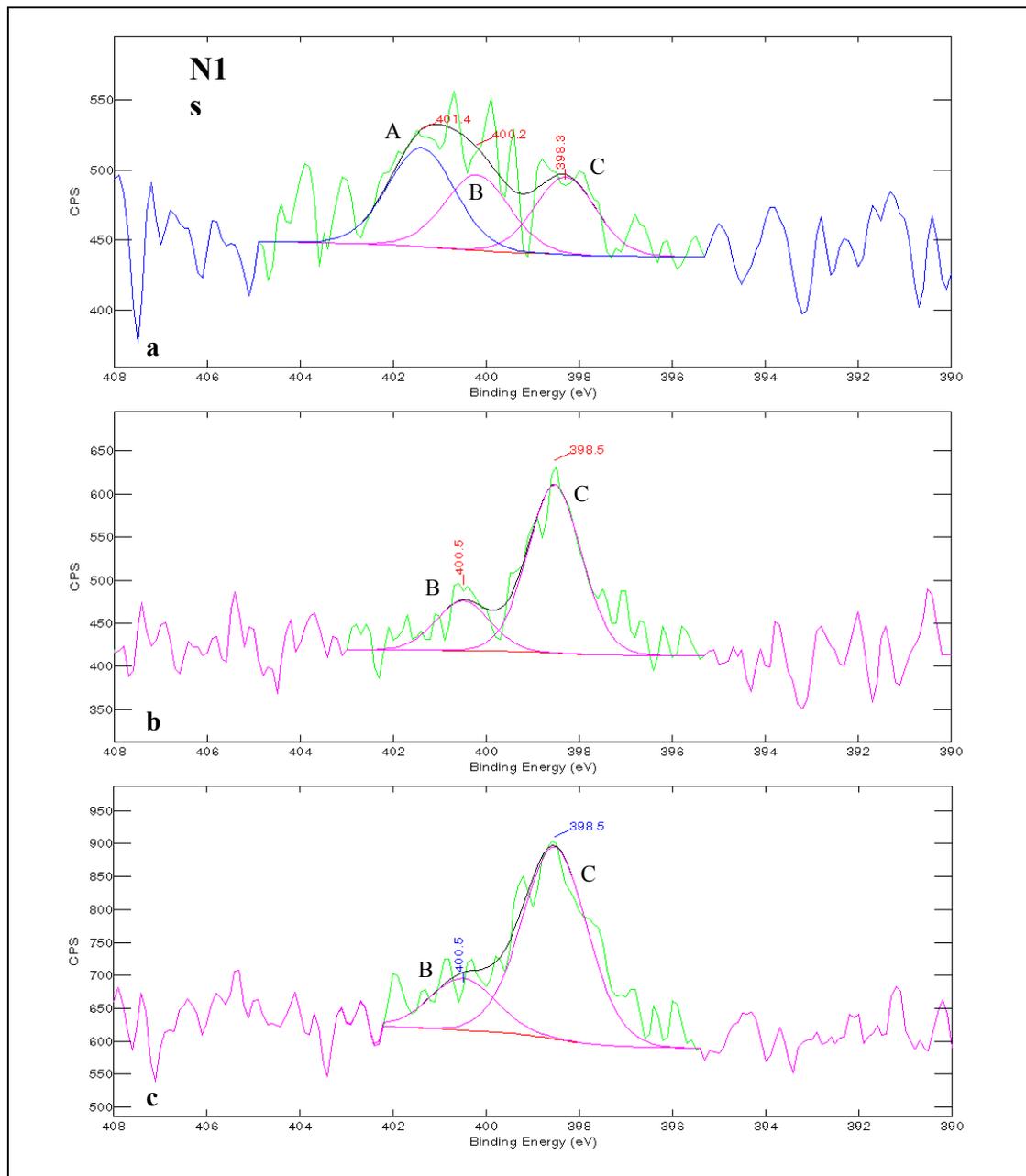


Figure 2.32. Spectres XPS N1s de la maghémite modifiée (a) APS, (b) EDPS et (c) DTSPS (expériences EF18, EF19 et EF20).

Dans le cas de la maghémite greffée par l'APS, on retrouve la même proportion de liaisons hydrogène (i.e 30%), par contre les amines libres ne représentent plus que 30%, la forme protonée contribuant pour 40% des amines totales. L'absence de la raie O1s, correspondant aux ions Si-O⁻, nous suggère que les ions ammonium interagissent

principalement avec les charges négatives de surface de la maghémite. Le fait que les transferts de protons menant aux ammoniums ne soient observés que dans le cas de l'APS, peut s'expliquer par la forme cyclique que peut adopter l'APS (Fig. 2.3). En outre, l'APS présente une quantité d'amine, susceptible d'interagir avec un silanol, plus faible par rapport à l'EDPS et au DTSPS, d'autant plus que l'on n'observe pas de cyclisation pour ces deux agents de couplage silaniques. Le pourcentage d'amines protonées est donc potentiellement plus élevé dans le cas de l'EF18.

Exp.	pic	E_b (eV)	aire	B/(B+C)	A/(A+B+C)	B/(A+B+C)
EF18 (APS)	A (RNH_3^+)	401,4	129			
	B (Liaisons H)	400,2	96	-	0,40	0,30
	C (RNH_2)	398,3	93			
EF19 (EDPS)	B (Liaisons H)	400,5	85			
	C ($\text{R}_2\text{NH}/\text{RNH}_2$)	398,5	285	0,30	-	-
EF20 (DTSPS)	B (Liaisons H)	400,5	129			
	C ($\text{R}_2\text{NH}/\text{RNH}_2$)	398,5	517	0,25	-	-

Tableau 2.11. Positions et valeurs des aires des composantes issues de la désomation des pics N1s des maghémites modifiées. Les ratios B/(B+C), B/(A+B+C) et A/(A+B+C) donnent une indication sur les proportions des différentes liaisons mises en jeu avec les amines.

c. Conclusions.

Cette étude XPS a permis de confirmer les résultats obtenus par d'autres méthodes de caractérisation comme l'ATG, la spectrométrie DRIFT ou les mesures de potentiel zêta. La densité de greffage dépend directement de la longueur de la chaîne aminoalkyle. L'analyse de la surface a confirmé la présence des couches polysiloxanes et le fait que le procédé n'ait pas affecté les chaînes organofonctionnelles.

L'examen des différents profils d'énergie de liaison, selon la position et la quantification de leurs composantes, a permis de déterminer les environnements des éléments constituant le film polysiloxane à la surface de la maghémite. Comme on a pu l'observer lors de l'étude du comportement des sols colloïdaux des maghémites modifiées, ou lors de la caractérisation de la surface par DRIFT, les amines interagissent sous différentes formes (protonées, liaisons hydrogène) avec la surface de la maghémite mais aussi avec le film polysiloxane. L'analyse des pics N1s a montré que l'APS développe davantage d'interactions avec la surface que les autres agents de couplage. Dans tous les cas, on note cependant une quantité importante d'amines libres. Celles-ci se dirigent vers l'extérieur du film polysiloxane, car elles ne subissent aucune interaction. Ce sont ces amines libres situées à la surface du film polysiloxane, qui conditionnent la valeur des PIE (10-10,4) des maghémites greffées. Dans le

cas de l'expérience EF11, la valeur du PIE, évaluée à pH 8,5, montre que la majorité des amines interagissent par liaisons hydrogène ou ioniques avec la surface de la maghémite ou les groupes silanols. Le traitement thermique sous vide a permis d'améliorer le taux de polycondensation du film polysiloxane et de diminuer le nombre d'interactions des hydroxyles de surface de la maghémite avec les amines, d'où le déplacement du PIE vers le pK_a des amines.

Lors de l'analyse des raies O1s, nous avons évoqué la possibilité de l'existence d'une liaison Fe-O-Si qui entrerait sous la forme d'une troisième composante entre celle des liaisons Si-O-Si et celle des liaisons Fe-O-Fe. Même si les résultats semblent cohérents, pour valider cette hypothèse, il faudrait confirmer la position de la raie Fe-O-Si par un témoin, par exemple, un silicate ferrique.

Dans le but de compléter cette étude, on peut aussi évaluer la proportion d'ions ammonium par rapport aux amines libres en analysant des échantillons préparés à différents pH. La condensation des silanols avec les hydroxyles de la surface d'oxyde de fer pourra être aussi optimisée par une étude en fonction de la température ou du temps de traitement thermique sous vide.

La figure 2.34 donne une représentation schématique des liaisons entre le film polysiloxane, issu de la condensation de l'APS, et la surface de la maghémite, qui sont susceptibles d'être mises en jeu, d'après cette étude.

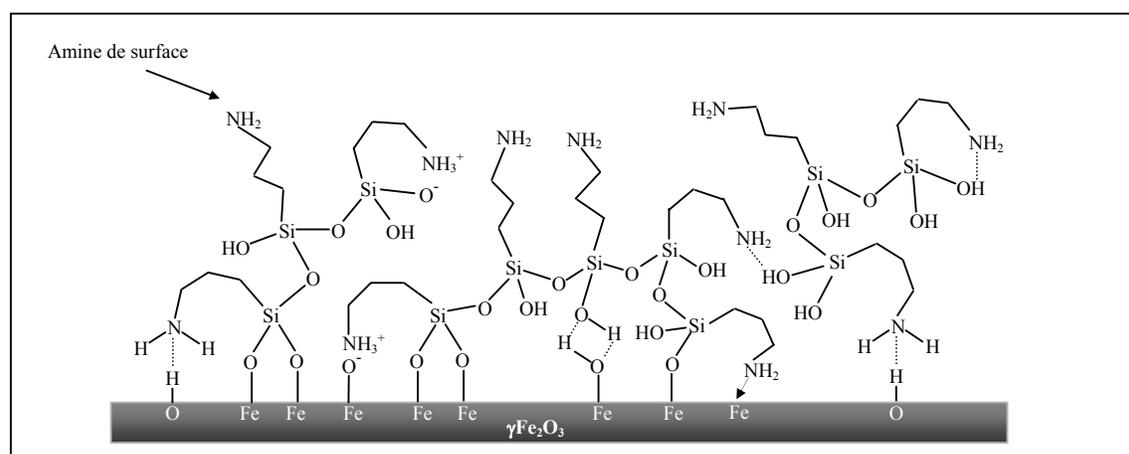


Figure 2.33. Représentation schématique des interactions envisageables entre le film polyAPS et la surface de la maghémite. On retrouve notamment, la situation normale de couplage à la surface avec la formation d'une liaison Fe-O-Si ; la situation où le greffage se fait par adsorption d'un groupe amine protoné ; la forme cyclique de l'APS, lorsque le bras aminopropyle se retourne pour former des liaisons hydrogènes, ou ioniques avec un silanol.

2.3.7 Etude par Spectroscopie Mössbauer des nanoparticules modifiées par l'APS

a. Partie expérimentale

Les études par spectroscopie Mössbauer ont été réalisées sur 2 échantillons de maghémite modifiée et sur la maghémite pure :

- ✓ L'échantillon FF10 : γ Fe₂O₃ (m \approx 100 mg)
- ✓ L'échantillon EF11 : γ Fe₂O₃ + APS (m = 124,6 mg)
- ✓ L'échantillon EF18 : γ Fe₂O₃ + APS déshydraté (m = 125,4 mg)

L'appareillage utilisé est un spectromètre de type HALDER à accélération constante mettant en œuvre une source de ⁵⁷Co (matrice de Rhodium) à température ambiante. Les échantillons, finement broyés, contiennent en moyenne 10 mg de fer par cm². Pour ces concentrations, les effets d'élargissement des raies peuvent être négligés. Les spectres ont été enregistrés à 293 K et à 4,2 K en utilisant un cryostat à hélium liquide.

Le calcul des spectres a été réalisé à l'aide d'un programme permettant de dépouiller les spectres en terme de distribution de paramètres hyperfins P(Δ) et P(B) par la méthode de Hesse et Rubartsch⁸⁵. Cette méthode est souvent utilisée pour des composés désordonnés pour lesquels il existe une large distribution d'environnements possibles qui se traduit sur le spectre expérimental par des raies de largeur importante, et dont la forme peut s'écarter d'un profil lorentzien.

Pour ce calcul, on fixe la largeur de la raie à mi-hauteur Γ à la valeur comprise entre 0,40 et 0,30 mm.s⁻¹. Les déplacements isomériques δ utilisés sont ceux déduits des travaux antérieurs sur la maghémite⁸⁶. A partir du spectre expérimental, une distribution d'éclatements quadrupolaires P(Δ) ou une distribution de champs hyperfins P(B) est alors extraite pour chaque type de fer, ce qui permet de calculer des paramètres moyens de Δ ou de B. Les pourcentages relatifs sont affinés pour chaque distribution étudiée. Les déplacements isomériques sont rapportés au fer α à 293 K.

b. Analyse à 4,2 K

La figure 2.34, montre les spectres Mössbauer expérimentaux, obtenus à T = 4,2 K, pour les trois échantillons étudiés.

Tous les spectres ne présentent qu'un seul sextuplet. En effet, en dessous de la température de Néel, les sites A et B ne sont pas discernables^{87,88}. Cependant, il serait possible de séparer les contributions des deux sous-réseaux en appliquant un champ magnétique externe⁸⁹. La comparaison des spectres expérimentaux montre que seule la maghémite apparaît magnétiquement ordonnée totalement. En effet, pour les deux échantillons correspondant à la maghémite modifiée, en plus du sextuplet, une composante supplémentaire non magnétiquement ordonnée apparaît au centre du spectre. Celle ci reste toutefois de très faible amplitude.

Dans le cas présent, en absence de champ magnétique, le meilleur affinement obtenu sur la base de raies de profil lorentzien, pour les trois échantillons étudiés, montre que le fer correspond à du fer trivalent en site octaédrique.

A partir de cet affinement, nous pouvons noter la forte évolution des largeurs de raies entre la maghémite pure et la maghémite greffée. Cet effet pourrait être la signature d'une modification importante des divers sites du fer. Le tableau 2.12 donne, à titre de comparaison, la largeur des raies 1 et 6 du sextuplet pour l'ensemble des échantillons analysés.

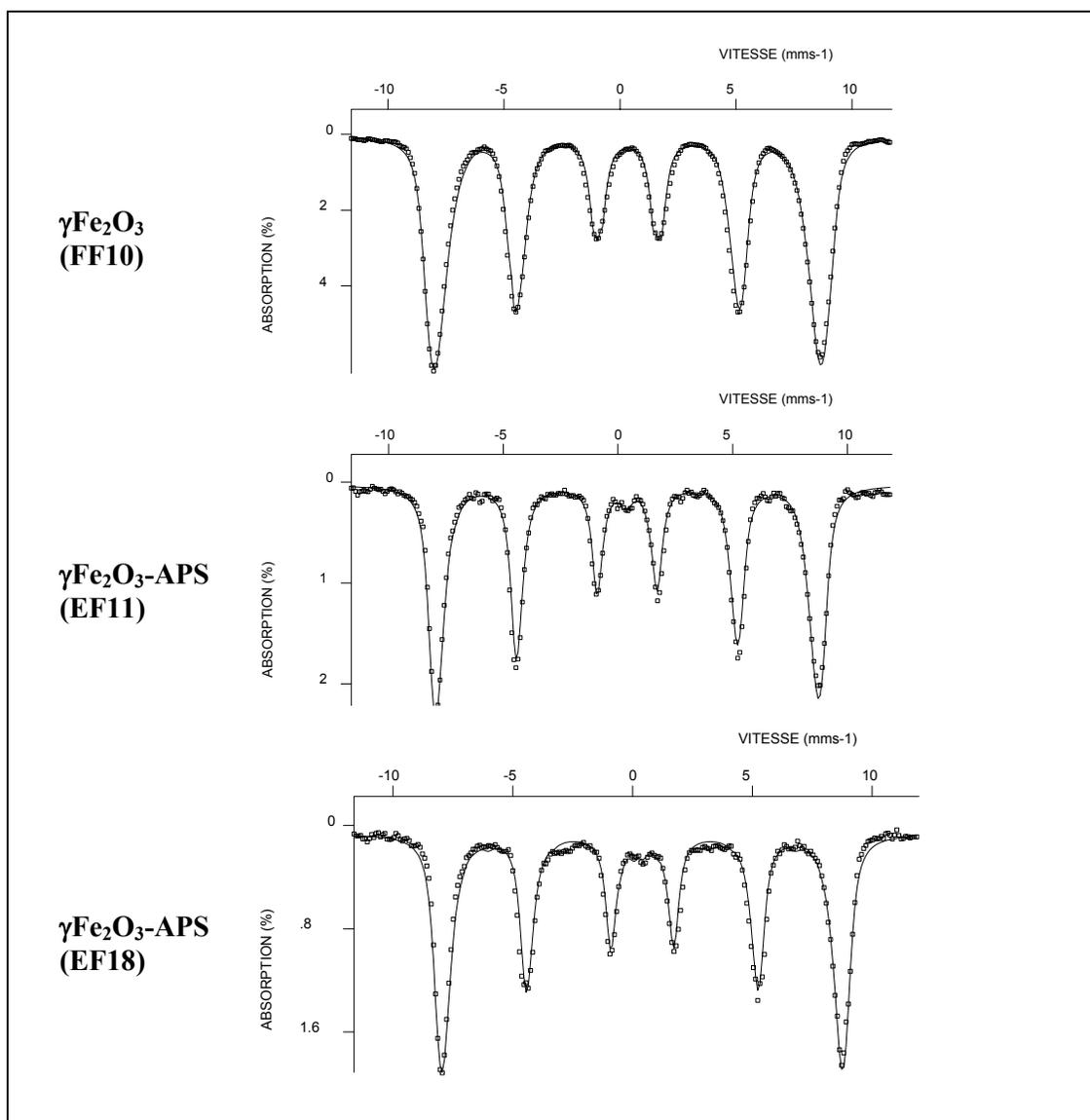


Figure 2.34. Spectres Mössbauer expérimentaux et calculés à $T = 4,2$ K des échantillons FF10 ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$), EF11 et EF18 ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ -APS avant et après déshydratation).

Composé	Γ_1 (mm.s ⁻¹)	Γ_6 (mm.s ⁻¹)
γ Fe ₂ O ₃ (FF10)	1,04	1,17
EF11	0,66	0,84
EF18	0,64	0,84

Tableau 2.12. Largeurs des raies externes des spectres Mössbauer expérimentaux

Sur la base de cette hypothèse et au regard des spectres expérimentaux, plusieurs affinements ont été entrepris en considérant une, deux ou trois distributions de champs hyperfins associées, dans le cas des deux échantillons correspondant à la maghémite modifiée, à une distribution d'éclatements quadrupolaires. Le meilleur affinement (cf. Fig. 2.35) a été obtenu en tenant compte de deux distributions de champs hyperfins pour la maghémite et de deux distributions de champs hyperfins associées à une distribution d'éclatements quadrupolaires pour les composés EF11 et EF18.

Les paramètres Mössbauer, déterminés à partir de cet affinement, sont reportés dans le tableau suivant :

Composé	DIS	δ (mm.s ⁻¹)	Γ (mm.s ⁻¹)	ε (mm.s ⁻¹)	Δ (mm.s ⁻¹)*	B* (Tesla)	% *
FF10 γ Fe ₂ O ₃	H1	0,43	0,40	-0,100	-	51,3	47
	H2	0,35	0,40	+0,100	-	51,7	53
EF11 γ Fe ₂ O ₃ -APS	H1	0,48	0,40	-0,003	-	52,5	43
	H2	0,42	0,40	+0,001	-	51,3	55
	Δ 1	0,40	0,40	-	0,88	-	2
EF18 γ Fe ₂ O ₃ -APS déshydraté	H1	0,48	0,40	-0,003	-	52,0	86
	H2	0,42	0,40	+0,001	-	49,2	12
	Δ 1	0,30	0,40	-	0,72	-	2

Tableau 2.13. Paramètres Mössbauer issus des spectres expérimentaux et calculés (* paramètres affinés).

La figure 2.35 représente la population des diverses distributions de champs hyperfins et d'éclatements quadrupolaires pour les différents échantillons étudiés. L'existence pour les échantillons de maghémite modifiée d'une distribution d'éclatements quadrupolaires peut être la signature de la formation après greffage de grains fins pour lesquels l'ordre magnétique à T = 4,2 K ne peut pas être encore obtenu totalement.

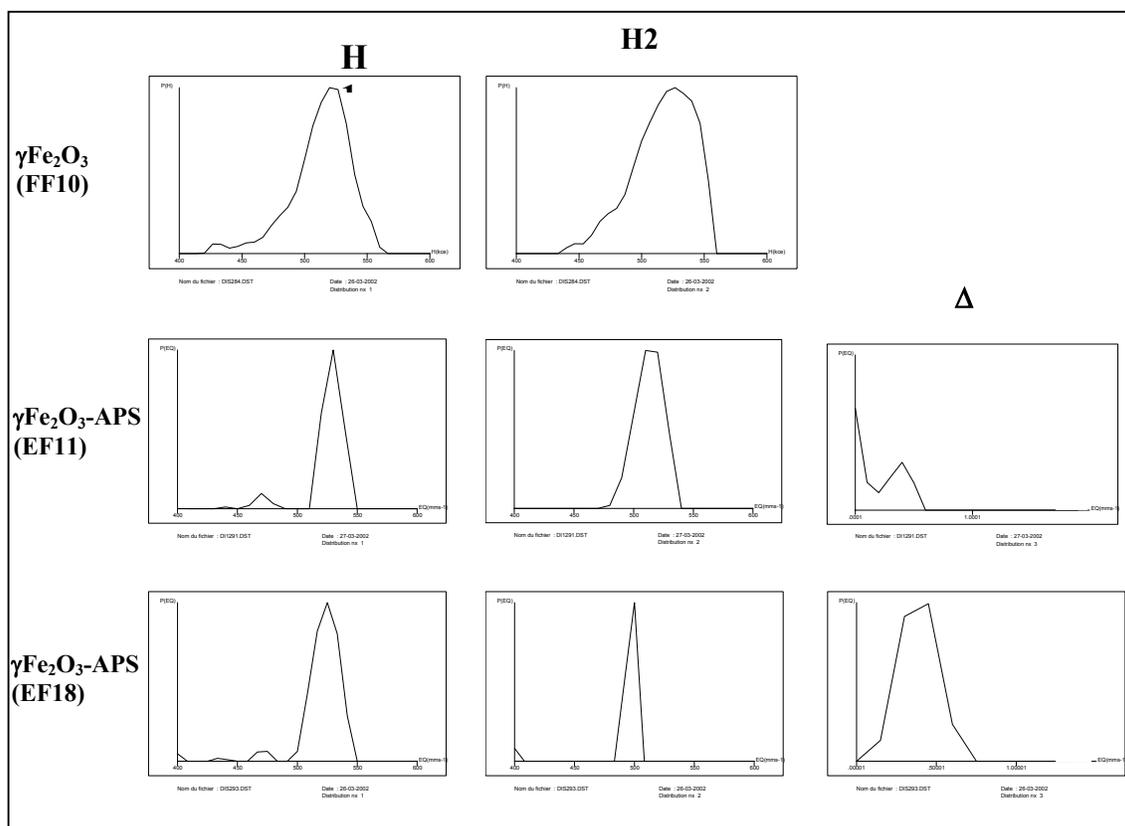


Figure 2.35. Population des distributions de champ hyperfins (H1 et H2) et d'éclatements quadrupolaires des trois échantillons FF10, EF11 et EF18.

Pour la maghémite, les deux distributions, H1 et H2, caractérisées par des valeurs de champ hyperfin moyen très proches et des populations pratiquement égales (47%/53%), sont très semblables. Elles possèdent, de plus, un profil assez large.

Pour les échantillons greffés, des variations peuvent être notées. Celles ci rendent compte de modifications plus ou moins prononcées des sites du fer. Ainsi pour l'échantillon EF11, les modifications restent assez peu importantes et le ou les sites du fer semblent proches de ceux déterminés pour la maghémite avant greffage. La valeur moyenne du champ hyperfin pour les deux distributions sont similaires à celles trouvées dans le cas de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$. Les valeurs de la population de chaque distribution H1(43%) et H2 (55%) sont du même ordre de grandeur. Toutefois, l'amplitude de chaque distribution est beaucoup plus faible, ce qui pourrait rendre compte de l'évolution d'une distribution continue vers une distribution discrète.

En revanche dans le cas de l'échantillon EF18, les modifications sont plus importantes vis-à-vis de la maghémite mais également vis-à-vis de l'échantillon EF11. Le champ de la seconde distribution H2 (49,2 T) est plus faible. Mais ce qui est le plus marquant est le changement survenant dans les populations des deux distributions de champs hyperfins. La

seconde distribution semble disparaître au profit de la première. Cette modification est le reflet d'un changement notable des interactions magnétiques entre le noyau de fer observé et ses proches voisins. La nature et/ou le greffage pourrait être à l'origine de cette modification. Pour cet échantillon, la largeur de la seconde distribution est très faible, assimilable à un site discret.

L'ensemble de ces résultats est en parfait accord avec l'évolution des largeurs de raies constatée lors de l'affinement des spectres expérimentaux obtenu sur la base de raies de profil lorentzien (voir Tab.2.12).

c. Analyse à 293 K

La figure 2.36 représente les spectres expérimentaux et calculés des trois échantillons étudiés à $T = 293\text{K}$.

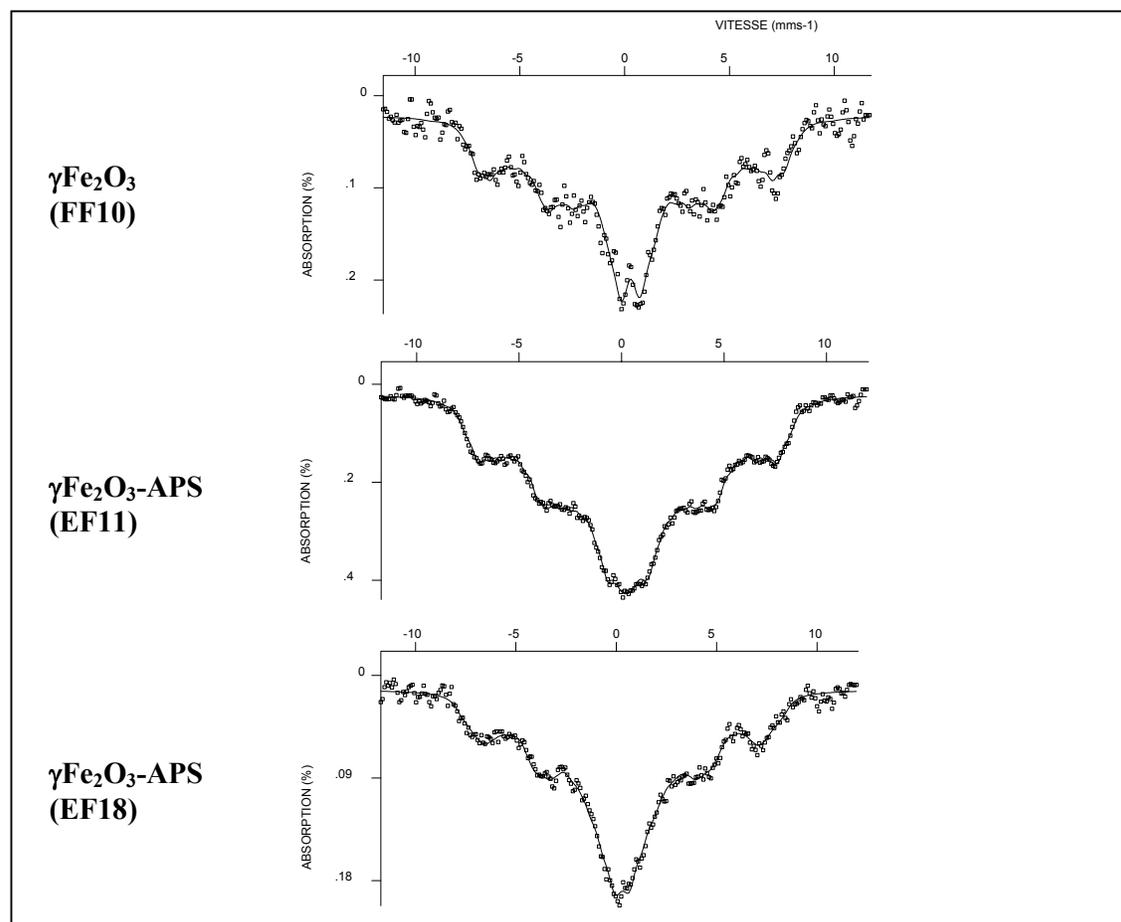


Figure 2.36. Spectres Mössbauer expérimentaux et calculés, des échantillons FF10, EF11 et EF18, obtenus à $T = 293\text{ K}$

Quel que soit l'échantillon analysé les spectres expérimentaux laissent apparaître deux composantes : l'une magnétiquement ordonnée, décrite par la présence d'un sextuplet mal

défini et une seconde, non magnétiquement ordonnée, matérialisée au centre du spectre par un doublet paramagnétique plus ou moins bien défini. Ainsi, l'allure des spectres Mössbauer est liée à l'apparition d'un phénomène de relaxation, dû vraisemblablement à une répartition plus ou moins homogène de la taille de grains qui s'ordonnent ou non en fonction de leur longueur de cohérence. En effet, les particules de plus grande taille ($d_n > 10$ nm) ne sont plus monodomaines. Les trois échantillons sont donc composés, à température ambiante, d'un mélange de nanoparticules superparamagnétiques et ferrimagnétiques.

A partir des spectres obtenus à $T = 4,2$ K et en tenant compte de l'effet Doppler du second ordre pour évaluer les déplacements isomériques à 293 K, un affinement a été réalisé sur la base d'une distribution de champs hyperfins associée à une distribution d'éclatements quadrupolaires. Le résultat de ce calcul est reporté dans le tableau 2.14.

