



**HAL**  
open science

# Nanoparticules d'oxydes de fer et nanotubes de titanate pour l'imagerie multimodale et à destination de la thérapie anticancéreuse

Jérémy Paris

► **To cite this version:**

Jérémy Paris. Nanoparticules d'oxydes de fer et nanotubes de titanate pour l'imagerie multimodale et à destination de la thérapie anticancéreuse. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université de Bourgogne, 2013. Français. NNT : 2013DIJOS065 . tel-01123991

**HAL Id: tel-01123991**

**<https://theses.hal.science/tel-01123991>**

Submitted on 6 Mar 2015

**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.

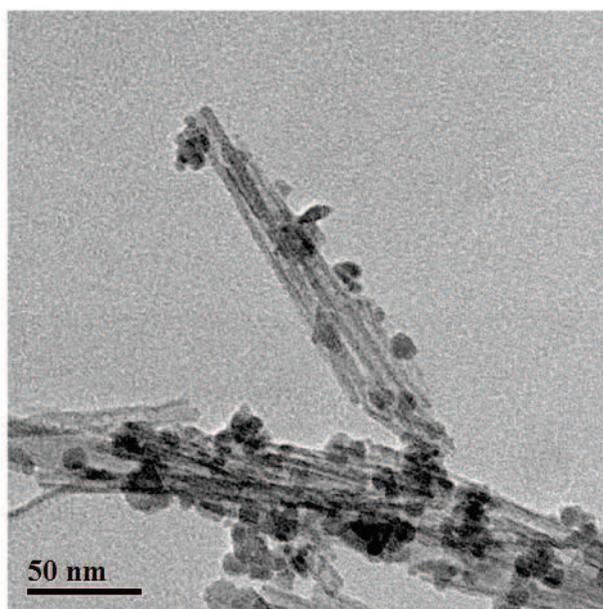
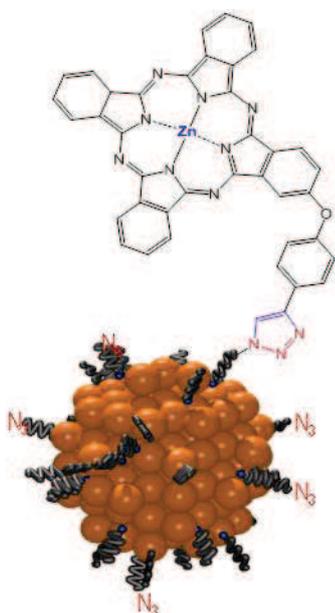
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE  
Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne  
UMR6303 Université de Bourgogne/CNRS  
UFR Sciences et Techniques  
École Doctorale Carnot

THÈSE  
Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Bourgogne  
Mention Sciences, Spécialité Chimie-Physique

Par Jérémy PARIS

# Nanoparticules d'oxydes de fer et nanotubes de titanate pour l'imagerie multimodale et à destination de la thérapie anticancéreuse



Soutenu le 13 décembre 2013 devant la commission d'examen :

M. A. DEREUX  
M. T. BÜRGI  
M. F. VOCANSON  
M. R. DECRÉAU  
Mme C. MENAGER  
Mme N. MILLOT  
M. J. BOUDON

Professeur à l'Université de Bourgogne  
Professeur à l'Université de Genève  
Professeur à l'Université Jean Monnet Saint-Etienne  
Maître de Conférences à l'Université de Bourgogne  
Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie  
Professeur à l'Université de Bourgogne  
Maître de Conférences à l'Université de Bourgogne

*Président*  
*Rapporteur*  
*Rapporteur*  
*Invité*  
*Examineur*  
*Directrice de thèse*  
*Co-encadrant de thèse*







## Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne, UMR 6303 CNRS-Université de Bourgogne. Je tiens à remercier Monsieur le Professeur A. Dereux de m'avoir accueillie dans ce laboratoire ainsi que d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je souhaite également remercier Monsieur F. Vocanson, Professeur à l'Université Jean Monnet Saint – Etienne et Monsieur T. Bürgi, Professeur de l'Université de Genève qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail et pour l'intérêt qu'ils ont montré à juger cette thèse.

Je souhaite exprimer une reconnaissance particulière à Madame C. Ménager, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie pour avoir pris le temps de participer à mon jury de thèse en tant qu'examineur.

Mes remerciements les plus sincères vont à Monsieur R. Decréau, Maître de Conférences à l'Université de Bourgogne pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse (en tant que membre invité). Merci aussi pour les échantillons de phtalocyanines, pour les discussions et les conseils tout au long de ces trois années de thèse.

Je tiens à remercier Madame N. Millot et Monsieur J. Boudon, mes directeurs de thèse, ainsi que Monsieur F. Bernard, animateur de l'équipe **Matériaux Nanostructurés : Phénomènes à l'Interface (MaNaPI)** de l'ICB, pour m'avoir accueillie au sein de leur équipe.

De très chaleureux remerciements vont à l'ensemble des personnes du **Département Technique d'Analyses – Instrumentation (DTAI)** avec qui j'ai eut plaisir de travailler lors de cette thèse et qui ont su me faire partager leurs connaissances, leurs compétences et aussi pour m'avoir apporté conseils : Olivier Heintz (XPS), Rémi Chassagnon (MET), Nicolas Geoffroy (DRX), Frédéric Herbst (MEB) et Maxime Guérineau (BET).

Je remercie également les nombreuses personnes qui m'ont permis d'avancer dans ce travail par le biais de diverses collaborations :

- ✓ L'entreprise CheMatech pour m'avoir fourni les agents macrocycliques (DOTA et NOTA) ainsi que pour leurs conseils scientifiques.
- ✓ L'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB) en particulier Y. Bernhard, C. Bernhard pour leur aide sur les greffages.
- ✓ Le Groupe d'étude de la Matière Condensée (GeMaC) de Versailles en particulier E. Popova pour les mesures magnétiques.
- ✓ Le CHU de Dijon et le laboratoire Le2i en particulier P.Walker pour l'accès ainsi que pour les acquisitions des séquences en IRM.
- ✓ Le Centre Georges-François Leclerc (CGFL), Centre de Lutte Contre le Cancer de Bourgogne en particulier A. Oudot et B. Collin pour la réalisation du radiomarquage et l'obtention des séquences en imagerie SPECT/CT.
- ✓ Le zebrafish lab en particulier J. Chluba et N. Yousfi pour m'avoir permis d'obtenir mes premiers et seuls résultats sur la toxicité des nanoparticules sur le modèle *in vivo* zebrafish

Ce travail n'aurait pas vu le jour sans eux, je tiens aussi à remercier le Conseil Régional de Bourgogne (thèse Jeune Chercheur Entrepreneur) et le Fond Européen de Développement Régional (FEDER) pour leur soutien financier.



# Sommaire

<b>Remerciements</b> .....	<b>5</b>
<b>Sommaire</b> .....	<b>7</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>13</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>17</b>
<b>Chapitre 1. Synthèse de nanotubes de titanate et de nanoparticules d'oxydes de fer</b> ....	<b>25</b>
I. Synthèse de nanotubes de titanate : TiONts .....	25
I.1 - État de l'art .....	25
I.1.1 - Les différentes voies de synthèses des nanotubes à base de titane.....	25
I.1.2 - La synthèse hydrothermale des nanotubes de titanate dans la littérature .....	26
I.1.3 - Morphologies des dérivés des nanotubes de titanate.....	27
I.1.4 - Mécanismes de formation et structure des nanotubes de titanate.....	27
I.2 - Notre synthèse hydrothermale de nanotubes de titanate .....	31
I.2.1 - Synthèse des nanotubes de titanate.....	31
I.2.2 - Caractérisation des nanotubes de titanate .....	34
I.3 - Optimisation de la synthèse de nanotubes de titanate .....	42
I.3.1 - Changement de réacteur .....	43
I.3.2 - Changement d'échelle : de 440 milligrammes à quelques grammes de nanotubes.....	48
I.4 - Résistance mécanique des TiONts éprouvée par broyage planétaire .....	51
I.4.1 - Protocole de broyage .....	51
I.4.2 - Analyse des nanotubes de titanate broyés .....	52
I.5 - Conclusion sur la synthèse des nanotubes de titanate .....	56
II. Synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer de structure spinelle superparamagnétique : SPIO .....	57
II.1 - Généralités sur les oxydes de fer.....	57
II.1.1 - Les oxydes de fer de structure spinelle .....	57
II.1.2 - Les propriétés magnétiques des oxydes de fer de phase spinelle.....	58
II.1.3 - Les principales méthodes de synthèse de nanoparticules de phase spinelle ....	59
II.2 - Synthèse et propriétés des nanoparticules d'oxydes de fer de structure spinelle synthétisées.....	59
II.2.1 - Synthèse des nanoparticules par coprécipitation type Massart .....	59
II.2.2 - Lavages des nanoparticules d'oxydes de fer .....	60

II.2.3 - Caractérisation des nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées .....	61
II.3 - Conclusion sur la synthèse des oxydes de fer .....	69
III. Création d'un nouveau nanocomposite : les TiONts – SPIO .....	70
III.1 - Amélioration des nanotubes de titanate : approche bibliographique .....	70
III.2 - Préparation des TiONts – SPIO : trois approches possibles .....	72
III.2.1 - Protocole des différentes méthodes de synthèse utilisées pour l'association de nanotubes de titanate avec les nanoparticules d'oxydes de fer .....	72
III.2.2 - Les différents rapports Fe/Ti testés .....	73
III.2.3 - Quels types d'accroches entre les nanotubes de titanate et les nanoparticules d'oxydes de fer ? .....	81
III.2.4 - Stabilité en suspension des nanotubes – SPIO .....	83
III.3 - Efficacité en tant qu'agent de contraste en IRM de ce nouveau nanocomposite... ..	84
III.3.1 - Hystérésimétrie .....	84
III.3.2 - Mesure de la relaxivité via l'IRM clinique du CHU de Dijon .....	86
III.3.3 - Autres caractérisations sur les TiONts – SPIO .....	87
III.4 - Conclusion sur la synthèse des TiONts – SPIO .....	89
III.5 - Tolérance des nanoparticules <i>in vivo</i> .....	89
IV. Conclusion sur la synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer et de nanotubes de titanate .....	90
<b>Chapitre 2. Préfonctionnalisation de la surface des nanoparticules .....</b>	<b>101</b>
I. Stabilité des nanoparticules en suspension .....	101
II. Modification de la surface par des agents stabilisants électrostatiques .....	104
II.1 - Propriétés et caractéristiques des agents stabilisants .....	104
II.1.1 - Le 3-aminopropyltriéthoxysilane .....	104
II.1.2 - L'acide 6-phosphonohexanoïque .....	106
II.2 - Conditions de fonctionnalisation des nanoparticules .....	108
II.2.1 - Protocole de fonctionnalisation .....	108
II.2.2 - Analyse des nanoparticules d'oxydes de fer modifiées par l'APTES et le PHA .....	110
II.2.3 - Propriétés des nanotubes de titanate fonctionnalisés par le PHA et l'APTES .....	117
II.2.4 - Étude de toxicité des nanoparticules préfonctionnalisées .....	124
II.3 - Conclusion sur la stabilisation des nanoparticules par des agents permettant une stabilisation par voie électrostatique .....	127
III. Couplage organique entre TiONts et SPIO modifiés pour la création d'un nouveau nanovecteur détectable en IRM .....	128

III.1 - Couplage organique entre TiONts et SPIO.....	128
III.1.1 - Protocole .....	128
III.1.2 - Analyse du conjugué TiONts – SPIO Orga après purification.....	131
III.1.3 - Fonctionnalisation avec le PEG <sub>2000</sub> – Si .....	134
III.1.4 - Aimantation à saturation et relaxivités mesurées des TiONts – SPIO Orga.....	139
III.1.5 - Comparaison des TiONts – SPIO Orga avec les TiONts – SPIO.....	140
III.2 - Conclusion sur la synthèse des TiONts – SPIO Orga.....	141
IV. Conclusion sur la modification de surface des nanoparticules .....	141
<b>Chapitre 3. Fonctionnalisation de nanoparticules pour l'imagerie nucléaire .....</b>	<b>149</b>
I. Suivi des nanoparticules par radiomarquage .....	149
II. Fonctionnalisation des nanotubes par des agents chélatants .....	154
II.1 - Les agents chélatants choisis pour l'imagerie nucléaire .....	154
II.2 - Fonctionnalisation de nanotubes de titanate à des fins d'imagerie SPECT.....	156
II.2.1 - Conditions de greffage du DOTA – NHS sur les TiONts – NH <sub>2</sub> .....	156
II.2.2 - Greffage de PEG sur les nanotubes fonctionnalisés par le DOTA .....	161
III. Biodistribution des nanotubes de titanate marqués à l'indium par imagerie SPECT ..	166
III.1 - Radiomarquage à l'indium pour l'imagerie SPECT et biodistribution des TiONts fonctionnalisés par le DOTA.....	166
III.1.1 - Radiomarquage à l'indium 111 .....	166
III.1.2 - Conditions du radiomarquage de l'indium 111 des nanotubes fonctionnalisés par le DOTA.....	168
III.2 - Imagerie SPECT et biodistribution des TiONts – DOTA [ <sup>111</sup> In] .....	169
III.2.1 - Le modèle animal étudié .....	169
III.2.2 - Images SPECT/CT et biodistribution des nanotubes de titanate .....	170
III.3 - Conclusion sur les nanotubes fonctionnalisés par le DOTA en vue d'imagerie SPECT/CT.....	172
IV. Agents de contraste bimodaux pour l'imagerie nucléaire (SPECT ou TEP) couplée à l'imagerie par résonance magnétique.....	173
IV.1 - Stratégie de fonctionnalisation pour la création d'agents de contraste bimodaux IRM/SPECT et/ou IRM/TEP .....	173
IV.1.1 - Protocole de greffage des agents chélatants macrocycliques .....	173
IV.1.2 - Caractérisation des agents de contraste bimodaux IRM/SPECT ou IRM/TEP .....	174
IV.2 - Fonctionnalisation des agents de contraste bimodaux SPIO – NOTA et SPIO – DOTA par le PEG <sub>3000</sub> – NHS .....	179

IV.2.1 - Analyse de la surface des nanohybrides fonctionnalisés avec le PEG <sub>3000</sub> – NHS .....	179
IV.2.2 - Estimation du taux de greffage du PEG <sub>3000</sub> – NHS à la surface des nanohybrides .....	180
IV.2.3 - Stabilité des agents de contraste bimodaux fonctionnalisés par le PEG.....	181
IV.2.4 - Propriétés magnétiques des agents de contraste bimodaux .....	183
IV.3 - Conclusion sur la création d'agents de contraste bimodaux pour l'imagerie IRM/SPECT ou IRM/TEP .....	184
V. Conclusion sur la fonctionnalisation des nanoparticules pour l'imagerie nucléaire .....	185
<b>Chapitre 4. Vers la création de nouvelles sondes théranostiques .....</b>	<b>189</b>
I. Sondes pour l'imagerie multimodale IRM/IO .....	189
II. Les phtalocyanines pour l'imagerie optique et la thérapie photodynamique .....	190
II.1.1 - Les phtalocyanines .....	190
II.1.2 - Intérêts des phtalocyanines.....	191
II.1.3 - Les phtalocyanines de zinc disponibles .....	195
II.1.4 - Les nanohybrides à base de phtalocyanines dans la littérature .....	199
III. Fonctionnalisation des nanotubes de titanate par les phtalocyanines de zinc .....	201
III.1 - Fonctionnalisation des nanotubes par voie peptidique .....	201
III.1.1 - Protocole de greffage des phtalocyanines sur les nanotubes de titanate.....	201
III.1.2 - Greffage ou adsorption des phtalocyanines à la surface des nanotubes ?.....	202
III.1.3 - Estimation du taux de greffage des phtalocyanines à la surface des nanotubes .....	206
III.1.4 - Fluorescence des nanotubes fonctionnalisés par voie peptidique.....	207
III.1.5 - Conclusion sur le greffage de phtalocyanines par voie peptidique.....	208
III.2 - Fonctionnalisation des nanotubes par chimie clic .....	208
III.2.1 - Qu'est que la chimie clic ?.....	208
III.2.2 - Préparation de la surface en vue de la chimie clic .....	208
III.2.3 - Fonctionnalisation des nanotubes par les phtalocyanines alcyne par chimie clic .....	214
III.3 - Greffage de PEG à la surface des nanotubes fonctionnalisés par les phtalocyanines .....	219
III.3.1 - Utilisation du PEG <sub>2000</sub> – Si .....	219
III.4 - Conclusion sur la fonctionnalisation des nanotubes par les phtalocyanines pour l'imagerie optique .....	222

IV. Création d'une sonde théranostique pour l'imagerie bimodale IRM – imagerie optique et pour la thérapie photodynamique associée à l'hyperthermie .....	223
V. Conclusion sur le greffage de phtalocyanines sur les nanoparticules .....	224
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>229</b>
<b>Perspectives de ce travail.....</b>	<b>233</b>
<b>Valorisation de ce travail.....</b>	<b>235</b>
<b>Récapitulatif des taux de greffages des différentes molécules sur les deux types de nanoparticules.....</b>	<b>238</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>239</b>
Annexe n°1 : Liste des appareils utilisés.....	239
Annexe n°2 : Informations obtenues par diffraction des Rayons X.....	240
Annexe n°3 : Analyses thermogravimétriques .....	244
Annexe n°4 : Potentiel zêta des nanoparticules (d'après <i>Maurizi 2010</i> ) .....	246
Annexe n°5 : Détermination de la taille par DLS .....	248
Annexe n°6 : Procédure de calcul de la relaxivité sur les gels d'IRM.....	249
Annexe n°7 : Le modèle <i>in vivo</i> : le zebrafish .....	251
Annexe n°8 : Protocole du test de cinétique de synthèse des ARN totaux sur le modèle cellulaire HepG2 .....	252
Annexe n°9 : Principe de la PDT .....	256
Annexe n°10 : Publication.....	258
Annexe n°11 : Les imageries nucléaires .....	261



## Liste des abréviations

APTES	3-AminoPropylTriEthoxySilane
ATG	Analyse ThermoGravimétrique
APS	PerSulfate d'Ammonium
BET	Brunauer Emmett Teller
DCC	DiCyclohexylCarbodiimide
DLS	Diffusion dynamique de la lumière ( <i>Dynamic Light Scattering</i> )
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DOTA	Acide 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tétraacétique
DOTA – NHS	Acide 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tétraacétique possédant un ester activé
DTPA	Acide DiéthylèneTriaminePentaacétique
DRX	Diffraction des Rayons X
EDC	1-Ethyl-(3-Diméthylaminopropyl) Carbodiimide
EDTA	Acide ÉthylèneDiamineTétraacétique
EtOH	Éthanol
EXAFS	Extended X-Ray Absorption Fine Structure
FTIR	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
FWHM	Largeur à mi-hauteur ( <i>Full Width Half Maximum</i> )
ICB	Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne
ICMUB	Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne
IR	InfraRouge
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
ITLC	Instant Thin Layer Chromatography
JCE	Jeune Chercheur Entrepreneur
MEB	Microscopie Électronique à Balayage
MET	Microscopie Électronique par Transmission
NHS	N-HydroxySuccinimide
NOTA	acide 2,2',2''-(1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triyl)triacétique
NOTA – NHS	acide 2,2',2''-(1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triyl)triacétique possédant un ester activé
IO	Optical Imaging/Imagerie Optique
PBS	Tampon phosphate salin ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
Pc	Phtalocyanines
PDT	Thérapie PhotoDynamique ( <i>photodynamic therapy</i> )
PEG	PolyÉthylène Glycol
PEG – SPIO – DOTA	Nanohybrides à base de nanoparticules d'oxydes de fer fonctionnalisées par le DOTA et le PEG <sub>3000</sub> - NHS
PEG – SPIO – NOTA	Nanohybrides à base de nanoparticules d'oxydes de fer fonctionnalisées par le NOTA et le PEG <sub>3000</sub> - NHS
PEG – TiONts – DOTA	Nanohybrides à base de nanotubes de titanate fonctionnalisées par le DOTA et le PEG <sub>3000</sub> - NHS
PEG – TiONts – Pc	Nanohybrides à base de nanotubes de titanate fonctionnalisées par les phtalocyanines et le PEG <sub>2000</sub> – Si
PEG – TiONts – SPIO	Nanocomposites synthétisés <i>par voie inorganique</i> de nanoparticules d'oxydes de fer et de nanotubes de titanate fonctionnalisés par le PEG <sub>2000</sub> – Si

PEG – TiONts – SPIO Orga	Nanocomposites synthétisés <i>par voie organique</i> de nanoparticules d'oxydes de fer et de nanotubes de titanate fonctionnalisés par le PEG <sub>2000</sub> – Si
PET	Tomographie par émission de positons ( <i>Positron Emission Tomography</i> )
PHA	Acide 6-phosphonoheptanoïque
SPECT	Tomographie par émission monophotonique ( <i>Single Photon Emission Computed Tomography</i> )
SPIO	Nanoparticules d'oxydes de fer ( <i>superparamagnetic iron oxide [nanoparticles]</i> )
SPIO – COOH	Nanoparticules d'oxydes de fer acide carboxylique
SPIO – DOTA	Nanoparticules d'oxydes de fer fonctionnalisées par le DOTA
SPIO – NH <sub>2</sub>	Nanoparticules d'oxydes de fer amine
SPIO – NOTA	Nanoparticules d'oxydes de fer fonctionnalisées par le NOTA
TEMP	Tomographie par Émission MonoPhotonique
TEP	Tomographie par Émission de Positons
THF	TetraHydroFurane
TiONts	Nanotubes de titanate ( <i>Titanate Nanotubes</i> )
TiONts – COOH	Nanotubes de titanate acide carboxylique
TiONts – DOTA	Nanotubes de titanate fonctionnalisées par le DOTA
TiONts – NH <sub>2</sub>	Nanotubes de titanate amine
TiONts – PcCOOH	Nanohybrides à base de nanotubes de titanate fonctionnalisés par la voie peptique avec la ZnPc – COOH
TiONts – PcNH <sub>2</sub>	Nanohybrides à base de nanotubes de titanate fonctionnalisés par la voie peptique avec la ZnPc – NH <sub>2</sub>
TiONts(COOH) – N <sub>3</sub>	Nanohybrides à base de nanotubes de titanate acide fonctionnalisés par le PEG – N <sub>3</sub>
TiONts(COOH) – Pc	Nanohybrides à base de nanotubes de titanate acide fonctionnalisés par le PEG – Pc
TiONts(NH <sub>2</sub> ) – N <sub>3</sub>	Nanohybrides à base de nanotubes de titanate amine fonctionnalisés par le PEG – N <sub>3</sub>
TiONts(NH <sub>2</sub> ) – Pc	Nanohybrides à base de nanotubes de titanate amine fonctionnalisés par le PEG – Pc
TiONts – SPIO	Nanocomposites synthétisés <i>par voie inorganique</i> de nanoparticules d'oxydes de fer et de nanotubes de titanate
TiONts – SPIO Orga	Nanocomposites synthétisés <i>par voie organique</i> de nanoparticules d'oxydes de fer et de nanotubes de titanate
US	UltraSons
UF	UltraFiltration
UV	UltraViolet
XANES	X-ray Absorption Near Edge Structure
XPS	Spectroscopie de Photoélectrons X ( <i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i> )
ZnPc	Phtalocyanine de zinc
ZnPc – NH <sub>2</sub>	Phtalocyanine de zinc amine
ZnPc – COOH	Phtalocyanine de zinc acide carboxylique
ZnPc – C ≡ C	Phtalocyanine de zinc alcyne
ZnPc – C ≡ C (hydro)	Phtalocyanine de zinc alcyne hydrosoluble

**« Beaucoup jugent, très peu savent, les vrais se taisent, les jaloux bavent ! »**  
*Citation Anonyme*



# Introduction

## Contexte de l'étude

Les possibilités offertes par les applications en médecine des nanoparticules sont l'un des facteurs essentiels du progrès médical au début de ce XXI<sup>ème</sup> siècle. Ainsi, le domaine de l'imagerie médicale est aussi touché par cette évolution technologique. Les rayons X ont permis, à Wilhelm Röntgen en 1895 (1<sup>er</sup> prix Nobel de physique en 1901), de réaliser la première image médicale de la main de sa femme et ainsi de donner naissance à la radiologie (Röntgen 1896). Depuis cette découverte, de nombreuses techniques d'imagerie médicale se sont développées pour obtenir des informations anatomiques et/ou physiologiques. Les premières techniques d'imagerie développées étaient anatomiques comme les rayons X, l'échographie et l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). Ensuite, ce sont les techniques d'imagerie physiologique qui ont été développées comme la scintigraphie nucléaire (SPECT<sup>1</sup> ou TEP<sup>2</sup>) et l'imagerie optique (IO). Chaque technique d'imagerie a ses propres avantages uniques et ses limitations intrinsèques (Figure 1) qui rendent difficile l'obtention d'informations précises et fiables sur la localisation de la maladie (Lee *et al.* 2012).

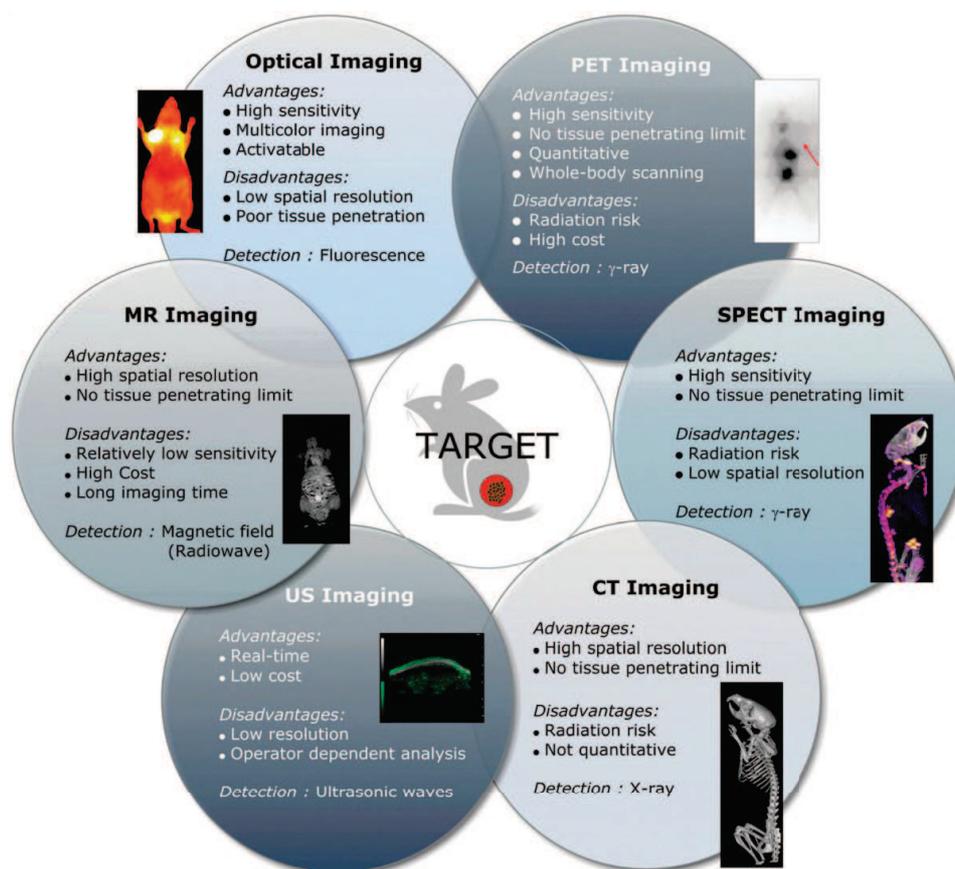


Figure 1. Les caractéristiques des différentes techniques d'imageries actuelles d'après (Lee *et al.* 2012)

<sup>1</sup> SPECT est l'acronyme anglais pour « Single Photon Emission Computed Tomography », traduit en français par Tomographie D'Émission MonoPhotonique (TEMP). L'acronyme anglais est le plus utilisé.

<sup>2</sup> TEP est l'acronyme français pour Tomographie par Émission de Positons, traduit de l'anglais PET pour Positron Emission Tomography.

De plus, les techniques d'imagerie ne possèdent pas la même résolution spatiale, ni la même sensibilité et la quantité de sondes injectées va dépendre de ces caractéristiques (Tableau 1).

Techniques d'Imagerie	Résolution spatiale	Sensibilité (mol.L <sup>-1</sup> )	Quantité de sondes injectées
IRM	25 – 100 µm	10 <sup>-3</sup> à 10 <sup>-5</sup>	µg – mg
SPECT	1 – 2 mm	10 <sup>-10</sup> à 10 <sup>-11</sup>	ng
TEP	1 – 2 mm	10 <sup>-11</sup> à 10 <sup>-12</sup>	ng
IO	2 – 3 mm	10 <sup>-9</sup> à 10 <sup>-12</sup>	µg – ng

Tableau 1. Caractéristiques des techniques d'imagerie IRM, SPECT, TEP et IO d'après (Pimlott et al. 2011) et (Cheon et al. 2008)

Depuis quelques années, la technologie permet d'associer deux types d'imagerie pour pallier aux limitations de chacune comme par exemple l'imagerie couplée PET/CT ou l'imagerie couplée IRM/TEP (Figure 2).

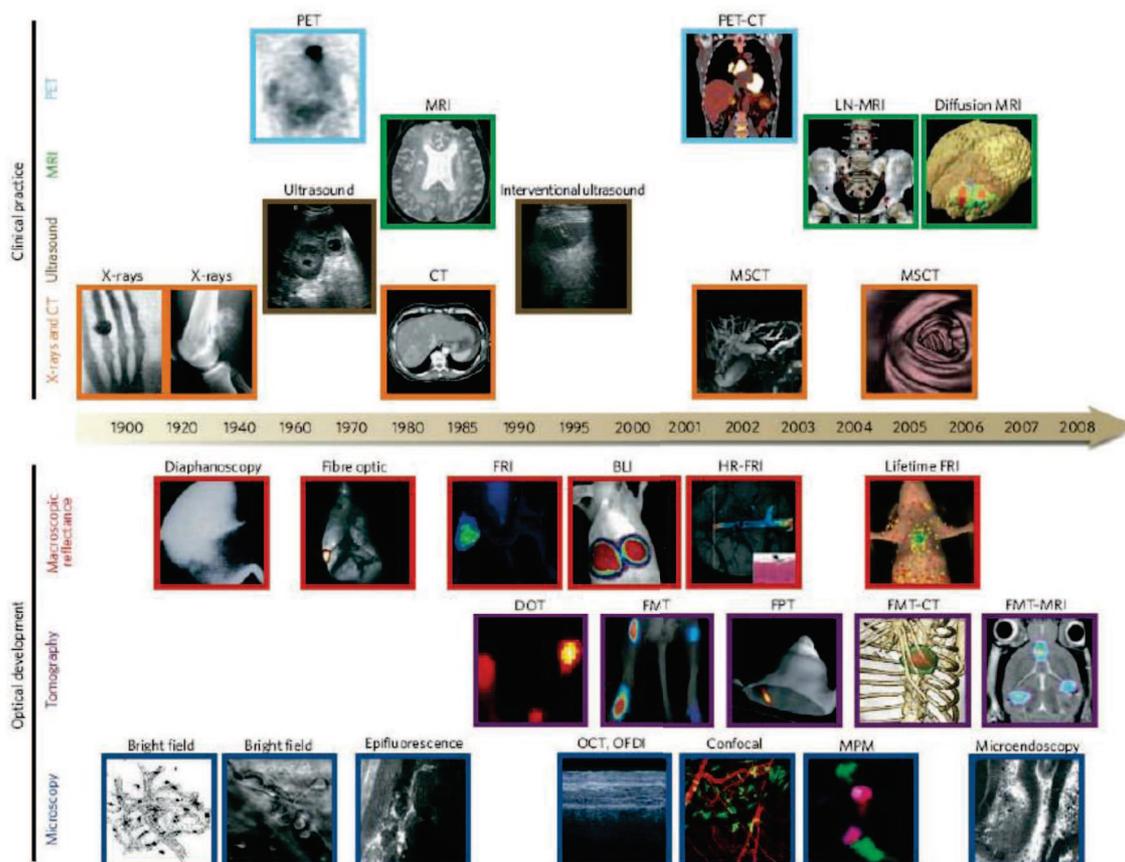


Figure 2. Historique des différentes techniques d'imagerie d'après (Weissleder et al. 2008) BLI, bioluminescence imaging ; CT, computed tomography ; DOT, diffuse optical tomography ; FMT, fluorescence-mediated tomography ; FPT, fluorescence protein tomography ; FRI, fluorescence reflectance imaging; HR-FRI, high-resolution FRI; LN-MRI, lymphotropic nanoparticle-enhanced MRI ; MPM, multiphoton microscopy ; MRI, magnetic resonance imaging ; MSCT, multi-slice CT ;OCT, optical coherence tomography ; OFDI, optical frequency-domain imaging ; PET, positron emission tomography.

Ces techniques d'imagerie couplées nécessitent l'utilisation d'agents de contraste multimodaux. Les nanoparticules avec leur taille nanométrique et leurs propriétés spécifiques à cette échelle sont de bons candidats comme agents de contraste multimodaux dans le domaine de l'imagerie médicale (Xie *et al.* 2010). Ainsi, certains oxydes métalliques tels que les nanoparticules d'oxydes de fer ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ou  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) possèdent à l'échelle nanométrique un comportement superparamagnétique qui pourra être utilisé en IRM (Sun *et al.* 2008).

Cependant, ces oxydes ne peuvent pas être utilisés directement après synthèse pour des applications en médecine. En effet, une modification de surface par des molécules organiques est nécessaire pour rendre ces nanoparticules biocompatibles et pour également éviter leur sédimentation dans les conditions physiologiques (Gupta *et al.* 2005). Cette modification permet aussi d'apporter d'autres fonctionnalités lorsque les molécules greffées possèdent des propriétés complémentaires aux nanoparticules (Figure 3) comme la fluorescence ou la capacité à complexer des cations radioactifs (Ametamey *et al.* 2008).

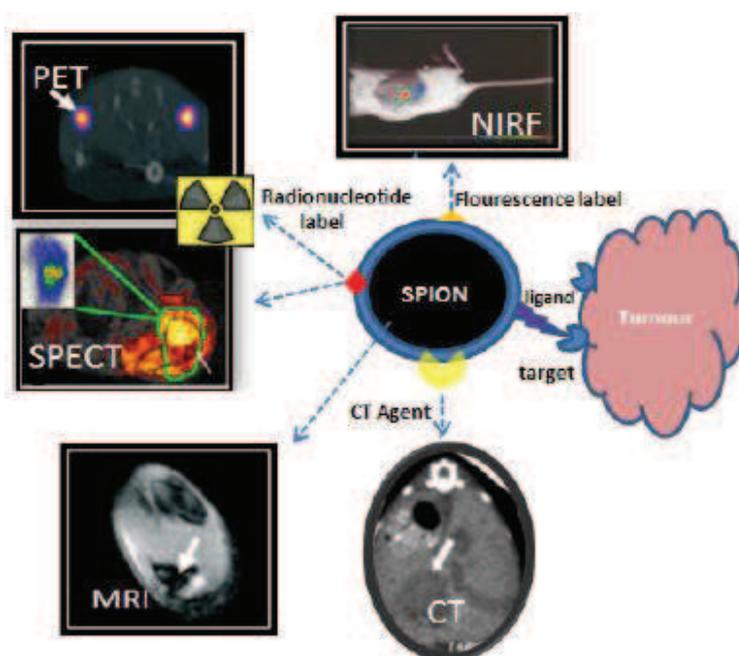


Figure 3. Concept d'un agent multimodal à base de nanoparticules d'oxydes de fer d'après (Thomas *et al.* 2013)

En plus d'apporter des propriétés complémentaires pour le diagnostique, les molécules organiques greffées peuvent apporter des propriétés thérapeutiques. D'ailleurs, certaines nanoparticules possèdent à l'échelle nanométrique un effet thérapeutique comme l'hyperthermie pour les nanoparticules d'oxydes de fer (Johannsen *et al.* 2007; Corchero *et al.* 2009; Johannsen *et al.* 2010) ou un effet radiosensibilisant pour les nanoparticules d'or (Simon-Deckers *et al.* 2008; Brun *et al.* 2009) et pour les nanotubes de titanate (Mirjolet *et al.* 2012).

L'association des propriétés de diagnostique et de thérapie est désignée par le terme « **théranostique** », une contraction de thérapeutique et diagnostique. Ainsi, des nanohybrides possédant une partie diagnostique et une partie thérapeutique sont considérés comme des nanohybrides théranostiques.

Forte de l'expérience de l'équipe MaNaPI du Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne dans le développement de nanoparticules pour des applications dans le domaine biomédical, cette thèse Jeune Chercheur Entrepreneur s'inscrit dans la continuité des travaux

précédents sur la synthèse des nanoparticules d'oxydes de fer (Maurizi 2010) et des nanotubes de titanate (Papa 2009). La particularité de ces derniers est leur morphologie atypique qui favorise leur internalisation par des cellules par rapport aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sphérique sans induire de cytotoxicité (Mirjolet *et al.* 2012; Papa *et al.* 2013). De même, aux doses requises pour les applications visées, les nanoparticules d'oxydes de fer sont connues pour ne pas être toxiques, le fer étant déjà présent dans l'organisme (Godin *et al.* 2010).

## Les Objectifs de ces travaux

Le but de cette thèse était de fabriquer des nanohybrides pour la création de sondes théranostiques ou d'agents de contraste multimodaux.

Pour arriver à ces fins, ce travail a été partagé en cinq objectifs essentiels :

1) **Synthétiser** des nanoparticules qui possèdent des propriétés d'imagerie ou de thérapie. La synthèse de ces nanoparticules doit être maîtrisée pour l'obtention de la structure, de la composition chimique et de la morphologie désirées. Notamment, une attention particulière sera prêtée à la reproductibilité des synthèses des nanotubes de titanate et des nanoparticules d'oxydes de fer.

2) **Préfonctionnaliser** la surface de ces nanoparticules par des ligands. Ces molécules organiques doivent apporter de nouvelles fonctions plus réactives en surface des nanoparticules mais ne doivent augmenter ni la toxicité ni l'état d'agglomération des nanohybrides.

3) **Développer** des agents de contraste bimodaux pour l'imagerie nucléaire et pour l'imagerie par résonance magnétique grâce au greffage de molécules capables de complexer des radioéléments. Ce travail s'intègre au sein de l'Equipex IMAPPI<sup>3</sup>.

4) **Élaborer** des nanohybrides théranostiques. Le greffage de molécules organiques possédant des propriétés en imagerie et en thérapie est une possibilité lorsque les nanoparticules ne possèdent pas elles-mêmes l'une ou l'autre des propriétés.

5a) **Valider** la biocompatibilité de ces nanohybrides. Des tests *in vitro* et *in vivo* devront permettre d'estimer la toxicité des nanohybrides.

5b) **Valider** l'efficacité en tant qu'agents de contraste des nanohybrides ainsi développés (essais *in vitro* et *in vivo*).

Pour cette étude, la stratégie de construction des nanohybrides est de fonctionnaliser étape par étape les nanohybrides (Figure 4) :

- 1) Étape 1 : Synthèse des nanoparticules
- 2) Étape 2 : Préfonctionnalisation de la surface des nanoparticules
- 3) Étape 3 : Greffage des molécules d'intérêt biologique comme des agents complexants ou des fluorophores
- 4) Étape 4 : Greffage de PEG pour améliorer la stabilité et la furtivité *in vivo* des nanohybrides.

---

<sup>3</sup> Le projet IMAPPI (Integrated Magnetic resonance And Positron emission tomography in Preclinical Imaging), déposé dans le cadre de l'appel à projet "Equipement d'Excellence" (EquipEx) des Investissements d'Avenir (Grand Emprunt National) est retenu par le Commissariat Général à l'Investissement. Ce projet concerne le développement d'une technologie émergente qui couple dans le même imageur à la fois les techniques d'IRM et de tomographie par émission de positons (TEP).

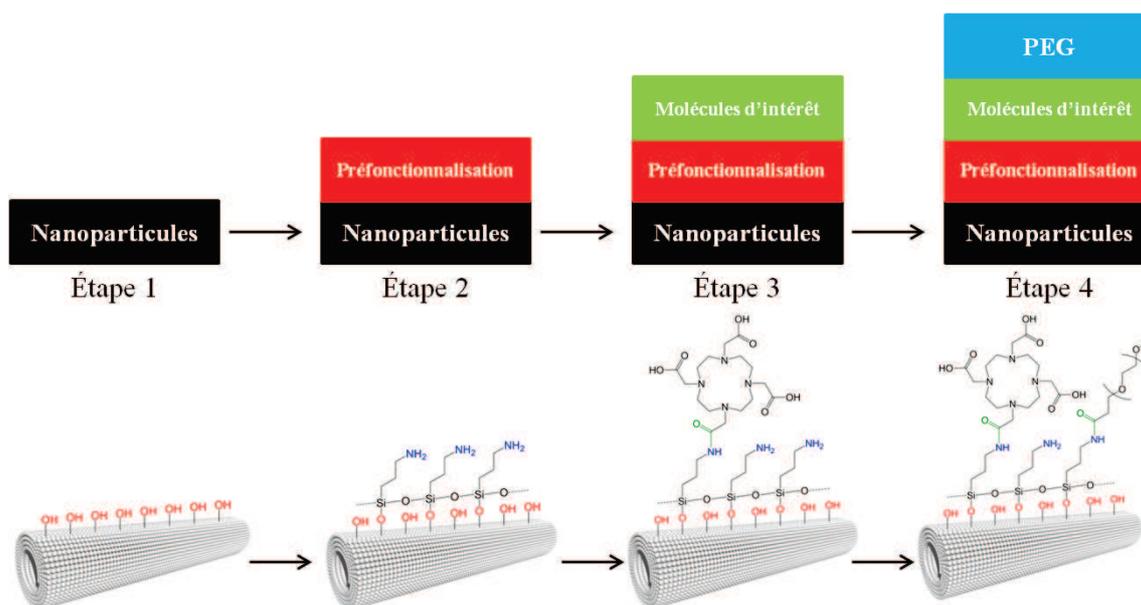


Figure 4. Représentation schématique de la construction étape par étape des nano-hybrides avec l'exemple des nanotubes de titanate et le greffage à leur surface de DOTA et de PEG.

## Plan du mémoire

Cette thèse est découpée en 4 chapitres :

### Chapitre 1 : Synthèse de nanotubes de titanate et de nanoparticules d'oxydes de fer

Dans ce premier chapitre, la synthèse des nanotubes de titanate et celle des oxydes de fer ainsi que leurs caractéristiques respectives sont détaillées. Par ailleurs, l'obtention et la caractérisation d'un nouveau nanocomposite formé des deux types de nanoparticules sont également exposées. Enfin, les premiers essais biologiques *in vitro* et *in vivo* de ces trois nanomatériaux sont présentés.

### Chapitre 2 : Préfonctionnalisation de la surface des nanoparticules

Le deuxième chapitre est scindé en deux parties. La première partie expose les différentes modifications de surface réalisées sur les nanotubes de titanate et les nanoparticules d'oxydes de fer ainsi que les caractérisations morphologiques et chimiques résultantes de ces modifications par un alcoxysilane ou un phosphonate. Puis s'en suivent les essais de couplage entre nanotubes de titanate préfonctionnalisés et nanoparticules d'oxyde de fer préfonctionnalisées. Enfin, les études préliminaires de toxicité *in vivo* des nanoparticules modifiées sont présentées dans ce chapitre.

### Chapitre 3 : Fonctionnalisation des nanoparticules pour l'imagerie nucléaire

Le troisième chapitre est en deux parties. La première partie traite de la fonctionnalisation des nanotubes de titanate par un agent complexant en vue de déterminer la biodistribution *in vivo* des nanotubes de titanate par imagerie nucléaire. La deuxième partie est consacrée à l'élaboration d'agents de contraste bimodaux pour l'imagerie IRM/SPECT ou IRM/TEP.

### Chapitre 4 : Vers la création de nouvelles sondes théranostiques

Le dernier chapitre est consacré à la création de sondes théranostiques grâce à la présence de phtalocyanines qui peuvent être utilisées pour l'imagerie optique ainsi que pour la thérapie photodynamique. Le greffage de phtalocyanines à la surface des nanoparticules par voie peptidique et par chimie clic est présenté ainsi que les caractéristiques intrinsèques d'imagerie de ces sondes.

## Références bibliographiques

- Ametamey, S.M., Honer, M. and Schubiger, P.A. (2008). "*Molecular Imaging with PET.*" Chemical Reviews **108**(5): 1501-1516.
- Brun, E., Sanche, L. and Sicard-Roselli, C. (2009). "*Parameters governing gold nanoparticle X-ray radiosensitization of DNA in solution.*" Colloids Surf B Biointerfaces **72**(1): 128-34.
- Cheon, J. and Lee, J.-H. (2008). "*Synergistically Integrated Nanoparticles as Multimodal Probes for Nanobiotechnology.*" Accounts of Chemical Research **41**(12): 1630-1640.
- Corchero, J.L. and Villaverde, A. (2009). "*Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles.*" Trends in Biotechnology **27**(8): 468-476.
- Godin, B., Sakamoto, J.H., Serda, R.E., Grattoni, A., Bouamrani, A. and Ferrari, M. (2010). "*Emerging applications of nanomedicine for the diagnosis and treatment of cardiovascular diseases.*" Trends in Pharmacological Sciences **31**(5): 199-205.
- Gupta, A.K. and Gupta, M. (2005). "*Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications.*" Biomaterials **26**(18): 3995-4021.
- Johannsen, M., Gneveckow, U., Thiesen, B., Taymoorian, K., Cho, C.H., Waldöfner, N., Scholz, R., Jordan, A., Loening, S.A. and Wust, P. (2007). "*Thermotherapy of Prostate Cancer Using Magnetic Nanoparticles: Feasibility, Imaging, and Three-Dimensional Temperature Distribution.*" European Urology **52**(6): 1653-1662.
- Johannsen, M., Thiesen, B., Wust, P. and Jordan, A. (2010). "*Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer.*" Int J Hyperthermia **26**(8): 790-5.
- Lee, D.-E., Koo, H., Sun, I.-C., Ryu, J.H., Kim, K. and Kwon, I.C. (2012). "*Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis.*" Chemical Society Reviews **41**(7): 2656-2672.
- Maurizi, L. (2010). Elaboration de nanoparticules fonctionnelles : applications comme agents de contraste en IRM. Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne, Université de Bourgogne.
- Mirjolet, C., Papa, A.L., Créhange, G., Raguin, O., Seigneur, C., Paul, C., Truc, G., Maingon, P. and Millot, N. (2012). "*The radiosensitization effect of titanate nanotubes as a new tool in radiation therapy for glioblastoma: A proof-of-concept.*" Radiotherapy and Oncology (108):136-142.
- Papa, A.L. (2009). Synthèse et caractérisation de nanotubes d'oxydes de titane Fonctionnalisation en vue de leur application comme nouveaux nanovecteurs biologiques : cas de la transfection d'ADN dans les cardiomyocytes. Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne, Université de Bourgogne.
- Papa, A.L., Dumont, L., Vandroux, D. and Millot, N. (2013). "*Titanate nanotubes: towards a novel and safer nanovector for cardiomyocytes.*" Nanotoxicology **7**: 1131-42.
- Pimlott, S.L. and Sutherland, A. (2011). "*Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease.*" Chemical Society Reviews **40**(1): 149-162.
- Röntgen, W.C. (1896). Eine neue art von strahlen. Würzburg, Stahel.
- Simon-Deckers, A., Brun, E., Gouget, B., Carrière, M., Sicard-Roselli and C. (2008). Impact of gold nanoparticles combined to X-Ray irradiation on bacteria. Heidelberg, ALLEMAGNE, Springer.
- Sun, C., Lee, J.S.H. and Zhang, M. (2008). "*Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery.*" Advanced Drug Delivery Reviews **60**(11): 1252-1265.
- Thomas, R., Park, I.-K. and Jeong, Y. (2013). "*Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Multimodal Imaging and Therapy of Cancer.*" International Journal of Molecular Sciences **14**(8): 15910-15930.

- Weissleder, R. and Pittet, M.J. (2008). "*Imaging in the era of molecular oncology.*" Nature **452**(7187): 580-589.
- Xie, J., Chen, K., Huang, J., Lee, S., Wang, J., Gao, J., Li, X. and Chen, X. (2010). "*PET/NIRF/MRI triple functional iron oxide nanoparticles.*" Biomaterials **31**(11): 3016-3022.



# Chapitre 1. Synthèse de nanotubes de titanate et de nanoparticules d'oxydes de fer

Ce chapitre est dédié à la synthèse des trois nanomatériaux : les nanotubes de titanate (TiONts), les oxydes de fer superparamagnétiques (SPIO) et la combinaison des deux nanomatériaux pour former un nouveau nanocomposite : les TiONts – SPIO. De ce fait, ce chapitre sera découpé en trois parties. La première sera consacrée à la synthèse de nanotubes de titanate après une étude bibliographique. La seconde partie traitera de la synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer de structure spinelle. Enfin, la troisième partie sera destinée à préciser la formation du nouveau nanocomposite, constitué de l'association des deux nanomatériaux précédents par voie inorganique ainsi que ses propriétés.

## I. Synthèse de nanotubes de titanate : TiONts

### I.1 - État de l'art

Les TiONts sont de plus en plus étudiés depuis leur découverte. Leur production est réalisable par différentes voies qui vont être décrites dans les paragraphes qui suivent.

#### I.1.1 - Les différentes voies de synthèses des nanotubes à base de titane

La synthèse des nanotubes de titane peut être effectuée par différentes méthodes : par voie hydrothermale classique (Kasuga *et al.* 1998; Kasuga *et al.* 1999; Chen *et al.* 2002b; Yao 2003), par moulage « template » à base d'alumine nanoporeuse (Hoyer 1996; Lakshmi *et al.* 1997; Imai *et al.* 1999), par oxydation anodique (Gong 2001; Ruan *et al.* 2005; Alivov 2009; Chen *et al.* 2013), par méthode sol-gel (Jung *et al.* 2002; Kobayashi *et al.* 2002), par des méthodes plus originales telles que l'ensemencement (Tian *et al.* 2003) ou plus récemment par phase vapeur hydrothermale (Liu *et al.* 2011). Ces techniques permettent d'obtenir des nanotubes de titanate (TiONts, comprenant du sodium dans la structure) ou de TiO<sub>2</sub> (dioxyde de titane) de diverses longueurs (L) et diamètres extérieurs (d<sub>ext</sub>) allant respectivement de 100 nm à plusieurs micromètres et de 8 à 500 nm en diamètres intérieurs (d<sub>int</sub>) (Tableau 2). À noter que pour certaines techniques de synthèse, la longueur n'est pas donnée car il s'agira le plus souvent de l'épaisseur du film composé par les nanotubes (template, anodique,...). Or, pour les applications en biologie, les dimensions les plus petites sont les plus intéressantes. Ainsi, la synthèse par voie hydrothermale va être privilégiée car celle-ci permet l'obtention de nanotubes les plus petits avec une longueur d'environ 100 nm et un diamètre extérieur d'une dizaine de nanomètres.

Méthodes	Nature	L	d <sub>ext</sub>	Références
Hydrothermal	TiONts	≈ 100 nm	≈ 8 nm	(Kasuga et al. 1998)
Template	TiO <sub>2</sub>	nd	200 nm	(Imai et al. 1999)
Anodique	TiO <sub>2</sub>	nd	35 – 320 nm	(Alivov 2009)
Sol-gel	TiO <sub>2</sub>	nd	500 nm	(Jung et al. 2002)
Ensemencement	TiO <sub>2</sub>	nd	12 nm	(Tian et al. 2003)
Phase vapeur	TiONts	10 μm	50 – 80 nm	(Liu et al. 2011)

Tableau 2. Longueurs et diamètres extérieurs des nanotubes de titanate ou de TiO<sub>2</sub> fabriqués par les différentes voies des synthèses

## I.1.2 - La synthèse hydrothermale des nanotubes de titanate dans la littérature

En 1998, Kasuga *et al.* ont établi pour la première fois la synthèse hydrothermale de nanotubes de titanate. La mise en place rapide et simple de la méthode « Kasuga » et les morphologies particulières obtenues ont attiré depuis l'attention comme en témoigne le nombre toujours croissant de publications éditées et citant la référence de Kasuga (1671 en septembre 2013).

Depuis, un grand nombre d'équipes de recherche dans le monde travaille sur la synthèse hydrothermale des nanotubes. La conséquence est la création de diverses variantes de la synthèse hydrothermale classique de Kasuga. Les points communs dans toutes ces investigations est le précurseur  $\text{TiO}_2$  mélangé à une solution concentrée de soude à  $10 \text{ mol.L}^{-1}$  suivi d'un traitement hydrothermal, la suspension obtenue est ensuite lavée par des rinçages à l'eau ou à l'acide. Cependant, une distinction est à faire entre certains points. En premier lieu, cela concerne la nature du précurseur de départ  $\text{TiO}_2$ . Dans un second temps, les paramètres tels que la température et la durée du traitement vont jouer un rôle sur l'obtention majoritaire de nanotubes (Tableau 3).

Précurseurs $\text{TiO}_2$	Conditions synthèse		Lavages	Réf
	T (°C)	t (h)		
rutile	110	20	$\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$	(Kasuga <i>et al.</i> 1998)
rutile	150	48	$\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$	(Lan <i>et al.</i> 2005)
anatase	130	72	$\text{H}_2\text{O}$	(Chen <i>et al.</i> 2002b)
anatase	120-190	22	$\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4$	(Bavykin <i>et al.</i> 2004)
anatase	140	72	$\text{HNO}_3$	(Gao <i>et al.</i> 2008)
anatase	130	72	$\text{H}_2\text{O}$	(Zhang <i>et al.</i> 2003)
anatase	100-180	48	$\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$	(Sun <i>et al.</i> 2003)
anatase	90	96	$\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$	(Nakahira <i>et al.</i> 2010)
Degussa P25 <sup>1</sup>	160	20	$\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$	(Morgan <i>et al.</i> 2008)
Degussa P25	110	4	$\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$	(Ma <i>et al.</i> 2006)
Aeroxide P25 <sup>2</sup>	150	72	$\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$	(Kiatkittipong <i>et al.</i> 2011)

Tableau 3. Conditions de synthèse hydrothermale des nanotubes de titanate dans la littérature entre 1998 et 2011

D'autres paramètres comme la dimension des cristallites du  $\text{TiO}_2$  de départ (Viriya-Empikul *et al.* 2009), sa structure (Morgan *et al.* 2009; Papa *et al.* 2009), le processus de lavage avec des solutions d'acide (Tableau 3) ou par un recuit thermique (Sreekantan *et al.* 2010) ainsi qu'un prétraitement aux ultrasons (Lan *et al.* 2005; Ma *et al.* 2006; Viriya-Empikul *et al.* 2009) peuvent avoir une influence sur le résultat final de la synthèse.

En conclusion, nombre de paramètres gouvernent la réussite de la synthèse hydrothermale de nanotubes de titanate (Hernandez-Alonso *et al.* 2011) et aucune équipe dans le monde n'utilise le même protocole. Forts des résultats de la précédente thèse sur le sujet (thèse Anne-Laure Papa (Papa 2009)), la synthèse hydrothermale des nanotubes développée par notre équipe, fixe les conditions de synthèse à  $150^\circ\text{C}$  pendant 36 heures, à partir du précurseur rutile dans la soude à  $10 \text{ mol.L}^{-1}$ , avec un prétraitement aux ultrasons de 15 minutes ( $P = 375 \text{ W}$ ) et suivi de lavages à l'eau déionisée.

<sup>1</sup> mélange d'anatase et de rutile dans un ratio [3 : 1] fabriqué par Degussa, une filiale d'Evonik (Ohno *et al.* 2001)

<sup>2</sup> autre nom du P25 Degussa après restructuration de la firme Evonik

### I.1.3 - Morphologies des dérivés des nanotubes de titanate

La synthèse hydrothermale de titanate à partir du  $\text{TiO}_2$  ne conduit pas exclusivement à la formation de nanotubes de titanate. Dans la littérature, un grand nombre de dérivés des nanotubes peuvent être nommés par diverses appellations : nanorubans, nanofeuilles, nanobaguettes, nanofils et nanofibres. Ils peuvent être classés en 4 groupes selon Bavykin *et al.* (Bavykin *et al.* 2006b) comme l'illustre la Figure 5.

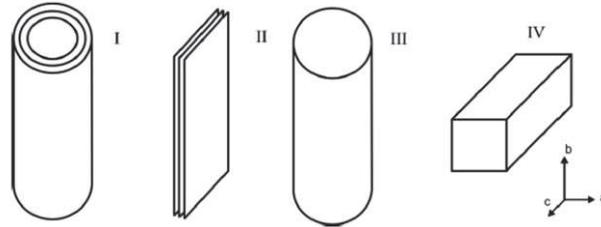


Figure 5. Les morphologies rencontrées dans la littérature I) nanotubes II) nanofeuilles, III) nanobaguettes ou nanofils, IV) nanofibres ou nanorubans d'après (Bavykin *et al.* 2006b)

### I.1.4 - Mécanismes de formation et structure des nanotubes de titanate

#### I.1.4.1 - Diagramme de phase

Comme vu précédemment, chaque équipe travaillant sur la synthèse de nanotubes réalise une synthèse différente ou proche de celle de Kasuga (Tableau 3). Des chercheurs (Morgan *et al.* 2008) ont réalisé un diagramme de phases morphologiques représentant les trois morphologies les plus courantes (nanoparticules, nanotubes et nanorubans) lors de la synthèse hydrothermale en faisant varier la concentration en soude et la température de réaction. Les domaines de ces phases sont estimés par DRX, Raman et MET. A noter que les synthèses ont été faites avec le Degussa P25 et que le traitement hydrothermal est de 20h en milieu NaOH. Ce travail met en évidence trois domaines (Figure 6) :

- À faible concentration en soude et à basse température, le domaine de stabilité des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  (le précurseur de départ);
- À forte concentration en soude et à haute température, le domaine de stabilité des nanorubans ;
- Entre les deux se situe le domaine de stabilité des nanotubes.

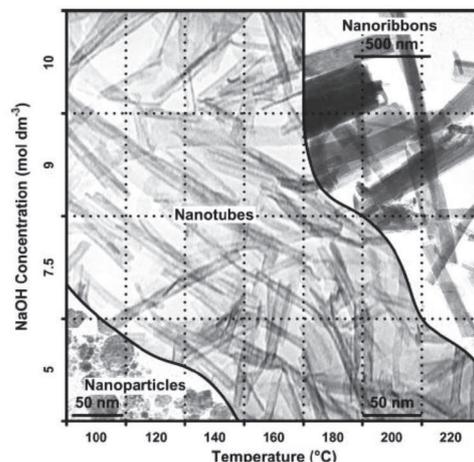


Figure 6. Diagramme de phase des différentes morphologies possibles en fonction de la concentration en soude et de la température d'après (Morgan *et al.* 2008)

Fort du travail précédent, l'équipe de Morgan (Morgan *et al.* 2009) a aussi établi des diagrammes de phases morphologiques possibles lors de la synthèse hydrothermale de nanotubes de titanate à partir des trois précurseurs les plus communément utilisés dans la littérature : anatase, rutile et Degussa P25 (Figure 7) toujours en fonction de la concentration en soude et de la température. D'après cette étude, pour le rutile, il semblerait qu'il ne soit pas possible d'obtenir des nanotubes seuls. Les nanotubes seraient toujours accompagnés de nanoparticules.

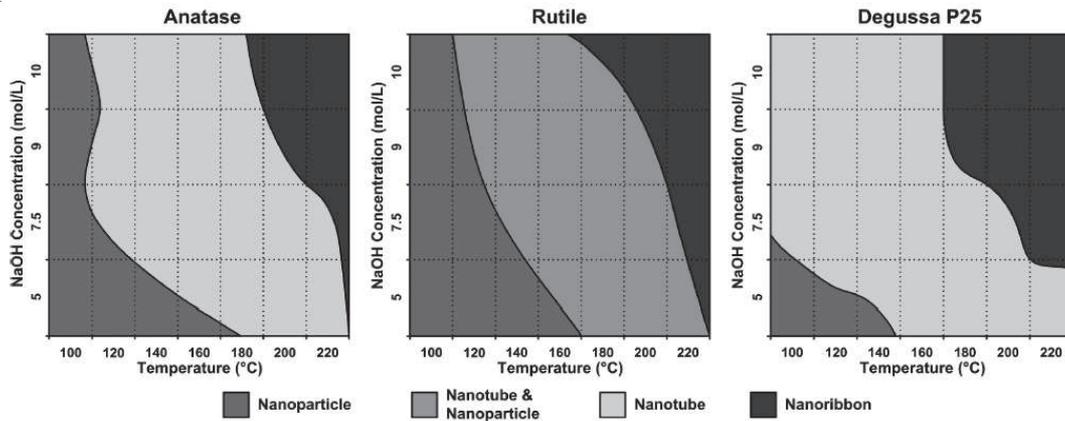


Figure 7. Diagramme de phases morphologiques possibles en fonction de la concentration en soude et de la température pour les trois précurseurs utilisés d'après (Morgan *et al.* 2009)

#### 1.1.4.2 - Mécanisme de formation

L'une des controverses causée par les nanotubes de titanate est leur mécanisme de formation en milieu alcalin. Vraisemblablement, ce mécanisme implique l'enroulement de nanofeuilles pour former les TiONts. Cependant, la séquence exacte des événements est encore méconnue. À ce jour, deux hypothèses sont en confrontation pour l'obtention de la nanofeuille permettant de former le nanotube : la **dissolution reprécipitation** (Kukovecz *et al.* 2005; Huang *et al.* 2009) du précurseur  $\text{TiO}_2$  et l'**exfoliation** (Chen *et al.* 2002b; Yuan *et al.* 2004; Nakahira *et al.* 2010).

La dissolution reprécipitation repose sur la **décomposition en bloc de  $\text{TiO}_6$**  du précurseur  $\text{TiO}_2$  puis sur la **recristallisation** en nanofeuilles avec des blocs de  $\text{TiO}_6$ . Cette nanofeuille s'enroule pour former des nanoboucles (Figure 8). Les morceaux de  $\text{TiO}_6$  restants vont alors s'intégrer aux nanoboucles dans un processus de croissance orientée menant aux nanotubes de titanate (Figure 8).

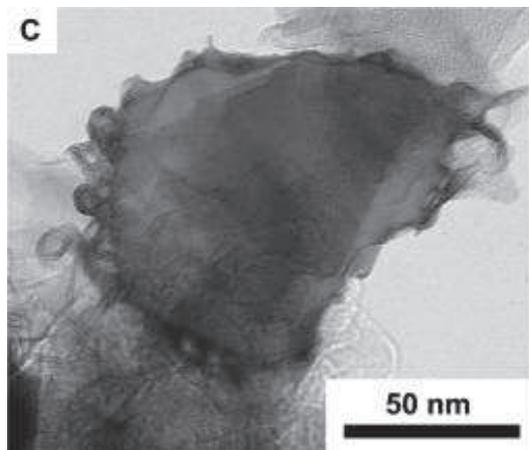


Figure 8. Nanoboucles à la surface des particules d'anatase d'après (Kukovecz *et al.* 2005)

À l'inverse, l'exfoliation consiste à **produire des nanofeuilles** à partir du précurseur  $\text{TiO}_2$  qui vont ensuite s'enrouler pour former des nanotubes (Figure 9). L'enroulement est basé sur la déficience en liaisons hydrogène à la surface des nanofeuilles et à l'intercalation des ions sodium au sein des nanofeuilles, l'obligeant à s'enrouler pour se stabiliser (Wang *et al.* 2002). Cette hypothèse a déjà été observée au MET (Chen *et al.* 2002b) et est supportée par des calculs sur la Density Functionnal Theory (DFT) (Chen *et al.* 2002a; Zhang *et al.* 2003). Dans leurs travaux, les auteurs ont calculé le diamètre optimal intérieur des nanotubes à 4,2 nm, proche de la réalité.

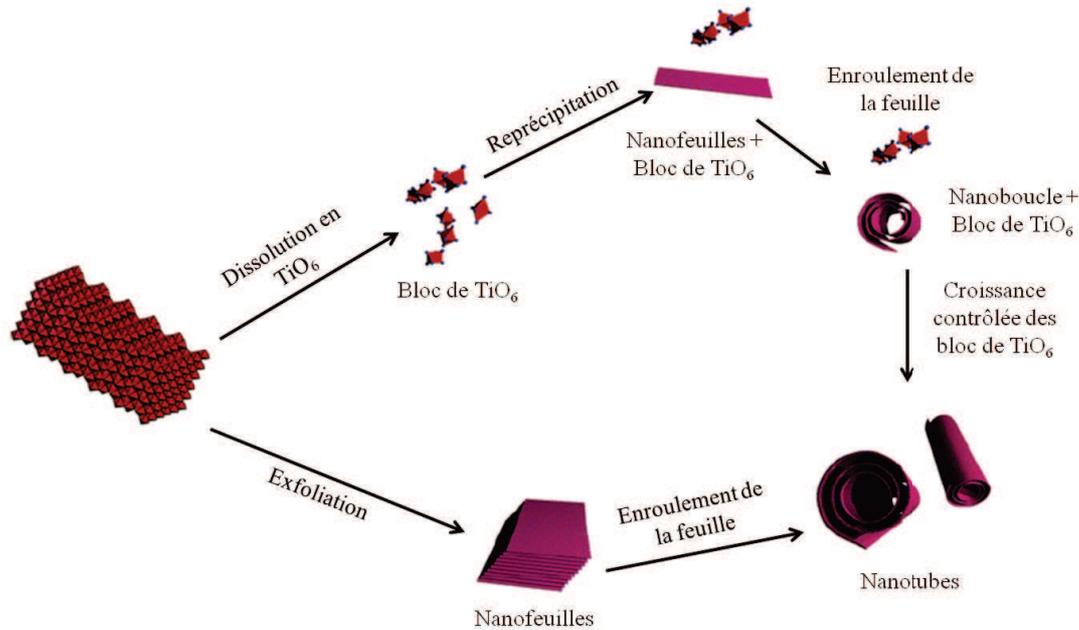


Figure 9. Représentation schématique des deux hypothèses possibles pour la formation de nanotubes

D'autre part, la transformation des feuilles en nanotubes est possible par trois mécanismes selon Bavykin *et al.* (Bavykin *et al.* 2004). Le premier est un enroulement en spirale ou en hélice d'une nanofeuille (a). Le deuxième et le troisième processus consistent en la courbure de plusieurs nanofeuilles unies pour respectivement former une structure en oignons (b) ou une structure concentrique (c) (Figure 10).

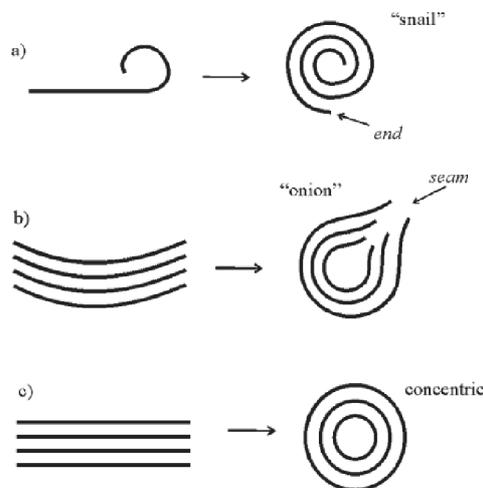


Figure 10. Schéma des mécanismes possibles de formation des nanotubes à partir de nanofeuilles d'après (Bavykin *et al.* 2004)

La morphologie dite en spirale est la plus commune (Yao 2003; Zhang *et al.* 2003) alors que la morphologie concentrique n'a jamais été observée car le nombre de parois de part et d'autre d'un nanotube peut être différent. L'enroulement sous forme d'oignon est moins fréquente (Bavykin *et al.* 2004; Bavykin *et al.* 2006b). D'autres formes aplaties peuvent être aussi observées (Papa *et al.* 2009). Cependant, il n'est pas encore envisageable de conclure sur le mécanisme le plus probable.

#### *1.1.4.3 - Des nanotubes de structure et de composition encore mal connues à ce jour*

L'identification de la structure cristalline des nanotubes de titanate a provoqué beaucoup de débats dans la littérature (Chen *et al.* 2007; Ou *et al.* 2007). Dans leur travail pionnier, Kasuga *et al.* ont caractérisé à tort leur produit comme étant une phase anatase (Kasuga *et al.* 1998). Depuis, plusieurs structures cristallines ont été proposées sur les produits nanotubulaires obtenus lors du traitement hydrothermal alcalin du précurseur  $\text{TiO}_2$ , y compris la structure monoclinique trititanate  $\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$  (Du *et al.* 2001; Chen *et al.* 2002a) ou tetratitanate  $\text{H}_2\text{Ti}_4\text{O}_9$  (Nakahira *et al.* 2004).

D'autres structures cristallines telles que la structure orthorhombique de titanate  $\text{H}_2\text{Ti}_2\text{O}_4(\text{OH})_2$  (Yang *et al.* 2003) ou  $\text{H}_{4x}\text{Ti}_{2-x}\square_x\text{O}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  (Ma *et al.* 2003; Ma *et al.* 2005) ont été soumises mais aussi la structure monoclinique  $\text{TiO}_2$ -(B) (Armstrong *et al.* 2005) et la structure tétragonal anatase (Poudel *et al.* 2005) ont été suggérées.

La détermination de la structure cristalline exacte des nanotubes de titanate est toujours incomplète à cause de difficultés intrinsèques à ces nanostructures telles que leur petite taille, le peu de matière les constituant et la formation de leur structure selon un certain axe cristallographique. Les positions précises et la concentration des atomes d'hydrogène à l'intérieur des nanotubes s'ajoutent aux difficultés précédentes.

Par ailleurs, des mesures cristallographiques plus sophistiquées utilisant la diffraction des rayons X et la distribution de paires atomiques sous radiation synchrotron ont démontré que la structure tridimensionnelle des produits nanotubulaires obtenus pendant le traitement hydrothermal peut être interprétée comme un arrangement d'octaèdres  $\text{TiO}_6$  dans des couches ondulées (Pradhan *et al.* 2007). L'arrangement particulier en octaèdres  $\text{TiO}_6$  peut dépendre de la morphologie de la nanostructure et de l'intercalation d'ions sodium dans la structure. Ceci est en accord avec la structure locale des nanotubes obtenue en utilisant l'analyse EXAFS (Saponjic *et al.* 2005). Les études XANES ont révélé que l'assemblage d'octaèdres  $\text{TiO}_6$  est différent dans la phase anatase, mais des structures semblables à l'anatase peuvent être présentes dans les nanotubes (Kubo *et al.* 2008).

Il est plus probable que les produits nanotubulaires obtenus correspondent plus largement à des titanates de sodium plutôt qu'à la structure anatase ou à la structure  $\text{TiO}_2$ -(B). Cette hypothèse est soutenue par l'observation de pics caractéristiques aux bas angles en DRX de titanates de sodium (Chen *et al.* 2007). De plus, un point isoélectrique bas et une valeur négative de potentiel zêta dans les solutions aqueuses illustrent l'effet acido-basique des titanates de sodium (Papa *et al.* 2011). L'adsorption préférable d'ions positivement chargés à la surface (Niu *et al.* 2007) et les facilités d'échange d'ions (Sun *et al.* 2003) entre les nanotubes et les milieux aqueux renforcent le point précédent.

La structure cristalline des nanotubes de titanate est toujours un sujet d'actualité et fait toujours partie de recherches systématiques dans la littérature. Cependant, il est possible de conclure que les structures ont plusieurs caractéristiques communes telles qu'une distance interparois de 7 à 8 Angström, l'échange d'hydrogène avec les ions sodium contenu dans le milieu alcalin ou encore des parois formées d'octaèdre  $\text{TiO}_6$ .

## I.2 - Notre synthèse hydrothermale de nanotubes de titanate

### I.2.1 - Synthèse des nanotubes de titanate

#### I.2.1.1 - Les caractéristiques du précurseur $TiO_2$ Tioxide®

Dans le cadre de ce travail, le dioxyde de titane utilisé est sous sa forme rutile et provient du commerce. Il est nommé Tioxide®. Celui-ci a été analysé par diffraction des rayons X (Annexe n°1 et 2) pour connaître la phase présente (Figure 11).