Composé	DIS	δ (mm.s ⁻¹)	Γ_i (mm.s ⁻¹)	ε (mm.s ⁻¹)	Δ (mm.s ⁻¹)*	B* (T)	% *
FF10 γ Fe ₂ O ₃	H1	0,36	0,40	-0,003		31,4	87
	Δ 1	0,33	0,40	-	0,30	-	13
EF11 γ Fe ₂ O ₃ -APS	H1	0,36	0,40	-0,003		33,6	80
	Δ 1	0,33	0,40	-	0,83	-	20
EF18 γ Fe ₂ O ₃ -APS déshydraté	H1	0,36	0,40	-0,003		29,6	81
	Δ 1	0,30	0,40	-	0,61	-	19

Tableau 2.14. Paramètres Mössbauer déterminés à $T = 293$ K pour l'ensemble des échantillons (* paramètres affinés)

La qualité des spectres ne nous permet pas de dégager de réelles évolutions entre les divers composés. Toutefois, nous pouvons noter :

- une légère diminution de population de la distribution (H1) de champs hyperfins entre la maghémite avant et après greffage. Cela pourrait être lié à la présence de grains plus fins dans le cas des composés greffés,
- l'augmentation de la valeur moyenne de la distribution (Δ 1) enregistrée pour les échantillons greffés, rend compte d'une augmentation de la distorsion de l'octaèdre autour du fer attribuable à la composante du champ électrique générée par les proches voisins. Cet effet semble plus marqué pour le composé EF11,
- quel que soit l'échantillon, aucun changement significatif du champ hyperfin moyen n'a été observé.

d. Discussions

L'interprétation des spectres expérimentaux des échantillons étudiés est rendue difficile du fait de la superposition de plusieurs phénomènes. Les effets de distribution de volume des particules, la forte contribution des atomes de surface dont les propriétés magnétiques diffèrent de celles des atomes internes, la présence d'une couche de passivation non magnétique, l'état de dispersion des nanoparticules et les effets de surface générés par la modification par l'APS, mettent en jeu un trop grand nombre de paramètres et rendent l'interprétation délicate. Néanmoins, en utilisant la maghémite non modifiée comme témoin et en se limitant à un modèle constitué d'un seul type de site (fer trivalent en site octaédrique), nous avons pu calculer les spectres en accord avec les points expérimentaux mesurés à basse température et ainsi dégager quelques évolutions au niveau des paramètres Mössbauer.

Les paramètres Mössbauer (δ , Δ , ϵ), les valeurs des populations ainsi que les largeurs des distributions en champ des distributions des produits modifiés apparaissent bien différents de ceux de la maghémite, montrant que ces distinctions sont essentiellement dues aux effets de surface.

La variation du déplacement isomérique δ est liée à celle de la densité électronique du fer. Nous avons observé, dans le cas de l'étude à 4,2 K, une augmentation des valeurs moyennes de δ pour la maghémite modifiée. Cette augmentation peut être attribuée aux interactions entre le film polysiloxane et les sites de surface. Celles-ci sont de natures diverses. Il peut s'agir de liaison de type donneur-accepteur mettant en jeu un doublet électronique des amines, ou de transfert de protons partiel ou total entre des hydroxyles de surface et un groupe amine. La formation de ponts Fe-O-Si peut aussi contribuer à l'augmentation de la valeur de δ . En effet, les liaisons Si-O et Fe-O sont antagonistes, la première étant plus courte (plus covalente), que la deuxième. La formation de ce type de pont augmente le caractère ionique de la liaison Fe-O⁹⁰.

La valeur de l'éclatement quadrupolaire du produit EF11 est plus élevée que celle de l'échantillon EF18. Ce paramètre dépend dans le cas du fer trivalent, de la répartition des charges électriques autour du noyau. En améliorant la condensation du silane, la déshydratation de la maghémite greffée a pu diminuer le nombre d'espèces ioniques interagissant avec les sites de surface et ainsi diminuer la valeur de Δ . En outre, la diminution de l'éclatement quadrupolaire signifie que les sites octaédriques sont moins déformés. Ce résultat peut être attribué à la diminution du nombre de sites de surface montrant que le film

polysiloxane pourrait être lié que par un seul type de liaison. Les amines auraient peut-être disparu de la surface pour ne laisser la place qu'aux liaisons Si-O avec le fer de surface.

Le fait que les distributions de champs hyperfins (H1 et H2) tendent vers des valeurs discrètes pour la maghémite greffée (EF11 et EF18) peut être interprété comme un effet de réorganisation des sites de la maghémite. La présence du film polysiloxane séparant les surfaces des nanoparticules à l'intérieur même des agrégats, doit modifier les interactions interparticulaires (dipolaires magnétiques) par rapport à celles de la maghémite non modifiée. Le fait que les largeurs des distributions soient plus faibles pour les nanoparticules modifiées suggère que celles-ci soient moins agrégées et leurs tailles plus homogènes que celles des nanoparticules de maghémite vierge⁹¹.

2.4 Conclusions

Cette étude a permis de déterminer des conditions opératoires favorables de modification chimique de la surface des nanoparticules de maghémite, par des agents de couplage silaniques aminés, tout en respectant la possibilité de peptisation après greffage. Contrairement, aux conclusions de certains auteurs^{63,64}, la silanisation directe des nanoparticules d'oxyde de fer en milieu aqueux, sans l'utilisation des ultrasons, est réalisable. Celle-ci doit cependant être achevée par une étape de déshydratation par traitement thermique modéré sous vide. Ce traitement joue un double rôle. Il favorise la condensation du film polysiloxane à la surface du substrat et il permet d'augmenter la réactivité des groupes aminofonctionnels à la surface des particules. Dans le cas des agents de couplage aminés, les liaisons hydrogène, développées entre les amines ou les silanols du film et les sites de surface, sont rompues sous l'effet du vide ce qui provoque le retournement des bras aminopropyle vers l'extérieur du réseau polysiloxane. Ce phénomène a été observé en mesurant les PIE des maghémites modifiées par l'APS, l'EDPS et le DTSP, au moyen de mesures de potentiel zêta en fonction du pH.

Les caractérisations des nanoparticules modifiées par ces trois agents de couplage confortent le modèle suggérant la saturation par encombrement stérique de la surface de la maghémite. Ce modèle vient à l'encontre de celui proposé par Lesniak *et al.*⁶¹ pour lequel il existerait un optimum de concentration en APS qui favoriserait la formation de particules core-shell. Dans notre système, la surface des nanoparticules de maghémite est initialement plus acide que la solution. L'hydrolyse et l'adsorption des silanes seraient donc favorisées à proximité de la surface. La formation rapide des premières couches expliquerait alors le fait

que nous n'ayons pas observé d'agglomérats de polysiloxanes généralement formés aux concentrations en aminosilanes utilisés.

Malgré les nombreuses techniques de caractérisation utilisées, nous n'avons pu mettre clairement en évidence l'existence de ponts Fe-O-Si entre la surface et le film polysiloxane. Néanmoins, la formation d'un film polysiloxane enveloppant les nanoparticules, observée par différentes techniques spectroscopiques (DRIFT, XPS, Mössbauer) est chimiquement plus stable vis-à-vis de la désorption par rapport à l'adsorption de molécules sur une surface. Du reste, les mesures de potentiel zêta ainsi que la spectrométrie DRIFT, ont permis de montrer que les différents traitements acido-basiques appliqués sur les nanoparticules greffées n'ont pas altéré l'adhésion du film polysiloxane.

Les caractéristiques des ferrofluides de maghémite modifiés sont reportées dans le tableau 2.15.

Caractéristiques	méthode	$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ -APS (EF18)	$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ -EDPS (EF19)	$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ -DTSP (EF20)
\bar{d}_n (PCS)	Spectroscopie de corrélation de photons	15,2 nm	7,7 nm	15,5 nm
σ		0,50	0,54	0,57
\bar{d}_n (MET)	Microscopie électronique à transmission	Idem FF10	Idem FF10	Idem FF10
Stabilité thermique	Calorimétrie	$T_{\gamma\alpha} = 770^\circ\text{C}$	nd	nd
$\varepsilon_{\lambda_{\text{abs}}}$	Spectrophotométrie	575 L/mol.cm 480 nm	nd	nd
d_{APS}	ATG/spectrométrie de masse	7,5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	4,9 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	3,5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$
PCN	Mesure du potentiel zêta	10,4	10,1	10,0
Domaine de floculation	pHmétrie/ Spectrophotométrie	7 < pH < 12	$\approx 7 < \text{pH} < 12$	$\approx 6,5 < \text{pH} < 12$
$C_{\text{lim}}^{\text{Cl}^-}$ (mol/l)	Spectrophotométrie	0,14 M/NaCl	0,17 M/NaCl	0,21 M/NaCl

Tableau 2.15. Caractéristiques des nanoparticules modifiées.

La partie suivante expose une étude portant sur l'encapsulation des nanoparticules de maghémite dans une coque de silice. Cette voie s'est présentée comme une alternative dans le cadre de la conception de nanoparticules magnétiques fonctionnalisées. La silice peut, en effet, permettre de faciliter le greffage des agents silaniques organofonctionnels.

3. Encapsulation des nanoparticules de maghémite dans une coque de silice par microémulsion inverse

3.1 Généralités

3.1.1 Introduction

Parmi les matériaux nanostructurés les plus étudiés depuis ces dernières années, les nanoparticules métalliques encapsulées dans la silice suscitent un engouement particulier. La silice possède, en effet, les propriétés requises pour la conception de ces matériaux : elle est optiquement transparente, chimiquement inerte, photochimiquement stable sous irradiation, de plus, elle est bon marché et les procédés de couplage à sa surface sont relativement simples. L'encapsulation des nanoparticules métalliques dans une coque de silice permet, en outre, de prévenir leur coalescence, de stabiliser dans un large domaine de pH et de fraction volumique les dispersions colloïdales. En limitant leur taille à l'échelle de la dizaine de nanomètres, l'encapsulation des nanoparticules (d'oxyde ou de sulfure) métalliques à l'intérieur de billes de silice permet de révéler des propriétés optoélectroniques particulières. Parmi les systèmes les plus étudiés, on peut citer les nanoparticules d'or et d'argent (Au@SiO_2 , Ag@SiO_2) qui possèdent une bande de plasmon dans les longueurs d'onde du visible dépendante de leur taille^{92,93}, les quantum dots de ZnS ou CdS (ZnS@SiO_2 , CdS@SiO_2) qui possèdent des propriétés luminescentes sous UV⁹⁴, les nanoparticules de TiO_2 ($\text{TiO}_2\text{@SiO}_2$) du fait de leur indice de réfraction suffisamment élevé, sont utilisées dans la conception de cristaux photoniques⁹⁵. Ces nanoparticules « core-shell » (cœur-écorce) présentent un nouvel intérêt pour la biologie. Associées à de l'ADN ou des protéines, elles constituent alors des biocapteurs qui peuvent être utilisés dans la reconnaissance spécifique de gènes, d'antigènes ou d'anticorps⁹⁶⁻⁹⁸.

Ce type de matériau ouvre donc des perspectives dans de nombreux domaines d'application et de nombreuses déclinaisons existent concernant la réalisation de nouveaux matériaux issus des procédés de synthèse des particules « core-shell ». Par exemple, l'élimination du cœur inorganique conduit à la formation de billes de silice creuses, appelées nanobulles ou hollow sphères^{94,99} ou encore cénosphères (de kenos, gr. vide). Ces matériaux peuvent développer des propriétés intéressantes en catalyse, lorsque la cavité de ces billes est fonctionnalisée. La réalisation de nanoparticules de structure oignon, dérivée de la structure core-shell, pour lesquelles, chaque couche possède un indice de réfraction différent, peut s'avérer intéressant dans le domaine de l'optique⁹⁴.

L'encapsulation de nanoparticules magnétiques dans des billes de silice présente aussi un réel intérêt pour des applications biologiques et chimiques. Après greffage d'agents silaniques organofonctionnels, les nanoparticules de silice magnétique peuvent entrer dans des procédés d'immobilisation d'enzymes pour des systèmes biocatalytiques¹⁰⁰, dans des systèmes de catalyse supportée¹⁰¹ ou dans des systèmes d'extraction/purification magnétique de cellules ou de protéines. Les billes de silice ont déjà fait office de vecteur non-viral pour la transfection d'ADN¹⁰² ou couplé à un fluorochrome, de marqueur cellulaire fluorescent¹⁰³. Leur utilisation *in vivo* semble néanmoins être limitée par le fait que les matrices de silice ne soient pas biodégradables (Chap. I §1.1). Cette propriété peut cependant se présenter comme un avantage dans le cadre de modélisations de marqueurs magnétiques *in vivo* qui requièrent une stabilité à long terme vis-à-vis des processus de biodégradation.

Des travaux concernant la synthèse de nanoparticules core-shell de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ ou de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ ont été reportés dans la littérature¹⁰⁴⁻¹⁰⁷. La méthode de synthèse est un procédé en deux étapes. La première, dénommée procédé liquide dense par Liu *et al.*, consiste à adsorber une fine couche de silicate de sodium d'environ 0,5 nm d'épaisseur, de façon à rendre la surface de la maghémite vitréophile¹⁰⁴. Dans un second temps, le sol de nanoparticules modifiées est placé dans une solution d'éthanol contenant de l'ammoniaque. Du tétraéthoxysilane (TEOS) est alors ajouté en quantités variables, selon l'épaisseur de la couche de silice recherchée. La croissance de la couche de silice se fait alors par hydrolyse et condensation du TEOS à la surface de la magnétite modifiée. Après un jour d'agitation, la croissance des particules se manifeste par une augmentation de la turbidité de la dispersion. Les billes de silice obtenues possèdent un diamètre pouvant atteindre 80 nm et sont relativement monodisperses. Philipse *et al.*¹⁰⁵ ont démontré l'importance de la première étape de modification. En effet elle permet de favoriser la croissance de la silice, à la surface de la magnétite. Sans cette étape préliminaire, la nucléation et la croissance se font de manière anarchique et la condensation des silanols mène alors à de larges agrégats de magnétite enrobés dans la silice. La réalisation de particules « core-shell » de maghémite et de magnétite dans la silice, directement en solution, et donc possible mais elle reste néanmoins techniquement délicate car elle suppose le contrôle de l'état de dispersion pendant la croissance de la couche de silice.

Dans le cadre de cette étude nous présentons une autre approche qui repose sur l'utilisation des microémulsions. En effet, de par la nature autoassemblante des tensioactifs, ces milieux sont mis à profit pour la synthèse et l'encapsulation de nanoparticules organiques (polymères) ou inorganiques (métal, oxyde ou sulfure métallique), les micelles jouant alors le

rôle de nanoréacteur. La grande variété des structures développées par ces systèmes offre de nombreuses possibilités de synthèse de matériaux de morphologie (particules sphériques, bâtonnets, fibres, matrices microporeuses...) et de taille contrôlées ($<0,1 \mu\text{m}$). La méthode de synthèse dérive du procédé sol-gel classique connu sous le nom de procédé Stöber, basée sur la polycondensation des tétraalkoxysilanes catalysée par voie basique et qui donne lieu à la formation de particules de silice submicroniques¹⁰⁸.

A partir d'une microémulsion inverse dont la composition est préalablement fixée, les objectifs de cette étude sont :

- ✓ de déterminer les conditions de synthèse de notre système, qui diffèrent de celles reportées dans la littérature. En effet, les nanoparticules sont généralement synthétisées *in situ* puis encapsulées par ajout d'une deuxième émulsion contenant le TEOS. Dans notre cas, les nanoparticules sont préformées en milieu aqueux (§1.2), puis placées dans une microémulsion dans laquelle nous ajoutons le TEOS ;

- ✓ de contrôler la morphologie des nanoparticules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ en fonction du pH du ferrofluide. Ce paramètre influence à la fois la vitesse d'hydrolyse et la stabilité initiale du sol de maghémite ;

- ✓ de déterminer les moyens de les peptiser en milieu aqueux et d'examiner leur stabilité dans ce milieu. Les tensioactifs restent adsorbés en une ou plusieurs couches à la surface des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ même après plusieurs lavages. Leur présence empêche alors toute possibilité de redispersion en phase aqueuse.

- ✓ d'étudier leurs propriétés magnétiques et leur comportement en température. La présence d'une couche de silice supérieure à 20 nm permet de découpler certaines interactions magnétiques et de protéger à haute température la transformation de la maghémite en hématite^{109,110}.

- ✓ et, secondairement, de les utiliser comme précurseurs pour la synthèse de cénoosphères de silice, obtenues par dissolution du cœur magnétique.

3.1.2 Définition des microémulsions

Les microémulsions sont des solutions micellaires transparentes, isotropes et, contrairement aux émulsions, elles sont thermodynamiquement stables¹¹¹. Ces systèmes sont constitués d'une phase huileuse, d'eau et de tensioactif (TA). L'addition d'un co-tensioactif (souvent un alcool gras), dont le volume de la chaîne hydrocarbonée est très différent de celui du TA primaire, est souvent requise pour favoriser la formation de la microémulsion en

augmentant la déformabilité de l'interface. La stabilité thermodynamique des microémulsions a longtemps été discutée, étant donné leur comportement intermédiaire entre l'état micellaire stable et les émulsions macroscopiques instables. Ruckenstein et al. ont démontré que la variation d'énergie libre (ΔG_m) associée à la formation spontanée d'une microémulsion, résulte de trois contributions¹¹² :

$$\Delta G_m = \Delta G_{int} + \Delta G_{ar} - T\Delta S_m$$

où $\Delta G_{int} = \gamma\Delta A$ représente la variation d'énergie interfaciale, ΔG_{ar} est la résultante des forces attractives de van der Waals et des forces répulsives électrostatiques ou stériques, $T\Delta S_m$ représente la contribution entropique associée à la dispersion des micelles dans la phase continue. Il apparaît dans cette relation que le terme ΔG_{int} doit être faible pour que ΔG_m soit négatif. Par conséquent, comme l'ont suggéré Schulman et al., la tension interfaciale (γ) eau/huile doit être suffisamment faible (de l'ordre de 10^{-2} à 10^{-3} dyne/cm⁻¹), car l'aire de l'interface (ΔA) créée est nécessairement élevée¹¹³. Des valeurs aussi faibles de la tension interfaciale imposent le choix d'un TA particulièrement efficace étant donné les concentrations élevées que nécessitent les microémulsions.

Différentes études ont montré qu'il existe une grande diversité de structure (sphérique, cylindrique, hexagonale, lamellaire) à l'intérieur même de la zone de stabilité d'une microémulsion. Selon la proportion des constituants et valeur de la balance hydrophile-lipophile du TA utilisé, la microémulsion peut être normale (huile dans l'eau, H/E) ou inverse (eau dans l'huile, E/H). Pour des régions riches en hydrocarbure ou en eau, le modèle globulaire (micelle sphérique) est le plus souvent observé. Pour des concentrations élevées en TA (et co-TA), le système présente généralement une structure lamellaire (smectique). Enfin, les régions où les proportions des différents constituants sont du même ordre de grandeur, présentent un système bicontinu dans lequel les microdomaines aqueux et huileux interconnectés forment une structure en éponge (isotrope).

3.1.3 Paramètres principaux des microémulsions inverses influençant la taille des nanoparticules

Pour un système E/H/TA donné, on peut distinguer certaines variables de synthèse contrôlant la taille des particules. Parmi ces variables, le rapport molaire $w = [H_2O]/[TA]$ détermine la taille des gouttelettes d'eau stabilisées par le TA dans la phase huileuse. Il a été démontré que le diamètre de ces gouttelettes pour un tensioactif comme le sulfonate sodique de 2-éthylhexyle (AOT) est relié à w par¹¹⁴ : $D(\text{nm}) = 0,3w$. Arriagada *et al.* ont étudié les

mécanismes de nucléation/croissance de nanoparticules de silice, par hydrolyse et condensation du TEOS en microémulsion inverse^{115,116}. Ils ont observé une diminution de la taille et un rétrécissement de la distribution de taille lorsque le rapport w augmente de 0,7 à 2,3. Cette diminution de la taille a été alors attribuée à l'augmentation de la nucléation intramicellaire. Ils ont constaté cependant, que la dépendance de ce rapport sur la taille des particules est beaucoup plus compliquée pour des valeurs plus élevées. En augmentant la concentration massique en ammoniacque (de 1,6 à 29,6% en poids), utilisée pour la condensation du TEOS, ils observent pour diverses valeurs de w , un minimum du diamètre moyen en nombre des particules, puis une augmentation de la taille pour des valeurs de w plus élevées, attribuée au processus d'agrégation des centres de nucléation. Pour des rapports w compris entre 10-15, on observe généralement une augmentation de la taille des particules en relation avec la taille des gouttelettes.

D'autres facteurs, inhérents à la nature des constituants de la microémulsion, influencent les mécanismes d'échange intermicellaire¹¹⁴. La nature de la phase huileuse (le nombre de carbone) et le nombre de gouttelettes déterminent le taux de collisions entre les micelles. En d'autres termes, l'utilisation d'une phase huileuse lourde et l'augmentation du nombre de gouttelettes, en diminuant la vitesse d'échange intermicellaire, favorise la formation de particules de plus petite taille en diminuant leur vitesse de croissance. Par ailleurs, la formation de micelles de quelques nanomètres de diamètre impose une courbure du film interfacial supérieure à sa valeur naturelle. L'énergie de courbure qui en résulte dépend de la rigidité de l'interface. Cette rigidité intervient dans les processus d'échange intermicellaire et influence aussi la distribution de taille des nanoparticules formées.

3.2 Synthèse des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$

3.2.1 Détermination des conditions opératoires

a. Choix du système E/H/TA

L'étude du diagramme pseudo-ternaire E/H/TA étant hors propos, nous avons choisi dans la littérature¹¹⁷ les compositions d'une microémulsion inverse, stable dans un large domaine, que nous avons ensuite adapté à notre problématique. L'AOT est un tensioactif anionique couramment utilisé dans les protocoles d'encapsulation. Associé à un co-tensioactif non ionique, le O-dodécyltétraéthylène glycol (Brij 30[®]), il forme avec l'eau, une phase continue dans l'hexane. La figure 3.1 montre le diagramme de phase obtenu par le système

eau/hexane/AOT-Brij 30. La zone hachurée correspond au domaine monophasé, stable et isotrope. Les conditions choisies arbitrairement pour lesquelles une microémulsion stable est obtenue sont en pourcentages massiques : 67,5% d'hexane, 22,5% de TA (co-TA/TA=2/3) et 10% d'eau. Dans ces conditions, le rapport w est égal à 10.

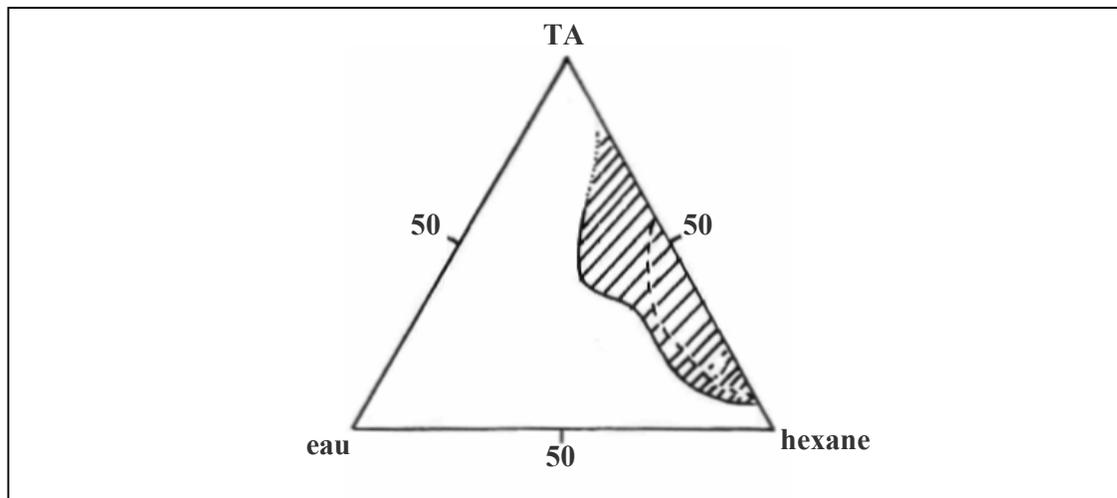


Figure 3.1. Diagramme de phases pseudo-ternaire du système eau/hexane/AOT-Brij30 en % en poids (d'après ref [117])

b. Détermination des conditions de synthèse des nanoparticules core-shell

L'idée de départ est d'utiliser l'acidité du ferrofluide de maghémite pour catalyser l'hydrolyse du TEOS à l'intérieur des micelles contenant les nanoparticules. La condensation a lieu ensuite par catalyse basique en ajoutant de l'ammoniaque dans le milieu. Des essais préliminaires ont montré que l'utilisation d'une trop grande quantité de TEOS entraîne la formation de nanoparticules core-shell plus ou moins coagulées, d'environ 50 nm de diamètre, coexistant avec des particules de silice beaucoup plus fines d'une dizaine de nanomètres (Fig. 3.2a). A l'inverse, une trop forte concentration en maghémite conduit à la formation d'agrégats de silice contenant une forte proportion de maghémite (Fig. 3.2b).

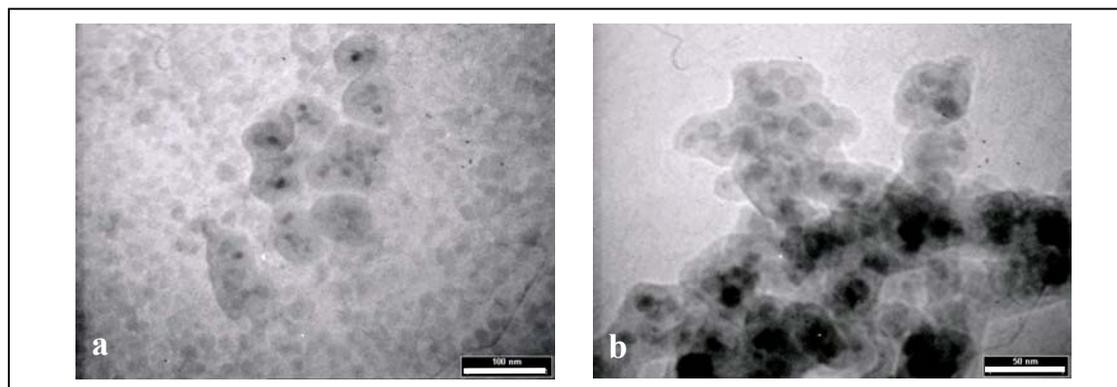


Figure 3.2. Micrographies MET montrant l'influence de la proportion de TEOS/maghémite. (a) TEOS en large excès (barre d'échelle égale à 100 nm) ; (b) maghémite en excès (barre d'échelle égale à 50 nm).

Par conséquent, il convient de déterminer les proportions de TEOS et de maghémite nécessaires, de manière à favoriser la formation de nanoparticules core-shell. Arriagada *et al.* ont estimé le nombre de particules de silice N_p à partir de la relation suivante¹¹⁵ :

$$(1) : N_p = \frac{n_{\text{TEOS}} M}{0,96 m_p}$$

où n_{TEOS} est le nombre de mole de TEOS dans la microémulsion, M la masse molaire de la silice, m_p la masse d'une particule de silice égale à $\pi d_n^3 \rho / 6$, d_n^3 le diamètre moyen en nombre des billes de silice, ρ la densité de la silice ($2,09 \text{ g.cm}^{-3}$ déterminé par pycnométrie) et 0,96 un facteur de correction qui rend compte du pourcentage massique de SiO_2 dans les particules. On peut utiliser cette relation pour estimer la proportion de TEOS à ajouter par rapport au nombre de moles de fer présent dans la microémulsion. Afin de prendre en compte la présence des nanoparticules de maghémite au sein des particules de silice, on remplace m_p par m_p' dans cette relation donnée par :

$$(2) : m_p' = \frac{\pi}{6} (d_{n\text{SiO}_2}^3 \rho_{\text{SiO}_2} - d_{n\text{Fe}_2\text{O}_3}^3 \rho_{\text{Fe}_2\text{O}_3})$$

où $d_{n\text{SiO}_2}$ et $d_{n\text{Fe}_2\text{O}_3}$ sont les diamètres moyens en nombre respectifs des nanoparticules de silice (50 nm, d'après les essais préliminaires) et de maghémite (7,5 nm, § 1.3.1a), ρ_{SiO_2} et $\rho_{\text{Fe}_2\text{O}_3}$ les densités respectives de la silice et de la maghémite ($4,87 \text{ g.cm}^{-3}$, § 1.3.2). La condition pour obtenir des nanoparticules core-shell est (3) : $N_{p\text{SiO}_2} = N_{p\text{Fe}_2\text{O}_3}$, or

$$N_{p\text{Fe}_2\text{O}_3} = \frac{n_{\text{Fe}}}{N_{\text{Fe}}}$$

où n_{Fe} est le nombre d'atome de fer total dans la microémulsion et N_{Fe} est le nombre d'atome de fer par particule. Ce dernier peut s'exprimer sous la forme :

$$(4) : N_{\text{Fe}} = \frac{\pi d_n^3 \rho_{\text{Fe}_2\text{O}_3} N_A}{3M_{\text{Fe}_2\text{O}_3}}$$

Dans cette expression, $M_{\text{Fe}_2\text{O}_3}$ est la masse molaire de la maghémite et N_A le nombre d'Avogadro. Avec $n_{\text{Fe}} = n_{\text{Fe}} N_A$, et d'après les expressions (1), (2), (3) et (4),

$$n_{\text{TEOS}} = 0,48 n_{\text{Fe}} \frac{M_{\text{Fe}_2\text{O}_3} (d_{n\text{SiO}_2}^3 \rho_{\text{SiO}_2} - d_{n\text{Fe}_2\text{O}_3}^3 \rho_{\text{Fe}_2\text{O}_3})}{M_{\text{SiO}_2} d_{n\text{Fe}_2\text{O}_3}^3 \rho_{\text{Fe}_2\text{O}_3}}$$

finalement,

$$n_{\text{TEOS}} = 161,2 n_{\text{Fe}}$$

Nous avons vu précédemment que la concentration en ammoniacque influence les processus de nucléation intramicellaire. Or, la quantité d'ammoniacque doit être suffisante à la

fois pour neutraliser les gouttelettes de ferrofluide acide et pour condenser les silanols issus de l'hydrolyse du TEOS. Nous avons choisi une faible concentration (2,3% en poids) afin d'éviter les phénomènes d'agrégation des germes de silice, mais qui est néanmoins suffisant pour catalyser la condensation du TEOS.

c. Synthèse des nanoparticules de silice-maghémite

Mode opératoire : dans un ballon de 500 mL, muni d'un barreau magnétique (olive), on verse 188,5 g d'hexane dans lequel on ajoute 37 g d'AOT et 24,7 g de Brij 30[®]. Le mélange est laissé 15', le temps que les TA se solubilisent. Un volume de 11,2 mL de ferrofluide ($[Fe^{3+}] = 0,031 \text{ mol/L}$) est alors versé rapidement dans le mélange. La solution est translucide ce qui montre que la microémulsion est stable. Celle-ci est à nouveau laissée sous agitation 15', de façon à homogénéiser les gouttelettes de ferrofluide. On verse alors 12,36 mL de TEOS (Aldrich, 98% en poids) rapidement dans le milieu réactionnel. La microémulsion est laissée pendant 30', le temps que le TEOS s'hydrolyse. Un volume de 21,7 mL d'ammoniaque (Erba, 30% en poids) est ensuite ajouté à la microémulsion ($w=9,6$). Celle-ci reste translucide. Néanmoins, après 12 h d'agitation, on observe une légère turbidité provenant de la formation de la couche de silice. La microémulsion reste stable même à l'arrêt de l'agitation.