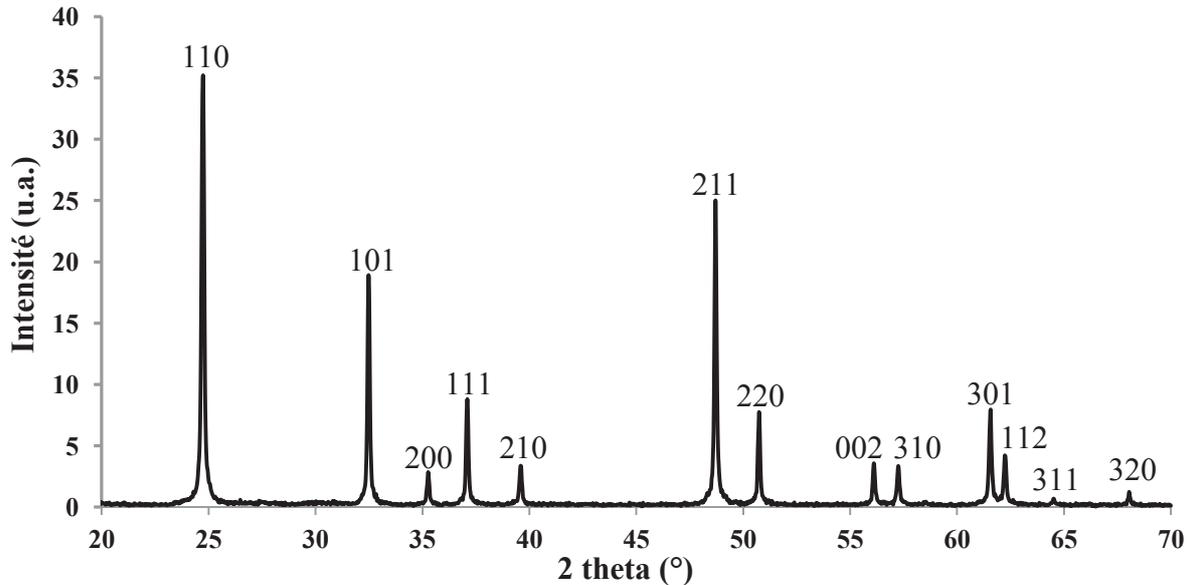


Figure 11. Diffractogramme du précurseur  $TiO_2$  Tioxide®,  $\lambda = 1,3922 \text{ \AA}$

Par reconnaissance de phase sur ce diffractogramme, la phase  $TiO_2$  rutile est présente (Fiche ICCD n° 01-072-7374). Les paramètres de maille sont calculés avec l'aide du logiciel Topas en tenant compte du décentrage de l'échantillon. De structure tétragonale, ( $a = b \neq c$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$  et de groupe d'espace  $P_{4_2}^m$ ), les paramètres de maille trouvés par cette méthode sont  $a = b = (4,597 \pm 0,002) \text{ \AA}$  et  $c = (2,961 \pm 0,002) \text{ \AA}$ .

De plus, le précurseur est observé en microscopie électronique en transmission (annexe n°1) pour connaître sa morphologie. Le rutile Tioxide® montre des grains le plus souvent allongés et s'agglomérant sous forme de rosace (Figure 12).

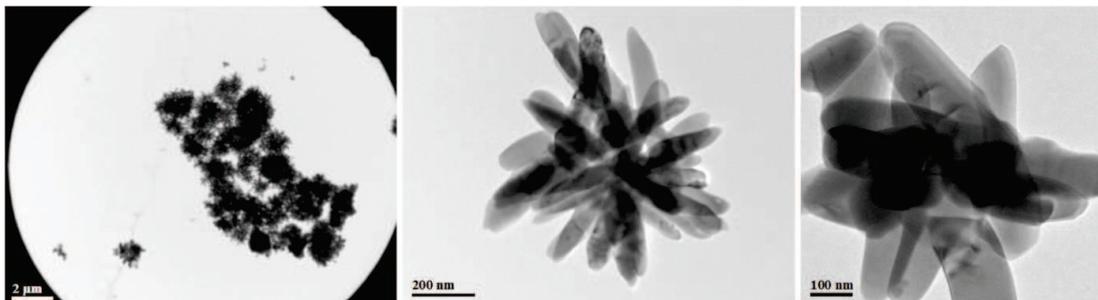


Figure 12. Clichés MET caractéristiques du rutile Tioxide®

Comme le rutile n'est pas sphérique aucun calcul de taille n'est possible à partir de la DRX ou la BET. Cependant, la surface spécifique calculée par la méthode BET (Brunauer Emmett Teller) (annexe n°1) après un dégazage à 100°C pendant 24h est de  $(6,5 \pm 0,1) \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ . Les caractéristiques morphologiques du rutile Tioxide® mesurées par ces différentes techniques sont regroupées dans le Tableau 4.

Caractéristiques	Valeurs
a	$(4,597 \pm 0,002) \text{ \AA}$
c	$(2,961 \pm 0,002) \text{ \AA}$
c/a	0,644
S <sub>BET</sub>	$(6,5 \pm 0,1) \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$

Tableau 4. Caractéristiques du dioxyde de titane rutile Tioxide®

Une analyse du précurseur rutile a été réalisée par XPS (annexe n°1) (Tableau 5). Quelques traces insignifiantes de soufre et d'azote ont été détectées ( $\leq 0,2 \%$ ). Le carbone détecté est du carbone de pollution provenant de l'atmosphère comme les molécules CO<sub>2</sub>, CO (Miller *et al.* 2002). Ici, le taux de carbone de pollution est très faible comparé aux taux habituellement trouvés en XPS (à titre d'exemple sur les aciers, C1s = 60 %).

Synthèse	Concentration atomique (%)		
	Ti 2p	O 1s	C 1s
Rutile	27	68	5

Tableau 5. Analyse XPS : concentrations atomiques des espèces en surface du précurseur rutile Tioxide® analysé en XPS

Le carbone de pollution sert à calibrer le spectre au seuil du carbone à 284,5 eV dans cette étude. Le niveau C1s se décompose en trois composantes distinctes à 284,5 eV pour les liaisons  $\underline{\text{C}} - \text{C}/\underline{\text{C}} - \text{H}$ , à 287 eV pour les liaisons  $\underline{\text{C}} = \text{O}$  et à 289,5 eV pour les liaisons  $(\underline{\text{C}} = \text{O}) - \text{OH}$  (Figure 13).

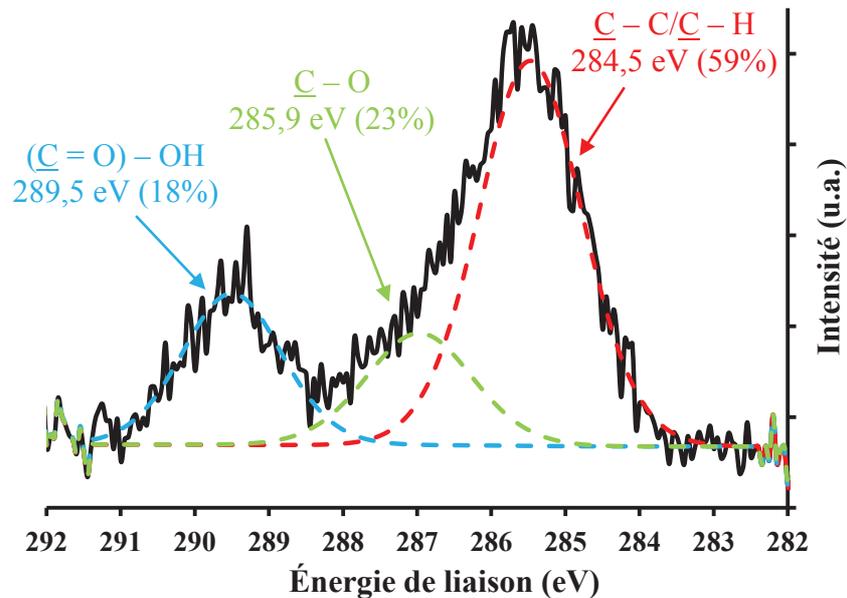


Figure 13. Analyse XPS : Décomposition du niveau C1s du précurseur rutile TiO<sub>2</sub>

*1.2.1.2 - Protocole de synthèse de nanotubes d'oxyde de titanate*

Dans ce travail expérimental, les TiONts ont été produits par voie hydrothermale classique en milieu basique. 440 mg de rutile (Tioxide®) sont ajoutés à 110 mL de soude à une concentration fixée à 10 mol.L<sup>-1</sup>. Ensuite, la suspension subit un traitement à la canne à ultrasons de 15 minutes (2s pulse + 2s arrêt), soit un traitement d'une durée totale de 30 minutes à une puissance de 375 W: cette étape permet d'amorcer la réaction (Après ultrasons = 65°C, pH = 14). Enfin, le mélange est introduit dans un bol en téflon puis celui-ci est placé dans l'enceinte du réacteur hydrothermal sous une agitation magnétique de 120 trs/min, chauffé à une température stabilisée autour de (155 ± 2) °C et sous une pression absolue de 3,5 bar pendant 36h.

Dans ce travail, le début de la synthèse est choisi arbitrairement quand **la température du mélange atteint 110°C (t = 0)**. Et la synthèse est terminée lorsque t = 36h à 155°C. Le refroidissement dure environ une heure.

Le réacteur hydrothermal qui a permis cette synthèse a été développé dans notre laboratoire en 2006 et peut contenir jusqu'à 110 mL de suspension et sera nommé « réacteur laboratoire » dans la suite du manuscrit (annexe n°1). De même, la synthèse de nanotubes de titanate avec 440 mg de rutile étant la synthèse de référence, elle sera appelée **TiONts**.

*1.2.1.3 - Lavage des nanotubes de titanate obtenus*

Après synthèse, la suspension contient en plus des nanotubes de titanate, les ions résiduels de la soude en large excès. Des étapes de purification sont nécessaires pour obtenir une suspension débarrassée de ces ions.

Après refroidissement du réacteur (environ 1h), un cycle de dialyse est d'abord appliqué sur la suspension basique préalablement placée dans une membrane de dialyse de seuil de coupure de 12 kDa. Cette dernière est plongée dans un bac de 25 litres d'eau déionisée afin de diminuer très rapidement et fortement le pH de la suspension (pH<sub>initial</sub> = 14) vers un pH neutre. Les échanges transmembranaires résultant de la diffusion des espèces et les échanges d'ions à travers la membrane sont favorisés lorsque le gradient de concentration est élevé d'où l'utilisation d'un bac de 25 litres pour accélérer la diffusion des ions et faire chuter rapidement le pH. Le pH de l'eau du dialysat est contrôlé régulièrement et l'eau est changée plusieurs fois pour favoriser l'échange d'ions à travers la membrane par effet d'osmose. L'eau de dialyse est renouvelée au bout de 2 heures (pH = 14), puis après 5 heures (pH = 9). La dernière dialyse dure 24 heures et le pH final de l'eau de dialyse avoisine le pH = 7.

Afin d'optimiser le lavage, la suspension est ensuite ultrafiltrée (membrane : 30 kDa) sous une pression d'azote (P = 2 bar) d'abord à l'eau déionisée ( $\sigma = 18 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) et ensuite avec de l'eau ultrapure ( $\sigma = 1,8 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) jusqu'à ce que la conductivité du filtrat soit inférieure à 10  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

À l'instar de la dialyse, l'ultrafiltration (UF) est une filtration sur membrane avec une taille de pores choisie où le liquide traverse la membrane semi-perméable grâce à une différence de pression. Les nanoparticules en suspension de poids moléculaire au-dessus du seuil de coupure sont retenues tandis que l'eau et les molécules de poids moléculaire au-dessous du seuil de coupure passent à travers la membrane. Ce processus de séparation permet de purifier et/ou concentrer des suspensions de nanoparticules (Figure 14). Cette technique a été mise en œuvre dans l'équipe pour la première fois durant cette thèse.

La suspension est donc lavée en deux étapes. D'abord, par dialyse pendant 30 heures pour diminuer fortement le pH, puis par ultrafiltration pour purifier au maximum la

suspension des ions résiduels et gagner du temps car l'ultrafiltration est une méthode de purification plus rapide que la dialyse.

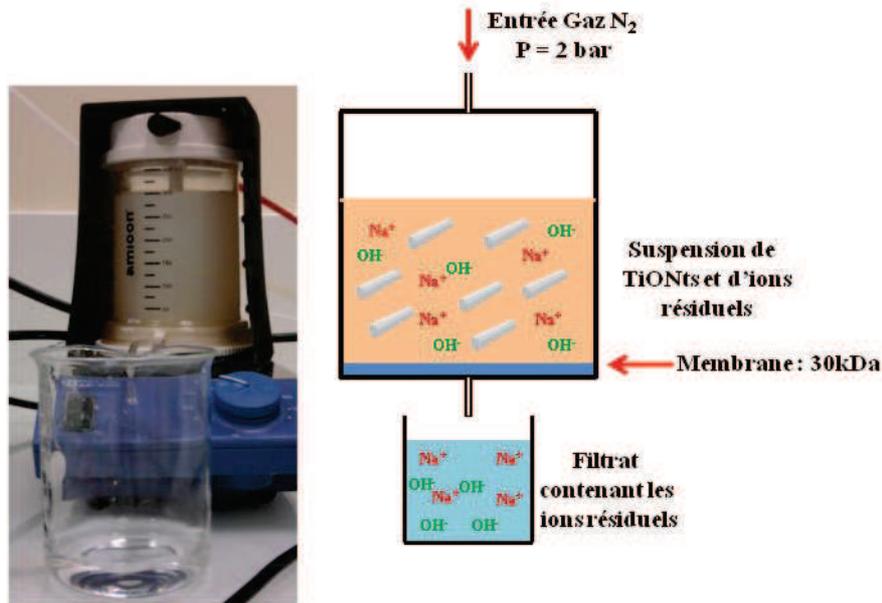


Figure 14. Photographie et schéma du montage d'ultrafiltration

Pour finir la suspension est lyophilisée pour récupérer une poudre de TiONts prête à être caractérisée.

## I.2.2 - Caractérisation des nanotubes de titanate

### I.2.2.1 - Analyse morphologiques des TiONts

Après lyophilisation, la microscopie électronique en transmission est la seule caractérisation possible pour mettre en avant la synthèse effective de TiONts (Figure 15). Ces nanotubes dévoilent une structure enroulée en spirale avec une cavité interne. Les nanotubes de titanate ont trois dimensions caractéristiques que sont le diamètre extérieur ( $d_{ext}$ ), le diamètre intérieur ( $d_{int}$ ) et la longueur ( $L$ ). Ces trois dimensions furent déterminées par comptage de 100 nanotubes sur clichés MET. Ce comptage donne des diamètres moyens extérieur et intérieur respectivement de  $d_{ext} = (9,1 \pm 1,3)$  nm et  $d_{int} = (3,8 \pm 0,6)$  nm ainsi qu'une longueur moyenne de  $(156 \pm 53)$  nm (Figure 15). La dispersion en taille est plus forte dans le cas des longueurs, la dispersion des diamètres est plus resserrée. Dans la littérature, les valeurs trouvées des longueurs et des diamètres sont semblables aux valeurs déterminées par MET (Kasuga *et al.* 1998; Chen *et al.* 2002b; Sun *et al.* 2003; Bavykin *et al.* 2009).

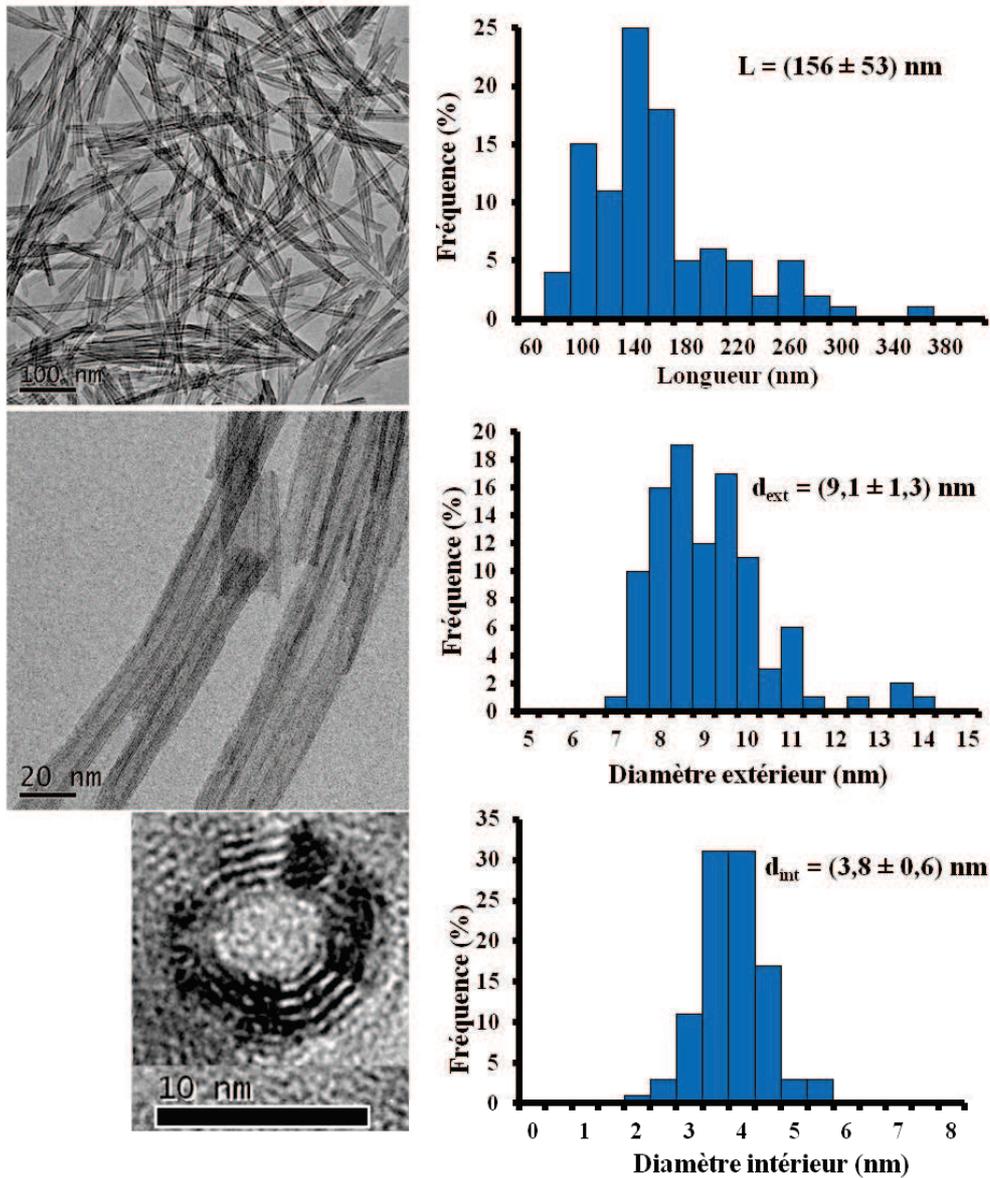


Figure 15. Images MET et distribution de taille en fréquence pour la longueur, les diamètres extérieurs et intérieurs des nanotubes de titanate

Cependant l'imagerie MET a révélé la présence d'autres nano-objets : des nanofeuilles et des nanorubans comme le montre la Figure 16. Ces derniers peuvent être un inconvénient pour les applications futures bien que leur présence soit toujours minoritaire (moins de 5 % en nombre sur les images MET). Les nanorubans sont très distincts des nanotubes car ceux-ci sont pleins et mesurent 150 à 200 nm de largeur et 1 à 10  $\mu\text{m}$  de longueur (Bellat 2012) contrairement aux nanotubes qui mesurent entre 100 et 200 nm de longueur et environ 10 nm de large.

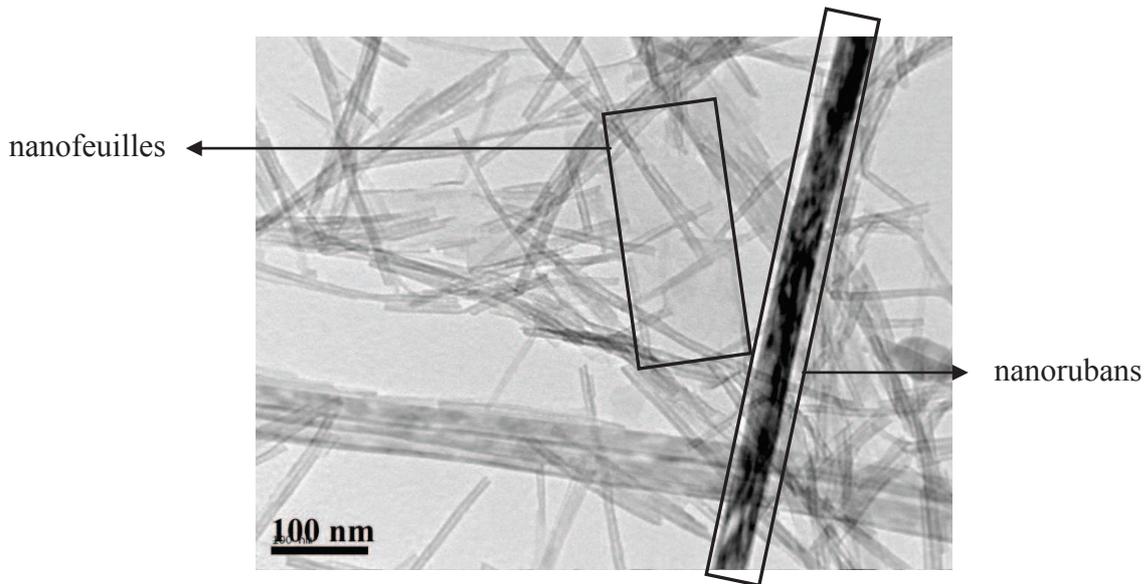


Figure 16. Cliché MET des 3 morphologies : nanotubes (95%), nanorubans (3%), nanofeuilles (2%)

Grâce à la microscopie, il est possible aussi de déterminer la distance interparois des nanotubes de titanate qui est de l'ordre  $d = 7,8 \text{ \AA}$  dans le sens de la longueur et d'environ  $d = 1,9 \text{ \AA}$  dans le sens de la largeur. Dans la littérature, la distance interparois des nanotubes est du même ordre de grandeur (Kasuga *et al.* 1998; Bavykin *et al.* 2004).

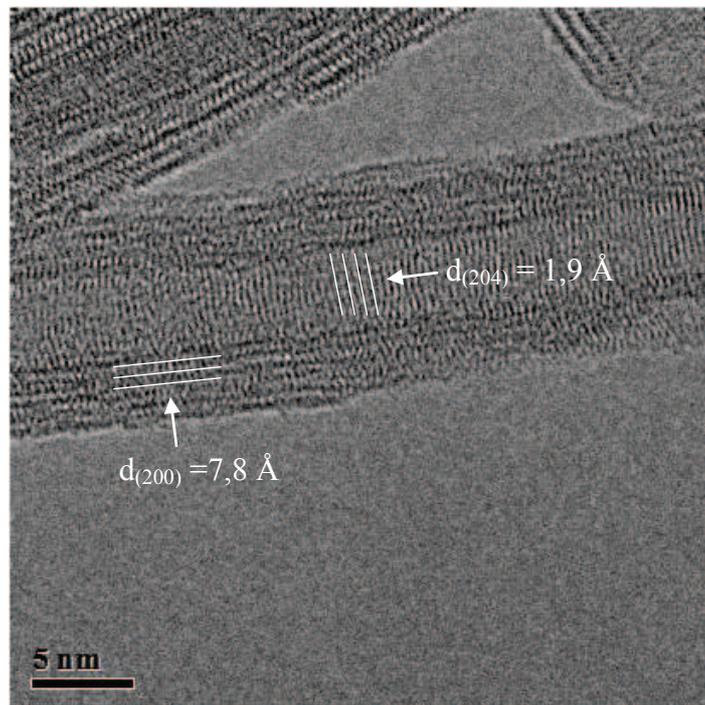


Figure 17. Clichés MET en haute résolution des nanotubes de titanate. Indexation des familles de plan si la structure est  $H_2Ti_3O_7$

1.2.2.2 - Analyse structurale et composition chimique des TiONts

La composition des nanotubes de titanate a été analysée ainsi que sa structure en XPS, en spectroscopie Raman et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

Les nanotubes ont été caractérisés d'abord en XPS pour connaître l'environnement chimique des éléments ainsi que leur concentration atomique.

Une faible quantité de carbone a été trouvée (6%). Ce carbone est en partie du carbone de pollution mais provient aussi des résidus de la synthèse du précurseur rutile Tioxide® (Tableau 5). Celui-ci sera pris en compte lors des analyses de nanotubes modifiés en surface par des composés carbonés. De plus, les nanotubes de titanate contiennent du titane et de l'oxygène mais aussi du sodium (Tableau 6). Le calcul des concentrations s'effectue directement avec le logiciel MultiPak.

Synthèse	Concentration atomique (%)			
	Ti 2p	O 1s	C 1s	Na KLL
TiONts	21	59	6	14

Tableau 6. Analyse XPS : concentrations atomiques des espèces en surface des nanotubes de titanate

Remarque :

Avec la source aluminium utilisé en XPS, certaines raies des électrons Auger du titane peuvent entraver le calcul de la concentration du niveau 1s du sodium car elles se situent aux mêmes énergies. Après vérification avec la source magnésium, la proportion du sodium de niveau 1s est égale à celle du niveau des électrons Auger du sodium (Na KLL) de la source aluminium. Ainsi, pour éviter tout problème, la concentration du sodium a été mesurée par grâce aux électrons Auger du sodium (Na KLL) avec la source aluminium (Tableau 6).

Le pic de l'oxygène peut être décomposé et ainsi les contributions des différents types d'oxygènes présents dans les nanotubes peuvent être attribuées. A l'aide du logiciel CasaXPS, trois composantes apparaissent correspondant à (Figure 18) :

- 529,8 eV, à de l'oxygène du réseau des nanotubes ( $O^{2-}$ ) ;
- 531,7 eV, aux hydroxyles de surface (OH) ;
- 535 eV, soit aux électrons Auger du sodium, soit à l' $H_2O$  de structure.

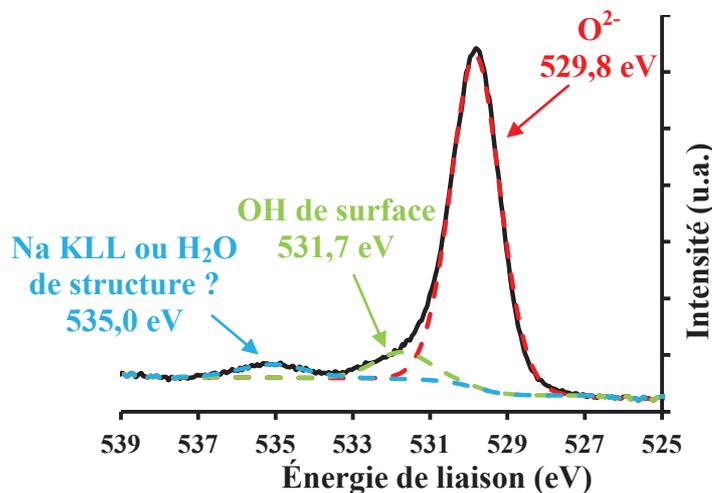


Figure 18. Analyse XPS : niveau O1s des nanotubes de titanate synthétisés

Des tests sur le composé  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ont été effectués en XPS pour déterminer l'origine du pic à 535 eV. Le composé  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  étant composé de sodium, les raies des électrons Auger de cet élément vont apparaître avec la source aluminium (Figure 19).

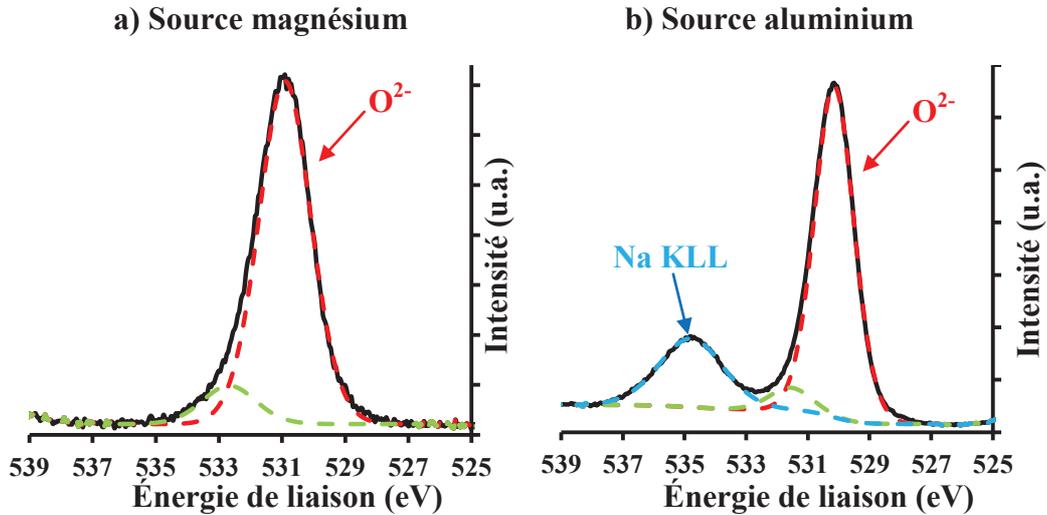


Figure 19. Analyse XPS : niveau O1s du composé  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , a) avec la source magnésium et b) avec la source aluminium monochromatée

Pour déterminer l'origine du pic à 535 eV, une comparaison est nécessaire entre le niveau 1s de l'oxygène du composé  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et celui des nanotubes avec la source aluminium. Pour cela, il faut étudier la différence de position entre l'oxygène  $\text{O}^{2-}$  et le pic électron Auger du sodium. De plus, le rapport d'aire du pic inconnu sur celle des raies Na KLL du sodium pourra renseigner sur la cause du pic à 535 eV. Les valeurs sont regroupées dans le Tableau 7.

Éléments	Position (eV)			Aire		
	$\text{O}^{2-}$	Na KLL/ $\text{H}_2\text{O}$	Différence	Na KLL	Na KLL/ $\text{H}_2\text{O}$	Rapport
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	530,1	534,8	4,7	3444	34819	0,10
TiONts	529,8	535	5,2	644	5254	0,12

Tableau 7. Analyse XPS : Comparaison des positions et des aires du niveau 1s de l'oxygène pour le composé  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et les TiONts

A partir du Tableau 7, le constat est que la différence de position entre l'oxygène  $\text{O}^{2-}$  et le pic à 535 eV est d'environ 5 eV, la différence est la même pour le composé  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et les nanotubes de titanate. Le rapport d'aire conduit à la même conclusion, ainsi le pic à 535 eV est donc majoritairement attribuable aux raies des électrons Auger du sodium.

La différence et le rapport d'aire laisse paraître une faible contribution de l'eau de structure car ceux-ci ne sont pas rigoureusement égaux (Tableau 7). La différence du rapport des aires suppose qu'il y aurait 2% d'eau de structure. En comparant cette aire à l'aire de la contribution de la composante  $\text{O}^{2-}$  (égale à 96000), cette proportion représente en fait 0,1% du pic de la composante  $\text{O}^{2-}$ . Ainsi, l'eau de structure sera donc négligée car peu ou pas représentative du pic à 535 eV.

Au final, le niveau O1s des nanotubes de titanate se décompose en deux composantes, la composante de l'oxygène du réseau  $\text{O}^{2-}$  à 529,8 eV et celle à 531,7 eV correspondant aux hydroxydes de surface (Figure 20).

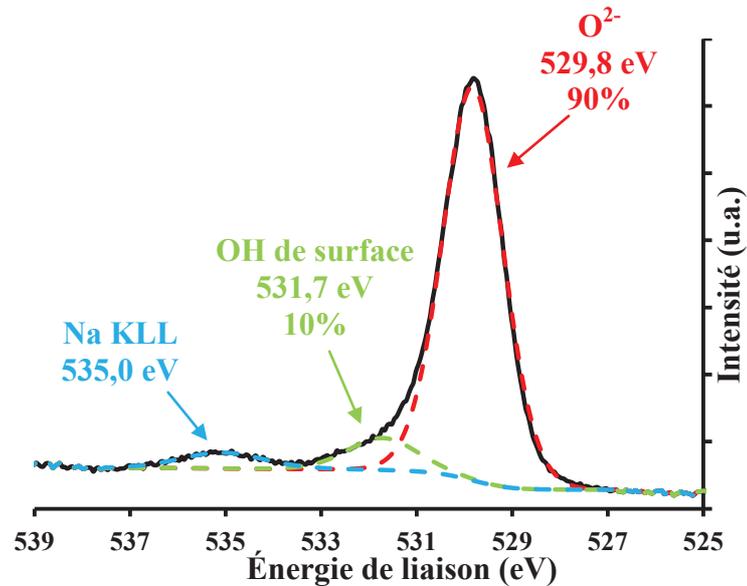


Figure 20. Analyse XPS : niveau 1s de l'oxygène des nanotubes de titanate synthétisés

Les proportions et les largeurs à mi-hauteurs (FWHM) des composantes du niveau O1s des nanotubes de titanate sont regroupées dans le Tableau 8. Ainsi, 90% de l'oxygène analysé est de l'oxygène de réseau et 10% provient des hydroxydes de surface.

Éléments	O <sup>2-</sup>	OH
Proportion (%)	90	10
FWHM (eV)	1,5	1,7
Position (eV)	529,8	531,7

Tableau 8. Analyse XPS : Proportions des différentes espèces de l'oxygène en surface des nanotubes de titanate observés en XPS

En regroupant les valeurs du titane, du sodium, du carbone de pollution et des deux composantes de l'oxygène dans le Tableau 9, la composition des nanotubes de titanate est établie.

Synthèse	Concentration atomique (%)				
	Ti 2p	O <sup>2-</sup>	OH	C 1s	Na KLL
TiONts	21	53	6	6	14

Tableau 9. Analyse XPS : Proportions des différentes espèces en surface des nanotubes de titanate observées en XPS

De plus, les nanotubes synthétisés ont été caractérisés par spectroscopie Raman (annexe n°1). La spectroscopie Raman est une méthode de caractérisation idéale pour des poudres d'oxyde puisqu'elle fournit des informations structurales dans des conditions environnementales diverses. En outre, la spectroscopie Raman peut aisément distinguer les structures cristallines différentes du TiO<sub>2</sub> (anatase, rutile, brookite). Tout d'abord, il est possible de comparer les nanotubes au rutile et aux nanorubans car les signatures acquises en spectroscopie Raman sont spécifiques aux trois matériaux (Figure 21). Lors du traitement hydrothermal, le rutile perd sa structure pour laisser la place à un nouvel arrangement afin d'obtenir un signal spécifique des nanotubes. Ce signal est constitué de cinq bandes à

283  $\text{cm}^{-1}$ , 451  $\text{cm}^{-1}$ , 666  $\text{cm}^{-1}$ , 805  $\text{cm}^{-1}$  et à 917  $\text{cm}^{-1}$ . Les nanorubans quant à eux, sont singularisés par plus de bandes (Bellat 2012). En comparant l'empreinte des nanorubans à celle des nanotubes, certains pics caractéristiques des nanorubans sont présents sur le spectre Raman des nanotubes à 160  $\text{cm}^{-1}$ , 196  $\text{cm}^{-1}$  et 467  $\text{cm}^{-1}$ . Ainsi, la synthèse de nanotubes est également composée de nanorubans fabriqués lors du traitement hydrothermal. La spectroscopie Raman confirme l'observation au microscope électronique en transmission. Les impuretés comme les nanofeuilles ne sont pas observées en Raman car elles n'ont pas de signature spécifique. La signature du rutile a quant à elle totalement disparu.

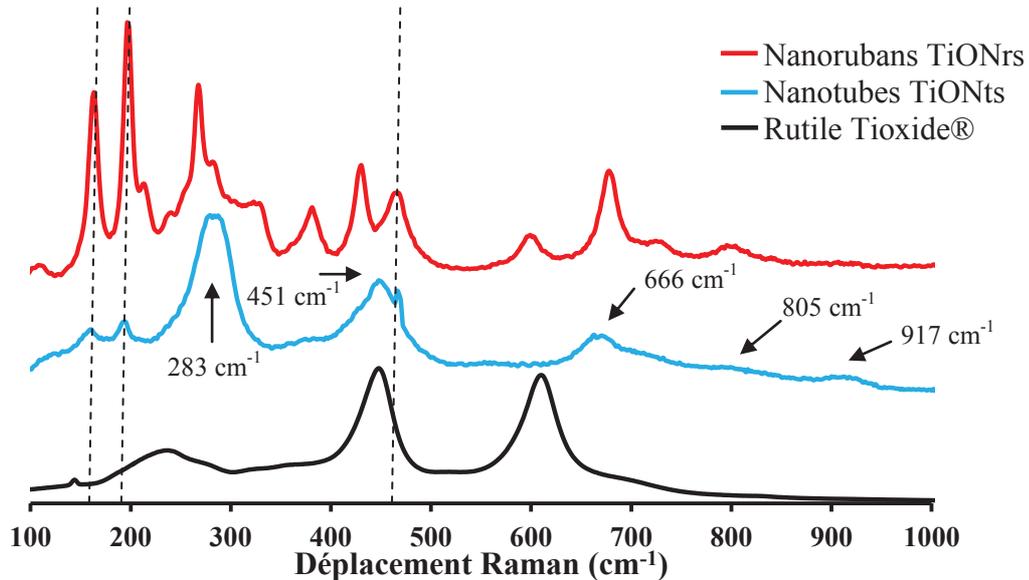


Figure 21. Comparaison de la signature Raman des TiONts synthétisés par rapport aux nanorubans et au rutile de départ. Les pics en pointillés représentent les pics des nanorubans sur le spectre Raman des TiONts

La signature des TiONts est difficilement comparable à celles des nanotubes trouvées dans la littérature compte tenu des nombreuses possibilités de structure et de composition obtenues en fonction de chaque paramètre de synthèse (Figure 22). D'autre part, les travaux de Kim *et al.* soulignent que les nanotubes composés de sodium n'ont pas le même signal que ceux composés entièrement d'hydrogène (Figure 22 b). Par contre, les deux spectres de la Figure 22 possèdent quelques similitudes avec le signal de nos nanotubes notamment les pics vers 280, 450, 660, 800 et 420  $\text{cm}^{-1}$ .

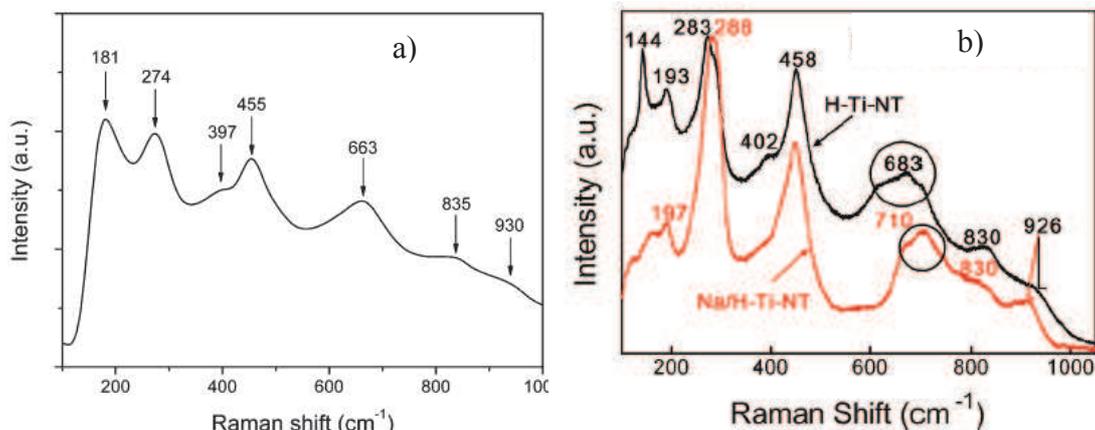


Figure 22. Spectres Raman des nanotubes de titanate trouvés dans la littérature a) (Gao *et al.* 2009) et b) (Kim *et al.* 2009)

### 1.2.2.3 - Analyse thermogravimétrique des TiONts

Les nanotubes de titanate ont été analysés par analyse thermogravimétrique (annexe n°1) de 30°C à 800°C (Figure 23). A partir de l'équation 1 (voir détails de calculs en annexe n°3), le taux d'hydroxyles de surface des nanotubes peut être déterminé entre la température après la deuxième inflexion de perte de masse et 800°C<sup>4</sup> (température finale de l'expérience). La surface spécifique des TiONts est de  $163 \pm 25 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ . Le taux de recouvrement des hydroxyles peut être mesuré à partir de la relation suivante :

$$N_{OH} = \frac{2 \cdot (\Delta m) \cdot N_a}{M_{H_2O} \cdot S_{BET} \cdot 10^{18}} \quad (\text{Équation 1})$$

Avec  $N_{OH}$ , le nombre d'hydroxyle par  $\text{nm}^2$  ;  $\Delta m$  la perte de masse entre 300°C et 800°C ;  $N_a$ , le nombre d'Avogadro ( $\text{mol}^{-1}$ ) ;  $M_{H_2O}$ , la masse molaire de l'eau ( $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) et  $S_{BET}$ , la surface spécifique des nanotubes ( $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ). Le nombre d'hydroxyles de surface est estimé à  $(6 \pm 4) \text{ OH}/\text{nm}^2$  ( $n = 15$ , avec  $n$  le nombre d'échantillons analysés). Le nombre d'hydroxyles de surface est très différent d'une synthèse à l'autre, ce n'est pas étonnant car il est habituel de voir ce taux varier sur les composés de titanate (Papa 2009).

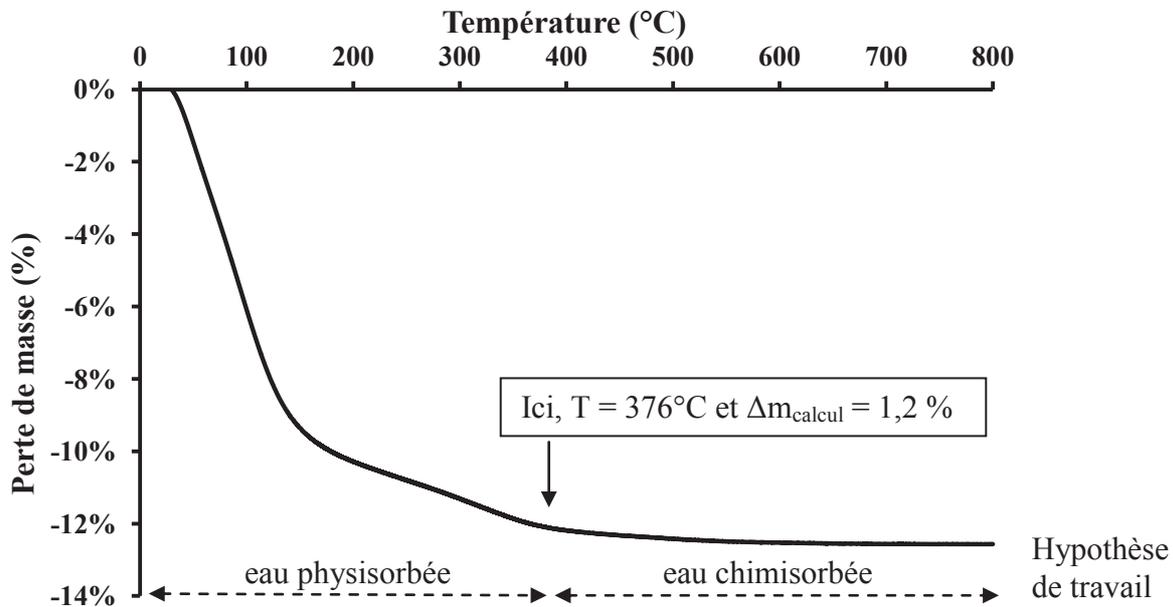


Figure 23. Analyse thermogravimétrique des TiONts sous flux de  $\text{N}_2$  ( $25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) avec une rampe de montée en température de  $5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ . Courbe représentative pour un échantillon.

### 1.2.2.4 - Stabilité des TiONts en suspension

Ces nanotubes synthétisés sont destinés à l'injection *in vivo*, il est donc nécessaire de connaître leur domaine de stabilité en suspension. Les charges de surfaces traduisent la stabilité électrostatique et sont mesurées par zétamétrie à force ionique constante (annexe n°1). Ces mesures sont effectuées dans une solution de NaCl ( $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) pour éviter le changement de force ionique sur la gamme de pH 2 à 11 lors de l'ajout d'acide ou de base (Figure 24). Le potentiel zêta s'annule vers un  $\text{pH} = 3,3 \pm 0,2$  ( $n = 6$ , avec  $n$  le nombre d'échantillons analysés) dans le cas des nanotubes de titanate. Cette valeur représente donc le

<sup>4</sup> Ce choix de la température de départ de l'eau chimisorbée minore sans aucun doute le taux d'hydroxyles de surface (phénomène initié entre les deux points d'inflexion) mais permet de comparer toutes les synthèses entre elles.

point isoélectrique (annexe n°4). En dessous de pH 3,5 le potentiel zêta est positif et au dessus il est négatif. À pH physiologique (7,4), les charges de surface sont donc négatives et la valeur du potentiel zêta est de  $(-32 \pm 3)$  mV.

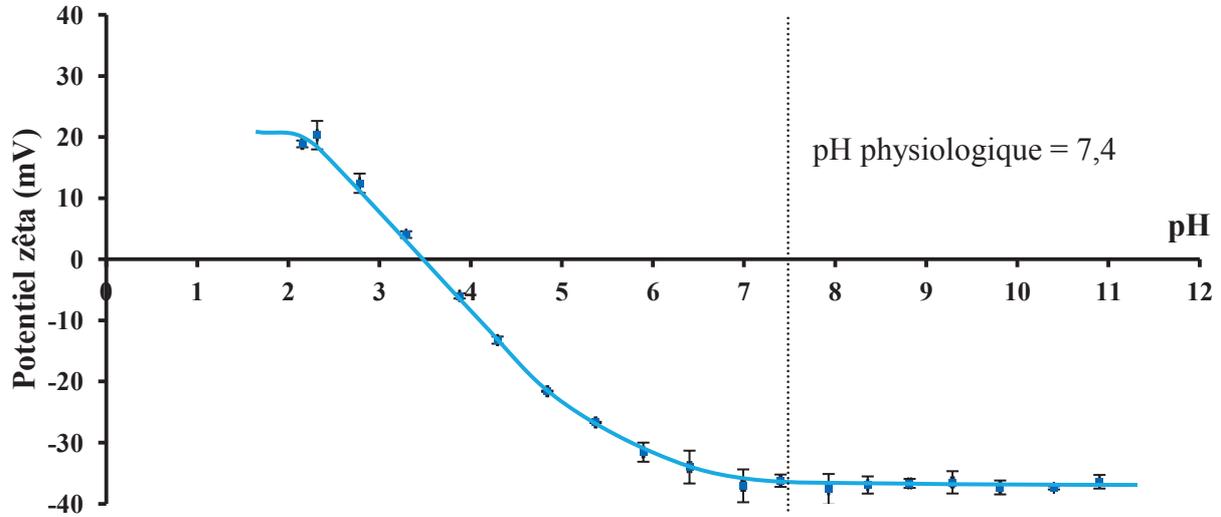


Figure 24. Potentiel zêta des nanotubes de titanate dans NaCl ( $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup>) en fonction du pH. Courbe représentative pour un échantillon.

D'après cette courbe, les nanotubes devraient être stables à pH physiologique (7,4). Cependant, les nanotubes ne sont pas stables dans ces conditions (Figure 25a). D'après les analyses au MET, les nanotubes forment des agglomérats de plusieurs microns (Figure 25b) qui sont instables à pH physiologique.

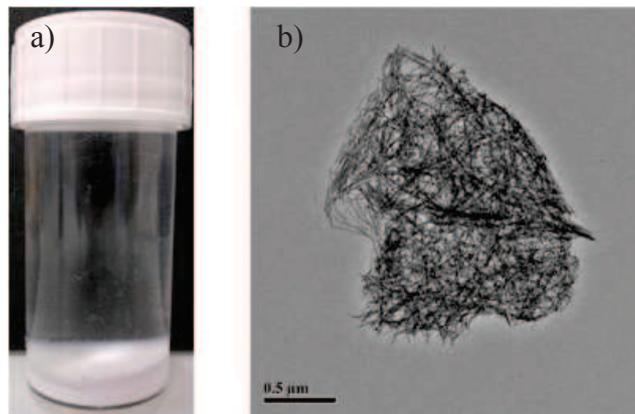


Figure 25. a) Photo de la suspension de TiONTs dans le tampon PBS (pH = 7,4 à 21°C après 2h de décantation), b) Cliché MET représentatif des agglomérats de TiONTs dans le PBS.

### I.3 - Optimisation de la synthèse de nanotubes de titanate

La synthèse classique de nanotubes de titanate réalisée depuis 2006 au laboratoire permet seulement de produire environ 500 mg de nanotubes. Pour remédier à cette limitation, deux issues sont envisagées. Soit changer le réacteur laboratoire ( $V_{\max} = 110$  mL) pour un réacteur plus volumineux acheté dans le commerce (réacteur commercial P,  $V_{\max} = 250$  mL, annexe n°1). Soit augmenter la masse du précurseur rutile lors de la synthèse hydrothermale dans le réacteur laboratoire. Ces deux voies ont été envisagées dans ce paragraphe.

### I.3.1 - Changement de réacteur

#### I.3.1.1 - Synthèse de nanotubes de titanate avec le réacteur commercial

La première solution à être mise en œuvre est le changement d'échelle par le biais d'un nouveau réacteur (annexe n°1). La synthèse hydrothermale s'effectue toujours dans les mêmes conditions de température et de pression ( $T = 155^{\circ}\text{C}$  et  $P = 3,5$  bar). Le traitement aux ultrasons reste le même (30 min, 2s pulse + 2s arrêt). Le seul changement intervient sur la masse de précurseur rutile et le volume de soude mis en jeu (la concentration en soude ne change pas :  $10 \text{ mol.L}^{-1}$ ). Le volume maximal est de 250 mL alors la masse de précurseur introduite sera de 1000 mg (noté **synthèse 1g**). Ainsi, en changeant de réacteur, pour un réacteur plus volumineux, la quantité de TiONts produite devrait être multipliée par 2,3 dans le cas idéal.

Cependant, le mode d'agitation est différent : agitation grâce à des pales au lieu d'un barreau magnétique. Or, le réacteur utilisé, le mode d'agitation ainsi que les quantités de réactifs peuvent avoir une influence sur la synthèse des nanotubes.

#### I.3.1.2 - Caractérisations des nanotubes obtenus avec le réacteur commercial

Tout d'abord, une analyse MET (Figure 26) est effectuée sur le résultat de la synthèse de TiONts afin de vérifier si la transformation en nanotubes a été réalisée en analysant la morphologie des nanoparticules obtenues.

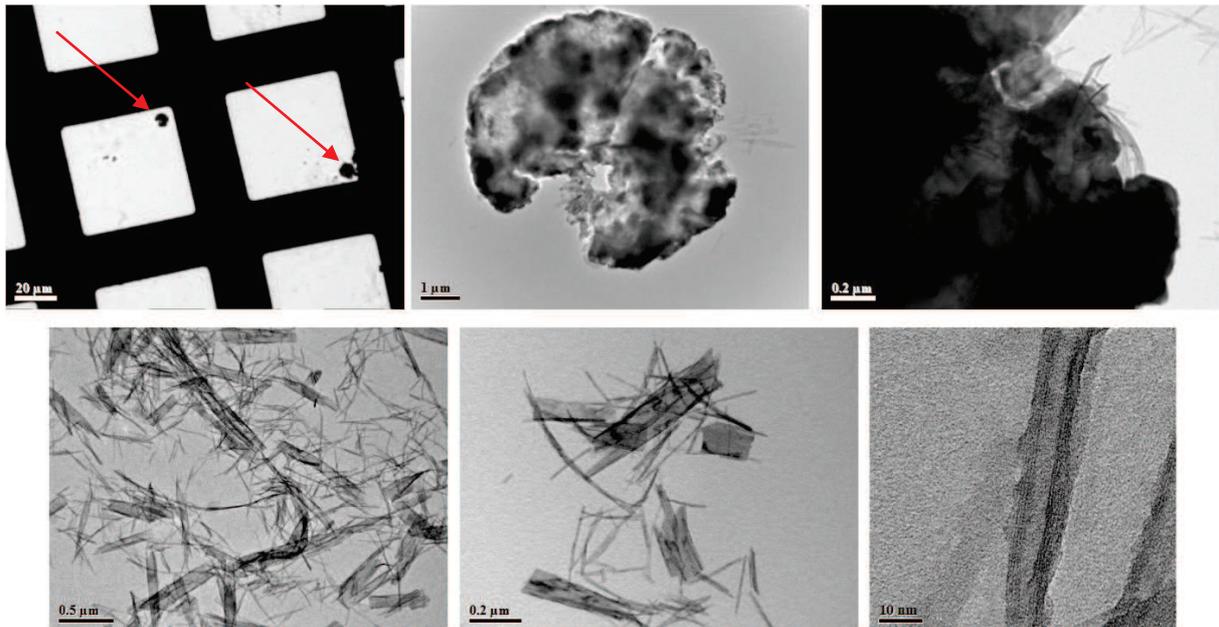


Figure 26. Clichés MET caractéristiques de la synthèse de nanotubes avec le réacteur commercial, sous faible agitation (120 trs/min)

Ces clichés MET montrent l'apparition d'agglomérats sphériques de plusieurs micromètres ainsi qu'un nombre élevé de nanofeuilles. Après comptage sur 150 nanoparticules, la synthèse est à 80% faite de nanotubes et à 20 % de nanofeuilles (exception faites des sphères). Ce type de synthèse ne conduit pas majoritairement à des nanotubes. Une explication pourrait être que l'agitation avec des pales à 120 trs/min ne permet pas une agitation uniforme de la suspension à cause des éléments plongeants (Figure 31). Cette

mauvaise agitation cause la décantation de la suspension entre les éléments plongeurs. Et ainsi, la synthèse des nanotubes ne pourrait avoir lieu correctement.

La vitesse d'agitation a été modifiée à 400 trs/min, pour obtenir une agitation uniforme dans tout le réacteur et éviter le dépôt du précurseur entre les éléments plongeurs. Les clichés en microscopie électronique en transmission mettent en évidence la réussite de la synthèse de nanotubes (Figure 27). La synthèse de nanotubes de titanate est quasiment exclusive, la présence de sous-produits (nanorubans et nanofeuilles) est moindre comparée à la synthèse de référence TiONts dans le réacteur « laboratoire » ( $\leq 1\%$  d'impuretés contre  $5\%$ ). Les nanofeuilles ont complètement disparu et les nanorubans sont moins présents que lors de la synthèse avec le réacteur laboratoire ( $\leq 1\%$  contre  $3\%$ ).

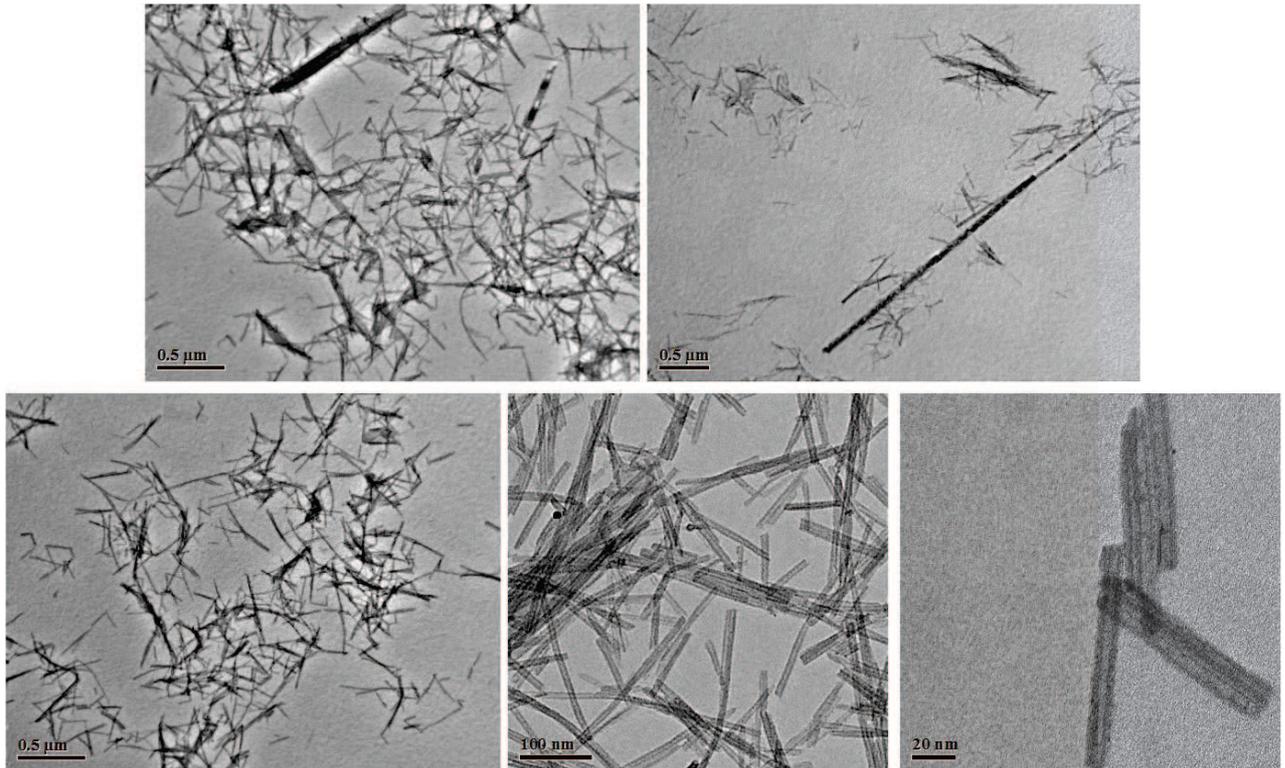


Figure 27. Clichés MET caractéristiques de la synthèse de nanotubes avec le réacteur commercial, sous forte agitation (400 trs/min)

D'après les clichés MET, les nanotubes synthétisés avec le réacteur commercial semblent de tailles supérieures à ceux obtenus avec le réacteur laboratoire. Cette conclusion est confirmée par comptage sur 100 nanotubes (Figure 28).

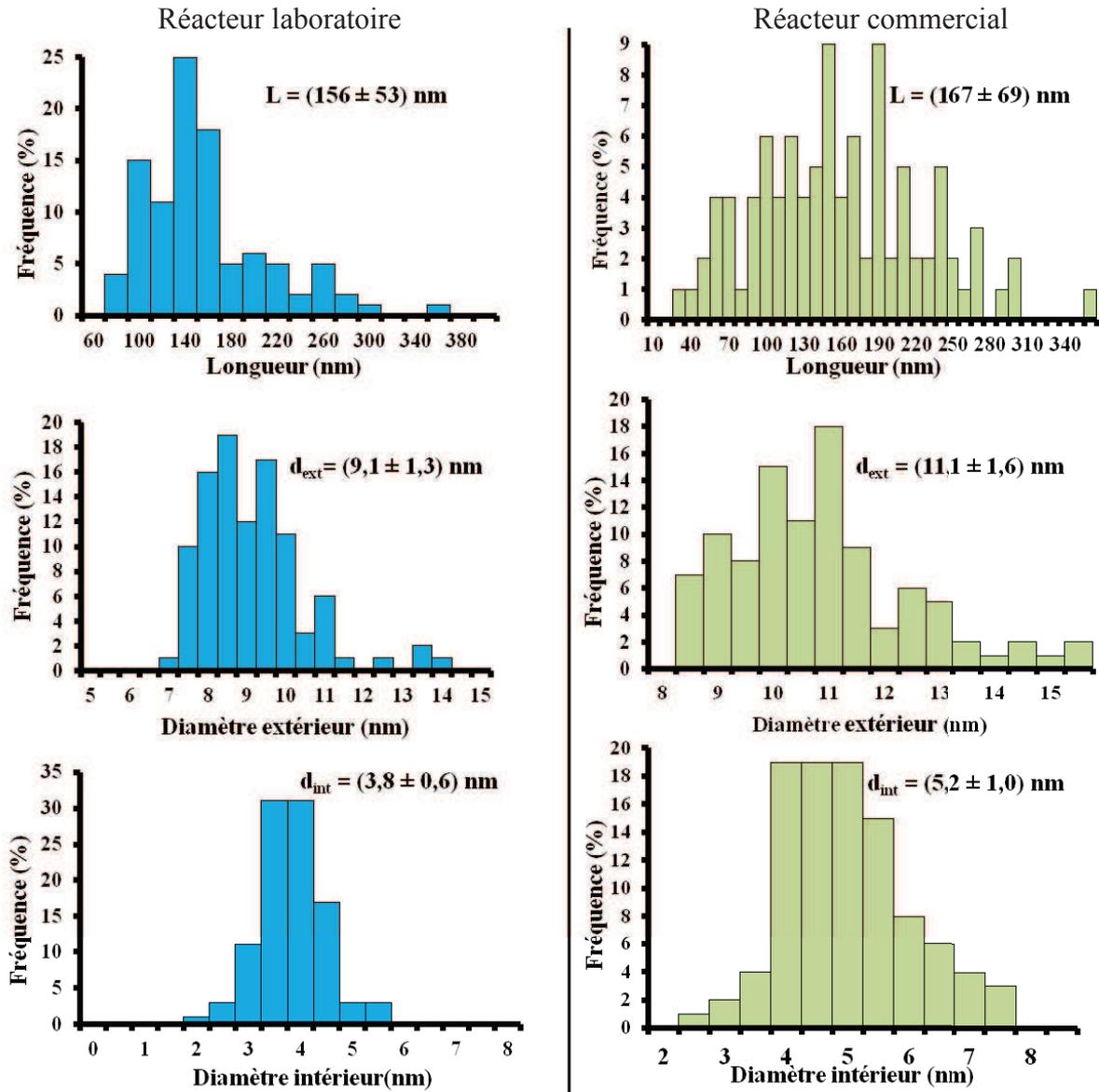


Figure 28. Comparaison de la longueur, des diamètres extérieurs et intérieurs des synthèses de nanotubes réalisées avec le réacteur commercial et le réacteur laboratoire

Le réacteur commercial permet la synthèse de TiONts de longueur, de diamètre extérieur et de diamètre intérieur un peu plus importants que ceux synthétisés avec le réacteur laboratoire. Ces différentes valeurs sont regroupées dans le Tableau 10 et mettent en avant un meilleur contrôle des dimensions des TiONts *via* le réacteur laboratoire, en effet, les écarts type sont plus faible dans ce cas.

Type nanotubes	Réacteur laboratoire	Réacteur commercial
Longueur (nm)	$156 \pm 53$	$167 \pm 69$
Diamètre extérieur (nm)	$9,1 \pm 1,3$	$11,1 \pm 1,6$
Diamètre intérieur (nm)	$3,8 \pm 0,6$	$5,2 \pm 1,0$

Tableau 10. Longueurs et diamètres moyens mesurés pour les nanotubes synthétisés dans le réacteur laboratoire et le réacteur commercial

La spectroscopie Raman montre que les nanotubes synthétisés dans les deux réacteurs ont la même structure (Figure 29).

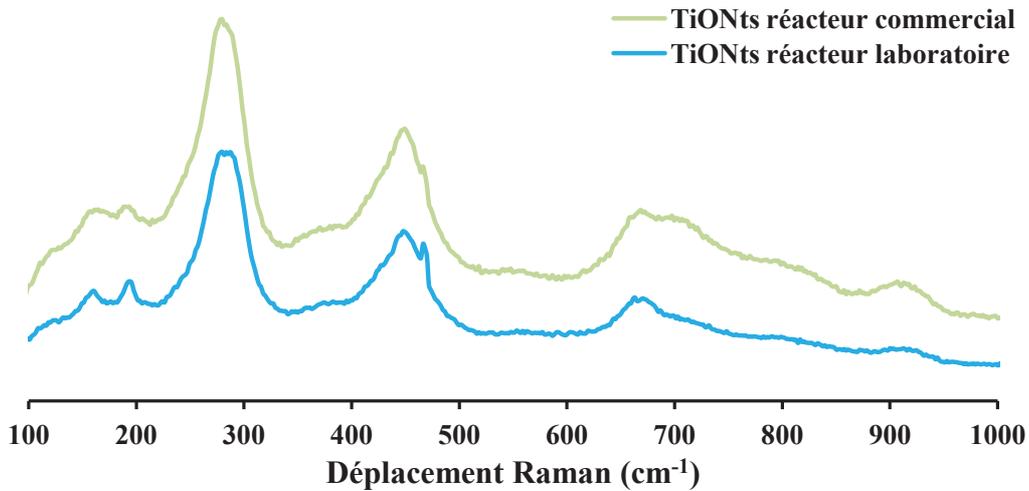


Figure 29. Spectres Raman des TiONts synthétisés dans le réacteur laboratoire et commercial

Les nanotubes synthétisés dans le réacteur commercial sont analysés en XPS et comparés aux nanotubes élaborés dans le réacteur laboratoire (Tableau 11). Il y a peu de différences entre deux types de synthèses. À part, la concentration atomique de carbone qui est deux fois plus élevée lors de la synthèse laboratoire.

Synthèse	Concentration atomique (%)			
	Ti 2p	O 1s	C 1s	Na KLL
Réacteur laboratoire	21	59	6	14
Réacteur commercial	22	60	3	15

Tableau 11. Analyse XPS : comparaison des concentrations atomiques des synthèses réalisées dans le réacteur laboratoire et le réacteur commercial

Le niveau O1s des nanotubes synthétisés par le réacteur commercial peut être aussi décomposé en deux composantes (Tableau 12) :

- 93% de l'oxygène est de l'oxygène de réseau
- 7% provient des hydroxydes de surface.

Les proportions et les largeurs à mi-hauteurs des composantes de l'oxygène de la synthèse TiONts avec le réacteur commercial sont regroupées dans le Tableau 12. Les caractéristiques des composantes sont sensiblement les mêmes dans les deux cas.

Éléments	Réacteur laboratoire		Réacteur commercial	
	O <sup>2-</sup>	OH <sup>-</sup>	O <sup>2-</sup>	OH <sup>-</sup>
Proportion (%)	90	10	93	7
FWHM (eV)	1,5	1,7	1,5	1,7
Position (eV)	529,8	531,7	529,8	531,5

Tableau 12. Analyse XPS : concentration des espèces de l'oxygène présente en surface des nanotubes de titanate synthétisés dans le réacteur laboratoire et le réacteur commercial

Le Tableau 13 regroupe les compositions des nanotubes fabriqués par les deux réacteurs. La seule différence notable est la diminution de la proportion en carbone lorsque les nanotubes sont faits à partir du réacteur commercial.

Synthèse	Concentration atomique (%)				
	Ti 2p	O <sup>2-</sup>	OH	C 1s	Na KLL
Réacteur laboratoire	21	51	5	6	14
Réacteur commercial	22	52	5	3	15

Tableau 13. Analyse XPS : comparaison des concentrations atomiques des espèces présentes entre les nanotubes synthétisés dans le réacteur laboratoire et le réacteur commercial

Les proportions des OH de surface sont les mêmes pour les nanotubes alors ils devraient posséder un potentiel zêta du même ordre de grandeur. Le potentiel zêta confirme cette hypothèse car les nanotubes synthétisés par les deux réacteurs possèdent le même point isoélectrique (PIE = 3,5). Ceux-ci sont chargés positivement en-dessous du point isoélectrique et négativement au-dessus de ce point. De même que pour les nanotubes synthétisés dans le réacteur laboratoire, les nanotubes fabriqués dans le réacteur commercial ne sont pas stables à pH physiologique malgré une valeur de potentiel zêta relativement élevée (en valeur absolue).

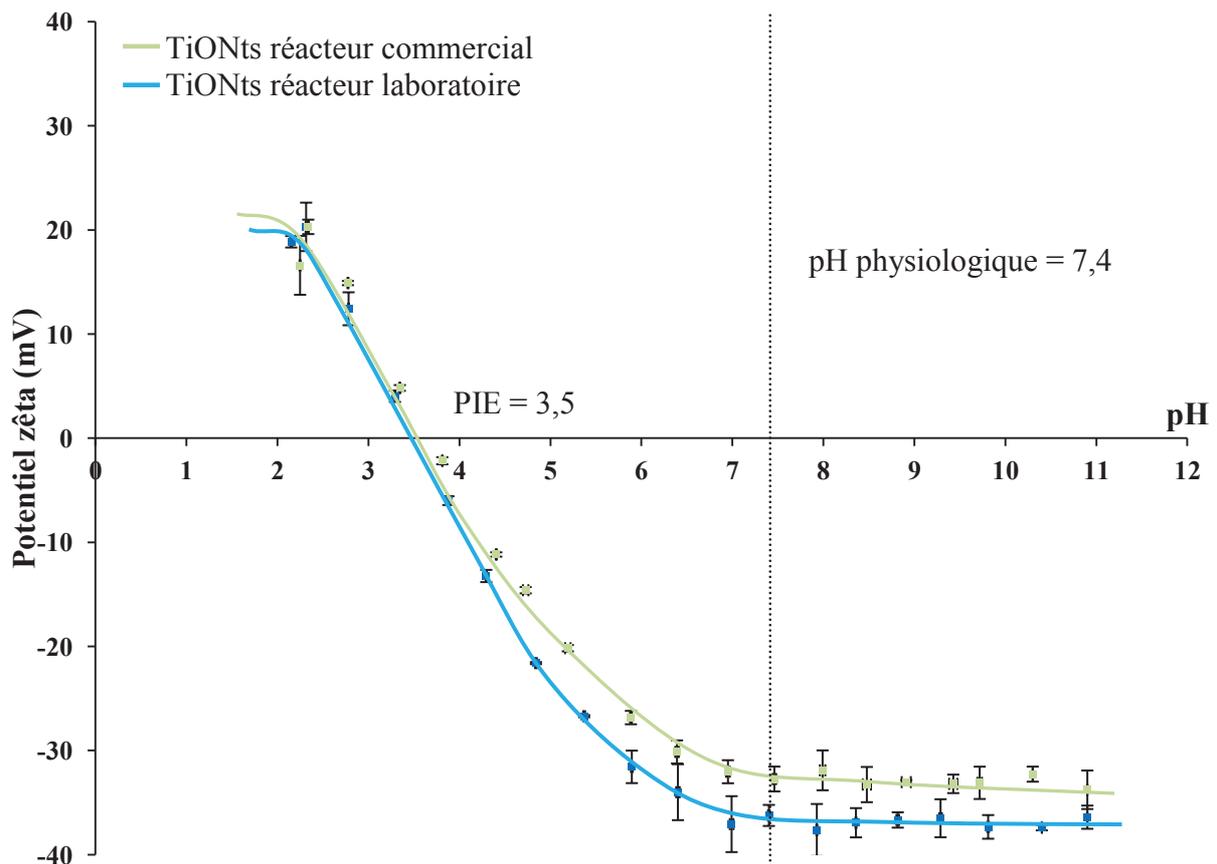


Figure 30. Potentiel zêta des nanotubes synthétisés par le réacteur laboratoire et le réacteur commercial dans NaCl ( $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ ) en fonction du pH. Courbes représentatives d'un échantillon.

I.3.2 - Changement d'échelle : de 440 milligrammes à quelques grammes de nanotubes

I.3.2.1 - Avec le réacteur commercial

La seconde proposition pour produire plus de nanotubes de titanate est d'augmenter la masse de précurseur rutile dans le même volume de départ. La masse habituelle pour le réacteur commercial est de 1g donc pour fabriquer plus de nanotubes celle-ci est multipliée par 2, soit une masse de précurseur Tioxide<sup>®</sup> de 2 g (noté, **synthèse 2g**). Les conditions de synthèse ne changent pas ( $T = 155^{\circ}\text{C}$ ,  $P = 3,5 \text{ bar}$  et  $v_{\text{agitation}} = 400 \text{ trs/min}$ ). La masse de  $\text{TiO}_2$  est trop importante et se coince entre les éléments plongeant (Figure 31 a et b) ainsi cela ne permet pas l'obtention de nanotubes mais plutôt des nanorubans de plusieurs micromètres de long et de l'ordre d'une centaine de nanomètres de longueur (Figure 31 c).

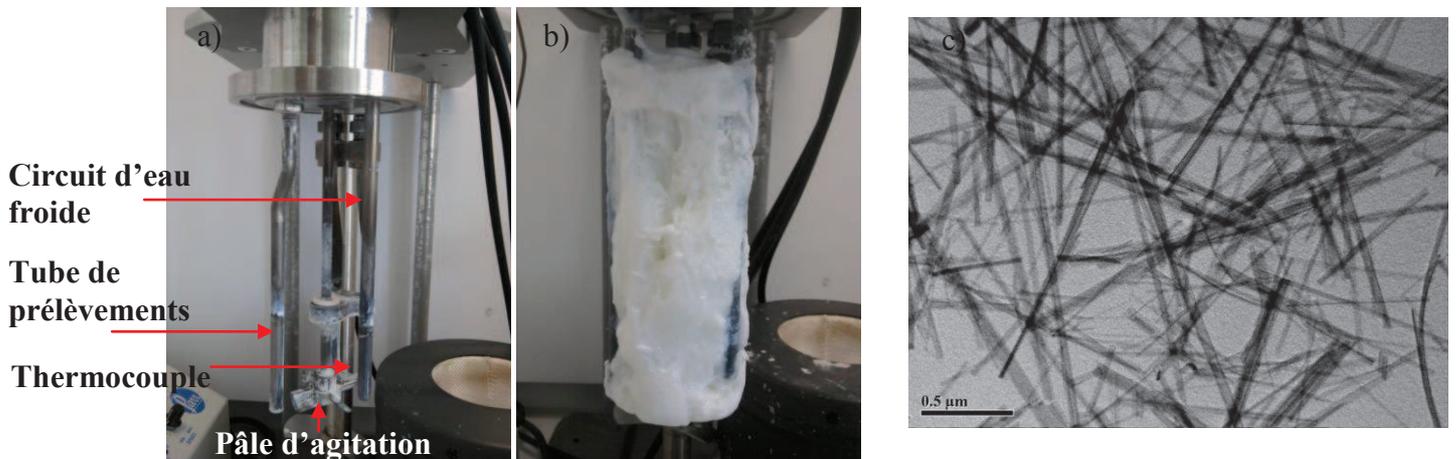


Figure 31. Avant (a) et après (b) synthèse de nanotubes de titanate en doublant la masse de précurseur rutile (synthèse 2g) ; (c) Clichés MET des nanorubans synthétisés par cette voie

La confirmation de la présence de nanorubans est établie en spectroscopie Raman par la mise en évidence de la signature des nanorubans pour la synthèse 2g (Figure 32). Ainsi, cette voie à partir de 2g de précurseur ne permet plus de produire des nanotubes en majorité.

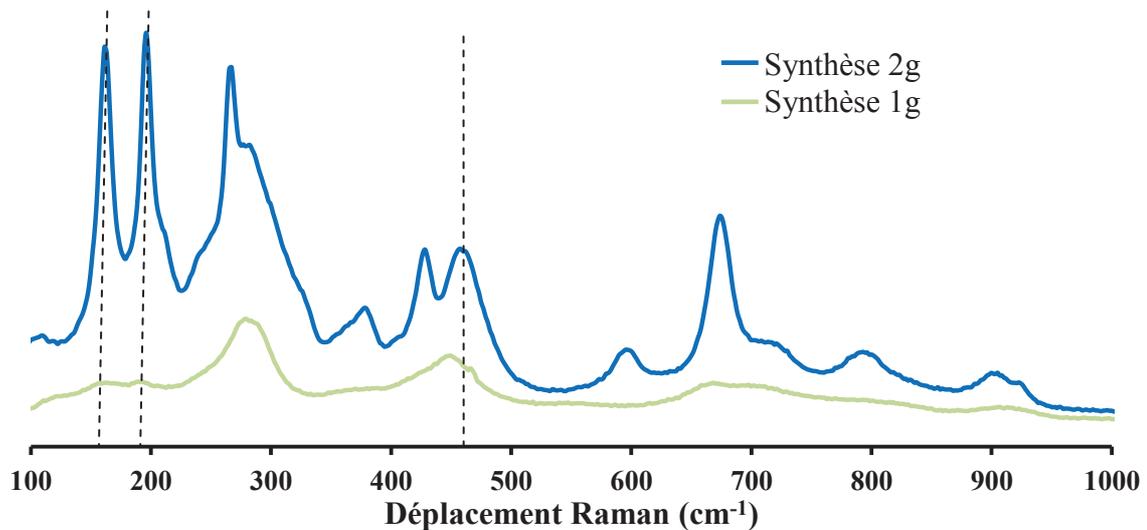


Figure 32. Comparaison des signatures Raman entre la synthèse 1g et la synthèse 2g dans le réacteur commercial. Les traits en pointillés représentent la signature des nanorubans sur le spectre Raman des TiONts.

1.3.2.2 - Avec le réacteur laboratoire

Avec le réacteur laboratoire, la synthèse classique permet de fabriquer 440 mg de nanotubes de titanate. De même que pour le réacteur commercial, l'augmentation de masse de précurseur rutile est étudiée. Les conditions de synthèse sont toujours les mêmes ( $T = 155^{\circ}\text{C}$  ;  $P = 3,5 \text{ bar}$  ;  $v = 120 \text{ trs/min}$  ;  $V = 110 \text{ mL}$ ). Seule la masse de précurseur rutile change, elle a été doublée ( $m = 880 \text{ mg}$ ) et triplée ( $m = 1320 \text{ mg}$ ). Dans les deux cas, des nanotubes sont synthétisés, d'après les clichés MET (Figure 33) la morphologie tubulaire est obtenue et la spectroscopie Raman montre la même structure que pour une synthèse classique (Figure 34).

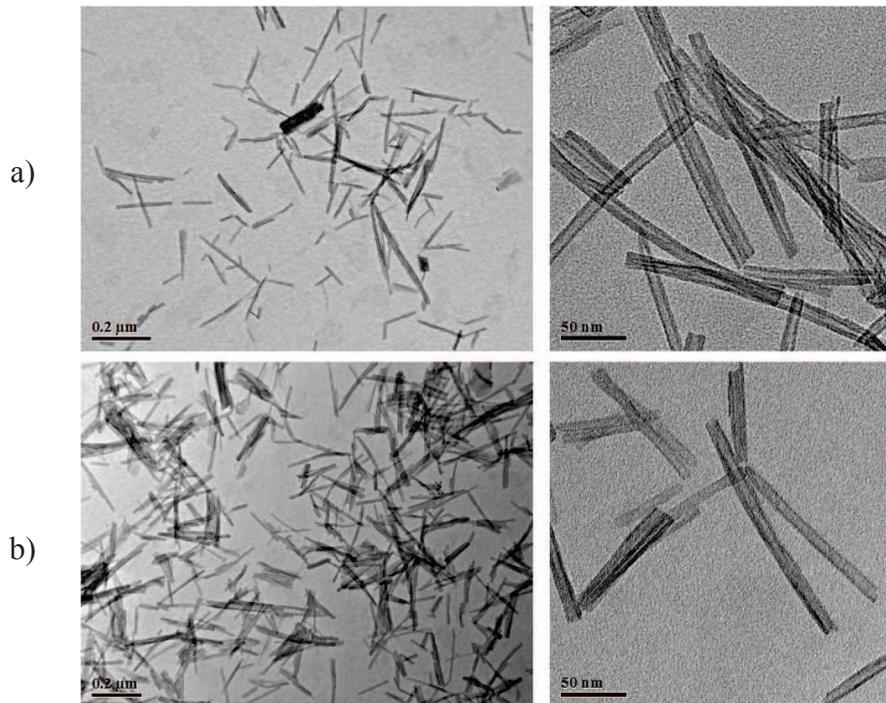


Figure 33. Clichés MET caractéristiques des TiONts obtenus dans le réacteur commercial a) en doublant la masse de rutile ( $m = 880 \text{ mg}$ ) et b) en triplant la masse de rutile ( $m = 1320 \text{ mg}$ )

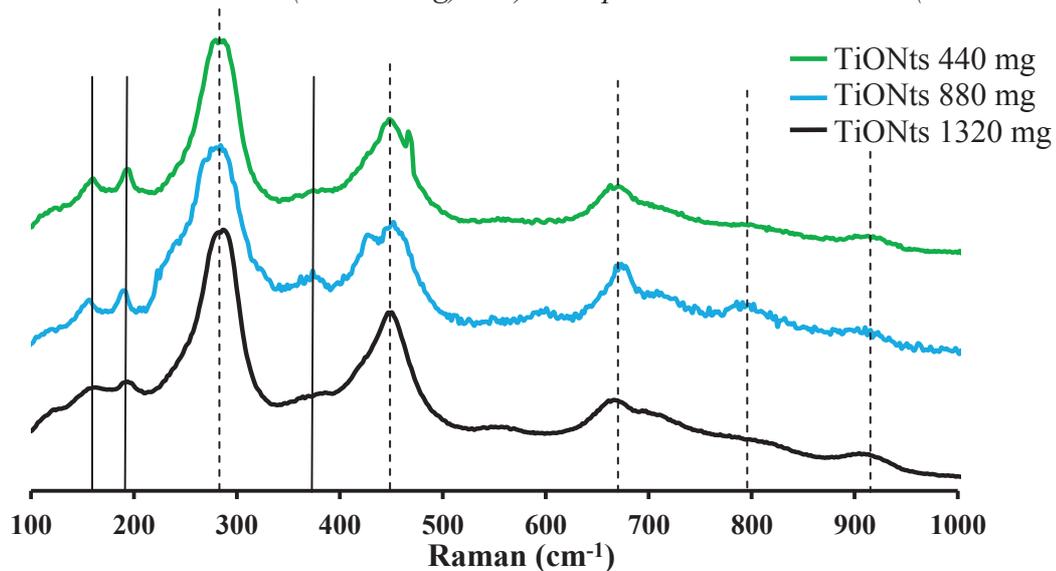


Figure 34. Spectres Raman des TiONts synthétisés dans le réacteur laboratoire pour une masse de 440, 880 et 1320 mg. Les traits en pointillés représentent la signature des nanotubes et les traits pleins représentent la signature des nanorubans.

*1.3.2.3 - Conclusion sur la synthèse de TiONts*

Tout d'abord, la méthode de synthèse de nanotubes de titanate par voie hydrothermale a permis d'obtenir des nanoparticules aux dimensions reproductibles. Ces nanotubes mesurent une centaine de nanomètres de long pour un diamètre d'environ 10 nanomètres et possèdent une cavité interne avoisinant les 4 nm. Cependant, leur structure et leur composition exactes restent mal connues même si des études tendent à sans rapprocher. De plus, avec le réacteur laboratoire, l'obtention de nanotubes en plus grande quantité (1320 mg contre 440 mg) est possible. En revanche, en utilisant le réacteur commercial, la synthèse des TiONts en grande quantité n'est pas réalisable à cause des éléments plongeants.

Remarque :

Une partie de ces éléments plongeants permettent de faire un prélèvement *in situ* lors d'une synthèse, ce qui a permis dans ce travail de suivre le mécanisme d'enroulement des TiONts sur 36h. Le mécanisme d'enroulement se déroule en 3 étapes (Figure 35) :

1<sup>er</sup> étape : l'exfoliation des grains de nanoparticules de rutile en agglomérats de nanofeuilles ;

2<sup>ème</sup> étape : la dispersion des agglomérats de nanofeuilles en nanofeuilles seules ;

3<sup>ème</sup> étape : l'enroulement des nanofeuilles en nanotubes.

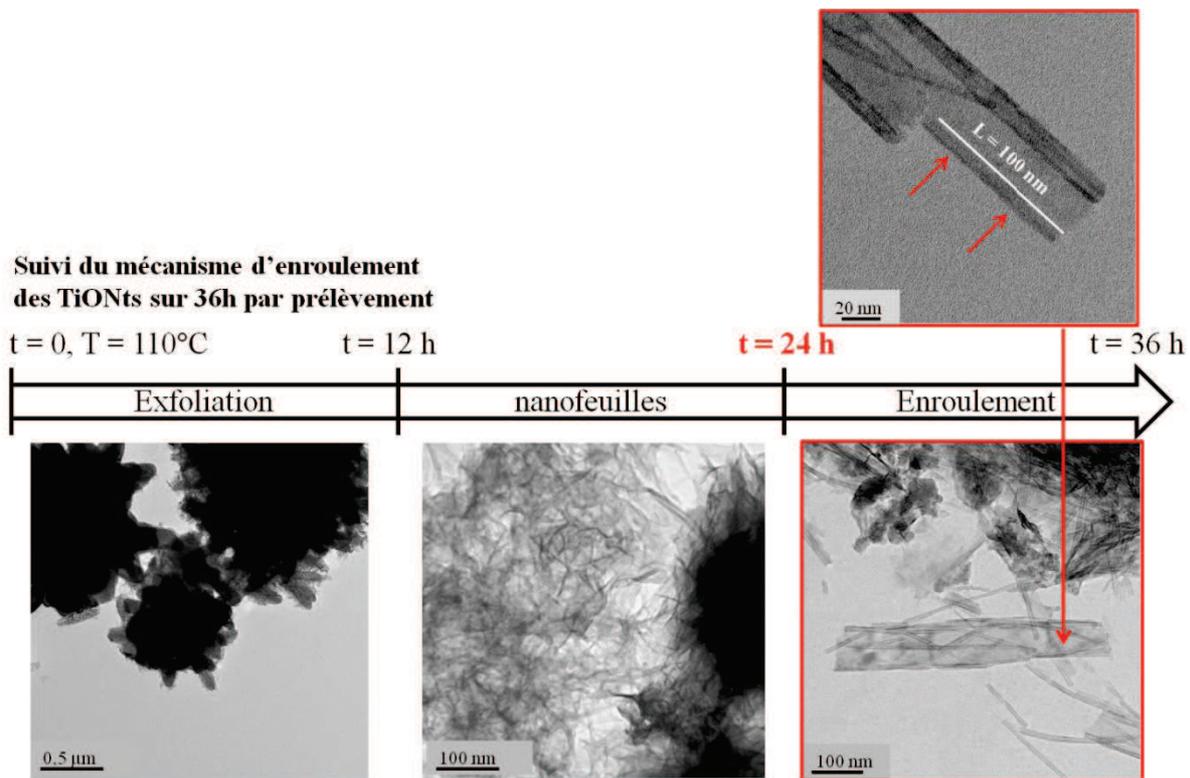


Figure 35. Suivi du mécanisme d'enroulement des TiONts sur 36h par prélèvement sur le réacteur commercial

Une étude plus poussée est nécessaire pour conclure sur le mécanisme de synthèse des TiONts. Cependant, dans ce travail, le mécanisme semble être plutôt l'exfoliation que le mécanisme de dissolution re-précipitation décrit dans la littérature.

## I.4 - Résistance mécanique des TiONts éprouvée par broyage planétaire

L'étude de la résistance des nanotubes est importante pour souligner leur robustesse à l'intérieur du corps. Cette étude a pour but de déterminer le seuil de résistance mécanique des nanotubes.

### I.4.1 - Protocole de broyage

Au cours de cette étude, les broyages ont été effectués à l'aide d'un broyeur planétaire de marque Fritsch et de référence P4 (annexe n°1). Ce dispositif comporte un plateau tournant sur lequel sont fixées deux jarres, tournant sur elles mêmes (Figure 36). Les paramètres de broyage seront donnés sous la forme ( $\Omega/\omega/t$ ),  $\Omega$  étant la vitesse de rotation du plateau en tours par minute,  $\omega$  celle des jarres également en tours par minute et  $t$  le temps de broyage en heures. Si  $\Omega$  et  $\omega$  sont de signes différents, le plateau et les jarres tournent dans des sens opposés ainsi la puissance produite lors du broyage sera plus importante.

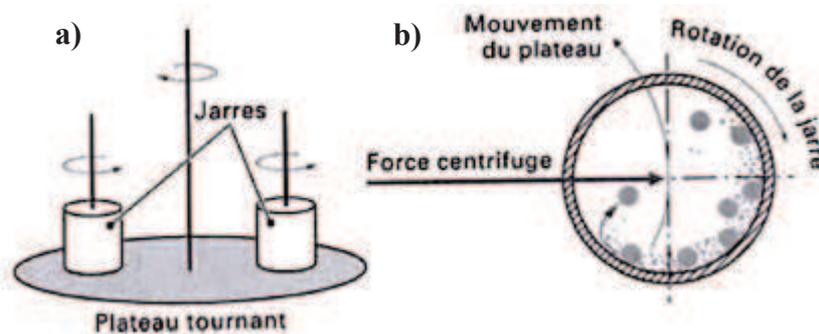


Figure 36. a) Représentation schématique d'un broyeur planétaire de type P4 et b) mouvement des billes à l'intérieur des jarres

Les jarres utilisées sont en carbure de tungstène (WC) et ont une capacité volumique de 12 mL. Lors de chaque broyage deux jarres sont utilisées, l'une sert au broyage des nanotubes et l'autre sert à équilibrer le plateau (elle est remplie d'eau, de sable et de billes). L'énergie et le résultat du broyage dépendent de nombreux paramètres (Gras 2000). En effet, l'énergie d'impact des billes lors du broyage dépend par exemple de la vitesse de rotation des jarres et du plateau. D'autres paramètres comme le diamètre et le nombre des billes ou le rapport masse de poudre sur masse de billes ont aussi un effet direct sur l'énergie produite lors du broyage et donc sur le résultat final.

Plusieurs études ont été réalisées pour comprendre, calculer la fréquence des chocs, le type de chocs ainsi que la quantité d'énergie engendrée (Abdellaoui *et al.* 1994, 1995). Ces études menées par Abdellaoui et Gaffet sur la compréhension de ce système ont permis de déterminer des grandeurs telles que la fréquence de choc, la puissance injectée ou encore le taux d'énergie de choc.

Dans cette étude, les calculs de puissance injectée lors du broyage sont en cours de calcul<sup>5</sup>. Ainsi, les valeurs seront données sous la forme ( $\Omega/\omega$ ). Les broyages les moins énergétiques sont (150/-50) et les plus énergétiques sont (300/-600).

<sup>5</sup> Le logiciel Cinétique monobille d'un broyeur planétaire d'Éric Gaffet est en cours d'acquisition

#### I.4.2 - Analyse des nanotubes de titanate broyés

##### I.4.2.1 - Influence de la puissance injectée lors du broyage

Le premier broyage est réalisé avec des paramètres de broyage (150/-50/0,5h) en milieu sec. Ces paramètres correspondent à une vitesse de rotation de 150 trs/min pour le plateau ( $\Omega$ ), 50 en sens inverse pour les jarres ( $\omega$ ) et 30 minutes de broyage (t). Le broyage est réalisé avec 3 billes de diamètre 10 mm et avec un rapport masse TiONts/masse bille = 1/70. Avec ces paramètres, le broyage n'est pas très énergétique. Les clichés MET témoignent du fait que les TiONts ne sont pas altérés par le broyage, en effet ils conservent leur forme tubulaire et ne se rompent pas (Figure 37 a).

Un second broyage, en milieu sec, plus énergétique (300/-600/1h) est réalisé sur la même synthèse. Lors de ce broyage les TiONts sont endommagés. En effet, une partie est cassée (Figure 37 b et c) et le comptage de 20 nanotubes (à cause de l'état d'agglomération) post broyage révèle des longueurs différentes  $L = (88 \pm 31)$  nm contre  $(156 \pm 53)$  nm avant broyage.

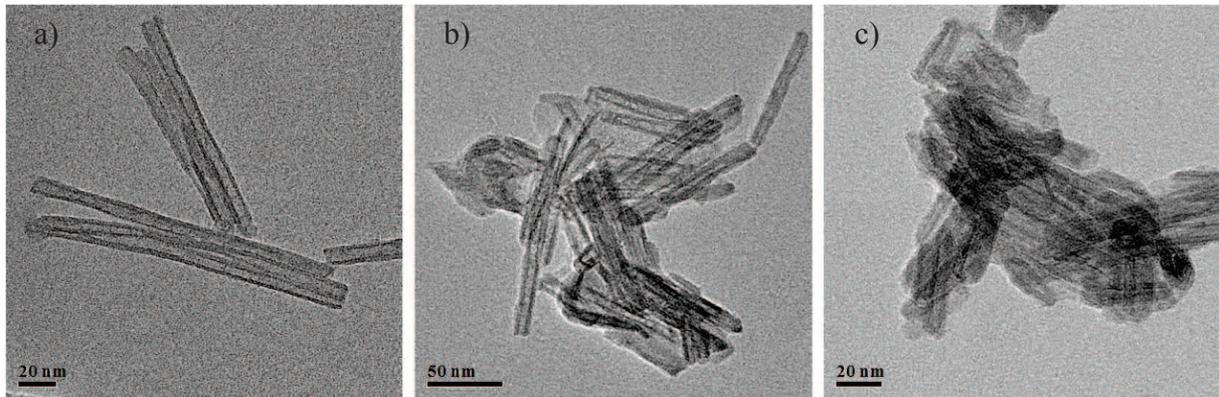


Figure 37. Produits obtenus a) après le premier broyage (150/-50/0,5h) b) et c) après le second broyage (300/-600/1h) avec 3 billes de diamètre 10 mm et un rapport masse TiONts/masse billes = 1/70 en milieu sec

Pour la suite des expériences, les broyages seront effectués avec 8 billes de diamètre 5 mm en WC avec un couple ( $\Omega / \omega$ ) de (300/-600) pendant un temps croissant. Avec les paramètres utilisés, la puissance de choc injectée sera conséquente ce qui permettra d'étudier des conditions de broyages plus énergétiques et donc des conditions mécaniques extrêmes (Figure 38).

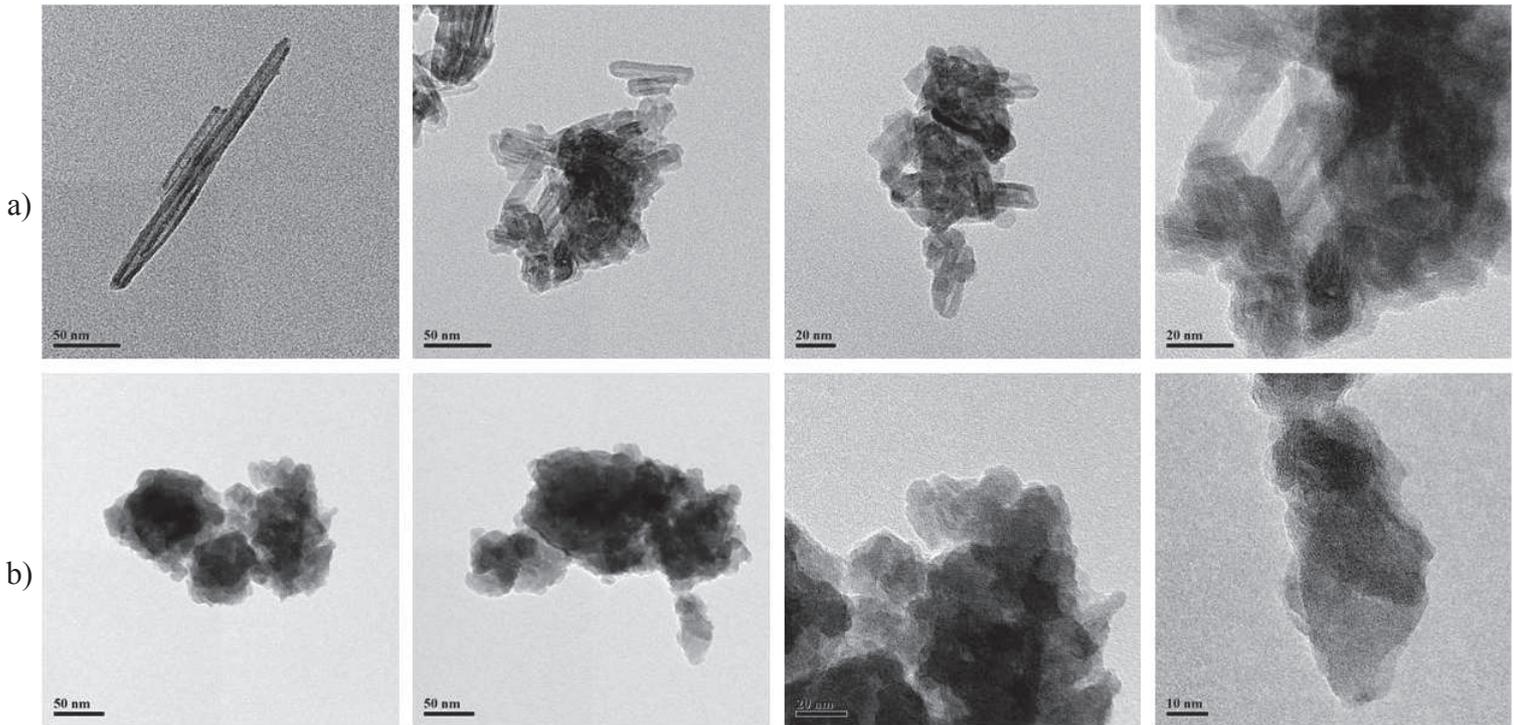


Figure 38. Photographie de la jarre de nanotubes après broyage en présence de 8 billes de diamètre 5 mm en WC

*1.4.2.2 - Influence du temps de broyage*

La durée du broyage des nanotubes influe sur leur morphologie, en effet ceux-ci s'agglomèrent et leur longueur semble se réduire au bout de 30 minutes (Figure 39 a). Un comptage représentatif sur une centaine de nanotubes n'est pas réalisable étant donné l'agglomération des tubes. L'observation de plans interréticulaires est toujours possible, ils sont donc toujours cristallisés. Le temps de broyage n'est pas suffisant pour agglomérer l'ensemble des nanotubes car certains restent relativement bien individualisés (Figure 39 a).

Lorsque le broyage dure deux heures, les nanotubes intacts deviennent quasiment inexistant. L'agglomérat compact obtenu ne permet plus d'observer des nanotubes mais plutôt des nanoplaques (Figure 39 b).



*Figure 39. Clichés MET après broyage, a) (300/-600/0,5h) et b) (300/-600/2h) avec 8 billes de diamètre 5 mm et un rapport mTiONts/mbilles = 1/18*

Les nanotubes broyés pendant 30 minutes et 2 heures ont été caractérisés par diffraction des rayons X et cette caractérisation confirme l'observation faite au MET. En effet, le signal en DRX met en avant la diminution d'intensité des raies de diffractions jusqu'à leur disparition totale soulignant une perte de la périodicité nécessaire à l'obtention d'un signal de diffraction (Figure 40).

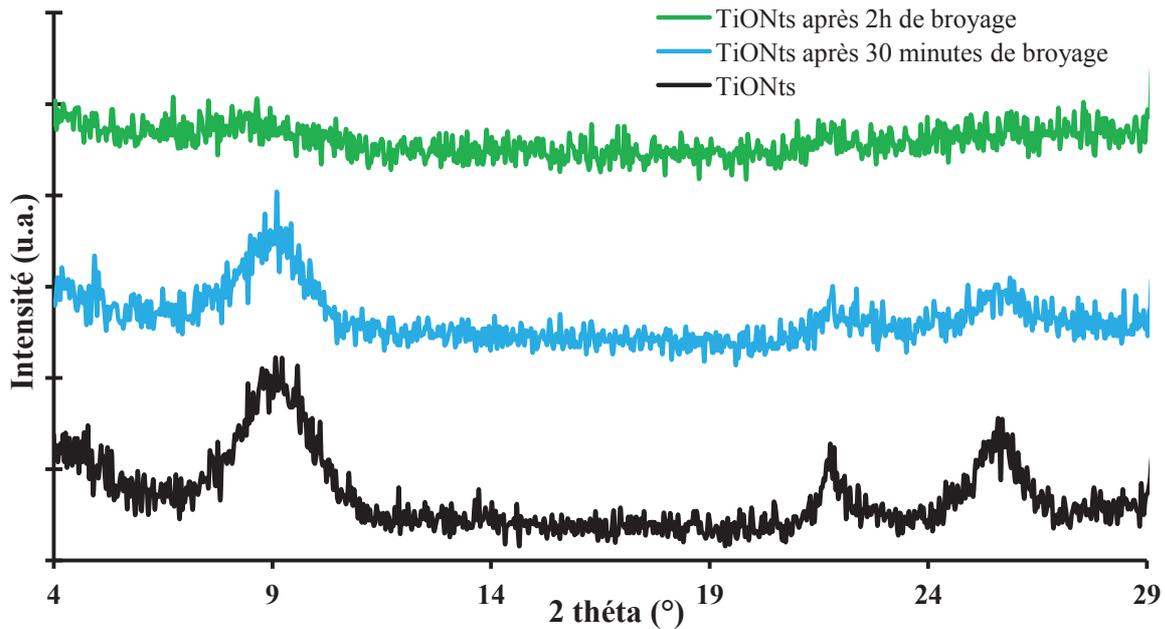


Figure 40. Diffractogrammes de TiONts non broyés, broyés 30 minutes et broyés 2 heures avec des vitesses de rotation de plateaux (300/-600) et 8 billes de WC de diamètre 5mm,  $\lambda = 1,39222 \text{ \AA}$

Le signal obtenu par spectrométrie Raman des TiONts permet d'observer une diminution de l'intensité des pics au bout de 2 heures de broyages. Malgré cela, les nanotubes broyés présentent les pics caractéristiques des nanotubes aux déplacements Raman attendus (Figure 41). Contrairement à diffraction des rayons X, la spectroscopie Raman ne nécessite pas d'avoir une structure cristalline périodique à grande distance pour obtenir un signal. Les pics caractéristiques des nanotubes sont toujours présents après 30 minutes et deux heures de broyage. A deux heures, l'intensité des pics est plus faible. Ce qui peut être le signe d'une perte de cristallinité.

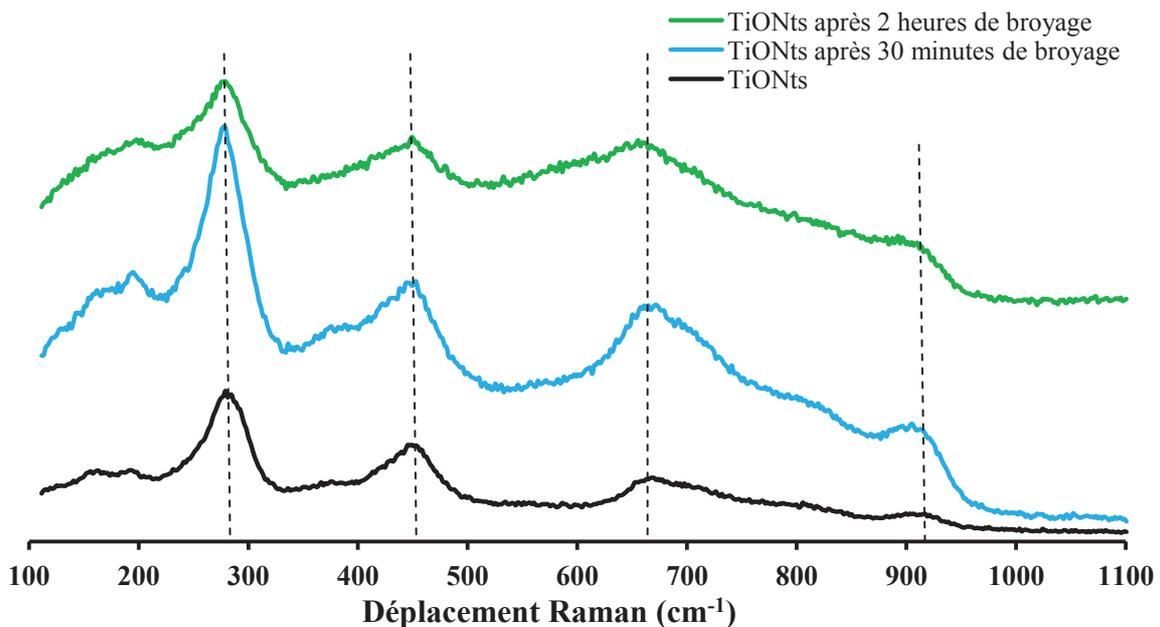


Figure 41. Spectres Raman de TiONts non broyés, broyés 30 minutes et broyés 2 heures avec des vitesses de rotation de plateaux (300/-600) et 8 billes de WC de diamètre 5mm

### 1.4.2.3 - Broyage en milieu liquide

Le but de l'étude étant de connaître la résistance mécanique des TiONts dans un milieu liquide (le corps humain en l'occurrence), un broyage (300/-600/1h) est réalisé en milieu aqueux avec de l'eau distillée ( $V_{H_2O} = 11,9$  mL). En milieu liquide, le broyage étant moins énergétique à cause de la résistance de l'eau, il devient beaucoup moins efficace, par conséquent les nanotubes ne sont pas endommagés comme l'attestent les observations en microscopie électronique en transmission (Figure 42). Un comptage de cent nanotubes est difficilement réalisable étant donné l'état d'agglomération des nanotubes.

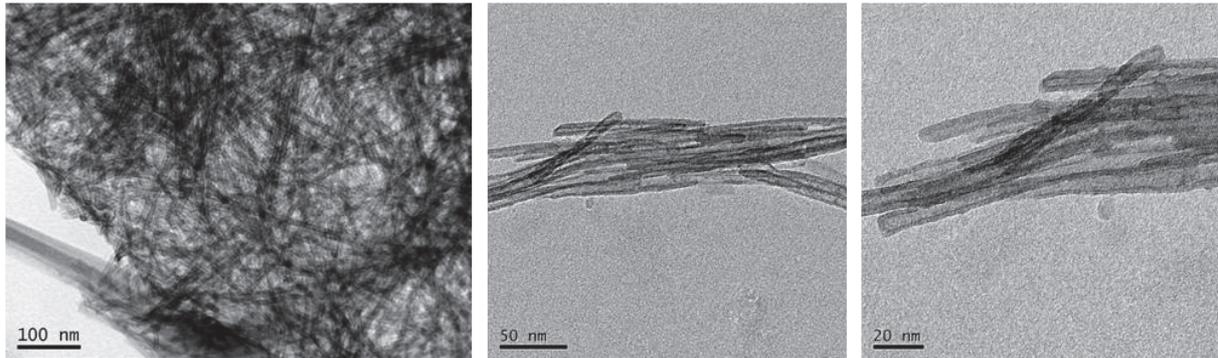


Figure 42. Broyage de TiONts (300/-600/1h) avec 3 billes de WC de diamètre 10 mm, un rapport masse TiONts/masse bille = 1/33 en milieu aqueux

Un broyage plus long et très énergétique (300/-600/48h) dans l'eau a été testé pour éprouver la résistance des nanotubes. De plus, cette expérience a été réalisée avec huit billes de WC de diamètre 5 mm et de masse 0,998 g afin d'augmenter la probabilité des chocs entre les nanotubes et les billes. Même pendant 48h, le broyage n'est pas assez énergétique pour endommager les nanotubes (Figure 43).

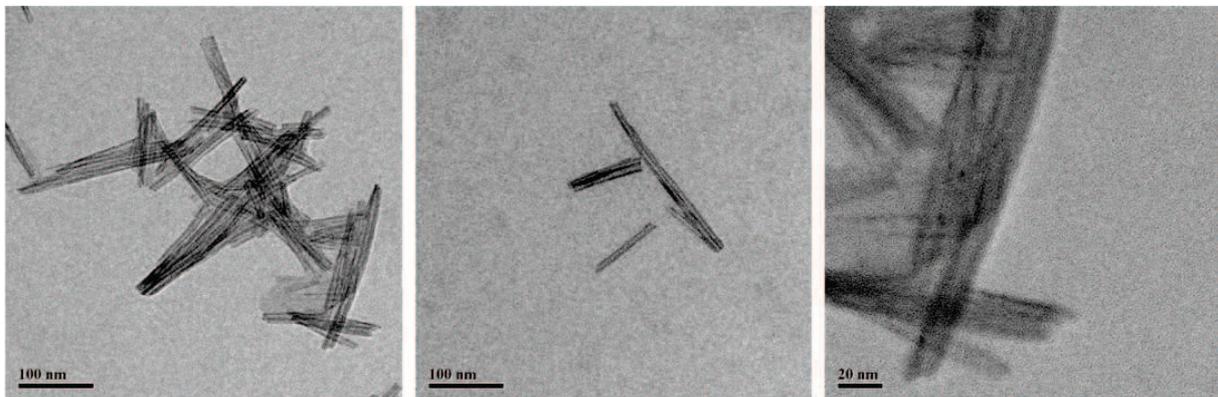


Figure 43. Broyage de TiONts (300/-600/48h) avec 8 billes de WC de diamètre 5 mm avec un rapport masse TiONts/masse bille = 1/33 en milieu aqueux pendant 48h

Lors d'un broyage, les éléments de broyage (jarres et billes) sont usés et conduisent à des pollutions. Ces pollutions changent la couleur habituellement blanche des nanotubes en gris (Figure 44 b). La poudre a été caractérisée par XPS. Les résultats d'analyse montrent les taux habituels de Ti, O, Na et de C mais aussi une faible pollution de tungstène due aux billes de WC utilisées (Tableau 14). Le pic le plus intense pour le tungstène est situé au niveau 4f à 32 eV mais comme celui-ci a une position proche de pics correspondant à l'oxygène et au titane, il est donc préférable de regarder à 200 eV, la présence ou non d'un pic correspondant au niveau 4d du tungstène. Le pic correspondant au carbone devrait avoir une nouvelle

contribution due à la liaison du carbone avec le tungstène à 282 eV (Figure 44 a). Finalement, la pollution est négligeable contrairement à ce que pourrait laisser penser le constat visuel (Figure 44 b) de la poudre après broyage car la concentration atomique du tungstène, déterminé en XPS, est inférieure à 1% et la composante au niveau C1s n'apparaît pas.

Synthèse	Concentration atomique (%)				
	Ti 2p	O 1s	C 1s	Na KLL	W 4d
TiONts avant broyage	21	58	6	15	-
TiONts après broyage	21	56	7	15	0,85

Tableau 14. Comparaison des concentrations atomiques déterminées par analyse XPS des espèces présentes entre les nanotubes et les nanotubes broyés (300/-600/48h) dans l'eau

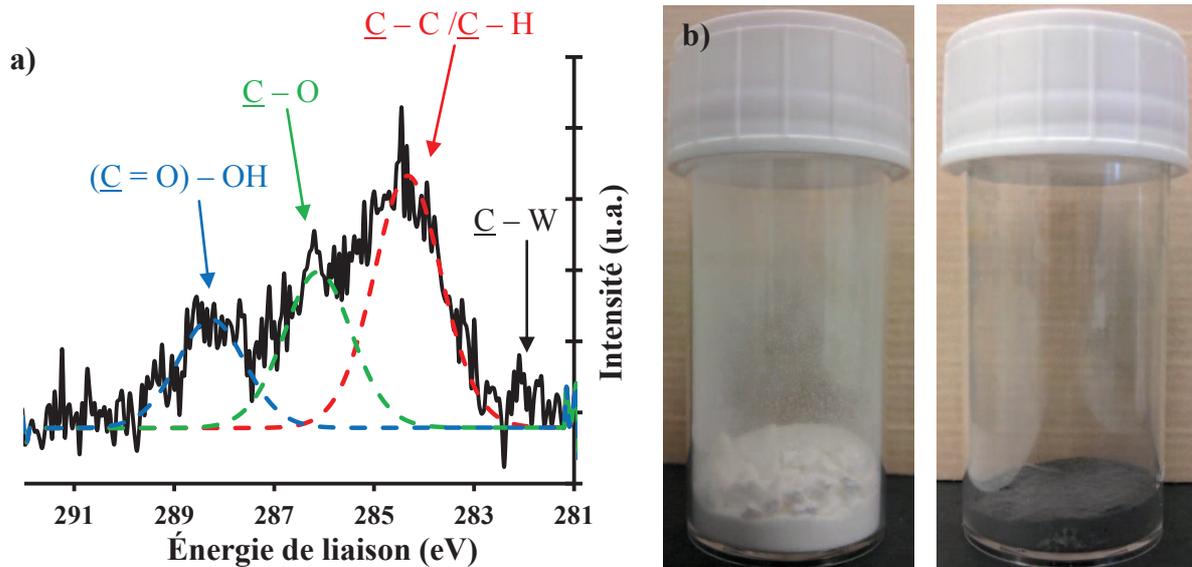


Figure 44. a) Analyse XPS : niveau C1s des nanotubes broyés (300/-600/48) et b) Photographies de la poudre de nanotubes avant broyage et après broyage dans l'eau

#### 1.4.2.4 - Influence des autres paramètres

D'autres paramètres tels que le rapport mTiONts/ mbilles ont un impact sur le résultat final du broyage. Cependant, la faible densité des TiONts limite les possibilités pour les choix de ce rapport. D'autre part, les nanotubes fabriqués par les divers réacteurs ne montrent pas de différences notables du point de vue mécanique.

### 1.5 - Conclusion sur la synthèse des nanotubes de titanate

La méthode de synthèse par voie hydrothermale a permis d'obtenir des nanoparticules de dimensions contrôlées. Ces nanoparticules ont une morphologie tubulaire. Ces nanotubes mesurent une centaine de nanomètres pour un diamètre d'environ 10 nanomètres et possèdent une cavité interne avoisinant les 4 nm. Cependant, leur structure et leur composition exactes restent mal connues. Ces nanotubes ne présentent pas de stabilité dans les conditions proches du milieu physiologique malgré un point isoélectrique aux alentours de 3,5 et un potentiel élevé (-35 mV). En revanche, l'étude de leur résistance mécanique en milieu aqueux effectuée grâce à un broyeur planétaire (300/-600/48h) atteste d'une bonne résistance de la morphologie des nanotubes de titanate. D'autres broyages en milieu sec ont permis de détériorer ces nanotubes mais à des énergies élevées.

## II. Synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer de structure spinelle superparamagnétique : SPIO

### II.1 - Généralités sur les oxydes de fer

Les oxydes de fer ainsi que leurs propriétés sont étudiées depuis de nombreuses années, une présentation générale en sera faite en avant propos en présentant leur structure et leurs propriétés.

#### II.1.1 - Les oxydes de fer de structure spinelle

La structure spinelle a pour formule chimique générale  $AB_2O_4$  (Figure 45) dans laquelle A et B symbolisent des cations et O incarne le réseau cubique à faces centrées. Ce dernier est constitué des 32 anions oxygène  $O^{2-}$  formant les sites octaédriques (sites B) et sites tétraédriques (sites A) dans lesquels les ions ferrique ou ferreux viennent se placer. Les sites tétraédriques au total de 64 ne seront occupés qu'au taux d'un huitième (8 sites occupés) et les 32 sites octaédriques seront occupés à moitié (16 sites occupés).

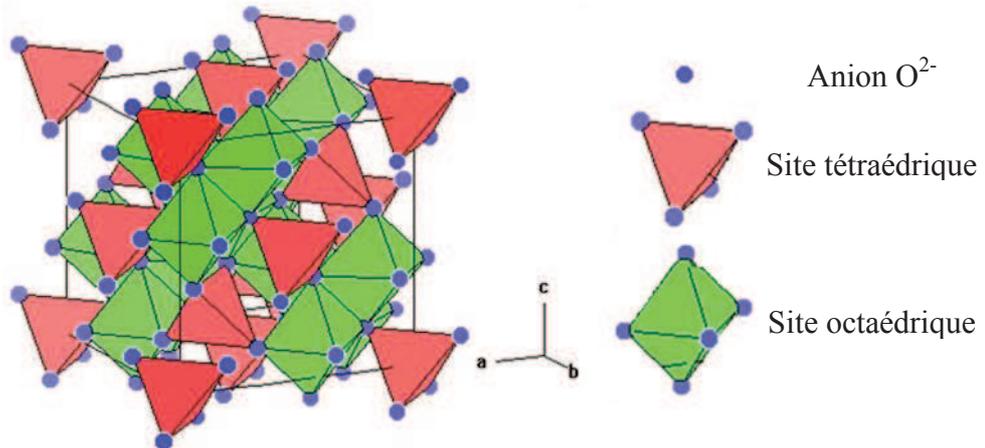
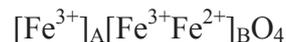


Figure 45. Représentation de la structure spinelle  $AB_2O_4$  avec une origine prise sur un site tétraédrique, les sites octaédriques (en vert) et sites tétraédriques (en rouge) sont compris dans le réseau des anions oxygènes  $O^{2-}$  représentée par les sphères bleues.

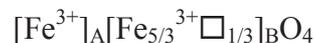
Selon l'état d'oxydation des oxydes de fer de structure spinelle : la magnétite ( $Fe_3O_4$ ) et la maghémite ( $\gamma\text{-}Fe_2O_3$ ) peuvent être obtenues.

La magnétite ( $Fe_3O_4$ ) est composée d'ions ferreux inclus exclusivement dans les sites octaédriques alors que les ions ferriques sont répartis équitablement dans les sites octaédriques et tétraédriques, sa formule est donc :



Elle cristallise dans le groupe d'espace  $Fd\bar{3}m$  et son paramètre de maille est de 8,396 Å.

La maghémite ( $\gamma\text{-}Fe_2O_3$ ) est obtenue par oxydation de la magnétite. Les cations divalents se retrouvent à l'état trivalent et la conséquence est la formation de lacunes cationiques symbolisées par  $\square$  au niveau des sites octaédriques, sa formule est alors :



Elle cristallise dans le groupe d'espace  $P4_132$  si les lacunes sont ordonnées et son paramètre de maille est de 8,345 Å. C'est la forme la plus oxydée de la magnétite.

En revanche, les ions ferreux peuvent aussi être oxydés partiellement formant un nouvel oxyde de structure spinelle et de formule  $Fe_{3(1-\delta)}O_4$ .  $\delta$  représente la déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène et est compris entre  $\delta = 0$  pour la magnétite pure et  $\delta = 1/9$  (0,111) pour la maghémite. De même pour le paramètre de maille de ces oxydes en partie oxydés, celui-ci sera compris entre le paramètre de maille de la magnétite ( $a = 8,396 \text{ \AA}$ ) et de la maghémite ( $a = 8,345 \text{ \AA}$ ). La diffraction des rayons X permet de mesurer le paramètre de maille et permet aussi *via* une méthode appelée méthode de Poix (annexe n°2) de remonter à la stœchiométrie en oxygène. De même, la proportion de fer (II) par rapport au fer (III) peut être retrouvée, ce paramètre est noté  $\eta$  (Tableau 15).

Phases	Paramètre de maille	Déviaton par rapport à la stœchiométrie en oxygène	Proportion Fe (II)/Fe (III)
	a (Å)	$\delta$	$\eta$ (%)
magnétite ( $Fe_3O_4$ )	8,396	0	33
maghémite ( $\gamma\text{-}Fe_2O_3$ )	8,345	$1/9 \approx 0,1111$	0

Tableau 15. Valeurs structurales théoriques caractérisant la magnétite et la maghémite

### II.1.2 - Les propriétés magnétiques des oxydes de fer de phase spinelle

Les nanoparticules n'affichent pas de cycle d'hystérésis lorsque la taille des cristallites est inférieure à 20 nm (Chatterjee *et al.* 2003; Teja *et al.* 2009) et adoptent un comportement dit **superparamagnétique** (Bean 1959) à température ambiante, c'est-à-dire que leur aimantation s'annule lorsque le champ magnétique externe disparaît (Figure 46).

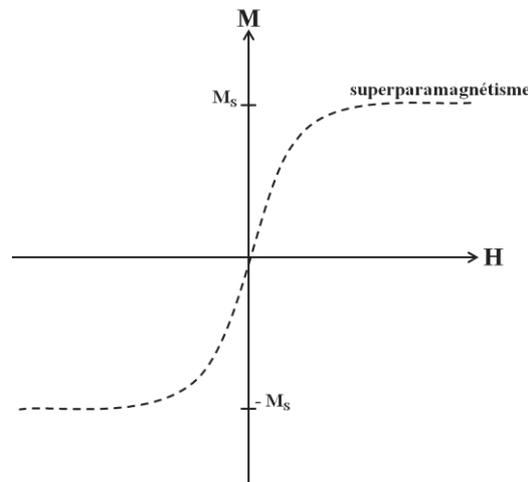


Figure 46. Représentation schématique d'une courbe d'aimantation de nanoparticules d'oxydes de fer ayant une taille inférieure à 20 nanomètres

Les valeurs d'aimantation à saturation des nanoparticules de magnétite ou de maghémite sont inférieures à celles des matériaux massifs à cause de l'effet de taille. En effet, la valeur de l'aimantation à saturation  $M_s$  de la magnétite est de 67,8 uem/g pour des nanoparticules de 12 nm (Panda *et al.* 2001) ou 75,6 uem/g pour des nanoparticules de 150 nm (Goya *et al.* 2003) contre 92 uem/g pour des massifs de magnétite. De même, les valeurs trouvées dans la littérature pour la maghémite soulignent ce phénomène : les travaux de Fiorani *et al.* (Fiorani *et al.* 2002) montrent que pour des grains de maghémite, l'aimantation à saturation diminue respectivement à 72, 55 et 48 uem/g pour des tailles de particules de 8,7, 4,6 et 2,7 nm, contre 74 uem/g pour des massifs de maghémite.

### II.1.3 - Les principales méthodes de synthèse de nanoparticules de phase spinelle

La synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer a été amplement étudiée dans la littérature (Huber 2005; Laurent *et al.* 2008). Leur fabrication est réalisable par diverses voies, notamment la co-précipitation des sels de fer en milieu basique (Massart 1981; Bee *et al.* 1995; Kim *et al.* 2001).

D'autres méthodes de synthèses ont été développées pour contrôler la taille des nanoparticules et leur morphologie telles que la synthèse par décomposition thermique (Hyeon *et al.* 2001; Sun *et al.* 2002; Woo *et al.* 2004), la voie sol-gel (Lu *et al.* 2002; Dai *et al.* 2005), la méthode polyol (Cai *et al.* 2007), la synthèse par microémulsion (Chin *et al.* 2007) et la voie hydrothermale (Daou *et al.* 2006).

Par ailleurs, diverses méthodes de synthèses moins courantes sont utilisées pour fabriquer des nanoparticules d'oxydes de fer telles que la synthèse par pyrolyse laser (Bomatí-Miguel *et al.* 2008), la voie électrochimique (Pascal *et al.* 1998), la biosynthèse (Bharde *et al.* 2008) ou par micro-ondes (Pascu *et al.* 2012). De plus, la synthèse de magnétite ou de maghémite a été mise au point sur des dispositifs en continu comme la voie hydrothermale (Maurizi *et al.* 2011) ou la voie eau supercritique (Maurizi 2010).

## II.2 - Synthèse et propriétés des nanoparticules d'oxydes de fer de structure spinelle synthétisées

Pour des applications dans le domaine de l'imagerie médicale, les suspensions de nanoparticules doivent répondre à des critères tels que la stabilité en milieu aqueux et posséder un cœur magnétique de taille inférieure à 20 nanomètres, condition *sine qua non* pour des propriétés superparamagnétiques.

### II.2.1 - Synthèse des nanoparticules par coprécipitation type Massart

La voie de synthèse retenue est la co-précipitation, basée sur une méthode proposée par Massart (Massart 1981). Ce procédé est la voie la plus facile pour l'obtention de grandes quantités de nanoparticules de magnétite et de maghémite. Le protocole consiste, en premier lieu, à faire co-précipiter des sels ferreux et ferriques (rapport molaire [1 : 2]) en milieu basique. Cette voie est très reproductible et permet l'obtention de suspensions de nanoparticules stables en milieu aqueux (à pH acide ou basique).

Tout d'abord, un mélange de 20 mL de chlorure de fer (II) à 2 mol.L<sup>-1</sup>, dissout dans de l'acide chlorhydrique à 2 mol.L<sup>-1</sup> pour éviter leur oxydation et de 80 mL de chlorure de fer (III) à 1 mol.L<sup>-1</sup>, dans un ratio molaire Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> = 0,5, est préparé. Ce mélange est ensuite co-précipité goutte-à-goutte (1 mL/min) dans 800 mL de soude à 0,75 M à 90°C sous agitation mécanique à 200 trs/min (Figure 47). Après 15 minutes, le chauffage est coupé et le système est refroidi avec de l'eau, puis laissé sous agitation encore pendant 15 minutes, soit un temps de réaction total de 30 minutes.

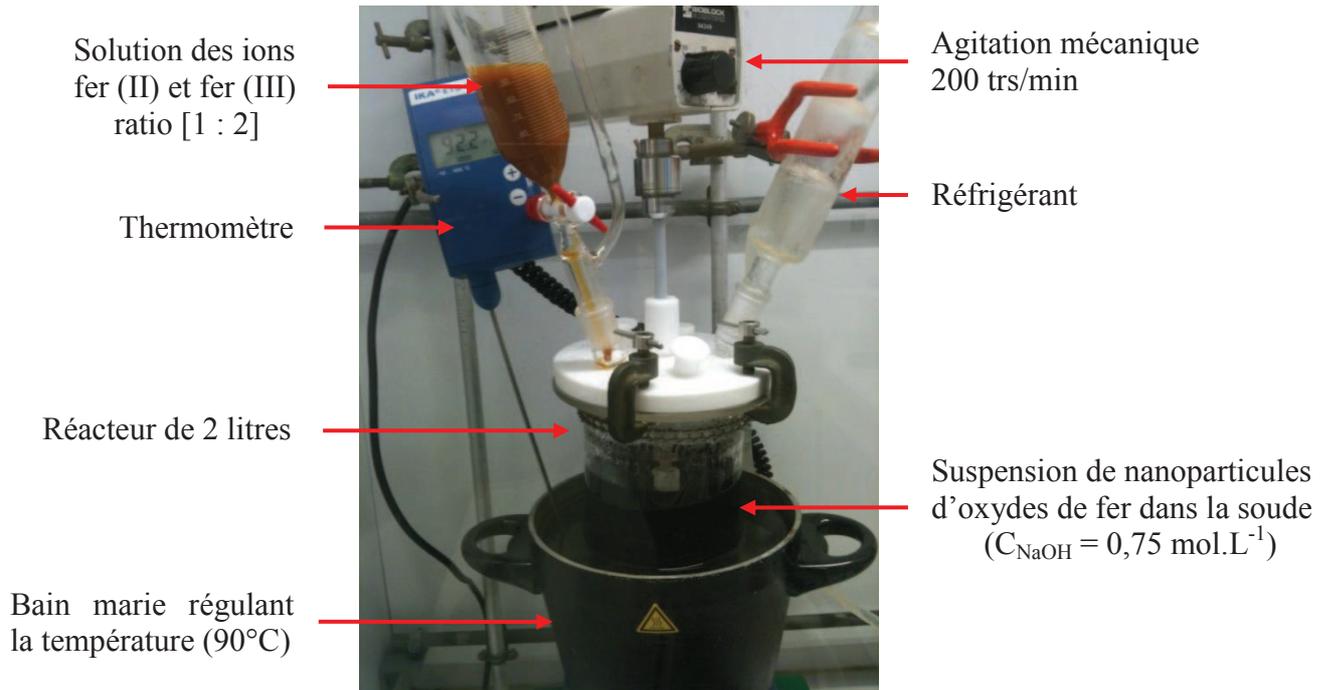


Figure 47. Photographie du montage pour l'élaboration des nanoparticules d'oxydes de fer en cours de synthèse

### II.2.2 - Lavages des nanoparticules d'oxydes de fer

La suspension basique ( $\text{pH} = 14$ ) de nanoparticules d'oxydes de fer est laissée sous décantation magnétique pendant 30 minutes, ainsi les sels de fer restent en contact avec la base pendant une heure (30 minutes de synthèse suivies de 30 minutes de décantation). Le surnageant basique est enlevé et la suspension est ensuite rincée sept fois par des lavages réguliers avec de l'acide nitrique ( $400 \text{ mL}$ ,  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) pour peptiser la surface des nanoparticules. Les lavages permettent l'élimination des ions résiduels comme les ions sodium, ferriques ou hydroxyles. Les ions chlorures sont au fur et à mesure échangés par les ions nitrates et les nanoparticules deviennent chargées positivement en milieu acide. La suspension est ensuite centrifugée ( $434 \times g$ ) pendant une heure pour enlever l'excès d'acide nitrique.

Dans ses travaux, L. Maurizi (Maurizi 2010) a optimisé ce protocole avec pour intention d'éliminer les gros agrégats formés lors de la synthèse. Cet optimisation consiste en quatre centrifugations à des forces centrifuges relatives de  $108$ ,  $434$ ,  $2712$ ,  $10847 \times g$  pendant respectivement 5 minutes, 10 minutes, 10 minutes et 5 minutes. Enfin, la suspension de nanoparticules est dialysée dans une solution aqueuse d'acide nitrique à  $\text{pH} = 3$  pour faire remonter le  $\text{pH}$  et ainsi éviter la dissolution des nanoparticules.

II.2.3 - Caractérisation des nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées

II.2.3.1 - Détermination de la structure des nanoparticules synthétisées

La diffraction des rayons X a été utilisée pour déterminer la phase des nanoparticules synthétisées par le protocole Massart (Figure 48).

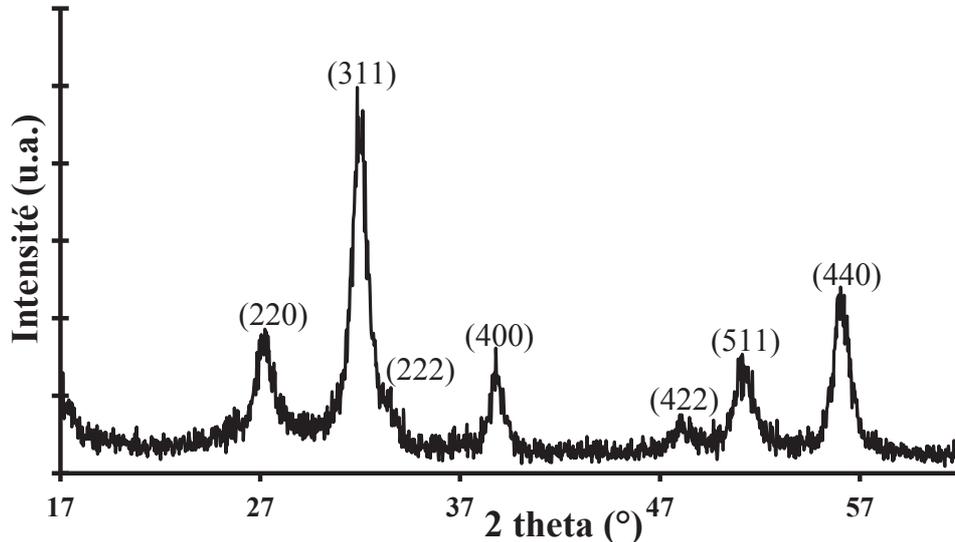


Figure 48. Diffractogramme des nanoparticules synthétisées par la méthode Massart,  $\lambda = 1,3922 \text{ \AA}$

La phase spinelle d'oxyde de fer a été mise en évidence par reconnaissance de phase. Le calcul du paramètre de maille renseigne quant à lui sur l'état d'oxydation des cations  $\text{Fe}^{2+}$ . Celui-ci est calculé *via* le logiciel Topas. Le paramètre de maille calculé par cette méthode est de  $a = (8,379 \pm 0,003) \text{ \AA}$ . Cette valeur est comprise entre celle de la magnétite ( $8,396 \text{ \AA}$ ) et celle de la maghémite ( $8,345 \text{ \AA}$ ). Ainsi, un oxyde de fer avec des ions ferreux partiellement oxydés a été synthétisé de formule  $\text{Fe}_{3(1-\delta)}\text{O}_4$ ,  $\delta$  étant la déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène. Par calcul avec la méthode de Poix, il est possible de remonter à cette déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène, ainsi qu'aux proportions des ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$ , aux lacunes cationiques ainsi qu'au paramètre  $\eta$ . Ici, les nanoparticules synthétisées ont pour déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène  $\delta = 0,035$  et une proportion de Fe (II) par rapport aux cations de Fe (III)  $\eta = 31\%$ . Alors, l'oxyde de fer synthétisé a pour formule :



D'autre part, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a permis de confirmer que la structure des nanoparticules synthétisées est proche de celle de la magnétite. Les analyses ont été effectuées sur des pastilles de KBr ( $m \approx 150\text{mg}$ ) auxquelles des nanoparticules ont été mélangées ( $m \approx 4 \text{ mg}$ ).

L'analyse par spectroscopie infrarouge de la magnétite est caractérisée par une bande IR comprise entre  $570$  et  $590 \text{ cm}^{-1}$  alors que la signature de la maghémite est faite de plusieurs bandes. Les valeurs des bandes IR des deux oxydes de fer de structure spinelle sont regroupées dans le Tableau 16 (Belin *et al.* 2002) et leurs représentations graphiques sont tracées sur la Figure 49 (Daou *et al.* 2008; Basly 2010).

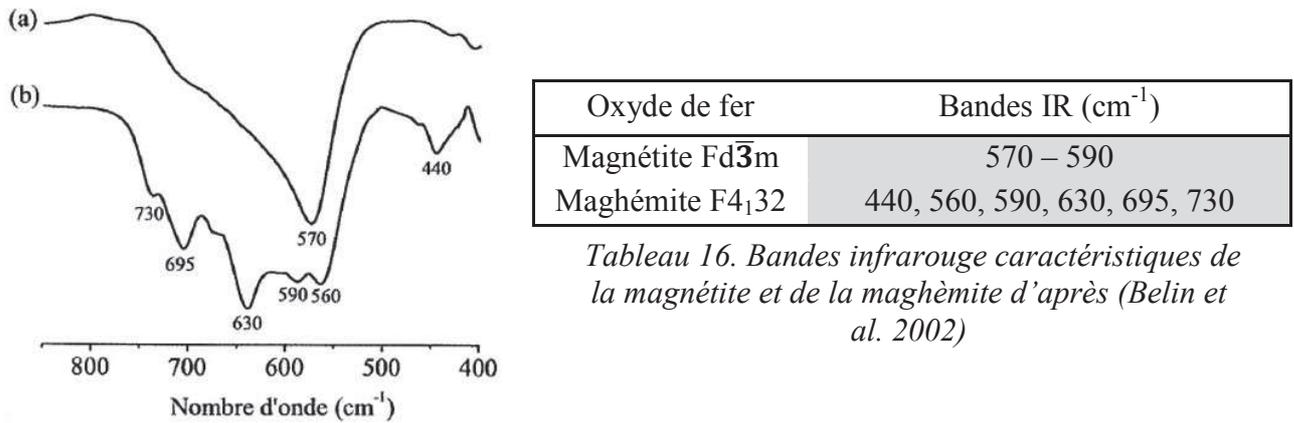


Figure 49. Spectre IR de la magnétite (a) et de la maghémite (b) d'après (Daou 2007)

Les nanoparticules synthétisées possèdent la bande caractéristique de la magnétite à  $580\text{ cm}^{-1}$  (Figure 50). La bande fine vers  $1390\text{ cm}^{-1}$  correspond à la vibration de la liaison N-O de l'acide nitrique utilisé lors de l'étape de peptisation. Enfin, les deux autres bandes sont dues à l'eau adsorbée à  $1650\text{ cm}^{-1}$  et  $3400\text{ cm}^{-1}$  qui correspond respectivement à l'eau physisorbée et aux hydroxyles de surface ou à l'eau chimisorbée (Belin et al. 2004).

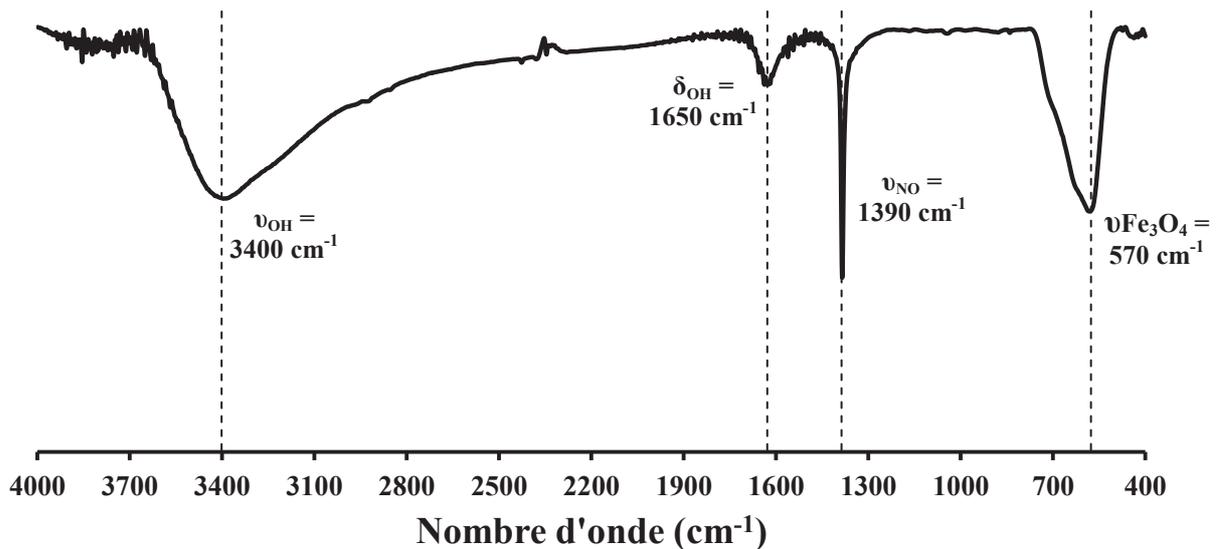


Figure 50. Spectre infrarouge des oxydes de fer synthétisés

Pour conclure, les nanoparticules synthétisées sont des oxydes de fer de structure spinelle proche de la magnétite  $\text{Fe}_{3(1-0,035)}\text{O}_4$ . Dans la suite de ce manuscrit, l'oxyde de fer sera nommé **SPIO** (SuperParamagnetic Iron Oxide).

### II.2.3.2 - Analyses morphologiques des nanoparticules

Dans un premier temps, la taille des cristallites est calculée grâce à la méthode de Le Bail *via* le logiciel Topas à partir de la largeur à mi-hauteur des raies de diffraction du diffractogramme (Figure 48). Le diamètre calculé des cristallites par cette technique est de  $d_{\text{DRX}} = (9,1 \pm 0,2)\text{ nm}$ . Cette mesure est corrélée par des observations faites en microscopie électronique en transmission, le diamètre des cristallites a été mesuré par comptage de

100 nanoparticules considérées comme des sphères pour mieux appréhender leur taille maximale (Figure 51). Le diamètre déterminé ainsi est de  $d_{MET} = (9 \pm 2)$  nm.

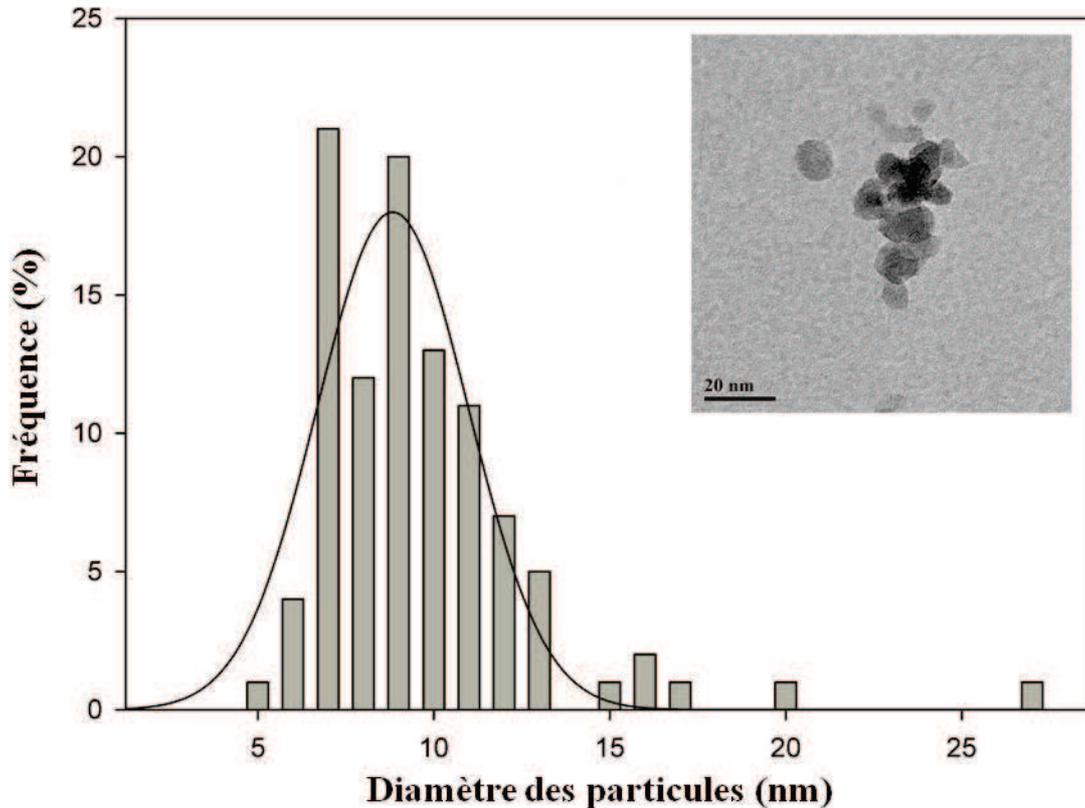


Figure 51. Distribution en taille et cliché MET des nanoparticules synthétisées par la voie Massart

Le diamètre des nanoparticules peut être également calculé avec la méthode BET pour corréler les résultats trouvés par les deux autres méthodes. Le diamètre est déterminé, pour des nanoparticules considérées comme lisses et sphériques, par l'équation :

$$S_{BET} = \frac{6000}{\rho \cdot d_{BET}} \quad (\text{Équation 2})$$

Avec  $S_{BET}$  la surface spécifique ( $m^2 \cdot g^{-1}$ ),  $\rho$  la masse volumique du matériau ( $g \cdot cm^{-3}$ ) et  $d_{BET}$  le diamètre en nm.

La surface spécifique de ces nanoparticules est de  $(92 \pm 10) m^2 \cdot g^{-1}$ , déterminée après un dégazage à  $150^\circ C$  pendant 16 heures. Ainsi, le diamètre est de  $d_{BET} = (12,5 \pm 0,3)$  nm si les nanoparticules sont considérées comme de la magnétite pure ( $\rho = 5,2 g \cdot cm^{-3}$ ) ou si les nanoparticules sont appréciées comme de la maghémite pure ( $\rho = 4,857 g \cdot cm^{-3}$ ), le diamètre est de  $d_{BET} = (13,4 \pm 0,3)$  nm. Le diamètre des grains calculé en BET est plus grand en raison d'un état d'agglomération des nanoparticules, diminuant ainsi la surface spécifique et augmentant alors le diamètre calculé par cette méthode.

Les diamètres des cristallites mesurés par ces différentes techniques sont résumés dans le Tableau 17.

Méthode	Diamètre (nm)
DRX	$9,1 \pm 0,2$
MET	$9 \pm 2$
BET	$12,5 \pm 0,3^{\square}$
	$13,4 \pm 0,3^{\blacktriangle}$

Tableau 17. Résumé des tailles de cristallites obtenues par différentes méthodes ( $\square$  si magnétite pure,  $\blacktriangle$  si maghémite pure)

La microscopie électronique en transmission confirme la tendance révélée par la mesure de surface spécifique. En effet, les observations après ultrasons mettent en avant une agrégation des cristallites (Figure 52).

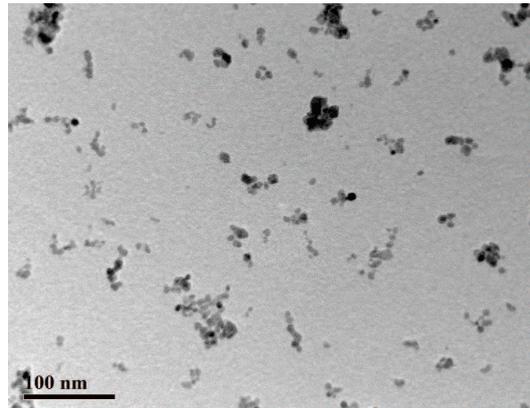


Figure 52. Cliché en microscopie électronique après ultrasons en transmission d'agrégats de nanoparticules synthétisées par la méthode Massart.

Ce phénomène est confirmé par mesure du diamètre hydrodynamique des nanoparticules après ultrasons. Les mesures en DLS (annexe n°1 et 5) ont été réalisées sur des suspensions de nanoparticules diluées cent fois à pH= 4. Les mesures sont répétées trois fois et révèlent une distribution de taille resserrée et une moyenne en nombre de  $d_H = (21 \pm 5)$  nm qui correspond à la taille des agrégats mesurés par MET (Figure 53).

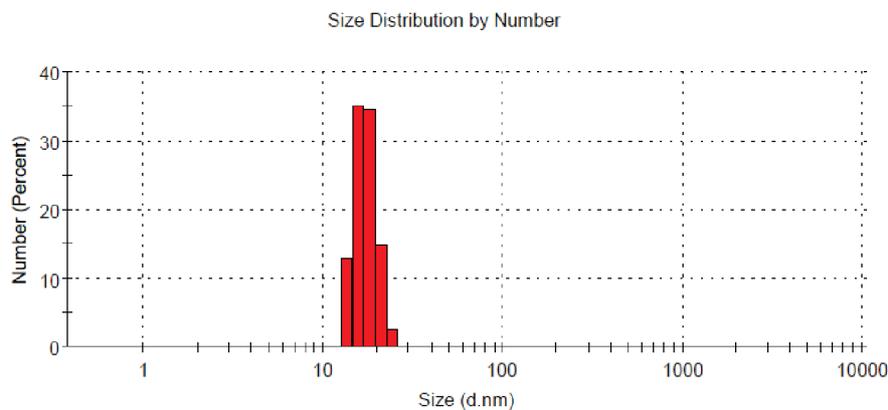


Figure 53. Mesure DLS en nombre des nanoparticules d'oxydes de fer dans  $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  de NaCl après ultrasons (canne à ultrasons, pendant 1 minute à 112 W)

### II.2.3.3 - Propriétés magnétiques des oxydes de fer synthétisés

D'après les diverses techniques utilisées, la taille des cristallites est inférieure à 20 nm, ainsi les nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées de phase spinelle doivent adopter un comportement superparamagnétique.