Afin d'extraire les nanoparticules, la microémulsion est versée dans 2 flacons de centrifugation puis, elle est ensuite déstabilisée par addition de 100 mL d'éthanol dans chaque flacon. Un précipité marron apparaît. Le précipité est centrifugé à 5000 rpm pendant 10'. Après élimination du surnageant, les particules sont lavées et centrifugées avec 200 mL d'éthanol. Les particules agrégées sont placées dans une ampoule à décanter et sont lavées dans un mélange binaire eau-dichlorométhane (50/50, 3×200 mL).

Peptisation en milieu aqueux : Après les étapes de lavages les nanoparticules de silice sont placées en milieu aqueux. La solution est ajustée à pH 9 par addition de quelques gouttes de KOH. Après plusieurs heures d'agitation, la solution reste turbide montrant que les particules sont toujours floculées. Cela montre qu'en dépit des nombreuses phases de lavages, une partie des TA reste adsorbée à la surface des nanoparticules. Pour remédier à cela, nous avons fait subir un traitement alcalin beaucoup plus brutal, de manière à passiver la surface de la silice et éliminer de la sorte les TA résiduels.

Le produit obtenu après lavages est décanté magnétiquement. Le floculat, formant une substance pâteuse, est réparti dans des tubes de centrifugation de 12 mL. Le produit occupe la moitié du volume de chaque tube. On verse ensuite une solution de KOH 0,5 M dans chaque tube. Les solutions sont aussitôt agitées pendant quelques secondes sur un agitateur vortex. Après homogénéisation, les dispersions sont centrifugées à 5000 rpm pendant 5 minutes. Une fois le surnageant éliminé, on ajoute 2 mL d'eau ce qui provoque la dispersion des particules. Néanmoins, les dispersions sont turbides, vraisemblablement en raison de la présence d'un excès de contre-ions potassium dans la solution. L'addition de 5 mL d'acétone dans chaque tube permet de précipiter les particules. Les solutions sont à nouveau centrifugées pendant 10' à 5000 rpm. On observe alors au niveau des culots, une solution dense, très visqueuse et magnétique, dont la couleur est caractéristique des ferrofluides de maghémite concentrés. La présence de l'acétone en forte proportion dans la solution permet de discriminer les particules de la solution de telle sorte que l'on obtienne une solution biphasée après la centrifugation. Le surnageant est éliminé en retenant le culot par un aimant. Un volume de 5 mL d'eau ultrapure est ajouté dans chaque tube conduisant à la peptisation des nanoparticules. Chaque échantillon de ferrofluide de $\gamma Fe_2O_3@SiO_2$ est ensuite rassemblé dans un flacon de stockage. Le sol de pH 10 a une stabilité de plusieurs mois.

3.2.2 Influence du pH sur la morphologie des nanoparticules.

Le système initial est constitué de deux sous-systèmes colloïdaux intimement imbriqués : la microémulsion et le sol de maghémite. Nous avons présenté dans le paragraphe 1.4.2, les paramètres déterminants (pH, I) pour contrôler la stabilité électrostatique des sols colloïdaux en milieu aqueux. Dans le cas des microémulsions, la stabilité est cette fois thermodynamique. Elle fait intervenir d'autres paramètres physicochimiques, comme la tension interfaciale, qui dépendent de la nature (longueur de la chaîne hydrocarbonée, tête hydrophile ionique ou non ionique, nombre de queues hydrophobes, balance hydrophile-lipophile) et de la concentration des constituants (concentration micellaire critique...). Dans le cadre de cette étude, les conditions thermodynamiques de la microémulsion sont fixées et on examine l'influence du pH sur la morphologie des particules de silice-maghémite.

Les conditions opératoires sont les mêmes que celles mentionnées dans le paragraphe précédent. Deux autres microémulsions sont préparées à partir de deux ferrofluides à pH 3,5 et à pH 4,5. Une goutte de chaque ferrofluide de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ est déposée sur une grille de microscopie, ces dernières sont placées dans un portoir, à l'abri des poussières et séchées à l'étuve à 40°C.

Les micrographies de MET sont montrées en figure 3.3. L'observation de ces micrographies nous montre que les particules core-shell sont obtenues pour le pH initial du ferrofluide, le plus bas (2,5). Lorsque le pH augmente d'une unité les particules de maghémite sont plus agrégées, mais gardent cette même morphologie. A pH 4,5, c'est-à-dire proche de la limite de stabilité, les particules de maghémite sont beaucoup plus flocculées, formant des chaînes entourées de silice agglomérée. Ce résultat, peu surprenant, montre toute l'importance du contrôle de la stabilité initiale du sol de maghémite, que ce soit pour la modification de surface ou pour l'encapsulation.

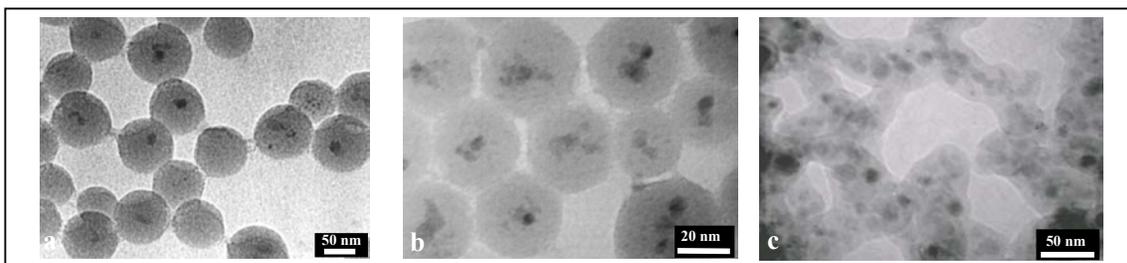


Figure 3.3. Micrographies MET des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ en fonction du pH initial du ferrofluide (a : pH 2,5 ; b : pH 3,5 ; c : pH 4,5).

Le diamètre moyen des nanoparticules (pH 2,5) a été estimé à 47 nm et possède une distribution relativement étroite (Fig. 3.4).

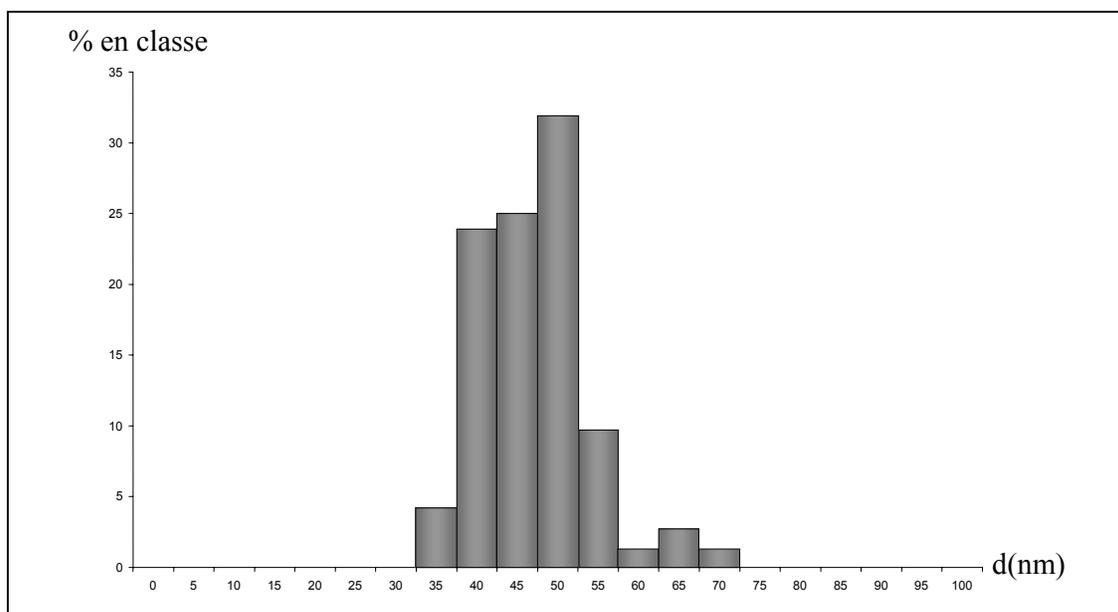


Figure 3.4. Distribution des diamètres des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ (pH du ferrofluide initial égal à 2,5).

3.2.3 Synthèse des cénosphères de silice

A partir des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$, il est possible de réaliser des cénosphères en éliminant le cœur d'oxyde de fer.

Mode opératoire : Les nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ préparées et lavées selon le mode opératoire décrit précédemment, sont versées dans un tube de centrifugation de 12 mL, de manière à occuper un volume de 5 mL. Afin de dissoudre l'oxyde de fer, 5 mL d'une solution d'acide chlorhydrique de concentration 10 M est ajouté dans chaque tube. Les produits sont homogénéisés sous agitation sur un vortex. La maghémite disparaît au bout de quelques minutes, laissant une solution turbide de couleur jaune-orangée caractéristique des chlorures ferriques. Après centrifugation, l'opération est renouvelée une deuxième fois. Les billes de silice sont ensuite rincées à l'eau ultrapure jusqu'à la disparition complète des chlorures de fer (i.e. jusqu'à la neutralisation). Les cénosphères de silice sont ensuite peptisées par voie alcaline selon la même procédure que pour les nanoparticules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$. Au terme de la peptisation, on obtient 3 sols de cénosphères de silice, issus des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ synthétisées à partir des ferrofluides de maghémite à pH 2,5, 3,5 et 4,5.

Les micrographies (Fig. 3.5) montrent les cénosphères de silice correspondant aux trois produits. L'examen des micrographies montre que le cœur magnétique a bien disparu. Le diamètre des cénosphères (de l'ordre de 50 nm pour a et b) est proche de celui des nanoparticules d'origine. La taille et le nombre de cavités semblent coïncider avec ceux des cœurs magnétiques des nanoparticules-mères de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$.

La surface spécifique mesurée par BET des particules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ (pH 2,5) est égale à 440 m²/g contre 480 m²/g pour les nanobulles correspondantes. La surface développée par gramme de nanoparticule de silice de 50 nm de diamètre qui ne posséderait aucune porosité, serait environ égale à 60 m²/g ($A=6/d\rho$, d en nm et ρ en g/cm³). Ce résultat montre

que les billes de silice sont poreuses. Cette forte porosité est inhérente au procédé de synthèse. Par ailleurs, on pouvait s'attendre à une différence de $130 \text{ m}^2/\text{g}$ (surface spécifique de la maghémite) entre les surfaces spécifiques des nanoparticules pleines et des nanoparticules vides. Or cette différence n'est seulement que de $40 \text{ m}^2/\text{g}$. Trois hypothèses peuvent expliquer cette observation : une partie de la surface de la maghémite ne serait pas en contact avec la silice ; le cœur des nanoparticules de silice serait constitué de plusieurs nanoparticules de maghémite, ce qui aurait pour effet de diminuer la valeur de la surface spécifique du cœur ; l'existence de billes de silice, sans maghémite, abaisserait cette différence.

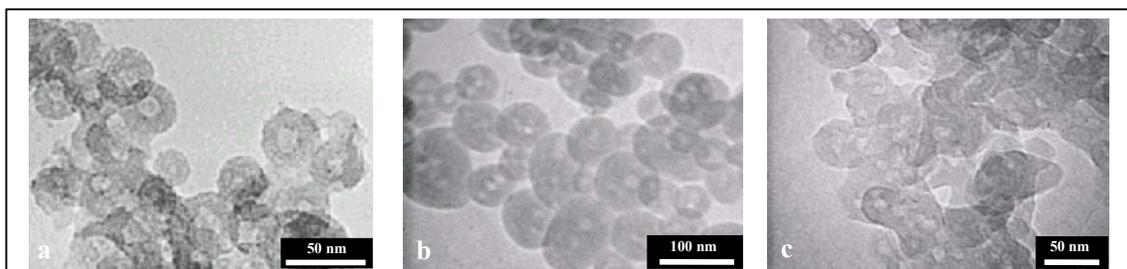


Figure 3.5. Micrographies MET des nanobulles issus de la synthèse des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@ \text{SiO}_2$ à des pH de ferrofluides différents (a : pH 2,5 ; b : pH 3,5 ; c : pH 4,5).

3.3 Propriétés physicochimiques des nanoparticules

3.3.1 Propriétés des sols de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@ \text{SiO}_2$

Des mesures de potentiel zêta ont été réalisées, en fonction du pH, afin de déterminer le PCN des ferrofluides de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@ \text{SiO}_2$.

Plusieurs échantillons de 20 mL du sol de nanoparticules core-shell, préparé selon le mode opératoire précédent (pH du ferrofluide initial égal à 2,5), sont ajustés à différents pH par addition de quelques gouttes de KOH ou de HNO₃ à 0,01 M. Les solutions sont ensuite injectées dans l'appareil de mesure de ζ .

Les résultats des mesures de ζ des ferrofluides de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@ \text{SiO}_2$ et de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, pour comparaison, sont présentés en figure 3.6.

Conformément à ce que l'on pouvait s'attendre, le PCN des particules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@ \text{SiO}_2$ est égal à 2,5, valeur qui est en accord avec le PCN de la silice, située pour une valeur de pH comprise entre 2 et 3. Ce résultat montre aussi que tout le TA a été éliminé de la surface de la silice. Le sol de nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@ \text{SiO}_2$ est stable pour des pH supérieurs à 5. La couche de silice permet, en déplaçant le PCN de 7 à 2,5, d'obtenir un ferrofluide stable dans un large domaine de pH.

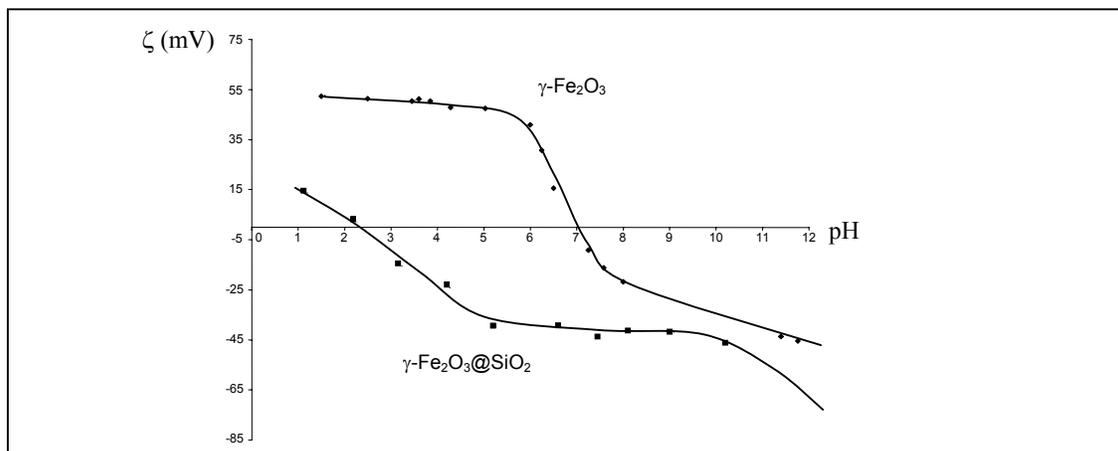


Figure 3.6. Mesures de potentiel zêta en fonction du pH des ferrofluides de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2$ et de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ en fonction du pH.

3.3.2 Comportement thermique

La diffraction des rayons X par la poudre dans des conditions isothermes a été utilisée de manière à examiner la stabilité thermique de la maghémite. Les thermodiffractogrammes ont été réalisés pour le produit synthétisé avec un pH initial égal à 2,5, de 473 K à 1273 K, par pas de 200 K, avec un temps de chauffe d'une heure pour chaque palier de température. (Fig. 3.7). L'acquisition de données réalisée à température ambiante (300 K) nous a servi de référence. Aucune transformation en hématite n'est observée jusqu'à 1273 K sous air. La silice joue le rôle d'agent antifrittage en confinant la maghémite, permettant ainsi la stabilisation de la structure spinelle inverse à haute température.

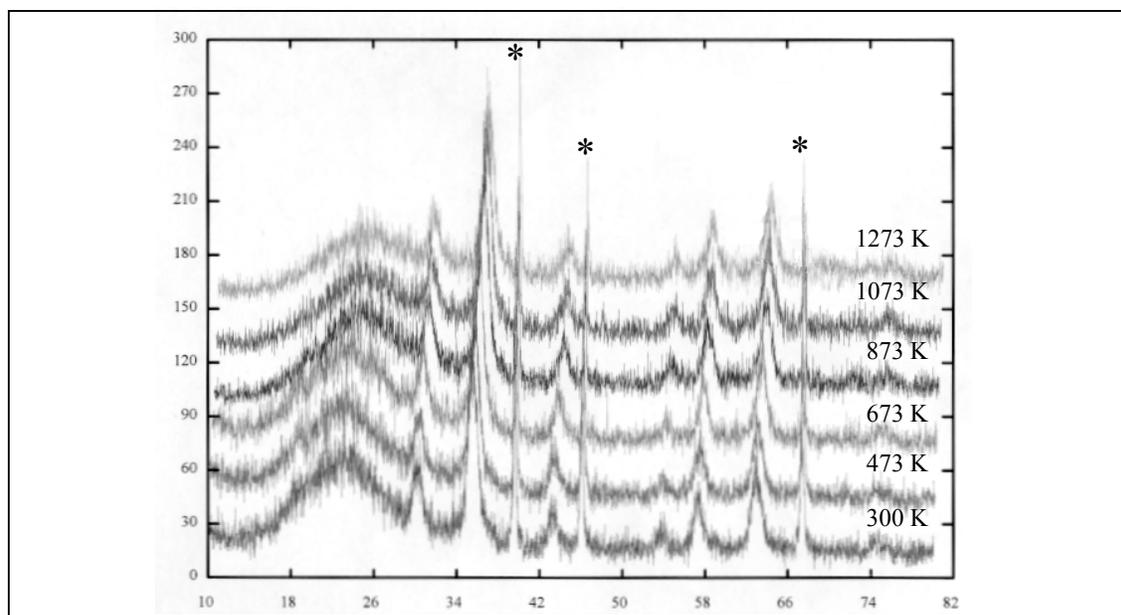


Figure 3.7. Diffractogrammes de rayons X en fonction de la température des particules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2$.

La figure 3.8 montre les cycles d'hystérésis à 15 K des particules de maghémite recuites à différentes températures (pendant une heure).

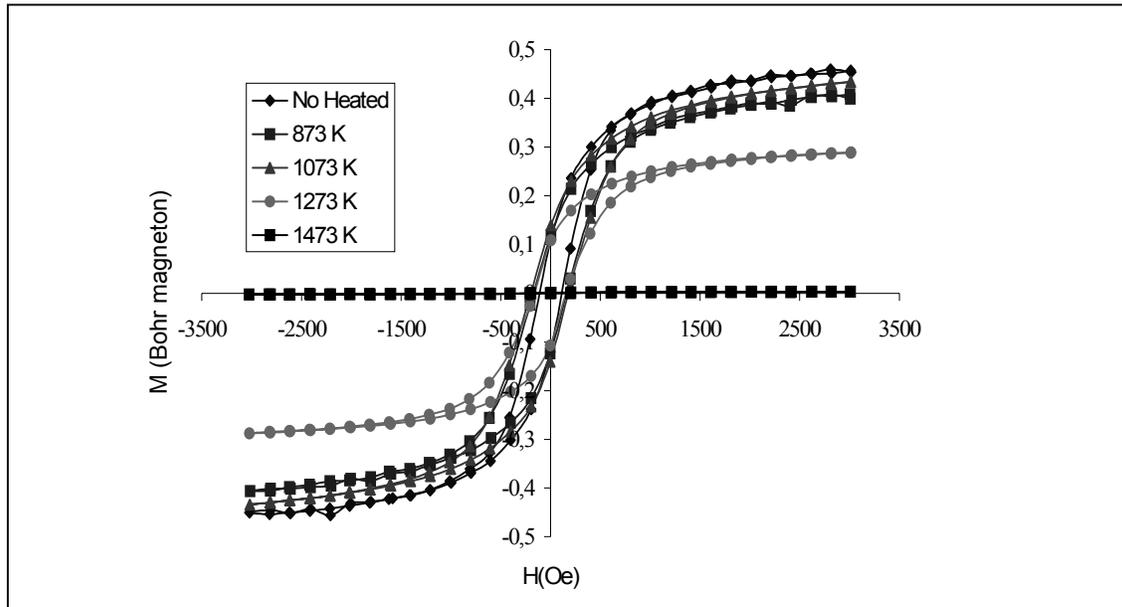


Figure 3.8. Cycles d'hystérésis à 15K des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ recuites à différentes températures.

Le comportement magnétique observé confirme que les nanoparticules de maghémite enrobées de silice sont quasiment stables thermiquement jusqu'à 1273 K. A 1473 K, l'observation du très faible signal peut être attribué, en première approximation, à la transformation des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ferrimagnétiques, en $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ antiferromagnétique. Chanéac *et al.*¹⁰⁹⁻¹¹⁰ ont observé dans le cas de nanoparticules de maghémite enrobées dans un gel de silice, une transformation polymorphe $\gamma \rightarrow \varepsilon$ à 1473 K. La phase ε , métastable, de structure rhomboédrique, se transforme ensuite en hématite (phase α) à 1673 K. La préparation des échantillons est donc un facteur important dans les processus de stabilisation des phases à haute température.

3.3.3 Propriétés magnétiques des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$

Les courbes d'aimantations ZFC (système refroidi sous champ nul) et FC (système refroidi à champ constant) de la maghémite et de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$, portées en fonction de la température, sont montrées en figure 3.9.

Le comportement magnétique des deux produits est caractéristique de particules superparamagnétiques. La forme des courbes ZFC est due au blocage progressif de l'aimantation des particules de plus en plus petites, du fait de la distribution de taille, lorsque la température diminue. La température pour laquelle les courbes d'aimantation ZFC et FC se raccordent, indique que tous les moments sont débloqués. Pour des valeurs supérieures à cette

température les particules ont un comportement superparamagnétique. Le maximum de la courbe ZFC peut être assimilé à la température de blocage relative, T_B , à un volume moyen. Pour des températures inférieures à T_B l'ordre magnétique dans la particule est quasi identique à celui du matériau massif, aux phénomènes de surface près. La différence de comportement des aimantations M_{FC} et M_{ZFC} entre les deux produits est typique d'une modification au niveau de l'état de dispersion. En effet, nous pouvons constater que la température de blocage de la maghémite est plus élevée que celle de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$. Ce phénomène a été attribué dans le cas de la maghémite, en première approximation, aux effets d'interactions magnétiques interparticulaires, plus élevées dans le cas de particules agrégées (ou concentrées)²¹. La couche de silice permet, en isolant les particules, de découpler les interactions dipolaires magnétiques.

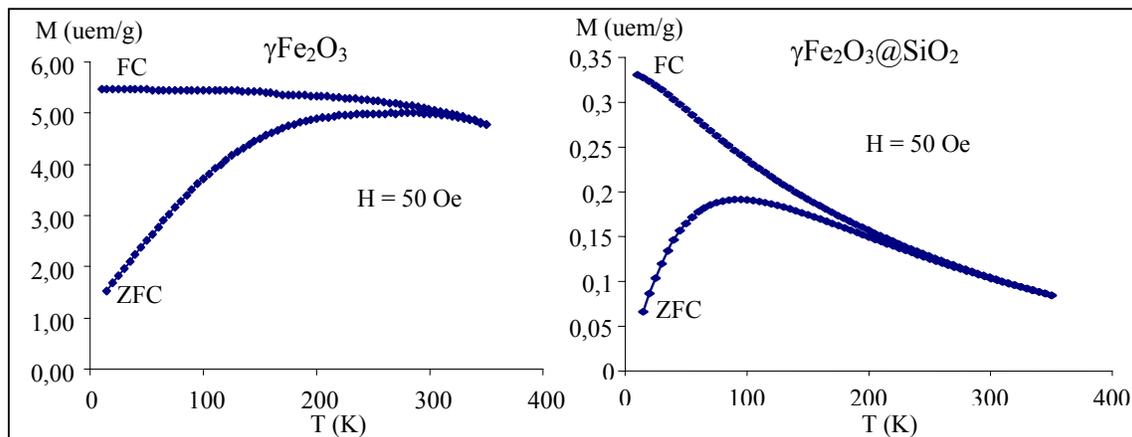


Figure 3.9. Courbes d'aimantation ZFC et FC en fonction de la température, de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ et de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ (synthétisé à partir du ferrofluide dont le pH initial est 2,5).

La figure 3.10 montre les cycles d'hystérésis de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ avant (15 K) et après (150 K)

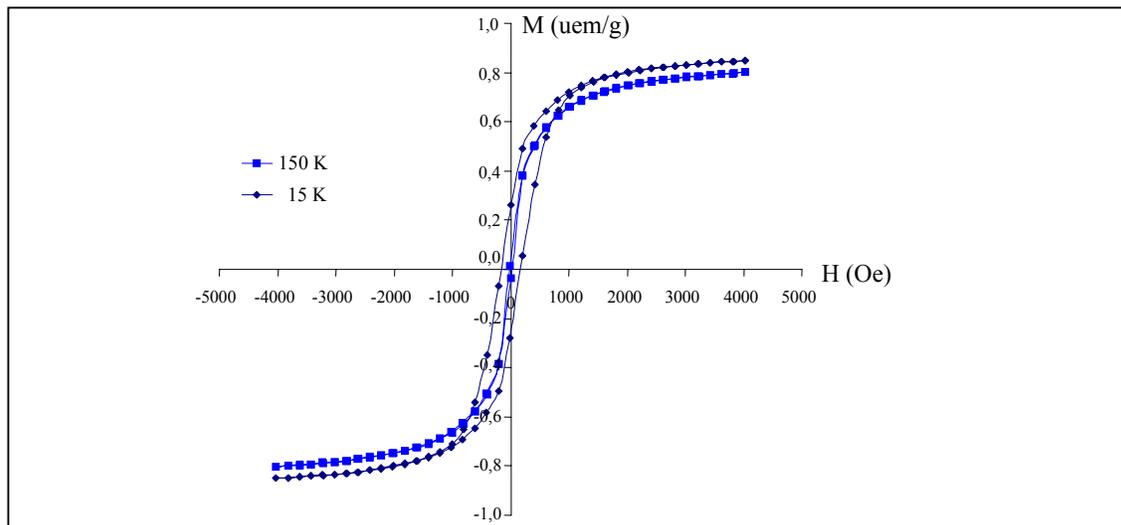


Figure 3.10. Cycle d'hystérésis à 15 K et 150 K des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$.

la température de blocage. Le cycle à 15 K, possède un champ coercitif non nul ce qui montre que les nanoparticules sont ferrimagnétiques à cette température comme dans le cas du matériau massif. L'absence d'un cycle d'hystérésis coercitif au-dessus de la température de blocage montre que le comportement magnétique de la majorité des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ est gouverné par la relaxation superparamagnétique.

3.4 Conclusions

Nous avons démontré la faisabilité de l'encapsulation en microémulsion inverse de nanoparticules de maghémite préformées. Le diamètre moyen des nanoparticules core-shell obtenues est de l'ordre de 50 nm. Pour un domaine de composition eau/hexane/TA préalablement fixé, le pH du ferrofluide s'est avéré être un paramètre important dans le contrôle de la morphologie des particules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$. L'encapsulation du ferrofluide dans des billes de silice permet, en quelques sortes, d'immobiliser l'état de la dispersion des nanoparticules initial, conditionné par le pH du ferrofluide. Le contrôle de ce paramètre permet ainsi d'ajuster le nombre de nanoparticules de maghémite piégées dans une coque de silice.

Après avoir déterminé des conditions de synthèse permettant l'obtention des nanoparticules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$, la difficulté était de trouver un moyen de disperser ces nanoparticules en milieu aqueux. L'élimination des TA, fortement adsorbés à la surface des nanoparticules en une ou plusieurs couches, est difficile par les procédés de lavage classiques. Le traitement des nanoparticules en milieu basique concentré permet, en passivant la surface des nanoparticules, de désorber les TA. Cependant, ce procédé, s'il est mal maîtrisé, peut mener à la dissolution complète des particules de silice. Néanmoins, l'utilisation d'un solvant miscible dans l'eau comme l'acétone, permet de séparer rapidement les particules du milieu basique contenant les TA et de les peptiser en milieu aqueux. Le ferrofluide obtenu est stable dans une large gamme de pH et le PCN des particules, mesuré par zétamétrie, est de l'ordre de 2,5.

La coque de silice retarde la transformation en hématite jusqu'à plus de 1000°C. Elle modifie aussi les propriétés magnétiques, comme la relaxation, de façon notable en diminuant les interactions magnétiques interparticulaires existant dans les agrégats.

La dissolution du cœur magnétique en milieu acide concentré abouti à la formation de nanobulles de silice. Des sols de ce type de particules peuvent être obtenus en utilisant le même procédé de peptisation que pour les nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$.

Références

- 1 Néel, L., *Ann. Geophys.*, **5(2)**, 99-136 (1949)
- 2 LeFort, J., *Acad. Sci. Paris*, **34**, 480 (1852)
- 3 Elmore, W.C., *Phys. Rev.*, **54**, 309-310 (1938)
- 4 Rosenweig, R.E., *International Science and Technology*, **July**, 48-56 (1966)
- 5 Reimers, G.W., Khalafalla, S.E., *U.S. Patent n°1439031*, (1973)
- 6 Massart, R., *IEEE Trans. Magn.*, **MAG-17(2)**, 1247-1248 (1981)
- 7 Raj, K., Moskowitz, B., Casciari, R., *J. Magn. Magn. Mater.*, **149**, 174-180 (1995)
- 8 Fauconnier, N., *Adsorption de ligands organiques sur des particules de maghémite en vue d'applications biomédicales*, Thèse de l'université Paris 6 (1996)
- 9 Lee, H., Lee, W.C., *J. Appl. Phys.*, **85(8)**, 5231-5233
- 10 Shinkai, M., Honda, H., Kobayashi, T., *Biocatalysis*, **5**, 61-69 (1991)
- 11 Sugimoto, T., Matijevic, E., *J. Colloid Interface Sci.*, **74**, 227 (1980)
- 12 Tamaura, Y., Buduan, P.V., Katsura, T., *J. Chem. Dalton Trans.*, 1807 (1981)
- 13 Tamaura, Y., Ito, K., Katsura, T., *J. Chem. Dalton Trans.*, 189 (1983)
- 14 Chouly, C., *Etude des relations structure-biodistribution et biocompatibilité de nanoparticules de magnétite-dextran (MD) utilisables pour l'IRM*, Thèse de l'université d'Angers (1993)
- 15 Jung, C.W., Jacobs, P., *Magn. Reson. Imaging*, **13(5)**, 661-674 (1995)
- 16 Lee, J., Isobe, T., Senna, M., *J. Colloid Interface Sci.*, **177**, 490-494 (1996)
- 17 Jolivet, J.P., *De la solution à l'oxyde*, InterEditions/CNRS Editions, Paris, (1994)
- 18 Lefebure, S., *Particules magnétiques de granulométrie contrôlée enrobées de tensioactifs et de polymères : Ferrofluide et couches magnétiques*, Thèse de l'Université Paris 6 (1996)
- 19 Cabuil, V., Thèse de l'université Paris 6 (1987)
- 20 Vayssières, L., Chanéac, C., Tronc, E., Jolivet, J.P., *J. Colloid Interfaces Sci.*, **205**, 205-212 (1998)
- 21 Prené, P., *Particules d'oxyde de fer spinelle. Physico-chimie des dispersions et comportement magnétique*, Thèse de l'université Paris 6 (1995)
- 22 Haneda, K., Morrish, A.H., *Solid State Comm.*, **22**, 779-782 (1977)
- 23 Tronc, E., Jolivet, J.P., Livage, J., *J. Hyperf. Int.*, **54**, 737 (1990)
- 24 Mornet, S., Grasset, F., Duguet, E., Portier, J., *Silica nanoparticles with a $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ magnetic core. Synthesis, Thermal behaviour, and magnetic properties*, Ferrites : Proceedings of the eighth international conference on ferrites (ICF 8), Kyoto and Tokyo, Japan, 766-768 (2000)
- 25 Watanabe, H. Seto, J., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, 395-399 (1993)
- 26 Preudhomme, J., *Ann. Chim.*, **9**, 31-41 (1974)
- 27 Jolivet, J.P., Massart, R., Fruchart, J.M., *Nouv. J. Chim.*, **7**, 325 (1983)
- 28 Marmier, N., Delisée, A., Fromage, F., *J. Colloid. Interface Sci.*, **211**, 54-60 (1999)
- 29 Hunter, R.J., *Foundations of colloid science*, 2nd Ed., Oxford university press, New York (2001)
- 30 Hunter, R.J., *Zeta potential in colloid science. Principles and applications*, Academic press, London (1986)
- 31 Bouchami, T., Thèse de l'université Paris 6 (1990)
- 32 Dupraz, A.M.P., de Wijn, J.R., Meer, S.A.T., de Groot, K., *J. Biomed. Mater. Res.*, **30**, 231-238 (1996)
- 33 Fauconnier, N., Bee, A., Roger, J., Pons, J.N., *Prog. Colloid Polym. Sci.*, **100**, 212-216 (1996)
- 34 Fauconnier, N., Pons, J.N., Roger, J., Bee, A., *J. Colloid. Interface Sci.*, **194**, 427-433 (1997)
- 35 Massart, R., Neveu, S., Cabuil-Marchal, V., Brossel, R., Fruchart, J.-M., Bouchami, T., Roger, J., Bee-Debras, A., Pons, J.-N., Carpentier, M., *Brevet FR. n°2 662 539* (1990)
- 36 Dumazet-Bonnamour, I., Le Perchec, P., *Colloid Surf. A*, **173**, 61-71 (2000)
- 37 Plueddemann, E.P., *Silane coupling agent*, 2nd ed., Plenum Press, New York and London (1991)

- 38 Le Bars, O., *Traitement spécifique d'une surface de silice : Influence sur la formation et la structure d'un dépôt de polypyrrole conducteur*, Thèse de l'Université Paris 6 (1997)
- 39 Knox, J.H., Pryde, A., *J. Chromatogr.*, **112**, 171-188 (1975)
- 40 Engelhardt, H., Mathes, D., *J. Chromatogr.*, **142**, 311-320 (1977)
- 41 Angeletti, E., Canepa, C., Martinetti, G., Venturello, P., *Tetrahedron Letters*, **29(18)**, 2261-2264 (1988)
- 42 Carlier, E., Guyot, A., Revillon, A., Llauro-Darricades, M.F., Petiaud, R., *React. Polym.*, **16**, 41-49 (1991)
- 43 Battistel, E., Bianchi, D., Rialdi, G., *Pure & Appl. Chem.*, **63(10)**, 1483-1490 (1991)
- 44 Kneuer, C., Sameti, M., Haltner, E.G., Schiestel, T., Schirra, H., Schmidt, H., Lehr, C.-M., *Int. J. Pharm.*, **196**, 257-261 (2000)
- 45 Arkles, B., Steinmetz, J.R., Zazyczny, J., Mehta, P., *Silane and other coupling agents*, Mittal, K.L. Ed., VSP, 91-104 (1992)
- 46 Plueddemann, E.P., *Silane and other coupling agents*, Mittal, K.L. Ed., VSP, 3-19 (1992)
- 47 Plueddemann, E.P., molecular characterization of composite interface, Plenum Press, New York and London, Ishida, H., Kumer, G. Eds (1985)
- 48 Osterholtz, F.D., Pohl, E.R., *Silane and other coupling agents*, Mittal, K.L. Ed., VSP, 119-141 (1992)
- 49 Leyden, D.E., Atwater, J.B., *Silane and other coupling agents*, Mittal, K.L. Ed., VSP, 143-157 (1992)
- 50 Schmidt, von H., Kaiser, A., *Glastechn. Ber.*, **54(10)**, 338-342 (1981)
- 51 Ishida, H., Koenig, J.L., *Appl. Spectros.*, **32(5)**, 462 (1985)
- 52 Ishida, H., Naviroj, S., Tripathy, S.K., Fitzgerald, J.J., Koenig, J.L., *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.*, **20**, 701-718 (1982)
- 53 Moses, P.R., Wier, L.M., Lennox, J.C., Murray, R.W., *Anal. Chem.*, **50**, 576 (1976)
- 54 Trens, P., Denoyel, R., Rouquerol, J., *Langmuir*, **11(2)**, 551-554 (1995)
- 55 Yuan, W., van Ooij, W.J., *J. Colloid Interfaces Sci.*, **185**, 197-209 (1997)
- 56 Leung, Y.L., Yang, Y.P., Wong, P.C., Mitchell, K.A.R., *J. Mater. Sci. Lett.*, **12**, 844-846 (1993)
- 57 Jung, C.W., *Magn. Reson. Imaging*, **13(5)**, 675-691 (1995)
- 58 Vrancken, K.C. Van Der Voort, P., Possemiers, K., Grobet, P., Vansant, E.F., *Chemically modified surfaces*, Peseck, J.J., Leigh, I.E. Eds., The Royal society of chemistry, 46-57 (1994)
- 59 Whitehead, R.A., Chagnon, M.S., Groman, E.V., Josephson, L., *U.S. Patent n°4695393*, (1987)
- 60 Groman, E., Josephson, L., Lewis, J., *World Patent WO 88/00060* (1988)
- 61 Lesniak, C., Schiestel, T., Nass, R., Schmidt, H., *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.*, **432**, 169-174 (1997)
- 62 Lesniak, C., Schiestel, T., Schmidt, H., Jordan, A., *World Patent WO 98/58673* (1998)
- 63 Xu, Z., Qingxia, L., Finch, J.A., *surfaces of nanoparticles and porous materials*, Schwarz, J.A., Contescu, C.I. Eds., 31-50, **78**, surface Science series Marcel Dekker, New York (1999)
- 64 Xu, Z., Qingxia, L., Finch, J.A., *Appl. Surf. Sci.*, **120**, 269-278 (1997)
- 65 Zhang, Y., Kohler, N., Zhang, M., *Biomaterials*, **23**, 1553-1561 (2002)
- 66 Tsubokawa, N., Maruyama, K., Sone, Y., Shimomura, M., *Polym. J.*, **21**, 475-481 (1989)
- 67 Espiard, P., Guyot, A., *polymer*, **36**, 4391-4395 (1995)
- 68 Maher, A., *Ciments pour le scellement de prothèses articulaires à base de monomères (méth)acriliques et d'alumine modifiée*, Thèse de l'Université Bordeaux I (1998)
- 69 Plueddemann, E., Stark, G.L., *28th annual technical conference, Reinforced plastics/Composites institute*, The society of the pastics industry Inc., **21-E**, 1-12 (1973)
- 70 Kaas, R.L., Kardos, J.L., *Polym. Eng. Sci.*, **11(1)**, 11-18 (1971)
- 71 Ishida, H., Koenig, J.L., *J. Colloid. Interface Sci.*, **64(3)**, 578 (1978)
- 72 Chiang, C. Ishida, H. Koenig, J.L., *J. Colloid. Interface Sci.*, **74(2)**, 396-404 (1980)
- 73 Boerio, F.J., Schoenlein, L.H., Greivenkamp, J.E., *J. Appl. Polym. Sci.*, **22**, 203 (1978)
- 74 Plueddemann, E., *Interfaces in polymer matrix composites*, Broutman, L.J., Knock, R.H., Eds., **6**, 15, Acad. Press, New York (1974)
- 75 Ishida, H., *Adhesion aspect of polymeric coatings*, Mittal, K.L., Ed., Plenum press, 68 (1983)
- 76 Arkles, B., *Tailoring surfaces with silanes*, Chemtech, **7**, 35-48 (1977)
- 77 Ung, T., Liz-Marzán, L.M., Mulvaney, P., *Langmuir*, **14**, 3740-3748 (1998)

- 78 Scarano, D., Zecchina, A., Bordiga, S., Geobaldo, F., Spoto, G., *J. Chem. Faraday, Trans.*, **89(22)**, 4123-4130 (1993)
- 79 Szostak, R., Nair, V., Thomas, T.L., *J. Chem. Faraday, Trans. I*, **83**, 487-494 (1987)
- 80 Farmer, V.C., *The infrared spectra of minerals*, Mineral society monograph 4, Farmer, V.C., Ed., 361-362, London (1974)
- 81 Jang, J., Kim, E.K., *J. Appl. Polym. Sci.*, **71**, 585-593 (1999)
- 82 Boerio, F.J., Cheng, S.Y., Armogan, L., Williams, J.W., Gosselin, C., *35th annual technical conference, Reinforced plastics/Composites institute*, The society of the pastics industry Inc., **23-C**, 1-17 (1980)
- 83 Montemor, M.F., Simões, A.M., Ferreira, M.G.S., Williams, B., Edwards, H., *Prog. Org. Coat.*, **38**, 17-26 (2000)
- 84 Turner, M.R., Duguet, E., Labrugère, C., *Surf. Interface Anal.*, **25**, 917-923 (1997)
- 85 Hesse, J., Rubartsch, A., *J. Phys. E. Sci. Instrum.*, **7**, 526 (1974)
- 86 Greenwood, N.N., Gibb, T.C., *Mössbauer Spectroscopy*, Chapman and Hall, London, 246-248 (1971)
- 87 Bauminger, R., Cohen, S.G., Marinov, A., Ofer, S., Segal, E., *Phys. Rev.*, **122**, 1447-1450 (1961)
- 88 Kelly, W.H., Folen, V.J., Hass, M., Schreiner, W.N., Beard, G.B., *Phys. Rev.*, **124**, 80-84 (1961)
- 89 Armstrong, R.J., Morrish, A.H., Sawatzky, G.A., *Phys. Letters*, **23**, 414, (1966)
- 90 Etourneau, J., Portier, J., Ménil, F., *J. Alloys Comp.*, **188**, 1-7 (1992)
- 91 Shafi, K.V.P.M., Ulman, A., Dyal, A., Yan, X., Yang, N.-L., Estournès, C., Fournès, L., Xattiaux, A., White, H., Rafailovich, M., *Chem. Mater.*, **14**, 1778-1787(2002)
- 92 Mulvaney, P., Liz-Marzán, L.M., Giersig, M., Ung, T., *J. Mater. Chem.*, **10**, 1259-1270 (2000)
- 93 Buining, P.A., Humbel, B., M., Philipse, A.P., *Langmuir*, **13**, 3921-3926 (1997)
- 94 Chang, S.-Y., Liu, L., Asher, S.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 6745-6747 (1994)
- 95 Fu, X., Qutubuddin, S., *Colloid Surf. A*, **179**, 65-70 (2001)
- 96 Mahtab, R., Rogers, J.P., Murphy, C.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **117(35)**, 9099-9100 (1995)
- 97 Murphy, C.J., Brauns, E.B., Gearheart, L., *Mat. Res. Symp. Proc.*, **452**, 597-600 (1997)
- 98 Chan, W.C.W., Nie, S., *Science*, **281**, 2016-2018 (1998)
- 99 Yin, Y.Y., Gates, B., Xia, Y., *Chem. Mater.*, **13(4)**, 1146-1148 (2001)
- 100 Battistel, E., Bianchi, D., Rialdi, G., *Pure & Appl. Chem.*, **63**, 1483-1490 (1991)
- 101 Angeletti, E., Canepa, C., Martinetti, G., Venturello, P., *Tetrahedron Letters*, **29(18)**, 2261-2264 (1988)
- 102 Kneuer, C., Sameti, M., Haltner, E.G., Schiestel, T., Schirra, H., Schmidt, H., Lehr, C.-M., *Int. J Pharm.* **196**, 257-261 (2000)
- 103 Schiestel, T., Schirra, H., Gerwann, J., Lesniak, C., Kalaghi-Nafchi, A., Borchard, G., Haltner, E., Lehr, C.-M., Schmidt, H., *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.*, **530**, 65-71 (1998)
- 104 Liu, Q., Xu, Z., Finch, J.A., Egerton, R., *Chem. Mater.*, **10(12)**, 3936-3940 (1998)
- 105 Philipse, A.P., van Bruggen, M.P.B., Pathmamanoharan, C., *Langmuir*, **10**, 92-99 (1994)
- 106 Liesbeth, N.D., Philipse, A.P., Suurmond, J., *Langmuir*, **13**, 6018-6025 (1997)
- 107 Liesbeth, N.D., Philipse, A.P., *J. Colloid Interface Sci.*, **212**, 14-23 (1999)
- 108 Stöber, W., Fink, A., *J. Colloid Interface Sci.*, **26**, 62-69 (1968)
- 109 Chanéac, C., Tronc, E., Jolivet, J.P., *J.Mater.Chem.*, **6(12)**, 1905-1911 (1996)
- 110 Tronc, E., Chanéac, C., Jolivet, J.P., *Non-crystalline and nanoscale materials*, Rivas, R., López-Quintela, M.A., Eds., 262-271 (1997)
- 111 Salager, J.L., *Surfactant Sci. Ser.*, **82**, 253-302 (1999)
- 112 Ruckenstein, E., Chi, J.C., *J. Chem. Soc. Faraday Trans II*, **71**, 1690 (1975)
- 113 Schulman, J.H., McRoberts, T.S., *Trans Faraday Soc.*, **42B**, 165 (1946)
- 114 Pileni, M.P., *Langmuir*, **13**, 3266-3276 (1997)
- 115 Arriagada, F.J., Osseo-Asare, K., *Colloid Surf. A*, **154**, 311-326 (1999)
- 116 Arriagada, F.J., Osseo-Asare, K., *J. Colloid Interface Sci.*, **211**, 210-220 (1999)
- 117 Daubresse, C., *Immobilisation de la papaine sur polyuréthane anionique*, Thèse de l'université de Liège, (1993)

CHAPITRE III

GREFFAGE DES MACROMOLECULES DE DEXTRAN ET « HABILLAGE » DES VECTEURS

Les deux dernières étapes dans la conception du vecteur magnétique doivent permettre respectivement la stabilisation en milieu physiologique des nanoparticules de maghémite modifiées par l'APS et leur fonctionnalisation, cette fois au sens biomédical du terme. Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi le greffage du dextran pour les raisons évoquées dans le chapitre I. Les macromolécules de dextran peuvent en effet jouer un double rôle : celui de stabilisateur au sens colloïdal et celui d'agent de couplage, permettant l'« habillage » ultime du vecteur selon l'application visée. Le système maghémite-APS-dextran constitue alors le vecteur de base dont les possibilités de « design » en surface conduisent à autant de déclinaisons différentes.

La première partie de ce chapitre est consacrée à l'étude du greffage du dextran sur les nanoparticules aminées. La deuxième partie est consacrée au couplage d'un poly(oxyde d'éthylène) aminotélchélique et au marquage par des molécules fluorescentes. Enfin, la dernière partie présente les premiers résultats des tests en milieux biologiques.

1. Stabilisation des nanoparticules fonctionnalisées en milieu physiologique par greffage de dextran

1.1 Principe de la stabilisation stérique

La stabilisation stérique est générée par la présence de macromolécules adsorbées à la surface des nanoparticules. L'utilisation de polymères non-ioniques pour la stabilisation des

sols colloïdaux est décrite par Napper¹⁻³. Cette méthode présente certains avantages par rapport à la stabilisation électrostatique. Notamment, la stabilité de ces sols est peu sensible aux variations de pH et de force ionique, les électrolytes n'ayant que peu d'effets sur l'extension des chaînes polymère. De plus, ce type de stabilisation reste efficace quelle que soit la concentration en particules.

La stabilisation stérique résulte des répulsions mutuelles des chaînes polymère générées lorsque deux nanoparticules se rapprochent. Ainsi les interactions polymère-solvant (χ_{PS}) doivent être favorables par rapport aux interactions polymère-polymère (χ_{PP}). En d'autres termes, le milieu de dispersion doit être un bon solvant ($\chi_{PS} < 0,4$) pour que les macromolécules solvatées présentent un rayon de giration maximal de façon à créer une barrière de stabilisation. Pour flocculer ce type de dispersion, il suffit alors d'augmenter ce paramètre d'interaction, en abaissant la qualité du solvant par l'ajout d'un non-solvant ou l'abaissement de la température. Ces comportements font appel à la théorie de Flory⁴ qui permet de prédire le comportement des polymères en solution, comme la température critique de floculation corrélée au point θ du système.

D'autres paramètres tels que le mode de fixation des macromolécules, la masse molaire moyenne ou la densité de greffage interviennent dans les processus de stabilisation stérique. Les propriétés des chaînes greffées en fonction de ces paramètres sont décrites dans le cadre de la théorie d'Alexander-De Gennes⁵⁻⁶ qui fait appel au concept de volume exclu et s'applique aux macromolécules neutres et flexibles. Le cas le plus favorable, pour générer des répulsions stériques effectives, est l'utilisation de chaînes longues isomoléculaires interagissant en de nombreux points d'ancrages avec la surface. Or ces trois conditions sont difficiles à remplir simultanément. De plus, il est également important que les macromolécules soient fortement liées à la surface. Les copolymères à blocs ($A_x B_y A_z B_n \dots$), constitués d'au moins un bloc insoluble (A ou B) dans le milieu de dispersion, sont de bons stabilisants stériques, car ils permettent d'augmenter l'énergie d'adhésion. Cependant les densités de recouvrement sont faibles en raison de la surface élevée occupée par les blocs insolubles. Le greffage covalent, qui met en jeu des énergies d'ancrage élevées (>100 kT), peut permettre d'atteindre des régimes de greffage de haute densité tout en maintenant une bonne stabilité chimique avec la surface.

1.2 Greffage du dextran sur les nanoparticules de maghémite aminées

Le dextran est un polysaccharide naturel du glucose lié en α -1,6 (Fig. 1.1), synthétisé par des bactéries (*leuconostoc mesenteroïdes* B512) à partir du saccharose. Ce polymère possède un faible taux de ramification en α -1,3 de l'ordre de 5 %, négligé dans le cadre de cette étude. La masse molaire en poids (\overline{M}_w) peut être contrôlée par hydrolyse partielle suivie d'une procédure de fractionnement.

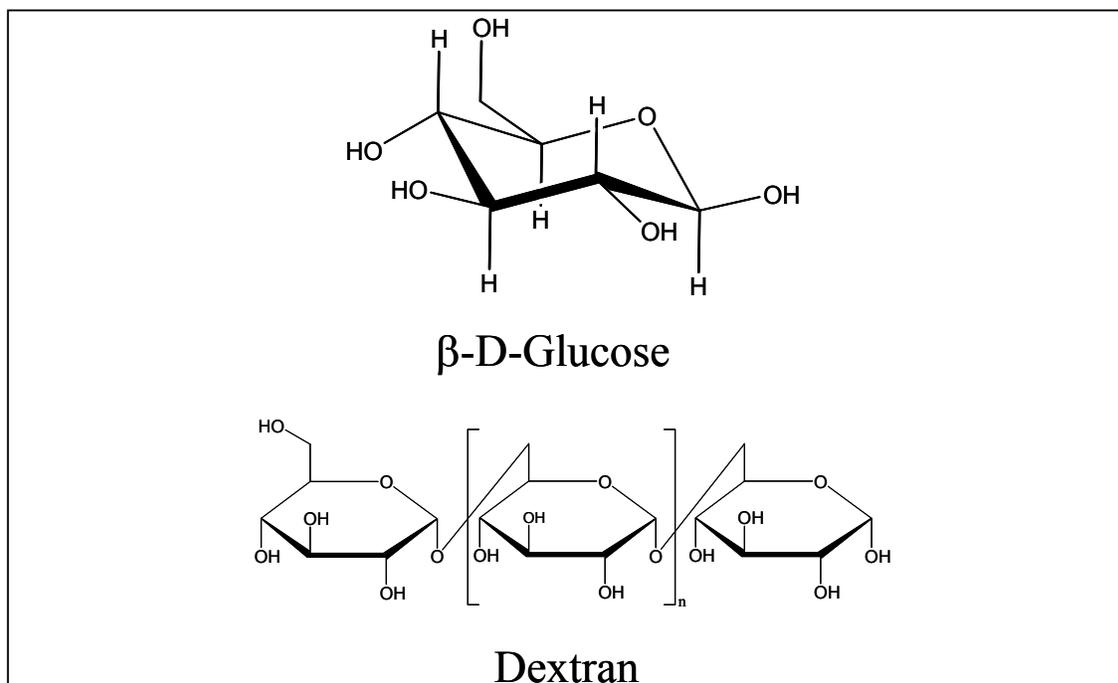


Figure 1.1. Formules chimiques développées du glucose et du dextran

Les amines présentes à la surface des nanoparticules de maghémite permettent le greffage du dextran, à condition d'activer celui-ci en créant le long des macromolécules des fonctions chimiques susceptibles de réagir avec elles.

1.2.1 Voie réactionnelle retenue

Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi de coupler le dextran via des liaisons imines (bases de Schiff). Cette méthode, couramment utilisée pour le couplage d'acides aminés ou de protéines sur les polysaccharides⁷, est réalisée en deux étapes (Fig. 1.2) :

✓ la première consiste à activer les groupements OH des cycles glucosidiques du dextran par du métapériodate de sodium. La réaction impliquée est une oxydation ménagée qui transforme les diols vicinaux en deux fonctions aldéhydes sur les carbones 2-3,

✓ dans la seconde étape, le dextran activé est mis en présence des particules fonctionnalisées. Les sites aldéhydiques peuvent ensuite réagir avec les groupements amines pour former les bases de Schiff. Ces dernières peuvent ensuite être stabilisées en amines secondaires par réduction avec le borohydrure de sodium.

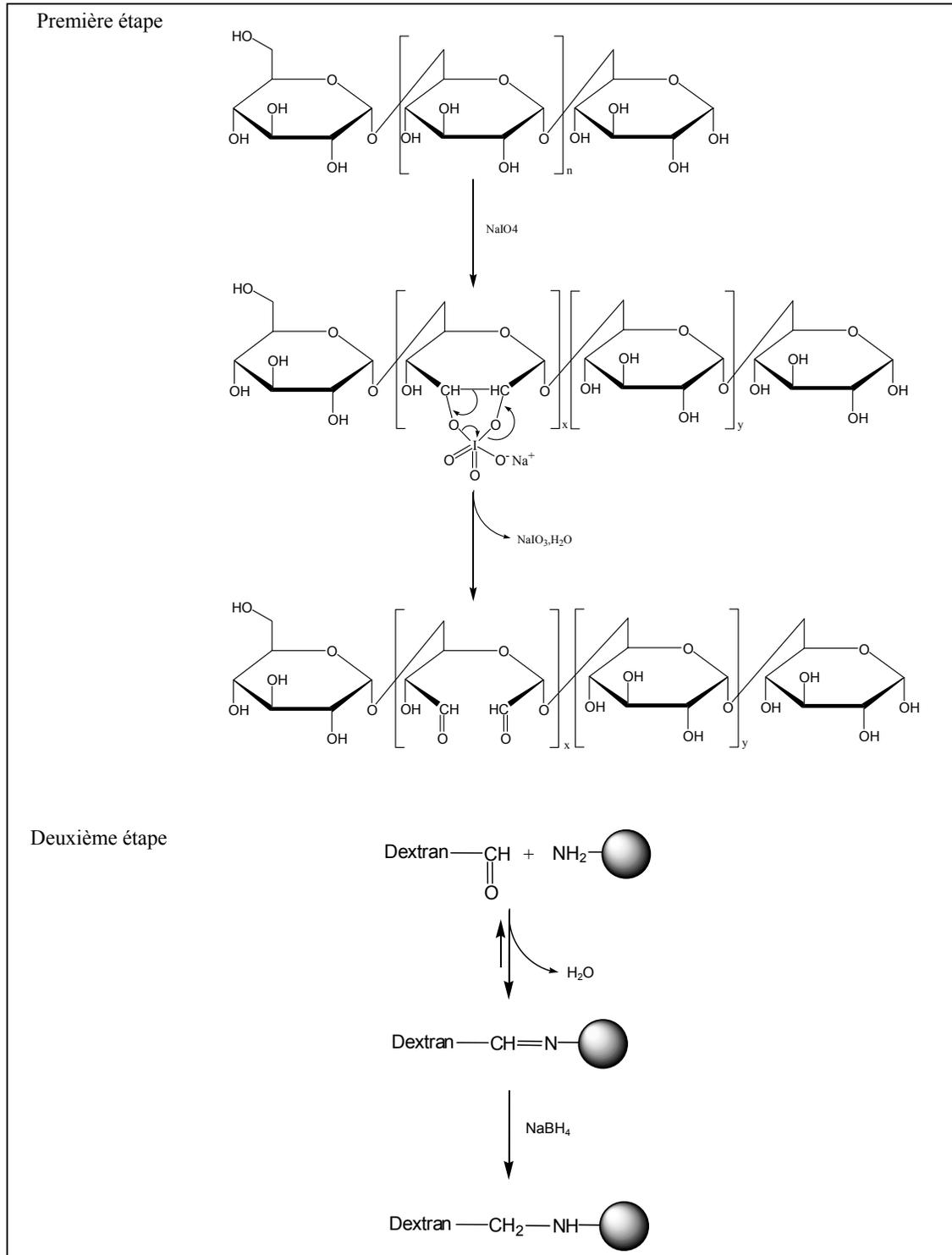


Figure 1.2. Schéma réactionnel retenu pour le couplage du dextran sur les nanoparticules de maghémite.

1.2.2 Activation du dextran

Pour jouer son rôle d'agent de couplage, le dextran doit pouvoir réagir non seulement avec les fonctions amines de la maghémite, mais également avec les molécules qui seront greffées à sa surface par la suite. Aussi, afin de limiter le nombre d'étapes de synthèse, le taux d'oxydation est-il choisi de façon à ce que l'excès de fonctions aldéhyde puisse être mis à profit pour les greffages ultérieurs. De plus, le nombre de sites réactionnels doit être suffisamment élevé, pour augmenter la probabilité de rencontre avec les sites de surface aminés. Le nombre de mole de métaperiodate de sodium est choisi arbitrairement égal à 1/3 du nombre de moles de résidus glucosidique ($n_{\text{NaIO}_4} = n_{\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6} / 3$). Ce paramètre sera susceptible d'être optimisé dans le cadre d'études ultérieures.

L'expansion des chaînes est favorisée pour des solutions diluées en dextran. Dans le cadre de cette étude, on utilise une concentration de (5 g/L) de façon à se placer en excès ($\times 50$) par rapport au nombre d'amines de surface. Afin d'examiner l'influence de la masse moléculaire, l'expérience est menée avec des dextrans de différents poids moléculaires.