Les mesures magnétiques des SPIO sont réalisées sur un hystérisimètre (M2100) à 77 K (température de l'azote liquide) sous un champ magnétique de 15 kOe et sur un PPMS (GeMac, Versailles) à température ambiante (300 K) sous un champ magnétique de 10 kOe (Figure 54). La courbe d'aimantation à 300 K met en avant l'absence du cycle d'hystérésis soulignant que les nanoparticules adoptent bien un comportement superparamagnétique. De plus, sans champ magnétique, cette conclusion est renforcée par le fait que la valeur de l'aimantation rémanente ( $M_r$ ) et du champ coercitif ( $H_c$ ) sont très faibles à 77K ou inexistantes à température ambiante précisant le comportement superparamagnétique des nanoparticules d'oxydes de fer de phase spinelle à température ambiante. Cela est confirmé par des mesures FC/ZFC (annexe n°10, figure 2A )

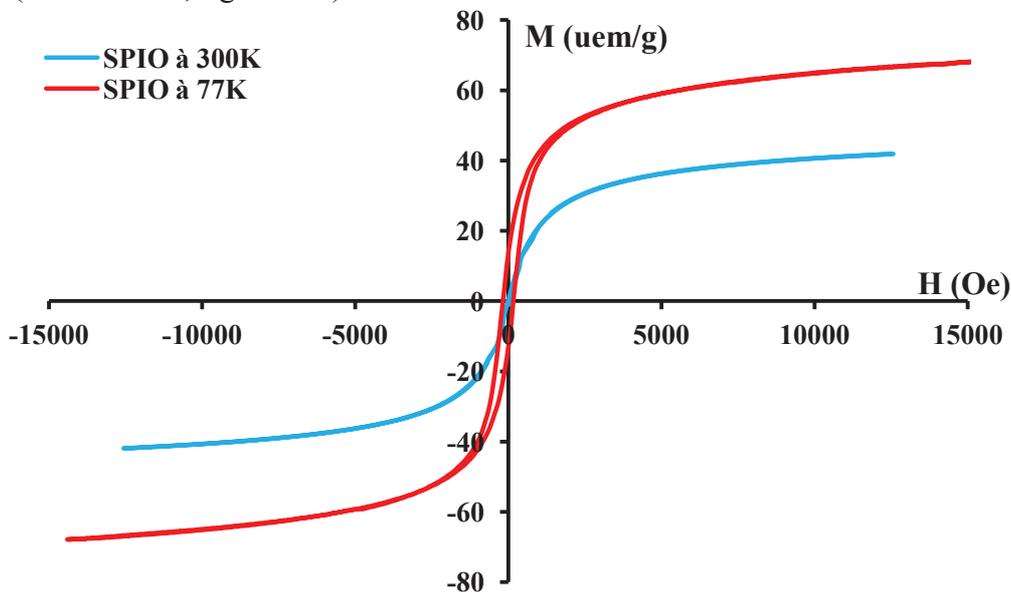


Figure 54. Cycle d'hystérésis des nanoparticules d'oxydes de fer à 77K (hystérisimètre M2100) et à 300K (PPMS).

Dans le cas présent, la valeur de l'aimantation à saturation  $M_s$  à 77K est de 68 uem/g correspondant à la littérature : 67,8 uem/g pour des nanoparticules de 12 nm (Panda *et al.* 2001). Cependant, l'allure de la courbe signale que le système n'est pas saturé et qu'il faudrait appliquer un champ supérieur pour orienter tous les moments magnétiques dans la même direction.

### II.2.3.4 - Analyses de la composition des nanoparticules d'oxydes de fer

Les nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées ont été analysées par XPS et par Analyse Thermogravimétrique (ATG).

En premier lieu, une quantification des éléments présents a été réalisée par XPS. Du carbone de pollution est observé et sera pris en compte dans la composition des nanoparticules alors que l'azote sera négligé car son signal est trop faible par rapport à celui de l'oxygène.

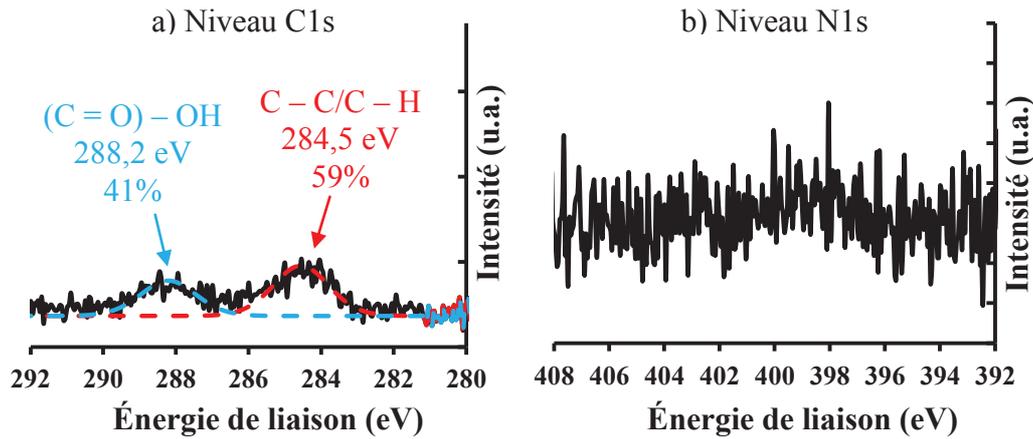


Figure 55. Analyse XPS : a) niveau C1s et b) niveau N1s des nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées par la méthode Massart

Les proportions des éléments trouvés sont rassemblées dans le Tableau 18.

Synthèse	Concentration atomique (%)		
	Fe 2p	O 1s	C 1s
SPIO	38	56	6

Tableau 18. Analyse XPS : Concentration atomique des espèces trouvées à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer

Au niveau de l'oxygène, le pic peut être dissocié en deux composantes correspondant à l'oxygène du réseau  $O^{2-}$  des oxydes de fer de structure spinelle à 529,8 eV et aux hydroxyles de surface  $OH^-$  à 531,6 eV.

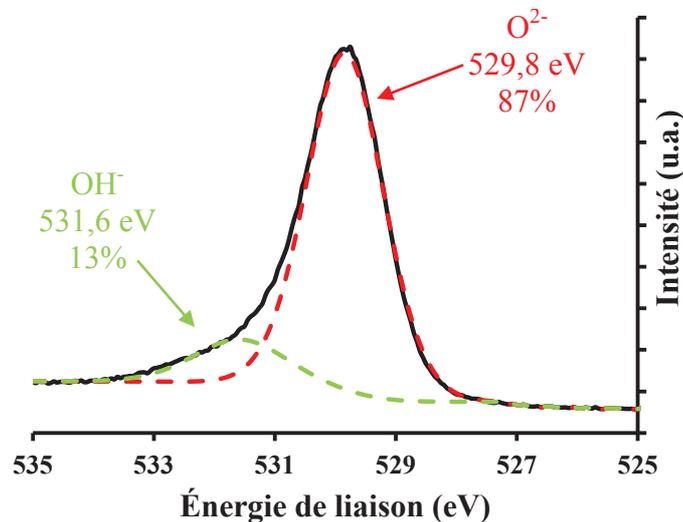


Figure 56. Analyse XPS : Décomposition du niveau O1s des nanoparticules d'oxydes de fer

Les proportions et les largeurs à mi-hauteurs (FWHM) sont regroupées dans le Tableau 19. Ainsi, 87% de l'oxygène est de l'oxygène de réseau et les 13% restants proviennent des hydroxyles de surface.

Éléments	O <sup>2-</sup>	OH <sup>-</sup>
Proportion (%)	87	13
FWHM (eV)	1,5	1,8
Position (eV)	529,8	531,6

Tableau 19. Caractéristiques des deux composantes du niveau O1s des nanoparticules d'oxydes de fer

Le Tableau 20 regroupe les valeurs trouvées en XPS du fer, du carbone de pollution et des deux composantes de l'oxygène.

Synthèse	Concentration atomique (%)				$\frac{Fe2p}{O^{2-}}$
	Fe 2p	O <sup>2-</sup>	OH <sup>-</sup>	C 1s	
SPIO	38	49	7	6	0,78

Tableau 20. Composition en surface des nanoparticules d'oxydes de fer

Le rapport Fe2p/O<sup>2-</sup> déterminé en XPS est sensiblement le même que celui évalué par DRX ( $\approx 0,73$ ).

Pour confirmer ces résultats, une analyse ATG de 30 à 800°C de la poudre d'oxyde de fer a été effectuée. La perte de masse peut être attribuée essentiellement au départ d'eau adsorbée. Les couches d'eau physisorbée sont éliminées jusqu'à 300°C (Mornet 2002). Au-delà, l'eau chimisorbée s'évacue : les groupes hydroxyles voisins réagissent pour former une molécule d'eau. Cette perte est plus intense lors du passage de la maghémite en hématite lors de la réorganisation des atomes de fer en structure rhomboédrique (Belin *et al.* 2002). Enfin, la perte de masse devient nulle et se stabilise aux alentours de 700°C (Figure 57).

Le taux de recouvrement des hydroxyles peut être mesuré à partir de l'équation 1:

$$N_{OH} = \frac{2.(\Delta m).N_a}{M_{H_2O}.S_{BET}.10^{18}} \quad (\text{Équation 1})$$

Avec  $N_{OH}$ , le nombre d'hydroxyle par nm<sup>2</sup> ;  $\Delta m$  la perte de masse entre 300°C et 800°C ;  $N_a$ , le nombre d'Avogadro (mol<sup>-1</sup>) ;  $M_{H_2O}$ , la masse molaire de l'eau (g.mol<sup>-1</sup>) et  $S_{BET}$ , la surface spécifique des nanoparticules (m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>). Ainsi, les nanoparticules d'oxydes de fer possèdent en surface un nombre d'hydroxyles de l'ordre de (6,7 ± 0,6) OH par nm<sup>2</sup> (n = 7 avec n le nombre d'échantillons analysés).

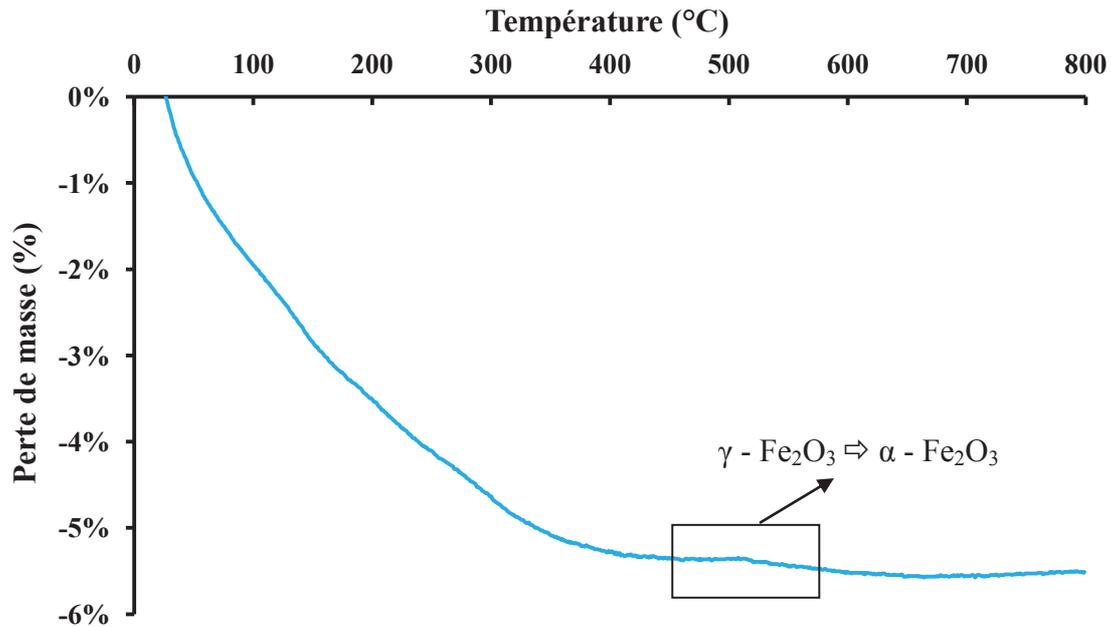


Figure 57. Analyse thermogravimétrique des nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées. Les mesures ont été réalisées sous flux de  $N_2$  ( $25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) avec une rampe de montée en température de  $5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ . Courbe représentative pour un échantillon.

#### II.2.3.5 - Mesures de la stabilité de la suspension de nanoparticules de fer

Au-delà de  $\text{pH} = 8$ , les nanoparticules sont chargées négativement et les forces électrostatiques sont plus élevées que les forces de van der Waals ainsi la suspension est stable (Figure 58). De même en-dessous de  $\text{pH} = 6$ , les forces répulsives électrostatiques entre les nanoparticules sont très fortes mais chargées positivement. Le potentiel zêta s'annule à  $\text{pH} = 7,2 \pm 0,2$  ( $n = 7$  avec  $n$  le nombre d'échantillons analysés) qui représente le point isoélectrique. Entre  $\text{pH} = 6$  et  $\text{pH} = 8$ , la répulsion électrostatique entre les nanoparticules et la faible valeur des charges de surface n'est pas suffisante pour maintenir les nanoparticules en suspension. Donc, les nanoparticules s'agglomèrent et décantent.

Cette instabilité peut être mise en évidence par DLS. Dans une zone proche de 6 et 8, les nanoparticules s'agglomèrent jusqu'à plusieurs micromètres et sédimentent. Ainsi, au point isoélectrique à  $\text{pH} = 7$ , la taille des agglomérats est la plus grande atteignant presque  $6 \mu\text{m}$ . En-deçà et au-delà de ces  $\text{pH}$ , les diamètres hydrodynamiques sont de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres. Les contraintes expérimentales des variations de  $\text{pH}$  sont réalisées avec un autotitrateur et mélanger par agitation magnétique ne permettent pas de revenir à la taille de départ (en milieu acide) en milieu basique

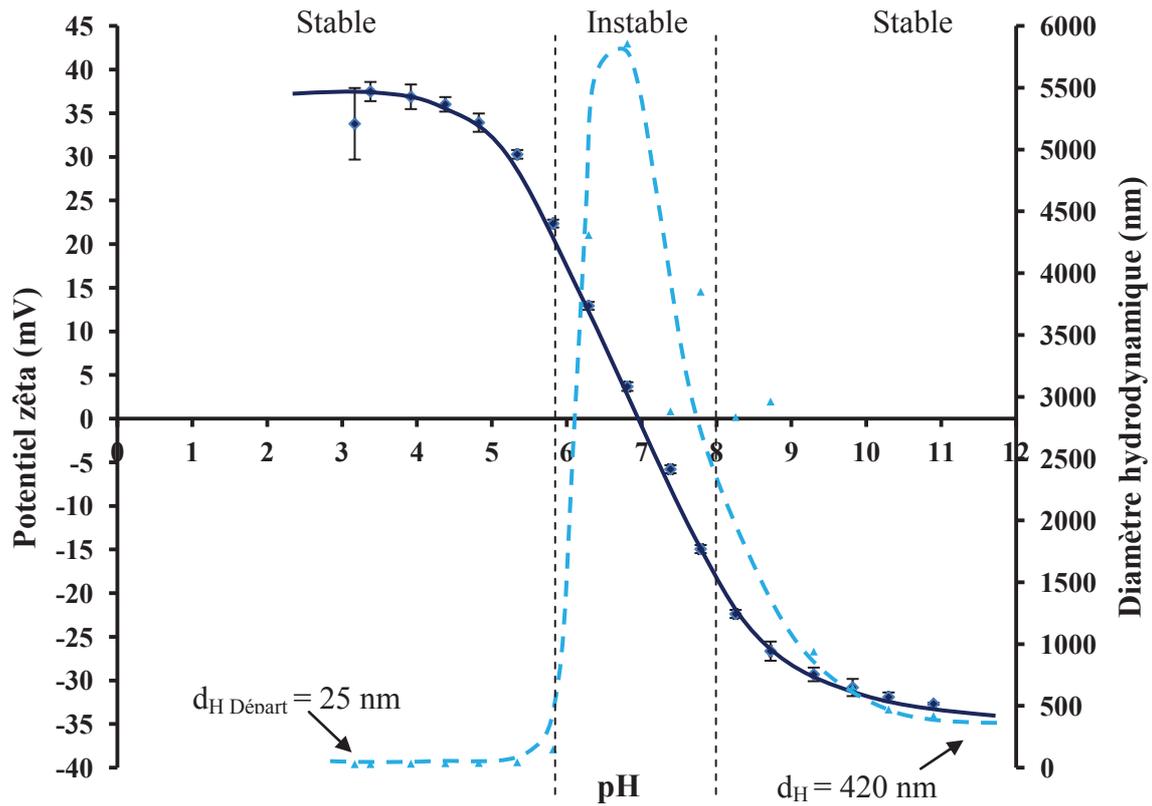


Figure 58. Évolution du potentiel zêta et du diamètre hydrodynamique (en nombre) des nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées dans NaCl ( $10^{-2}$  mol.L $^{-1}$ ) en fonction du pH. La courbe en pointillé représente le diamètre hydrodynamique. Courbes représentatives d'un échantillon.

### II.3 - Conclusion sur la synthèse des oxydes de fer

Pour conclure, la synthèse de nanoparticules par la voie co-précipitation type Massart permet d'obtenir des nanoparticules d'oxydes de fer de structure spinelle avec des tailles de cristallites de l'ordre de dix nanomètres et une taille d'agrégats avoisinant les 20 nanomètres. Ainsi, ces nanoparticules de phase spinelle présentent un comportement superparamagnétique à température ambiante. La composition des nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées est comprise entre celle de la magnétite et de la maghémite avec pour formule chimique  $[\text{Fe}^{3+}]_A[\text{Fe}^{3+}_{1,21} \text{Fe}^{2+}_{0,69} \square_{0,10}]_B \text{O}_4$  où  $\delta$ , la déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène, est égale à 0,035 et  $\eta$  la proportion de Fe (II) par rapport aux cations de Fe (III) est égale à 31% qui correspond à une structure proche de celle de la magnétite.

Cependant, ces nanoparticules d'oxydes ne présentent pas de stabilité dans les conditions du milieu physiologique car leur point isoélectrique est égal à  $7,2 \pm 0,2$ . Une modification de surface sera donc nécessaire en vue des applications biologiques visées.

### III. Création d'un nouveau nanocomposite : les TiONts – SPIO

Cette troisième partie aborde la combinaison des nanoparticules d'oxydes de fer sur les nanotubes de titanate pour combiner leurs propriétés. Ainsi, un nouveau nanovecteur détectable en IRM pourra être élaboré. Tout d'abord, une étude bibliographique présentera le dopage des nanotubes par divers éléments afin d'améliorer leurs propriétés. Puis, la synthèse inorganique pour l'assemblage des deux nanomatériaux sera présentée et enfin l'efficacité en tant qu'agents de contraste en IRM de ce nouveau nanocomposite sera évaluée ainsi que sa toxicité.

#### III.1 - Amélioration des nanotubes de titanate : approche bibliographique

Les nanotubes de titanate ou de  $\text{TiO}_2$  sont très largement utilisés dans le domaine catalytique. Cependant, leur efficacité photocatalytique est limitée par la large bande d'énergie (gap : 3,2 eV pour l'anatase ; 3,0 eV pour le rutile) qui réduit son excitation dans la gamme UV du spectre (Malato *et al.* 2009).

De nombreuses études ont été consacrées à l'amélioration de l'activité photocatalytique des nanotubes de titanate ou de  $\text{TiO}_2$  avec des métaux comme le platine (An *et al.* 2009), le palladium (Mohapatra *et al.* 2008) et l'argent (Yu *et al.* 2009; Xie *et al.* 2010) ou des non métaux ont été utilisés pour renforcer les propriétés des nanotubes comme l'azote (Yang *et al.* 2010), le soufre (Yan *et al.* 2011) et le bore (Lu *et al.* 2007).

De plus, le dépôt d'oxydes métalliques sur des nanotubes a déjà été mis en œuvre par l'association des TiONts ou de  $\text{TiO}_2$  avec l'oxyde d'étain  $\text{SnO}_2$  (Hou *et al.* 2007), l'oxyde de cérium  $\text{CeO}_2$  (Wen *et al.* 2011), l'oxyde de nickel  $\text{NiO}$  (Shrestha *et al.* 2010) ou l'oxyde de cuivre  $\text{Cu}_2\text{O}$  (Li *et al.* 2011) afin d'améliorer les propriétés photocatalytiques des nanotubes.

D'autre part, Liang *et al.* (Liang *et al.* 2010) ont déjà étudié l'assemblage d'oxyde de fer avec des nanotubes d'oxyde de titane par électrodéposition de ces oxydes sur une couche de nanotubes auto-organisée pour donner des propriétés ferromagnétiques à température ambiante aux nanotubes. Ainsi, la plupart des recherches ont été menés sur l'assemblage d'éléments ou d'oxyde sur des nanotubes auto-organisés produits par anodisation (Figure 59).

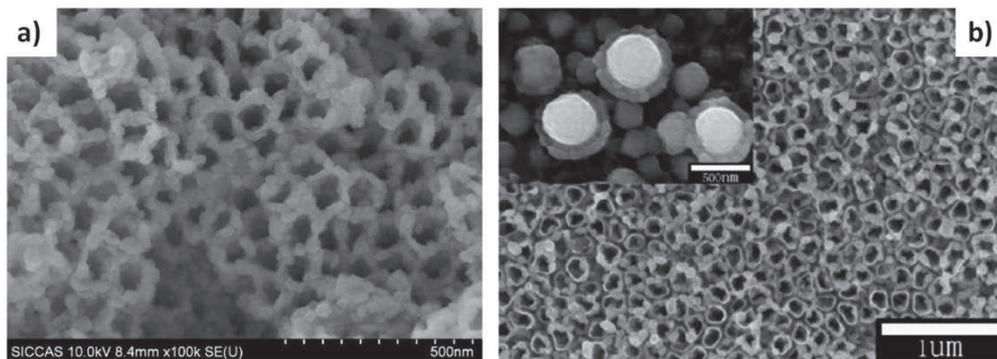


Figure 59. Clichés MET des nanotubes de  $\text{TiO}_2$  avec a) l'oxyde de cérium (Wen *et al.* 2011), b) l'oxyde de fer (Liang *et al.* 2010)

Pour les nanotubes synthétisés par voie hydrothermale, d'autres méthodes existent pour le dopage par des éléments à l'intérieur ou à l'extérieur des TiONts.

Le groupe de Bavykin (Bavykin *et al.* 2006a) utilise la méthode de l'imprégnation pour déposer du platine, du palladium, du ruthénium et de l'or dans les nanotubes. Cette technique consiste à ajouter une solution contenant l'élément sous forme de sel aux nanotubes déjà synthétisés et ensuite à évaporer le solvant (Figure 60).

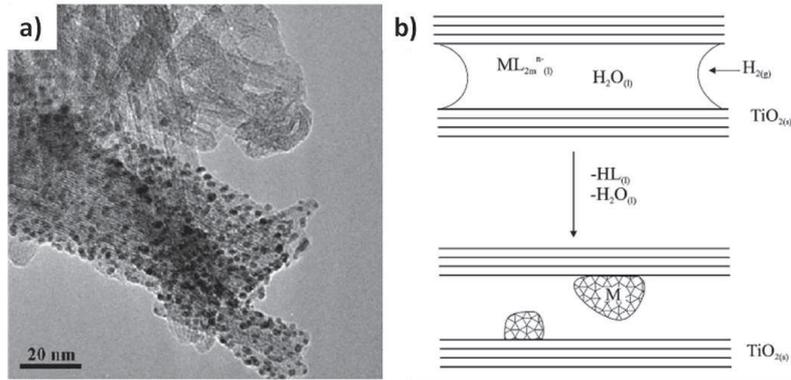


Figure 60. a) Cliché MET des TiONts avec le platine en utilisant  $H_2PtCl_6$ , b) Illustration du procédé de déposition d'un métal dans les pores du nanotube de titanate par imprégnation selon Bavykin et al (Bavykin et al. 2006a)

En revanche, le groupe de Niu (Niu *et al.* 2010) a produit des nanotubes avec des oxydes de fer à la surface de TiONts. La première étape consiste à ajouter une solution de chlorure de fer (II) et (III) dans un rapport massique [1 : 3] à 0,5 g de nanotubes déjà fabriqués sous agitation à 80°C pendant 3h pour former un mélange de nanotubes et de cations ferreux et ferriques. Ensuite, ce mélange est agité et traité aux ultrasons en présence de soude pour ainsi former des nanotubes-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Figure 61).



Figure 61. a) Schéma de fabrication et b) Cliché MET des nanotubes-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> selon (Niu et al. 2010)

Enfin, les compétences développées dans notre équipe pour la synthèse de nanotubes de titanate et de nanoparticules d'oxydes de fer ont permis la fabrication de nanotubes – SPIO. Des nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées par la méthode Massart ont été ajoutées à la suspension de rutile et de soude à 10 mol.L<sup>-1</sup> puis placées dans le réacteur pour un traitement hydrothermal de 150°C pendant 36h (Papa *et al.* 2011). Le résultat est l'obtention de nanotubes associés à des nanoparticules d'oxydes de fer (Figure 62).

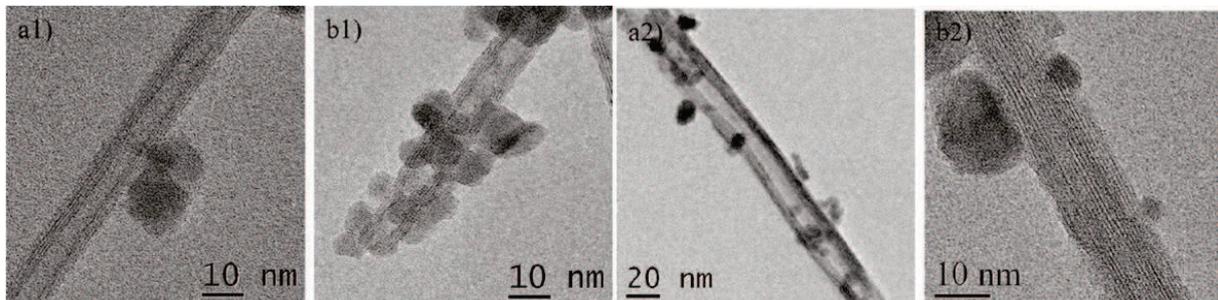


Figure 62. Clichés en microscopie électronique en transmission des TiONts-SPIO réalisés par synthèse hydrothermale selon Papa et al (Papa et al. 2011)

### III.2 - Préparation des TiONts – SPIO : trois approches possibles

L'association de nanotubes avec des SPIO est possible de plusieurs manières : soit en utilisant des TiONts déjà élaborés auxquels l'ajout de sels de fer est réalisé, soit en ajoutant des SPIO déjà synthétisés mis avec le précurseur  $\text{TiO}_2$  pour former les nanotubes, soit en réalisant la synthèse simultanée des deux nanoparticules. Ces trois voies sont décrites dans ce paragraphe. Une approche par voie organique sera quant à elle présentée dans le prochain chapitre.

#### III.2.1 - Protocole des différentes méthodes de synthèse utilisées pour l'association de nanotubes de titanate avec les nanoparticules d'oxydes de fer

##### *III.2.1.1 - 1ère méthode : Synthèse hydrothermale des TiONts en présence de nanoparticules d'oxydes de fer*

La première méthode consiste à faire une synthèse de nanotubes en présence de nanoparticules d'oxydes de fer. La synthèse des TiONts est très délicate car le moindre changement d'un paramètre de synthèse peut déboucher sur l'obtention privilégiée de nanostructures non voulues comme les nanorubans. Ainsi, c'est le même protocole que pour la synthèse de nanotubes seuls qui est appliqué à la différence près qu'un volume  $V$  de suspension de SPIO fonction du ratio  $\text{Fe/Ti}$  est ajouté au mélange soude plus rutile avant le passage aux ultrasons. L'effet de l'acidité de la suspension de SPIO (stockage  $\text{pH} = 3$ ) est négligeable en regard des quantités de soude utilisées ( $10 \text{ mol.L}^{-1}$ ). Ensuite, le mélange est introduit dans le réacteur pour subir le même traitement hydrothermal que pour la synthèse de nanotubes seuls pendant 36 heures à  $155^\circ\text{C}$ . Elle sera notée **TiONts\***.

##### *III.2.1.2 - 2ème méthode : Synthèse par chimie douce des SPIO en présence de nanotubes de titanate*

La deuxième méthode consiste à effectuer une synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer en présence de nanotubes de titanate. Pour cette voie, quelques modifications ont été faites afin d'être dans des conditions les plus proches possibles de la synthèse en réacteur hydrothermal avec notamment un volume de soude qui passe de 800 mL à 110 mL et celui de la solution de sels de fer qui passe de 100 mL à 13,75 mL. Cependant, le rapport molaire fer (II) et fer (III) reste inchangé. Pour rappel, il est de  $\frac{1}{2}$  pour obtenir des nanoparticules de magnétite. Pour ce qui est de l'incorporation des TiONts, deux possibilités ont été exploitées : la première est de les mettre dans la soude et la seconde dans la solution de sels de fer. Cette voie sera nommée **SPIO\***. Si les TiONts sont avec la soude ou avec la solution de fer, la notation sera précisée par respectivement **SPIO\*S** ou **SPIO\*F**.

##### *III.2.1.3 - 3ème méthode : Synthèse hydrothermale simultanée des TiONts et des SPIO*

Le protocole utilisé est le même que celui de la synthèse TiONts\* à ceci près que ce ne sont plus des nanoparticules qui sont additionnées mais une solution de sels de fer (II) et fer (III) avant le traitement aux ultrasons. Une précipitation immédiate des sels de fer est observée au contact de la soude à  $10 \text{ mol.L}^{-1}$  qui se disperse sous l'effet des ultrasons. Cette méthode sera malgré tout appelée **cosynthèse** dans la suite du manuscrit.

Les suspensions de ces trois types de synthèse sont lavées avec le même protocole de lavage que pour la synthèse hydrothermale de TiONts. En effet, un cycle de dialyse puis un

autre d'ultrafiltration sont appliqués à la suspension pour la purifier des ions résiduels et stabiliser son pH à pH neutre.

### III.2.2 - Les différents rapports Fe/Ti testés

En plus des trois chemins explorés pour synthétiser ce nouveau nanomatériau, trois rapports massiques en Fe/Ti vont être examinés : [1 : 0,1], [1 : 2], [1 : 0,5].

#### III.2.2.1 - Le rapport Fe/Ti [1 : 0,1]

Dans le sens de production de nanotubes en présence de nanoparticules d'oxydes de fer (TiONts\*) pour un rapport Fe/Ti [1 : 0,1], il n'y a pas de création de nanotubes lors du traitement hydrothermal (Figure 63a). De même pour la synthèse simultanée des deux nanomatériaux (Figure 63c). En revanche, ces deux voies aboutissent à la création de nanorubans fonctionnalisés par des nanoparticules d'oxydes de fer.

Dans le cas des synthèses de nanoparticules d'oxydes de fer en présence de nanotubes (SPIO\*), il y a tellement peu de nanotubes qu'ils sont noyés dans des agrégats de SPIO et ainsi il y a peu ou pas de nanotubes fonctionnalisés (Figure 63 b). Par conséquent, les synthèses utilisant le rapport Fe/Ti [1 : 0,1] seront abandonnées car elles ne permettent pas l'obtention de nanotubes fonctionnalisés par des SPIO.

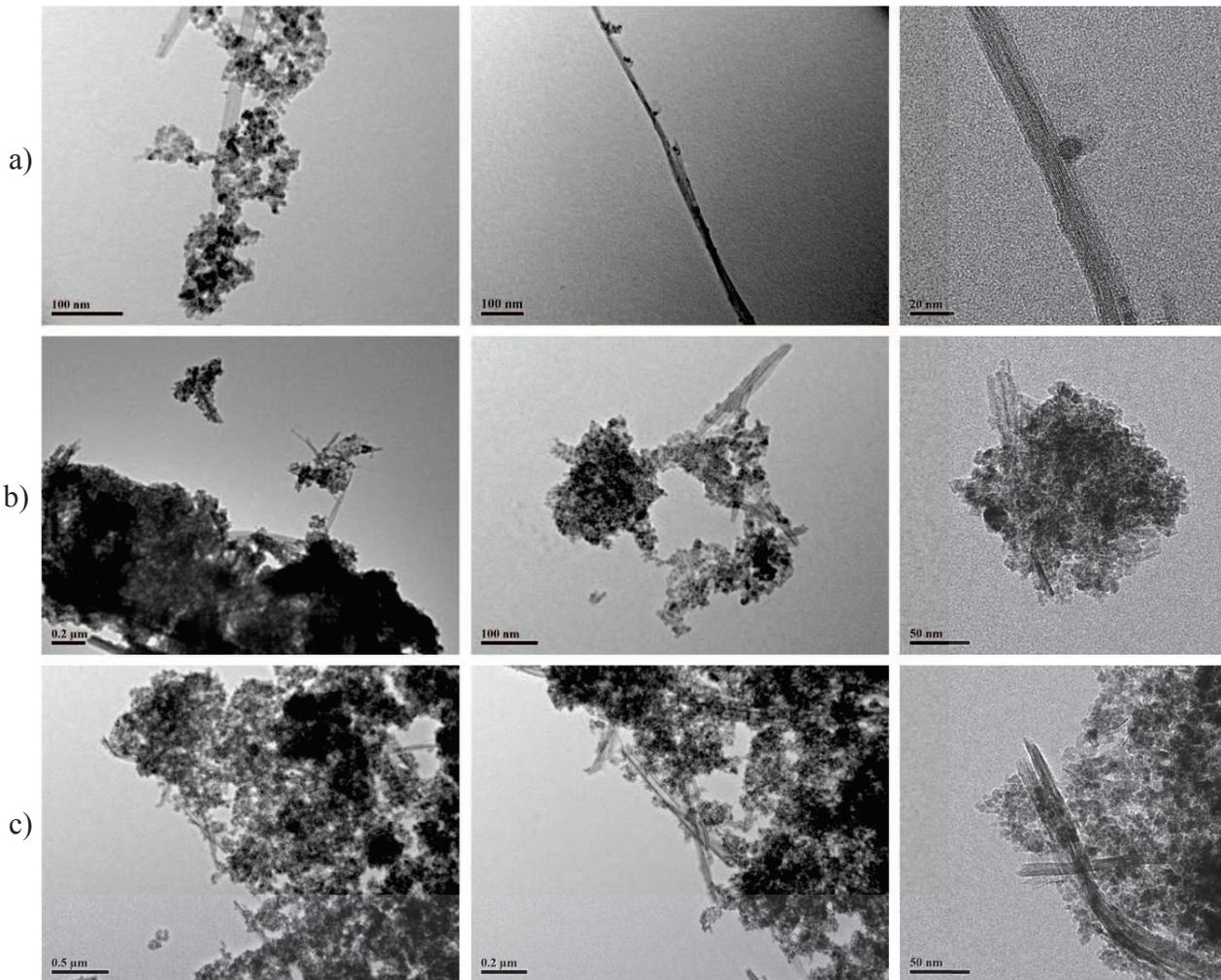


Figure 63. Clichés MET caractéristiques des nanotubes – SPIO synthétisé a) TiONts\*, b) SPIO\* et c) cosynthèse pour le rapport [1 : 0,1]

III.2.2.2 - Le rapport Fe/Ti [1 : 2]

Les approches pour combiner les deux nanomatériaux par les méthodes TiONts\* ou SPIO\* ne permettent pas ou trop peu l'obtention de nanotubes fonctionnalisés par des nanoparticules d'oxydes de fer (Figure 64). Après observation des clichés MET, les deux types de nanoparticules ne se mélangent pas quelle que soit la technique.

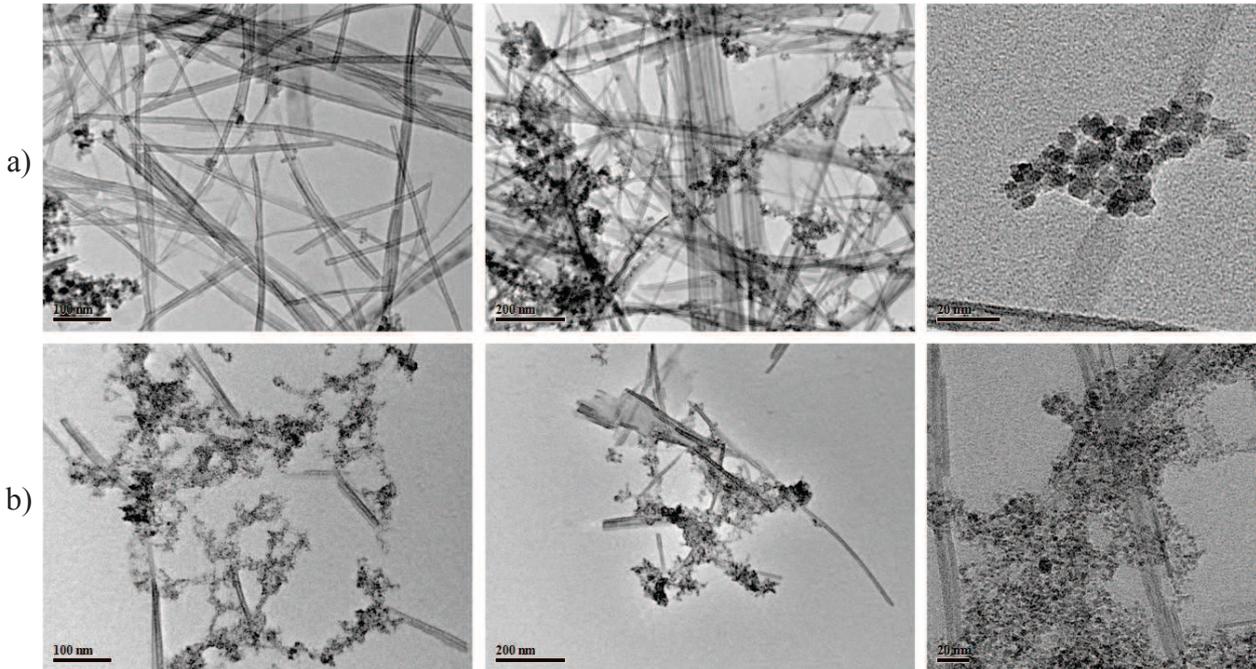


Figure 64. Clichés MET caractéristiques des nanotubes – SPIO synthésés par méthode a) TiONts\* et b) SPIO\* pour le rapport [1 : 2]

Par ailleurs, lors de la synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer en présence de nanotubes de titanate (SPIO\*), une tendance est observable, la diminution de la taille des nanoparticules d'oxydes de fer. Par exemple, lors de la synthèse en présence de nanotubes ajoutés à la solution d'ion fer (SPIO\*F) ou ajoutés à la soude (SPIO\*S), le diamètre calculé par comptage sur 100 nanoparticules est complètement différent. En revanche, lors de la synthèse TiONts\*, aucune tendance significative n'est appréciable. La présence des TiONts lors de la synthèse Massart semble donc favoriser la germination des SPIO.

Synthèse	$d_{\text{MET}}$ (nm)
SPIO	$9 \pm 2$
SPIO*F	$7 \pm 1$
SPIO*S	$4 \pm 1$

Tableau 21. Diamètre moyen des nanoparticules d'oxydes de fer synthésées en présence de nanotubes soit dans la solution d'ion fer ou soit dans la soude pour un rapport Fe/Ti [1 : 2]

La combinaison par la synthèse simultanée de nanotubes de titanate et de nanoparticules d'oxydes de fer permet la production de nanotubes – SPIO. Deux modes d'assemblage sont observés : le premier est l'accrochage des nanoparticules d'oxydes de fer à la surface des TiONts (Figure 65 a). Le second procédé d'assemblage, visible en microscopie électronique en transmission, correspondrait à une incorporation des nanoparticules d'oxydes de fer à l'intérieur de la cavité des nanotubes (Figure 65 b).

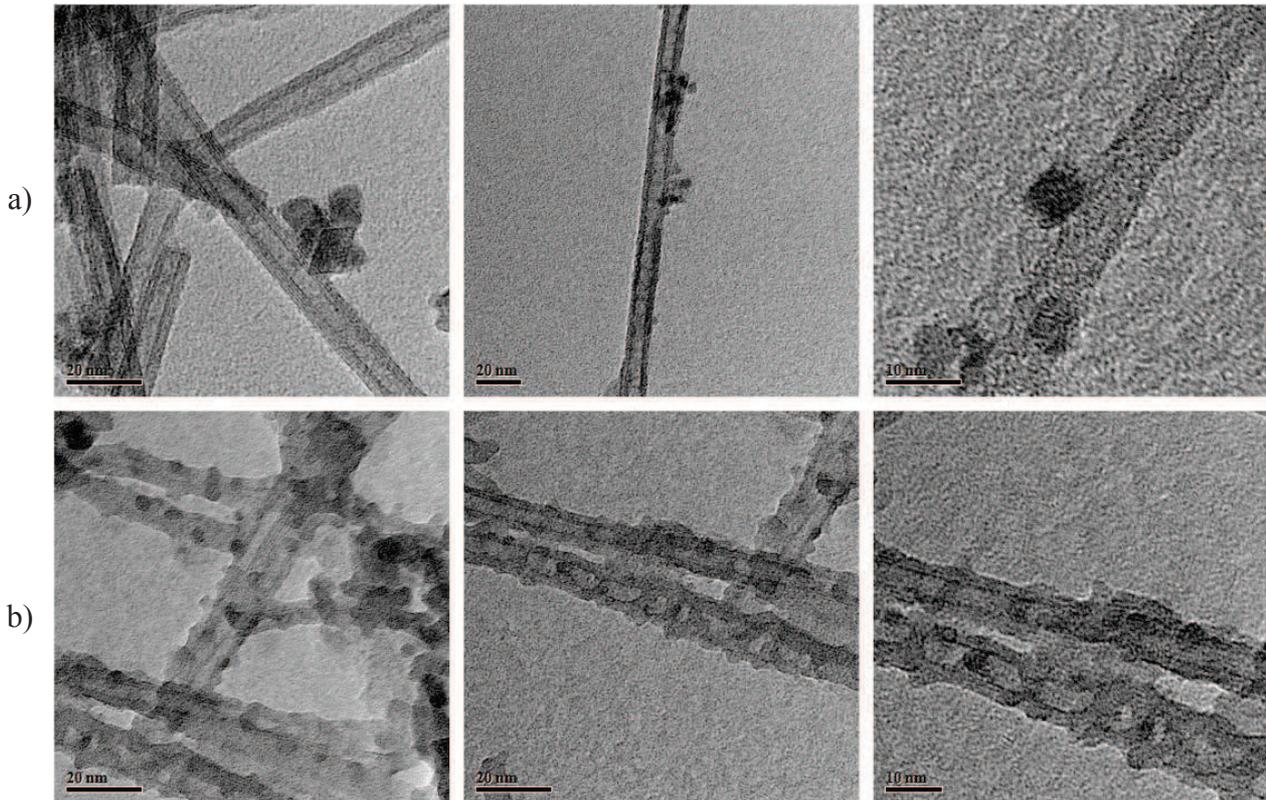


Figure 65. Clichés MET caractéristiques de nanotubes – SPIO synthétisés par cosynthèse dans un rapport [1 :2]. a) Les nanoparticules d'oxydes de fer se trouvent à la surface des nanotubes et b) Les nanoparticules d'oxydes de fer semblent incorporées à l'intérieur et à la surface des nanotubes

### III.2.2.3 - Le rapport Fe/Ti [1 : 0,5]

Le rapport [1 : 0,5] est très intéressant car les trois voies de synthèse permettent de produire des nanotubes associés à des nanoparticules d'oxydes de fer. En effet, la production de TiONts – SPIO est possible avec la méthode TiONts\* (Figure 66). La liaison entre les deux nanomatériaux semble ne s'effectuer qu'à la surface avec des nanoparticules seules ou avec des grappes de nanoparticules d'oxydes de fer.

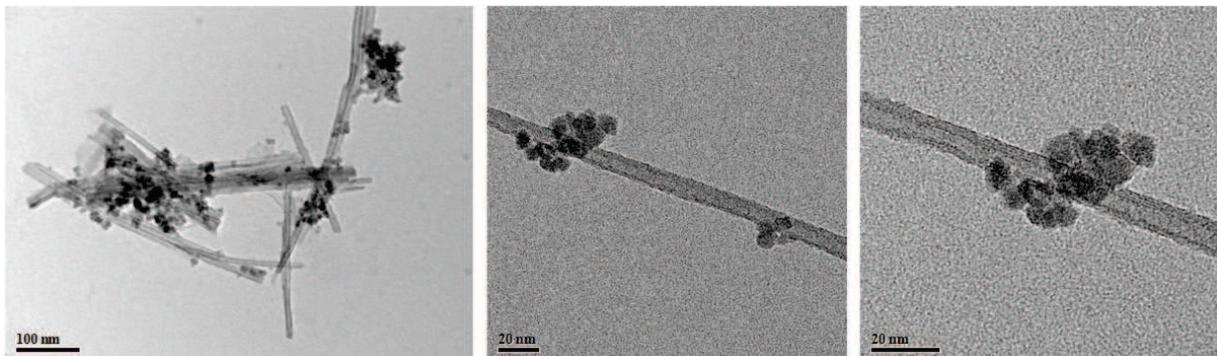


Figure 66. Clichés MET caractéristiques des nanotubes – SPIO synthétisés par la méthode TiONts\* pour le rapport [1 : 0,5]

L'analyse EDS des nanotubes – SPIO confirme la présence de fer et de titane dans la zone analysée (Figure 67). Les nanoparticules accrochées à la surface des nanotubes de titanate sont bien des oxydes de fer.

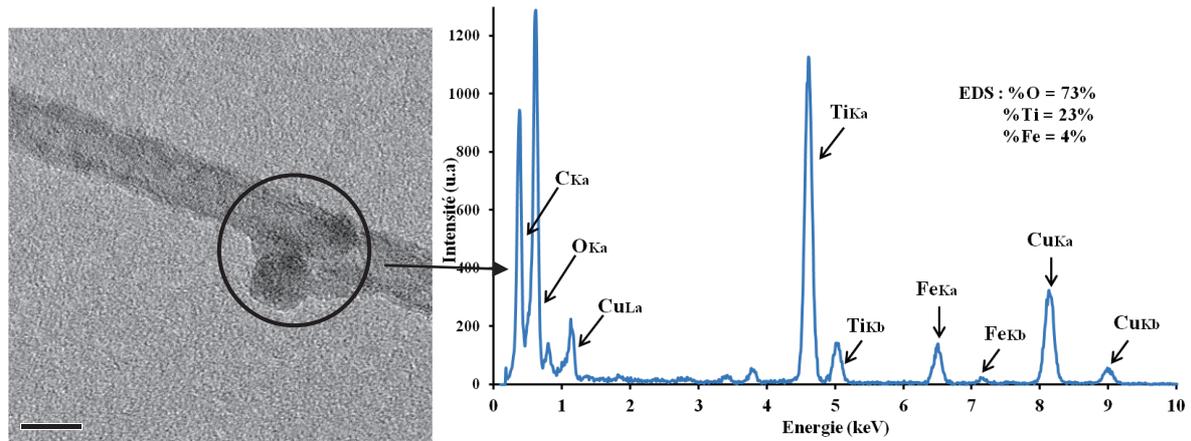


Figure 67. Cliché MET et EDS associée des nanotubes – SPIO synthétisés par la méthode TiONts\*. Le cercle noir représente la zone d'analyse

Avec ce rapport Fe/Ti, la méthode SPIO\* permet de créer des nanotubes associés à des nanoparticules d'oxydes de fer. Par contre, les nanotubes fonctionnalisés sont trop peu nombreux. En effet, il reste aussi des nanotubes non modifiés par les SPIO et des nanoparticules d'oxydes de fer libres en grandes quantités (Figure 68).

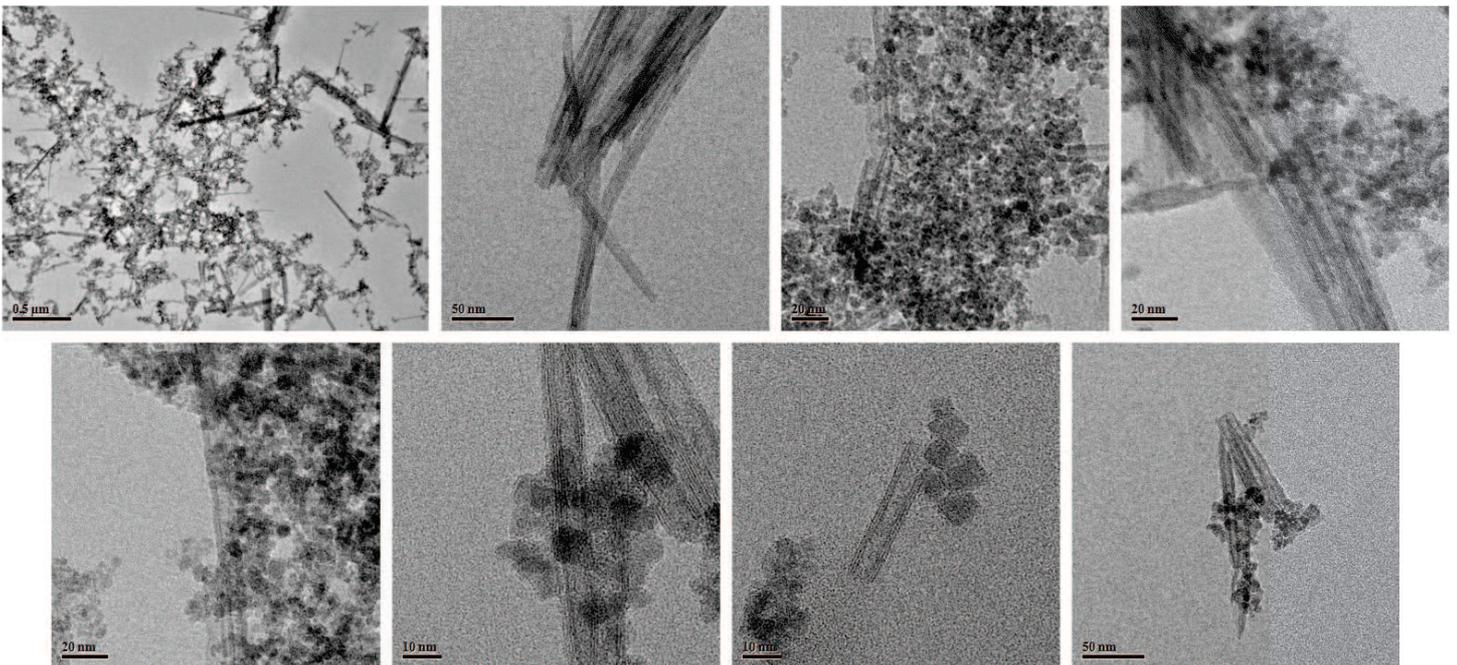


Figure 68. Clichés MET caractéristiques des nanotubes – SPIO synthétisés par méthode SPIO\* pour le rapport [1 : 0,5]

De même que pour le précédent rapport, la diminution de la taille des SPIO est observable en microscopie électronique en transmission mais dans une moindre mesure. En effet, la taille des nanoparticules diminue fortement lorsqu'il y a plus de nanotubes présents au cours de la synthèse (cf. Tableau 21). Ainsi pour le rapport [1 : 0,5], le diamètre des nanoparticules est moins diminué en comparaison avec la synthèse de référence type Massart.

Le comptage a été effectué sur 100 nanoparticules (Tableau 22). En revanche, pour les nanotubes aucunes tendances ne semblent se dégager. La présence des nanotubes ou le changement de conditions limitent la taille des nanoparticules d'oxydes de fer.

Synthèse	$d_{MET}$ (nm)
SPIO	$9 \pm 2$
SPIO*F	$7 \pm 2$
SPIO*S	$7 \pm 1$

Tableau 22. Diamètre moyen des nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées en présence de nanotubes soit dans la solution d'ion fer ou soit dans la soude pour un rapport Fe/Ti [1 :0,5]

La méthode par cosynthèse permet d'obtenir des nanotubes – SPIO. Contrairement au rapport [1 : 2], l'association des deux nanomatériaux ne s'effectue que sur la surface des nanotubes (Figure 69).

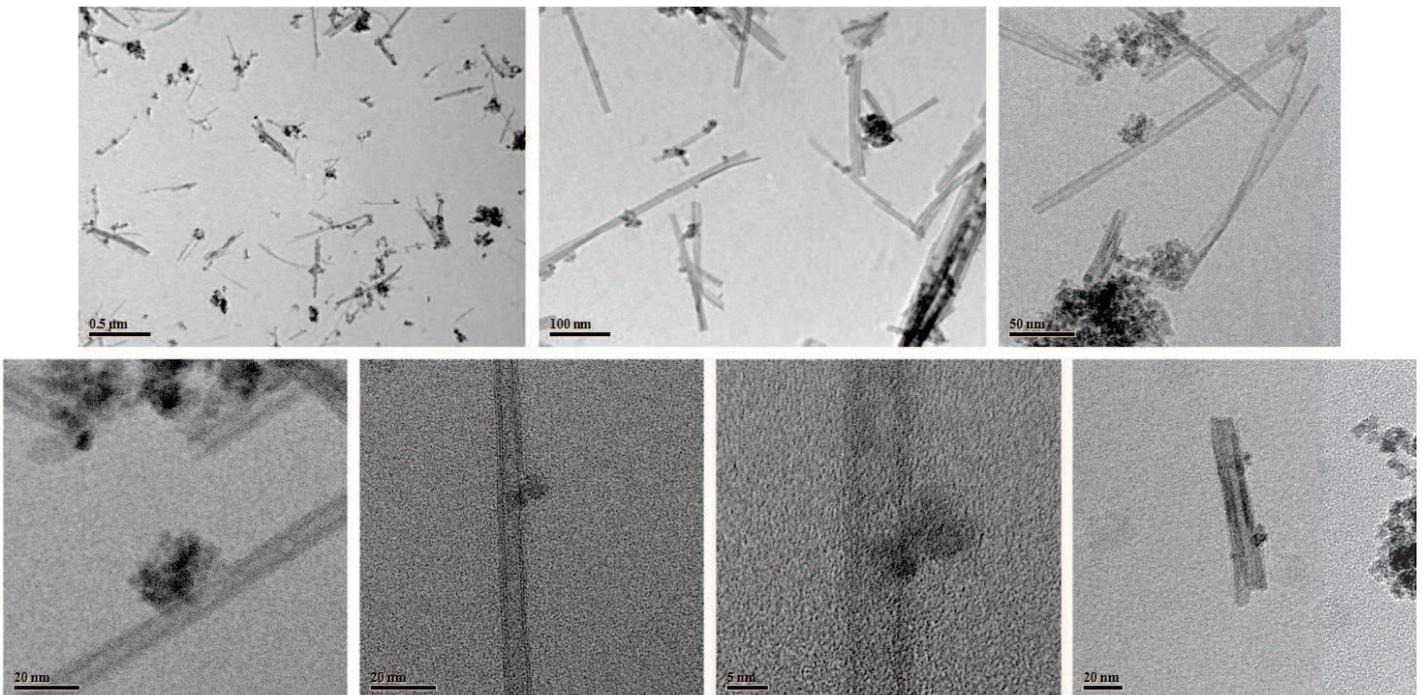


Figure 69. Clichés MET des nanotubes – SPIO synthétisés par cosynthèse pour le rapport [1 : 0,5]

#### III.2.2.4 - Autres essais de synthèse des nanotubes – SPIO

D'autres tests ont été effectués pour essayer de combiner les deux nanomatériaux, par exemple, la méthode par TiONts\* avec un rapport [1 : 5], ou encore la méthode SPIO\* en mélangeant les nanotubes avec la solution d'ions ferrique et ferreux pendant 24h avec un rapport [1 : 0,5]. Par ailleurs, un essai par voie hydrothermale avec comme précurseur de départ des nanotubes de titanate et des nanoparticules préalablement synthétisés a été aussi effectué avec un rapport Fe/Ti de [1 : 0,5]. Ces trois tests ne permettent pas ou peu la fabrication de nanotubes fonctionnalisés par des nanoparticules d'oxydes de fer (Figure 70).

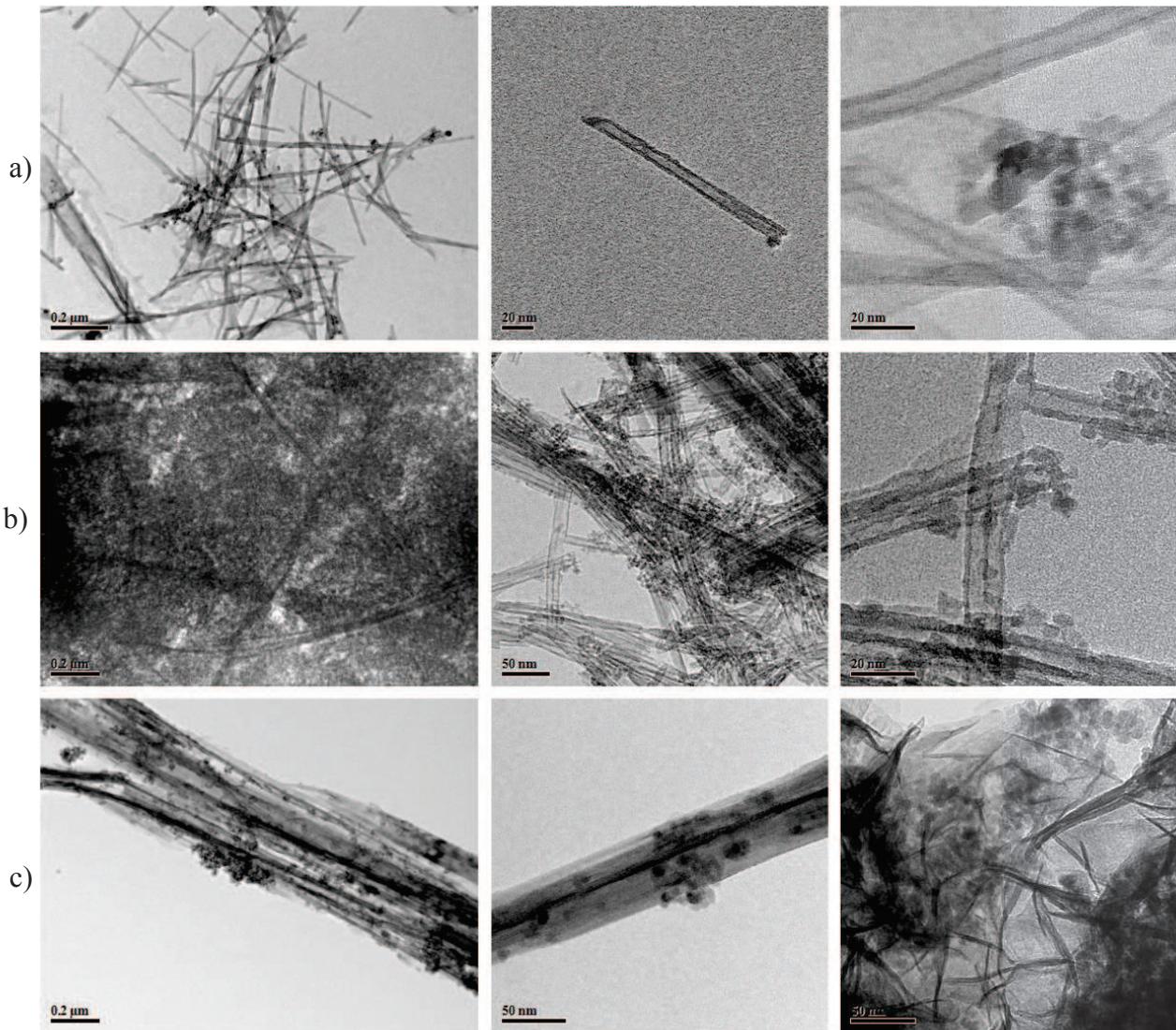


Figure 70. Clichés MET des trois tests a) TiONts\* avec un rapport [1 : 5], b) SPIO\* en mélangeant les nanotubes et les ions fer pendant 24h avec un rapport [1 : 0,5] et c) cosynthèse à partir de TiONts et de SPIO préalablement synthétisés avec un rapport [1 : 0,5]

### III.2.2.5 - Bilan des synthèses des nanotubes – SPIO

Pour conclure, les trois méthodes proposées permettent l'obtention de nanotubes fonctionnalisés par des nanoparticules d'oxydes de fer pour les rapports Fe/Ti [1 : 2] et [1 : 0,5]. En particulier, la méthode par cosynthèse permet en plus grand nombre la création de nanotubes – SPIO avec des accroches simultanées à la surface des TiONts et dans la cavité pour un rapport [1 : 2] (Figure 65).

À l'inverse, la méthode de synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer en présence de nanotubes (SPIO\*) ne permet que pour le rapport [1 : 0,5] la création de TiONts – SPIO mais dans des proportions trop marginales ne reflétant pas l'échantillon. Il reste beaucoup de nanoparticules d'oxydes de fer agglomérées entre elles et donc non fonctionnalisées avec les nanotubes.

En revanche, la méthode en partant de la synthèse hydrothermale de nanotubes (TiONts\*) permet l'obtention de nanotubes fonctionnalisés par des nanoparticules d'oxydes de fer plus spécialement pour le rapport [1 : 0,5] (Figure 68).

Contrairement aux autres rapports, le rapport [1 :0,1] ne permet dans aucun cas d'obtenir des nanotubes fonctionnalisés par des nanoparticules d'oxydes de fer mais plutôt des nanorubans marqués par des SPIO (Figure 63 a).

Le Tableau 23 regroupe les résultats pour tous les tests effectués pour l'association des nanotubes de titanate avec les nanoparticules d'oxydes de fer.

Méthodes		Résultats
TiONts*	Rapport Fe/Ti [1 : 0,1]	Nanorubans accrochés par SPIO
	Rapport Fe/Ti [1 : 2]	Peu de nanotubes accrochés par SPIO
	Rapport Fe/Ti [1 : 0,5]	Assemblage TiONts – SPIO réussi
	Rapport Fe/Ti [1 : 5]	Peu de nanotubes accrochés par SPIO
SPIO*	Rapport Fe/Ti [1 : 0,1]	Nanorubans accrochés par SPIO
	Rapport Fe/Ti [1 : 2]	Peu ou pas de nanotubes accrochés par SPIO Diminution de la taille des nanoparticules d'oxydes de fer
	Rapport Fe/Ti [1 : 0,5]	Peu ou pas de nanotubes accrochés par SPIO
	Rapport Fe/Ti [1 : 0,5] 24h	Peu ou pas de nanotubes accrochés par SPIO
Cosynthèse	Rapport Fe/Ti [1 : 0,1]	nanorubans accrochés par SPIO
	Rapport Fe/Ti [1 : 2]	Assemblage TiONts – SPIO réussi 2 accroches possibles : surface ou à l'intérieur
	Rapport Fe/Ti [1 : 0,5]	Assemblage TiONts – SPIO réussi
	Rapport Fe/Ti [1 : 0,5] avec TiONts et SPIO	Nanorubans et nanofeuilles accrochés par SPIO

Tableau 23. Récapitulatif des synthèses réalisées pour l'assemblage des nanoparticules d'oxydes de fer avec les nanotubes de titanate

Seulement, trois synthèses seront retenues pour purification car celles-ci montrent en microscopie en transmission le plus de nanotubes fonctionnalisés par les nanoparticules d'oxydes de fer :

- TiONts\* [1 : 0,5]
- Cosynthèse [1 : 0,5]
- Cosynthèse [1 : 2]

Ces trois lots seront avant la suite des caractérisations purifiés par décantation magnétique, la seule technique, que nous avons trouvée, capable de séparer des nanoparticules d'oxydes de fer magnétiques, des nanotubes libres. L'aimant est laissé une heure pour attirer le maximum de nanoparticules d'oxydes de fer libres et pour laisser décanter les nanotubes non accrochés qui sont instables en milieu aqueux (Figure 71). Les nanotubes associés à des nanoparticules d'oxydes de fer sont moins magnétiques et sont donc attirés moins rapidement par l'aimant. Après une heure, le surnageant est retiré pour être stocké séparément de l'agglomérat crée par l'aimant, composé en majorité de nanoparticules d'oxydes de fer en (Figure 72 a), en prenant soin de ne pas récupérer le culot du fond qui est constitué principalement de nanotubes non marqués et d'impuretés (nanorubans, nanofeuilles, (Figure 72 b). C'est ce surnageant qui doit majoritairement contenir les nanocomposites nanotubes SPIO.

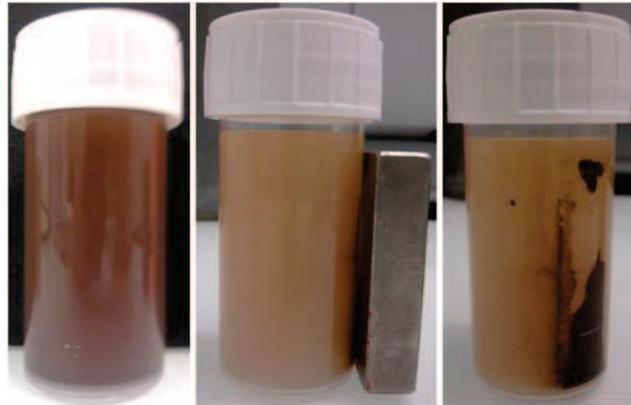


Figure 71. Purification par décantation magnétique des nanotubes – SPIO

Des analyses XPS ont été réalisées sur les composés avant et après purification (Tableau 24). La concentration atomique en fer et en titane est sensiblement la même pour toutes les méthodes de synthèse. Après purification, la concentration en fer et en titane évolue peu malgré la décantation magnétique. Cela laisse penser que l'association des TiONts et des SPIO se fait dans des proportions de ces deux composés représentatives du mélange de départ.

		Concentration atomique (%)					$\frac{Fe}{Ti}$
		C 1s	O 1s	Na KLL	Ti 2p	Fe 2p	
TiONts* [1 : 0,5]	avant	11	57	6	12	13	1,08
	purifiée	9	58	8	13	12	0,92
Cosynthèse [1 : 0,5]	avant	12	58	2	11	15	1,36
	purifiée	9	60	2	13	16	1,23
Cosynthèse [1 : 2]	avant	8	58	10	16	8	0,5
	purifiée	6	59	10	14	11	0,79

Tableau 24. Concentration atomique (%) déterminée par XPS des nanotubes – SPIO avant et après purification par décantation magnétique

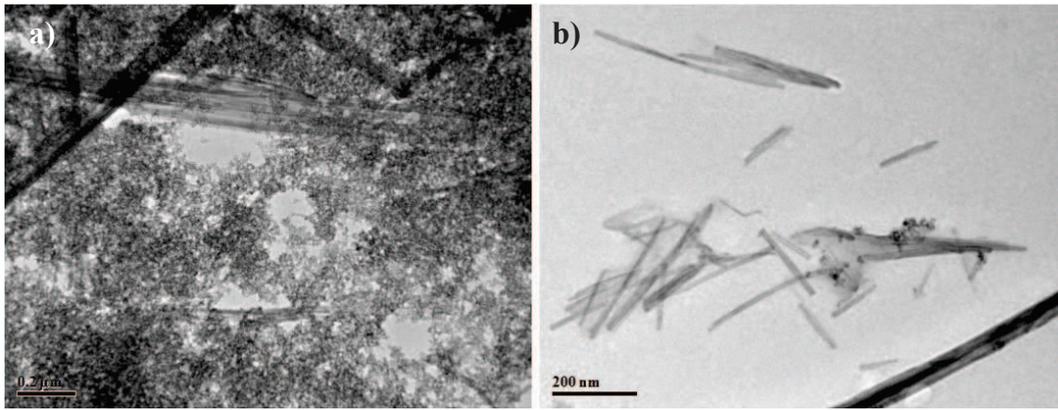


Figure 72. Clichés MET a) agglomérat causé par l'aimant et b) culot après décantation magnétique

### III.2.3 - Quels types d'accroches entre les nanotubes de titanate et les nanoparticules d'oxydes de fer ?

Dans les travaux de Papa *et al* (Papa *et al.* 2011), les auteurs concluent que la liaison entre les deux nanoparticules n'est pas électrostatique après observation d'un échantillon à pH =10 en microscopie électronique en transmission. En effet, à pH =10, d'après leurs courbes de potentiel zêta (Figure 73 a), les deux nanoparticules sont chargées de la même façon et devraient donc se repousser. Or, les auteurs observent bien des nanotubes fonctionnalisés par des nanoparticules d'oxydes de fer (Figure 73 b). Ainsi, le lien entre les deux nanoparticules n'est pas électrostatique et semble bien plus résistant.

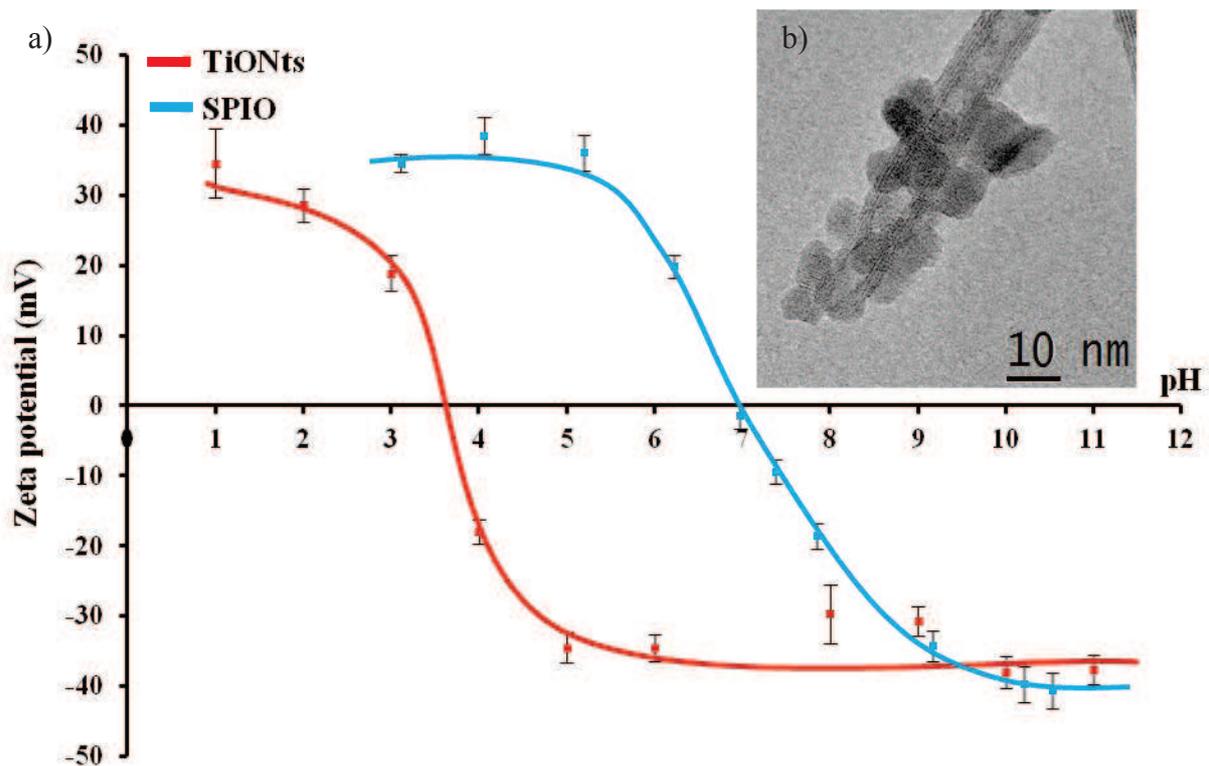


Figure 73. a) Potentiel zêta des nanotubes de titanate et des nanoparticules d'oxydes de fer et b) Cliché MET des nanotubes – SPIO à pH =10 d'après Papa *et al.* (Papa *et al.* 2011)

Si la liaison n'est pas électrostatique, elle pourrait être de nature covalente. La liaison possible entre les nanoparticules d'oxydes de fer et des nanotubes peut être Fe – O – Ti. L'observation de cette liaison en XPS apporterait une preuve concrète pour confirmer cette hypothèse. Après décomposition du niveau 1s de l'oxygène, quatre composantes apparaissent. Les composantes classiques des nanotubes : (Figure 74)

- à 529,8 eV, la composante du réseau oxygène O<sup>2-</sup> ;
- à 531,2 eV, la composante des hydroxyles de surface OH<sup>-</sup> ;

Pour obtenir une simulation correcte et fiable lors de la décomposition, les largeurs à mi-hauteur des ces deux composantes ont été fixées par rapport à celles des TiONts soit respectivement 1,5 et 1,7 eV pour les composantes O<sup>2-</sup> et OH. À 535 eV correspond la raie des électrons Auger du Sodium. **La dernière composante située à 532,6 eV pourrait être attribué à la liaison Fe – O – Ti** (Figure 74).