Mode opératoire de l'activation du dextran par NaIO_4 : une masse de 10 g de dextran ($M_w = 5000$ (T5), 20000 (T20), 40000 (T40), 70000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (T70), Sigma) est ajoutée dans 200 mL d'eau ultrapure. Après solubilisation du polymère, 10 mL d'une solution à 2,06 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaIO_4 (Aldrich, 99,8%) sont versés dans le mélange. La réaction est laissée 12 h sous agitation. A l'issue de cette étape d'oxydation, il est nécessaire d'éliminer les sels periodiques du milieu pour éviter la floculation du ferrofluide. La solution, jaune pâle, est versée dans un tube à dialyse en cellulose (seuil de coupure 12 400 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, Aldrich). La dialyse est réalisée dans un bêcher de 5 L contenant de l'eau ultrapure. L'eau est renouvelée 5 fois toutes les 10 heures. Le volume de la solution de dextran activé est ensuite mesuré, puis le mélange est stocké au réfrigérateur à 4°C. Dans tout les cas les tests de Felhing permettant de révéler la présence des aldéhydes se sont avérés positifs. Les dosages quantitatifs sont envisagés lors d'études futures afin de contrôler les rendements de la réaction de couplage.

1.2.3 Greffage du dextran sur la maghémite aminée

Mode opératoire du greffage du dextran sur la maghémite aminée : un volume équivalent à 1 g de dextran oxydé (T5, T20, T40, T70) est versé dans 20 mL de ferrofluide ($[\text{Fe}^{3+}] = 0,08 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) à pH 3. La solution est laissée sous agitation pendant 24 h, puis 10 mL de solution de borohydrure de sodium 0,206 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ est versé dans le mélange. La solution est laissée sous agitation pendant 4 h.

Lorsque cette réaction a été menée avec le ferrofluide EF18, les sols obtenus au final ont été systématiquement stables. Les codes d'expérience utilisés à la suite de cet exposé sont les suivants : MF18Tx avec $x=5, 20, 40, 70$ respectivement pour les dextrans T5, T20, T40 et T70 (voir aussi tableau de filiation en Annexe 3).

En revanche, avec le ferrofluide EF11 (maghémite-APS non-déshydratée), malgré les nombreux essais effectués dans des conditions opératoires diverses, l'étape de réduction au

borohydrure de sodium a systématiquement entraîné la floculation du sol. Nous supposons que la réactivité des amines étant inhibée par les nombreuses interactions avec le film polysiloxane et la surface de la maghémite, les points d'ancrage sont trop peu nombreux pour que le greffage covalent soit effectif. Par ailleurs, une contre-expérience a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires, avec le ferrofluide FF10 et le dextran T70 activé. On a pu observer, comme dans le cas précédent, la floculation du sol à l'étape d'addition du borohydrure de sodium.

Il est important de noter que le pH initial du ferrofluide modifié conditionne la taille finale des vecteurs. Pour obtenir des vecteurs de taille minimale, il faut donc choisir un pH pour lequel le ferrofluide est le plus stable, c'est-à-dire pH 3. En outre, afin d'hydrolyser les acétals qui se seraient éventuellement formés par réaction des fonctions aldéhydes avec les alcools du dextran, il est nécessaire de se placer en dessous de pH 4.

Afin d'éliminer l'excès de dextran, les lavages ont été réalisés dans un premier temps à partir de membranes à dialyse possédant un seuil de coupure de $100\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Spectrapor). Cette technique s'est avérée être inefficace pour les dextrans T20, T40 et T70. Seul le produit issu du couplage de l'EF18 avec le dextran T5 a pu être dialysé. Cependant, après 1 jour de dialyse ($2 \times 5\ \text{L}$ d'eau ultrapure), le sol devient turbide. Il a donc fallu trouver un moyen pour éliminer l'excès de dextran des autres sols. L'ultrafiltration tangentielle s'est avérée être la méthode la mieux adaptée à notre système.

Mode opératoire de la purification des sols de maghémite-dextran par ultrafiltration tangentielle : le système d'ultrafiltration (Fig. 1.3) est constitué d'une pompe péristaltique (Millipore N80EL005), de tuyauterie en silicone et d'une cartouche (Prep/Scale™-TFF) renfermant une membrane en poly(éther sulfone) de seuil de coupure égal à 100 kD. Le ferrofluide (environ 200 mL) est placé dans le réservoir de rétentat. Après passage du sol dans la membrane, 1 L d'eau est versé dans le réservoir afin de procéder au lavage. Le sol est lavé ainsi contre 3 L d'eau ultrapure. Le sol purifié est plus dilué, car le volume mort du système est de 100 mL environ. Une partie du produit reste colmaté à l'intérieur de la membrane. Celui-ci est cependant évacué après plusieurs heures de lavage.

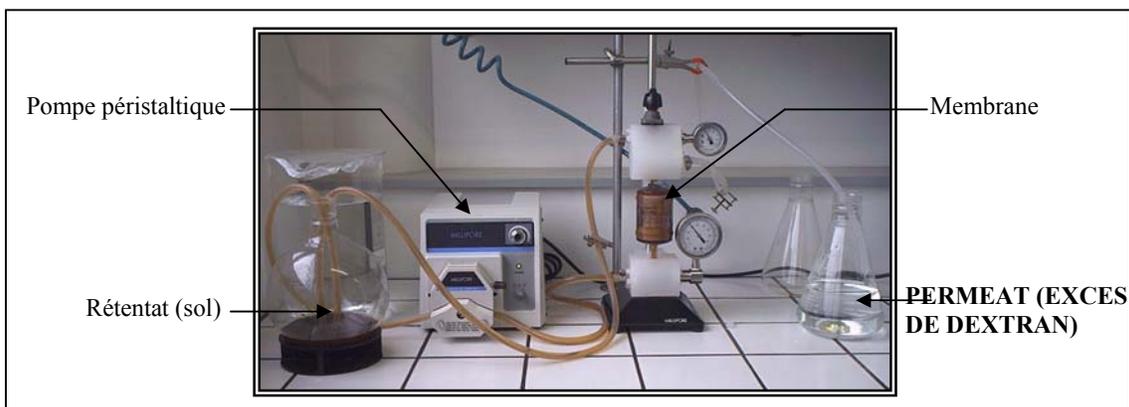


Figure 1.3. Description du système d'ultrafiltration tangentielle utilisé pour la purification des sols de maghémite-dextran

1.3 Influence de la masse molaire \overline{M}_w du dextran sur la taille des particules et le comportement des sols

Nous avons observé à l'issu du couplage du dextran que le sol MF18T5, préparé avec le dextran de faible poids moléculaire ($5\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), flocule au cours de la phase de lavage. Les clichés de microscopie électronique, présentés en figure 1.4, montrent que les nanoparticules sont partiellement agrégées. Nous avons vu que dans le cas des sols ioniques, la MET donnait peu d'indication concernant l'état d'agrégation des nanoparticules en solution. Le dextran permet ici de préserver la morphologie des particules lors du séchage sur la grille et de rendre compte de la taille des floccs présents en solution.

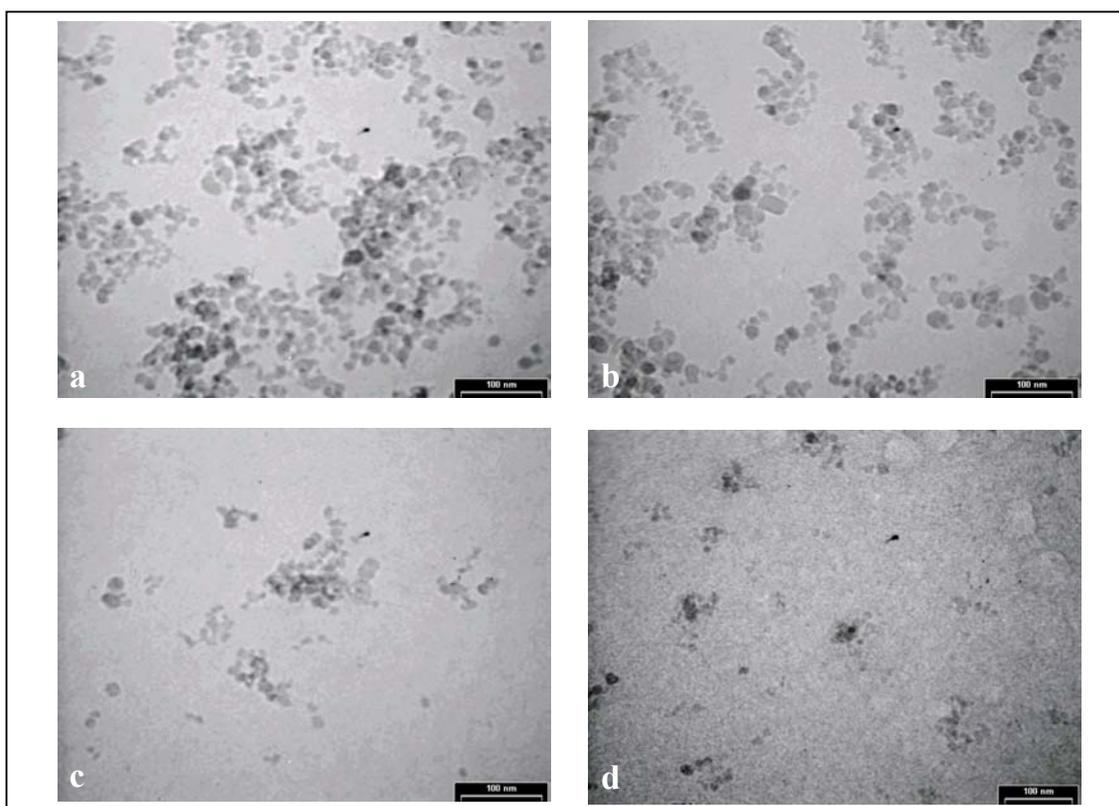


Figure 1.4. Micrographies de MET des sols MF18T5 (a), MF18T20 (b), MF18T40 (c) et MF18T70 (d). (barre d'échelle=100 nm).

Le cœur minéral des particules MF18T(5,20,40,70) est constitué d'un ensemble de nanoparticules de maghémite enrobés de dextran (invisible au MET). Cette morphologie est due au procédé de couplage. En effet, il est difficile d'éviter les phénomènes de pontage interparticulaires, même en utilisant des solutions concentrées en dextran. Néanmoins, nous observons une évolution en fonction de \overline{M}_w . Les particules MF18T5 se présentent sous la forme d'agrégats très polydisperses pouvant atteindre plusieurs centaines de nanomètres. La taille de ces agrégats et la polydispersité diminue lorsque la masse molaire du dextran

augmente. Sur les clichés c et d, nous pouvons observer de nombreux agrégats de faible taille, inférieure à 20 nm, des particules isolées et des agrégats de taille plus grande, de l'ordre de 50 à 100 nm.

Les mesures PCS confirment cette évolution. La figure 1.5 montre les distributions en nombre obtenues pour les trois sols MF18T20, MF18T40 et MF18T70.

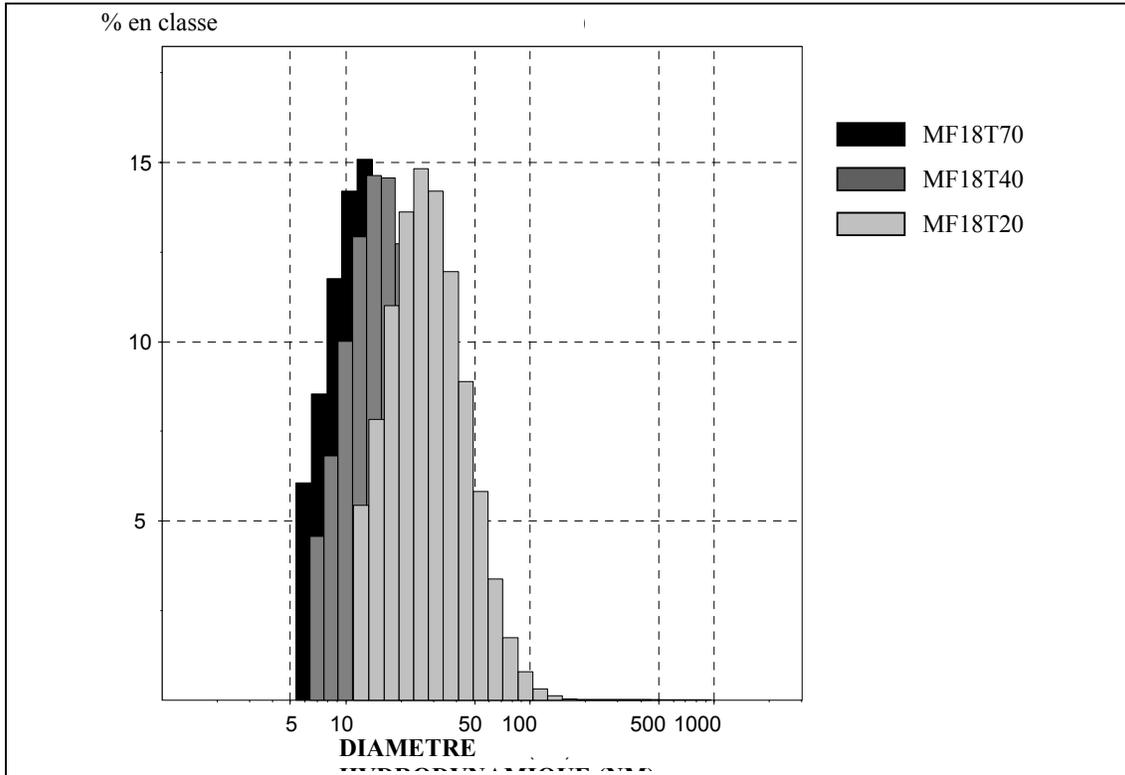


Figure 1.5. Distributions en nombre des particules MF18T20, MF18T40 et MF18T70

Le tableau 1.1 rassemble les différentes valeurs moyennes des diamètres hydrodynamiques mesurés pour ces trois échantillons, qui diminuent lorsque \overline{M}_w augmente.

Code exp.	\overline{d}_n (nm)	\overline{d}_v (nm)	\overline{d}_{PCS} (nm)
MF18T70	15	31,9	59,6
MF18T40	17,9	35,1	68,6
MF18T20	31,4	68,6	132,8
Ferumoxides ⁹ (Endorem [®])	36,1	58,5	227
Ferumoxtran ⁹ (Sinerem [®])	21,4	29,5	49,7

Tableau 1.1. Valeurs moyennes des diamètres en nombre, en volume et en intensité des nanoparticules MF18T20, MF18T40 et MF18T70.

Conformément à ce qui a pu être observé dans la littérature⁸, ce résultat montre que la masse molaire moyenne en poids des macromolécules est un facteur déterminant pour le contrôle de la taille des nanoparticules. L'épaisseur de la couche de dextran des particules MF18T5 n'est pas suffisamment élevée pour générer les répulsions stériques nécessaires à la stabilisation du

sol. En comparant avec les produits de contraste commercialisés, les particules MF18T(20,40,70) sont plus petites que l'Endorem[®] et le produit MF18T70 est comparable au Sinerem[®]. La taille de ces particules pourra être améliorée soit en jouant par fractionnement sur colonnes chromatographique ou par précipitation contrôlée du produit fini, soit en diminuant la taille du cœur minéral en jouant sur les processus de nucléation.

1.4 Mise en évidence du greffage par spectroscopie DRIFT

Mode opératoire de la préparation des échantillons de dextran activé pour la spectroscopie DRIFT : un prélèvement de 5 mL de solution de dextran T70 oxydé est versé dans 10 mL d'éthanol afin de le précipiter. Le surnageant est ensuite éliminé et le dextran est lavé avec 3 x 10 mL d'éthanol avant d'être placé à l'étuve sous vide à 60°C. La préparation des échantillons pour la spectrométrie est réalisée selon le mode opératoire décrit dans le chapitre II (§ 1.4.1c).

Les spectres du dextran T70, avant et après activation au métapériodate de sodium, sont présentés en figure 1.6 (a et b).

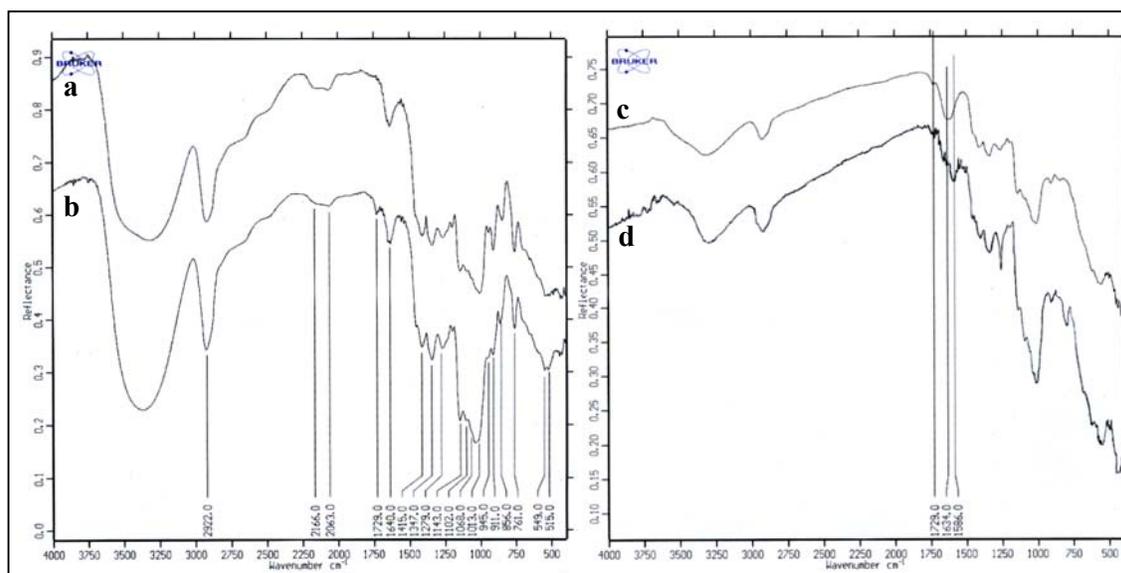


Figure 1.6. Spectres DRIFT du dextran avant (a) et après (b) oxydation au métapériodate de sodium, de la maghémite modifiée EF18 couplée au dextran T70 oxydé (MF18T70), avant (c) et après (d) réduction au borohydride de sodium.

La signature du dextran est caractérisée par une forêt de pics située au-dessous de 1000 cm^{-1} , attribuée aux vibrations du cycle α -D-glucopyranose. Les nombreuses bandes situées dans la région comprise entre 1200 et 1000 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations de valence ν_{C-O} des fonctions éthers et hydroxyles. La bande forte à 2922 cm^{-1} caractérise les vibrations de valence ν_{C-H} des liaisons C-H saturées. La large bande à 3450 cm^{-1} est due aux vibrations de valence des groupes hydroxyle, liés entre eux à différents degrés par des liaisons hydrogène.

Nous retrouvons, sur le spectre de la figure 1.6b, la même signature avec cependant quelques nuances apportées par l'oxydation d'une partie des cycles glucopyranosiques. L'épaule, présent sur la bande large à 3450 cm^{-1} du spectre du dextran, a disparu dans le spectre du dextran oxydé. Cela signifie que l'oxydation a modifié le taux de liaisons hydrogène en remplaçant une partie des hydroxyles par des fonctions aldéhyde. La seule différence notable entre les deux spectres est la présence sur le spectre (b) de la bande d'intensité moyenne, à 1729 cm^{-1} , caractéristique des vibrations de valence $\nu_{\text{C=O}}$ des aldéhydes saturés.

Les spectres des produits MF18T70 avant et après réduction au borohydrure de sodium sont montrés sur la figure 1.6 (c et d). On retrouve l'empreinte caractéristique du dextran oxydé. La bande située à 1634 cm^{-1} s'est élargie et décalée de 10 cm^{-1} par rapport à celle du dextran. Cet élargissement est dû à la bande de valence $\nu_{\text{C=N}}$ qui vient se superposer à celle du dextran. Sur le spectre du produit MF18T70 réduit, la bande de valence des bases de Schiff a disparu. Il présente une nouvelle bande à 1586 cm^{-1} attribuée au mode de déformation des amines secondaires δ_{NH} .

1.5 Comportement du sol de nanoparticules couplées au dextran en fonction du pH et de la force ionique du milieu

La présence du dextran à la surface de la maghémite fonctionnalisée permet de stabiliser les sols, quel que soit le pH du milieu. La figure 1.7 montre les mesures du potentiel zêta en fonction du pH du produit MF18T70 réduit.

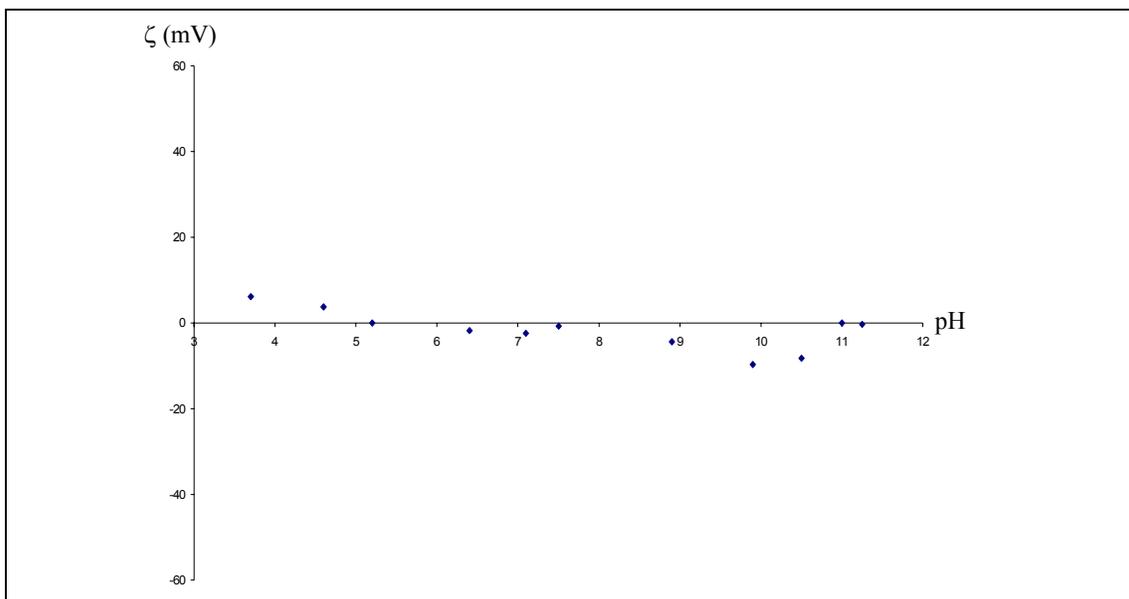


Figure 1.7. Mesures de potentiel zêta en fonction du pH des particules MF18T70.

Les valeurs de potentiel sont faibles comparées à celles qui avaient été mesurées dans le cas des sols ioniques. Le dextran est un polymère neutre. Par conséquent, le couplage de ces macromolécules neutralise la surface des nanoparticules ce qui explique les faibles valeurs de potentiel zêta (ou de mobilité électrophorétique).

La concentration en électrolyte n'a aucune influence sur la stabilité des sols de MF18T70. La figure 1.8 montre deux mesures de potentiel zêta dans le cas d'une solution saline de concentration égale à 150 mM en NaCl, à pH 7 et pour un tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) à 150 mM de pH 7,4. Bien que les valeurs de potentiel zêta soient pratiquement nulles, les sols de maghémite modifiée, couplée avec le dextran, restent stables dans ces milieux, montrant qu'il s'agit bien d'une stabilisation stérique.

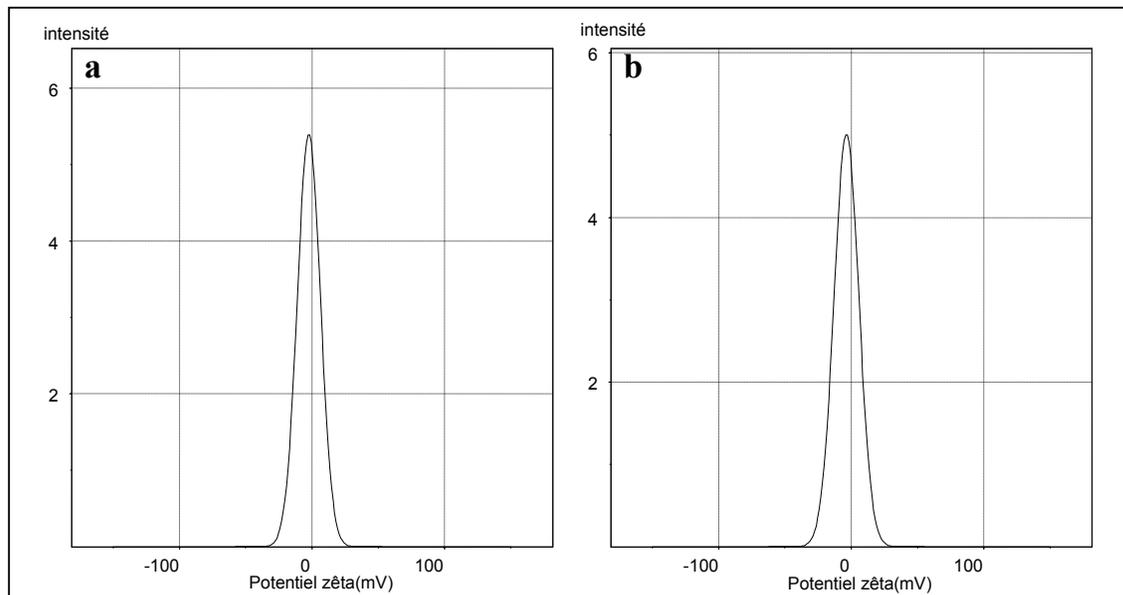


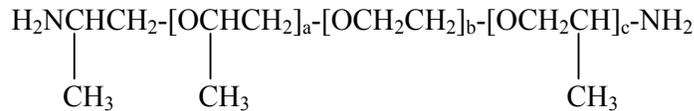
Figure 1.8. Mesures de potentiel zêta des nanoparticules MF18T70 : (a) dans une solution de NaCl à 150 mM (pH 7), dans un tampon PBS (pH 7,4) à 50 mM.

Ainsi, les nanoparticules de maghémite-silane-dextran remplissent un grand nombre de conditions définies dans le cahier des charges pour qu'elles soient administrées par voie intraveineuse. En effet, elles sont stables en milieu fortement salin et à pH 7. Leur surface est neutre et leur taille, de l'ordre de 50 nm, est suffisamment faible. Le dextran couplé à la surface possède des aldéhydes disponibles pour greffer des molécules bioactives comme des médicaments, ou des fluorochromes.

2. « Habillage » des vecteurs par un poly(oxyde d'éthylène) fonctionnalisé et marquage par des fluorochromes

Dans le cadre de la problématique définie dans le chapitre I (§ 4.1), il est nécessaire d'augmenter la demi-vie plasmatique des nanoparticules. Le greffage de macromolécules de poly(oxyde d'éthylène) doit permettre d'allonger ce temps de séjour dans le système vasculaire. Leur greffage via un dérivé aminotélechélique est l'objet de la première partie de ce paragraphe.

Dans le cadre de cette étude de faisabilité, le produit MF18T70 a été modifié par la Jeffamine[®]2003 ($M_w=2000$ g/mol, Hunstman) de formule développée :



avec $a + c = 5$ et $b \approx 39,5$. L'intérêt de ces oligomères présentant une fonction amine à chacune de leur extrémité est de permettre à la fois l'ancrage sur le dextran (selon une extrémité via l'établissement d'un pont imine avec des fonctions aldéhydes résiduelles) et le greffage de nouvelles espèces moléculaires (à l'autre extrémité). Bien évidemment, les deux fonctions chimiques étant de même nature, il faut éviter le greffage de boucles de macromolécules (greffage au dextran via les deux extrémités) en utilisant un large excès d'oligomères ($n_{\text{ED2003}} = 5n_{\text{NaIO}_4} = 5n_{\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6} / 3$) par rapport au nombre de fonctions aldéhyde du dextran.

Le couplage de ce type de macromolécules sur les nanoparticules magnétiques doit permettre dans un deuxième temps de greffer des fluorochromes, des agents de ciblage (peptides, acide folique...) selon l'application recherchée. Néanmoins, dans le cadre de la problématique définie dans le chapitre I (§ 4.1), il sera nécessaire d'ajuster le nombre de fonctions amines, porteuses de charges positives, par exemple en couplant simultanément une Jeffamine[®] monoamine.

2.1 Greffage de la Jeffamine[®] ED2003 à la surface des nanoparticules de maghémite-APS-dextran

2.3.2 Greffage de la Jeffamine[®]

Mode opératoire du greffage de la Jeffamine ED2003 à la surface des particules maghémite-dextran : un volume équivalent à 1 g de dextran T70 oxydé est versé dans 20 mL de ferrofluide EF18

($[Fe^{3+}] = 0,08 \text{ mol.L}^{-1}$) à pH 4. La solution est placée sous agitation pendant 24 h, afin que le dextran puisse s'adsorber et réagir avec les amines de surface. L'excès de dextran est ensuite éliminé par ultrafiltration tangentielle contre 3 L d'eau ultrapure. Une solution contenant 20,5 g de Jeffamine ED2003, diluée dans 100 mL d'eau, est ajustée à pH 4 par addition d'acide nitrique concentré. Cette solution est ajoutée au sol de MF18T70 non réduit, sous agitation. Le borohydrure de sodium est alors ajouté (10 mL de concentration égale à $0,206 \text{ mol.L}^{-1}$). Après 4 h d'agitation, l'excès de Jeffamine est éliminé sous ultrafiltration tangentielle contre 5 L d'eau ultrapure.

Ce mode opératoire a été appliqué avec les nanoparticules de maghémite modifiées EF19 et EF20 menant, dans tous les cas, à un sol stabilisé.

2.3.3 Détermination de la taille des nanoparticules couplées à la Jeffamine

La taille des nanoparticules a été déterminée par granulométrie PCS. La figure 2.1 présente les distributions en nombre des nanoparticules MF18T70, MF19T70 et MF20T70 avant et après couplage à la Jeffamine ED2003.

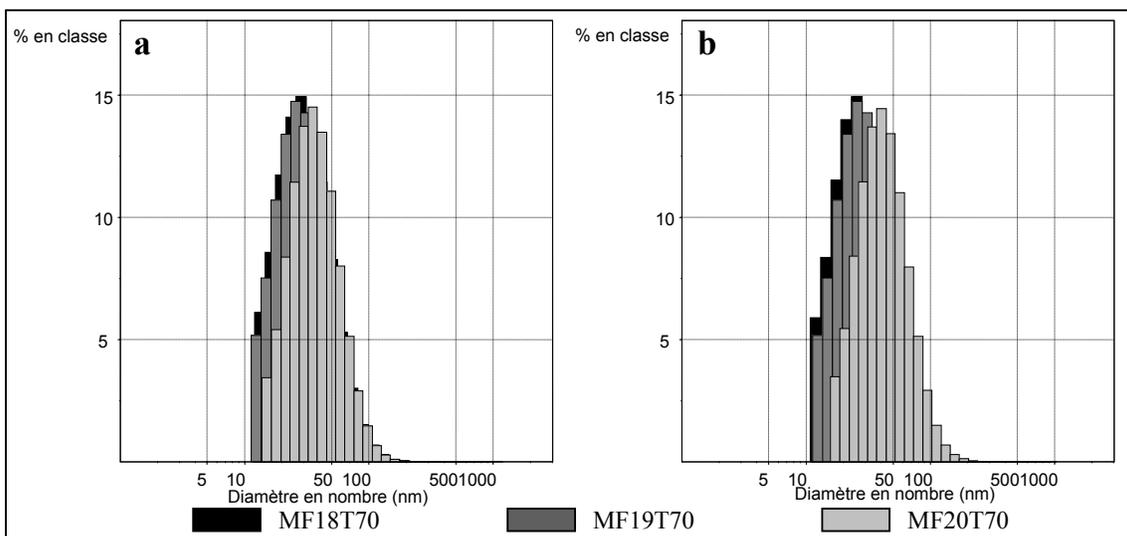


Figure 2.1. Distributions des diamètres hydrodynamiques en nombre des nanoparticules MF(18,19,20)T70 avant (a) et après (b) couplage à la Jeffamine ED2003.

Les distributions des nanoparticules synthétisées à partir des produits EF18 et EF19 sont semblables. La distribution des diamètres des nanoparticules, issues du greffage du dextran et de la Jeffamine sur le produit EF20, est plus large et légèrement décalée vers les grandes tailles du fait d'une moins bonne stabilisation du sol initial. Les valeurs des diamètres hydrodynamiques, mesurés par PCS, sont réunies dans le tableau 2.1.

Nous pouvons remarquer que le couplage de la Jeffamine affecte relativement peu la qualité des dispersions. L'augmentation de la taille peut être attribuée aux couplages interparticulaires et à l'augmentation de l'épaisseur de la couche polymère. Les particules maghémite-silane-dextran modifiées à l'APS sont plus petites que celles modifiées à l'EDPS ou au DTSP. Ce résultat est vraisemblablement lié au nombre de points d'ancrage qui doit

être plus élevé dans le cas des nanoparticules EF18, ce qui leur confère une meilleure stabilité stérique. Ceci est confirmé par les mesures d'ATG qui donnent les rapports massiques maghémite/dextran suivants : 35/65 pour MF18T70, 45/55 pour MF19T70 et 43/57 pour MF20T70.

Code exp.	\bar{d}_n (nm)	\bar{d}_v (nm)	\bar{d}_{PCS} (nm)
MF18T70	15	32	60
MF19T70	28	64	130
MF20T70	40	78	130
MF18T70-ED2003	31	69	135
MF19T70-ED2003	32	70	130
MF20T70-ED2003	46	92	150

Tableau 2.1. Valeurs moyennes des diamètres en nombre, en volume et en intensité des nanoparticules MF18T20, MF18T40 et MF18T70.

2.4 Marquage des nanoparticules aux fluorochromes

2.4.2 Greffage des fluorochromes

Quatre fluorochromes ont été utilisés dans le cadre de cette étude : la rhodamine B (RhB, Sigma) et le Lucifer Yellow sous la forme de son sel dilithié (LY, Sigma) pour les produits MF(18,19,20)T70 ; le dérivé isothiocyanate de la tétraméthylrhodamine (TRITC, Sigma) et l'ester succinimidyle de la 5-carboxyfluorescéine (5-FAM, SE, Molecular Probes) pour les mêmes produits, couplés à la Jeffamine. Les schémas réactionnels sont présentés en figure 2.3.

Mode opératoire des réactions de couplage des molécules fluorescentes sur les particules maghémite-dextran et maghémite-dextran-POE : les réactions de couplage sur les nanoparticules MF(18,19,20)T70 ont lieu en milieu tamponné au PBS (pH 7,4, 0,01 M) pour un nombre de mole de LY ou de RhB équivalent au nombre de mole de métaperiodate utilisé lors de l'activation du dextran. La réaction est laissée sous agitation pendant 24 h à l'abri de la lumière. Les réactions de couplage sur les nanoparticules MF(18,19,20)T70-ED2003 ont lieu en milieu tamponné au carbonate/bicarbonate de sodium (pH 9, 0,01 M) pour un nombre de moles de TRITC ou de 5-FAM, SE, équivalent à celui du métaperiodate utilisé lors de l'activation du dextran. Le 5-FAM, SE est préalablement dissout dans 3 mL de DMF. L'élimination de l'excès des fluorochromes se fait par extraction liquide-liquide (eau/chloroforme), jusqu'à ce que la phase organique devienne incolore (Fig. 2.2). Les traces de chloroforme sont éliminées à l'évaporateur rotatif.

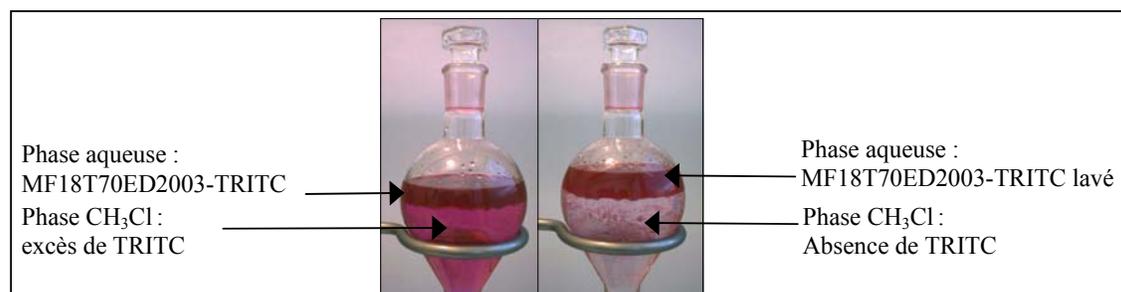


Figure 2.2. Elimination de l'excès de fluorochromes (ici le TRITC) dans un sol de MF18T70-ED2003. La coloration du sol suggère que le fluorochrome est couplé à la surface des nanoparticules.

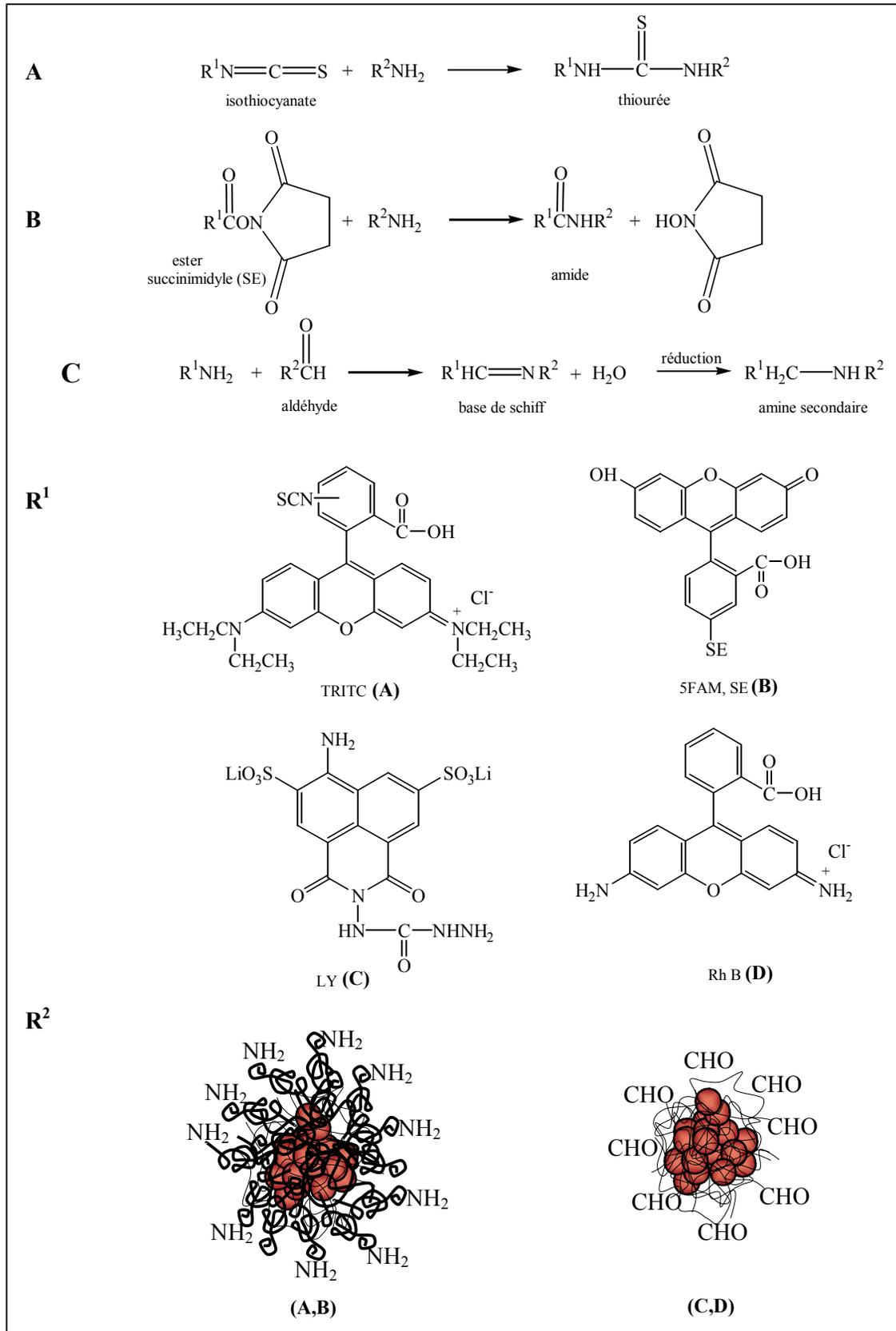


Figure 2.3. Schémas réactionnels et formules développées des fluorochromes utilisés lors de cette étude. (R¹ désigne le fluorochrome, R² le type de vecteur, A, B, C et D les réactions mises en jeu).

Après le marquage des fluorochromes, les sols restent stables. La figure 2.4 montre deux ferrofluides MF18T70-ED2003 marqués par le TRITC (a) et le 5-FAM, SE (b). Cependant quelques agrégats sont apparus à l'issue du lavage au chloroforme. Cet effet est dû aux interactions créées par les fluorochromes à la surface des nanoparticules. En effet, ces colorants sont des molécules amphiphiles composés de cycles aromatiques hydrophobes substitués par des fonctions polaires hydrophiles. Le fait de coupler ces molécules en utilisant une fonction polaire a tendance à déséquilibrer la balance hydrophile-hydrophobe. De plus, la présence des cycles conjugués peut générer des interactions attractives de type π - π aromatiques, constituant ainsi une nouvelle source de déstabilisation.

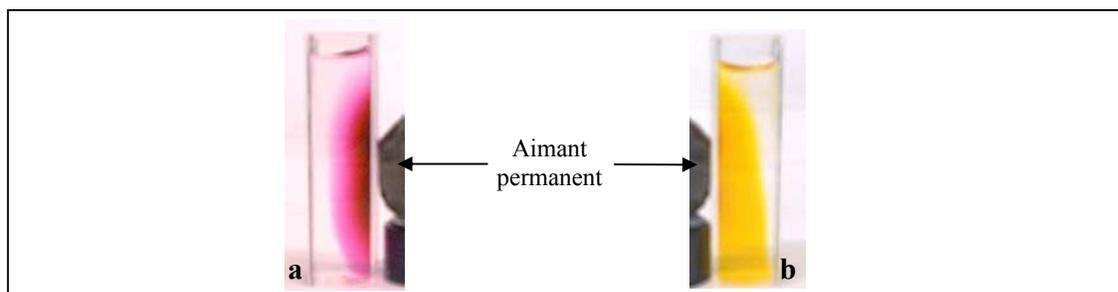


Figure 2.4. Ferrofluides de MF18T70-ED2003-TRITC (a) et MF18T70-ED2003-5-FAM, SE (b). Ces échantillons photographiés ont été obtenus par addition de quelques gouttes de chaque produit dans de l'eau ultrapure, sans agitation. Sous l'action d'un aimant permanent, les gouttes de ferrofluide marqué, plus denses que le milieu liquide, sont attirées par les lignes de champ magnétique.

Cette expérience montre la nécessité de contrôler la dernière étape de couplage à la surface des nanoparticules, notamment le nombre de molécules greffées, car c'est elle qui conditionne le comportement du sol et les propriétés de biodistribution. La saturation de la surface par des molécules amphiphiles, comme des fluorochromes, ne constitue pas une solution à retenir dans le cadre de la problématique 4.1 (Chap. I) mais peut devenir intéressante pour celle décrite dans le § 4.2 (Chap. I). Cette observation devra aussi être prise en compte lors des études futures de couplage de macromolécules amphiphiles que sont les peptides.

2.4.3 Détermination de la taille des nanoparticules marquées aux fluorochromes

A titre indicatif, la figure 2.5 montre les distributions des diamètres en nombre des nanoparticules MF(18,19,20)T70-Rh B et MF(18,19,20)T70-ED2003-TRITC.

Le tableau 2.2 indique les valeurs de ces diamètres. Le greffage des fluorochromes a eu pour effet d'augmenter la taille des nanoparticules. L'augmentation des valeurs des diamètres

hydrodynamiques est le signe d'un état plus agrégé pour les nanoparticules marquées. Cet effet est vraisemblablement dû aux interactions décrites précédemment.

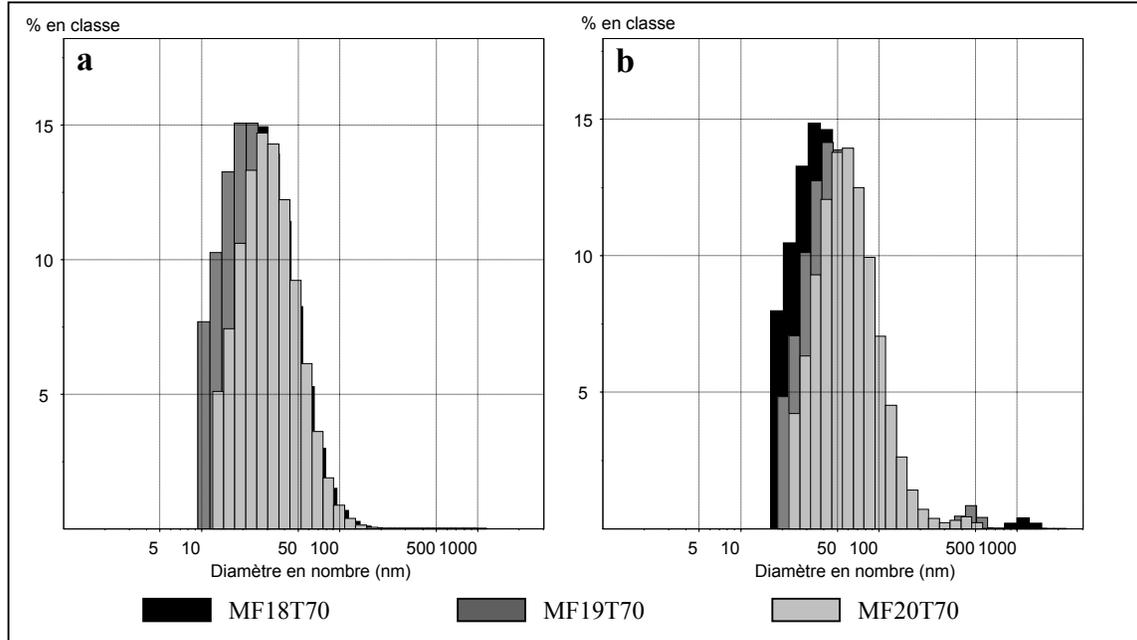


Figure 2.5. Distributions des diamètres hydrodynamiques en nombre des nanoparticules MF(18,19,20)T70 marquées à la Rhodamine B (a) et marquées à la tétraméthylrhodamine, après couplage à la Jeffamine ED2003 (b).

Code exp.	\bar{d}_n (nm)	\bar{d}_V (nm)	\bar{d}_{PCS} (nm)
MF18T70-Rh B	33	78	150
MF19T70-Rh B	26	64	140
MF20T70-Rh B	34	74	140
MF18T70-ED2003-TRITC	47	120	260
MF19T70-ED2003-TRITC	54	120	215
MF20T70-ED2003-TRITC	67	135	240

Tableau 2.2. Valeurs moyennes des diamètres en nombre, en volume et en intensité des nanoparticules MF18T20, MF18T40 et MF18T70.

Ces nanoparticules semblent être adaptées pour une stratégie de marquage cellulaire macrophagique, du fait de la présence de la rhodamine qui apporte à leur surface un caractère amphiphile. La partie suivante présente les résultats de tests *in vitro* qui consistaient à créer un double marquage, contraste IRM et fluorescence, au sein de microglies (cellules macrophagiques du cerveau).

3. Internalisation des nanoparticules magnétiques fluorescentes sur des lignées cellulaires macrophagiques (HEMC5)

Dans le cadre de la problématique définie dans la partie 4.2 (Chap. I) des cellules HEMC5 (Human Embryonic Microglia Cell) ont été marquées par les particules magnétiques fluorescentes, afin d'évaluer leur cytotoxicité et leur capacité à être phagocytées.

Mode opératoire de l'étude du comportement des particules maghémite-dextran fluorescentes en milieu de cultures cellulaires : 50 ou 200 μ L de particules magnétiques fluorescentes (MF(18,19,20)-(RhB, LY) et MF(18,19,20)ED2003-(TRITC, 5-FAM, SE), $[Fe_2O_3]=1,4$ g/L) sont versés dans une boîte de Pétri contenant les cultures de microglies. Le milieu de culture contient (pour 1 L de préparation aqueuse stérile) : 100 mL de MEM (milieu essentiel minimum avec les sels de Earle ; sans bicarbonate de sodium, Eurobio) ; 4 g/L de glucose ; 584 mg de glutamine ; 3,7 g/L de bicarbonate de sodium ; 4 mL de pénicilline (100 U/mL)- streptomycine (0,1 mg/mL). Le pH est contrôlé à une valeur comprise entre 7-7,4. Les cellules sont incubées dans ce milieu pendant 45 min à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Les particules sont alors ajoutées dans le milieu et sont laissées pendant 24 h à 37°C. Les cultures sont ensuite lavées, filtrées, puis conservées à 4°C.

3.1 Tests de cytotoxicité

L'évaluation de la viabilité des cellules en présence des nanoparticules a été réalisée pour différents temps d'incubation en utilisant la méthode de coloration par la solution de bleu de Tryptan (Sigma). Les cellules sont considérées viables lorsqu'elles excluent le bleu de Tryptan. Les pourcentages de mort cellulaire sont alors déterminés par microscopie (grandissement X200) sur 100 cellules.

Les nanoparticules fluorescentes ne présentent pas de signe d'apoptose ou de nécrose cellulaire sur la lignée de microglies humaine HEMC5. Le taux de mort cellulaire varie entre 0,8 et 2,8 % selon les échantillons contre 1,5% pour le témoin sans particule, correspondant au pourcentage normal de mort naturelle.

3.2 Observation par microscopie optique à épifluorescence

Les cellules correspondant aux 24 échantillons sont déposées sur des lames de verre, puis observées sous différentes radiations correspondant aux longueurs d'onde d'absorption des différents fluorochromes. Les observations qualitatives des marquages des cellules sont résumées dans le tableau 3.1. Nous pouvons constater que le marquage des cellules par les particules MF(18,19,20)-(RhB, LY) est moins fort que celui réalisé avec les produits MF(18,19,20)-ED2003-(TRITC, 5-FAM, SE). Cet effet peut provenir d'un problème de stabilité de la base de Schiff qui n'a pas été réduite en amine secondaire, afin de

préserver les fluorochromes liés au dextran. D'autre part le LY fluoresce moins du fait de son faible coefficient d'extinction ($\epsilon = 12000$ contre $90000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour la RhB), ce qui pourrait expliquer en partie ce marquage faible. De plus, le marquage est d'autant plus fort que le volume d'addition en particules fluorescentes est élevé. On n'observe aucune différence notable entre les échantillons des différentes séries 18, 19 et 20.

Par contre, les microglies mises en présence avec les particules MF(18,19,20)ED2003-(TRITC, 5-FAM, SE) fluorescent davantage. Cependant, les particules traitées à la fluorescéine 5FAM, SE fluorescent moins du fait des phénomènes d'extinction dû au pH intracellulaire. Par conséquent, nous avons retenu pour la suite de l'étude, les produits MF(18,19,20)-TRITC, qui permettent un marquage efficace.

produit	V = 50 μ l	V = 200 μ l
MF18-RhB	(-)	(+)
MF19-RhB	(-)	(+)
MF20-RhB	(-)	(+)
MF18-LY	(-)	(+)
MF19-LY	(-)	(+)
MF20-LY	(-)	(+)
MF18-ED2003-TRITC	2+	4+
MF19-ED2003-TRITC	2+	4+
MF20-ED2003-TRITC	2 à 3+	4+
MF18-ED2003-5FAM, SE	(+)	2+
MF19-ED2003-5FAM, SE	(+)	(+)
MF20-ED2003-5FAM, SE	(+)	(+)

Tableau 3.1. Tests de capture macrophagique des nanoparticules fluorescentes. Les signes (-) et (+) dénotent les attributions qualitatives des différents marquages fluorescents. ((-) marquage faible, (+) marquage fort).

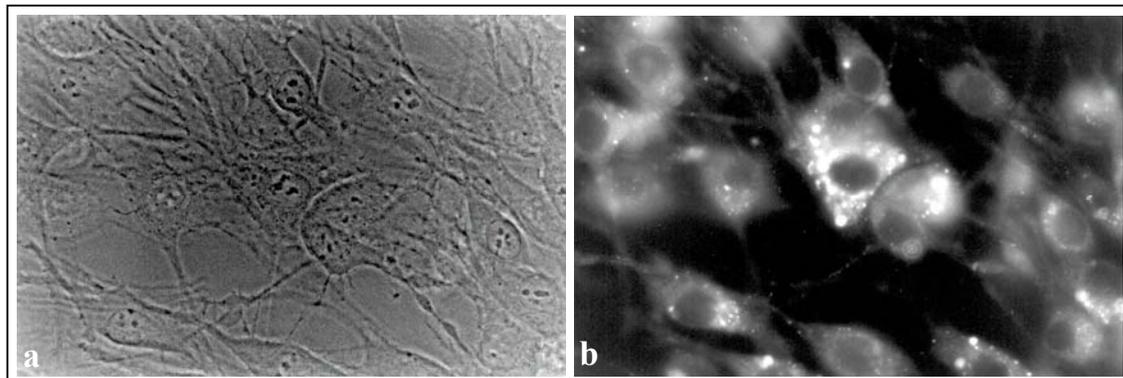


Figure 3.1. Photographies des microglies HEMC5 marquées par les nanoparticules fluorescentes MF18-ED2003-TRITC, (a) en contraste de phase et (b) en épifluorescence. ($\times 100$).

La figure 3.1 montre les photographies des cellules HEMC5 mises en présence avec le produit MF18-ED2003-TRITC, en fluorescence et en contraste de phase. Nous observons sur la photographie (b), les cellules fluorescentes présentant par endroit un marquage vésiculaire (présence de granules). Les particules sont localisées dans le cytoplasme et ne pénètrent pas dans les noyaux qui apparaissent plus sombres, ce qui permet de les discerner clairement. Cette photographie coïncide avec le cliché (a) montrant que toutes les cellules sont marquées par les nanoparticules fluorescentes.

3.3 IRM des microglies marquées par les nanoparticules magnétiques fluorescentes

L'IRM nous a permis de révéler la présence des nanoparticules magnétiques à l'intérieur des cellules microgliales. La figure 3.2 montre l'IRM à 1,5 Teslas des culots de centrifugation contenant les cellules HEMC5 incubées en présence de nanoparticules MF18-ED2003-TRITC.

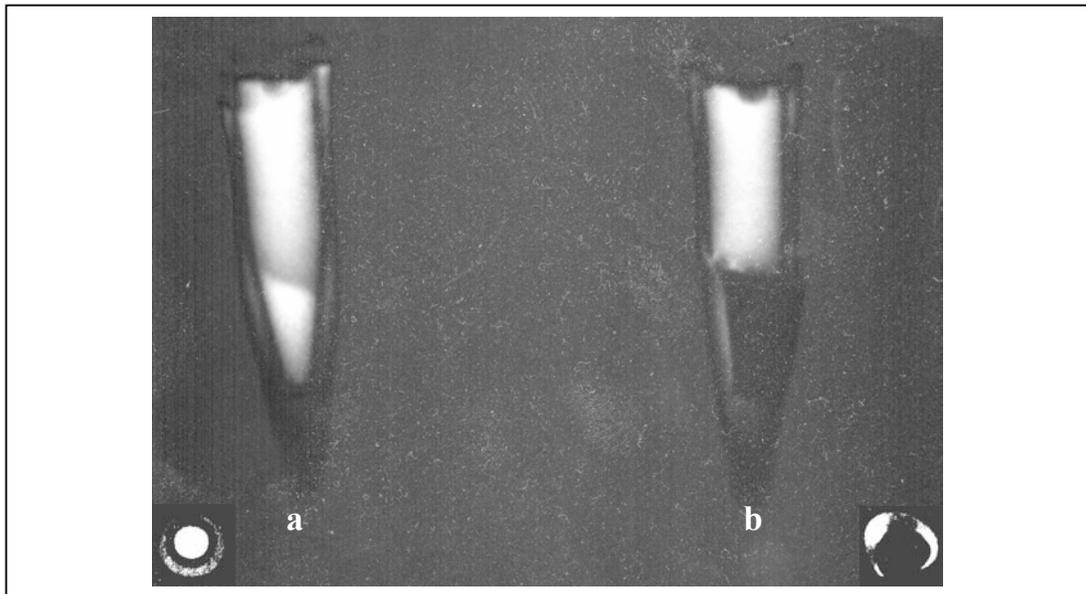


Figure 3.2. Cliché IRM des cellules HEMC5 à 1,5 Tesla (contraste en T1). (a) témoin sans particules, (b) échantillon de cellules HEMC5 contenant les nanoparticules MF18-ED2003-TRITC. En médaillons, vues en coupe transversale des culots des tubes de centrifugation.

La photographie (a) représente la culture témoin de cellules HEMC5 en absence de particules et la figure (b), celle contenant les particules de MF18-ED2003-TRITC, observées en T1. Les cellules marquées présentent un hyposignal intense en T1, ce qui montre que les cellules sont très concentrées en maghémite (voir §2.2.1 Chap. I). La quantité de fer contenue dans les cellules a été déterminée par spectrométrie de flamme. Dans les cellules-témoins la concentration massique en fer est inférieure à 0,12 mg/L, alors qu'elle est de 2,44 g/L pour les

cellules marquées. La concentration en fer dans les cellules marquées est aussi plus forte que la concentration initiale, lors de l'addition des particules dans les cultures. Il s'agit donc d'une phagocytose active.

Cette expérience montre que la maghémite, visualisée à l'IRM, et le fluorochrome, visualisé au microscope, sont bien liés. La présence de cellules fluorescentes décelées au microscope à épifluorescence permet donc d'attester de la présence des nanoparticules magnétiques.

4. Conclusions

Cette étude nous a permis de valider la faisabilité des objets décrits dans le cahier des charges. En outre, le greffage du dextran activé par NaIO_4 sur les nanoparticules de maghémite modifiée par les agents de couplage silaniques aminés permet de stabiliser les sols en milieu physiologique. Les produits déshydratés EF18, 19 et 20 conduisent à des sols stables tandis que ceux issus des produits EF11 et FF10 (témoin), couplés dans les mêmes conditions, sont déstabilisés. Le traitement thermique sous vide permet donc d'augmenter la réactivité des amines de surface et par conséquent d'augmenter le nombre de points d'ancrage des macromolécules, nécessaires pour stabiliser les nanoparticules.

Les particules maghémite-silane-dextran sont constituées d'un ensemble de nanoparticules de maghémite enveloppées par le dextran. Leur taille moyenne mesurée par PCS, est environ égale à 60 nm. Compte tenu du fait que la valeur du diamètre PCS est largement influencée par la présence de particules de plus grande taille (agrégats), la majorité des particules possèdent une taille bien inférieure à cette valeur moyenne. Afin d'optimiser la taille des particules, il sera possible de séparer les différentes classes sur des colonnes chromatographiques d'exclusion stérique.

Après greffage du dextran sur les nanoparticules, il reste suffisamment de fonctions aldéhydes pour coupler des chaînes de poly(oxyde d'éthylène) ou des fluorochromes. Le POE greffé, la Jeffamine ED2003[®], possède des fonctions amines en bout de chaîne permettant son couplage sur les particules maghémite-dextran tout en maintenant la fonctionnalité du vecteur. La taille des particules, égale à 130 nm, a légèrement augmenté, vraisemblablement en raison de quelques réactions de couplage interparticulaires.

Divers fluorochromes ont été greffés sur ces particules. Le meilleur marquage a été obtenu pour les particules MF(18,19,20)-ED2003-TRITC du fait du rendement quantique élevé de ce fluorochrome qui semble demeurer intact en milieu intracellulaire. Les particules

magnétiques marquées à la rhodamine ont été incubées en présence de microglies humaines (HEMC5). Celles-ci ne présentent pas d'effet cytotoxique. Observées au microscope à épifluorescence, les cellules ont montré un fort marquage fluorescent. Ces mêmes cellules observée en IRM (en T1) ont révélé un contraste négatif signalant une forte concentration en particules dans le milieu.