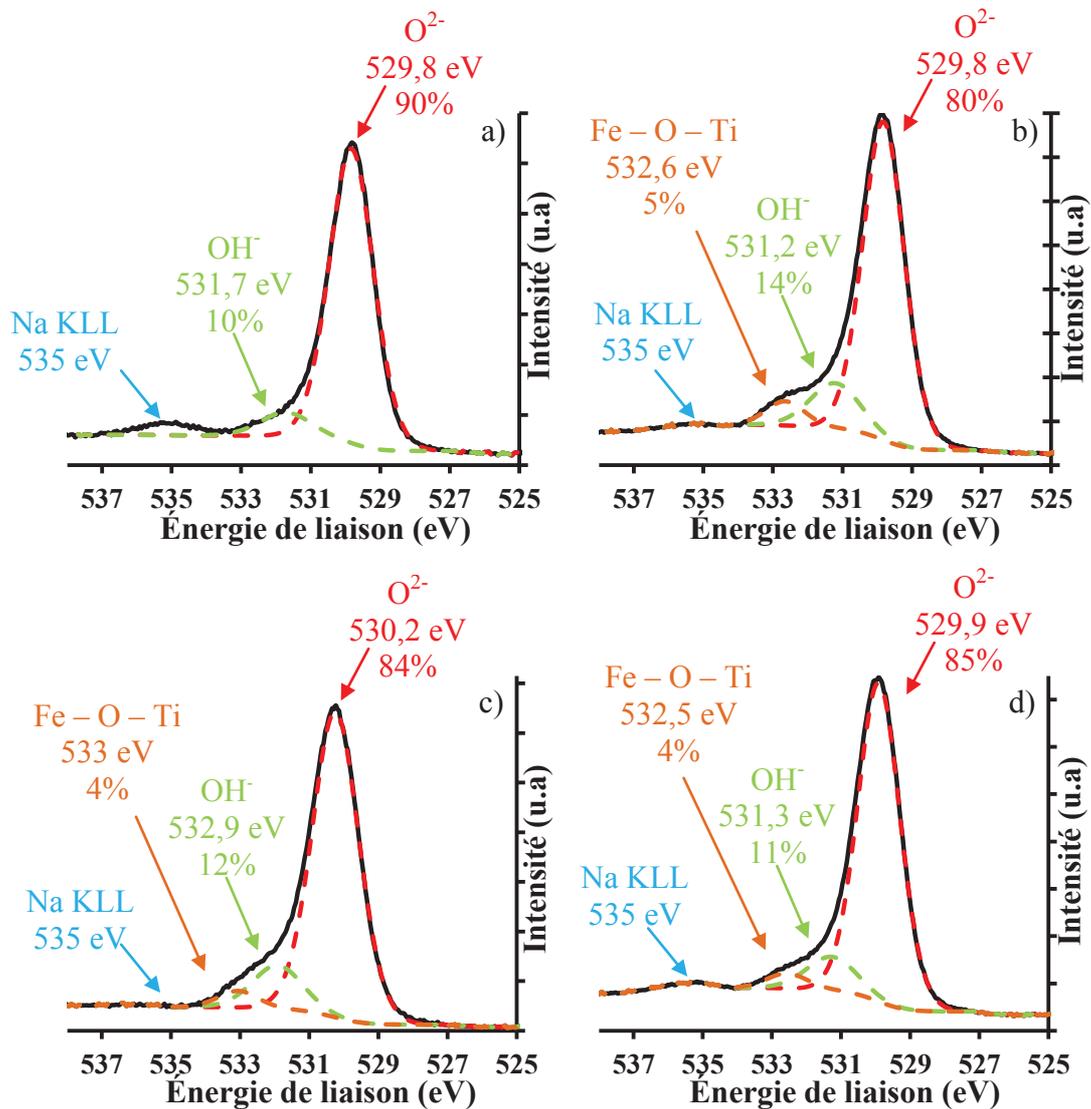


Figure 74. Analyse XPS : niveau O1s et ses composantes a) des nanotubes de titanate et des nanotubes – SPIO b) TiONts\*[1 : 0,5], c) cosynthèse [1 : 0,5] et d) cosynthèse [1 : 2]

Dans la littérature, cette liaison n'est pas mise en évidence pour des composés comparables aux nanotubes – SPIO comme des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> dopée au fer. Les travaux de Nagaveni (Nagaveni *et al.* 2004) attribuent le pic vers 532,5 eV comme étant le pic correspondant aux hydroxyles de surface pour des nanoparticules de TiO<sub>2</sub>. Généralement, le

pic des hydroxyles de surface des TiONts est localisé vers 531 eV (Papa *et al.* 2009). D'autres travaux comme ceux d'Abazović (Abazović *et al.* 2009) ne concluent pas quant-à la présence de la liaison Fe – O – Ti. Les auteurs affirment que le pic situé aux alentours de 532,5 eV peut correspondre soit aux hydroxyles de surface ou soit à la présence de fer qui influence le réseau du TiO<sub>2</sub>.

Dans le cas des nanotubes – SPIO, la composante située vers 532,5 eV peut être considérée comme la résultante de la liaison Fe – O –Ti car les hydroxyles de surface des nanotubes ou des SPIO se situent aux alentours de 531,5 eV. La question de l'eau a déjà été traitée auparavant et sa composante se localise vers 535 eV et est négligeable dans notre cas (paragraphe I.222 – Analyse structurale et composition chimique des TiONts).

Le Tableau 25 regroupe les positions et les largeurs à mi-hauteurs des composantes du niveau 1s de l'oxygène pour les nanotubes de titanate et les nanotubes – SPIO.

	Composante	Position (eV)	FWHM (eV)
TiONts	O <sup>2-</sup>	529,8	1,5
	OH <sup>-</sup>	531,7	1,7
TiONts* [1 : 0,5]	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	529,8	1,4
	OH <sup>-</sup>	531,2	1,7
	Fe – O – Ti	532,6	1,3
Cosynthèse [1 : 0,5]	O <sup>2-</sup>	530,4	1,6
	OH <sup>-</sup>	532,1	1,7
	Fe – O – Ti	533,2	1,3
Cosynthèse [1 : 2]	O <sup>2-</sup>	529,9	1,4
	OH <sup>-</sup>	531,3	1,7
	Fe – O – Ti	532,6	1,4

Tableau 25. Caractéristiques des composantes du niveau O1s des nanotubes de titanate et des nanotubes – SPIO synthétisés par les différentes voies

### III.2.4 - Stabilité en suspension des nanotubes – SPIO

Les nanotubes – SPIO sont destinés à l'injection *in vivo* alors il est essentiel de déterminer leur domaine de stabilité (Figure 75). Ainsi, le point isoélectrique de l'échantillon TiONts – SPIO cosynthèse [1 : 2] est à pH = 3,8. Les valeurs des PIE des autres échantillons sont proches et regroupés dans la Figure 76. A pH physiologique, la suspension de TiONts – SPIO est stable (Figure 76).

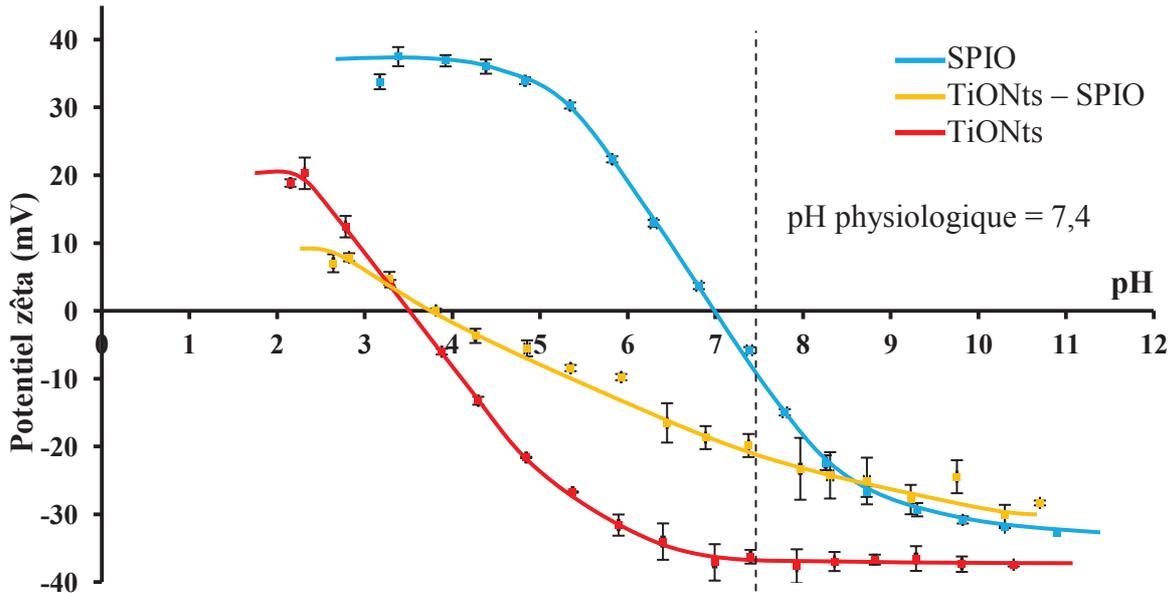


Figure 75. Comparaison des courbes de potentiel zêta des nanotubes – SPIO dans le cas de la cosynthèse [1:2] par rapport aux TiONts et SPIO dans NaCl ( $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ ) en fonction du pH. La courbe TiONts – SPIO est quasi-similaire pour les trois voies de synthèses. Courbes représentatives d'un échantillon.



b)

	PIE	$\zeta$ à pH = 7,4 (mV)
<b>TiONts* [1 : 0,5]</b>	3,5 ± n.d.	-27 ± 2
<b>cosynthèse [1 : 0,5]</b>	3,2 ± n.d.	-28 ± 2
<b>cosynthèse [1 : 2]</b>	3,8 ± n.d.	-22 ± 4

Figure 76. a) Suspension des TiONts – SPIO cosynthèse [1 : 0,5] à pH physiologique et b) récapitulatif des points isoélectrique des trois synthèses de TiONts – SPIO. n.d. non déterminé car il n'y avait pas assez de valeurs pour être représentatif.

### III.3 - Efficacité en tant qu'agent de contraste en IRM de ce nouveau nanocomposite

#### III.3.1 - Hystérésimétrie

Les propriétés magnétiques ont été mesurées sur les poudres synthétisées de nanotubes fonctionnalisés par les nanoparticules d'oxydes de fer (Figure 77). Les mesures ont été réalisées à la température de l'azote liquide (77 K). Les valeurs de l'aimantation rémanente et des champs coercitifs sont très faibles soulignant que les nanoparticules d'oxydes de fer restent bien superparamagnétiques à température ambiante après accroche sur les nanotubes de titanate rendant de ce fait le nouveau nanocomposite superparamagnétique à température ambiante.

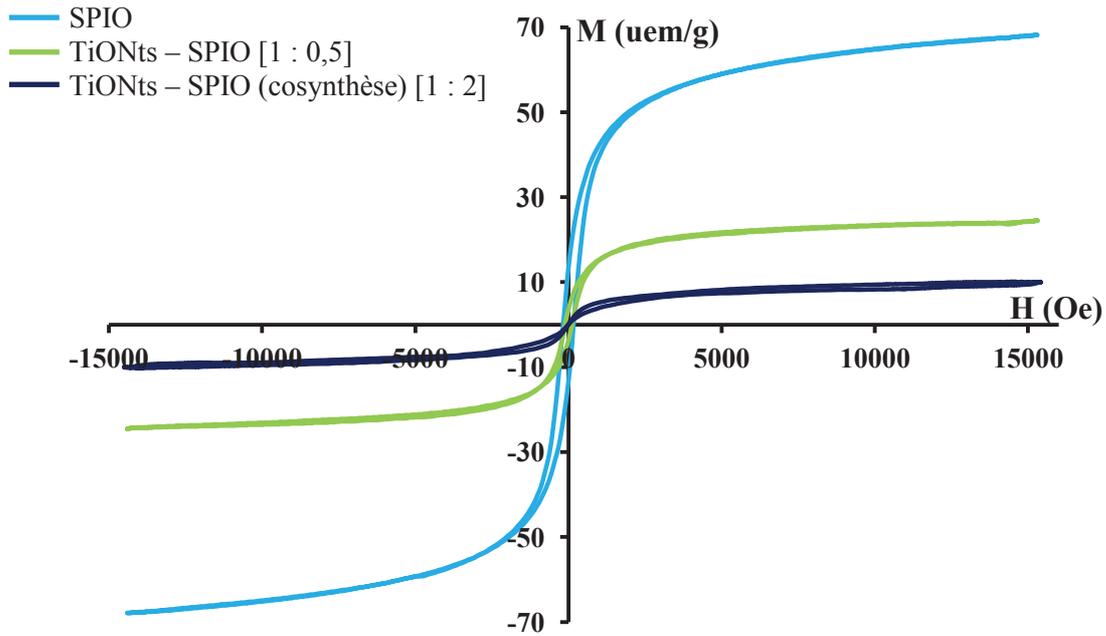


Figure 77. Cycle d'hystérésis à 77 K des nanoparticules d'oxydes de fer seules (SPIO) et des synthèses TiONts – SPIO avec un rapport [1 : 0,5] et (cosynthèse) [1 : 2]. Tracé par gramme de nanocomposite. La courbe TiONts – SPIO [1 : 0,5] représente les deux voies de synthèse (TiONts\* et cosynthèse) pour ce même rapport, car ces deux courbes se superposent quasi parfaitement

La valeur de l'aimantation des SPIO est de 68 uem/g. Dans le cas des nanotubes associés aux nanoparticules d'oxydes de fer, la valeur de l'aimantation à saturation est plus faible car cette valeur est ramenée par masse de nanocomposite, prenant donc en compte des nanoparticules non magnétiques, les nanotubes de titanate. Seulement l'oxyde de fer est magnétique et participe à la mesure. Alors, il est possible d'estimer un taux de fer (en % massique) contenu dans les nanotubes associés aux nanoparticules d'oxydes de fer par rapport à la valeur de l'aimantation à saturation des SPIO à 77 K (Joumaa *et al.* 2008). Ainsi, pour les nanoparticules d'oxydes de fer seules, la valeur de l'aimantation est de 68 uem/g correspondant à un taux de fer de 100 % car ce nanomatériau n'est composé que de nanoparticules d'oxydes de fer. En revanche, pour la cosynthèse avec un rapport [1 : 2], la valeur est de 10 uem/g correspondant à 15% de fer. Donc, ce nanocomposite est composé en masse de 15 % de nanoparticules d'oxydes de fer et 85% de nanotubes de titanate. Les valeurs de l'aimantation à saturation ainsi que leur correspondance en taux de fer sont regroupées dans le Tableau 26.

	Ms (uem/g)		Taux de fer (% massique)	
	avant purification	après purification	avant purification	après purification
SPIO	68	-	100	-
TiONts-SPIO (TiONts*) [1 : 0,5]	24	20	36	30
TiONts-SPIO (cosynthèse) [1 : 0,5]	25	22	37	32
TiONts-SPIO (cosynthèse) [1 : 2]	10	12	15	17

Tableau 26. Aimantation à saturation (Ms) et du taux de fer des SPIO et des TiONts – SPIO avec un rapport [1 : 0,5] et [1 : 2]

Les synthèses avec un rapport [1 : 0,5] ont la même aimantation à saturation et donc le même taux de fer. Pour le rapport [1 : 2], moins de fer est engagé donc l'aimantation à saturation est plus faible dans ce cas que lors des synthèses avec un rapport [1 : 0,5] et ainsi, le taux de fer est plus faible. De même que déjà observé en XPS (Tableau 24), les proportions Fe/Ti sont peu changées, avant et après purification.

### III.3.2 - Mesure de la relaxivité via l'IRM clinique du CHU de Dijon

En premier lieu, pour juger de leur capacité contrastante en imagerie, les nanotubes – SPIO ont été évalués en imagerie par résonance magnétique (IRM). Leurs relaxivités sont mesurées dans un appareil clinique de 3T au centre hospitalier universitaire de Dijon permettant de travailler dans les mêmes conditions que pour les études *in vivo*.

Habituellement, les oxydes de fer diminuent l'intensité des signaux en IRM (Mornet *et al.* 2006). Ce phénomène, appelé « contraste négatif », diminue le temps de relaxation  $T_2$  et est apprécié par la relaxivité  $r_2$ , le pouvoir contrastant mesuré en  $L.mmol_{Fe}^{-1}.s^{-1}$ . Plus la valeur de la relaxivité est élevée plus important sera l'effet contrastant négatif. D'autre part, des études admettent que des nanoparticules de très petites tailles peuvent avoir un effet contrastant positif  $T_1$  déterminé par sa relaxivité  $r_1$  (Tromsdorf *et al.* 2009).

#### III.3.2.1 - Préparation des gels

Pour mesurer les relaxivités des nanoparticules d'oxydes de fer en imagerie par résonance magnétique, il faut que les suspensions soient bien homogènes. Un gel à base d'acrylamide a été choisi pour éviter tout phénomène de décantation. La concentration volumique en acrylamide choisie est de 4,5% (Maurizi 2010).

La réaction de gélification est une polymérisation radicalaire du monomère d'acrylamide :  $CH_2=CH-CO-NH_2$ . Cette polymérisation a été déclenchée par du persulfate d'ammonium (PSA) permettant de former des radicaux libres à partir du monomère. Cette réaction est entretenue et accélérée par le TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine).

Pour un échantillon, une série de six concentrations en nanocomposite de 1, 3, 5, 7, 10 et de 20  $mg.L^{-1}$  est préparée et est répétée trois fois soit au total 18 tubes contenant les nanoparticules piégées dans le gel d'acrylamide. Les TiONts – SPIO ont été ajoutés à la solution d'acrylamide, la réaction a été amorcée par 15  $\mu L$  de TEMED et 20  $\mu L$  d'une solution de PSA (10% massique). Les gels sont ensuite placés à 60°C pendant 10 minutes. Après cette étape les gels sont formés et homogènes (Figure 78).

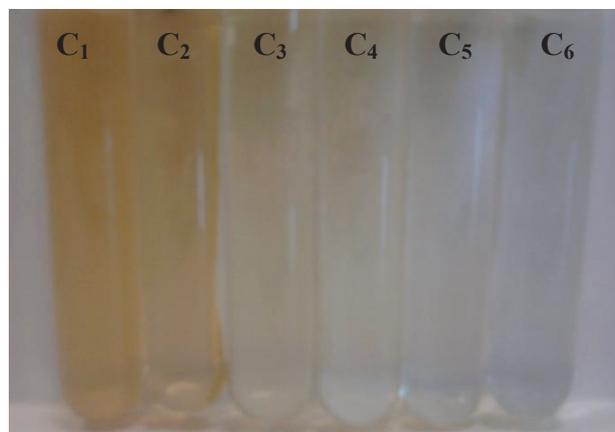


Figure 78. Photographies des nanoparticules piégées dans des gels d'acrylamide pour les six concentrations choisies.

III.3.2.2 - Les relaxivités mesurées sur les gels

Les tubes contenant le mélange de nanoparticules piégées dans le gel d'acrylamide sont analysés grâce à l'IRM clinique à 32 temps d'échos  $T_E$  différents allant de 8,5 à 272 ms avec un pas de 8,5 ms pour un temps de relaxation  $T_2$ . Plus le temps d'écho sera élevé, plus le contraste sera négatif (noir) pour un temps de relaxation  $T_2$  (Figure 79).

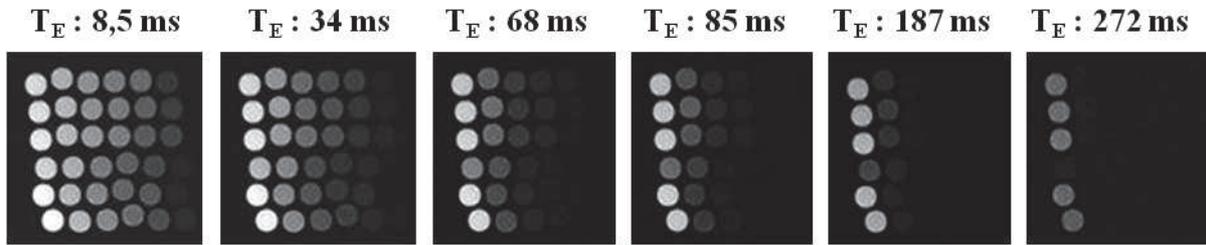


Figure 79. Coupe IRM  $T_2$  de 2 échantillons de nanotubes – SPIO pour 6 temps d'écho dans une IRM clinique de 3T

A partir de la démarche décrite dans l'annexe n°6, les relaxivités des nanotubes – SPIO ont été calculées (Tableau 27). Dans la première considération, le calcul est mené comme si tout l'échantillon était de la magnétite pure. Pour palier à ce problème, la valeur de la relaxivité a été pondérée en tenant compte des taux de fer obtenus en hystérésimétrie.

Synthèse	Hystérésimétrie Taux de fer (%)	IRM		
		Calcul brut $r_2$ (L.mg <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	magnétite $r_2$ (L.mmol <sub>nanohybride</sub> <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	TiONts – SPIO $r_2$ (L.mmolFe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
SPIO	100	4,30 ± 0,30	331 ± 23	-
TiONts* [1 : 0,5]	30	4,03 ± 0,17	311 ± 13	93 ± 4
cosynthèse [1 : 0,5]	32	3,46 ± 0,09	267 ± 7	85 ± 2
cosynthèse [1 : 2]	17	4,77 ± 0,25	368 ± 20	63 ± 3

Tableau 27. Valeurs de la relaxivité trouvée pour les diverses synthèses de nanotubes – SPIO

Les valeurs obtenues sont comparables aux valeurs trouvées dans la littérature pour des composés similaires tels que des nanoparticules composées de FePt – Au qui possèdent une relaxivité  $r_2$  de 59 L.mmol<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> (Choi *et al.* 2006). Ces nouveaux nanocomposites sont détectables en IRM.

III.3.3 - Autres caractérisations sur les TiONts – SPIO

Pour confirmer la présence de la liaison Fe – O – Ti observée en XPS, des expériences XANES et EXAFS ont été réalisées au synchrotron SOLEIL sur la ligne SAMBA. Ces mesures vont mettre en évidence la nature, le nombre et la distance des plus proches voisins du fer et du titane. Les premiers résultats sont montrés ci-dessous (Figure 80 et Figure 81).

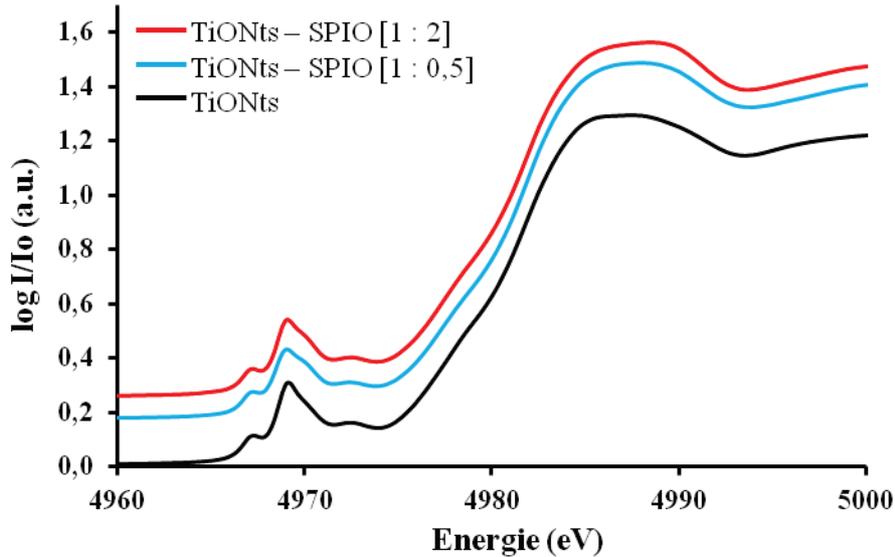


Figure 80. Pré-seuil XANES du niveau K du titane des nanotubes et des TiONts – SPIO purifiés et obtenus par cosynthèse

Le signal obtenu des nanotubes non fonctionnalisés, au niveau K du titane (Figure 80), correspond à celui trouvé dans la littérature (Ma *et al.* 2005). La seule différence observée se situe au pré-seuil du fer sur la synthèse TiONts – SPIO par la présence d'un faible épaulement qui pourrait traduire la présence de la liaison Fe – O – Ti (Figure 81).

La différence entre les signatures des SPIO et des TiONts – SPIO [1 : 2] tout particulièrement peut être expliquée par une différence d'environnement des cations de fer. L'observation en microscopie électronique en transmission confirme une organisation différente des nanoparticules d'oxydes de fer à la surface des nanotubes d'oxydes de titane pour les rapports Fe/Ti [1 : 0,5] et [1 : 2] (Figure 65). Des expériences EXAFS sont en cours d'exploitation pour confirmer la présence de la liaison Fe – O – Ti.

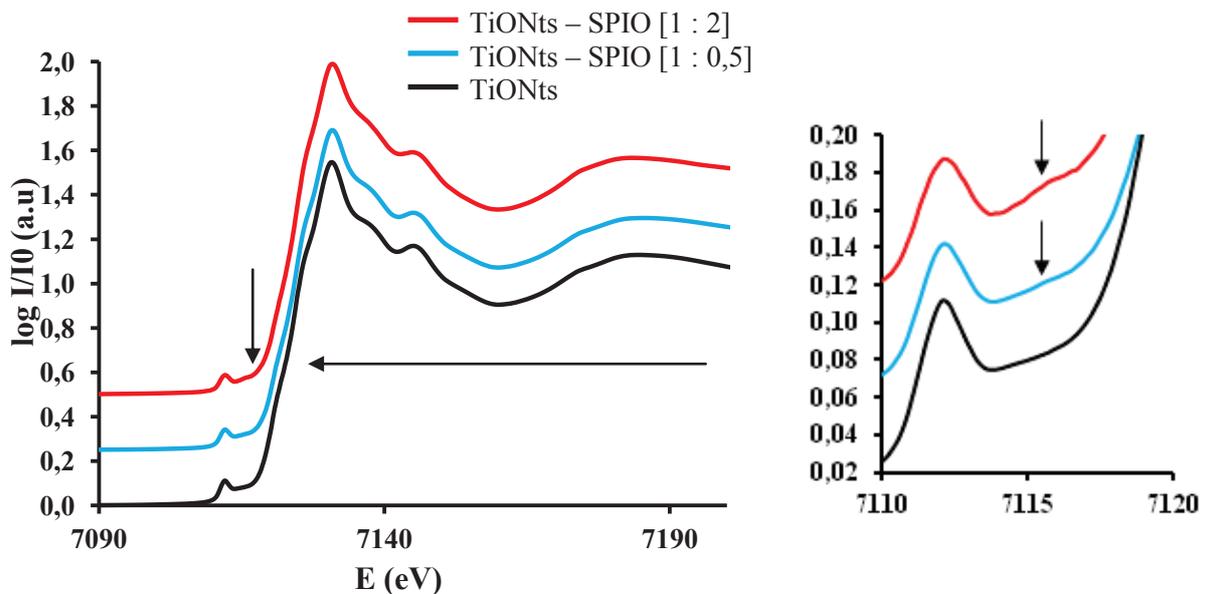


Figure 81. Pré-seuil XANES du niveau K du fer des nanoparticules d'oxydes de fer et des TiONts – SPIO purifiés et obtenus par cosynthèse

Des expériences en microscopie électronique en transmission de tomographie 3D réalisées sur les TiONts – SPIO à l'Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés (IMPMC) sont en cours de traitement. Elles pourront permettre de mieux visualiser l'accroche (à la surface ou dans la cavité) des nanoparticules d'oxydes de fer avec les TiONts.

### III.4 - Conclusion sur la synthèse des TiONts – SPIO

Pour conclure, l'obtention du nanocomposite nanotubes – SPIO est possible par la méthode TiONts\* dans un rapport Fe/Ti [1 : 0,5] mais aussi par la voie cosynthèse dans un rapport [1 : 0,5] et [1 : 2]. D'autres essais ont été réalisés mais ne permettent pas l'obtention de nanotubes marqués par des nanoparticules d'oxyde de fer. Différentes accroches sont possibles, en particulier, à la surface des nanotubes. La fonctionnalisation à l'intérieur de la cavité des nanotubes a été observée dans un seul cas, la cosynthèse de précurseur rutile et des sels de fer dans un rapport [1 : 2]. L'interaction entre les nanotubes et les nanoparticules d'oxydes de fer pourrait être de type covalent Fe – O – Ti, observable en XPS à 532,5 eV.

De plus, en suspension, les nanotubes – SPIO sont stables en régime électrostatique du fait de leur point isoélectrique proche de pH = 3,5 et de leur valeur de potentiel zêta à pH physiologique supérieure à 20 mV (valeur absolue).

D'autre part, les nanoparticules d'oxydes de fer accrochées sur les nanotubes permettent de rendre superparamagnétiques les nanotubes – SPIO. Des mesures IRM, sur des gels d'acrylamide dans lesquels les nanoparticules sont piégées, ont permis de mesurer la relaxivité (pouvoir contrastant). Cette valeur est comparable à celle trouvée dans la littérature. Ainsi, ces nanocomposites nanotubes – SPIO vont pouvoir être suivis en imagerie par résonance magnétique.

### III.5 - Tolérance des nanoparticules *in vivo*

La toxicité des trois nanomatériaux synthétisés dans ce chapitre est évaluée *in vivo* sur le modèle zebrafish (annexe n°7) en collaboration avec le zebrafishlab (Inserm U866). La concentration des nanoparticules est fixée à 50 µg/mL, une dose très supérieure à la quantité potentiellement injectée classiquement *in vivo* (Tableau 1). Le nombre de mesures a été répété trois fois avec un nombre de zebrafish égal à 60 pour réaliser des statistiques, soit 180 zebrafish pour chaque condition. La survie, l'éclosion ainsi que le développement des zebrafish sont évalués sur 96h par observation au microscope optique.

La survie des zebrafish doit être proche de 100% pour que les nanoparticules n'induisent pas de toxicité. L'éclosion se déroule habituellement entre 24 heures et 48 heures avec une éclosion supérieure à 90%. La déformation des larves doit être proche de zéro pour que le développement des zebrafish ne soit pas perturbé.

Les trois nanomatériaux ne semblent pas induire de toxicité sur les zebrafish pour une concentration de 50 µg/mL car la survie des zebrafish est proche de 100% (Figure 82 a). Les premiers résultats ne montrent pas plus de zebrafish malformés dans le cas des trois nanomatériaux que pour le contrôle. De même, l'éclosion n'est pas perturbée en présence des nanoparticules (Figure 82 b et c).

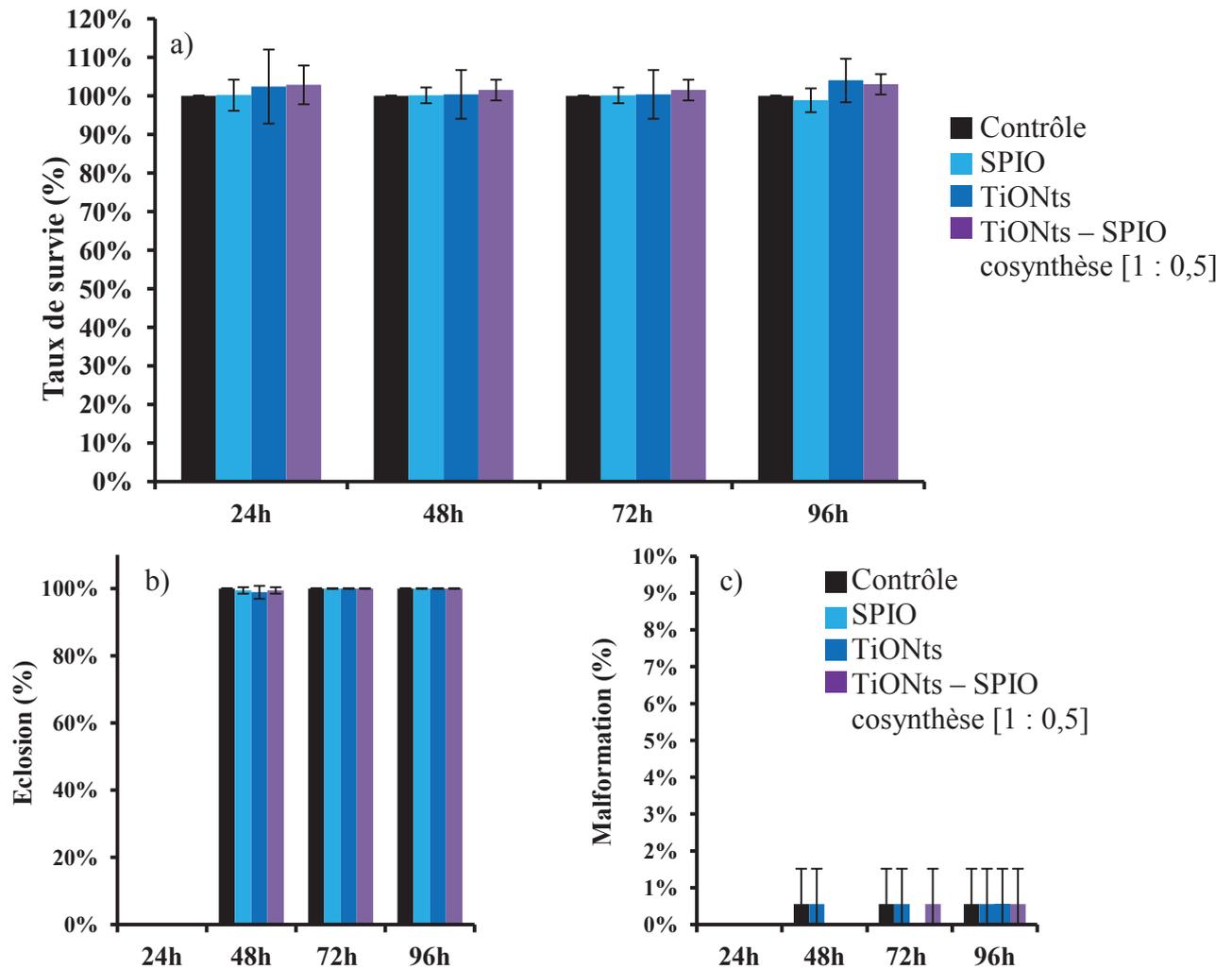


Figure 82. a) Taux de survie, b) éclosion et c) développement des zebrafish en présence des nanoparticules SPIO, TiONts et TiONts – SPIO cosynthèse [1 ; 0,5] à 50 µg/mL

#### IV. Conclusion sur la synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer et de nanotubes de titanate

Tout d'abord, la méthode de synthèse de nanotubes de titanate par voie hydrothermale a permis d'obtenir des nanoparticules aux dimensions reproductibles. Ces nanotubes mesurent une centaine de nanomètres de long pour un diamètre d'environ 10 nanomètres et possèdent une cavité interne avoisinant les 4 nm. Cependant, leur structure et leur composition exactes restent mal connues même si des études tendent à sans rapprocher. Ces nanotubes ne présentent pas de stabilité en suspension dans les conditions proches du milieu physiologique malgré un point isoélectrique aux alentours de 3,5 et un potentiel élevé (35 mV à pH = 7,4). En revanche, l'étude de leur résistance mécanique en milieu aqueux effectuée grâce à un broyeur planétaire (300/-600/48h) atteste d'une bonne stabilité morphologique et structurale des nanotubes de titanate. D'autres broyages en milieu sec ont permis de détériorer ces nanotubes mais à des énergies importantes

Toutes les caractéristiques des nanotubes de titanate synthétisés sont données dans le Tableau 28.

	Caractéristiques	Techniques d'analyses	Résultats	n	
TiONts	Structure	-	Inconnue	-	
	Morphologie	Longueur		156 ± 53 nm	100
		Diamètre externe	MET	9,1 ± 1,3 nm	100
		Diamètre interne		3,8 ± 0,6 nm	100
	Analyse de surface	Hydroxyles en surface	ATG	6 ± 4 OH/nm <sup>2</sup>	15
		Surface spécifique	BET	163 ± 25 m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup>	20
	Stabilité	Point isoélectrique	Zêtamétrie	3,3 ± 0,2	10
	Impuretés	nanorubans	MET	3%	150
		nanofeuilles		2%	150
	Robustesse mécanique	(150/-50)	milieu sec	détérioration	-
(300/-600)		milieu liquide	incassable	-	

Tableau 28. Caractéristiques des nanotubes de titanate synthétisés

Par ailleurs, la synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer par la voie co-précipitation type Massart permet d'obtenir des suspensions de nanoparticules d'oxydes de fer de phase spinelle avec des tailles de cristallites de l'ordre de dix nanomètres et une taille d'agglomérats avoisinant les 20 nanomètres. La composition est comprise entre celle de la magnétite et de la maghémite avec pour formule chimique  $[\text{Fe}^{3+}]_A[\text{Fe}^{3+}_{1,21}\text{Fe}^{2+}_{0,69}\square_{0,10}]_B\text{O}_4$  où  $\delta$  la déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène est égale à 0,035 et  $\eta$  la proportion de fer (II) par rapport aux cations fer (III) est égale à 31% ; ce qui correspond à une structure proche de la magnétite pure. Cependant, ces nanoparticules d'oxydes ne présentent pas de stabilité dans les conditions du milieu physiologique car leur point isoélectrique est égal à 7. D'autre part, ces nanoparticules de phase spinelle adoptent un comportement superparamagnétique à température ambiante. Les caractéristiques des nanoparticules d'oxydes de fer synthétisés sont regroupées dans le Tableau 29.

	Caractéristiques	Techniques d'analyses	Résultats	n	
SPIO	Structure	Paramètre de maille	$a = (8,379 \pm 0,003) \text{ \AA}$	-	
		Degré d'oxydation	$\text{Fe}_{2,965}\text{O}_4 \delta = 0,035$	-	
	Morphologie		DRX	9,1 ± 0,2 nm	-
		Taille de cristallite	MET	9 ± 2 nm	100
			BET	12,5 ± 0,3 nm	7
	Analyse de surface	Hydroxyles en surface	ATG	6,7 ± 0,6 OH/nm <sup>2</sup>	7
		Surface spécifique	BET	92 ± 10 m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup>	7
	Stabilité	Point isoélectrique	Zêtamétrie	7,2 ± 0,2	7
		Domaine de floculation	PCS	6 < pH < 8	
	Magnétisme	à 77K	Ms	68 uem.g <sup>-1</sup>	
		à 300K	Comportement	superparamagnétique	

Tableau 29. Caractéristiques des nanoparticules d'oxydes de fer synthétisés

Enfin, l'obtention du nanocomposite nanotubes – SPIO est réalisable par plusieurs voies. La méthode TiONts\* dans un rapport Fe/Ti [1 : 0,5] mais aussi la voie cosynthèse dans un rapport [1 : 0,5] et [1 : 2] permettent d'obtenir des nanotubes – SPIO. D'autres conditions ont été réalisées mais ne permettent pas l'obtention de nanotubes associés aux nanoparticules de fer. Ces dernières sont le plus souvent à la surface des nanotubes de titanate. Cependant, par la méthode cosynthèse avec les précurseurs rutile et sels de fer dans un rapport [1 : 2], l'intérieur de la cavité des nanotubes a pu être fonctionnalisé. Cette liaison entre les deux nanoparticules est de type covalent (Fe – O – Ti), observable par XPS à 532,5 eV. D'autre part, les nanotubes – SPIO sont superparamagnétique grâce aux nanoparticules d'oxydes de fer accrochées sur les nanotubes. Des mesures IRM, sur des gels d'acrylamide dans lesquels les nanoparticules sont piégées, ont permis de mesurer la relaxivité  $r_2$ , le pouvoir contrastant. Cette valeur est comparable à celle trouvée dans la littérature. Ainsi, ces nanocomposites nanotubes – SPIO sont détectables en IRM.

Les caractéristiques des TiONts – SPIO synthétisés sont réunies dans le Tableau 30.

	Types d'accroches sur TiONts	Ms (uem/g)	PIE	Hystérisimétre Taux de fer (%)	IRM $r_2$ (L.mmolFe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
TiONts* [1 : 0,5]	surface	20	3,5 ± n.d.	30	93 ± 4
cosynthèse [1 : 0,5]	surface	22	3,2 ± n.d.	32	85 ± 2
cosynthèse [1 : 2]	surface et cavité	12	3,9 ± n.d.	17	63 ± 3

Tableau 30. Caractéristiques des nanotubes – SPIO synthétisés. n.d. non déterminé car il n'y avait pas assez de valeurs pour être représentatif.

Les premiers essais de toxicité in vivo avec le modèle zebrafish sur les nanoparticules nues ne semblent pas induire de toxicité. Au vu des propriétés, les nanoparticules d'oxydes de fer ou les nanotubes de titanate ne sont pas stables pour les conditions physiologiques, et nécessite donc une modification de surface par des agents électrostatiques qui permettront une stabilisation électrostatique (Abazović *et al.* 2009).

Références bibliographiques

- Abazović, N., Mirengi, L., Janković, I., Bibić, N., Šojić, D., Abramović, B. and Čomor, M. (2009). "Synthesis and Characterization of Rutile  $TiO_2$  Nanopowders Doped with Iron Ions." *Nanoscale Research Letters* **4**(6): 518-525.
- Abdellaoui, M. and Gaffet, E. (1994). "A mathematical and experimental dynamical phase diagram for ballmilled  $Ni_{10}Zr_7$ ." *Journal of Alloys and Compounds* **209**: 351-361.
- Abdellaoui, M. and Gaffet, E. (1995). "The physics of mechanical alloying in a planetary ball mill: Mathematical treatment." *Acta Metallurgica et Materialia* **43**(3): 1087-1098.
- Alivov, Y.F., Z.Y.; Johnstone, D. (2009). "Titanium nanotubes grown by titanium anodization " *Journal of Applied Physics* **106**(3).
- An, H., Zhou, J., Li, J., Zhu, B., Wang, S., Zhang, S., Wu, S. and Huang, W. (2009). "Deposition of Pt on the stable nanotubular  $TiO_2$  and its photocatalytic performance." *Catalysis Communications* **11**(3): 175-179.
- Armstrong, G., Armstrong, A.R., Canales, J. and Bruce, P.G. (2005). "Nanotubes with the  $TiO_2$ -B structure." *Chemical Communications* **0**(19): 2454-2456.
- Basly, B. (2010). Conception et caractérisation de nano-objet magnétiques pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM), Université de Strasbourg.
- Bavykin, D., Lapkin, A., Plucinski, P., Torrente-Murciano, L., Friedrich, J. and Walsh, F. (2006a). "Deposition of Pt, Pd, Ru and Au on the surfaces of titanate nanotubes." *Topics in Catalysis* **39**(3-4): 151-160.
- Bavykin, D.V., Friedrich, J.M. and Walsh, F.C. (2006b). "Protonated Titanates and  $TiO_2$  Nanostructured Materials: Synthesis, Properties, and Applications." *Advanced Materials* **18**(21): 2807-2824.
- Bavykin, D.V., Parmon, V.N., Lapkin, A.A. and Walsh, F.C. (2004). "The effect of hydrothermal conditions on the mesoporous structure of  $TiO_2$  nanotubes." *Journal of Materials Chemistry* **14**(22): 3370-3377.
- Bavykin, D.V. and Walsh, F.C. (2009). "Elongated Titanate Nanostructures and Their Applications." *European Journal of Inorganic Chemistry* **2009**(8): 977-997.
- Bean, L. (1959). "Superparamagnetism." *Journal of Applied Physics* **30**(4).
- Bee, A., Massart, R. and Neveu, S. (1995). "Synthesis of very fine maghemite particles." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **149**(1-2): 6-9.
- Belin, T., Guigue-Millot, N., Caillot, T., Aymes, D. and Niepce, J.C. (2002). "Influence of Grain Size, Oxygen Stoichiometry, and Synthesis Conditions on the  $\gamma$ - $Fe_2O_3$  Vacancies Ordering and Lattice Parameters." *Journal of Solid State Chemistry* **163**(2): 459-465.
- Belin, T., Millot, N., Villieras, F., Bertrand, O. and Bellat, J.P. (2004). "Structural Variations as a Function of Surface Adsorption in Nanostructured Particles." *The Journal of Physical Chemistry B* **108**(17): 5333-5340.
- Bellat, V. (2012). Ingénierie d'un nouveau nanobiohybride à base de nanorubans de titanates pour la médecine régénérative. *Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne*, Université de Bourgogne.
- Bharde, A.A., Parikh, R.Y., Baidakova, M., Jouen, S., Hannoyer, B., Enoki, T., Prasad, B.L.V., Shouche, Y.S., Ogale, S. and Sastry, M. (2008). "Bacteria-Mediated

- Precursor-Dependent Biosynthesis of Superparamagnetic Iron Oxide and Iron Sulfide Nanoparticles.* Langmuir **24**(11): 5787-5794.
- Bomatí-Miguel, O., Mazeina, L., Navrotsky, A. and Veintemillas-Verdaguer, S. (2008). "Calorimetric Study of Maghemite Nanoparticles Synthesized by Laser-Induced Pyrolysis." Chemistry of Materials **20**(2): 591-598.
- Cai, W. and Wan, J. (2007). "Facile synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles in liquid polyols." Journal of Colloid and Interface Science **305**(2): 366-370.
- Chatterjee, J., Haik, Y. and Chen, C.-J. (2003). "Size dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **257**(1): 113-118.
- Chen, B., Hou, J. and Lu, K. (2013). "Formation Mechanism of TiO<sub>2</sub> Nanotubes and Their Applications in Photoelectrochemical Water Splitting and Supercapacitors." Langmuir **29**(19): 5911-5919.
- Chen, Q., Du, G.H., Zhang, S. and Peng, L.-M. (2002a). "The structure of trititanate nanotubes." Acta Crystallographica Section B **58**(4): 587-593.
- Chen, Q. and Peng, L.M. (2007). "Structure and applications of titanate and related nanostructures." International Journal of Nanotechnology **4**(1): 44-65.
- Chen, Q., Zhou, W., Du, G.H. and Peng, L.M. (2002b). "Trititanate Nanotubes Made via a Single Alkali Treatment." Advanced Materials **14**(17): 1208-1211.
- Chin, A.B. and Yaacob, I.I. (2007). "Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart's procedure." Journal of Materials Processing Technology **191**(1-3): 235-237.
- Choi, J.-S., Jun, Y.-W., Yeon, S.-I., Kim, H.C., Shin, J.-S. and Cheon, J. (2006). "Biocompatible Heterostructured Nanoparticles for Multimodal Biological Detection." Journal of the American Chemical Society **128**(50): 15982-15983.
- Dai, Z., Meiser, F. and Möhwald, H. (2005). "Nanoengineering of iron oxide and iron oxide/silica hollow spheres by sequential layering combined with a sol-gel process." Journal of Colloid and Interface Science **288**(1): 298-300.
- Daou, T.J. (2007). Synthèse et fonctionnalisation de nanoparticules d'oxydes de fer magnétiques. Université de Strasbourg, Université de StraSbourg.
- Daou, T.J., Grenèche, J.M., Pourroy, G., Buathong, S., Derory, A., Ulhaq-Bouillet, C., Donnio, B., Guillon, D. and Begin-Colin, S. (2008). "Coupling Agent Effect on Magnetic Properties of Functionalized Magnetite-Based Nanoparticles." Chemistry of Materials **20**(18): 5869-5875.
- Daou, T.J., Pourroy, G., Bégin-Colin, S., Grenèche, J.M., Ulhaq-Bouillet, C., Legaré, P., Bernhardt, P., Leuvrey, C. and Rogez, G. (2006). "Hydrothermal Synthesis of Monodisperse Magnetite Nanoparticles." Chemistry of Materials **18**(18): 4399-4404.
- Du, G.H., Chen, Q., Che, R.C., Yuan, Z.Y. and Peng, L.M. (2001). "Preparation and structure analysis of titanium oxide nanotubes." Applied Physics Letters **79**(22): 3702-3704.
- Fiorani, D., Testa, A.M., Lucari, F., D'orazio, F. and Romero, H. (2002). "Magnetic properties of maghemite nanoparticle systems: surface anisotropy and interparticle interaction effects." Physica B: Condensed Matter **320**(1-4): 122-126.
- Gao, T., Fjellvåg, H. and Norby, P. (2009). "Crystal Structures of Titanate Nanotubes: A Raman Scattering Study." Inorganic Chemistry **48**(4): 1423-1432.

- Gao, T., Wu, Q., Fjellvåg, H. and Norby, P. (2008). "Topological Properties of Titanate Nanotubes." The Journal of Physical Chemistry C **112**(23): 8548-8552.
- Gong, D.G., Craig A.; Varghese, Oommen K.; Hu, Wenchong; Singh, R. S. ; Chen, Zhi and Dickey, Elizabeth C. (2001). "Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation." Journal of MATERIALS RESEARCH **16**(12): 3331-3334.
- Goya, G.F., Berquo, T.S., Fonseca, F.C. and Morales, M.P. (2003). "Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles." Journal of Applied Physics **94**(5): 3520-3528.
- Gras, C. (2000). Réactivité et thermodynamique dans le procédé MASHS Application aux systèmes Mo-Si et Fe-Si. Université de Bourgogne, Université de Bourgogne.
- Hernandez-Alonso, M.D., Garcia-Rodriguez, S., Sanchez, B. and Coronado, J.M. (2011). "Revisiting the hydrothermal synthesis of titanate nanotubes: new insights on the key factors affecting the morphology." Nanoscale **3**(5): 2233-2240.
- Hou, L.-R., Yuan, C.-Z. and Peng, Y. (2007). "Synthesis and photocatalytic property of SnO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> nanotubes composites." Journal of Hazardous Materials **139**(2): 310-315.
- Hoyer, P. (1996). "Formation of a Titanium Dioxide Nanotube Array." Langmuir **12**(6): 1411-1413.
- Huang, J., Cao, Y., Huang, Q., He, H., Liu, Y., Guo, W. and Hong, M. (2009). "High-Temperature Formation of Titanate Nanotubes and the Transformation Mechanism of Nanotubes into Nanowires." Crystal Growth & Design **9**(8): 3632-3637.
- Huber, D.L. (2005). "Synthesis, Properties, and Applications of Iron Nanoparticles." Small **1**(5): 482-501.
- Hyeon, T., Lee, S.S., Park, J., Chung, Y. and Na, H.B. (2001). "Synthesis of Highly Crystalline and Monodisperse Magnetite Nanocrystallites without a Size-Selection Process." Journal of the American Chemical Society **123**(51): 12798-12801.
- Imai, H., Takei, Y., Shimizu, K., Matsuda, M. and Hirashima, H. (1999). "Direct preparation of anatase TiO<sub>2</sub> nanotubes in porous alumina membranes." Journal of Materials Chemistry **9**(12): 2971-2972.
- Joumaa, N., Toussay, P., Lansalot, M. and Elaissari, A. (2008). "Surface modification of iron oxide nanoparticles by a phosphate-based macromonomer and further encapsulation into submicrometer polystyrene particles by miniemulsion polymerization." Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry **46**(1): 327-340.
- Jung, J.H., Kobayashi, H., Van Bommel, K.J.C., Shinkai, S. and Shimizu, T. (2002). "Creation of Novel Helical Ribbon and Double-Layered Nanotube TiO<sub>2</sub> Structures Using an Organogel Template." Chemistry of Materials **14**(4): 1445-1447.
- Kasuga, T., Hiramatsu, M., Hoson, A., Sekino, T. and Niihara, K. (1998). "Formation of Titanium Oxide Nanotube." Langmuir **14**(12): 3160-3163.
- Kasuga, T., Hiramatsu, M., Hoson, A., Sekino, T. and Niihara, K. (1999). "Titania Nanotubes Prepared by Chemical Processing." Advanced Materials **11**(15): 1307-1311.
- Kiatkittipong, K., Scott, J. and Amal, R. (2011). "Hydrothermally Synthesized Titanate Nanostructures: Impact of Heat Treatment on Particle Characteristics and Photocatalytic Properties." ACS Applied Materials & Interfaces **3**(10): 3988-3996.

- Kim, D.K., Zhang, Y., Voit, W., Rao, K.V. and Muhammed, M. (2001). "Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **225**(1–2): 30-36.
- Kim, S.-J., Yun, Y.-U., Oh, H.-J., Hong, S.H., Roberts, C.A., Routray, K. and Wachs, I.E. (2009). "Characterization of Hydrothermally Prepared Titanate Nanotube Powders by Ambient and In Situ Raman Spectroscopy." The Journal of Physical Chemistry Letters **1**(1): 130-135.
- Kobayashi, S., Hamasaki, N., Suzuki, M., Kimura, M., Shirai, H. and Hanabusa, K. (2002). "Preparation of Helical Transition-Metal Oxide Tubes Using Organogelators as Structure-Directing Agents." Journal of the American Chemical Society **124**(23): 6550-6551.
- Kubo, T. and Nakahira, A. (2008). "Local Structure of TiO<sub>2</sub>-Derived Nanotubes Prepared by the Hydrothermal Process." The Journal of Physical Chemistry C **112**(5): 1658-1662.
- Kukovecz, Á., Hodos, M., Horváth, E., Radnóczy, G., Kónya, Z. and Kiricsi, I. (2005). "Oriented Crystal Growth Model Explains the Formation of Titania Nanotubes." The Journal of Physical Chemistry B **109**(38): 17781-17783.
- Lakshmi, B.B., Patrissi, C.J. and Martin, C.R. (1997). "Sol - Gel Template Synthesis of Semiconductor Oxide Micro- and Nanostructures." Chemistry of Materials **9**(11): 2544-2550.
- Lan, Y., Gao, X.P., Zhu, H.Y., Zheng, Z.F., Yan, T.Y., Wu, F., Ringer, S.P. and Song, D.Y. (2005). "Titanate Nanotubes and Nanorods Prepared from Rutile Powder." Advanced Functional Materials **15**(8): 1310-1318.
- Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L. and Muller, R.N. (2008). "Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications." Chemical Reviews **108**(6): 2064-2110.
- Li, D., Chien, C.-J., Deora, S., Chang, P.-C., Moulin, E. and Lu, J.G. (2011). "Prototype of a scalable core-shell Cu<sub>2</sub>O/TiO<sub>2</sub> solar cell." Chemical Physics Letters **501**(4–6): 446-450.
- Liang, Y.Q., Cui, Z.D., Zhu, S.L. and Yang, X.J. (2010). "Formation and characterization of iron oxide nanoparticles loaded on self-organized TiO<sub>2</sub> nanotubes." Electrochimica Acta **55**(18): 5245-5252.
- Liu, P., Zhang, H., Liu, H., Wang, Y., Yao, X., Zhu, G., Zhang, S. and Zhao, H. (2011). "A Facile Vapor-Phase Hydrothermal Method for Direct Growth of Titanate Nanotubes on a Titanium Substrate via a Distinctive Nanosheet Roll-Up Mechanism." Journal of the American Chemical Society **133**(47): 19032-19035.
- Lu, N., Quan, X., Li, J., Chen, S., Yu, H. and Chen, G. (2007). "Fabrication of Boron-Doped TiO<sub>2</sub> Nanotube Array Electrode and Investigation of Its Photoelectrochemical Capability." The Journal of Physical Chemistry C **111**(32): 11836-11842.
- Lu, Y., Yin, Y., Mayers, B.T. and Xia, Y. (2002). "Modifying the Surface Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles through A Sol-Gel Approach." Nano Letters **2**(3): 183-186.
- Ma, R., Bando, Y. and Sasaki, T. (2003). "Nanotubes of lepidocrocite titanates." Chemical Physics Letters **380**(5–6): 577-582.

- Ma, R., Fukuda, K., Sasaki, T., Osada, M. and Bando, Y. (2005). "Structural Features of Titanate Nanotubes/Nanobelts Revealed by Raman, X-ray Absorption Fine Structure and Electron Diffraction Characterizations." The Journal of Physical Chemistry B **109**(13): 6210-6214.
- Ma, Y., Lin, Y., Xiao, X., Zhou, X. and Li, X. (2006). "Sonication–hydrothermal combination technique for the synthesis of titanate nanotubes from commercially available precursors." Materials Research Bulletin **41**(2): 237-243.
- Malato, S., Fernández-Ibáñez, P., Maldonado, M.I., Blanco, J. and Gernjak, W. (2009). "Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends." Catalysis Today **147**(1): 1-59.
- Massart, R. (1981). "Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media." Magnetics, IEEE Transactions on **17**(2): 1247-1248.
- Maurizi, L. (2010). Elaboration de nanoparticules fonctionnelles : applications comme agents de contraste en IRM. Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne, Université de Bourgogne.
- Maurizi, L., Bouyer, F., Paris, J., Demoisson, F., Saviot, L. and Millot, N. (2011). "One step continuous hydrothermal synthesis of very fine stabilized superparamagnetic nanoparticles of magnetite." Chemical Communications **47**(42): 11706-11708.
- Miller, D.J., Biesinger, M.C. and McIntyre, N.S. (2002). "Interactions of CO<sub>2</sub> and CO at fractional atmosphere pressures with iron and iron oxide surfaces: one possible mechanism for surface contamination?" Surface and Interface Analysis **33**(4): 299-305.
- Mohapatra, S.K., Kondamudi, N., Banerjee, S. and Misra, M. (2008). "Functionalization of Self-Organized TiO<sub>2</sub> Nanotubes with Pd Nanoparticles for Photocatalytic Decomposition of Dyes under Solar Light Illumination." Langmuir **24**(19): 11276-11281.
- Morgan, D.L., Liu, H.-W., Frost, R.L. and Waclawik, E.R. (2009). "Implications of Precursor Chemistry on the Alkaline Hydrothermal Synthesis of Titania/Titanate Nanostructures." The Journal of Physical Chemistry C **114**(1): 101-110.
- Morgan, D.L., Zhu, H.-Y., Frost, R.L. and Waclawik, E.R. (2008). "Determination of a Morphological Phase Diagram of Titania/Titanate Nanostructures from Alkaline Hydrothermal Treatment of Degussa P25." Chemistry of Materials **20**(12): 3800-3802.
- Mornet, S. (2002). Synthèse et modification chimique de la surface de nanoparticules de magnhémite à des fins d'applications biomédicales, Université de Bordeaux.
- Mornet, S., Vasseur, S., Gasset, F., Veverka, P., Goglio, G., Demourgues, A., Portier, J., Pollert, E. and Duguet, E. (2006). "Magnetic nanoparticle design for medical applications." Progress in Solid State Chemistry **34**(2–4): 237-247.
- Nagaveni, K., Hegde, M.S., Ravishankar, N., Subbanna, G.N. and Madras, G. (2004). "Synthesis and Structure of Nanocrystalline TiO<sub>2</sub> with Lower Band Gap Showing High Photocatalytic Activity." Langmuir **20**(7): 2900-2907.
- Nakahira, A., Kato, W., Tamai, M., Isshiki, T., Nishio, K. and Aritani, H. (2004). "Synthesis of nanotube from a layered H<sub>2</sub>Ti<sub>4</sub>O<sub>9</sub> H<sub>2</sub>O in a hydrothermal treatment using various titania sources." Journal of Materials Science **39**(13): 4239-4245.

- Nakahira, A., Kubo, T. and Numako, C. (2010). "Formation Mechanism of TiO<sub>2</sub>-Derived Titanate Nanotubes Prepared by the Hydrothermal Process." Inorganic Chemistry **49**(13): 5845-5852.
- Niu, H., Cai, Y., Shi, Y., Wei, F., Mou, S. and Jiang, G. (2007). "Cetyltrimethylammonium bromide-coated titanate nanotubes for solid-phase extraction of phthalate esters from natural waters prior to high-performance liquid chromatography analysis." Journal of Chromatography A **1172**(2): 113-120.
- Niu, H., Zhang, S., Zhang, X. and Cai, Y. (2010). "Alginate-Polymer-Caged, C18-Functionalized Magnetic Titanate Nanotubes for Fast and Efficient Extraction of Phthalate Esters from Water Samples with Complex Matrix." ACS Applied Materials & Interfaces **2**(4): 1157-1163.
- Ohno, T., Sarukawa, K., Tokieda, K. and Matsumura, M. (2001). "Morphology of a TiO<sub>2</sub> Photocatalyst (Degussa, P-25) Consisting of Anatase and Rutile Crystalline Phases." Journal of Catalysis **203**(1): 82-86.
- Ou, H.-H. and Lo, S.-L. (2007). "Review of titania nanotubes synthesized via the hydrothermal treatment: Fabrication, modification, and application." Separation and Purification Technology **58**(1): 179-191.
- Panda, R.N., Gajbhiye, N.S. and Balaji, G. (2001). "Magnetic properties of interacting single domain Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> particles." Journal of Alloys and Compounds **326**(1-2): 50-53.
- Papa, A.-L., Maurizi, L., Vandroux, D., Walker, P. and Millot, N. (2011). "Synthesis of Titanate Nanotubes Directly Coated with USPIO in Hydrothermal Conditions: A New Detectable Nanocarrier." The Journal of Physical Chemistry C **115**(39): 19012-19017.
- Papa, A.-L., Millot, N., Saviot, L., Chassagnon, R.M. and Heintz, O. (2009). "Effect of Reaction Parameters on Composition and Morphology of Titanate Nanomaterials." The Journal of Physical Chemistry C **113**(29): 12682-12689.
- Papa, A.L. (2009). Synthèse et caractérisation de nanotubes d'oxydes de titane Fonctionnalisation en vue de leur application comme nouveaux nanovecteurs biologiques : cas de la transfection d'ADN dans les cardiomyocytes. Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne, Université de Bourgogne.
- Pascal, C., Pascal, J.L., Favier, F., Elidrissi Moubtassim, M.L. and Payen, C. (1998). "Electrochemical Synthesis for the Control of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticle Size. Morphology, Microstructure, and Magnetic Behavior." Chemistry of Materials **11**(1): 141-147.
- Pascu, O., Carenza, E., Gich, M., Estradé, S., Peiró, F., Herranz, G. and Roig, A. (2012). "Surface Reactivity of Iron Oxide Nanoparticles by Microwave-Assisted Synthesis; Comparison with the Thermal Decomposition Route." The Journal of Physical Chemistry C **116**(28): 15108-15116.
- Poudel, B., Wang, W.Z., Dames, C., Huang, J.Y., Kunwar, S., Wang, D.Z., Banerjee, D., Chen, G. and Ren, Z.F. (2005). "Formation of crystallized titania nanotubes and their transformation into nanowires." Nanotechnology **16**(9): 1935.
- Pradhan, S.K., Mao, Y., Wong, S.S., Chupas, P. and Petkov, V. (2007). "Atomic-Scale Structure of Nanosized Titania and Titanate: Particles, Wires, and Tubes." Chemistry of Materials **19**(25): 6180-6186.

- Ruan, C., Paulose, M., Varghese, O.K., Mor, G.K. and Grimes, C.A. (2005). "*Fabrication of Highly Ordered TiO<sub>2</sub> Nanotube Arrays Using an Organic Electrolyte.*" The Journal of Physical Chemistry B **109**(33): 15754-15759.
- Saponjic, Z.V., Dimitrijevic, N.M., Tiede, D.M., Goshe, A.J., Zuo, X., Chen, L.X., Barnard, A.S., Zapol, P., Curtiss, L. and Rajh, T. (2005). "*Shaping Nanometer-Scale Architecture Through Surface Chemistry.*" Advanced Materials **17**(8): 965-971.
- Shrestha, N.K., Yang, M., Nah, Y.-C., Paramasivam, I. and Schmuki, P. (2010). "*Self-organized TiO<sub>2</sub> nanotubes: Visible light activation by Ni oxide nanoparticle decoration.*" Electrochemistry Communications **12**(2): 254-257.
- Sreekantan, S. and Wei, L.C. (2010). "Study on the formation and photocatalytic activity of titanate nanotubes synthesized via hydrothermal method." Journal of Alloys and Compounds **490**(1-2): 436-442.
- Sun, S. and Zeng, H. (2002). "*Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles.*" Journal of the American Chemical Society **124**(28): 8204-8205.
- Sun, X. and Li, Y. (2003). "*Synthesis and Characterization of Ion-Exchangeable Titanate Nanotubes.*" Chemistry – A European Journal **9**(10): 2229-2238.
- Teja, A.S. and Koh, P.-Y. (2009). "*Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles.*" Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials **55**(1-2): 22-45.
- Tian, Z.R., Voigt, J.A., Liu, J., Mckenzie, B. and Xu, H. (2003). "*Large Oriented Arrays and Continuous Films of TiO<sub>2</sub>-Based Nanotubes.*" Journal of the American Chemical Society **125**(41): 12384-12385.
- Tromsdorf, U.I., Bruns, O.T., Salmen, S.C., Beisiegel, U. and Weller, H. (2009). "*A Highly Effective, Nontoxic T<sub>1</sub> MR Contrast Agent Based on Ultrasmall PEGylated Iron Oxide Nanoparticles.*" Nano Letters **9**(12): 4434-4440.
- Viriya-Empikul, N., Charinpanitkul, T., Sano, N., Soottitantawat, A., Kikuchi, T., Faungnawakij, K. and Tanthapanichakoon, W. (2009). "*Effect of preparation variables on morphology and anatase–brookite phase transition in sonication assisted hydrothermal reaction for synthesis of titanate nanostructures.*" Materials Chemistry and Physics **118**(1): 254-258.
- Wang, Y.Q., Hu, G.Q., Duan, X.F., Sun, H.L. and Xue, Q.K. (2002). "*Microstructure and formation mechanism of titanium dioxide nanotubes.*" Chemical Physics Letters **365**(5-6): 427-431.
- Wen, H., Liu, Z., Yang, Q., Li, Y. and Yu, J. (2011). "*Synthesis and electrochemical properties of CeO<sub>2</sub> nanoparticle modified TiO<sub>2</sub> nanotube arrays.*" Electrochimica Acta **56**(7): 2914-2918.
- Woo, K., Hong, J., Choi, S., Lee, H.-W., Ahn, J.-P., Kim, C.S. and Lee, S.W. (2004). "*Easy Synthesis and Magnetic Properties of Iron Oxide Nanoparticles.*" Chemistry of Materials **16**(14): 2814-2818.
- Xie, K., Sun, L., Wang, C., Lai, Y., Wang, M., Chen, H. and Lin, C. (2010). "*Photoelectrocatalytic properties of Ag nanoparticles loaded TiO<sub>2</sub> nanotube arrays prepared by pulse current deposition.*" Electrochimica Acta **55**(24): 7211-7218.

- Yan, G., Zhang, M., Hou, J. and Yang, J. (2011). "Photoelectrochemical and photocatalytic properties of N+S co-doped TiO<sub>2</sub> nanotube array films under visible light irradiation." Materials Chemistry and Physics **129**(1–2): 553-557.
- Yang, G., Jiang, Z., Shi, H., Xiao, T. and Yan, Z. (2010). "*Preparation of highly visible-light active N-doped TiO<sub>2</sub> photocatalyst.*" Journal of Materials Chemistry **20**(25): 5301-5309.
- Yang, J., Jin, Z., Wang, X., Li, W., Zhang, J., Zhang, S., Guo, X. and Zhang, Z. (2003). "*Study on composition, structure and formation process of nanotube Na<sub>2</sub>Ti<sub>2</sub>O<sub>4</sub>(OH)<sub>2</sub>.*" Dalton Transactions **0**(20): 3898-3901.
- Yao, B.D.C., Y. F. ; Zhang, X. Y. ; Zhang, W. F. ; Yang, Z. Y. And Wang, N. (2003). "*Formation mechanism of TiO<sub>2</sub> nanotubes*" Applied Physics Letters **82**(2): 3.
- Yu, J., Dai, G. and Huang, B. (2009). "Fabrication and Characterization of Visible-Light-Driven Plasmonic Photocatalyst Ag/AgCl/TiO<sub>2</sub> Nanotube Arrays." The Journal of Physical Chemistry C **113**(37): 16394-16401.
- Yuan, Z.-Y. and Su, B.-L. (2004). "*Titanium oxide nanotubes, nanofibers and nanowires.*" Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **241**(1–3): 173-183.
- Zhang, S., Peng, L.M., Chen, Q., Du, G.H., Dawson, G. and Zhou, W.Z. (2003). "*Formation Mechanism of H<sub>2</sub>Ti<sub>3</sub>O<sub>7</sub> Nanotubes.*" Physical Review Letters **91**(25): 256103.

## Chapitre 2. Préfonctionnalisation de la surface des nanoparticules

Dans la première partie de ce travail, il est apparu que les nanoparticules synthétisées (TiONts ou SPIO) ne sont pas assez stables pour les applications biologiques visées car les nanoparticules ne sont pas assez chargées à leur surface et sédimentent dans les conditions physiologiques (pH = 7,4 ; 0,9% NaCl). Ainsi, il est nécessaire de fonctionnaliser leur surface pour rendre les nanoparticules plus stables et pour apporter également de nouvelles fonctions organiques plus réactives pour des couplages futurs avec des molécules d'intérêts biologiques.

### I. Stabilité des nanoparticules en suspension

La modification de la surface des nanoparticules est indispensable pour conserver leur stabilité dans le temps afin d'éviter leur précipitation. La stabilisation des nanoparticules est réalisable de deux manières. D'une part, de façon électrostatique (Figure 83) par le biais d'agents stabilisants chargés *via* des carboxylates (Mudunkotuwa *et al.* 2010; De Sousa *et al.* 2013) ou encore *via* des amines (Yamaura *et al.* 2004; Bini *et al.* 2012). Beaucoup d'études ont été effectuées sur les nanoparticules d'oxydes de fer avec les carboxylates. La plupart du temps, l'acide citrique est utilisé lors de la synthèse des nanoparticules d'oxydes de fer car en plus d'être stabilisant, l'acide citrique limite à la fois l'oxydation des  $Fe^{2+}$  (Krishnamurti *et al.* 1991; Maurizi *et al.* 2011) et la taille des nanoparticules (Bee *et al.* 1995; Maurizi *et al.* 2011).

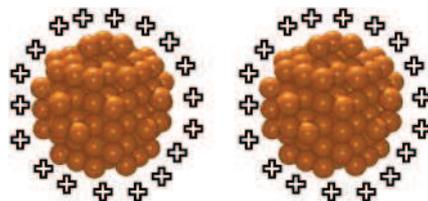


Figure 83. Exemple de stabilisation électrostatique des nanoparticules

D'autre part, la stabilisation des nanoparticules est réalisable de façon stérique (Figure 84) *via* des polymères comme le dextran (Molday *et al.* 1982; Berry *et al.* 2003), le polyéthylène glycol (Kim *et al.* 2001; Kumagai *et al.* 2007), le chitosan (Lee *et al.* 2005; Kaushik *et al.* 2008) ou l'alcool polyvinylique (Lee *et al.* 1996).

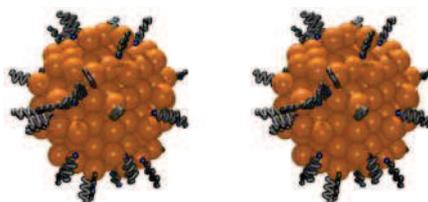


Figure 84. Stabilisation stérique des nanoparticules

Par ailleurs, la littérature sur la modification de surface des nanotubes de titanate est beaucoup moins vaste. Cependant, quelques travaux traitent du sujet tels que l'utilisation de la polyéthylèneimine (Liu *et al.* 2012; Papa *et al.* 2013) pour stabiliser les nanoparticules, ou des amino-silanes (Brnardić *et al.* 2013) pour en première intention rendre la surface plus réactive et ainsi stabiliser les TiONts par voie stérique *via* des molécules plus encombrantes comme le polystyrène (Gao *et al.* 2009) ou bien encore la polycaprolactone (Shi *et al.* 2007).

La stabilisation des nanoparticules ne peut être obtenue qu'en modifiant leur surface avec des ligands qui se greffent de façon covalente ou reste en interaction sur les hydroxydes de surface des nanoparticules (Figure 85). Généralement, les ligands sont des carboxylates (Yu *et al.* 2004; Sahoo *et al.* 2005; Thomas *et al.* 2009), des phosphonates (Mutin *et al.* 2005; Guerrero *et al.* 2013) ou encore des silanes (Mornet *et al.* 2005).

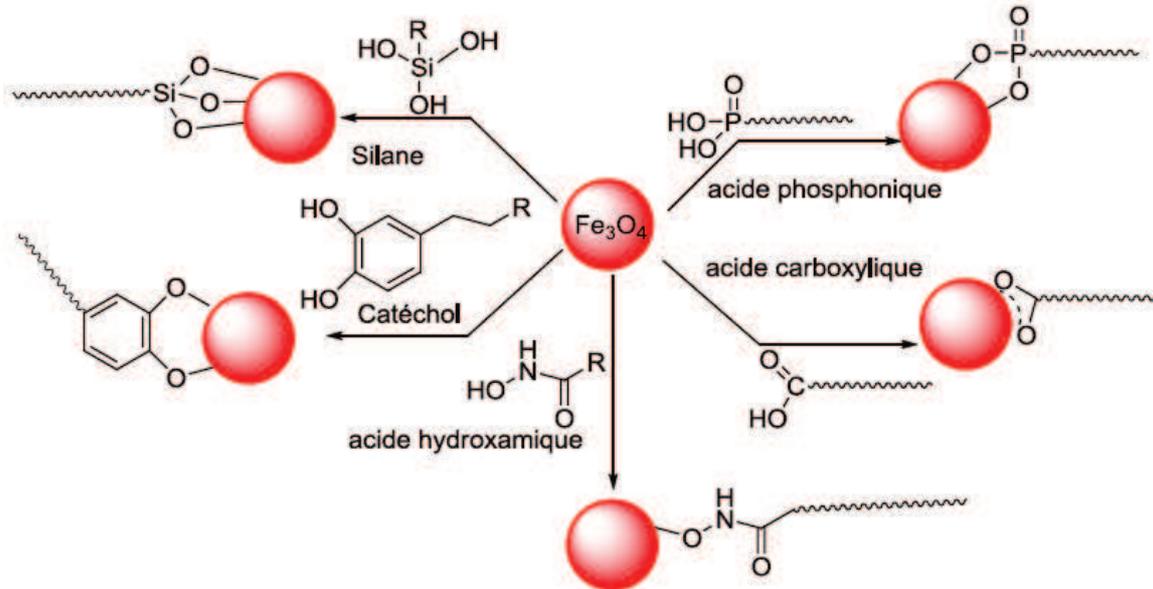


Figure 85. Nature des ligands permettant la stabilisation des nanoparticules d'oxydes de fer d'après (Nguyen 2013)

Les groupements silanes les plus couramment utilisés sont les alcoxysilanes de formule générale  $R_nSiX_{4-n}$  avec X qui représente un groupe hydrolysable (Cl, OR...) et R la fonction d'intérêt ( $NH_2$ , NCO, etc.).

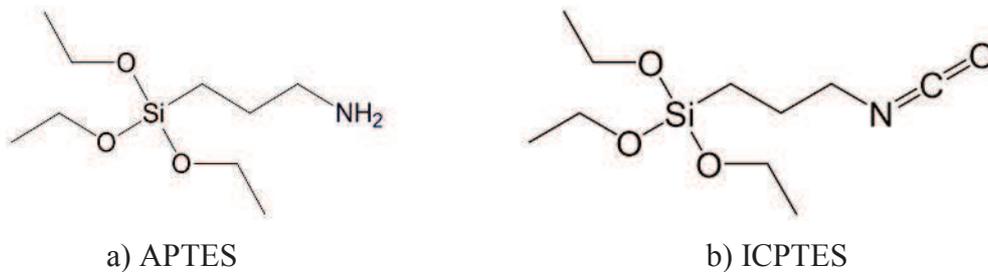


Figure 86. Formule semi développée d'alkoxysilanes :  
 a) APTES : 3-aminopropyltriéthoxysilane  
 b) ICPTES : 3-isocyanatopropyltriéthoxysilane

La fonctionnalisation de nanoparticules par des molécules possédant un point d'ancrage à base de phosphonate se développe de plus en plus pour des applications médicales (Figure 87) telles que l'hyperthermie (Lartigue *et al.* 2011), le greffage de dendrons pour éviter l'agrégation des nanoparticules en milieu physiologique (Basly *et al.* 2010), des systèmes de drug delivery<sup>6</sup> (Tudisco *et al.* 2012), l'imagerie bimodale IRM/SPECT (De Rosales *et al.* 2011) et pour des propriétés antibactériennes (Dong *et al.* 2011).

<sup>6</sup> Système de délivrance de médicaments

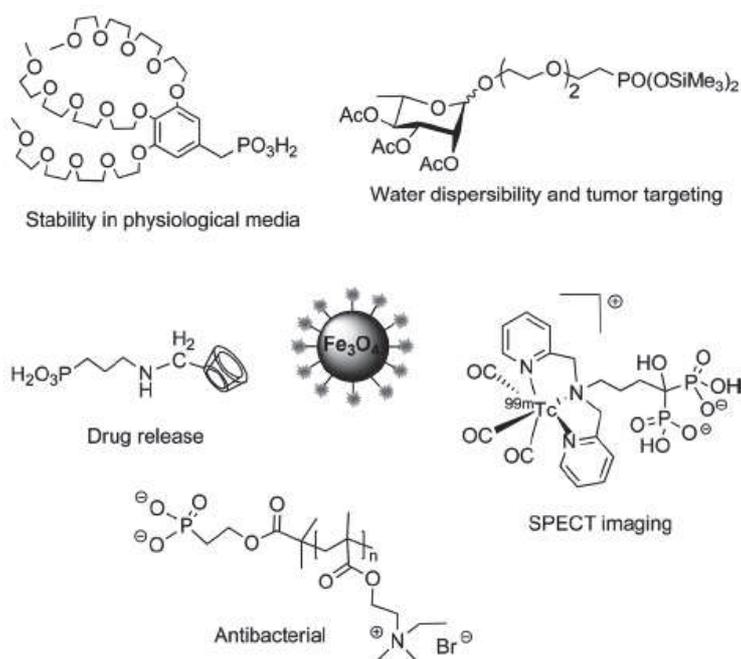


Figure 87. Exemples de nanoparticules d'oxydes de fer fonctionnalisées par des phosphonates pour des applications médicales d'après (Guerrero *et al.* 2013)

Les molécules possédant un groupement acide carboxylique (Figure 88) sont souvent utilisées lors du processus de synthèse des nanoparticules d'oxydes de fer telles que l'acide oléique par exemple (Sun *et al.* 2002) ou l'acide citrique (Krishnamurti *et al.* 1991; Bee *et al.* 1995; Maurizi *et al.* 2011). Cependant, la liaison créée entre le groupement acide carboxylique et les hydroxydes de surface des nanoparticules d'oxyde de fer est fragile et peut être facilement rompue par l'augmentation de température. D'autres molécules possédant des groupements acide carboxylique ont été utilisées pour stabiliser les nanoparticules d'oxyde de fer telles que l'acide gluconique (Fauconnier *et al.* 1996), l'acide dimercaptosuccinique (Maurizi *et al.* 2009) ou des acides gras saturés (Shen *et al.* 1998).

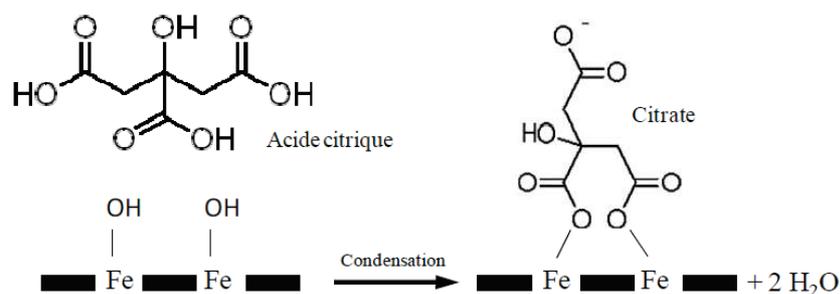


Figure 88. Greffage de citrates à la surface de la magnétite d'après (Jolivet 1994)

## II. Modification de la surface par des agents stabilisants électrostatiques

Dans cette partie, la stabilisation s'effectue par des agents stabilisants de type électrostatique. Les deux agents utilisés dans cette étude sont le 3-aminopropyltriéthoxysilane et l'acide 6-phosphonohexanoïque.

### II.1 - Propriétés et caractéristiques des agents stabilisants

#### II.1.1 - Le 3-aminopropyltriéthoxysilane

Le 3-aminopropyltriéthoxysilane ou plus communément appelé **APTES** est une petite molécule de formule semi-développée  $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_3 - \text{Si} - (\text{CH}_2)_3 - \text{NH}_2$  ( $M = 221 \text{ g.mol}^{-1}$ ). L'APTES possède une partie silane qui se fixera à la surface des nanoparticules et une partie amine qui permettra la stabilité par répulsion électrostatique. La réaction de greffage de l'APTES à la surface d'oxyde métallique se déroule en 4 étapes (Figure 89) :

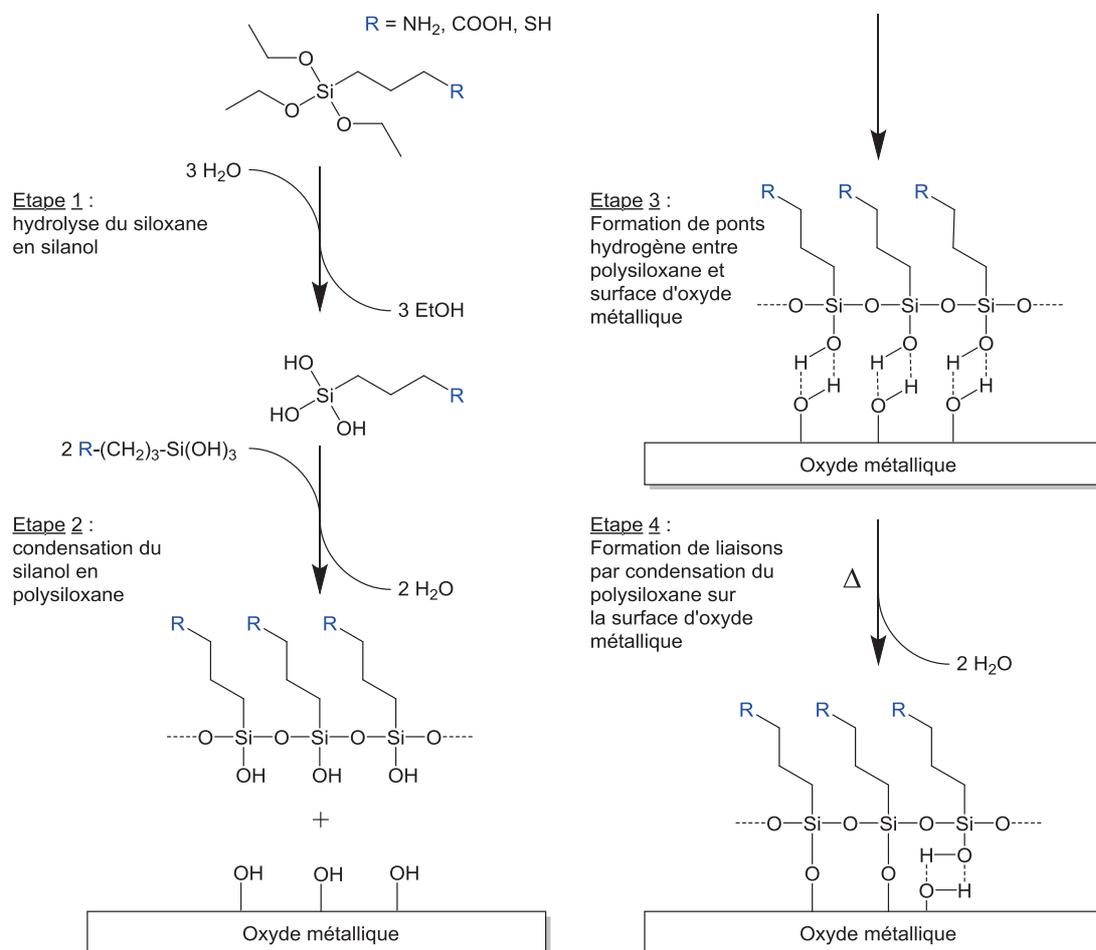


Figure 89. Les différentes étapes de greffage de l'APTES à la surface des nanoparticules d'après (Mornet 2002)

1) La première étape est la réaction d'hydrolyse de l'APTES en solution aqueuse qui entraîne la formation d'un silanol  $\text{RSi}(\text{OH})_3$  avec le départ de l'alcool correspondant.

2) La deuxième étape est la réaction de condensation intermoléculaire des silanols en polysiloxanes (Wu *et al.* 2008).

3) La troisième étape est la formation de ponts hydrogène entre les polysiloxanes et la surfaces des oxydes métalliques.

4) L'étape finale est le greffage par liaisons covalentes des silanols libres sur les hydroxyles de surface de l'oxyde métallique. Certains silanols peuvent rester aussi en interaction électrostatique avec la surface de l'oxyde si la couche de siloxanols n'est pas assez condensée.

Dans le cadre de nos travaux, l'APTES a été caractérisé par FTIR (Figure 90). Les bandes à  $2400\text{ cm}^{-1}$  représentent les vibrations du  $\text{CO}_2$  lors de l'enregistrement du spectre car celui-ci se fait à l'air libre. Les bandes des modes de vibrations de la chaîne carbonée sont observées à  $2976$ ,  $2931$ ,  $2891$  et  $2735\text{ cm}^{-1}$  mais aussi dans la zone à  $1400\text{ cm}^{-1}$  avec les modes de déformations des  $\text{CH}_2$ . De plus, les modes de vibration des liaisons C – C sont observées à  $1075\text{ cm}^{-1}$ . Les liaisons  $\text{CH}_2 - \text{O}$  de l'APTES sont remarquées par la présence de la bande à  $1169\text{ cm}^{-1}$  et le silane de l'APTES est présent par le biais des bandes Si – O à  $780$  et  $957\text{ cm}^{-1}$ . Les bandes des modes de vibration et de déformation des amines sont présentes à  $1610$  et  $3300\text{ cm}^{-1}$ .

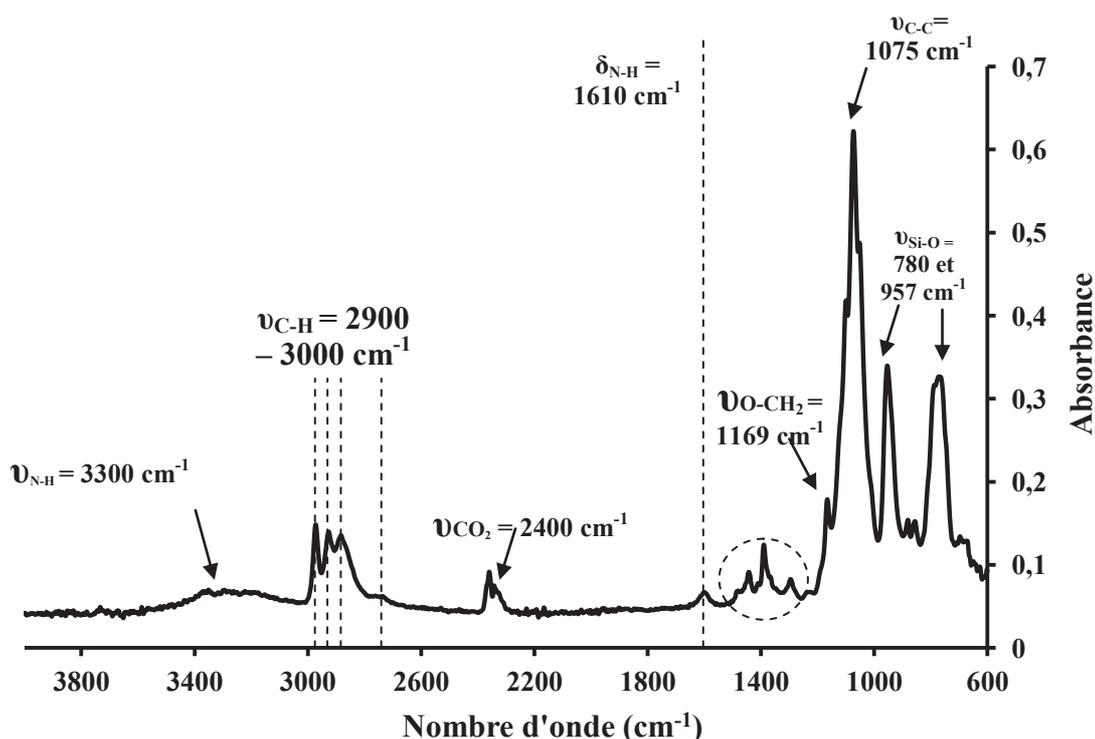


Figure 90. Spectre IR de l'APTES enregistré en ATR

Du fait du caractère liquide de l'APTES, celui-ci n'a pas pu être évalué en XPS. Mais, le niveau C1s devrait comporter deux composantes (C – C/C – H à  $284,5\text{ eV}$  et C –  $\text{NH}_2$  à  $286\text{ eV}$ ) et le niveau N1s ne devrait faire apparaître qu'une seule composante C –  $\text{NH}_2$  vers  $399,2\text{ eV}$ .

### II.1.2 - L'acide 6-phosphonohexanoïque

L'acide 6-phosphonohexanoïque se compose d'une fonction phosphonate et d'une chaîne carbonée finissant par un acide carboxylique (Figure 91) de formule semi-développée  $(P=O)(OH)_2 - (CH_2)_5 - COOH$  ( $M = 196 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Il sera dénommé **PHA** dans la suite du manuscrit.

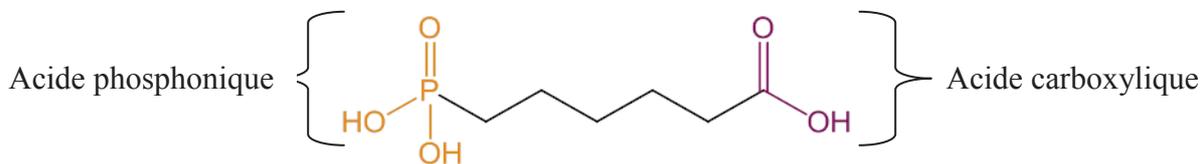


Figure 91. Formule semi-développée du PHA

Le groupement phosphonate permet d'assurer un greffage covalent à la surface des nanoparticules. De plus, des travaux ont souligné que les phosphonates permettaient un taux de greffage significativement plus élevé et une accroche plus forte qu'en utilisant des ligands à base de carboxylates (Park *et al.* 2006; Daou *et al.* 2007b). Dans le cas des phosphonates, trois types d'interactions avec la surface avec les nanoparticules d'oxydes de fer sont rapportés (Figure 92). L'accroche par les trois liaisons est la moins probable. La liaison de ligands phosphonate à la surface de dioxyde de titane a également été largement étudiée (Guerrero *et al.* 2001; Cozzoli *et al.* 2003; Ruiterkamp *et al.* 2011).

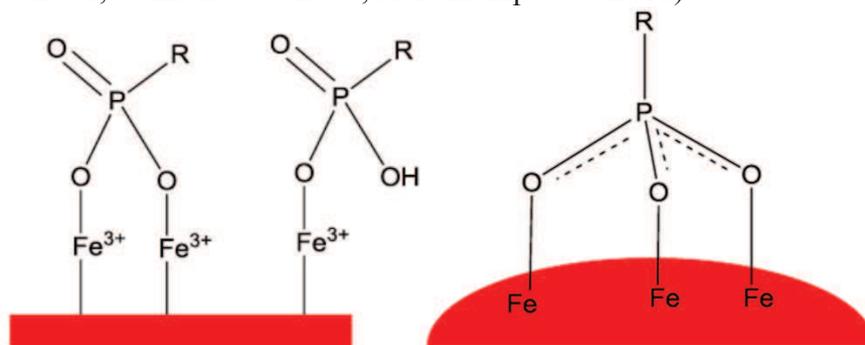


Figure 92. Représentation schématique des différentes accroches d'un phosphonate à la surface d'un oxyde métallique d'après (Mutin *et al.* 2005)

Dans le cadre de nos travaux, l'acide 6-phosphonohexanoïque a été caractérisé par spectroscopie infrarouge. Les bandes spécifiques de la chaîne carbonée sont présentes à  $2800 - 2900 \text{ cm}^{-1}$  qui correspondent aux modes de vibrations des liaisons C - H et à  $1300 - 1400 \text{ cm}^{-1}$  aux modes de déformations des liaisons C - H. Le pic à  $1712 \text{ cm}^{-1}$  est particulier au mode de vibration de la liaison C = O de l'acide carboxylique en bout de chaîne du PHA. Entre  $900 - 1100 \text{ cm}^{-1}$ , se trouvent les bandes caractéristiques des liaisons P - O du phosphonate et des liaisons C - C de la chaîne carbonée du PHA. La bande correspondant aux vibrations des liaisons P = O se situe à  $1330 \text{ cm}^{-1}$  (Figure 93).

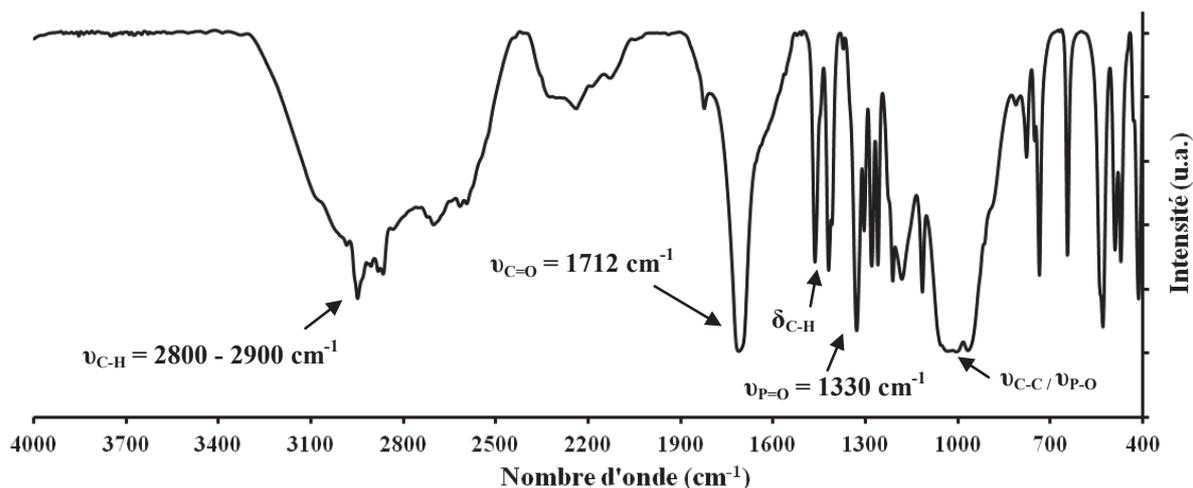


Figure 93. Spectre IR de l'acide 6-phosphonohexanoïque

L'acide 6-phosphonohexanoïque a été également étudié par XPS. Les concentrations atomiques des éléments composants le PHA comme le carbone, l'oxygène et le phosphore sont déterminées (Tableau 31). Les valeurs trouvées sont proches des valeurs théoriques calculées.

PHA	Concentration atomique (%)		
	C 1s	O 1s	P 2p
Théorique	50	41,7	8,3
Expérimentale	52	39	9

Tableau 31. Analyse XPS : Composition atomique du PHA

La décomposition du niveau C1s permet de distinguer quatre composantes (Figure 94). La composante majoritaire est celle des liaisons  $\underline{\text{C}} - \text{C}/\underline{\text{C}} - \text{H}$  de la chaîne carbonée du PHA à 284,5 eV. Les autres composantes sont les liaisons correspondant à l'acide carboxylique du PHA à 288,8 eV ( $\underline{\text{C}} = \text{O}$ ) - OH et à 287,2 eV ( $\underline{\text{C}} = \text{O}$ ) -  $\text{O}^-$  en très faible proportion (1%). La composante à 286,0 eV peut être attribuée par défaut aux liaisons  $\underline{\text{C}} - \text{P}$  car il y a dans le PHA autant de liaison acide carboxylique (10%) que de liaisons  $\underline{\text{C}} - \text{P}$  (7%) (Rouxhet *et al.* 2011).

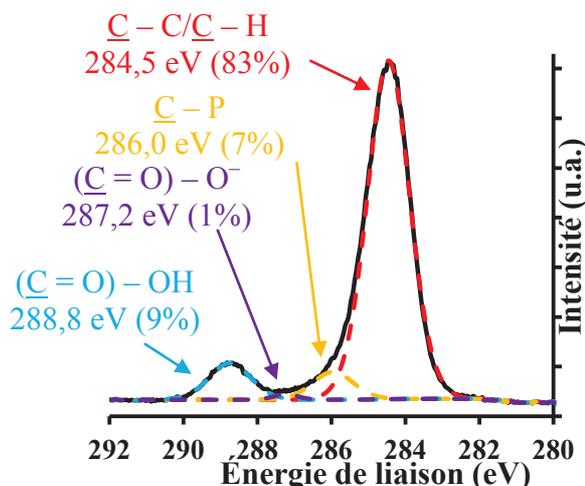


Figure 94. Analyse XPS : Décomposition du niveau C1s du PHA

À partir des composantes du niveau C1s, les composantes de l'oxygène peuvent être identifiées (Figure 95). Les deux composantes de l'oxygène de l'acide carboxylique du PHA sont présentes à 532,4 eV pour l'oxygène carbonyle de la liaison (C =  $\underline{O}$ ) – OH et à 533,2 eV pour l'oxygène hydroxyle de la liaison (C = O) –  $\underline{O}H$ . L'attribution de la dernière composante est principalement due aux liaisons du phosphore avec l'oxygène (P =  $\underline{O}$ /P –  $\underline{O}^-$ ) à 531,2 eV (Quan *et al.* 1989). Les oxygènes de l'acide carboxylique sous la forme carboxylate ((C = O) –  $\underline{O}^-$ ) à 531,1 eV sont négligeables car il y a très peu d'acide 6-phosphonohexanoïque sous la forme carboxylate d'après la décomposition du niveau C1s du PHA (Rouxhet *et al.* 2011).

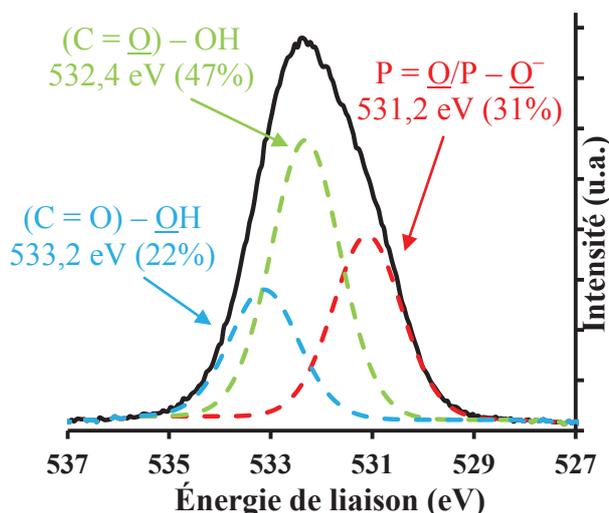


Figure 95. Analyse XPS : Décomposition du niveau O1s du PHA

## II.2 - Conditions de fonctionnalisation des nanoparticules

### II.2.1 - Protocole de fonctionnalisation

Les nanoparticules d'oxydes de fer ainsi que les nanotubes de titanate ont été fonctionnalisés à leur surface avec le même protocole. Seuls quelques ajustements tels que la quantité molaire d'agents stabilisants mis en jeu ont été effectués pour optimiser le taux de recouvrement.

Le couplage de l'APTES avec les nanoparticules (Figure 96) se déroule dans un mélange eau/ éthanol (50/50 en volume). 100 mg de nanoparticules (SPIO ou TiONts) sont ajoutées à 75 mL (95 mL pour les TiONts) de ce mélange eau/éthanol alors homogénéisé aux ultrasons (10 minutes). Ce mélange contenant les nanoparticules est placé sous agitation magnétique (400 trs/min). Une deuxième solution de 25 mL d'éthanol comprenant 1,1 mL d'APTES (1,7 mL pour les TiONts) est ajouté goutte à goutte à la suspension eau/éthanol contenant les 100 mg de nanoparticules. Le mélange est laissé sous agitation magnétique (400 trs/min) et sous atmosphère inerte ( $N_2$ ) pendant 48 heures à température ambiante. Le pH de la suspension est basique (pH 9 – 10).

Après 48 heures de réaction, 20 mL de glycérol sont ajoutés à la suspension qui est ensuite placée à l'évaporateur rotatif pour éliminer l'eau et l'éthanol (250 mbar/80°C). Cette étape permet de condenser au maximum la couche de polysiloxane à la surface des nanoparticules. Les nanoparticules modifiées contenues dans le glycérol sont lavées respectivement à l'acétone par décantation magnétique (6×400 mL) pour les nanoparticules d'oxydes de fer et par filtration sur membrane possédant une taille de pores de 30 kDa

(acétone/éthanol 80 : 20) pour les nanotubes de titanate. Un dernier cycle de 4 lavages à l'eau ultrapure (400 mL) est appliqué dans les mêmes conditions. La suspension est ensuite placée en dialyse pendant une semaine en changeant l'eau deux fois par jour pour terminer l'étape de lavage.

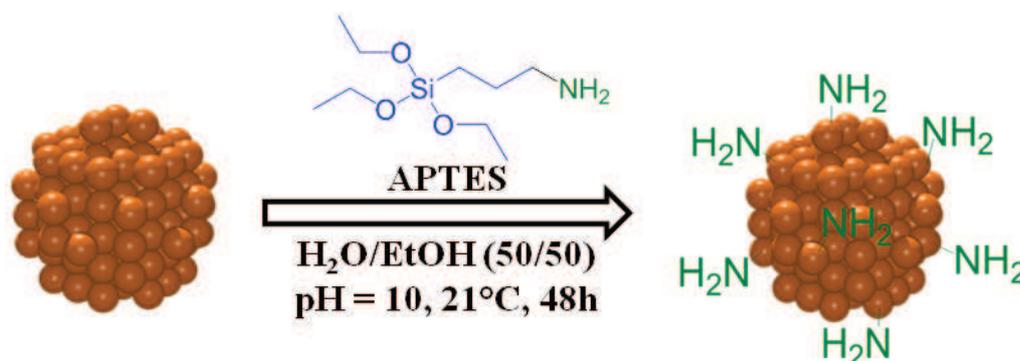


Figure 96. Représentation schématique du greffage de l'APTES sur les nanoparticules d'oxydes de fer<sup>7</sup>

Les nanoparticules d'oxydes de fer modifiées par l'APTES<sup>8</sup> seront nommées **SPIO – NH<sub>2</sub>** dans la suite du rapport, les nanotubes eux seront notés **TiONts – NH<sub>2</sub>**.

Le greffage du PHA avec les nanoparticules (Figure 97) se déroule également dans un mélange eau/éthanol (50/50 en volume). Dans un rapport en masse de [1 : 1], les nanoparticules et la poudre de PHA sont mélangées au bain à ultrasons pendant 10 minutes dans 100 mL (120 mL pour les TiONts) du mélange eau/éthanol. La suspension contenant les nanoparticules et le PHA est placée sous agitation magnétique (400 trs/min) et sous atmosphère inerte (N<sub>2</sub>) pendant 48 heures à température ambiante. Le pH de la suspension est acide (pH 4 – 5).

Après 48 heures de réaction, la suspension de nanoparticules modifiées est lavée par ultrafiltration sur membrane de taille de pores de 30 kDa (10×200 mL d'eau ultrapure) pour éliminer les phosphonates qui n'ont pas réagi.

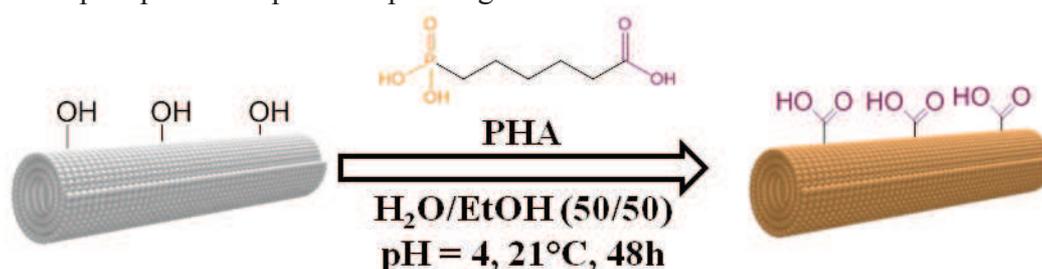


Figure 97. Représentation schématique du greffage du PHA sur les nanotubes de titanate<sup>7</sup>

Les nanoparticules d'oxydes de fer et les nanotubes modifiés par le PHA<sup>8</sup> seront intitulés respectivement **SPIO – COOH** et **TiONts – COOH** dans la suite du manuscrit.

<sup>7</sup> La couche de silane ou de phosphonate et les chaînes carbonées ne sont pas représentées sur les schémas.

<sup>8</sup> Pour simplifier l'écriture, seulement les fonctions d'intérêt seront notées dans la suite du manuscrit.

II.2.2 - Analyse des nanoparticules d'oxydes de fer modifiées par l'APTES et le PHA

II.2.2.1 - Stabilité des nanoparticules d'oxydes de fer modifiées

Les nanoparticules d'oxydes de fer modifiées ont un point isoélectrique différent des nanoparticules d'oxydes de fer nues (Figure 98). Les SPIO – NH<sub>2</sub> possèdent un point isoélectrique proche de (8,9 ± 0,8) et sont donc chargées positivement à pH = 7,4. À l'inverse, les nanoparticules d'oxydes de fer modifiées par le PHA ont un point isoélectrique plus acide, aux alentours de pH = (4,3 ± 0,4) et sont ainsi chargées négativement à pH = 7,4. Le diamètre hydrodynamique des SPIO – NH<sub>2</sub> est de d<sub>H</sub> = (19 ± 3) nm à pH= 7,4. À l'inverse, les nanoparticules d'oxydes de fer modifiées par le PHA ont un diamètre hydrodynamique plus grand, d<sub>H</sub> = (69 ± 2) nm à pH= 7,4.

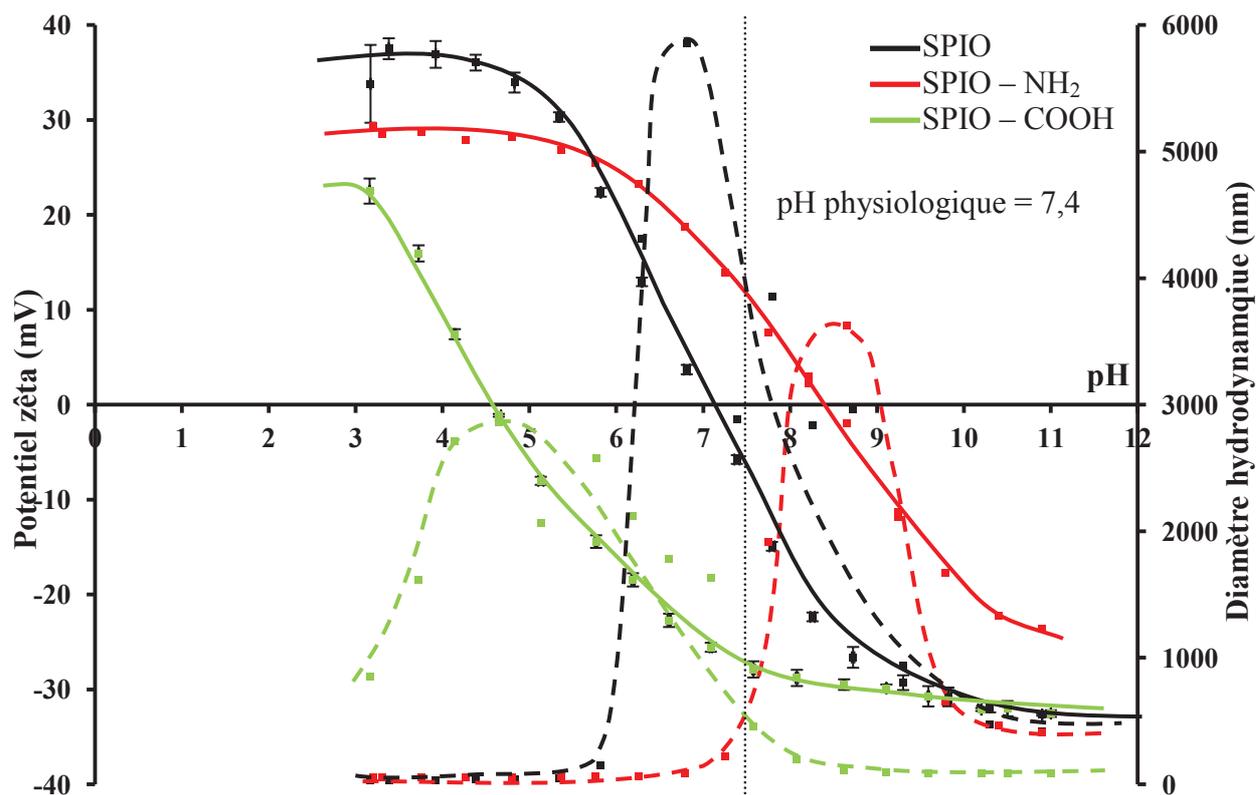


Figure 98. Évolution en fonction du pH du potentiel zêta et du diamètre hydrodynamique (courbes en pointillés et sans ultrasons) des SPIO, SPIO – NH<sub>2</sub> et SPIO – COOH dans NaCl (10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup>). Courbes représentatives d'un échantillon.

Le Tableau 32 réunit les valeurs du potentiel zêta et du diamètre hydrodynamique trouvées pour les nanoparticules modifiées par l'APTES et le PHA.

Synthèse	PIE	ζ à pH = 7,4 (mV)	d <sub>H</sub> à pH = 7,4 (nm)*	n
SPIO	7,2 ± 0,2	-8 ± 3	1368 ± 93	7
SPIO – NH <sub>2</sub>	8,9 ± 0,8	+17 ± 2	19 ± 3	13
SPIO – COOH	4,3 ± 0,4	-27 ± 2	69 ± 2	10

Tableau 32. Valeurs des points isoélectriques, du potentiel zêta et du diamètre hydrodynamique à pH = 7,4 pour les SPIO, SPIO – NH<sub>2</sub> et SPIO – COOH. \*Le diamètre hydrodynamique a été déterminé par DLS après passage aux ultrasons. n représente le nombre d'échantillons.

Les points isoélectriques des SPIO – NH<sub>2</sub> et des SPIO – COOH sont respectivement de l'ordre de pH = 9 et 4. Les effets de la modification de surface sont les mêmes que ceux observés dans la littérature, c'est-à-dire un décalage du point isoélectrique vers des pH plus élevés pour la modification *via* les amines et vers des pH plus bas avec les acides carboxyliques (Daou *et al.* 2007b; De Palma *et al.* 2007). Les diamètres hydrodynamiques correspondent aux ordres de grandeurs donnés dans la littérature (Mornet *et al.* 2005; Daou *et al.* 2008).

Les clichés MET montrent que les nanoparticules d'oxydes de fer modifiées par l'APTES et le PHA sont dispersées sous forme d'agglomérats sur la grille MET. Les plus petits sont des agrégats qui correspondent à la taille mesurée par diffusion de la lumière (Figure 99).

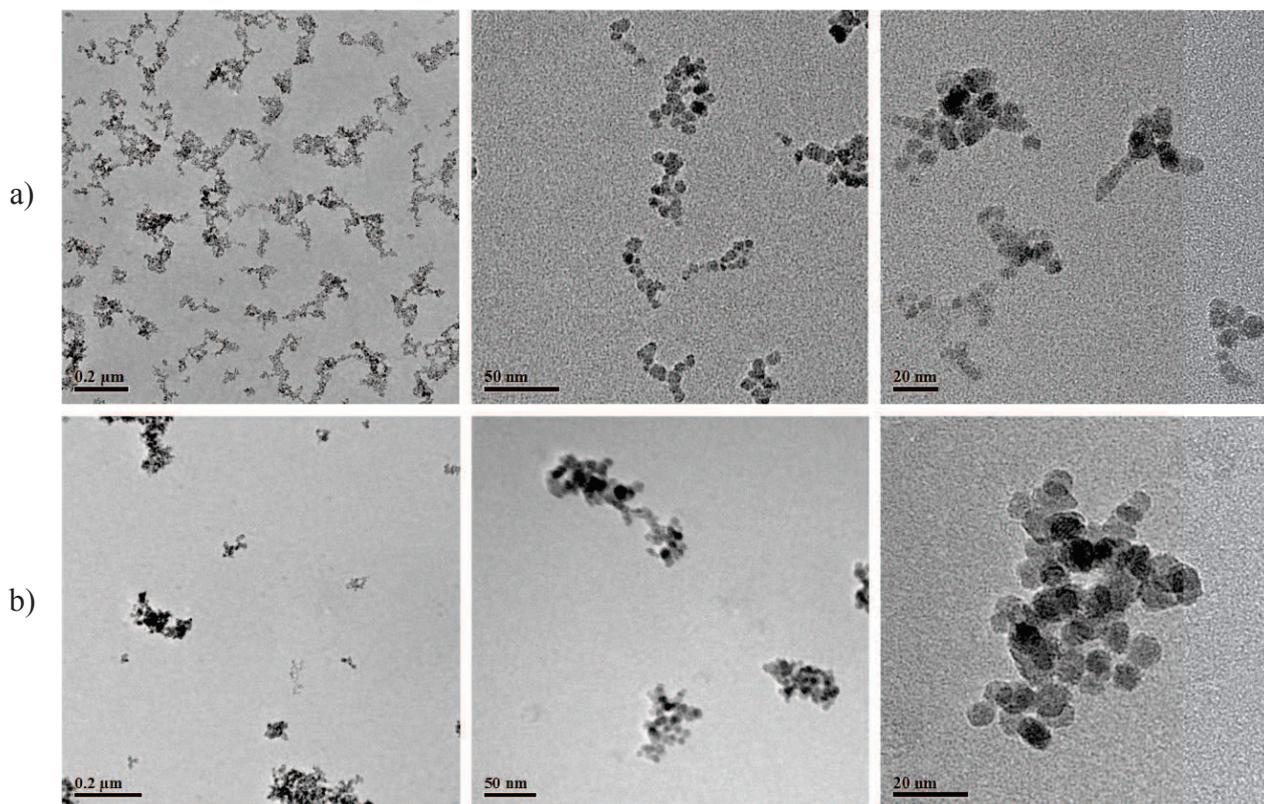


Figure 99. Clichés MET des a) SPIO – NH<sub>2</sub> et b) SPIO – COOH

#### II.2.2.2 - Analyse des nanoparticules d'oxydes de fer fonctionnalisées

Pour confirmer la présence d'une couche organique à la surface de la magnétite, celle-ci est caractérisée par spectroscopie infrarouge pour les SPIO – NH<sub>2</sub> et SPIO – COOH (Figure 100). Pour les nanoparticules modifiées, le spectre montre les deux bandes vibrationnelles de la liaison Fe – O à 580 et 640 cm<sup>-1</sup>, cette caractéristique est typique de nanoparticules d'oxydes de fer dont la structure spinelle est désordonnée (Mornet *et al.* 2005). Le pic situé à 1650 cm<sup>-1</sup> correspond à l'eau physisorbée et celui à 3400 cm<sup>-1</sup> aux hydroxyles de surface (Belin *et al.* 2004). La présence des bras de chaque ligand a été confirmée par l'apparition des bandes à 2915 et 2810 cm<sup>-1</sup> qui correspondent aux modes de vibrations des liaisons C – H.

Le greffage de l'APTES sur la surface des nanoparticules de magnétite a été confirmé par les bandes comprise entre 1150 – 1100 cm<sup>-1</sup> qui peuvent être assignées aux liaisons Si –

O – Si (Ma *et al.* 2003; Bini *et al.* 2012). Les bandes situées à  $1123\text{ cm}^{-1}$  peuvent également correspondre aux vibrations des liaisons C – C et celles à  $1020\text{ cm}^{-1}$  aux vibrations de la liaison C – N. Les faibles bandes à  $880$  et  $922\text{ cm}^{-1}$  révèlent la présence de liaisons Si – O – H et reflètent la vibration des OH de surface (Yamaura *et al.* 2004) laissant entendre que la couche du polysiloxane n'est pas complètement condensée. Les bandes de vibration N – H de la liaison amine situées à  $3410\text{ cm}^{-1}$  sont confondues avec celle de l'eau adsorbée. Par contre, la déformation de la liaison N – H à  $1560\text{ cm}^{-1}$  est clairement visible ce qui souligne la présence du ligand APTES à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer.

Dans le cas des SPIO – COOH, l'acide carboxylique qui termine la chaîne carbonée du ligand phosphonate est caractérisé par les bandes à  $1720\text{ cm}^{-1}$  et  $1240\text{ cm}^{-1}$  qui correspondent respectivement aux modes de vibrations des liaisons C = O et C – O. La partie du spectre comprise entre  $900$  et  $1200\text{ cm}^{-1}$  est plus délicate à interpréter car celle-ci peut correspondre aux modes de vibrations des liaisons C – C de la chaîne carbonée du PHA et aux modes de vibrations des liaisons P – O – Fe (Daou *et al.* 2007a). Cette bande est caractéristique de l'acide 6-phosphonohexanoïque (Figure 93), ce qui confirme la présence du PHA à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer. De plus, le pic de la vibration P – OH à  $920\text{ cm}^{-1}$  n'est pas vraiment visible et ne permet pas de conclure si le PHA est lié de façon bidentée ou monodentée à la surface des nanoparticules (Barja *et al.* 1999; Lartigue *et al.* 2009). Cependant les analyses FTIR prouvent qu'une liaison existe et que les phosphonates sont greffés à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer.

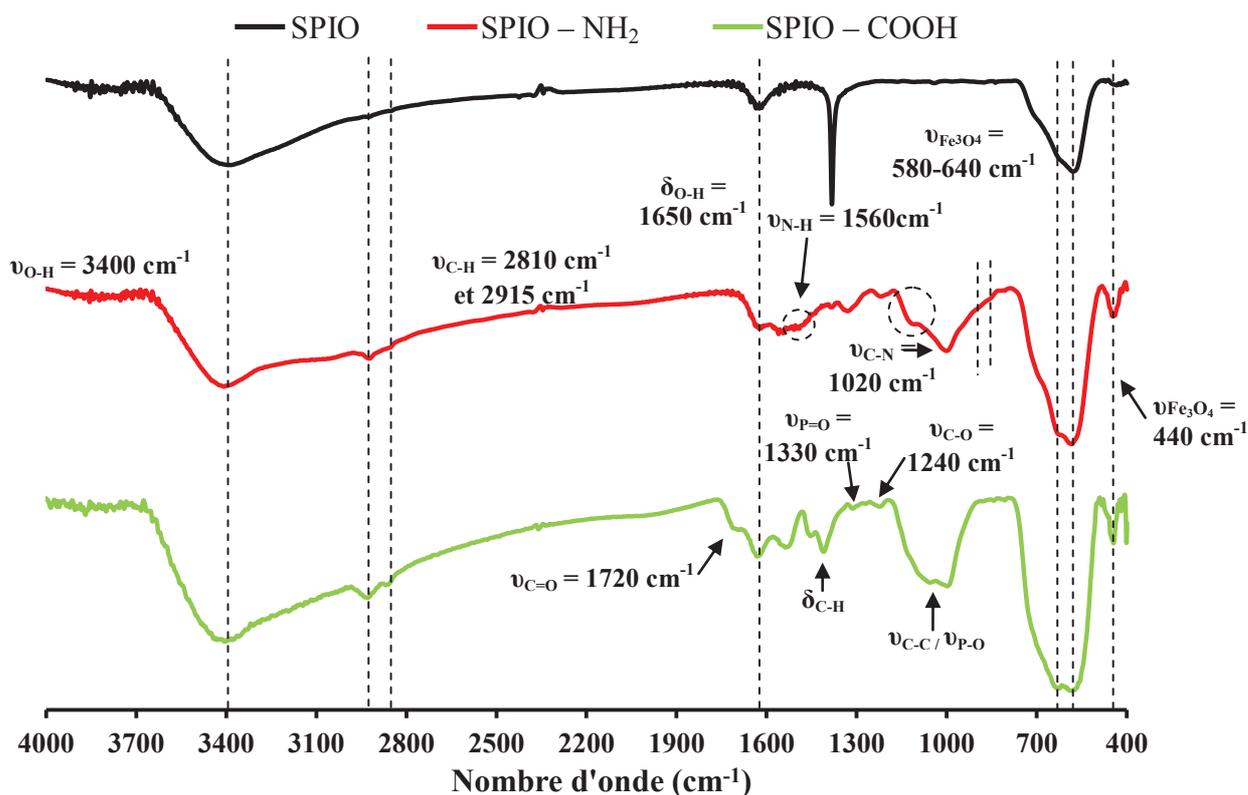


Figure 100. Spectres infrarouge des nanoparticules nues et modifiées par l'APTES et le PHA

Pour corréler les résultats de la spectroscopie infrarouge, les nanoparticules modifiées ont été analysées par XPS. La première observation est la diminution de la concentration en fer qui révèle la présence des ligands à la surface des nanoparticules modifiées. Cette baisse se traduit par l'augmentation en particulier du carbone et des éléments propres à chaque

ligand tels que l'azote, le silicium pour l'APTES et le phosphore pour le PHA (Tableau 33). Les concentrations d'azote et de silicium sont équivalentes car l'APTES est composé d'un atome de silicium et d'un atome d'azote ce qui prouve que le ligand silane n'est pas détérioré pendant le greffage.

Synthèse	Concentration atomique (%)					
	Fe 2p	O 1s	C 1s	N 1s	Si 2s	P 2p
<b>SPIO</b>	38	56	6	-	-	-
<b>SPIO – NH<sub>2</sub></b>	28	55	13	2	2	-
<b>SPIO – COOH</b>	29	52	17	-	-	2

Tableau 33. Analyse XPS : Concentration atomique des espèces présentes en surface des SPIO et SPIO modifiées par l'APTES et le PHA

Les niveaux 1s du carbone et de l'oxygène sont décomposés pour à la fois prouver la présence des ligands à la surface des nanoparticules et déterminer si le lien covalent entre les nanoparticules et les ligands existe (Figure 101). Le carbone présent à la surface des SPIO avant préfonctionnalisation est considéré comme du carbone de pollution. L'analyse par XPS des SPIO – NH<sub>2</sub> met en évidence la composante de la liaison  $\underline{\text{C}} - \text{NH}_2$  de l'APTES et celle des SPIO – COOH souligne la présence de la composante de la liaison  $\underline{\text{C}} - \text{P}$  du PHA.

La décomposition des niveaux O1s des SPIO modifiés met en avant l'apparition de nouvelles composantes (Figure 101). Pour les SPIO – NH<sub>2</sub>, les mêmes composantes que celles des SPIO sont observées. La seule différence notable est le déplacement de 0,5 eV de la composante des hydroxyles de surface. Ce déplacement est sûrement dû à l'enrobage des nanoparticules par l'APTES. Si la couche n'est pas entièrement condensée, certains hydroxyles de surface sont libres mais possèdent un environnement chimique différent, ce qui se traduit par le déplacement de la composante de 0,5 eV.

Pour les SPIO – COOH, les composantes correspondent à l'oxygène de réseau  $\text{O}^{2-}$  à 529,7 eV et à la double liaison ( $\text{C} = \underline{\text{O}}$ ) – OH de l'acide carboxylique à 532,2 eV. D'après le spectre XPS du PHA pur, la dernière composante à 531,0 eV coïncide avec les liaisons des phosphonates ( $\text{P} = \underline{\text{O}}$ ,  $\text{P} - \underline{\text{O}}^-$ ). De plus, la forme carboxylate ( $\underline{\text{C}} = \text{O}$ ) –  $\text{O}^-$  de l'acide carboxylique peut aussi contribuer à la formation de la composante à 531,0 eV, tout comme les hydroxyles de surface libres. La liaison Fe – O – P n'a cependant pas été identifiée *via* la technique XPS.

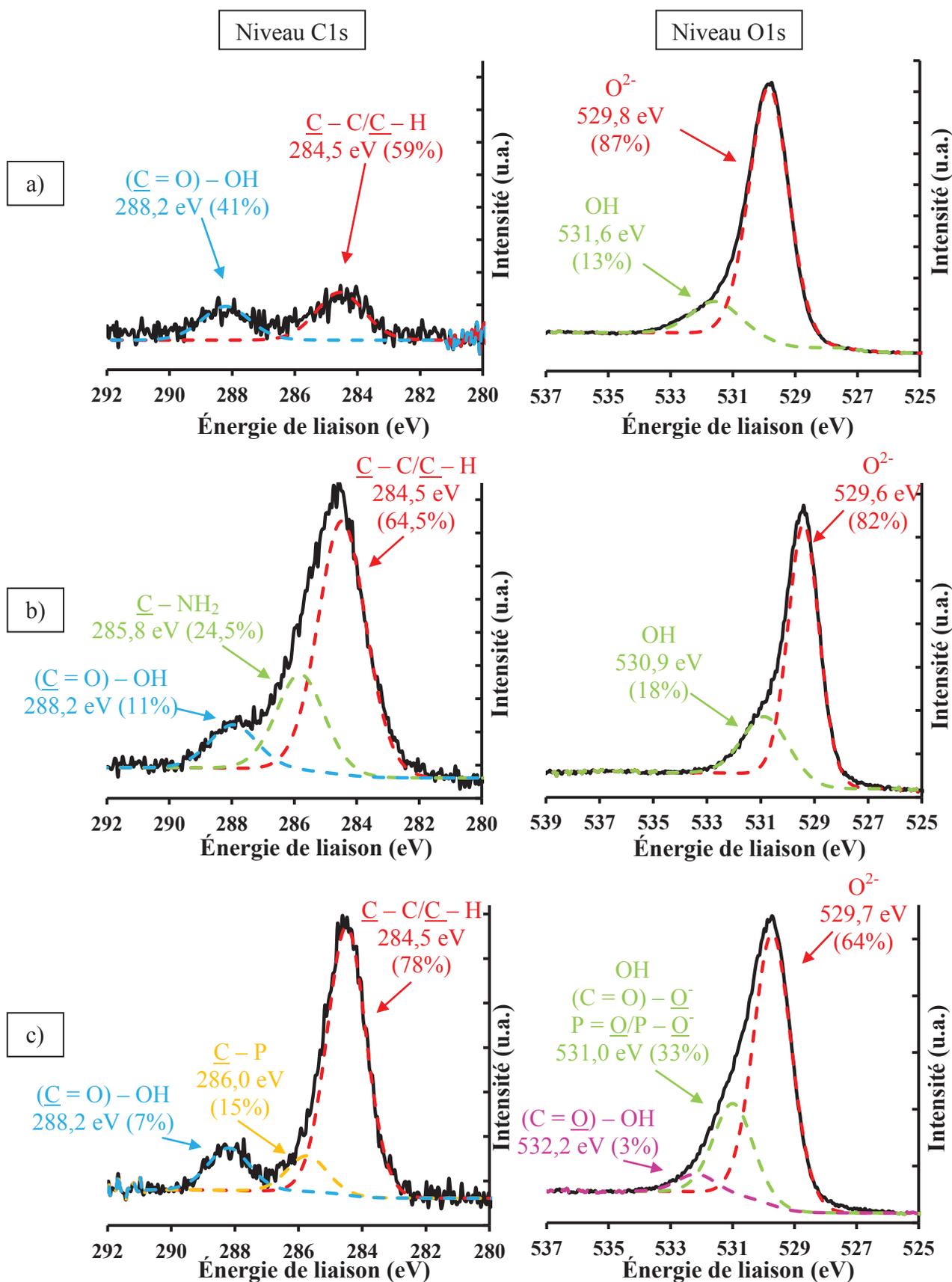


Figure 101. Analyse XPS : Décomposition des niveaux C1s et O1s, a) SPIO, b) SPIO - NH<sub>2</sub>, et c) SPIO - COOH

D'autre part, la décomposition du niveau N1s des SPIO – NH<sub>2</sub> met en évidence deux composantes à 399,3 eV à 401,1 eV (Böhmler *et al.* 2011) qui correspondent respectivement aux liaisons C – NH<sub>2</sub> et C – NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (Figure 102) alors que normalement il devrait n'y en avoir qu'une. Pour finir, le niveau P2p des SPIO – COOH ne présente qu'une seule composante à 132,8 eV comme pour le PHA seul (Joumaa *et al.* 2008).

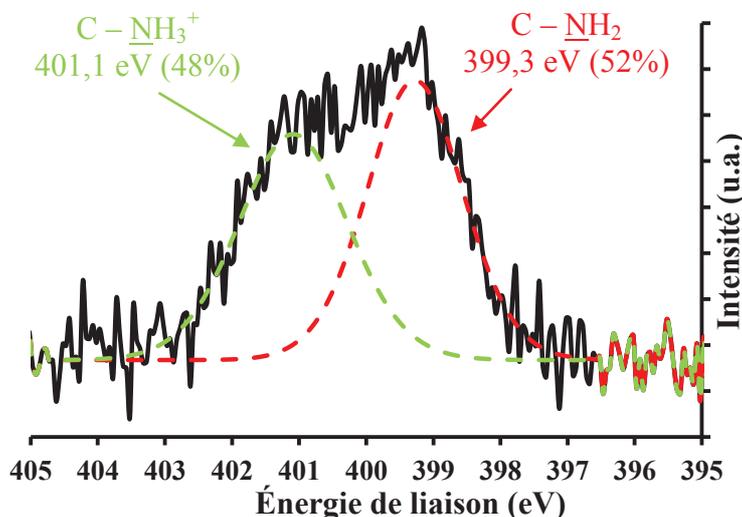


Figure 102. Analyse XPS : Décomposition du niveau N1s des SPIO – NH<sub>2</sub>

Les nanoparticules modifiées ont été analysées en ATG de 30°C à 800°C. La perte de masse entre 150 °C et 800°C des nanoparticules modifiées est plus importante que celle des SPIO nus suggérant la présence de ligands à la surface des nanoparticules (Figure 103). Les SPIO – COOH ont une perte de masse plus importante, ce qui n'est pas surprenant puisque la chaîne carbonée du PHA est plus lourde que celle de l'APTÉS (Tableau 34).

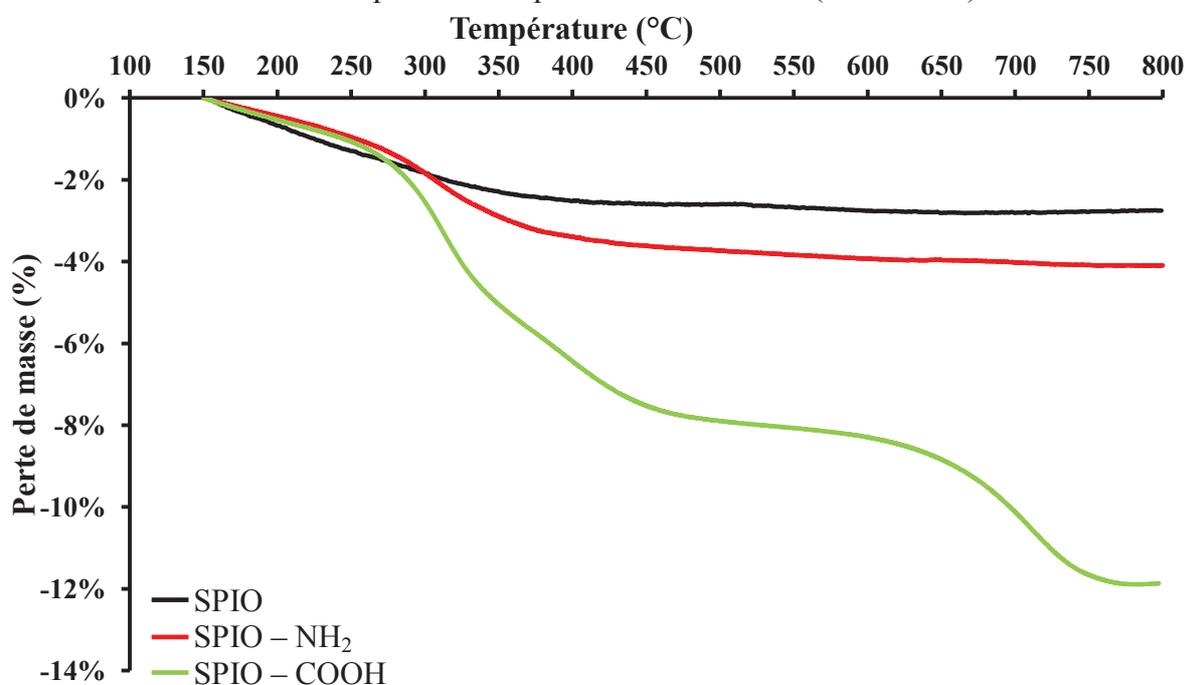


Figure 103. Analyse thermogravimétrique des SPIO, SPIO – NH<sub>2</sub>, SPIO – COOH. Les mesures ont été réalisées sous flux de N<sub>2</sub> (25 mL.min<sup>-1</sup>) avec une rampe de montée en température de 5°C.min<sup>-1</sup>. Les courbes ont été normalisées à 150°C (annexe n°3). Courbes représentatives d'un échantillon.

Cette technique permet d'estimer le taux de greffage des molécules organiques liées à la surface des nanoparticules en appliquant la formule (Équation 3) aux différentes ATG :

$$N_{Molécules} = \frac{(\Delta m_{calcul}) \cdot N_A}{M_{XX} \cdot S_{BET} \cdot 10^{18}} \quad (\text{Équation 3})$$

Avec  $N_{Molécules}$ , le nombre de molécules (NH<sub>2</sub>, COOH) par nm<sup>2</sup> ;  $\Delta m$ , la perte de masse entre 150°C et 800°C (%) ;  $M_{XX}$ , la masse molaire considérée de la partie organique (g.mol<sup>-1</sup>) ;  $S_{BET}$ , la surface spécifique des SPIO (92 ± 10 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>) et  $N_A$ , le nombre d'Avogadro (mol<sup>-1</sup>).

Pour estimer le taux de greffage des nanoparticules modifiées, il faut poser une hypothèse. Seule la partie organique du ligand doit être considérée comme perte de masse entre 150°C et 800°C car selon l'XPS, le silicium et le phosphore sont toujours présents après ATG. Par exemple, pour l'APTES, c'est la partie amino-propyl qui est considérée comme perte de masse en ATG soit une masse molaire de 58 g.mol<sup>-1</sup>. Les estimations des taux de greffage calculés avec l'équation 3 pour les SPIO – NH<sub>2</sub> et SPIO – COOH sont regroupées dans le Tableau 34.

	$\Delta m$ totale (%)	Masse molaire considérée (g.mol <sup>-1</sup> )	molécules/nm <sup>2</sup>	R (%)	n
<b>SPIO</b>	0,9*	18	(6,7 ± 0,6) OH	-	5
<b>SPIO – NH<sub>2</sub></b>	4,1	58	(5,0 ± 0,7) NH <sub>2</sub>	75	13
<b>SPIO – COOH</b>	11,9	115	(5,3 ± 0,6) COOH	79	10

Tableau 34. Estimation du taux de greffage pour les nanoparticules d'oxydes de fer modifiées par l'APTES et le PHA. \*Perte de masse entre 300°C et 800°C. R représente le rendement de greffage (%) et n le nombre d'échantillons analysés.

Les estimations du taux de greffage des nanoparticules d'oxydes de fer modifiées par l'APTES et le PHA sont sensiblement les mêmes et sont de l'ordre de 5 molécules par nm<sup>2</sup>.

Pour confirmer les résultats en ATG, une analyse élémentaire (annexe n°1) des SPIO – NH<sub>2</sub> a été réalisée. Les SPIO – COOH ne seront pas analysés par cette méthode car le phosphore n'est pas détectable par cette technique à Dijon. En utilisant la concentration massique de l'élément azote déterminée par analyse élémentaire, il est possible d'estimer la quantité de NH<sub>2</sub> par nm<sup>2</sup> pour 1 gramme de nanoparticules (Tableau 35).

$$N_{Molécules} = \frac{\%N \cdot N_A}{M_N \cdot S_{BET} \cdot 10^{18}} \quad (\text{Équation 4})$$

Avec  $N_{Molécules}$ , le nombre de NH<sub>2</sub> par nm<sup>2</sup> ; %N, la concentration massique de l'élément azote (%) ;  $M_N$ , la masse molaire de l'azote (g.mol<sup>-1</sup>) ;  $S_{BET}$ , la surface spécifique des SPIO (92 ± 10 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>) et  $N_A$ , le nombre d'Avogadro (mol<sup>-1</sup>).

	Concentration massique (%)			NH <sub>2</sub> /nm <sup>2</sup>	n
	N	C	H		
<b>SPIO – NH<sub>2</sub></b>	1,13	6,07	0,97	5,8 ± 1,5	11

Tableau 35. Analyse élémentaire de SPIO – NH<sub>2</sub>

Les estimations du taux de greffage par ATG et analyse élémentaire sont du même ordre de grandeur soit environ de 5 à 6 NH<sub>2</sub> par nm<sup>2</sup> confirmant les résultats d'ATG. Ainsi, le

nombre de molécules par  $\text{nm}^2$  des nanoparticules modifiées par le PHA ou l'APTES est correctement estimé par la méthode ATG. Dans la littérature, les taux de couverture sont du même ordre de grandeur (Mornet 2002; Daou *et al.* 2007a).

### II.2.3 - Propriétés des nanotubes de titanate fonctionnalisés par le PHA et l'APTES

#### II.2.3.1 - Stabilité des nanotubes de titanate modifiés

Malgré un point isoélectrique bas et une valeur de potentiel zêta élevée à  $\text{pH} = 7,4$  (de l'ordre de  $-30 \text{ mV}$ ), les nanotubes nus ne sont pas stables. Les mêmes phénomènes sont observés pour les nanotubes de titanate modifiés par l'APTES et le PHA. La modification de surface des TiONts par l'APTES a pour effet de décaler le point isoélectrique vers des pH plus hauts, aux alentours de 6,3. En revanche, la modification par le PHA modifie le point isoélectrique vers des pH plus bas, vers 3,2 comme déjà observé pour les SPIO (Figure 98). Cette modification de surface ne change pas la charge mais augmente un peu la stabilisation (Tableau 36).

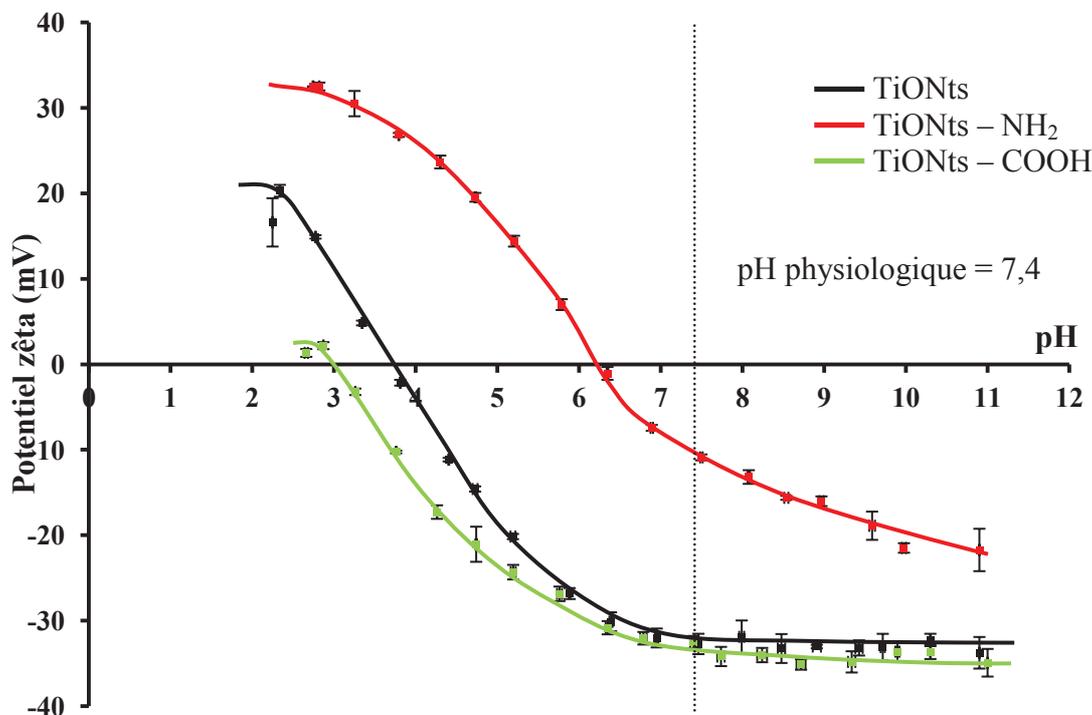


Figure 104. Évolution en fonction du pH du potentiel zêta des TiONts, TiONts - NH<sub>2</sub> et TiONts - COOH dans NaCl ( $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ ). Courbes représentatives d'un échantillon.

Le Tableau 36 regroupe les caractéristiques des nanotubes de titanate modifiés par l'APTES et le PHA.

Synthèse	PIE	$\zeta$ à pH = 7,4 (mV)	n
TiONts	$3,3 \pm 0,2$	$-32 \pm 3$	6
TiONts - NH <sub>2</sub>	$6,3 \pm 0,8$	$-13 \pm 4$	12
TiONts - COOH	$3,2 \pm 0,3$	$-35 \pm 3$	6

Tableau 36. Valeurs des points isoélectriques et des valeurs du potentiel zêta à  $\text{pH} = 7,4$  pour les TiONts, TiONts - NH<sub>2</sub> et TiONts - COOH. Les valeurs sont données pour n échantillons.

Comme pouvaient le laisser présager les valeurs de potentiels zêta à pH = 7,4 (Figure 104), Les composés TiONts – NH<sub>2</sub> ne sont pas stables par régime électrostatique dans les conditions proches du milieu physiologique après 24 heures. En revanche, les TiONts – COOH sont stables dans ces conditions mais aussi dans le PBS (Figure 105).

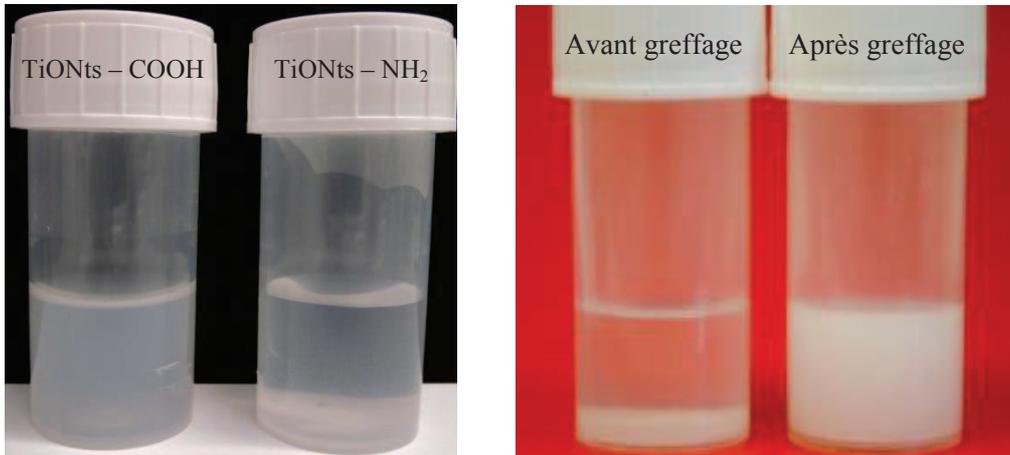


Figure 105. Photographie des nanotubes modifiés dans NaCl ( $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ ) à pH = 7,4 à 24 heures (à gauche) et des TiONts – COOH dans le PBS après 24 heures (à droite)

Selon les clichés MET, la modification de surface a permis de disperser les nanotubes en agglomérats d'une centaine de nanomètres (Figure 106) et ceux-ci ne se retrouvent plus sous forme d'agglomérats de quelques micromètres comme les TiONts non modifiés (Figure 25 b).