Ces expériences prouvent que les fluorochromes sont liés aux nanoparticules de maghémite-dextran-POE et par conséquent, montrent que ces particules sont capables de vectoriser des molécules, dans le cas présent, des fluorochromes, à l'intérieur de cellules. Ces vecteurs possèdent des applications potentielles *ex vivo* utilisés, par exemple, pour étudier la migration de cellules doublement marquées, à travers certaines barrières physiologiques comme la BHE, dont les mécanismes de migration sont mal connus. Dans cette optique, la prochaine étape sera de marquer des cellules hématopoïétiques Sca1+ *ex vivo* par les nanoparticules MF(18,19,20)-ED2003-TRITC de manière à ce qu'elles soient visibles en IRM et par observation classique des coupes histologiques au microscope à épifluorescence.

Références

- 1 Ewans, R., Napper, D.H., *Kolloid-Z. u. Z. Polymere*, **251**, 329-336 (1973)
- 2 Ewans, R., Napper, D.H., *Kolloid-Z. u. Z. Polymere*, **251**, 409-414 (1973)
- 3 Napper, D.H., *J. Colloid Interface Sci.*, **33**, 384 (1970)
- 4 Flory, P.J., *Principles of polymer chemistry*, Cornell University Press, Ithaca, New York (1953)
- 5 Alexander, S., *J. Phys.*, **38**, 983 (1977)
- 6 De Gennes, P.G., *Macromolecules*, **13**, 1069 (1980)
- 7 Molteni, L., *Methods in enzymology*, **112**, 285-298 (1985)
- 8 Devoldere, L., *Synthèse et caractérisation de nanoparticules superparamagnétiques utilisables comme agents contrastant pour l'imagerie par résonance magnétique (I.R.M)*, Thèse de Paris 6 (1995)
- 9 Jung, C.W., Jacobs, P., *Magn. Reson. Imaging*, **13(5)**, 661-674 (1995)

CONCLUSION GENERALE

Les vecteurs nanocomposites réalisés dans le cadre de notre étude sont conçus à partir d'une structure de base identique, seule les dernières étapes d'habillage sont modulées selon l'application recherchée.

La première application (Chap. I § 4.1) s'inscrit dans un contexte d'approche thérapeutique dans laquelle les vecteurs sont destinés à l'administration par voie intraveineuse. La deuxième application (Chap. I § 4.2) se situe dans le cadre d'une approche diagnostique qui utilise l'imagerie cellulaire, par phagocytose de nanoparticules magnétiques.

Sur la base d'une revue bibliographique, nous avons dégagé les exigences principales requises pour l'élaboration de vecteurs magnétiques utilisables *in vivo*. Notamment, les nanoparticules doivent être stabilisées par des macromolécules hydrophiles, biocompatibles et biodégradables, comme le dextran, de façon à générer des répulsions stériques permettant d'éviter la floculation en milieu physiologique. Nos études se sont dirigées vers l'amélioration de l'adhésion des macromolécules à la surface des nanoparticules magnétiques.

Nous avons alors entrepris l'élaboration du vecteur, étape par étape, du ferrofluide de maghémite synthétisé selon la méthode Massart, au greffage de macromolécules de dextran et de POE, en passant préalablement par une phase de fonctionnalisation de la surface des nanoparticules au moyen d'agents de couplage silaniques aminés. Cette démarche nous a permis de contrôler la synthèse de nos matériaux et de résoudre certains problèmes qui se sont révélés au fur et à mesure de l'avancement de nos recherches.

Notamment, nous avons déterminé les conditions opératoires optimales pour la modification chimique de la surface des nanoparticules de maghémite, tout en respectant la possibilité de peptisation après greffage. Nous avons montré qu'il était nécessaire de déshydrater les nanoparticules de maghémite modifiées par traitement thermique modéré sous vide dans le glycérol. Ce traitement favorise la condensation du film polysiloxane à la surface du substrat et permet de préserver la réactivité des groupes aminofonctionnels à la surface des particules. En effet, ces derniers développent des réactions de transfert de proton partiel ou total avec les silanols du film ou les sites de surface. Sous l'effet du vide, ces liaisons sont rompues provoquant ainsi le retournement des bras aminopropyle vers l'extérieur du réseau

polysiloxane. Ce phénomène a été confirmé par les valeurs des points isoélectriques (PIE) des maghémities modifiées par l'APS, l'EDPS et le DTPS, au moyen de mesures de potentiel zêta en fonction du pH.

Les dernières étapes de conception du vecteur, ont consisté à greffer le dextran activé sur les nanoparticules de façon à ce que les macromolécules puissent générer des répulsions stériques nécessaires à leur stabilisation. Ces vecteurs, de diamètre PCS environ égal à 60 nm, sont constitués d'un ensemble de nanoparticules de maghémite enveloppées par le dextran. Le dextran a également servi d'agent de couplage pour « l'habillage » des nanoparticules par des macromolécules de POE et le marquage par des fluorochromes. Ces nouveaux vecteurs possèdent une taille moyenne d'environ 130 nm. Des tests *in vitro* ont permis de marquer des microglies humaines (HEMC5) et de montrer que ces produits ne sont pas cytotoxiques. Le double marquage des microglies, vérifié par microscopie en épifluorescence et IRM, a permis de confirmer la stabilité du greffage du fluorochrome sur le vecteur lors de la phagocytose.

Afin d'améliorer nos vecteurs, plusieurs études doivent être entreprises. Il serait intéressant de moduler la longueur des chaînes de POE et d'étudier l'influence de ces variations sur les taux de greffage et sur la demi-vie plasmatique des vecteurs. L'utilisation d'un POE portant deux fonctions extrêmes de nature différente (hétérofonctionnel) devrait apporter des degrés de liberté supplémentaires pour développer la chimie de greffage autour de ces systèmes et contrôler la quantité de molécules d'intérêt biologique greffées en surface. Dans le même ordre d'idée, la nature des liaisons entre les différentes composantes pourrait être modifiée (en amide, uréthane, thiourée,...) pour s'adapter aux cinétiques de biodégradation et/ou de relargage de médicaments.

La balance hydrophile/hydrophobe ainsi que la densité de charges surfaciques devront être contrôlées de manière à augmenter la capture macrophagique dans le cadre de la problématique (Chap. I § 4.2) ou à augmenter la demi-vie plasmatique (Chap. I § 4.1).

La taille du vecteur pourra être ajustée en jouant sur les conditions de synthèse du cœur minéral magnétique, en diminuant la taille et la distribution en taille des nanoparticules. Il sera possible aussi de fractionner les différentes classes en taille des nanoparticules de maghémite-silane-dextran-POE sur des colonnes chromatographiques de Sephadex®.

Enfin, d'un point de vue efficacité en tant qu'agent de contraste IRM, les mesures de relaxivités (R1 et R2) sont actuellement en cours.

Il faut également noter que parallèlement à cette étude, nous avons entrepris une démarche similaire en recherchant des oxydes minéraux autres que la maghémite pour notamment faire varier T_c (p.15, ref. 56, Chap. I).

L'encapsulation des nanoparticules de maghémite dans une coque de silice s'est présentée comme une alternative intéressante. Des nanoparticules core-shell de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2$ de 50 nm de diamètre ont été obtenues en microémulsion inverse. La morphologie des particules dépend non seulement des paramètres de la microémulsion, mais également de ceux du ferrofluide, comme le pH.

Les prochaines études devraient permettre de faire varier l'épaisseur de la couche de silice en fonction des paramètres de la microémulsion. Il sera intéressant alors d'entreprendre une étude comparant des mesures de spectroscopie Mössbauer aux mesures d'aimantation en fonction de l'épaisseur de la coque de silice afin de dévoiler des comportements proches des propriétés magnétiques des nanoparticules isolées en l'absence d'interactions dipolaires magnétiques.

L'augmentation du nombre de particules de maghémite par coque de silice ouvre des perspectives intéressantes notamment pour tout ce qui concerne les procédés de purification (cellulaires, protéines, ADN, ...) assistés magnétiquement.

Nous avons montré qu'il est possible de dissoudre sélectivement le cœur magnétique pour obtenir des nanosphères de silice creuses.

Les cavités de ces céosphères pourraient être fonctionnalisées pour y stocker des principes actifs ou les utiliser comme nanoréacteurs de phases minérales difficilement accessibles sous forme nanoparticulaire.

ANNEXE 1 : LE PHENOMENE PHYSIQUE DE LA RMN

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique en développement depuis une cinquantaine d'années. La découverte simultanée et la conceptualisation de ce phénomène physique par Bloch¹ et Purcell² leur ont valu le prix Nobel de physique 1952. Cette technique spectroscopique permet notamment de déterminer la structure de molécules, de macromolécules ou de protéines.

1. Principes de base

Un atome est constitué d'un noyau composé de protons et de neutrons autour duquel gravitent des électrons. Du fait du mouvement de rotation sur lui-même, ce noyau possède un spin nucléaire, ce qui lui confère un moment cinétique \vec{J} qui dépend de sa masse, aligné à un moment magnétique $\vec{\mu}$ qui dépend de sa charge : $\vec{\mu} = \gamma \vec{J}$. Le facteur multiplicatif γ est appelé rapport gyromagnétique. Le nombre quantique de spin nucléaire, noté I associé au moment cinétique \vec{J} , doit être non nul pour que le noyau puisse posséder un moment magnétique : $\mu = \gamma \frac{h}{2\pi} \sqrt{I(I+1)}$, où h est la constante de Planck.

Pour un noyau ${}^A_Z\text{N}$, I est non nul si A et Z sont pairs, I est demi-entier si A ou Z est impair, et entier si A et Z sont respectivement pair et impair. Ainsi les noyaux ${}^1\text{H}$, ${}^{13}\text{C}$, ${}^{15}\text{N}$, ${}^{31}\text{P}$ ou ${}^{23}\text{Na}$ possèdent un moment magnétique avec un rapport gyromagnétique qui leur est propre.

En absence de champ magnétique extérieur, l'orientation des aimantations se fait de façon aléatoire. Sous l'action d'un champ magnétique statique \vec{B}_0 , les moments magnétiques $\vec{\mu}$ s'orientent par rapport à \vec{B}_0 dans des directions quantifiées et décrivent un mouvement de précession autour de \vec{B}_0 (Fig. 1a) avec une vitesse angulaire ω_0 : $\omega_0 = \gamma B_0$.

Il s'établit alors une interaction entre le moment magnétique du spin nucléaire et le champ qui lève la dégénérescence du niveau d'énergie en (2I+1) niveaux équidistants séparés par une énergie $\Delta E = h\nu_0$ avec $\nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0$, fréquence de transition de spin nucléaire ou fréquence de précession de Larmor ($\omega_0 = 2\pi \nu_0$).

On s'intéresse ici plus particulièrement au cas du noyau d'hydrogène qui est la sonde la plus employée, à la base, en IRM clinique. Pour l'hydrogène, $I = \frac{1}{2}$, il possède donc deux états énergétiques. L'état d'énergie du spin $+\frac{1}{2}$ est plus stable que l'état de spin $-\frac{1}{2}$. De ce

fait, si l'on considère une population de noyaux d'hydrogène à l'équilibre, les niveaux d'énergie sont peuplés selon une distribution de Boltzmann privilégiant le niveau de plus faible énergie (spin $+\frac{1}{2}$). La somme des aimantations élémentaires résultant de cette différence de population entre les deux niveaux constitue l'aimantation macroscopique \vec{M}_0 (Fig. 1b). Les déphasages qui existent entre les différentes aimantations dans les mouvements autour du champ \vec{B}_0 font qu'il n'y a pas de composante transversale de cette aimantation lors de l'équilibre. Il n'existe qu'une composante longitudinale \vec{M}_0 .

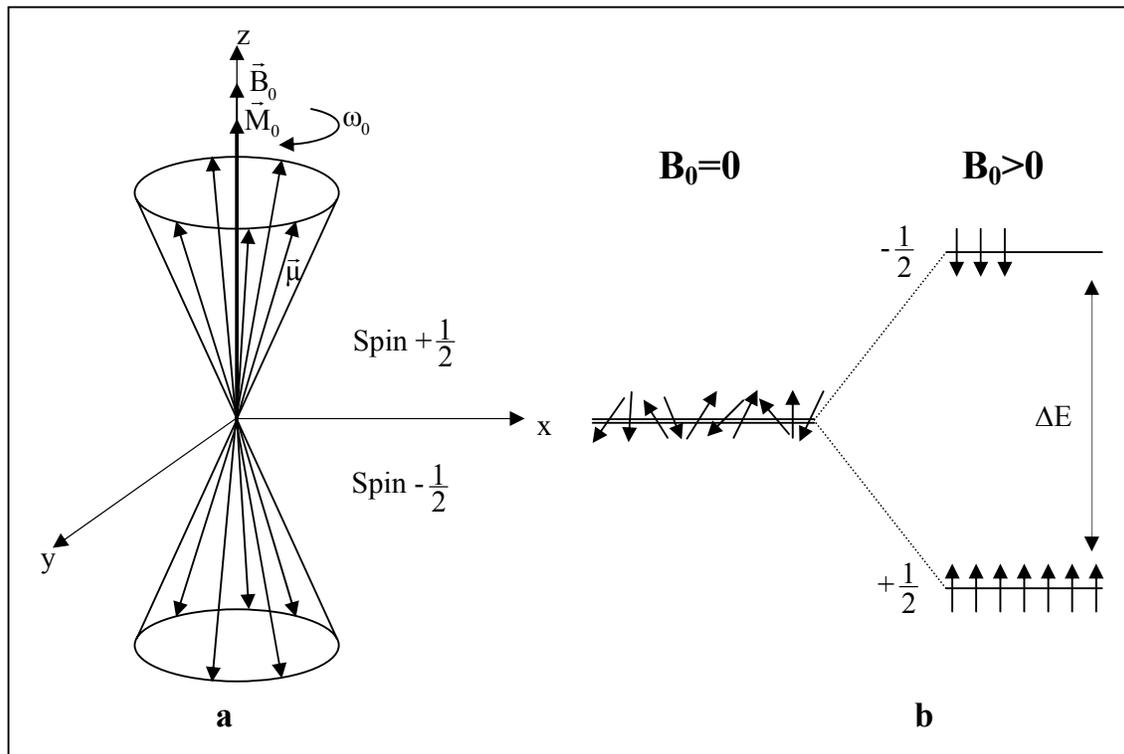


Figure 1. Représentation schématique (a) des mouvements de précession d'un ensemble de moments magnétiques nucléaires dans le cas où $I=1/2$ et (b) de la distribution des niveaux énergétiques d'une assemblée de noyaux d'hydrogène à l'équilibre avant et après application d'un champ magnétique extérieur B_0 .

Si on applique maintenant, un champ magnétique alternatif \vec{B}_1 (champ radio-fréquences) à la fréquence de résonance des noyaux d'hydrogène dans l'axe perpendiculaire à \vec{B}_0 , l'aimantation résultante \vec{M}_0 bascule d'un angle α autour de \vec{B}_1 , proportionnel à la durée et à l'amplitude de cette excitation. En ajustant ces deux paramètres, on peut contrôler les angles de basculement, par exemple, de 90° ou de 180° . Si la fréquence d'excitation n'est pas proche ou égale à la fréquence de résonance, le système reste sur sa position d'équilibre.

A l'arrêt de l'excitation, les spins de l'ensemble des noyaux d'hydrogène du système tendent à retrouver leur distribution de population initiale dans les deux niveaux. Le système va relaxer pour revenir à sa position d'équilibre en décrivant un mouvement complexe à la vitesse angulaire ω_0 . L'aimantation résultante n'est plus dans la direction du champ \vec{B}_0 , la composante transversale n'est plus nulle. L'aimantation résultante \vec{M} peut être décomposée en une composante longitudinale \vec{M}_z , croissante et qui tend vers sa valeur d'équilibre, plus une composante transversale \vec{M}_{xy} , décroissante et qui tend vers 0. La mesure de ce retour à l'état d'équilibre à l'aide de la bobine placée perpendiculairement à \vec{B}_0 correspond au signal RMN (Fig. 2). Ce retour est perturbé par les interactions entre les noyaux et leur environnement (couplage dipôle-dipôle, quadrupolaire, déplacement chimique anisotrope, ...). Dans le cas du noyau d'hydrogène, seul le couplage dipôle-dipôle est significatif.

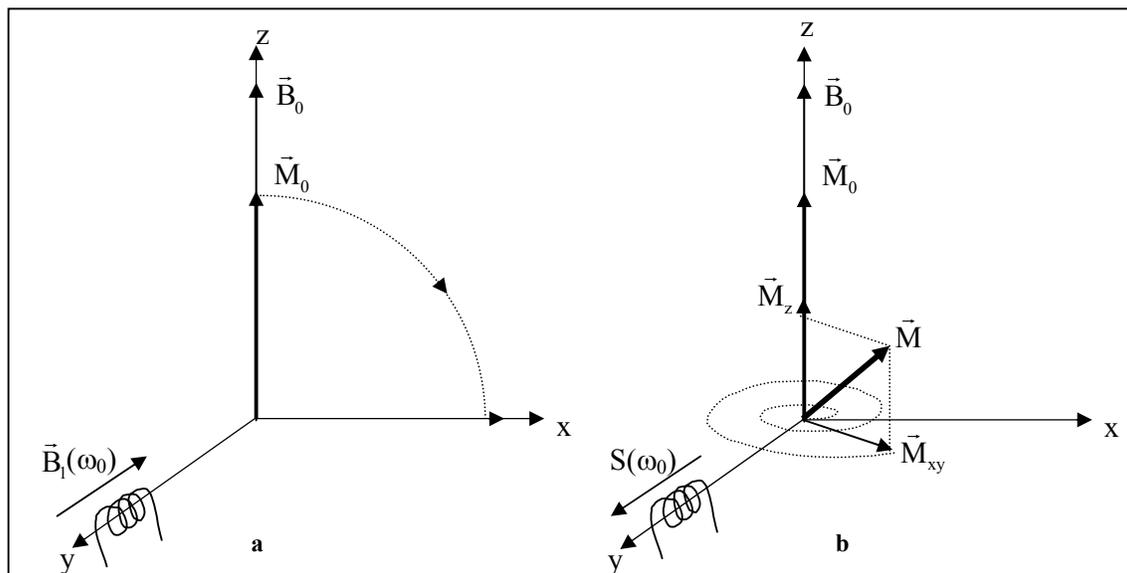


Figure 2. Représentation schématique de l'excitation \vec{B}_1 provoquant un basculement de l'aimantation à 90° (a) et retour à l'équilibre de l'aimantation qui induit le signal RMN (b).

Le signal RMN ou FID (free induction decay) décrit une sinusoïde amortie définie selon trois paramètres (Fig. 3) : l'amplitude initiale M_0 , la fréquence et la constante d'amortissement T_2^* :

$$M_{xy} = M_0 \left(e^{-\frac{t}{T_2^*}} \sin \omega_0 t \right)$$

L'amplitude du signal M_0 est directement représentative du nombre de noyaux présents dans l'échantillon. Il est donc possible de quantifier la densité d'hydrogène, $N(H)$, dans un volume d'un échantillon donné. La fréquence de résonance ω_0 dépend de la nature du

noyau qui possède un rapport gyromagnétique qui lui est propre. Par exemple, pour un champ de 1 Tesla, l'hydrogène ^1H résonne à 42,57 MHz, le phosphore ^{31}P à 17,24 MHz, le carbone ^{13}C à 10,70 MHz, le sodium ^{23}Na à 11,26 MHz. Le spectre RMN est obtenu par transformée

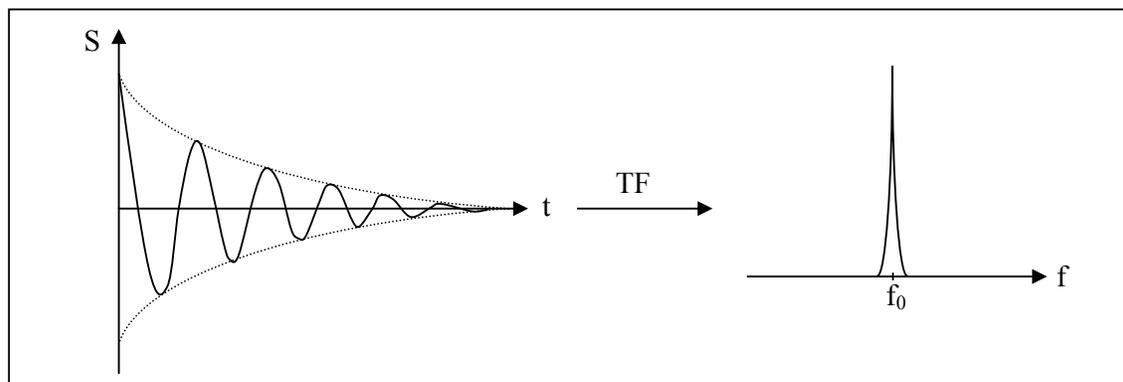


Figure 3. Représentation schématique du signal RMN sinusoïdal amorti et spectre RMN après transformée de Fourier du signal.

de Fourier du signal RMN. L'aire sous la raie de résonance dépend du nombre de noyaux résonant, la largeur à mi-hauteur est représentative de la constante d'amortissement.

2. Les temps de relaxation

Lors du retour à l'équilibre, l'aimantation résultante peut se décomposer en relaxation longitudinale M_z et en relaxation transversale M_{xy} .

a. La relaxation longitudinale ou relaxation spin-réseau (Fig. 4a)

A l'équilibre $M_z = M_0$ et après le basculement $M_z = 0$. Le retour de M_z à sa valeur de départ M_0 est exponentiel : $M_z(t) = M_0 (1 - e^{-t/T_1})$ Cette relaxation longitudinale, dite **relaxation T1** ou **relaxation spin-réseau**, correspond au retour énergétique du système après l'excitation. D'un point de vue macroscopique, elle correspond au retour de l'aimantation dans la direction de \vec{B}_0 . Son évolution est caractérisée par le temps de relaxation T1. Le temps de relaxation longitudinale T1 dépend en fait de la mobilité des noyaux d'hydrogène engagés dans les molécules. Par exemple le temps de relaxation T1 de l'eau pure est de l'ordre de 3 à 4 secondes tandis que celui de l'eau dans les tissus est de l'ordre de 0,5 s.

b. La relaxation transversale ou relaxation spin-spin (Fig. 4b)

A l'équilibre $M_{xy} = 0$ et après le basculement $M_{xy} = M_0$. Le retour de M_{xy} à sa valeur de départ 0 est exponentiel : $M_{xy}(t) = M_0 e^{-t/T_2}$ La relaxation transversale représente la désynchronisation des aimantations élémentaires dans leur mouvement autour de \vec{B}_0 . Ce

déphasage est lié aux interactions entre les aimantations nucléaires avec les noyaux voisins. Le temps de **relaxation transversale T2** est aussi appelé temps de **relaxation spin-spin**. T2 dépend aussi de la mobilité des noyaux d'hydrogène et il est toujours inférieur à T1. Le T2 de l'eau pure est de 3 à 4 s tandis que celui des tissus est de 50 ms.

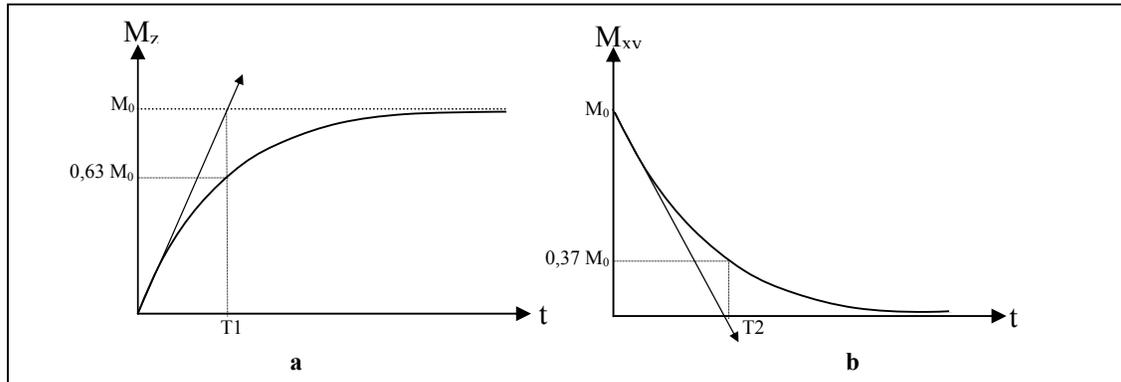


Figure 4. Relaxation longitudinale (a) et relaxation transversale (b) après une excitation à 90° .

Les temps de relaxation T1 et T2 varient en fonction de l'organisation physico-chimique de l'eau dans les tissus et ils augmentent avec l'hydratation des tissus. Ce sont notamment ces variations qui permettent de faire la différence entre un tissu sain et une lésion.

Références

- 1 Bloch, F., Hansen, W.W., Packard, M., *Phys. Rev.*, **70**, 474-485 (1946)
- 2 Purcell, E.M., Torrey, H.C., Pound, R.V. *Phys. Rev.*, **69**, 37-43 (1946)

ANNEXE 2 : LE SUPERPARAMAGNETISME

Dans le cas des composés ferro- ou ferrimagnétiques, les interactions entre les moments magnétiques ne se développent que sur des distances limitées. Le matériau présente alors un magnétisme coopératif: l'ordre magnétique est confiné dans des domaines magnétiques qui sont des régions délimitées par des frontières, appelées parois de Bloch. Chaque monodomaine possède un moment magnétique permanent, orienté sur un axe de facile aimantation. En l'absence de champ, l'aimantation résultante est nulle (Fig. 1). Sous l'action d'un champ magnétique, le volume des monodomaines augmente par déplacement des parois de Bloch et les aimantations quittent l'axe de facile aimantation pour basculer vers l'orientation du champ.

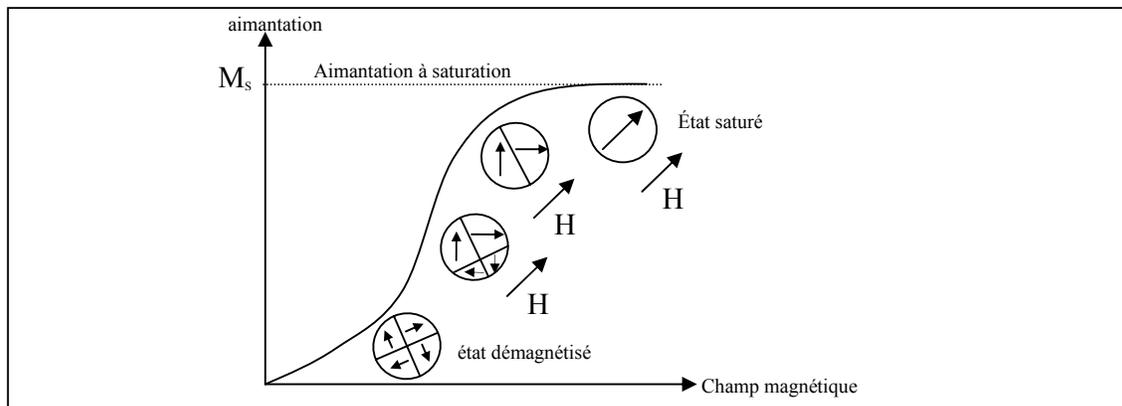


Figure 1. Représentation schématique de la courbe de première aimantation d'un composé ferromagnétique : effet du champ appliqué sur les domaines magnétiques.

L'énergie nécessaire à la rotation de cette aimantation est l'énergie d'anisotropie magnétocristalline E_a . Pour un monodomaine de volume V , $E_a = KV$ où K est la constante d'anisotropie. La taille critique en dessous de laquelle un cristal est monodomaine est de l'ordre de 10 à 50 nm.

Pour un matériau ferromagnétique, $KV \gg kT$, le moment magnétique est bloqué dans la direction de facile aimantation. Sous l'effet de l'augmentation du champ magnétique, l'énergie d'échange augmente, ce qui provoque l'alignement des aimantations dans la direction de ce champ. L'aimantation augmente jusqu'à saturation, comme le montre la figure 2. A l'arrêt du champ, le matériau conserve une aimantation rémanente qui dépend de l'orientation précédente des moments magnétiques : le matériau ferro- ou ferrimagnétique a été magnétisé.

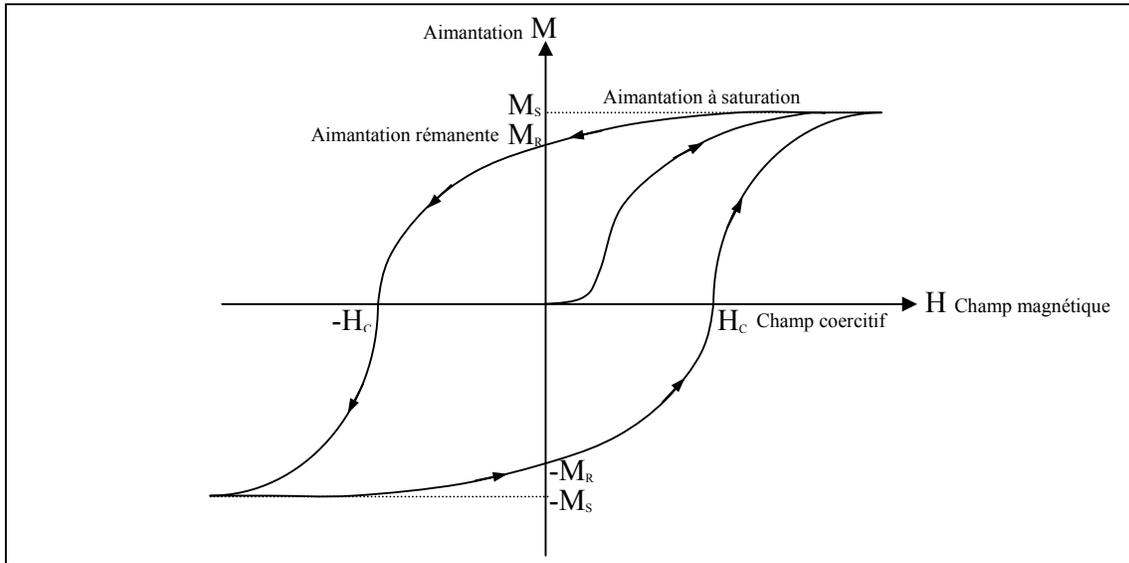


Figure 2. Représentation schématique du cycle d'hystérésis d'un matériau ferro- ou ferrimagnétique.