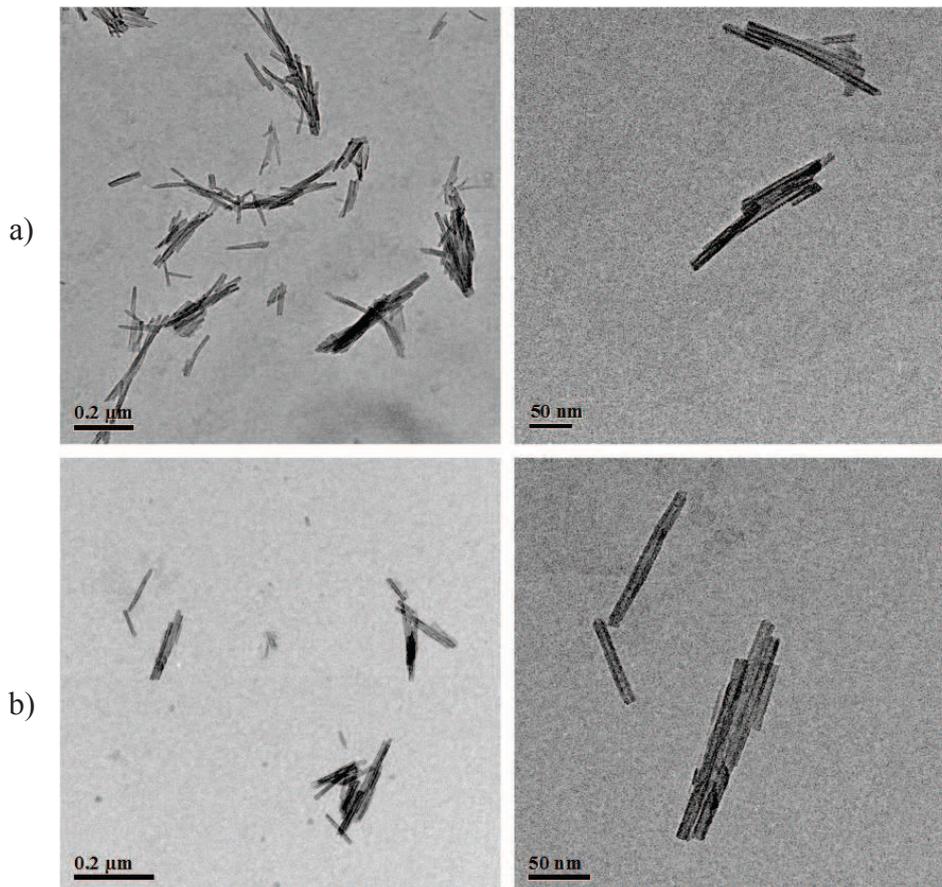


Figure 106. Clichés MET des nanotubes modifiés par a) l'APTES et b) le PHA

## II.2.3.2 - Analyse des nanotubes de titanate modifiés par le PHA et l'APTES

La spectroscopie FTIR a été utilisée pour caractériser les nanotubes de titanate et a montré l'existence de groupes hydroxyles à leur surface *via* la présence des vibrations à  $1630\text{ cm}^{-1}$  et  $3400\text{ cm}^{-1}$  (Sun *et al.* 2003). Les bandes à  $2400\text{ cm}^{-1}$  représentent les vibrations du  $\text{CO}_2$  lors de l'enregistrement du spectre car celui-ci se fait à l'air libre. Les nanotubes semblent toujours sous la même forme et composition car les modes de vibrations spécifiques aux nanotubes à  $470\text{ cm}^{-1}$ , à  $917\text{ cm}^{-1}$  et la bande entre  $700 - 750\text{ cm}^{-1}$  sont encore présentes après greffage.

La présence des chaînes carbonées de chaque ligand a été confirmée par l'apparition des bandes à  $2915$  et  $2960\text{ cm}^{-1}$  qui correspondent aux modes de vibrations des liaisons C – H. Les bandes de vibration N – H de la liaison amine situées à  $3250\text{ cm}^{-1}$  et  $1625\text{ cm}^{-1}$  sont confondues avec celle de l'eau adsorbée.

Les modes de vibrations vers  $1050\text{ cm}^{-1}$  peuvent correspondre aux liaisons C – C mais aussi aux modes de vibrations caractéristiques des ligands APTES (Si – O – Si) et du PHA (P – O). La différence n'est pas facilement observable en infrarouge mais laisse présager la présence des ligands à la surface des nanotubes de titanate (Figure 107).

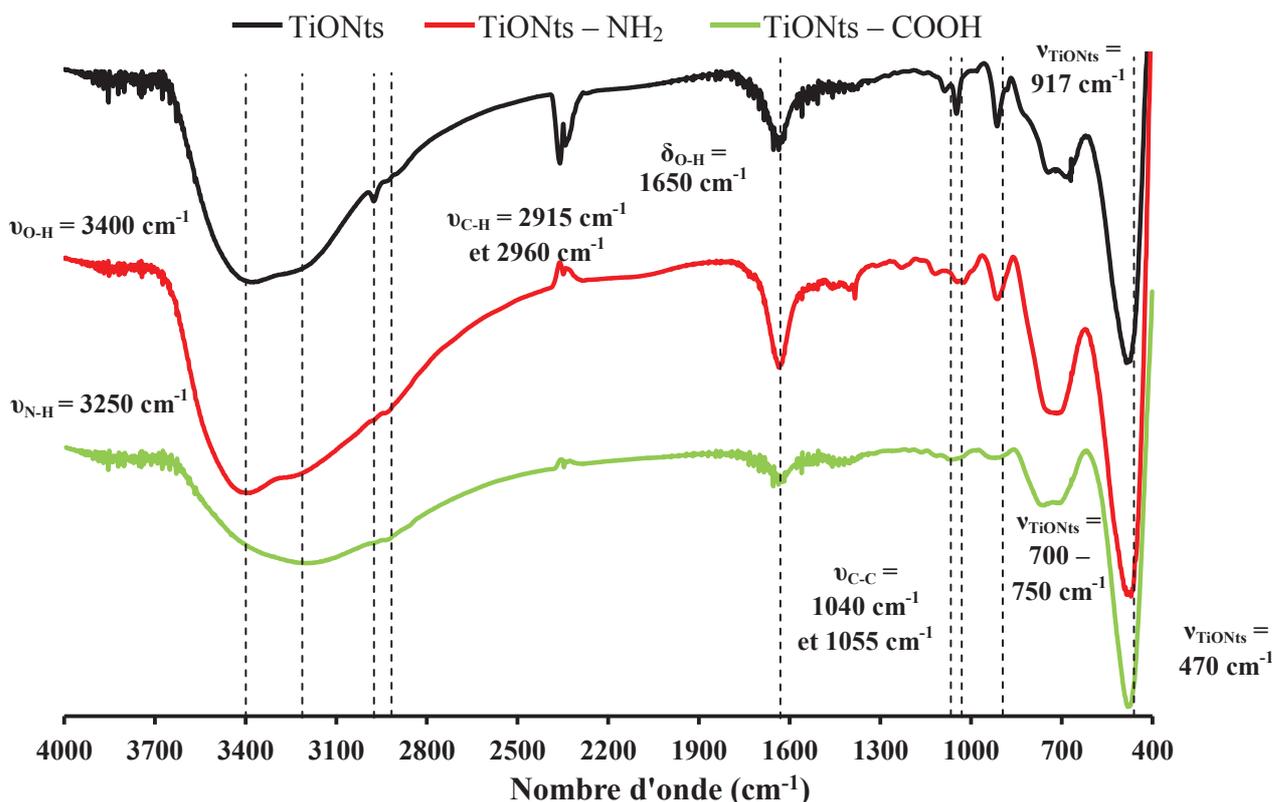


Figure 107. Spectres infrarouge des  $\text{TiONts}$ ,  $\text{TiONts} - \text{NH}_2$  et  $\text{TiONts} - \text{COOH}$

De même que pour les nanoparticules d'oxydes de fer modifiées, les nanotubes de titanate modifiés par l'APTES et le PHA ont été caractérisés par XPS. La première observation est l'augmentation en particulier du carbone et des éléments propres à chaque ligand tels que l'azote, le silicium pour l'APTES et le phosphore pour le PHA (Tableau 37).

Synthèse	Concentration atomique (%)						
	Ti 2p	O 1s	C 1s	Na KLL	N 1s	Si 2p	P 2p
TiONts	21	59	6	14	-	-	-
TiONts – NH <sub>2</sub>	19	54	13	8	3	3	-
TiONts – COOH	21	59	16	3	-	-	1

Tableau 37. Analyse XPS : Concentration atomique des espèces présentes en surface des TiONts et TiONts modifiées par l'APTES et le PHA

Les niveaux 1s du carbone et de l'oxygène sont aussi décomposés (Figure 108). La décomposition du niveau C1s permet de mettre en évidence l'apparition de la composante correspondant aux liaisons  $\underline{\text{C}} - \text{NH}_2$  des nanotubes modifiés par l'APTES. D'autre part, pour les TiONts – COOH, les composantes liées au squelette carboné du PHA sont identifiées telles que la composante correspondant aux liaisons  $\underline{\text{C}} - \text{P}$  et  $(\underline{\text{C}} = \text{O}) - \text{OH}$  de l'acide carboxylique. L'augmentation de la proportion des liaisons  $\underline{\text{C}} - \text{C}/\underline{\text{C}} - \text{H}$  révèle aussi la présence des ligands à la surface des nanotubes modifiés.

La décomposition des niveaux O1s des TiONts modifiés met en avant l'apparition de nouvelles composantes. Pour les TiONts – COOH, les composantes correspondent à l'oxygène de réseau  $\text{O}^{2-}$  à 529,7 eV et à la double liaison  $(\text{C} = \underline{\text{O}}) - \text{OH}$  de l'acide carboxylique à 532,2 eV. La composante à 531,0 eV peut être attribuée aux liaisons de l'oxygène avec le phosphore ( $\text{P} = \text{O}/\text{P} - \text{O}^-$ ) mais aussi aux hydroxyles de surface restants. En plus de la présence des ligands à la surface des TiONts – COOH, les électrons Auger du sodium ne sont plus présents à 535 eV car le greffage du PHA se produit à un pH acide et ainsi les ions sodium sont échangés avec les ions hydrogène du milieu  $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$  (Sun *et al.* 2003).

Au contraire, les nanotubes modifiés par l'APTES ne présentent pas de différence lors de la décomposition du niveau O1s. Les mêmes composantes que pour les nanotubes nus sont observées :

- à 529,7 eV, la composante des oxygènes de réseau  $\text{O}^{2-}$  ;
- à 531,5 eV, la composante des hydroxyles de surface OH ;
- à 535 eV, les électrons Auger du sodium.

La composante des hydroxyles de surface OH à 531,5 eV laisse penser que tous les hydroxyles de surface n'ont pas été utilisés lors du greffage de l'APTES. L'observation de la composante des hydroxyles de surface peut confirmer que les nanotubes ne sont pas entièrement fonctionnalisés par l'APTES à cause de la morphologie atypique des nanotubes.

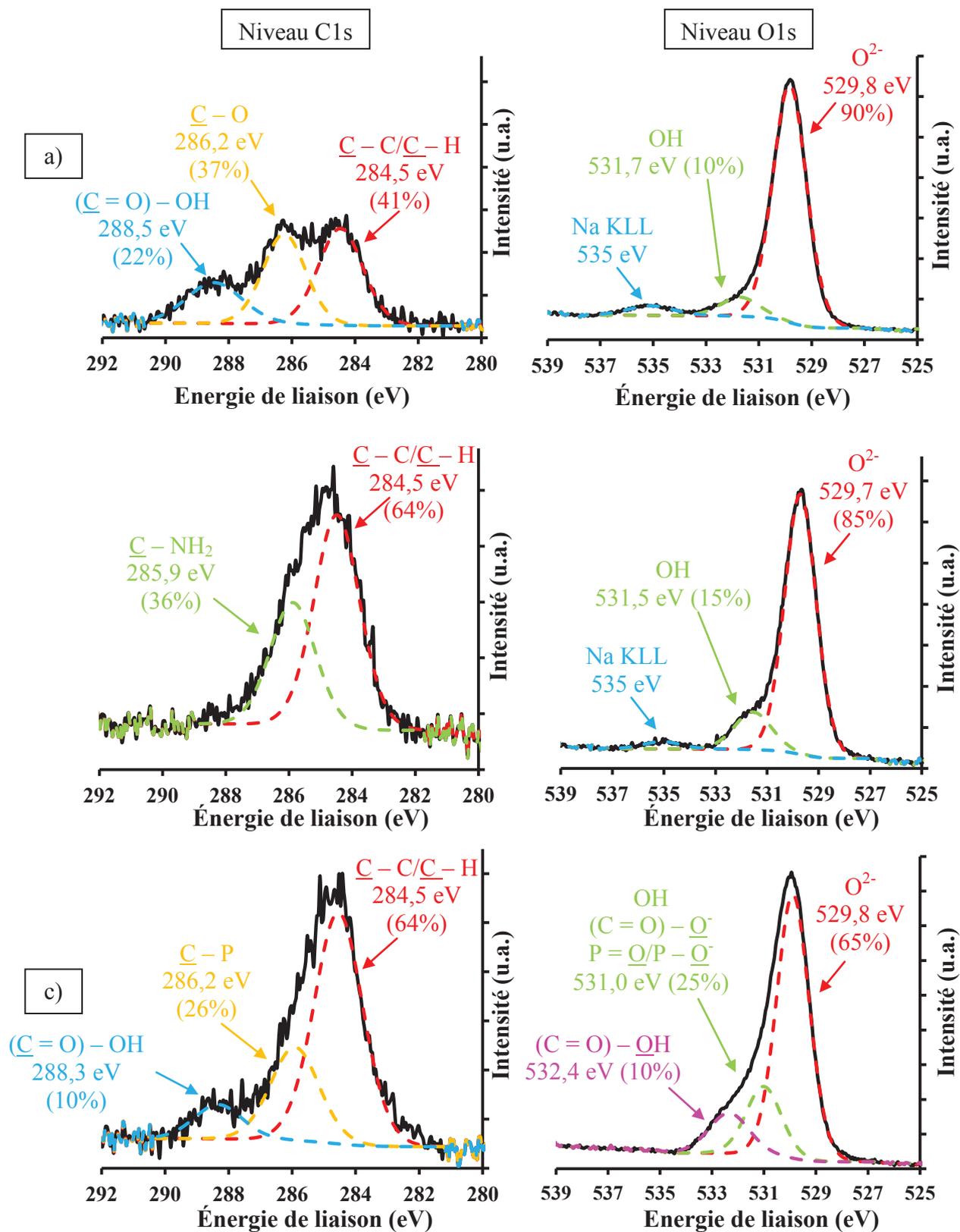


Figure 108. Analyse XPS : Décomposition des niveaux C1s et O1s, a) TiONts, b) TiONts - NH<sub>2</sub> et c) TiONts - COOH

D'autre part, la décomposition du niveau N1s des TiONts – NH<sub>2</sub> laisse aussi apparaître deux composantes à 399,2 eV et à 401,1 eV qui correspondent également aux liaisons types C – NH<sub>2</sub> et C – NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (Figure 109). De même que pour les SPIO – COOH, le niveau P2p ne présente qu'une seule composante.

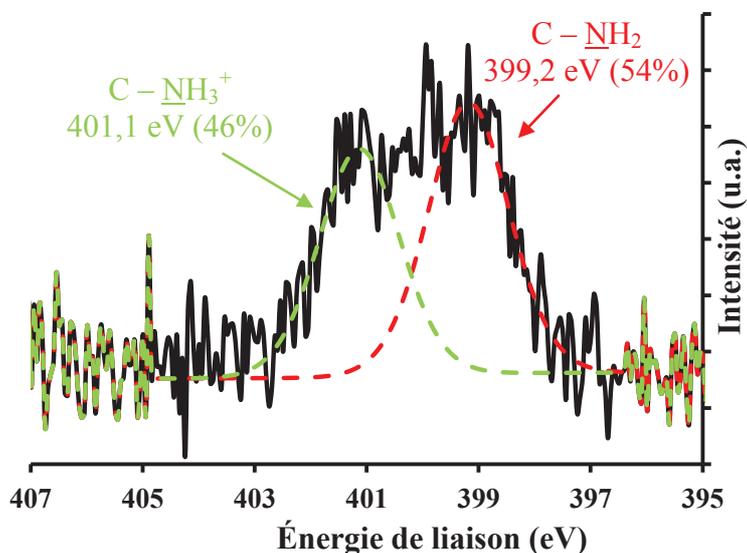


Figure 109. Analyse XPS : Décomposition du niveau N1s des TiONts – NH<sub>2</sub>

Les nanoparticules modifiées ont été analysées en ATG de 30°C à 800°C. La perte de masse des nanotubes modifiés entre 150°C et 800°C est plus importante que celle des nanotubes nus soulignant la présence de ligands à la surface des TiONts (Figure 110). Les mêmes tendances que pour les SPIO modifiés sont observées (Figure 103).

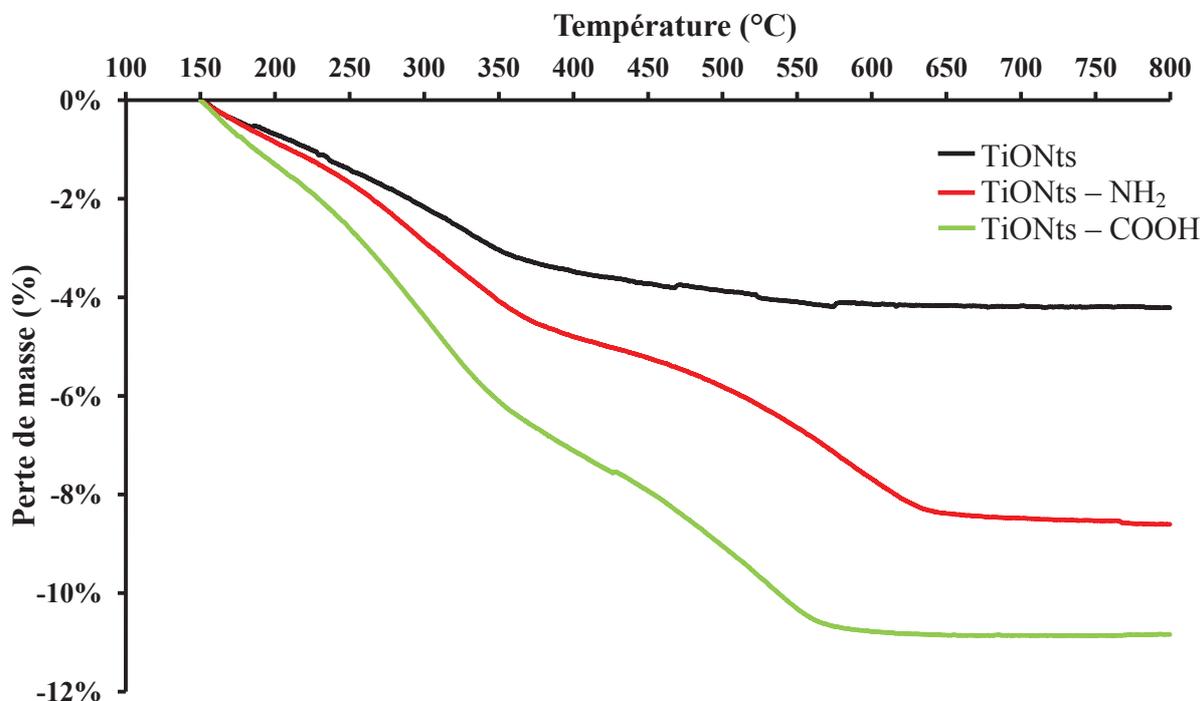


Figure 110. Analyse thermogravimétrique des TiONts, TiONts – NH<sub>2</sub>, TiONts – COOH. Les mesures ont été réalisées sous flux de N<sub>2</sub> (25 mL.min<sup>-1</sup>) avec une rampe de montée en température de 5°C.min<sup>-1</sup>. Les courbes ont été normalisées à 150°C (annexe n°3). Courbes représentatives d'un échantillon.

Ainsi, le taux de greffage des nanotubes modifiés peut être estimé à partir de la formule (Équation 3, annexe n°3). Le Tableau 38 regroupe les valeurs trouvées pour une surface spécifique des TiONts nus de  $(163 \pm 25) \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ .

	$\Delta m$ totale (%)	Masse molaire considérée ( $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	molécules/ $\text{nm}^2$	R (%)	n
TiONts	3,8	18	$(6 \pm 4) \text{ OH}$	-	10
TiONts – $\text{NH}_2$	8	58	$(5,7 \pm 0,8) \text{ NH}_2$	95	17
TiONts – $\text{COOH}$	10,9	115	$(3,1 \pm 0,5) \text{ COOH}$	52	8

Tableau 38. Estimation du taux de greffage pour les nanotubes modifiés par l'APTES et le PHA. R représente le rendement de greffage (%) et n le nombre d'échantillons analysés.

L'estimation du taux de greffage de l'APTES à la surface des TiONts est plus importante que celle des TiONts modifiés par le PHA. La chaîne carbonée qui est plus grande dans le cas du PHA doit certainement engendrer une gêne stérique plus forte, empêchant ainsi d'autres molécules du PHA de s'accrocher à la surface des nanotubes de titanate (6 carbones pour le PHA contre 3 pour l'APTES). Cependant, le greffage du PHA sur les nanoparticules d'oxydes de fer a conduit à un taux comparable à celui de l'APTES de l'ordre de  $5 \text{ COOH}/\text{nm}^2$  (Tableau 34), par conséquent la forme des nanoparticules joue aussi un rôle dans le mécanisme du greffage. La longueur plus grande des nanotubes permet peut être aux molécules du PHA de se coucher à leur surface et de limiter ainsi l'accès aux hydroxyles de surface (Figure 111).

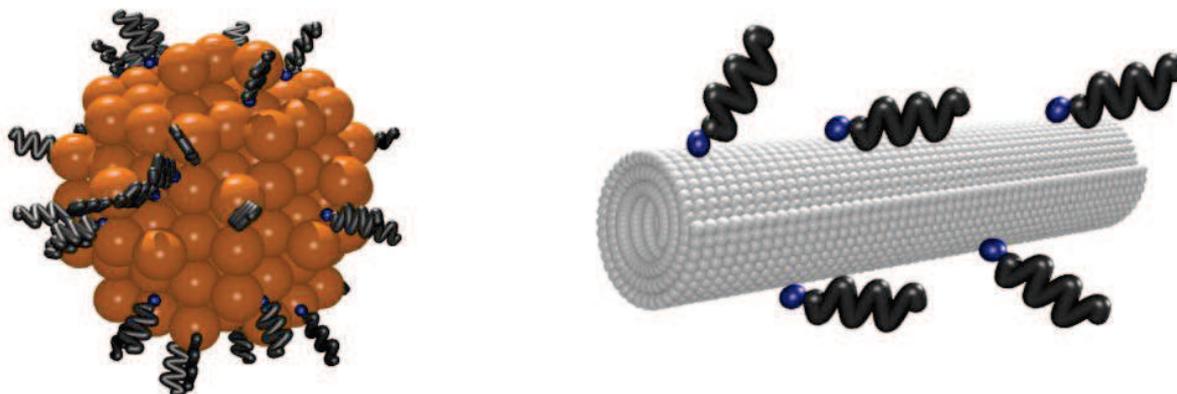


Figure 111. Représentation schématique en 3D des SPIO – COOH (à gauche) et des TiONts – COOH (à droite)

### II.2.4 - Étude de toxicité des nanoparticules préfonctionnalisées

#### II.2.4.1 - Test *in vitro* des nanoparticules préfonctionnalisées

L'étude pour évaluer la cytotoxicité *in vitro* a été réalisée sur la toute nouvelle plateforme technologique Welience «NanoCare» pour évaluer la cytotoxicité des nanoparticules préfonctionnalisées par l'APTES. Le principe consiste à mettre en évidence des perturbations de l'homéostasie cellulaire (équilibre de l'ensemble des paramètres physico-chimique) induites par la présence des nanoparticules.

Les cellules utilisées sont des cellules HepG2 (Figure 112) qui proviennent d'une lignée cellulaire immortelle d'origine humaine dérivée d'un carcinome hépatocellulaire prélevé sur un enfant de 11 ans (Aden *et al.* 1979). Les cellules HepG2 expriment la plupart des protéines plasmatiques caractéristiques des cellules hépatiques saines (Knowles *et al.* 1980). De plus, les différentes activités enzymatiques (phase I et II) identifiées dans ces cellules présentent l'avantage de mimer les processus d'activation et de détoxification qui ont lieu *in vivo* chez l'homme (Dearfield *et al.* 1983; Limbosch 1983).

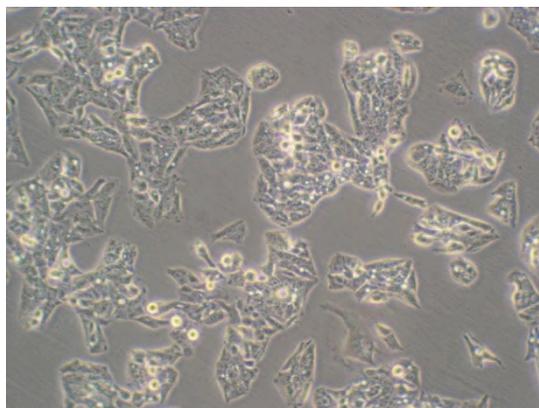
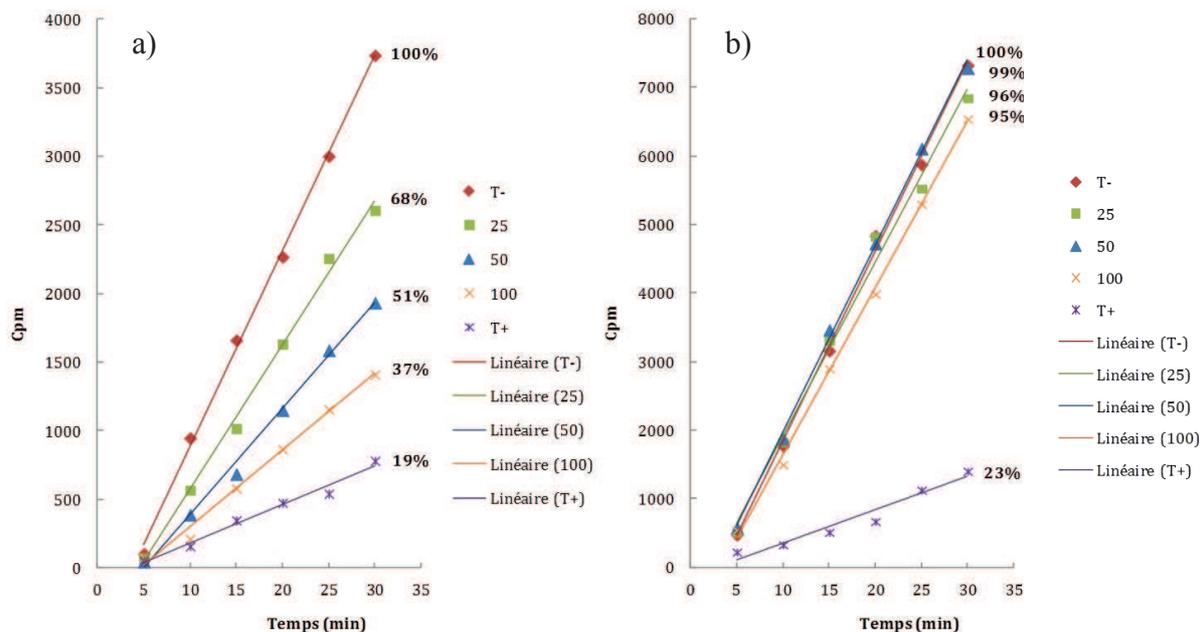


Figure 112. Photographie des cellules HepG2 à 70% de confluence (grossissement  $\times 400$ )

L'étude est réalisée par le biais du test de cinétique de synthèse des Acides Ribonucléique (ARN) totaux. Ce test quantitatif, reproductible et très sensible permet de mesurer la vitesse d'incorporation de l'uridine tritiée au cours du temps lors des synthèses d'ARN dans les cellules. Ce test a été privilégié par rapport aux tests classiques comme les tests MTT (Papa *et al.* 2013) ou Alamar Blue (Papa *et al.* 2013) en raison de sa robustesse et sa sensibilité. Une diminution de la vitesse traduit un début de cytotoxicité. Cette méthode a été décrite pour la première fois en utilisant la lignée cellulaire HeLaS3 qui se cultive en suspension (Fauris 1983). Ce test a alors été transposé et adapté à une lignée cellulaire adhérente, les cellules HepG2 (Valentin *et al.* 2001) puis automatisé afin de l'adapter à des études de screening (Valentin-Séverin *et al.* 2002).

Les études de cytotoxicité du test de cinétique de synthèse des ARN totaux ont été réalisées sur les SPIO – NH<sub>2</sub> et les TiONts – NH<sub>2</sub>. Le protocole ainsi que la démarche pour analyser les résultats sont décrits dans l'annexe n°8. Les analyses sont répétées trois fois (n = 3).



Les courbes de cinétiques d'incorporation de l'uridine tritiée peuvent être traduites sous forme d'histogramme pour présenter l'évolution de la cytotoxicité (Figure 114).

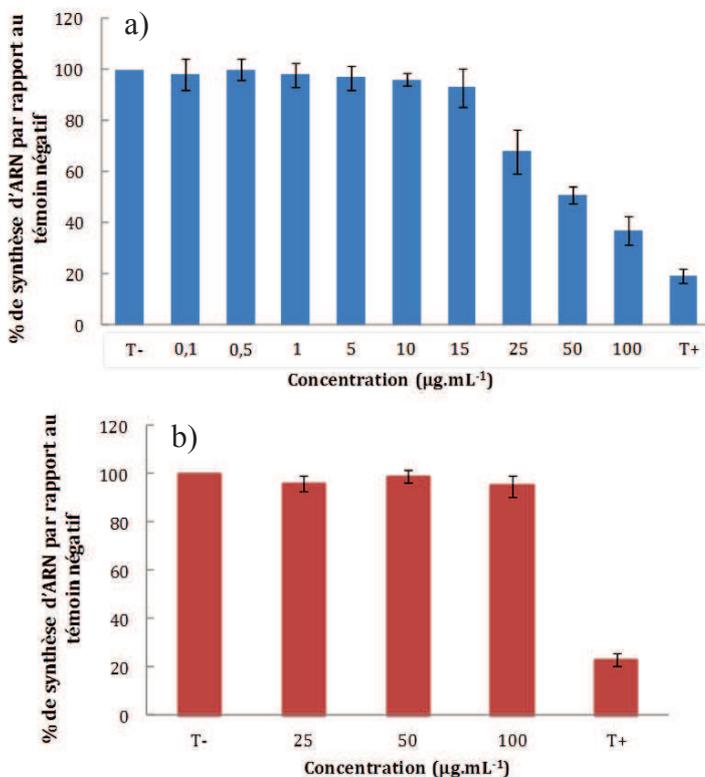


Figure 114. Histogramme présentant la cytotoxicité sur une gamme de concentration élevée variant de 0,1 à 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  a) SPIO-NH<sub>2</sub> et b) TiONts - NH<sub>2</sub> à 24 heures avec T- le témoin négatif : le milieu de culture (non cytotoxique) et T+ le témoin positif : le milieu de culture en présence de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (cytotoxique)

Pour les SPIO – NH<sub>2</sub>, un effet cytotoxique est observé en fonction de la dose. Plus la concentration est élevée plus la cytotoxicité est élevée. Dans ce cas, l'étude a été étendue sur une plage de concentrations plus faibles pour déterminer une gamme de concentration sans effet cytotoxique qui est comprise entre 0,1 et 15 µg.mL<sup>-1</sup>. Ainsi, la dose seuil de cytotoxicité est de 15 µg.mL<sup>-1</sup> dans le cas des SPIO – NH<sub>2</sub>. Ce résultat, assez surprenant illustre bien la sensibilité de ce test. En revanche, les TiONts – NH<sub>2</sub> ne présentent pas de cytotoxicité sur une gamme allant de 25 à 100 µg.mL<sup>-1</sup>.

#### II.2.4.2 - Test *in vivo* des nanoparticules préfonctionnalisées

La toxicité *in vivo* des nanoparticules préfonctionnalisées par l'APTES (SPIO – NH<sub>2</sub> et TiONts – NH<sub>2</sub>) est étudiée avec le modèle zebrafish (annexe n°7). La toxicité des nanoparticules préfonctionnalisées n'est pas avérée pour une concentration de 50 µg/mL (Figure 115 a). De plus, l'éclosion n'est pas perturbée ainsi que le développement des zebrafish au bout de 96 heures (Figure 115 b et c).

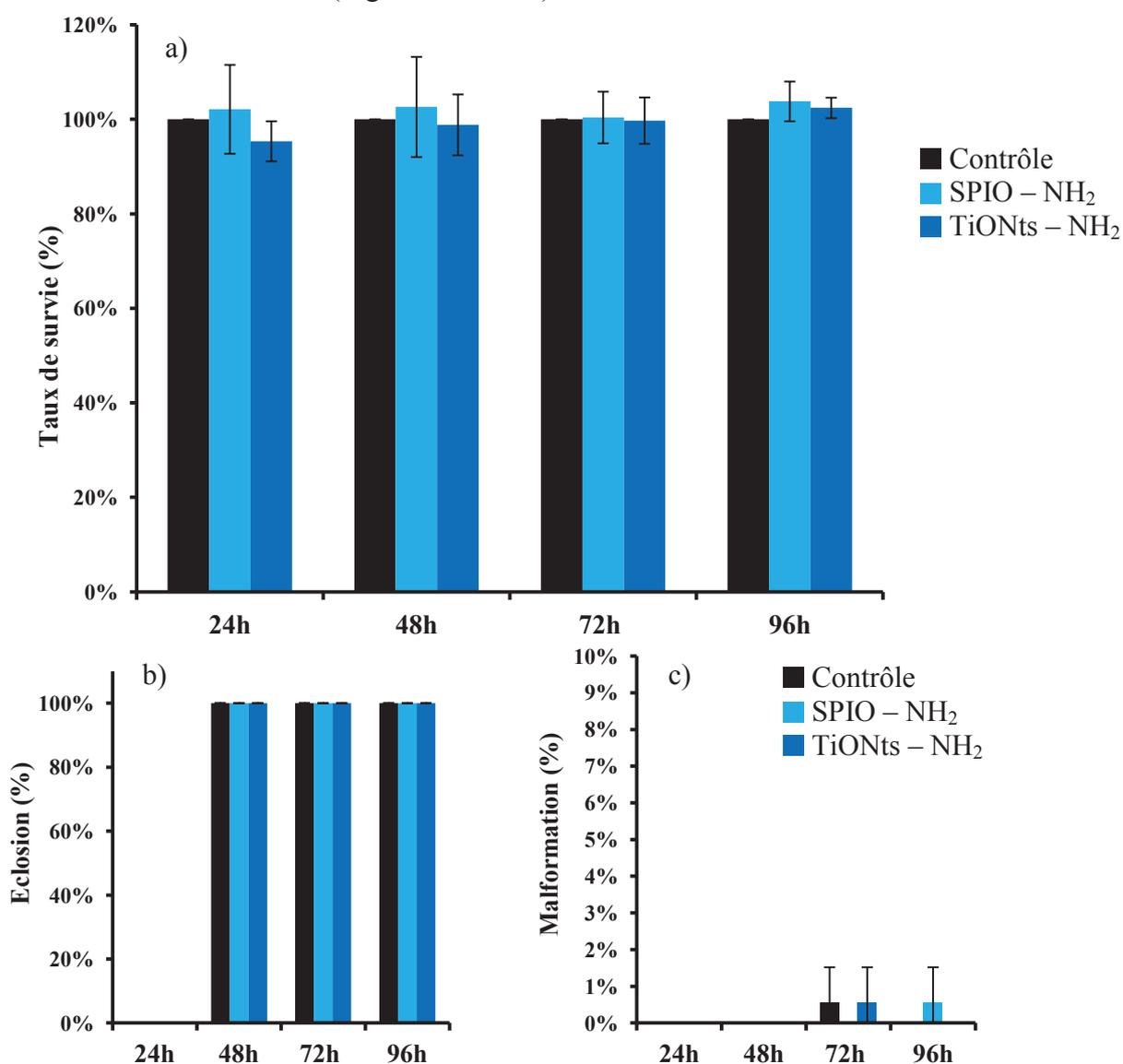


Figure 115. a) Taux de survie, b) éclosion et c) développement des zebrafish en présence des nanoparticules préfonctionnalisées par l'APTES à 50 µg/mL

### II.3 - Conclusion sur la stabilisation des nanoparticules par des agents permettant une stabilisation par voie électrostatique

Le greffage des deux ligands à la surface des deux types de nanoparticules est une réussite. Le taux de greffage est estimé à environ 5 molécules par  $\text{nm}^2$ , il est plus faible dans le cas des TiONts – COOH de l'ordre de 3 COOH/ $\text{nm}^2$ , ce qui est certainement dû à la gêne stérique engendrée par le bras carboné du PHA. Cependant, aucune technique d'analyse n'a permis de mettre en évidence un lien covalent entre les nanoparticules et les ligands. Cette modification de surface a pour effet de rendre la surface des nanoparticules plus réactive vis-à-vis de nouvelles fonctions organiques. Cependant, la valeur des charges de surface n'est pas suffisante pour stabiliser les nanoparticules modifiées dans les conditions physiologiques ( $\text{pH} = 7,4$  ; 0,9% NaCl) pour les nanoparticules d'oxydes de fer modifiées par l'APTES et le PHA, tout comme les TiONts –  $\text{NH}_2$ . En revanche, les nanotubes modifiés par le PHA sont stables dans ces mêmes conditions.

Des tests *in vitro* ont été réalisés et montrent que les SPIO –  $\text{NH}_2$  ont un effet cytotoxique en fonction de la concentration. Au dessous de  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , les SPIO –  $\text{NH}_2$  ne sont pas cytotoxiques. Cependant, au dessus  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , des essais effectués *in vivo* sur les zebrafish à  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ne soulignent pas ce phénomène. En revanche, les TiONts –  $\text{NH}_2$  ne présentent pas de cytotoxicité sur la gamme de 25 à  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , ni de toxicité *in vivo* à  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  sur le modèle zebrafish.

Le Tableau 39 regroupe toutes les caractéristiques des nanoparticules d'oxydes de fer et de nanotubes de titanate modifiés par les deux ligands : l'APTES et le PHA.

	PIE	$\zeta$ à $\text{pH} = 7,4$ (mV)	$d_H$ (nm) à $\text{pH} = 7,4$	Stabilité à $\text{pH} = 7,4$	$S_{\text{BET}}$ ( $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ )	Nombre/ $\text{nm}^2$ ATG	n
<b>SPIO</b>	$7,2 \pm 0,2$	$-8 \pm 3$	$1368 \pm 93$	non	$92 \pm 10$	$6,7 \pm 0,6$	5 – 7
<b>SPIO – <math>\text{NH}_2</math></b>	$8,9 \pm 0,8$	$+17 \pm 2$	$19 \pm 3$	non	<sup>-9</sup>	$5,0 \pm 0,7$	13
<b>SPIO – COOH</b>	$4,3 \pm 0,4$	$-27 \pm 2$	$69 \pm 2$	non	<sup>-9</sup>	$5,3 \pm 0,6$	10
<b>TiONts</b>	$3,3 \pm 0,2$	$-32 \pm 3$	<sup>-10</sup>	non	$163 \pm 25$	$6 \pm 4$	6 – 10
<b>TiONts – <math>\text{NH}_2</math></b>	$6,3 \pm 0,8$	$-13 \pm 4$	<sup>-10</sup>	non	<sup>-9</sup>	$5,7 \pm 0,8$	12 – 17
<b>TiONts – COOH</b>	$3,2 \pm 0,3$	$-35 \pm 3$	<sup>-10</sup>	oui	<sup>-9</sup>	$3,1 \pm 0,5$	6 – 8

Tableau 39. Caractéristiques des SPIO et TiONts modifiées par l'APTES et le PHA

Dans la première partie de ce travail (Chapitre 1.III – Création d'un nouveau nanocomposite : les TiONts – SPIO), la création d'un nouveau nanocomposite (TiONts – SPIO) par voie inorganique a été réalisée. Dans la suite de ce travail, une nouvelle manière de lier les deux nanoparticules a été envisagée : la voie organique. Cette nouvelle voie devrait permettre de greffer plus de nanoparticules d'oxydes de fer à la surface des nanotubes de titanate et d'assurer une liaison covalente.

<sup>9</sup> Pour la suite du manuscrit, seules les surfaces spécifiques des nanoparticules de départ seront considérées.

<sup>10</sup> Les diamètres hydrodynamiques ne sont pas déterminés dans le cas des TiONts car le calcul des diamètres est basé sur une morphologie sphérique.

### III. Couplage organique entre TiONts et SPIO modifiés pour la création d'un nouveau nanovecteur détectable en IRM

#### III.1 - Couplage organique entre TiONts et SPIO

Dans cette partie, des essais pour lier les deux nanoparticules de manière organique ont été effectués. Deux voies ont été envisagées, le greffage de SPIO – NH<sub>2</sub> avec des TiONts – COOH ou inversement la fonctionnalisation des TiONts – NH<sub>2</sub> avec des SPIO – COOH.

##### III.1.1 - Protocole

Dans le premier chapitre (Chapitre 1.III – Création d'un nouveau nanocomposite : les TiONts – SPIO), lors de la synthèse des TiONts – SPIO, le meilleur rapport Fe/Ti était le rapport [1 ; 0,5] pour l'obtention de nanotubes fonctionnalisés par les nanoparticules d'oxydes de fer. Ce même rapport a été gardé pour le greffage des SPIO avec les TiONts par voie organique, ceci à titre de comparaison entre les deux voies envisagées.

Pour cette raison, un mélange de SPIO modifiés et de TiONts modifiés dans un rapport Fe/Ti de [1 ; 0,5] est mis en présence d'1-ethyl-3-diméthylaminopropylcarbodiimide.HCl (EDC) et de N-hydroxysuccinimide (NHS) dans une solution aqueuse. Le pH de la suspension est fixé à pH = 5 (TiONts – NH<sub>2</sub> et SPIO – COOH) et pH = 6 (TiONts – COOH et SPIO – NH<sub>2</sub>) pour que les deux types de nanoparticules modifiées soient stables pendant la durée du greffage. Le mélange est soumis au bain à ultrasons pour homogénéiser la suspension et cette dernière est ensuite placée sous agitation magnétique (300 trs/min) pendant 48 heures sous atmosphère inerte (N<sub>2</sub>).

À l'issue des 48 heures, la suspension est lavée par plusieurs cycles d'ultrafiltration (10×100 mL) avec des membranes de 300 kDa (tailles des pores ≈ 40 nm) pour éliminer les agents de couplage.

Lors du greffage, une liaison entre les deux nanoparticules va se former *via* la création d'une liaison amide :

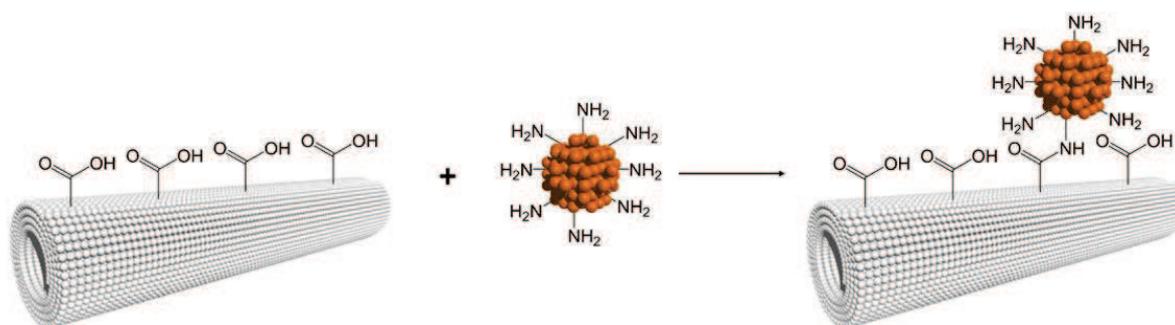
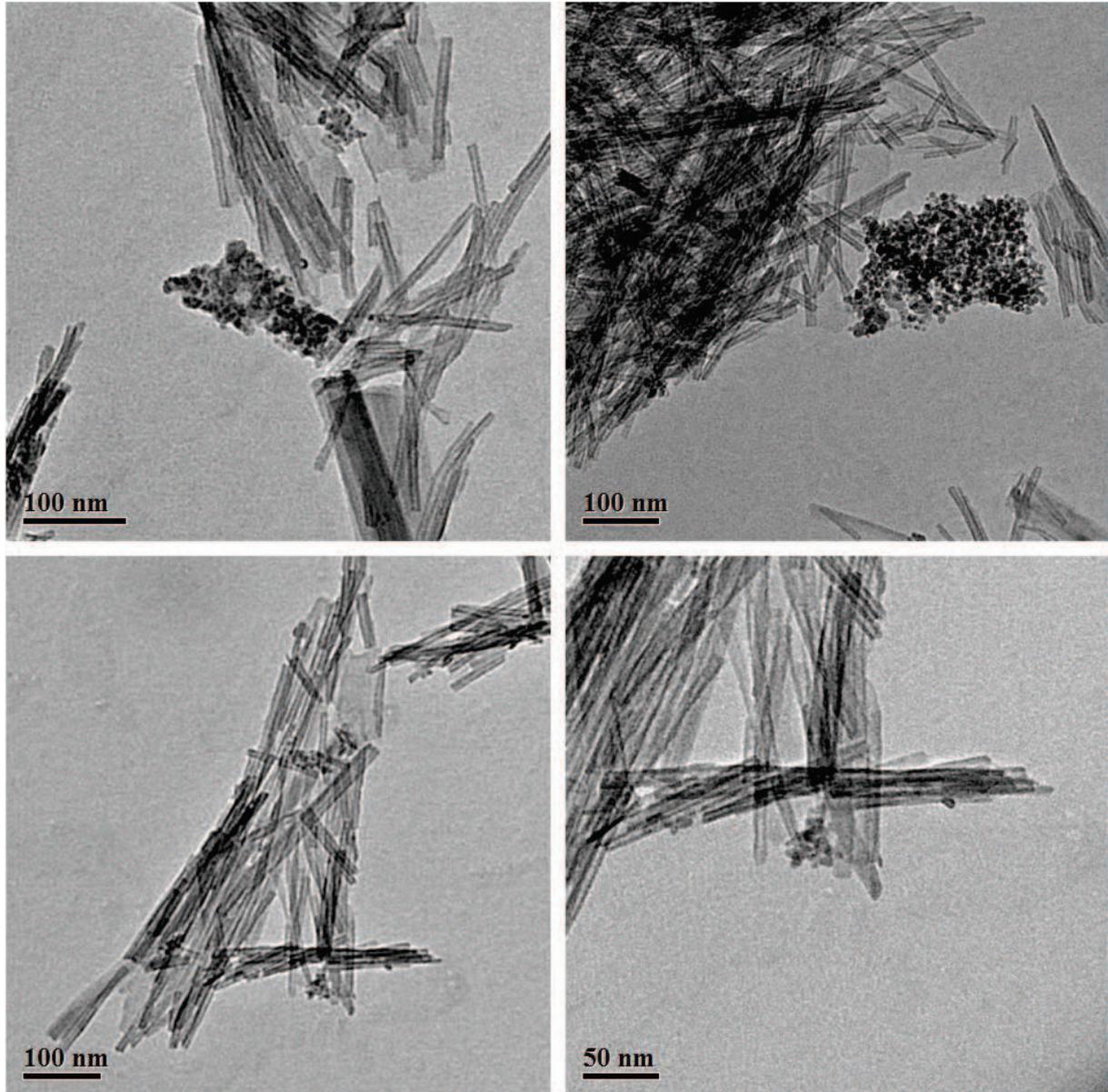


Figure 116. Réaction d'un TiONts portant des fonctions acide carboxylique avec un SPIO portant des fonctions amine pour la formation d'une liaison amide entre les deux types de nanoparticules.

*III.1.1.1 - Greffage des SPIO – COOH avec les TiONts – NH<sub>2</sub>*

L'observation en microscopie électronique en transmission de la suspension reste le meilleur moyen de montrer le couplage de nanoparticules d'oxydes de fer sur les nanotubes de titanate. Les clichés MET ne témoignent d'aucune liaison entre les nanoparticules modifiées et les nanotubes. Ces derniers ne présentent pas de SPIO à leur surface. Les clichés MET révèlent que les TiONts – NH<sub>2</sub> et les SPIO – COOH sont isolés les uns des autres, c'est-à-dire que la réaction entre les deux nanoparticules n'a pas eu lieu (Figure 117).



*Figure 117. Clichés MET du greffage des SPIO – COOH et des TiONts – NH<sub>2</sub> dans un rapport Fe/Ti de [1 : 0,5]*

III.1.1.2 - Greffage des SPIO – NH<sub>2</sub> avec les TiONts – COOH

En revanche, dans le cas du greffage des SPIO – NH<sub>2</sub> sur les TiONts – COOH, l'observation de nanotubes fonctionnalisés par des SPIO est visible sur les clichés MET (Figure 118). En effet, les nanotubes sont fonctionnalisés par de nombreuses nanoparticules d'oxydes de fer seules ou en petites grappes. Ce type de nanotubes fonctionnalisés par les SPIO – NH<sub>2</sub> sera nommé **TiONts – SPIO Orga** dans la suite du manuscrit. L'explication plausible de la réussite de ce greffage est sûrement due à la valeur plus faible, au pH de couplage, du diamètre hydrodynamique des SPIO – NH<sub>2</sub> ( $d_H = 19 \pm 3$  nm) par rapport à celui des SPIO – COOH ( $d_H = 69 \pm 2$  nm) : une agglomération plus faible favoriserait probablement davantage le couplage.

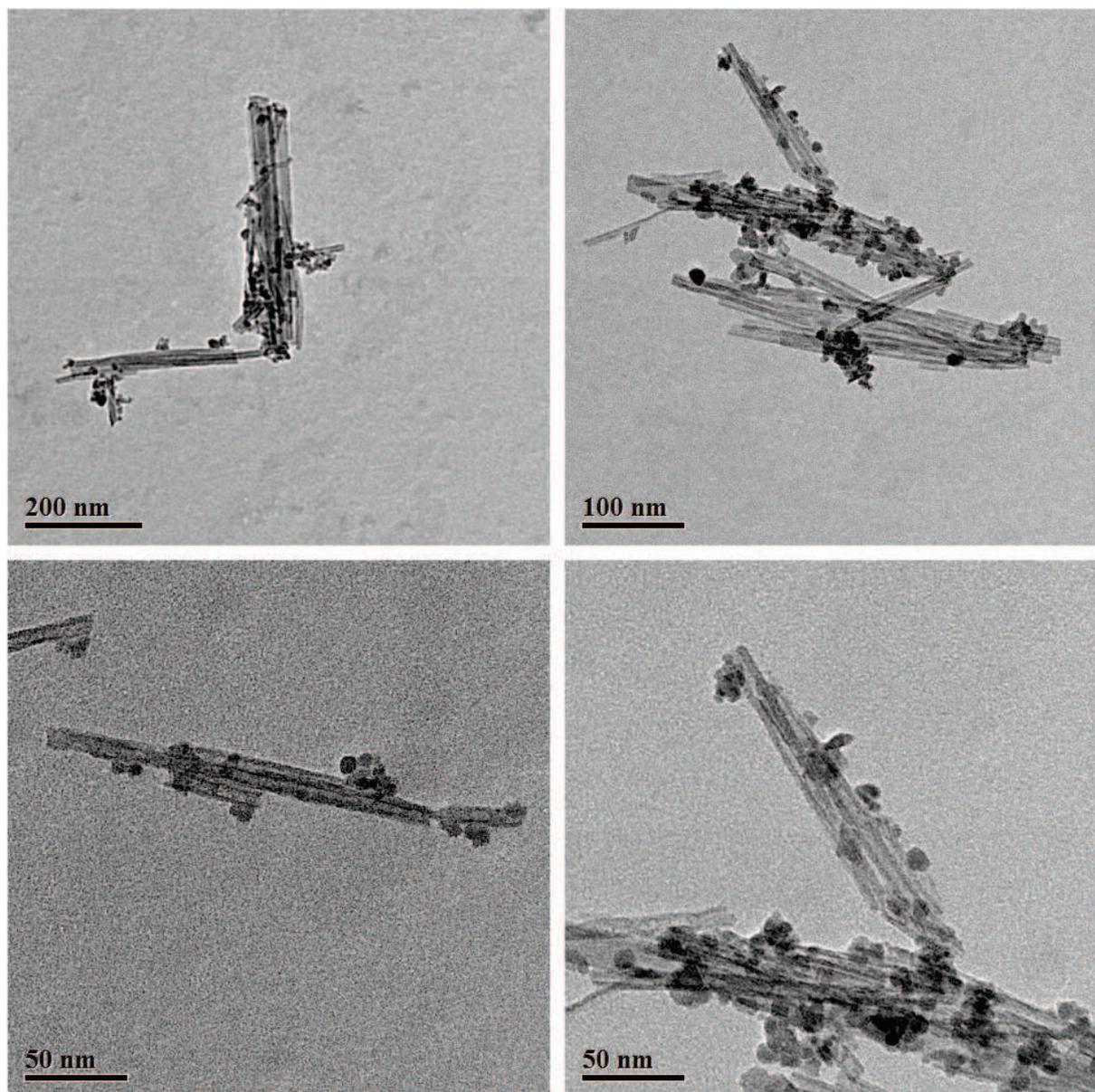


Figure 118. Clichés MET du greffage des SPIO – NH<sub>2</sub> et des TiONts – COOH dans un rapport Fe/Ti de [1 : 0,5]

Une étape de purification par décantation magnétique est aussi réalisée pour éliminer les SPIO – NH<sub>2</sub> et les TiONts – COOH qui n'ont pas réagi. L'aimant est laissé pendant une

heure sur le côté du flacon ce qui va permettre d'attirer les nanoparticules d'oxydes de fer aminés qui n'ont pas réagi. Ensuite, le surnageant contenant un maximum de TiONts – SPIO Orga est prélevé (Figure 119).



Figure 119. Photographie de la décantation magnétique sur les suspensions des TiONts – SPIO Orga

### III.1.2 - Analyse du conjugué TiONts – SPIO Orga après purification

#### III.1.2.1 - Analyse de la stabilité du conjugué

Le conjugué TiONts – SPIO Orga a été caractérisé en premier lieu par zétamétrie à force ionique constante (Figure 120) car il est destiné à des applications biomédicales. Le point isoélectrique des TiONts – SPIO Orga se situe aux alentours de  $\text{pH} = 4,3$ , valeur intermédiaire entre celles des TiONts – COOH et SPIO –  $\text{NH}_2$ . La suspension est stable dans l'eau.

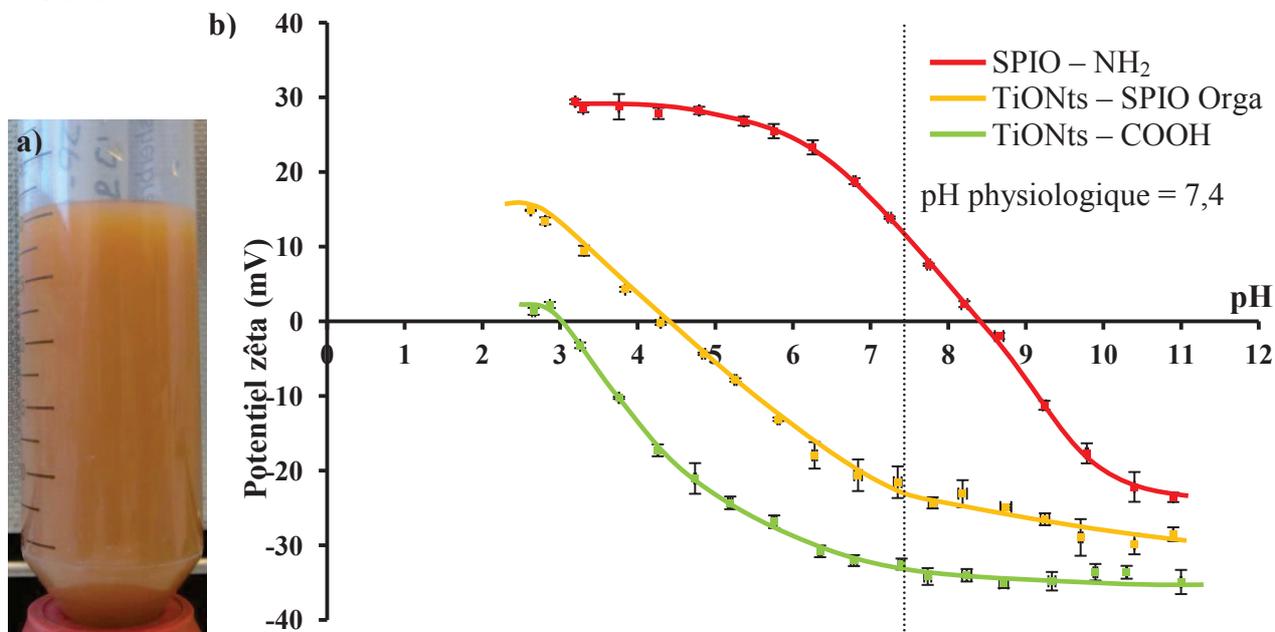


Figure 120. a) Photographie de la suspension de TiONts – SPIO Orga dans l'eau ( $\text{pH} = 7$ ) et b) Évolution du potentiel zêta des TiONts – SPIO Orga, SPIO –  $\text{NH}_2$  et TiONts – COOH dans  $\text{NaCl}$  ( $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ ). Courbes représentatives d'un échantillon.

Le Tableau 40 regroupe les valeurs des points isoélectriques et du potentiel zêta des TiONts – SPIO Orga.

Synthèse	PIE	$\zeta$ à pH = 7,4 (mV)	n
SPIO – NH <sub>2</sub>	8,9 ± 0,8	+17 ± 2	13
TiONts – COOH	3,2 ± 0,3	-35 ± 3	6
TiONts – SPIO Orga	4,3 ± n.d.	-21 ± 1	1

Tableau 40. Récapitulatif des points isoélectriques et des valeurs du potentiel zêta pour les SPIO – NH<sub>2</sub>, TiONts – COOH et TiONts – SPIO Orga. n.d. non déterminé car il n'y avait pas assez de valeurs pour être représentatif.

### III.1.2.2 - Analyses du nanocomposite TiONts – SPIO Orga

Le nanocomposite TiONts – SPIO Orga a été analysé par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, en XPS et par analyse thermogravimétrique (ATG).

Lors du greffage, une fonction amide est formée et peut être détectée en spectroscopie infrarouge,  $\nu_{C=O}$  amide entre 1650 – 1700 cm<sup>-1</sup>. Cependant, le pic de la fonction amide se trouve au même endroit que la déformation des hydroxyles de surface,  $\delta_{OH} = 1650$  cm<sup>-1</sup>. Par conséquent, la fonction amide créée lors du couplage des SPIO – NH<sub>2</sub> et des TiONts – COOH n'est pas détectable sur le spectre IR (Figure 121). De plus, la présence d'acide carboxylique à la surface des nanotubes s'ajoute à la difficulté précédente. D'autre part, sur le spectre infrarouge des TiONts – SPIO Orga, les bandes de vibration spécifiques aux oxydes de fer de structure spinelle sont visibles à 580 cm<sup>-1</sup> et 640 cm<sup>-1</sup> ainsi que les vibrations des TiONts à 470 cm<sup>-1</sup> et à 700-750cm<sup>-1</sup> ce qui confirme la présence des deux nanoparticules dans l'assemblage.

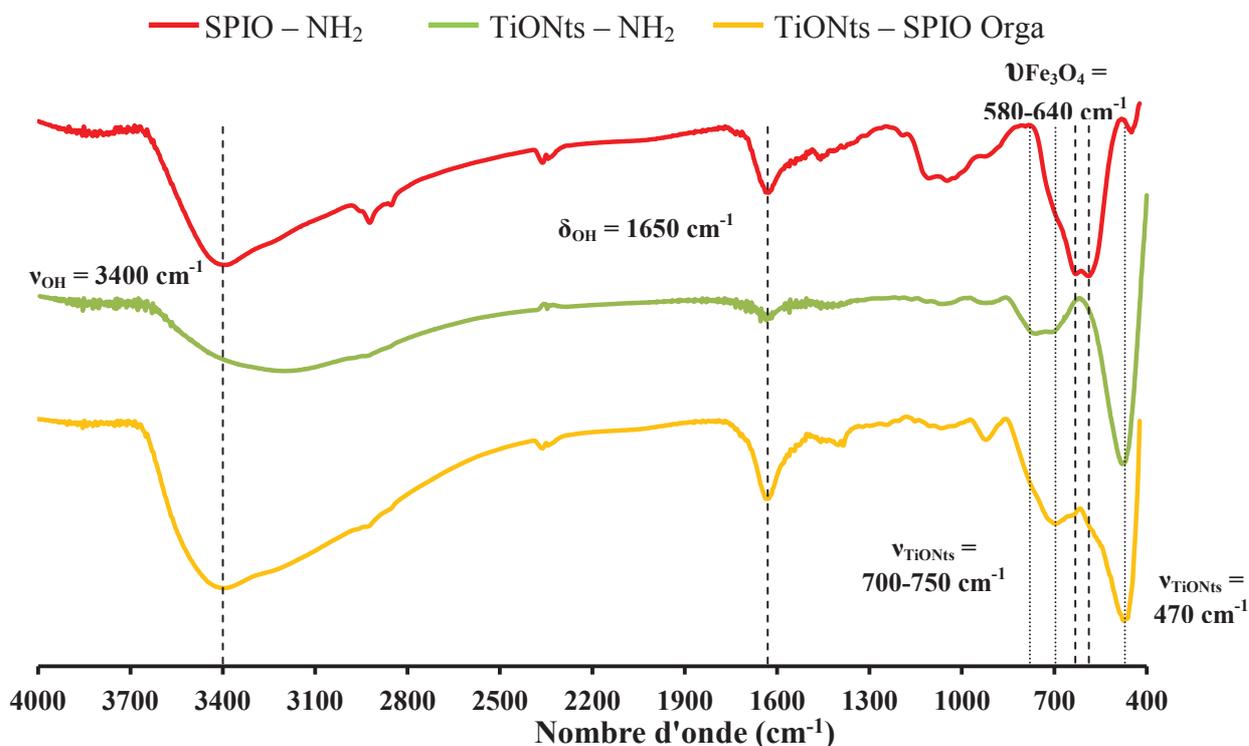


Figure 121. Spectre IR des TiONts – SPIO Orga, des SPIO – NH<sub>2</sub> et des TiONts – COOH

Pour corrélérer ces résultats, une analyse par XPS de la poudre de TiONts – SPIO Orga est réalisée. La présence de fer et de titane est confirmée par cette analyse dans un rapport Fe/Ti  $\approx$  1, pour un rapport attendu de Fe/Ti = 2. Le silicium et l'azote des SPIO – NH<sub>2</sub> ainsi que le phosphore des TiONts – COOH sont présents à la surface des TiONts – SPIO Orga (Tableau 41).

Synthèse	Concentration atomique (%)							
	Fe 2p	Ti 2p	O 1s	C 1s	Na KLL	N 1s	Si 2s	P 2p
SPIO – NH <sub>2</sub>	19	-	46	28	-	3,5	3,5	-
TiONts – COOH	-	21	59	16	3	-	-	1
TiONts – SPIO Orga	10	14	55	14	2	3	1	1

Tableau 41. Concentration atomique des espèces présentes en surface des SPIO – NH<sub>2</sub>, TiONts – COOH et TiONts – SPIO Orga

Après décomposition du niveau C1s des TiONts – SPIO Orga, la fonction amide, le lien entre les deux nanoparticules modifiées, n'est pas identifiable car les composantes de celle-ci (C = O) – NH – C et (C = O) – NH – C se situent respectivement aux mêmes énergies que celles des composantes C – NH<sub>2</sub> et (C = O) – OH qui proviennent des nanoparticules préfonctionnalisées (Figure 122). Les énergies pour chaque composantes sont semblables à celles de la littérature (Rouxhet *et al.* 2011).

La décomposition du niveau O1s ne met en avant que deux contributions : celle de l'oxygène de réseau O<sup>2-</sup> et celle des hydroxyles de surface OH. Les composantes des oxygènes des acides carboxyliques ne sont pas présentes car l'aire de la composante des acides carboxyliques est négligeable par rapport à l'aire de la composante O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

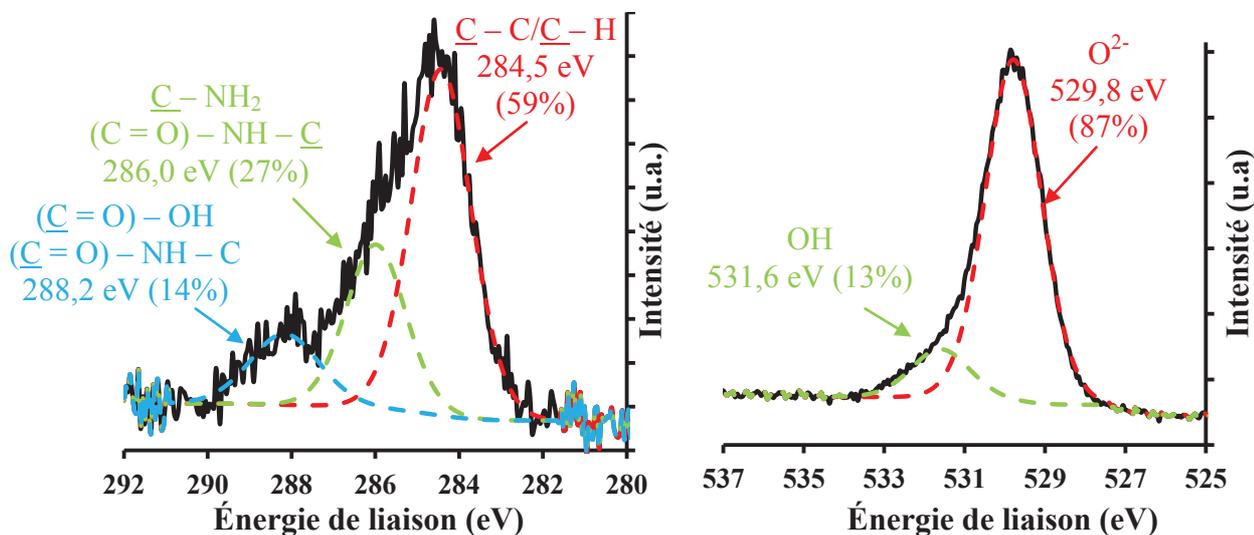


Figure 122. Analyse XPS : Décomposition des niveaux C1s et O1s des TiONts – SPIO Orga

Le niveau N1s présente deux composantes à 399,6 eV et 401,3 eV (Figure 123), la dernière est celle des amines protonées C – NH<sub>3</sub><sup>+</sup>. Généralement, les liaisons C – NH<sub>2</sub> se situent à 399,2 eV. Dans le cas des TiONts – SPIO Orga, la composante est légèrement décalée ce qui peut provenir d'une contribution des liaisons amides (C = O) – NH – C dans la formation de cette composante (Rouxhet *et al.* 2011). Mais, toutes les liaisons C – NH<sub>2</sub> n'ont pas réagi lors du greffage donc elles ne peuvent pas être exclues de la contribution de la composante. De plus, l'augmentation de la proportion de la composante à 399,6 eV (63%) du niveau N1s des TiONts – SPIO Orga par rapport à celle du niveau O1s des SPIO – NH<sub>2</sub>

(399,3 eV, 52% Figure 102) permet d'aller dans le sens de la formation de la liaison amide lors de l'assemblage des deux nanoparticules.

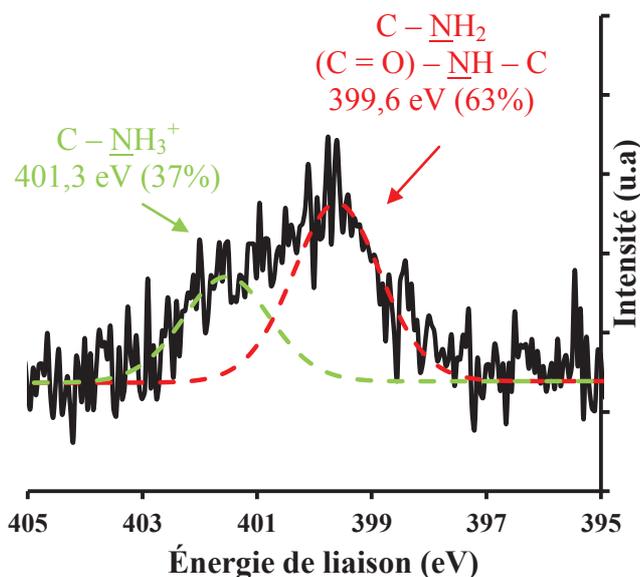


Figure 123. Analyse XPS : Décomposition du niveau N1s des TiONts – SPIO Orga

### III.1.3 - Fonctionnalisation avec le PEG<sub>2000</sub> – Si

Comme vu précédemment, les nanoparticules ou nanotubes doivent être modifiées en surface pour être utilisés en biologie. Les premiers essais de stabilisation électrostatique ont permis de disperser les oxydes de fer et les nanotubes de titanate. Une autre méthode de stabilisation est la stabilisation par gêne stérique *via* le greffage d'un polymère à la surface des nanoparticules comme le polyéthylène glycol (PEG) qui est utilisé pour son caractère hydrophile (Wan *et al.* 2007; Barrera *et al.* 2009). Le PEG va aussi permettre d'augmenter le temps de circulation des nanoparticules dans l'organisme (furtivité) en limitant leur internalisation par les macrophages (Zhang *et al.* 2002; Xie *et al.* 2007; Tromsdorf *et al.* 2009). et retarde leur élimination par le système réticulo-endothélial (Gref *et al.* 2000; Berry *et al.* 2003; Mornet *et al.* 2004).

Le greffage du PEG peut se faire de plusieurs façons grâce aux deux types de fonctions présentes à la surface du nanohydrure TiONts – SPIO Orga, soit par une fonction amine à la surface des SPIO, soit par une fonction carboxylate à la surface des TiONts. La modification avec le PEG peut se faire *via* un PEG – NH<sub>2</sub> ou *via* un PEG – COOH mais un seul type de particule sera modifié. L'avantage de cette modification est de laisser disponible une fonction pour d'éventuelles modifications futures. L'utilisation de deux PEG différents est possible mais étant plus difficiles à caractériser et à différencier, cette voie n'est pas souhaitable. Une autre approche est l'utilisation d'un PEG possédant une fonction silane qui se greffe aux hydroxydes de surface des nanoparticules restants (Zhang *et al.* 2002; Kohler *et al.* 2004). La deuxième solution a été retenue car si les deux nanoparticules sont fonctionnalisées par le PEG, le nanohydrure gagne en stabilité, en biocompatibilité et en furtivité.

Le polymère choisi est un PEG silanisé qu'il a fallu synthétiser. En bref, le 3-isocyanatopropyltriéthoxysilane (ICPTES) a été couplé à un polyéthylène glycol commercial de longueur de chaîne 2000 ( $M \approx 2000 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Cette réaction (Maurizi *et al.* 2009) a permis

d'obtenir un PEG silanisé (Figure 124) de masse molaire  $M = 2252 \text{ g.mol}^{-1}$  (noté **PEG<sub>2000</sub> – Si**, par la suite).

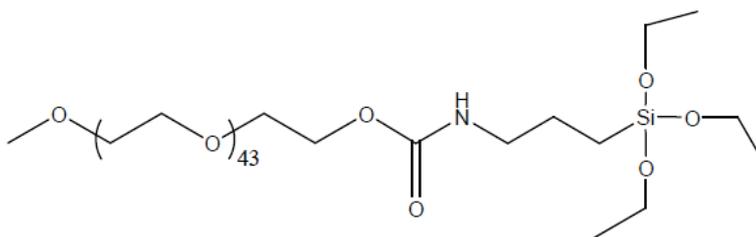


Figure 124. Formule semi-développée du PEG<sub>2000</sub> – Si

Dans la plupart des travaux, un mélange eau /alcool (Jo *et al.* 2000) ou un mélange eau avec des solvants organiques (Kohler *et al.* 2006) est fréquemment utilisé dans le couplage du PEG – Si et des oxydes de fer. Le couplage dans le mélange eau/éthanol a été retenu car l'éthanol libéré par l'ICPTES après hydrolyse ne devrait pas modifier la polarité du mélange.

Pour 10 mg de nanohybrides, 0,013 mmol de PEG<sub>2000</sub> – Si sont ajoutés à 20 mL d'un mélange eau/éthanol (50/50 en volume). L'ensemble est mis sous atmosphère d'azote et agité magnétiquement (300 tours/min) pendant 48 heures à 21°C. Ensuite, la suspension est lavée par dix cycles d'ultrafiltration (taille des pores : 30 kDa) et enfin lyophilisée pour les futures caractérisations. Le nanohybride synthétisé sera dénommé **PEG – TiONts – SPIO Orga** dans la suite de ce travail.

Le meilleur moyen de confirmer le greffage du PEG<sub>2000</sub> – Si à la surface du nanohybride est de prouver l'existence d'une liaison Si – O – Métal (Fe ou Ti).

Après les nombreux cycles de lavages par ultrafiltration, le nanohybride a été analysé par XPS pour prouver que le polymère a bien été greffé (Tableau 42). La première observation est la chute de la concentration de fer sur le nanohybride pegylé par rapport au nanohybride seul. D'autre part, l'augmentation de la concentration des éléments provenant du PEG<sub>2000</sub> – Si notamment celle du carbone est visible. L'XPS étant une analyse de surface, la diminution du signal du fer et l'augmentation des signaux dus au polymère prouvent la présence de polymère en surface des nanoparticules d'oxydes de fer. Le signal du silicium est trop faible pour être exploité et démontrer une liaison Si – O – Fe ou Si – O – Ti.