Dans le cas où $KV \ll kT$, l'énergie thermique bascule aléatoirement les aimantations d'un axe de facile aimantation à un autre. Sous l'action d'un champ magnétique, les aimantations s'alignent rapidement vers le sens du champ pour atteindre après augmentation de celui-ci, une valeur de saturation. A l'arrêt du champ magnétique, les moments retrouvent leurs orientations aléatoires. Ce comportement est appelé **superparamagnétisme de Néel**. Le temps de relaxation de l'aimantation est appelé temps caractéristique de Néel :

$$\tau_N = 10^{-9} \exp[KV/kT]$$

Les agents de contraste superparamagnétiques sont généralement composés de nanoparticules de magnétite Fe_3O_4 ou de maghémite $Fe_2O_3-\gamma$ stabilisées par un polymère hydrophile. Ces dispersions colloïdales magnétiques, appelés **ferrofluides** possèdent des propriétés magnétiques particulières en milieu liquide. Généralement ces particules sont assez petites pour la formation d'une paroi de Bloch. Elles sont donc considérées comme monodomaines. Dans le cas de ces systèmes à grains fins, la constante d'anisotropie peut être très différente de la constante d'anisotropie magnétocristalline du fait de la forme des grains qui crée un abaissement de la symétrie et des interactions : $E_a = K_{eff}V$. Sous l'action d'un champ magnétique extérieur, deux processus peuvent se présenter :

✓ Le moment s'aligne, d'un axe de facile aimantation à un autre, sans mouvement de rotation des particules sur elles-mêmes, c'est le superparamagnétisme intrinsèque ou superparamagnétisme de Néel. Dans ce cas, $E_a \ll kT$. A l'arrêt du champ, l'aimantation des particules s'annule avec le temps caractéristique de Néel.

✓ La particule est ferromagnétique ($E_a \gg kT$), par conséquent son moment, bloqué sur l'axe de facile aimantation, s'aligne dans la direction du champ par rotation de la particule. La suspension magnétique possède un comportement de type superparamagnétique, c'est le **superparamagnétisme extrinsèque (Brown)**. A l'arrêt du champ, la position aléatoire des particules est rétablie, ce qui annule l'aimantation avec un temps caractéristique τ_B , appelé temps de Brown : $\tau_B = 3\eta V_H/kT$ avec η la viscosité du milieu et V_H le volume hydrodynamique de la nanoparticule.

Ces liquides magnétiques ont un comportement global paramagnétique, dont les particules monodomaines se comportent comme des macrospins. On parle alors de paramagnétisme géant des liquides magnétiques, car l'énergie magnétique $E_m = \mu_0 \mu H$ est environ 10^4 fois plus élevée que celle d'une substance paramagnétique. La courbe d'aimantation (Fig. 3) est bien décrite par la fonction de Langevin :

$$M = M_s L(x) = M_s (\coth x - 1/x)$$

avec $x = \mu_0 \mu H/kT$, μ moment magnétique des particules monodomaines, μ_0 perméabilité du vide et M_s aimantation à saturation. Elle résulte de l'équilibre entre l'énergie magnétique E_m et l'énergie d'agitation thermique kT .

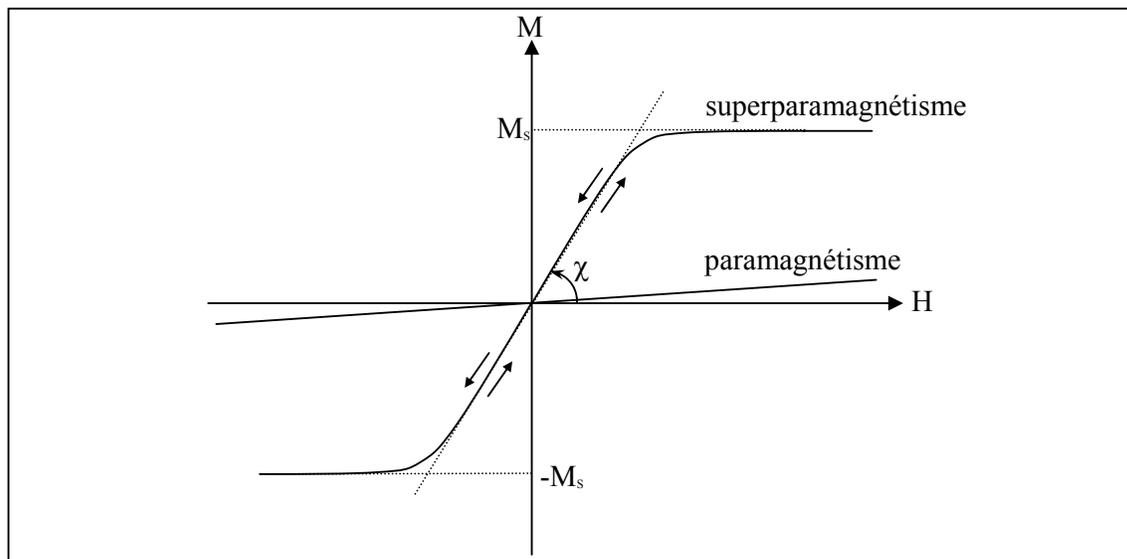
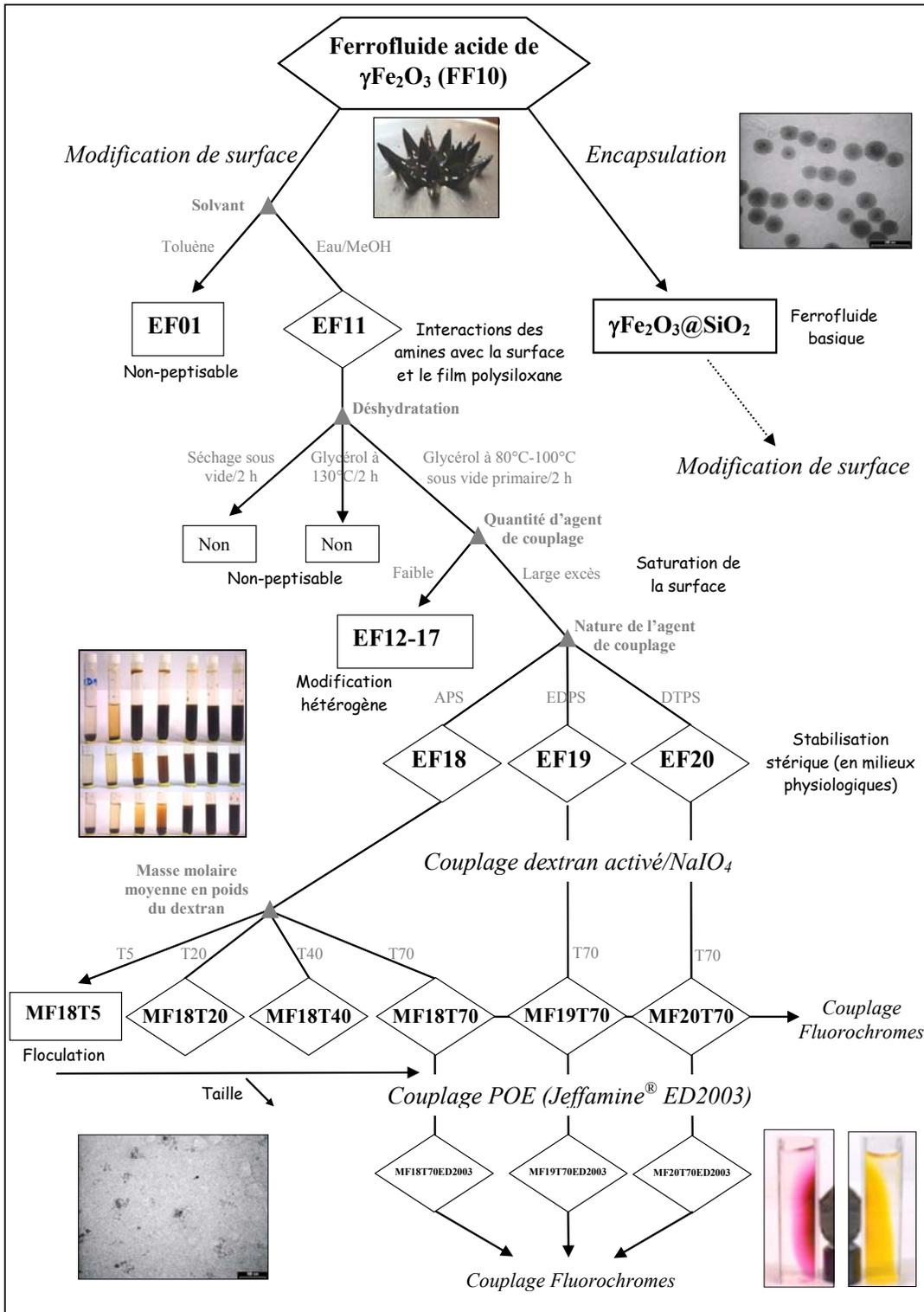


Figure 3. Représentation schématique de la courbe d'aimantation d'un liquide magnétique.

ANNEXE 3 : SCHEMA DE FILIATION DES FERROFLUIDES SYNTHETISES DANS LE CADRE DE CETTE ETUDE



LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

CHAPITRE I	
LE CONTEXTE BIOMEDICAL ET LA STRATEGIE DE L'ETUDE	
	5
1. Les vecteurs et les stratégies de la vectorisation	
	5
Figure 1.1. Représentation schématique de l'action des conjugués anticorps-drogue (immunotoxines)	6
Figure 1.2. Représentation schématique du principe de l'ADEPT	7
Figure 1.3. Représentation schématique du principe de la vectorisation d'une substance active vers une cellule cible	9
Tableau 1.1. Classification des vecteurs	11
2. L'IRM et les agents de contraste	
	17
Figure 2.1. IRM pondérée en T1 de la tête d'un patient après une lobectomie frontale vue en coupe sagittale de 5 mm d'épaisseur et angiogramme de la circulation intracrânienne	18
Figure 2.2. Evolution de l'intensité du signal en IRM en fonction des paramètres intrinsèques (densité de noyau d'hydrogène N(H), temps de relaxation T1 et T2) dans les tissus biologiques	19
Figure 2.3. Schéma montrant la différence de relaxation entre un tissu sain et un tissu tumoral	19
Figure 2.4. Principe de détermination graphique des relaxivités R1 et R2	21
Figure 2.5. Représentation schématique de l'effet de la concentration en agent de contraste sur l'intensité du signal	22
Figure 2.6. Structure des complexes du gadolinium	24
Figure 2.7. Profils NMRD représentant le comportement des relaxivités R1 et R2 d'un agent de contraste superparamagnétique (MION-46) en fonction de l'intensité du champ	28
Figure 2.8. Illustration de la distribution des agents de contraste dans le foie selon leur spécificité de ciblage, modulée par la présence d'une tumeur	30
Tableau 2.1. Relaxivités de produits de contraste commerciaux	21
Tableau 2.2. Relaxivités de quelques agents de contraste paramagnétiques dérivés du Gd-DTPA	25
Tableau 2.3. Caractéristiques de marqueurs superparamagnétiques	29
3. Le devenir des vecteurs <i>in vivo</i>	
	32
Figure 3.1. Image MEB de particules de magnétite adsorbées à la surface de macrophages J774A.1 de souris	32
Figure 3.2. Images IRM d'un rat avant et 1 h après injection de magnétoliposomes	35
Tableau 3.1. Influence de la taille des agents de contraste sur le ciblage	34
4. Problématiques de l'étude	
	42
Figure 4.1. Représentation schématique des vecteurs magnétiques recherchés dans le cadre de cette étude	43
Figure 4.2. Double marqueurs superparamagnétiques et fluorescents synthétisés dans le cadre de cette approche	45
Figure 4.3. Schéma de la synthèse de nanoparticules de magnétite stabilisées par le dextran	47
Figure 4.4. Schéma de la synthèse de nanoparticules de maghémite stabilisées par des charges électrostatiques	48

CHAPITRE II
SYNTHÈSE ET MODIFICATION DE LA SURFACE DE
NANOPARTICULES DE MAGHÉMITE 56

1. Synthèse et caractérisation des ferrofluides ioniques de maghémite 56

Figure 1.1. Représentation de la structure spinelle inverse de la magnétite 57

Figure 1.2. Représentation schématique des conditions expérimentales de l'élaboration du ferrofluide ionique de maghémite..... 60

Figure 1.3. Clichés de MET de nanoparticules de maghémite (exp. FF10) 63

Figure 1.4. Histogramme en taille des nanoparticules de maghémite et distribution de type log-normale corrélée (exp. FF10) 63

Figure 1.5. Représentation schématique du montage optique 65

Figure 1.6. Histogrammes PCS et MET des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ (exp. FF10) 66

Figure 1.7. Distributions lognormales des diamètres pondérés en nombre d_n , en volume d_v et en intensité d_z pour la maghémite colloïdale à pH 2 67

Figure 1.8. Diffractogramme de poudre de la maghémite synthétisée 68

Figure 1.9. Diffractogrammes de rayons X de la maghémite colloïdale traitée à différentes températures 70

Figure 1.10. Spectre d'absorption d'un ferrofluide de maghémite dilué à $3,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ en Fe 71

Figure 1.11. Droite d'étalonnage du dosage spectrophotométrique du fer dans les sols de maghémite 71

Figure 1.12. Hystérésis de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ à 15K et à 290K 72

Figure 1.13. Représentation schématique de l'adsorption de l'eau sur la surface d'un oxyde de Fer 73

Figure 1.14. Courbe ATG des nanoparticules de maghémite (FF10) 74

Figure 1.15. Courbes ATG/DSC montrant la perte de masse de la maghémite (FF10) lors de sa transformation en hématite 75

Figure 1.16a. Spectre de masse de la maghémite en fonction de la température 76

Figure 1.16b. Détail du spectre de masse de la maghémite montrant la désorption des ions chlorures lors de la transformation en hématite à 466°C 77

Figure 1.17a. Spectre DRIFT de la maghémite 78

Figure 1.17b. Spectres DRIFT de la maghémite colloïdale avant et après traitement thermique à 300°C 79

Figure 1.18. Représentation schématique de la variation du potentiel électrique et de la concentration ionique en fonction de la distance à l'interface dans le modèle de la double couche électrique de Gouy-Chapman 82

Figure 1.19. Représentation schématique de l'énergie d'interaction totale $V_T=V_A+V_R$ en fonction de la distance 84

Figure 1.20. Dispositif de mesure du potentiel zêta 87

Figure 1.21. Variation isotherme du potentiel zêta des nanoparticules de maghémite en fonction du pH du milieu 88

Figure 1.22. Détermination du domaine de stabilité du ferrofluide de maghémite en fonction du pH par spectrophotométrie 89

Figure 1.23a. Evolution de la taille des agrégats de nanoparticules en fonction du pH (distribution en nombre) 90

Figure 1.23b. Variation des diamètres pondérés en nombre, en masse et en intensité (PCS) en fonction du pH 92

Figure 1.24. Détermination de la concentration limite en NaCl du ferrofluide de maghémite 91

Figure 1.25. Photographies illustrant le comportement de dispersions de maghémite en milieu aqueux sous l'action d'un champ magnétique permanent 93

Tableau 1.1. Diamètres moyens calculés, issus des mesures de PCS, des nanoparticules de maghémite dispersées en milieu 66

Tableau 1.2. Concentrations ioniques du plasma sanguin humain 91

Tableau 1.3. Caractéristiques du ferrofluide de base. 92

2. Modification de la surface des nanoparticules de maghémite par des agents de couplage silaniques aminés	94
Figure 2.1. Représentation schématique du couplage d'un polymère à la surface d'un substrat inorganique par l'intermédiaire d'un organosilane	94
Figure 2.2. Mécanisme de greffage des alkoxy-silanes sur un substrat oxyde métallique	95
Figure 2.3. Structure résonante conduisant à la cyclisation de l'aminopropylsilanetriol en milieu acide	98
Figure 2.4. Spectre infrarouge en transmission de l'APS pur, entre 450 et 4000 cm^{-1}	102
Figure 2.5. Spectre infrarouge DRIFT entre 450 et 4000 cm^{-1} , de la maghémite modifiée par l'APS (EF11) avant et après peptisation à l'acide nitrique à pH 2,5	103
Figure 2.6. Variations isothermes du potentiel zêta des nanoparticules de maghémite de référence et modifiées en surface par le 3-aminopropyltriméthoxysilane (EF11) en fonction du pH	105
Figure 2.7. Variations isothermes du potentiel zêta du Poly(APS) en fonction du pH	107
Figure 2.8. Représentation de la forme zwitterionique du γ -aminopropylsilanetriol	108
Figure 2.9. Photographie présentant les séries de dilutions de solutions de NaCl en présence de maghémite et de maghémite modifiée EF11, à pH = 3 et graphe représentant la variation de la densité optique en fonction de la concentration en NaCl	108
Figure 2.10. Spectre de masse de la maghémite modifiée APS (exp. EF18) en fonction de la température	112
Figure 2.11. Thermogramme montrant la perte de masse de la maghémite modifiée APS et la transformation de la maghémite en hématite	113
Figure 2.12. Diffractogramme du produit résultant de la dégradation thermique de la maghémite modifiée APS	114
Figure 2.13. Thermogramme de la maghémite colloïdale d'origine et de cette même maghémite modifiée par l'APS	114
Figure 2.14. Influence de la concentration initiale d'APS sur la densité surfacique de greffage en APS à la surface de la maghémite	115
Figure 2.15. Thermogrammes des maghémites modifiées APS (EF18), EDPS (EF19) et DTSP (EF20)	117
Figure 2.16. Clichés MET de maghémites modifiées APS (EF18), EDPS (EF19) et DTSP (EF20)	117
Figure 2.17. Distributions lognormales des diamètres hydrodynamiques pondérés en nombre des maghémite modifiées APS (EF18), EDPS (EF19), DTSP (EF20) à pH 2,5 et histogramme correspond à la distribution des diamètres en nombre de particules de maghémite modifiées par l'APS selon le mode opératoire EF01	120
Figure 2.18. Variations isothermes, en fonction du pH du sol, du potentiel zêta des nanoparticules de maghémite d'origine et modifiées en surface par le 3-aminopropyltriméthoxysilane, avant (EF11) et après traitement thermique modéré sous vide (EF18)	122
Figure 2.19. Variations du potentiel zêta des sols de maghémite modifiée APS pour différentes densités de greffage	123
Figure 2.20. Diagramme de phase $\text{pH} = f(d_{\text{APS}})$ du système maghémite-3-aminopropyltriméthoxysilane	124
Figure 2.21. Mesures de potentiel zêta en fonction du pH de la maghémite modifiée par des agents de couplages silaniques aminés	125
Figure 2.22. Photographies montrant l'évolution de la concentration limite en ion Cl^- , à pH=3, en fonction de la nature de la chaîne aminoalkyle	126
Figure 2.23. Evaluation de la concentration limite en Cl^- , à pH = 3, par spectrophotométrie UV-vis	127
Figure 2.24. Spectres DRIFT de la maghémite modifiée APS avant (EF11) et après traitement thermique modéré sous vide (EF18)	129
Figure 2.25. Spectres DRIFT de la maghémite modifiée par l'EDPS (EF19) et le DTSP (EF20)	130
Figure 2.26. Spectres DRIFT d'échantillon de maghémite modifiée APS à différents temps de traitement thermique sous vide	131
Figure 2.27. Spectres de la maghémite EF18 traitée à différents pH	132
Figure 2.28. Spectres DRIFT de la maghémite-aminopropane avant et après traitement acide	133

Figure 2.29.	Spectres XPS généraux de la maghémite colloïdale, de la maghémite modifiée APS, EDPS et DTSPS	134
Figure 2.30.	Spectres XPS des témoins : O1s de la maghémite de référence, O1s du polyAPS superposé à celui de la maghémite modifiée APS et N1s du polyAPS comparé au spectre N1s de la maghémite modifiée APS	136
Figure 2.31.	Spectres XPS O1s de la maghémite modifiée APS, EDPS et DTSPS	139
Figure 2.32.	Spectres XPS N1s de la maghémite modifiée APS, EDPS et DTSPS	141
Figure 2.33.	Représentation schématique des interactions envisageables entre le film polyAPS et la surface de la maghémite	143
Figure 2.34.	Spectres Mössbauer expérimentaux et calculés à T = 4,2 K des échantillons FF10 ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$), EF11 et EF18 ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ -APS avant et après déshydratation)	145
Figure 2.35.	Population des distributions de champ hyperfins (H1 et H2) et d'éclatements quadrupolaires des trois échantillons FF10, EF11 et EF18	147
Figure 2.36.	Spectres Mössbauer expérimentaux et calculés, des échantillons FF10, EF11 et EF18, obtenus à T = 293 K	148
Tableau 2.1.	Fréquences d'absorption IR caractéristiques de l'APS pur	102
Tableau 2.2.	Codes d'expérience adoptés pour les échantillons de maghémite de différentes concentrations initiales en APS	111
Tableau 2.3.	Influence de la concentration en APS sur la densité de recouvrement à la surface des nanoparticules de maghémite	116
Tableau 2.4.	Densités surfaciques de recouvrement des maghémites modifiées par les agents de couplages APS, EDPS et DTSPS et surfaces développées respectives	118
Tableau 2.5.	Valeurs des diamètres moyens en nombre et écart-type des maghémites modifiées et de la maghémite d'origine, comparées à celles trouvées dans la littérature	120
Tableau 2.6.	Valeurs des concentrations limites de floculation en ions Cl^- et des constantes d'Hamaker des maghémites modifiées	127
Tableau 2.7.	Pourcentages atomiques et énergies de liaison (E_b) des éléments présents à la surface de la maghémite et des maghémites modifiées	135
Tableau 2.8.	Rapports des aires sous pic obtenus par intégration des raies $\text{Fe}2p_3$, O1s, N1s, C1s et Si2p du spectre XPS général	137
Tableau 2.9.	Comparaison des proportions d'agents silaniques greffés à la surface de la maghémite, évalué par XPS et par ATG	138
Tableau 2.10.	Positions et valeurs des aires des composantes issues de la désomation des pics O1s des maghémites modifiées	140
Tableau 2.11.	Positions et valeurs des aires des composantes issues de la désomation des pics N1s des maghémites modifiées	142
Tableau 2.12.	Largeurs des raies externes des spectres Mössbauer expérimentaux	146
Tableau 2.13.	Paramètres Mössbauer issus des spectres expérimentaux et calculés	146
Tableau 2.14.	Paramètres Mössbauer déterminés à T = 293 K pour l'ensemble des échantillons	149
Tableau 2.15.	Caractéristiques des nanoparticules modifiées	152
3. Encapsulation des nanoparticules de maghémite dans une coque de silice par microémulsion inverse		153
Figure 3.1.	Diagramme de phases pseudo-ternaire du système eau/hexane/AOT-Brij30 en % en poids	158
Figure 3.2.	Micrographies MET montrant l'influence de la proportion de TEOS/maghémite	158
Figure 3.3.	Micrographies MET des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@ \text{SiO}_2$ en fonction du pH initial du ferrofluide	161
Figure 3.4.	Distribution des diamètres des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@ \text{SiO}_2$	162
Figure 3.5.	Micrographies MET des nanobulles issus de la synthèse des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@ \text{SiO}_2$ à des pH de ferrofluides différents	163
Figure 3.6.	Mesures de potentiel zêta en fonction du pH des ferrofluides de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@ \text{SiO}_2$ et de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ en fonction du pH	164

Figure 3.7.	Diffractogrammes de rayons X en fonction de la température des particules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$	164
Figure 3.8.	Cycles d'hystérésis à 15K des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ recuites à différentes températures	165
Figure 3.9.	Courbes d'aimantation ZFC et FC en fonction de la température, de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ et de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$	166
Figure 3.10.	Cycle d'hystérésis à 15 K et 150 K des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$	166

CHAPITRE III

GREFFAGE DES MACROMOLECULES DE DEXTRAN ET HABILLAGE DES VECTEURS 171

1. Stabilisation des nanoparticules fonctionnalisées en milieu physiologique par greffage de dextran 171

Figure 1.1.	Formules chimiques développées du glucose et du dextran	173
Figure 1.2.	Schéma réactionnel retenu pour le couplage du dextran sur les nanoparticules de maghémite.....	174
Figure 1.3.	Description du système d'ultrafiltration tangentielle utilisé pour la purification des sols de maghémite-dextran.....	176
Figure 1.4.	Micrographies de MET des sols MF18T5 (a), MF18T20 (b), MF18T40 (c) et MF18T70 (d). (barre d'échelle=100 nm)	177
Figure 1.5.	Distributions en nombre des particules MF18T20, MF18T40 et MF18T70	178
Figure 1.6.	Spectres DRIFT du dextran avant (a) et après (b) oxydation au métapériodate de sodium, de la maghémite modifiée EF18 couplée au dextran T70 oxydé (MF18T70), avant (c) et après (d) réduction au borohydrure de sodium	179
Figure 1.7.	Mesures de potentiel zêta en fonction du pH des particules MF18T70	180
Figure 1.8.	Mesures de potentiel zêta des nanoparticules MF18T70 : (a) dans une solution de NaCl à 150 mM (pH 7), dans un tampon PBS (pH 7,4) à 50 mM.....	181
Tableau 1.1.	Valeurs moyennes des diamètres en nombre, en volume et en intensité des nanoparticules MF18T20, MF18T40 et MF18T70.....	178

2. « Habillage » des vecteurs par un poly(oxyde d'éthylène) fonctionnalisé et marqué par des fluorochromes 181

Figure 2.1.	Distributions des diamètres hydrodynamiques en nombre des nanoparticules MF(18,19,20)T70 avant et après couplage à la Jeffamine ED2003	183
Figure 2.2.	Elimination de l'excès de fluorochromes dans un sol de MF18T70-ED2003	184
Figure 2.3.	Schémas réactionnels et formules développées des fluorochromes utilisés lors de cette étude	185
Figure 2.4.	Photographies de ferrofluides de MF18T70-ED2003-TRITC et MF18T70-ED2003-5-FAM, SE	186
Figure 2.5.	Distributions des diamètres hydrodynamiques en nombre des nanoparticules MF(18,19,20)T70 marquées à la Rhodamine B et marquées à la tétraméthylrhodamine, après couplage à la Jeffamine ED2003	187
Tableau 2.1.	Valeurs moyennes des diamètres en nombre, en volume et en intensité des nanoparticules MF18T20, MF18T40 et MF18T70.....	184
Tableau 2.2.	Valeurs moyennes des diamètres en nombre, en volume et en intensité des nanoparticules MF18T20, MF18T40 et MF18T70.....	187

3. Internalisation des nanoparticules magnétiques fluorescentes sur des lignées cellulaires macrophagiques (HEMC5)	188
Figure 3.1. Elimination de l'excès de fluorochromes dans un sol de MF18T70-ED2003	189
Figure 3.2. Clichés IRM des microglies HEMC5 à 5 Teslas (observation en T1)	190
Tableau 3.1. Tests de capture macrophagique des nanoparticules fluorescentes. Les signes (-) et (+) dénotent les attributions qualitatives des différents marquages fluorescents. ((-) marquage faible, (+) marquage fort).	189
Annexe 1 Le phénomène physique de la RMN	195
Figure 1. Représentation schématique des mouvements de précession d'un ensemble de moments magnétiques nucléaires dans le cas où $I=1/2$ et de la distribution des niveaux énergétiques d'une assemblée de noyaux d'hydrogène à l'équilibre avant et après application d'un champ magnétique extérieur B_0	197
Figure 2. Représentation schématique de l'excitation \vec{B}_1 provoquant un basculement de l'aimantation à 90° et retour à l'équilibre de l'aimantation qui induit le signal RMN	198
Figure 3. Représentation schématique du signal RMN sinusoïdal amorti et spectre RMN après transformée de Fourier du signal	199
Figure 4. Relaxation longitudinale (a) et relaxation transversale (b) après une excitation à 90°	200
Annexe 2 Le superparamagnétisme.....	201
Figure 1. Représentation schématique de la courbe de première aimantation d'un composé ferromagnétique : effet du champ appliqué sur les domaines magnétiques	201
Figure 2. Représentation schématique du cycle d'hystérésis d'un matériau ferro- ou ferrimagnétique	202
Figure 3. Représentation schématique de la courbe d'aimantation d'un liquide magnétique	203
Annexe 3 Schéma de filiation des ferrofluides synthétisés	204
Liste des tableaux et figures	205

Résumé :

Ce travail porte sur le développement de nanovecteurs magnétiques à base de nanoparticules, destinés à des applications biomédicales *in vivo*.

Les études se sont dirigées vers l'optimisation du couplage de macromolécules de dextran et de dérivés de polyoxyde d'éthylène à la surface des nanoparticules magnétiques afin de les rendre biocompatibles. Des nanoparticules de maghémite, préalablement synthétisées, ont été modifiées en surface par des agents de couplage silaniques organofonctionnels suivi du greffage covalent des macromolécules

Les nanovecteurs, ont ensuite été marqués par des sondes fluorescentes pour réaliser des tests *in vitro* de double marquage (IRM, fluorescence) de microglies humaines (HEMC5).

Mots clés :

- Agents de contraste pour l'IRM
 - Maghémite
 - 3-aminopropyltriméthoxysilane
 - Ferrofluide
 - Nanovecteur
 - Modification de surface
-

Title : Synthesis and chemical surface modification of maghemite nanoparticles for biomedical applications.

Abstract :

This work deals with the development of nanovectors containing superparamagnetic nanoparticles, intended for *in vivo* biomedical applications. The studies moved towards the optimization of the macromolecule coupling such as dextran and polyethyleneoxide derivatives on the surface of magnetic nanoparticles in order to make them biocompatible. Surfaces of previously synthesized maghemite nanoparticles were modified by organofunctional silane coupling agents followed by a covalent grafting of the macromolecules. The nanovectors were then labeled by fluorescent probes to carry out double labeling *in vitro* tests (IRM, fluorescence) on human microglies (HEMC5).

Keywords :

- MRI Contrast agent
- Maghemite
- 3-aminopropyltriméthoxysilane
- Ferrofluid
- Nanovector
- Surface modification