Synthèse	Concentration atomique (%)							
	Fe 2p	Ti 2p	O 1s	C 1s	Na KLL	N 1s	Si 2s	P 2p
<b>TiONts – SPIO Orga</b>	10	14	55	14	2	3	1	1
<b>PEG – TiONts – SPIO Orga</b>	4	13	50	30	-	3	0	-

Tableau 42. Concentration atomique des espèces présentes en surface des TiONts – SPIO Orga et des TiONts – SPIO Orga fonctionnalisés avec le PEG<sub>2000</sub> – Si

Cette analyse soulève le fait que le PEG<sub>2000</sub> – Si est présent plus particulièrement à la surface des SPIO – NH<sub>2</sub> car la concentration atomique du fer diminue de 10% à 4% alors que celle du titane s'abaisse de 14% à 13%. Le PEG<sub>2000</sub> – Si semble préférentiellement greffé à la surface des SPIO aminés car la surface de ces derniers est aussi composée d'un alkoxy silane tout comme le lien d'accroche du PEG<sub>2000</sub> – Si qui semble posséder une meilleure affinité avec le silane de l'APTES qu'avec les phosphonates du PHA. De plus, la surface des TiONts modifiés est rendu moins accessible à cause de l'encombrement stérique dû à l'agent de couplage phosphonate qui possède une chaîne carbonée plus longue.

La décomposition du pic du niveau C1s met en évidence l'apparition d'une nouvelle composante correspondant à la liaison  $\underline{\text{C}} - \text{O}$  du PEG<sub>2000</sub> - Si à 286,3 eV (Maurizi 2010) qui augmente le pourcentage de la composante (45% contre 27%) pour les TiONts - SPIO Orga (Figure 122) confirmant la présence du PEG à la surface du nanohybride (Figure 125).

La décomposition du niveau O1s montre trois composantes : la première correspondant aux oxygènes de réseaux des nanoparticules à 530,0 eV. La deuxième à 531,6 eV provient essentiellement de l'oxygène contenu dans le PEG ( $\text{C} - \underline{\text{O}}$ ) mais aussi aux hydroxyles de surface. La dernière contribution provient de l'oxygène des hydroxyles des acides carboxyliques ( $\text{C} = \text{O}$ ) -  $\underline{\text{O}}\text{H}$  à 533,3 eV.

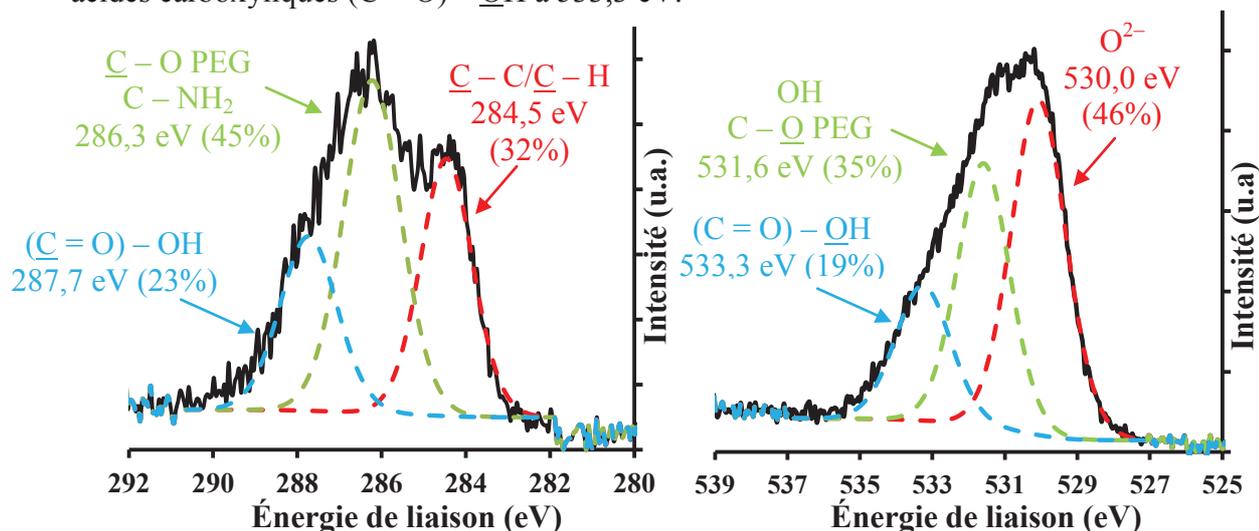


Figure 125. Analyse XPS : Décomposition du niveau C1s et O1s des TiONts - SPIO Orga fonctionnalisés avec le PEG<sub>2000</sub> - Si

Pour déterminer si le PEG<sub>2000</sub> - Si a formé une liaison avec les oxydes de fer par le biais d'une liaison Si - O - Fe, le nanohybride a été analysé en spectroscopie infrarouge (Figure 126). Cette technique met en avant les bandes caractéristiques du PEG telles que les modes de vibrations du motif éthylène glycol à 2900 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_{\text{C-H}}$ ), à 1120 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_{\text{C-O}}$ ) et à 1090 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_{\text{C-C}}$ ).

De même, la bande de vibration de la liaison N - H carbamate est plus prononcée soulignant que l'étape de greffage n'a pas détérioré la fonction carbamate et ainsi la fonction sur la chaîne de PEG est toujours accrochée le silane. Par ailleurs, la bande caractéristique des nanotubes (470 cm<sup>-1</sup>) est également présente. Par contre, les bandes caractéristiques de la structure spinelle (580 - 640 cm<sup>-1</sup>) sont complètement atténuées à cause du greffage du PEG à sa surface.

Cependant, il n'a pas été possible de trouver une bande caractéristique de la vibration de la liaison Si - O - Fe située aux alentours de 986 cm<sup>-1</sup> d'après la littérature (Mornet *et al.* 2005) mais les données restent floues à ce sujet.

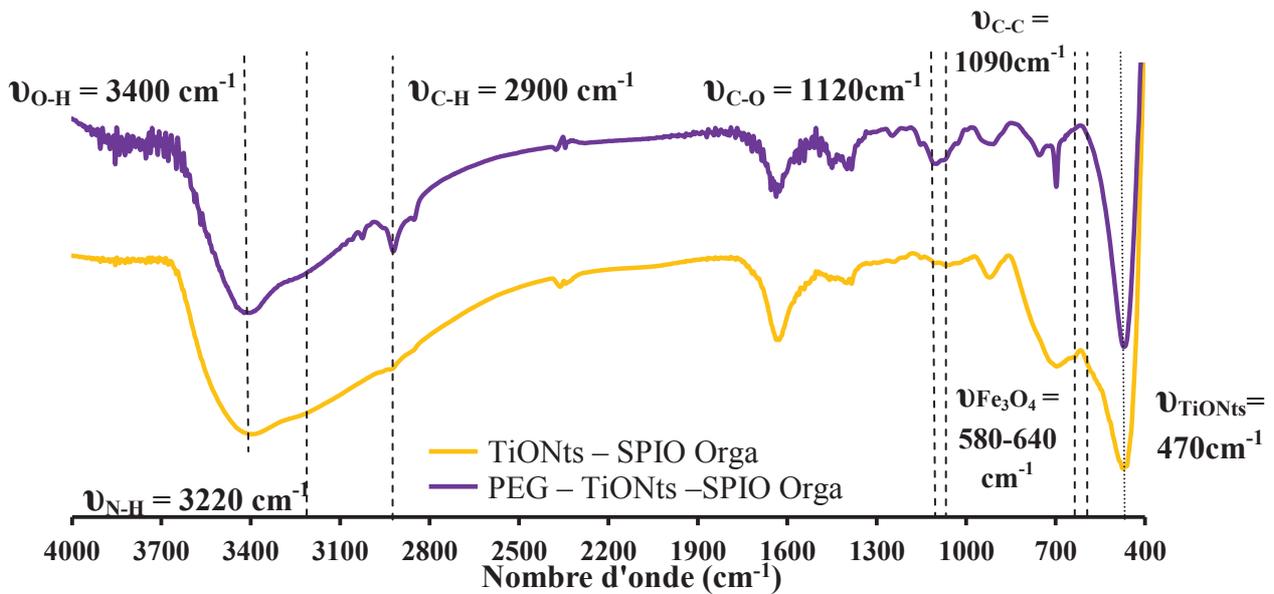


Figure 126. Spectre IR des nanohybrides TiONts – SPIO Orga et PEG – TiONts – SPIO Orga

La modification par le PEG<sub>2000</sub> – Si est remarquée en zétamétrie car l'observation d'un écrantage de charge est largement visible. Cet écrantage est dû à la présence de PEG à la surface du nanohybride. En revanche, le PIE ne varie pas (Figure 127).

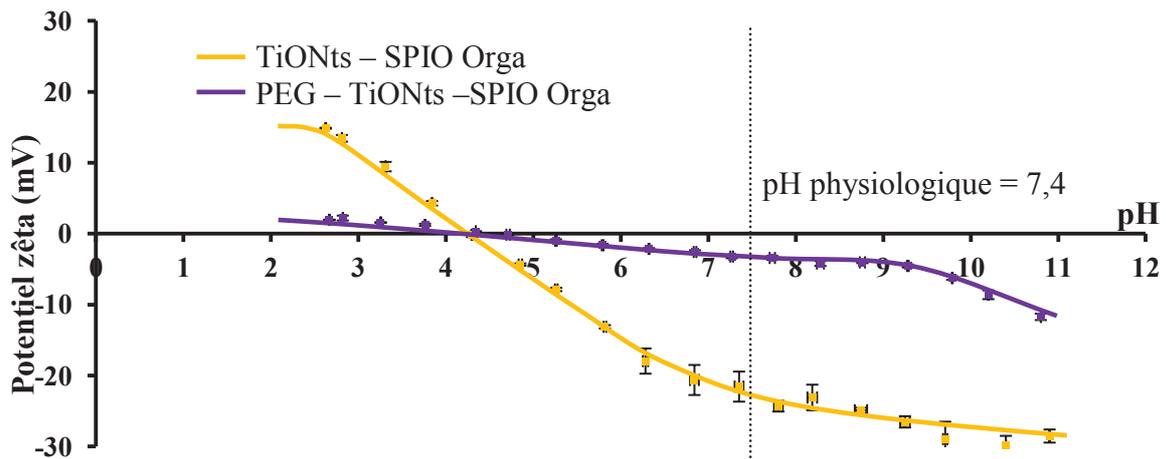


Figure 127. Évolution du potentiel zêta des TiONts – SPIO Orga et des PEG – TiONts – SPIO Orga dans NaCl ( $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ ) en fonction du pH.

La suspension des PEG – TiONts – SPIO – Orga est stable dans le temps (pendant une semaine) par rapport à la suspension de TiONts – SPIO – Orga (Figure 128).

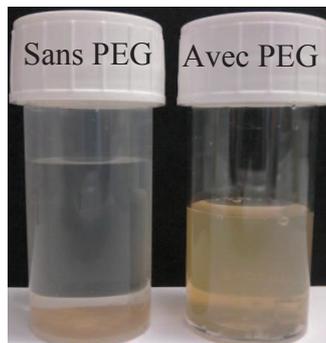


Figure 128. Photographie des suspensions instable des TiONts – SPIO – Orga et stable des PEG – TiONts – SPIO – Orga dans le PBS après 72 heures.

Les clichés MET montrent que le greffage du PEG n'a pas détérioré la liaison entre les nanotubes et les nanoparticules d'oxydes de fer. De plus, des agglomérats de quelques centaines de nanomètres sont observés (Figure 129).

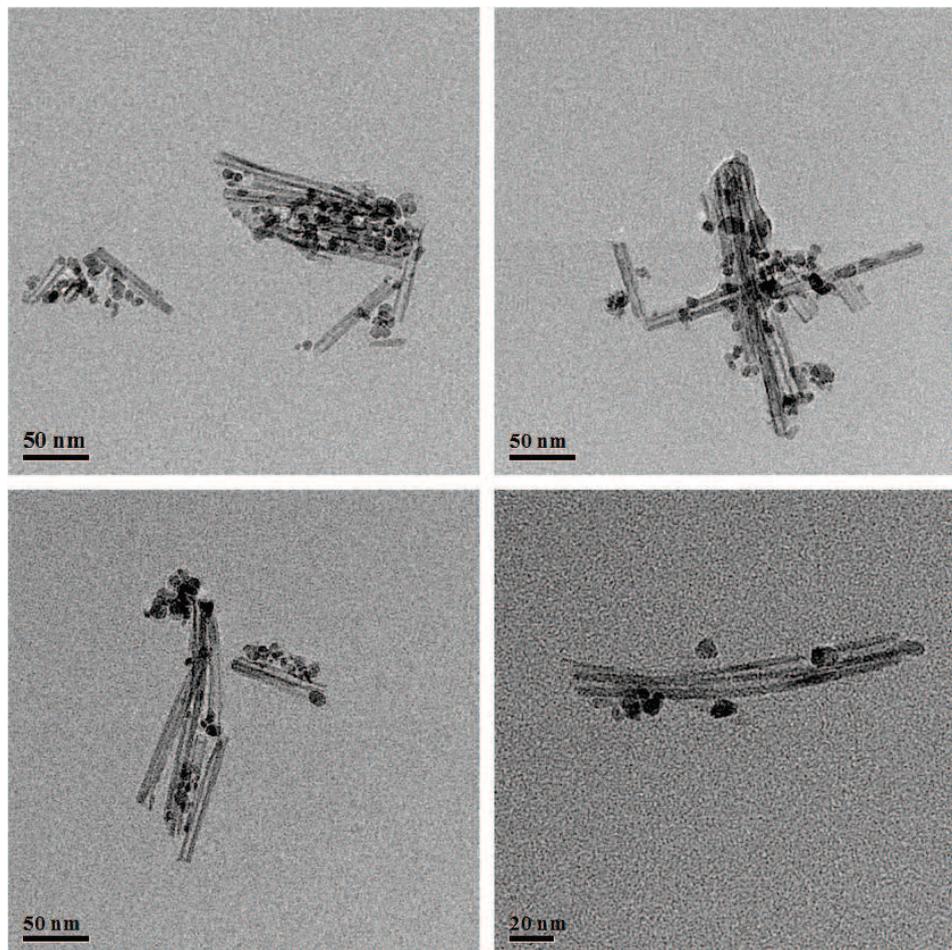


Figure 129. Clichés MET du nanohybride PEG – TiONts – SPIO Orga

La taille des agglomérats des PEG – TiONts – SPIO Orga semble être plus petite que celle des TiONts – SPIO Orga sans PEG. De plus, les nanotubes semblent être plus dispersés en présence de PEG (comparaison entre les Figure 118 et Figure 129).

Selon l'analyse thermogravimétrique des PEG – TiONts – SPIO Orga (Figure 130) qui induit des pertes de masse importante entre 150°C et 800°C, le taux de greffage du PEG<sub>2000</sub> – Si sur les nanohybrides peut être estimé grâce à l'équation 3 (annexe n°3) en faisant l'hypothèse que le PEG ne s'est fixé que sur les SPIO – NH<sub>2</sub> et en considérant que :

- la masse molaire de la partie carbonée du PEG<sub>2000</sub> – Si est égale à 2052 g.mol<sup>-1</sup> ;
- la surface spécifique des SPIO – NH<sub>2</sub> est égale à celle des SPIO soit 92 ± 10 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> ;
- la perte de masse entre 150 et 800°C est majoritairement due aux chaînes carbonées du polymère ;
- en retranchant la perte de masse due aux espèces présentes sur les nanoparticules préfonctionnalisées.

Ainsi, après calcul, le taux de PEG est de l'ordre de 1 PEG/nm<sup>2</sup> (Tableau 43). Cette valeur est similaire aux valeurs de la littérature pour des nanoparticules d'oxydes de fer fonctionnalisées par du PEG – Si qui est de l'ordre de 0,3 à 1 PEG/nm<sup>2</sup> (Butterworth *et al.* 2001).

	$\Delta m$ totale (%)	$\Delta m$ calcul (%)	Masse molaire considérée (g.mol <sup>-1</sup> )	PEG/nm <sup>2</sup>
TiONts – SPIO Orga	9,9	-	-	-
PEG – TiONts – SPIO Orga	32,5	22,6	2052	1

Tableau 43. Estimation du taux de greffage du PEG sur les nanohybrides PEG – TiONts – SPIO Orga

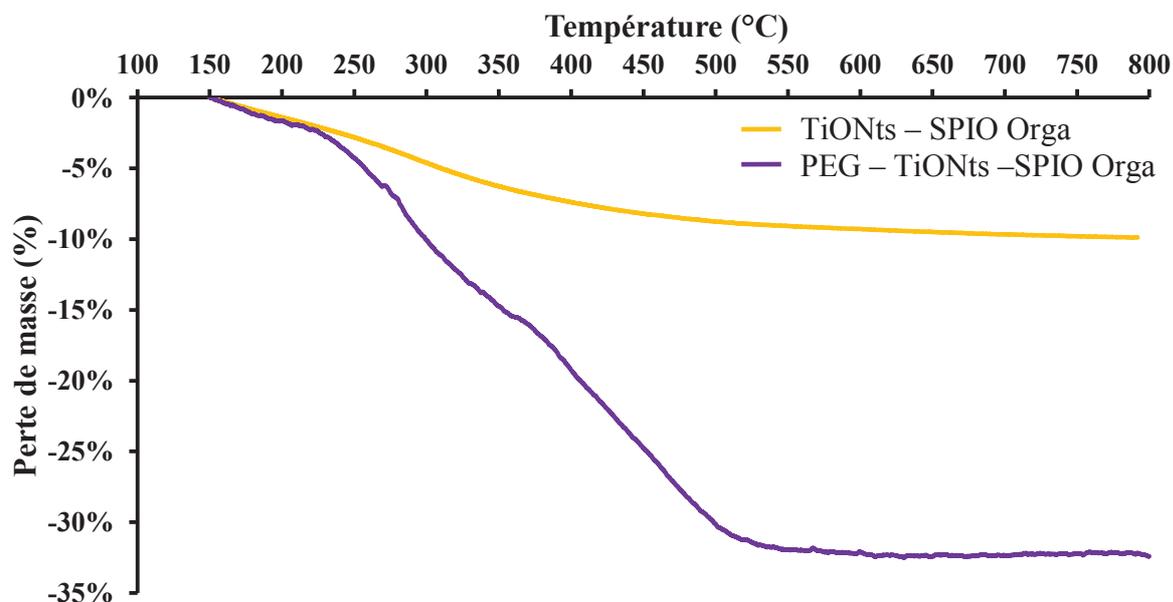


Figure 130. ATG des nanohybrides TiONts – SPIO Orga et PEG – TiONts – SPIO Orga. Les mesures ont été réalisées sous flux de N<sub>2</sub> (25 mL.min<sup>-1</sup>) avec une rampe de montée en température de 5°C.min<sup>-1</sup>. Les courbes ont été normalisées à 150°C (annexe n°3).

### III.1.4 - Aimantation à saturation et relaxivités mesurées des TiONts – SPIO Orga

Comme précédent, les nanoparticules d'oxydes de fer sont analysées pour connaître leurs propriétés magnétiques : l'aimantation à saturation ainsi que la relaxivité mesurée sur l'IRM clinique 3T du CHU de Dijon (Tableau 44).

Synthèse	IRM (magnétite)	Hystérisimètre		IRM (nanocomposite)
	r <sub>2</sub> (L.mmol <sub>nanocomposite</sub> <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	Ms (uem/g)	Taux de fer (%)	r <sub>2</sub> (L.mmolFe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
SPIO	331 ± 23	47 <sup>11</sup>	100	331 ± 23
TiONts – SPIO Orga	326 ± 7	15	32	159 ± 8
PEG – TiONts – SPIO Orga	241 ± 18	3	6	44 ± 3

Tableau 44. Propriétés magnétiques des composés TiONts – SPIO – Orga et des PEG – TiONts – SPIO – Orga. Le r<sub>2</sub> exprimé en L.mmol<sub>nanocomposite</sub><sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> est estimé en faisant l'hypothèse que toute la masse du nanocomposite est magnétique. Le seconde r<sub>2</sub> est exprimé en L.mmol Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> en tenant compte de la proportion de SPIO dans le nanocomposite.

<sup>11</sup> Mesure faite sur le PPMS à Versailles.

Les valeurs de  $r_2$  calculées sans tenir compte du taux de fer obtenus en hystérisimétre indiquent que les nanohybrides TiONts – SPIO Orga et PEG – TiONts – SPIO Orga pourront être suivis par IRM car les valeurs sont du même ordre de grandeur que celles des TiONts – SPIO synthétisés dans le chapitre 1 ( $\approx 100 \text{ L.mmolFe}_3\text{O}_4^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ).

### III.1.5 - Comparaison des TiONts – SPIO Orga avec les TiONts – SPIO

Les composés TiONts – SPIO Orga sont comparés aux nanocomposites TiONts – SPIO synthétisés de manière inorganique (Chapitre 1). Le Tableau 45 regroupe les valeurs des différentes caractéristiques des nanotubes fonctionnalisés par les nanoparticules d'oxydes de fer synthétisés par les deux voies (« inorganiques » et organiques).

Synthèse	PIE	$\zeta$ à pH = 7,4 (mV)	PEG/nm <sup>2</sup>	IRM (magnétite) $r_2$ (L.mmolFe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
<b>SPIO</b>	7,2 ± 0,2	-8 ± 3	-	331 ± 23
<b>TiONts – SPIO</b>	3,5 ± 0,3	-27 ± 4	-	93 ± 4
<b>PEG – TiONts – SPIO</b>	3,6 ± 0,2	-2 ± 1	1,2	76 ± 4
<b>TiONts – SPIO Orga</b>	4,3 ± n.d.	-21 ± 1	-	159 ± 8
<b>PEG – TiONts – SPIO Orga</b>	4,3 ± n.d.	-3 ± 1	1	44 ± 3

Tableau 45. Comparaison des caractéristiques des TiONts – SPIO Orga et des TiONts – SPIO nus et fonctionnalisés avec le PEG<sub>2000</sub> – Si. n.d. non déterminé car il n'y avait pas assez de valeur pour être représentatif.

Après un mois dans le PBS, les suspensions de nanotubes fonctionnalisés par les nanoparticules d'oxydes de fer et le PEG sont comparées. La suspension du nanohybride PEG – TiONts – SPIO (voie inorganique) est encore stable après 1 mois dans le PBS, contrairement à la suspension du nanohybride PEG – TiONts – SPIO – Orga. Cette conclusion est peut-être logique puisque le nanohybride PEG – TiONts – SPIO a été fonctionnalisé sur toute sa surface par le PEG<sub>2000</sub> – Si alors que seules les nanoparticules d'oxydes de fer semblent être fonctionnalisées par ce même PEG dans le cas de la voie organique (Figure 131).

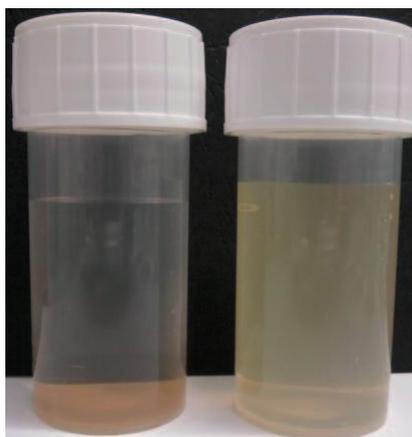


Figure 131. Photographie des suspensions PEG – TiONts – SPIO – Orga (à gauche) et PEG – TiONts – SPIO (à droite) après 1 mois dans le PBS

### III.2 - Conclusion sur la synthèse des TiONts – SPIO Orga

Tout d'abord, les nanoparticules modifiées par l'APTES et le PHA ont permis de coupler les deux types de nanoparticules entre elles. Le mélange s'effectue dans une solution aqueuse en présence d'agents de couplage (EDC/NHS) à pH = 5 ou pH = 6 pour assembler respectivement les nanoparticules TiONts – NH<sub>2</sub> avec les SPIO – COOH et les nanoparticules TiONts – COOH avec les SPIO – NH<sub>2</sub>. Cependant, seul le couplage des TiONts – COOH avec les nanoparticules d'oxydes de fer aminées est une réussite. Le diamètre hydrodynamique plus conséquent dans le cas des SPIO – COOH peut être à l'origine de ce résultat.

De plus, les TiONts – SPIO Orga ont été fonctionnalisés par du PEG<sub>2000</sub> pour augmenter leur biocompatibilité, leur furtivité et leur stabilité en suspension. Seules les nanoparticules d'oxydes de fer modifiées par l'APTES semble être fonctionnalisées par le PEG<sub>2000</sub> – Si. Ce résultat surprenant est probablement due à une meilleure compatibilité du PEG<sub>2000</sub> – Si avec le silane de l'APTES qu'avec les phosphonates du PHA. Cette conclusion est basée sur la diminution de la concentration atomique du fer en XPS ainsi que sur l'atténuation des raies caractéristiques de la structure spinelle en FTIR.

Les techniques d'analyses n'ont pas permis de conclure quant au greffage covalent du PEG<sub>2000</sub> – Si sur la surface de la magnétite. Néanmoins, la présence de PEG a été confirmée et un taux de polymère par nm<sup>2</sup> a pu être calculé : il est de l'ordre de 1 PEG/nm<sup>2</sup>.

Les nanohybrides TiONts – SPIO Orga et PEG – TiONts – SPIO Orga pourront être suivis par IRM car ils présentent des valeurs de relaxivités élevées (les valeurs ont pour l'instant été déterminées sans tenir compte du taux de fer des nanocomposites).

## IV. Conclusion sur la modification de surface des nanoparticules

Le greffage des ligands aminé et carboxylique à la surface des deux types de nanoparticules est une réussite. Le taux de greffage est estimé à environ 5 molécules par nm<sup>2</sup>, il est plus faible seulement dans le cas des TiONts – COOH et est de l'ordre de 3 COOH/nm<sup>2</sup>, ce qui est probablement dû à la gêne stérique engendrée par le bras carboné du PHA et du rayon de courbure des nanotubes. Cependant, aucune technique d'analyse n'a permis de mettre en évidence un lien covalent entre les nanoparticules et les ligands mais la présence des ligands à la surface des nanoparticules a été soulignée par ces mêmes techniques d'analyses (XPS, IR zétamétrie, ATG). Par contre, la valeur des charges de surface n'est pas suffisante pour stabiliser les nanoparticules modifiées dans les conditions physiologiques (pH = 7,4 ; 0,9% NaCl) pour les nanoparticules d'oxydes de fer modifiées par l'APTES et le PHA, tout comme les TiONts – NH<sub>2</sub>. En revanche, les nanotubes modifiés par le PHA sont stables dans ces mêmes conditions.

Des tests *in vivo* ont été réalisés et montrent que les SPIO – NH<sub>2</sub> ont un effet cytotoxique en fonction de la concentration. Au dessus de 15 µg.mL<sup>-1</sup>, les SPIO – NH<sub>2</sub> sont cytotoxiques. Cependant, les essais effectués sur les zebrafish à 50 µg.mL<sup>-1</sup> ne soulignent pas ce phénomène. En revanche, les TiONts – NH<sub>2</sub> ne présentent pas de cytotoxicité sur la gamme de 25 à 100 µg.mL<sup>-1</sup>, ni de toxicité *in vivo* à 50 µg.mL<sup>-1</sup> sur les tests zebrafish.

Le Tableau 46 regroupe toutes les caractéristiques des nanoparticules d'oxydes de fer et de nanotubes de titanate modifiés par les deux ligands : l'APTES et le PHA.

	PIE	$\zeta$ à 7,4 (mV)	$d_H$ (nm) à 7,4	Stabilité à pH = 7,4	$S_{BET}$ ( $m^2 \cdot g^{-1}$ )	Nombre/nm <sup>2</sup> ATG	n
<b>SPIO</b>	7,2 ± 0,2	-8 ± 3	1368 ± 93	non	92 ± 10	6,7 ± 0,6	5 – 7
<b>SPIO – NH<sub>2</sub></b>	8,9 ± 0,8	+17 ± 2	19 ± 3	non	n.d.	5,0 ± 0,7	13
<b>SPIO – COOH</b>	4,3 ± 0,4	-27 ± 2	69 ± 2	non	n.d.	5,3 ± 0,6	10
<b>TiONts</b>	3,3 ± 0,2	-32 ± 3	- <sup>12</sup>	non	163 ± 25	6 ± 4	6 – 10
<b>TiONts – NH<sub>2</sub></b>	6,3 ± 0,8	-13 ± 4	- <sup>12</sup>	non	n.d.	5,7 ± 0,8	12 – 17
<b>TiONts – COOH</b>	3,2 ± 0,3	-35 ± 3	- <sup>12</sup>	oui	n.d.	3,1 ± 0,5	6 – 8

Tableau 46. Caractéristiques des SPIO et TiONts modifiées par l'APTES et le PHA  
n.d. non déterminé

De plus, la surface des nanoparticules modifiées a gagnée en réactivité, ce qui va permettre de greffer des molécules d'intérêt pour la biologie comme des fluorophores ou des agents chélatants pour l'imagerie bimodale et la thérapie anticancéreuse.

Les nanoparticules modifiées par les deux ligands ont permis de construire un nouveau nanohydrate théranostique : les TiONts – SPIO Orga. Des nanotubes modifiés ainsi que des nanoparticules ont été mélangés avec des agents de couplage (EDC/NHS) dans une solution aqueuse à pH = 5 ou pH = 6 pour coupler respectivement les composés TiONts – NH<sub>2</sub> avec SPIO – COOH et les composés TiONts – COOH avec SPIO – NH<sub>2</sub>. Seulement dans ce dernier cas, l'obtention de nanotubes fonctionnalisés par des nanoparticules d'oxydes de fer est observée par MET. L'autre voie de synthèse ne permet pas de coupler les deux types de nanoparticules.

De plus, les TiONts – SPIO Orga ont été fonctionnalisés par du PEG<sub>2000</sub> pour augmenter leur biocompatibilité, leur furtivité et leur stabilité. Un résultat surprenant de cette fonctionnalisation est marqué par le fait que le PEG<sub>2000</sub> – Si semble se greffer préférentiellement sur les nanoparticules d'oxydes de fer aminées laissant les nanotubes modifiés par les phosphonates libres. Cette conclusion est basée sur la diminution de la concentration atomique du fer en XPS ainsi que sur l'atténuation des raies caractéristiques de la structure spinelle en FTIR alors que la concentration atomique en titane ne varie presque pas avec le greffage du PEG<sub>2000</sub> Si. Le nombre de PEG estimé par ATG est de l'ordre de 1 PEG/nm<sup>2</sup>. Ces nanohybrides peuvent être suivis par IRM comme le laisse entendre les valeurs de relaxivité calculées sans tenir compte du taux de fer (en attente des résultats d'aimantation à saturation).

Le Tableau 47 regroupe les caractéristiques des TiONts – SPIO – Orga ainsi que celles des composés PEG – TiONts – SPIO – Orga.

Synthèse	PIE	$\zeta$ à pH = 7,4 (mV)	PEG/nm <sup>2</sup> (ATG)	$r_2$ (L.mmolFe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
<b>TiONts – SPIO Orga</b>	4,3	-21 ± 1	-	159 ± 8
<b>PEG – TiONts – SPIO Orga</b>	4,4	-3 ± 1	1	44 ± 3

Tableau 47. Caractéristiques des composés TiONts – SPIO Orga et PEG – TiONts – SPIO Orga

<sup>12</sup> Les diamètres hydrodynamiques ne sont pas déterminés dans le cas des TiONts car le calcul des diamètres est basé sur une morphologie sphérique.

## Références bibliographiques

- Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. and Knowles, B.B. (1979). "Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line." *Nature* **282**(5739): 615-616.
- Barja, B.C., Tejedor-Tejedor, M.I. and Anderson, M.A. (1999). "Complexation of Methylphosphonic Acid with the Surface of Goethite Particles in Aqueous Solution." *Langmuir* **15**(7): 2316-2321.
- Barrera, C., Herrera, A.P. and Rinaldi, C. (2009). "Colloidal dispersions of monodisperse magnetite nanoparticles modified with poly(ethylene glycol)." *Journal of Colloid and Interface Science* **329**(1): 107-113.
- Basly, B., Felder-Flesch, D., Perriat, P., Billotey, C., Taleb, J., Pourroy, G. and Begin-Colin, S. (2010). "Dendronized iron oxide nanoparticles as contrast agents for MRI." *Chemical Communications* **46**(6): 985-987.
- Bee, A., Massart, R. and Neveu, S. (1995). "Synthesis of very fine maghemite particles." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **149**(1-2): 6-9.
- Belin, T., Millot, N., Villiéras, F., Bertrand, O. and Bellat, J.P. (2004). "Structural Variations as a Function of Surface Adsorption in Nanostructured Particles." *The Journal of Physical Chemistry B* **108**(17): 5333-5340.
- Berry, C.C., Wells, S., Charles, S. and Curtis, A.S.G. (2003). "Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro." *Biomaterials* **24**(25): 4551-4557.
- Bini, R.A., Marques, R.F.C., Santos, F.J., Chaker, J.A. and Jafelicci Jr, M. (2012). "Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxysilanes." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **324**(4): 534-539.
- Böhmler, J., Ploux, L., Ball, V., Anselme, K. and Ponche, A. (2011). "Necessity of a Thorough Characterization of Functionalized Silicon Wafers before Biointerface Studies." *The Journal of Physical Chemistry C* **115**(22): 11102-11111.
- Brnardić, I., Huskić, M., Umek, P. and Grgurić, T.H. (2013). "Sol-gel functionalization of sodium TiO<sub>2</sub> nanotubes and nanoribbons with aminosilane molecules." *Ceramics International* **39**(8): 9459-9464.
- Butterworth, M.D., Illum, L. and Davis, S.S. (2001). "Preparation of ultrafine silica- and PEG-coated magnetite particles." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **179**(1): 93-102.
- Cozzoli, P.D., Kornowski, A. and Weller, H. (2003). "Low-Temperature Synthesis of Soluble and Processable Organic-Capped Anatase TiO<sub>2</sub> Nanorods." *Journal of the American Chemical Society* **125**(47): 14539-14548.
- Daou, T.J., Begin-Colin, S., Grenèche, J.M., Thomas, F., Derory, A., Bernhardt, P., Legaré, P. and Pourroy, G. (2007a). "Phosphate Adsorption Properties of Magnetite-Based Nanoparticles." *Chemistry of Materials* **19**(18): 4494-4505.
- Daou, T.J., Buathong, S., Ung, D., Donnio, B., Pourroy, G., Guillon, D. and Bégin, S. (2007b). "Investigation of the grafting rate of organic molecules on the surface of magnetite nanoparticles as a function of the coupling agent." *Sensors and Actuators B: Chemical* **126**(1): 159-162.
- Daou, T.J., Grenèche, J.M., Pourroy, G., Buathong, S., Derory, A., Ulhaq-Bouillet, C., Donnio, B., Guillon, D. and Begin-Colin, S. (2008). "Coupling Agent Effect on Magnetic Properties of Functionalized Magnetite-Based Nanoparticles." *Chemistry of Materials* **20**(18): 5869-5875.
- De Palma, R., Peeters, S., Van Bael, M.J., Van Den Rul, H., Bonroy, K., Laureyn, W., Mullens, J., Borghs, G. and Maes, G. (2007). "Silane Ligand Exchange to Make

- Hydrophobic Superparamagnetic Nanoparticles Water-Dispersible.* Chemistry of Materials **19**(7): 1821-1831.
- De Rosales, R.T.M., Tavare, R., Glaria, A., Varma, G., Protti, A., Blower, P.J., De Rosales, R.T.M., Tavare, R., Glaria, A., Varma, G., Protti, A. and Blower, P.J. (2011). "*Tc-99m-Bisphosphonate-Iron Oxide Nanoparticle Conjugates for Dual-Modality Biomedical Imaging.*" Bioconjugate Chemistry **22**(3): 455-465.
- De Sousa, M.E., Fernández Van Raap, M.B., Rivas, P.C., Mendoza Zélis, P., Girardin, P., Pasquevich, G.A., Alessandrini, J.L., Muraca, D. and Sánchez, F.H. (2013). "*Stability and Relaxation Mechanisms of Citric Acid Coated Magnetite Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia.*" The Journal of Physical Chemistry C **117**(10): 5436-5445.
- Dearfield, K.L., Jacobson-Kram, D., Brown, N.A. and Williams, J.R. (1983). "*Evaluation of a human hepatoma cell line as a target cell in genetic toxicology.*" Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **108**(1-3): 437-449.
- Dong, H., Huang, J., Koepsel, R.R., Ye, P., Russell, A.J. and Matyjaszewski, K. (2011). "*Recyclable Antibacterial Magnetic Nanoparticles Grafted with Quaternized Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) Brushes.*" Biomacromolecules **12**(4): 1305-1311.
- Fauconnier, N., Bee, A., Roger, J. and Pons, J.N. (1996). Adsorption of gluconic and citric acids on maghemite particles in aqueous medium. Trends in Colloid and Interface Science X. Solans, C., Infante, M. R. and García-Celma, M. J., Steinkopff. **100**: 212-216.
- Fauris, C.D., C. ; Vilagines, R. (1983). Mesure de la cytotoxicité des eaux par inhibition de la synthèse d'ARN cellulaire. In Acute Aquatic Ecotoxicological Tests.
- Gao, Y., Zhou, Y. and Yan, D. (2009). "*Preparation of polystyrene-grafted titanate nanotubes by in situ atom transfer radical polymerization.*" Science in China Series B: Chemistry **52**(3): 344-350.
- Gref, R., Lück, M., Quellec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S., Blunk, T. and Müller, R.H. (2000). "*'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption.*" Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **18**(3-4): 301-313.
- Guerrero, G., Alauzun, J.G., Granier, M., Laurencin, D. and Mutin, P.H. (2013). "*Phosphonate coupling molecules for the control of surface/interface properties and the synthesis of nanomaterials.*" Dalton Transactions **42**(35): 12569-85.
- Guerrero, G., Mutin, P.H. and Vioux, A. (2001). "*Anchoring of Phosphonate and Phosphinate Coupling Molecules on Titania Particles.*" Chemistry of Materials **13**(11): 4367-4373.
- Jo, S. and Park, K. (2000). "*Surface modification using silanated poly(ethylene glycol)s.*" Biomaterials **21**(6): 605-616.
- Jolivet, J.P. (1994). De la solution à l'oxyde.
- Joumaa, N., Toussay, P., Lansalot, M. and Elaissari, A. (2008). "*Surface modification of iron oxide nanoparticles by a phosphate-based macromonomer and further encapsulation into submicrometer polystyrene particles by miniemulsion polymerization.*" Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry **46**(1): 327-340.
- Kaushik, A., Khan, R., Solanki, P.R., Pandey, P., Alam, J., Ahmad, S. and Malhotra, B.D. (2008). "*Iron oxide nanoparticles-chitosan composite based glucose biosensor.*" Biosensors and Bioelectronics **24**(4): 676-683.
- Kim, D.K., Zhang, Y., Kehr, J., Klason, T., Bjelke, B. and Muhammed, M. (2001). "*Characterization and MRI study of surfactant-coated superparamagnetic nanoparticles administered into the rat brain.*" Journal of Magnetism and Magnetic Materials **225**(1-2): 256-261.

- Knowles, B., Howe, C. and Aden, D. (1980). "*Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen.*" Science **209**(4455): 497-499.
- Kohler, N., Fryxell, G.E. and Zhang, M. (2004). "*A Bifunctional Poly(ethylene glycol) Silane Immobilized on Metallic Oxide-Based Nanoparticles for Conjugation with Cell Targeting Agents.*" Journal of the American Chemical Society **126**(23): 7206-7211.
- Kohler, N., Sun, C., Fichtenholtz, A., Gunn, J., Fang, C. and Zhang, M. (2006). "*Methotrexate-Immobilized Poly(ethylene glycol) Magnetic Nanoparticles for MR Imaging and Drug Delivery.*" Small **2**(6): 785-792.
- Krishnamurti, G.S.R. and Huang, P.M. (1991). "*Influence of citrate on the kinetics of Fe(II) oxidation and the formation of iron oxyhydroxides.*" Clays and Clay Minerals **39**(1): 28-34.
- Kumagai, M., Imai, Y., Nakamura, T., Yamasaki, Y., Sekino, M., Ueno, S., Hanaoka, K., Kikuchi, K., Nagano, T., Kaneko, E., Shimokado, K. and Kataoka, K. (2007). "*Iron hydroxide nanoparticles coated with poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer as novel magnetic resonance contrast agents for in vivo cancer imaging.*" Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **56**(1-2): 174-181.
- Lartigue, L., Innocenti, C., Kalaivani, T., Awwad, A., Sanchez Duque, M.D.M., Guari, Y., Larionova, J., Guérin, C., Montero, J.-L.G., Barragan-Montero, V., Arosio, P., Lascialfari, A., Gatteschi, D. and Sangregorio, C. (2011). "*Water-Dispersible Sugar-Coated Iron Oxide Nanoparticles. An Evaluation of their Relaxometric and Magnetic Hyperthermia Properties.*" Journal of the American Chemical Society **133**(27): 10459-10472.
- Lartigue, L., Oumzil, K., Guari, Y., Larionova, J., Guérin, C., Montero, J.-L., Barragan-Montero, V., Sangregorio, C., Caneschi, A., Innocenti, C., Kalaivani, T., Arosio, P. and Lascialfari, A. (2009). "*Water-Soluble Rhamnose-Coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles.*" Organic Letters **11**(14): 2992-2995.
- Lee, H.S., Hee Kim, E., Shao, H. and Kook Kwak, B. (2005). "*Synthesis of SPIO-chitosan microspheres for MRI-detectable embolotherapy.*" Journal of Magnetism and Magnetic Materials **293**(1): 102-105.
- Lee, J., Isobe, T. and Senna, M. (1996). "*Preparation of Ultrafine Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Particles by Precipitation in the Presence of PVA at High pH.*" Journal of Colloid and Interface Science **177**(2): 490-494.
- Limbosch, S. (1983). "*Benzo[a]pyrene- and Aldrin-Metabolizing Activities in Cultured Human and Rat Hepatoma Cell Lines.*" Journal of the National Cancer Institute **71**(2): 281-286.
- Liu, J., Liu, Y., Wu, Z., Chen, X., Wang, H. and Weng, X. (2012). "*Polyethyleneimine functionalized protonated titanate nanotubes as superior carbon dioxide adsorbents.*" Journal of Colloid and Interface Science **386**(1): 392-397.
- Ma, M., Zhang, Y., Yu, W., Shen, H.-Y., Zhang, H.-Q. and Gu, N. (2003). "*Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane.*" Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **212**(2-3): 219-226.
- Maurizi, L. (2010). Elaboration de nanoparticules fonctionnelles : applications comme agents de contraste en IRM. Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne, Université de Bourgogne.
- Maurizi, L., Bisht, H., Bouyer, F. and Millot, N. (2009). "*Easy Route to Functionalize Iron Oxide Nanoparticles via Long-Term Stable Thiol Groups.*" Langmuir **25**(16): 8857-8859.

- Maurizi, L., Bouyer, F., Paris, J., Demoisson, F., Saviot, L. and Millot, N. (2011). "One step continuous hydrothermal synthesis of very fine stabilized superparamagnetic nanoparticles of magnetite." Chemical Communications **47**(42): 11706-11708.
- Molday, R.S. and Mackenzie, D. (1982). "Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells." Journal of Immunological Methods **52**(3): 353-367.
- Mornet, S. (2002). Synthèse et modification chimique de la surface de nanoparticules de magnhémite à des fins d'applications biomédicales, Université de Bordeaux.
- Mornet, S., Portier, J. and Duguet, E. (2005). "A method for synthesis and functionalization of ultrasmall superparamagnetic covalent carriers based on maghemite and dextran." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **293**(1): 127-134.
- Mornet, S., Vasseur, S., Grasset, F. and Duguet, E. (2004). "Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy." Journal of Materials Chemistry **14**(14): 2161-2175.
- Mudunkotuwa, I.A. and Grassian, V.H. (2010). "Citric Acid Adsorption on  $TiO_2$  Nanoparticles in Aqueous Suspensions at Acidic and Circumneutral pH: Surface Coverage, Surface Speciation, and Its Impact on Nanoparticle–Nanoparticle Interactions." Journal of the American Chemical Society **132**(42): 14986-14994.
- Mutin, P.H., Guerrero, G. and Vioux, A. (2005). "Hybrid materials from organophosphorus coupling molecules." Journal of Materials Chemistry **15**(35-36): 3761-3768.
- Nguyen, T.T.T. (2013). Poly(oxyde d'éthylène)s fonctionnels à extrémité acide phosphonique et à fonctionnalité réversible pour la stabilisation de nanoparticules magnétiques, Université Nantes Angers Le Mans.
- Papa, A.L., Dumont, L., Vandroux, D. and Millot, N. (2013). "Titanate nanotubes: towards a novel and safer nanovector for cardiomyocytes." Nanotoxicology **7**: 1131-42.
- Park, H., Bae, E., Lee, J.-J., Park, J. and Choi, W. (2006). "Effect of the Anchoring Group in Ru–Bipyridyl Sensitizers on the Photoelectrochemical Behavior of Dye-Sensitized  $TiO_2$  Electrodes: Carboxylate versus Phosphonate Linkages." The Journal of Physical Chemistry B **110**(17): 8740-8749.
- Quan, D.T., Le Bloa, A., Hbib, H., Bonnaud, O., Meinel, J., Quemerais, A. and Marchand, R. (1989). "Couches minces d'oxynitruure de phosphore. Application aux structures MIS sur InP." Rev. Phys. Appl. (Paris) **24**(5): 545-551.
- Rouxhet, P.G. and Genet, M.J. (2011). "XPS analysis of bio-organic systems." Surface and Interface Analysis **43**(12): 1453-1470.
- Ruiterkamp, G.J., Hempenius, M.A., Wormeester, H. and Vancso, G.J. (2011). "Surface functionalization of titanium dioxide nanoparticles with alkanephosphonic acids for transparent nanocomposites." Journal of Nanoparticle Research **13**(7): 2779-2790.
- Sahoo, Y., Goodarzi, A., Swihart, M.T., Ohulchanskyy, T.Y., Kaur, N., Furlani, E.P. and Prasad, P.N. (2005). "Aqueous Ferrofluid of Magnetite Nanoparticles: Fluorescence Labeling and Magnetophoretic Control." The Journal of Physical Chemistry B **109**(9): 3879-3885.
- Shen, L., Laibinis, P.E. and Hatton, T.A. (1998). "Bilayer Surfactant Stabilized Magnetic Fluids: Synthesis and Interactions at Interfaces." Langmuir **15**(2): 447-453.
- Shi, Z., Xueping, G., Deying, S., Zhou, Y. and Yan, D. (2007). "Preparation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) grafted titanate nanotubes." Polymer **48**(26): 7516-7522.
- Sun, S. and Zeng, H. (2002). "Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles." Journal of the American Chemical Society **124**(28): 8204-8205.
- Sun, X. and Li, Y. (2003). "Synthesis and Characterization of Ion-Exchangeable Titanate Nanotubes." Chemistry – A European Journal **9**(10): 2229-2238.

- Thomas, L.A., Dekker, L., Kallumadil, M., Southern, P., Wilson, M., Nair, S.P., Pankhurst, Q.A. and Parkin, I.P. (2009). "*Carboxylic acid-stabilised iron oxide nanoparticles for use in magnetic hyperthermia.*" Journal of Materials Chemistry **19**(36): 6529-6535.
- Tromsdorf, U.I., Bruns, O.T., Salmen, S.C., Beisiegel, U. and Weller, H. (2009). "*A Highly Effective, Nontoxic T<sub>1</sub> MR Contrast Agent Based on Ultrasmall PEGylated Iron Oxide Nanoparticles.*" Nano Letters **9**(12): 4434-4440.
- Tudisco, C., Oliveri, V., Cantarella, M., Vecchio, G. and Condorelli, G.G. (2012). "*Cyclodextrin Anchoring on Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles Modified with Phosphonic Linkers.*" European Journal of Inorganic Chemistry **2012**(32): 5323-5331.
- Valentin-Séverin, I., Laignelet, L., Lhuguenot, J.-C. and Chagnon, M.-C. (2002). "*Uridine uptake inhibition assay: an automated micromethod for the screening of cytotoxicity.*" Toxicology **171**(2-3): 207-213.
- Valentin, I., Philippe, M., Lhuguenot, J.-C. and Chagnon, M.-C. (2001). "*Uridine uptake inhibition as a cytotoxicity test for a human hepatoma cell line (HepG2 cells): comparison with the neutral red assay.*" Toxicology **158**(3): 127-139.
- Wan, S., Huang, J., Guo, M., Zhang, H., Cao, Y., Yan, H. and Liu, K. (2007). "*Biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticle dispersions stabilized with poly(ethylene glycol)-oligo(aspartic acid) hybrids.*" Journal of Biomedical Materials Research Part A **80A**(4): 946-954.
- Wu, W., He, Q. and Jiang, C. (2008). "*Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies.*" Nanoscale Research Letters **3**(11): 397-415.
- Xie, J., Xu, C., Kohler, N., Hou, Y. and Sun, S. (2007). "*Controlled PEGylation of Monodisperse Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles for Reduced Non-Specific Uptake by Macrophage Cells.*" Advanced Materials **19**(20): 3163-3166.
- Yamaura, M., Camilo, R.L., Sampaio, L.C., Macêdo, M.A., Nakamura, M. and Toma, H.E. (2004). "*Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles.*" Journal of Magnetism and Magnetic Materials **279**(2-3): 210-217.
- Yu, S. and Chow, G.M. (2004). "*Carboxyl group (-CO<sub>2</sub>H) functionalized ferrimagnetic iron oxide nanoparticles for potential bio-applications.*" Journal of Materials Chemistry **14**(18): 2781-2786.
- Zhang, Y., Kohler, N. and Zhang, M. (2002). "*Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake.*" Biomaterials **23**(7): 1553-1561.



## Chapitre 3. Fonctionnalisation de nanoparticules pour l'imagerie nucléaire

Dans le chapitre précédent, les nanoparticules ont été préfonctionnalisées par l'APTES et le PHA. Cette modification a permis d'obtenir des amines et des acides carboxyliques en surface des nanoparticules (SPIO ou TiONts). Dans ce chapitre, la première partie traitera de la fonctionnalisation des nanotubes de titanate préfonctionnalisés par des agents complexant des radioéléments pour connaître leur biodistribution *in vivo* dans des souris. Enfin, la seconde partie présentera la création d'agents de contraste bimodaux IRM/SPECT ou IRM/TEP.

### I. Suivi des nanoparticules par radiomarquage

Le suivi par imagerie nucléaire de nanoparticules *in vivo* nécessite l'utilisation de radioéléments. Ces derniers sont souvent à courte durée de vie (quelques heures) c'est le cas du  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$  pour l'imagerie TEP (Tomographie par Émission de Positron) ou avec des temps de demi-vie plus importants (de l'ordre du jour) pour l'imagerie SPECT<sup>13</sup> (Tomographie d'Émission MonoPhotonique) comme le  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{125}\text{I}$  ou  $^{111}\text{In}$  (annexe n°11).

L'usage de radioéléments pour l'imagerie nucléaire nécessite l'utilisation de composés organique capables de les piéger. Ces composés chélatants sont en principe spécifiques à chaque radioélément. Dans ce travail, le radioélément utilisé est de l'indium 111 pour l'imagerie SPECT. Pour la TEP, les radioéléments susceptibles d'être utilisés sont le  $^{64}\text{Cu}$  et  $^{68}\text{Ga}$ .

Il est alors nécessaire de greffer à la surface des nanoparticules des ligands qui vont former des complexes stables avec les radioéléments. Un grand nombre de ligands bifonctionnels ont été étudiés pour le radiomarquage à l'indium 111 comme les ligands polyaminopolycarboxylates ou les ligands macrocycliques.

Les ligands polyaminopolycarboxylates qui forment des complexes stables avec l'indium 111 sont l'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) et le DTPA (acide N-diéthylène triamino pentaacétique) (Figure 132). La majorité des nouveaux radiopharmaceutiques marqués à l' $^{111}\text{In}$  sont actuellement des biomolécules telles que des protéines et des peptides. Leurs indications sont la détection de cancers et le ciblage des antigènes et des récepteurs surexprimés dans certaines tumeurs (Moreau *et al.* 2012). Quelques travaux récents ont été réalisés avec le DTPA pour le suivi de nanoparticules telles que des nanoparticules d'or (Park *et al.* 2008; Park *et al.* 2010), des oxydes de gadolinium (Kryza *et al.* 2011) et des nanotubes de carbone (Wu *et al.* 2009). Des dérivés du DTPA peuvent être aussi utilisés afin d'augmenter la stabilité *in vivo* des produits radiopharmaceutiques obtenus (Safavy *et al.* 2002).

---

<sup>13</sup> L'acronyme anglais SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) est le plus utilisé par rapport à l'acronyme français TEMP (Tomographie d'Émission MonoPhotonique)

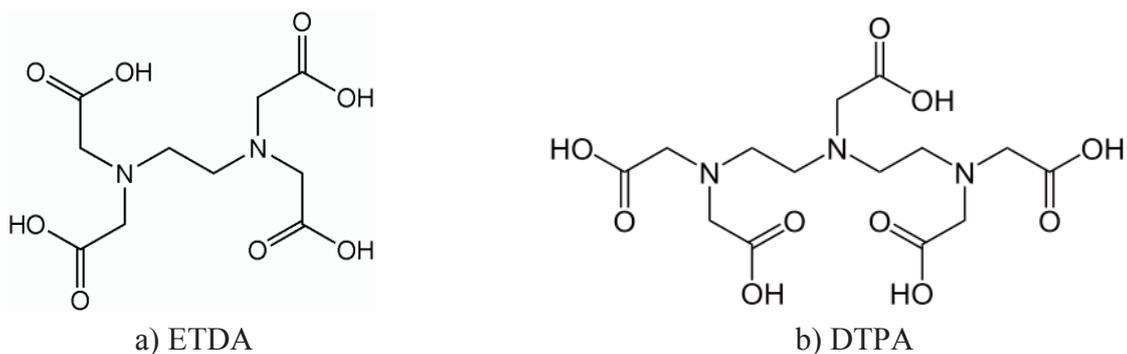
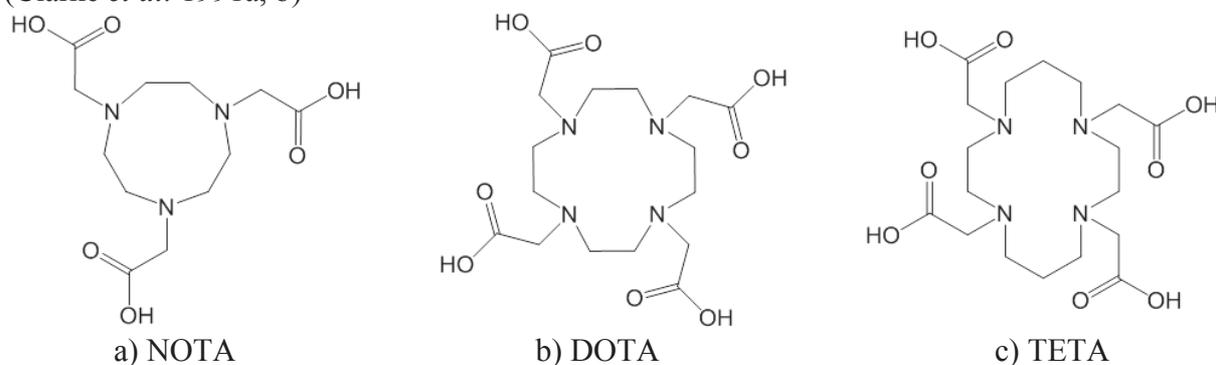


Figure 132. Les ligands polyaminopolycarboxylates

Les ligands macrocycliques chélatants sont généralement les plus utilisés pour le radiomarquage par  $^{111}\text{In}$  et par le  $^{64}\text{Cu}$ . Trois agents macrocycliques peuvent être distingués parmi tous ceux qui existent : NOTA, DOTA et TETA (Figure 133).

Les constantes de stabilité des complexes des trois ligands avec les ions  $\text{In}^{3+}$  ont été déterminées et peuvent être classées dans l'ordre décroissant : NOTA > DOTA > TETA (Clarke *et al.* 1991a, b)


 Figure 133. Les agents macrocycliques utilisés pour complexer  $^{111}\text{In}$  d'après (Reichert *et al.* 1999)

Le ligand macrocyclique le plus communément utilisé pour le suivi par imagerie nucléaire de nanoparticules est le DOTA (acide 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tétraacétique) et ses dérivés (Liu *et al.* 2007; Mcdevitt *et al.* 2007; Lee *et al.* 2008; Glaus *et al.* 2010). Le DOTA forme un complexe octacoordiné avec les radioéléments en utilisant les quatre azotes et les quatre acides carboxyliques (Lau *et al.* 2006).

Le premier facteur à prendre en compte lors de la conception d'un complexe métallique radiopharmaceutique est la stabilité thermodynamique. Cependant, elle n'indique pas le comportement *in vivo* de ces complexes. Elle est quantifiée par la mesure de la constante  $K_{ml}$ , en revanche, elle ne permet pas de comparer les divers ligands possédant des propriétés acido-basiques différentes. Il est alors préférable de quantifier la concentration en métal libre par une méthode de calcul de spéciation (Équation 5) :

$$p[M] = -\log[M]_{libre} \quad (\text{Équation 5})$$

Cette concentration est exprimée sous la forme logarithmique  $p[M]$  et représente l'affinité exclusive que le cation métallique possède avec un ligand particulier. Cette affinité permet de comparer la capacité de plusieurs ligands à complexer un métal. Plus la valeur de  $p[M]$  est élevée, plus le ligand est efficace. Des études (Reichert *et al.* 1999) ont permis de déterminer les valeurs de  $p[M]$  de  $^{111}\text{In}^{3+}$  avec divers ligands polydentés (Tableau 48).

Ligands	Transferrine	EDTA	DTPA	NOTA	DOTA	TETA
p[In <sup>3+</sup> ]	18,3	22,1	24,9	21,6	17,8	16,2

Tableau 48. Exemples d'affinité de l'ion In<sup>3+</sup> avec plusieurs agents chélatants linéaires et macrocycliques d'après (Reichert et al. 1999)

Afin d'éviter tout phénomène de transmétallation ou de relargage *in vivo*, les ions métalliques doivent être complexés de façon stable et durable par un ligand adapté car chaque cation métallique possède des propriétés et une taille qui lui sont spécifiques. D'ailleurs, certaines biomolécules telles que la transferrine, transporteur du fer contenu dans le sang, sont capables de capter des éléments métalliques, notamment le gallium et l'indium (Harris *et al.* 1994; Harris *et al.* 2002).

L'efficacité du radiomarquage est un critère utilisé pour décrire la capacité d'un chélateur à réaliser un marquage avec un rendement élevé et une haute pureté radiochimique (>90%). L'avantage premier des ligands polyaminopolycarboxylates comme le DTPA complexé à l'<sup>111</sup>In est leur efficacité de chélation extrêmement forte, rapide et d'une grande pureté radiochimique dans des conditions modérées (Liu *et al.* 2001) mais la faible stabilité *in vivo* de ces ligands entraîne un relargage du radioélément et peut entraîner un risque important d'irradiation des organes.

En revanche, les dérivés du DOTA pour la chélation de l'indium possèdent une stabilité *in vivo* plus élevée mais la cinétique de radiomarquage du DOTA est généralement lente et nécessite une température de complexation relativement élevée, alors que les complexes avec le DTPA se forment à température ambiante (Liu 2004). Ainsi, l'utilisation du DOTA avec des éléments radioactifs possédant des temps de demi-vie très courts et la température élevée nécessaire lors du radiomarquage sont des limitations importantes à l'utilisation de ce ligand macrocyclique lors du marquage de biomolécules telles que des anticorps ou des peptides. Cependant, la faible cinétique du marquage et la température élevée du radiomarquage ne sont pas une limite dans le cas des nanoparticules. Par conséquent, les dérivés du DOTA sont essentiellement utilisés dans la littérature pour le suivi de nanoparticules.

Par exemple, les nanotubes de titanate n'ont jamais été suivis par imagerie nucléaire, néanmoins leurs homologues les nanotubes de carbone ont été radiomarqués au <sup>64</sup>Cu complexé dans un dérivé DOTA et suivis en imagerie TEP pour connaître leur biodistribution (Liu *et al.* 2007).

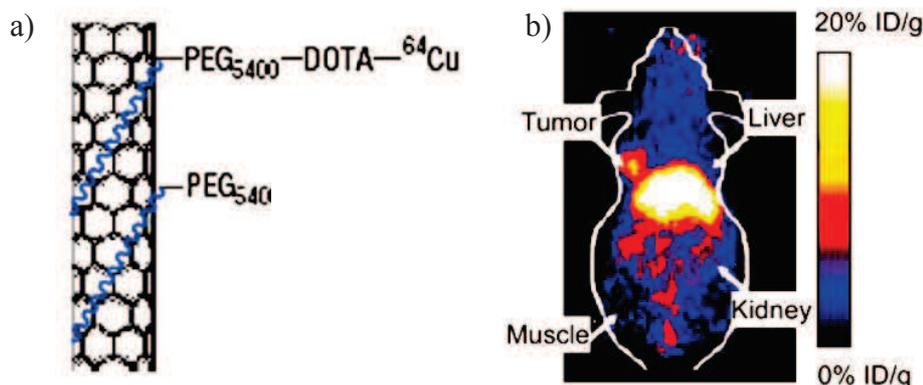


Figure 134. a) Représentation schématique du DOTA greffé sur les nanotubes de carbone et b) Image TEP obtenue d'après (Liu *et al.* 2007)

Par ailleurs le greffage du DOTA à la surface des nanoparticules requière plusieurs étapes avec en premier lieu, une étape de préfonctionnalisation pour préparer la surface et la rendre plus réactive comme dans le cas du greffage du DOTA – NCS avec les nanotubes de carbone (Mcdevitt *et al.* 2007). Ainsi, un dérivé aminé a été greffé à la surface des nanotubes de carbone pour ensuite le coupler avec le DOTA – NCS et obtenir des nanotubes de carbone fonctionnalisés par le DOTA (Figure 135).

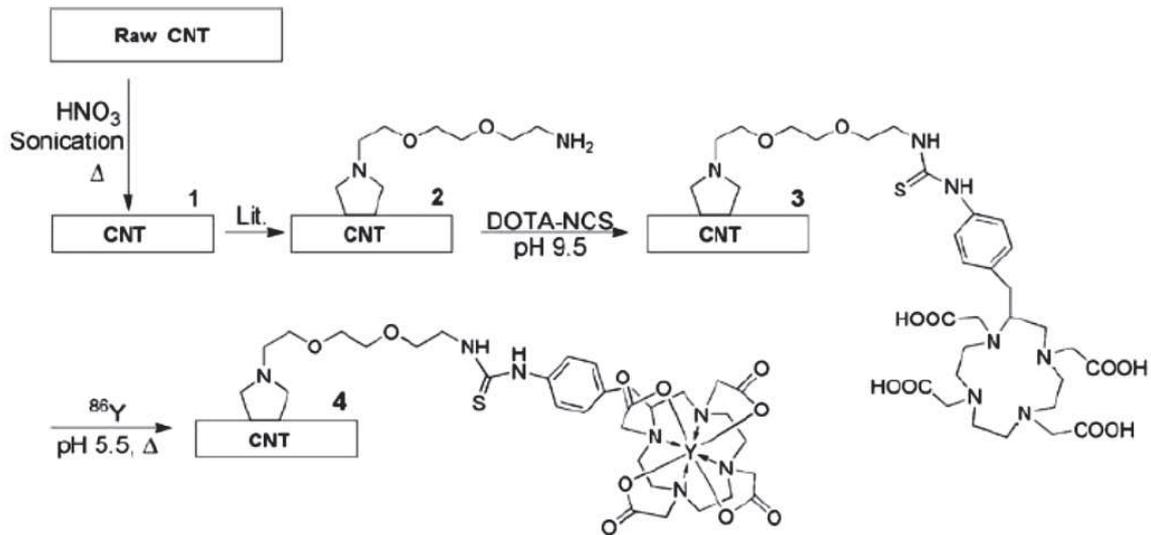


Figure 135. Les différentes étapes de modification de surface des nanotubes de carbone pour la radiomarquage à l'yttrium 86 complexé dans un DOTA d'après (Mcdevitt *et al.* 2007)

Dans ces travaux, les images TEP ont montré que les sites majeurs d'accumulation de la radioactivité résultant de l'injection de nanotubes de carbone marqués à l'yttrium (0,6 mg/kg) étaient le rein, le foie, la rate et plus faiblement le squelette osseux (Figure 136).

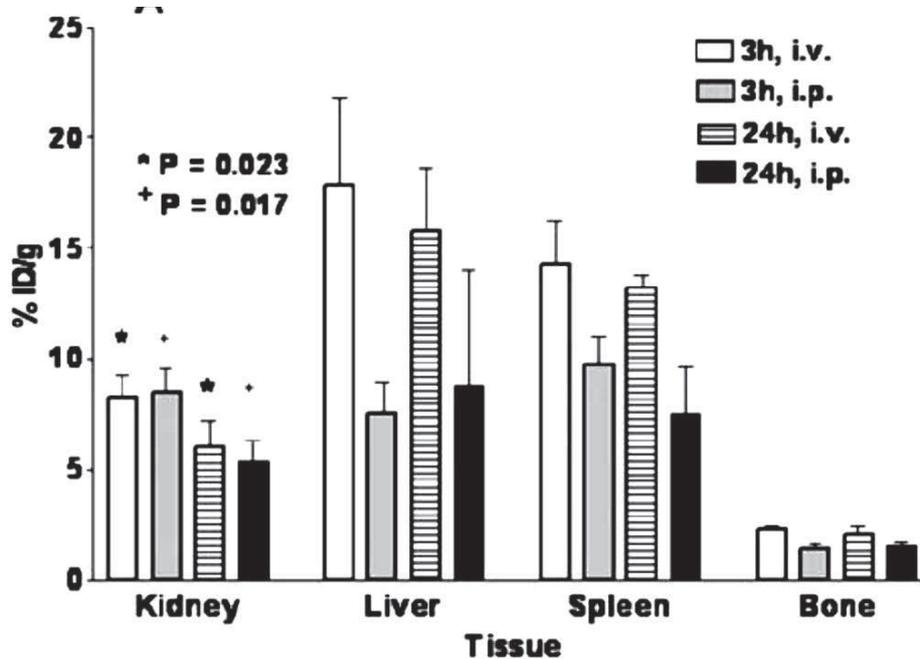


Figure 136. Biodistribution obtenue d'après les images TEP des nanotubes de carbone marqués à l'<sup>86</sup>Y (n = 3) selon (Mcdevitt *et al.* 2007)

De même, des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  ont déjà été fonctionnalisées par du DOTA pour faire de l'imagerie par résonance magnétique en complexant un cation gadolinium (III). Les auteurs ont fabriqué une sonde multimodale en greffant en plus de la rhodamine à la surface des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  (Rehor *et al.* 2011). Dans ces travaux, l'étape de préfonctionnalisation n'a pas eu lieu car les auteurs utilisent des dérivées du DOTA et de la rhodamine à base de phosphonate qui réagit directement avec les hydroxyles de surface des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$ .

En revanche, l'utilisation de nanoparticules d'oxydes de fer modifiées en vue d'application de diagnostic fait d'elles des agents de contraste multimodaux (Cheon *et al.* 2008). Par exemple, les nanoparticules d'oxydes de fer (pour l'IRM) fonctionnalisées par des agents macrocycliques pour l'imagerie nucléaire sont des agents de contraste bimodaux soit pour l'IRM/TEP (Lee *et al.* 2008; Hwang *et al.* 2009; Glaus *et al.* 2010), soit pour l'IRM/SPECT (De Rosales *et al.* 2011; Sandiford *et al.* 2012). De même, les travaux de De Rosales (De Rosales *et al.* 2011) ont permis la création d'un agent de contraste bimodal pour l'IRM et pour la SPECT en fonctionnalisant la surface des nanoparticules par un bisphosphonate capable de complexer le Technétium,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (Figure 137).



Figure 137. Représentation d'un agent de contraste bimodal IRM/SPECT d'après (De Rosales *et al.* 2011)

Les clichés obtenus en IRM et en SPECT ainsi que la biodistribution mesurée par comptage radioactif indique que la majorité de l'agent de contraste bimodal injecté se situe dans le foie et la rate des souris (Figure 138).

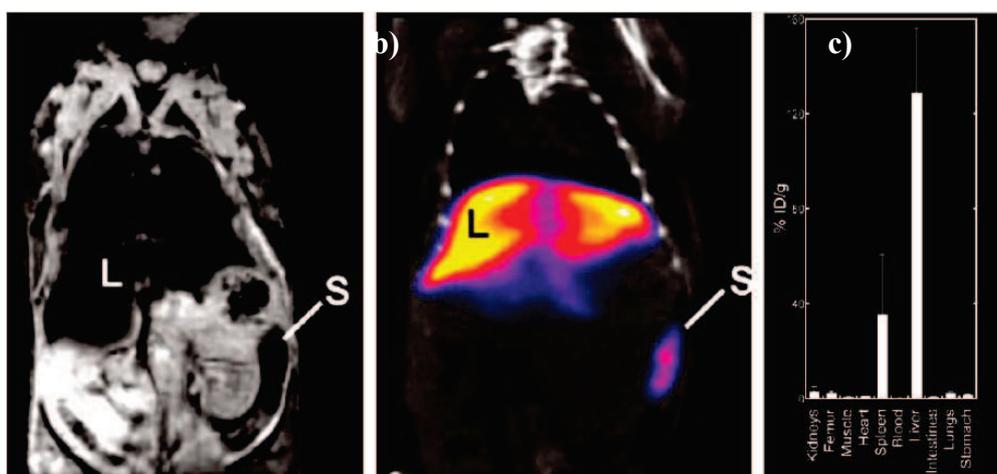


Figure 138. Étude *in vivo* de l'agent de contraste bimodal IRM/SPECT marqué au  $^{99\text{m}}\text{Tc}$   
 a) Image IRM T2, b) Image SPECT/CT et c) biodistribution en radioactivité ( $n = 3$ )  
 L : Liver (Foie) et S : Spleen (rate) d'après (De Rosales *et al.* 2011)

## II. Fonctionnalisation des nanotubes par des agents chélatants

### II.1 - Les agents chélatants choisis pour l'imagerie nucléaire

Comme vu précédemment, les agents chélatants choisis sont macrocycliques car ils présentent un faible taux de relargage *in vivo* par rapport aux agents linéaires. Ces agents ont été fournis par la société CheMatech<sup>14</sup>. Les agents choisis sont le DOTA – NHS pour complexer l'<sup>111</sup>In ou le <sup>64</sup>Cu et le NOTA – NHS pour capter le <sup>68</sup>Ga (Figure 139). L'intérêt de ces molécules est l'ester activé qui pourra venir se greffer sur des nanoparticules modifiées en surface par l'APTES. L'amine à la surface des nanoparticules va réagir avec l'ester activé NHS pour former une liaison peptidique et ainsi lier le composé macrocyclique aux nanoparticules. Par cette action, les autres bras carboxyliques ne rentrent pas en jeu lors de la fonctionnalisation des nanoparticules et restent libre pour le maintien de l'élément radioactif à l'intérieur de la cavité.

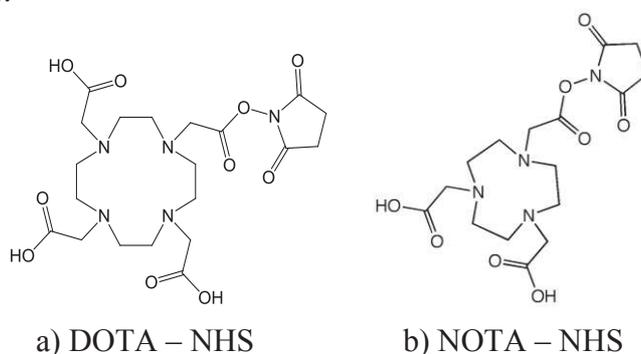


Figure 139. Formule semi-développée des agents macrocycliques choisis, synthétisés par la société CheMatech

Le DOTA – NHS a été caractérisé par analyse XPS (Tableau 49). Les concentrations atomiques mesurées sont proches de celles de la fraction théorique. Les éléments caractéristiques du DOTA – NHS comme le carbone, l'azote et l'oxygène sont identifiés. La présence de fluor et de phosphore est expliquée par le fait qu'une molécule d'acide hexafluorophosphorique (HPF<sub>6</sub>) accompagne toujours le DOTA – NHS, cet acide est un résidu du procédé de fabrication des agents chélatants qui n'est pas entièrement éliminé lors de l'étape de purification.

	Concentration atomique (%)				
	C 1s	O 1s	N 1s	F 1s	P 2p
<b>Fraction théorique</b>	47,6	23,8	11,9	14,3	2,4
<b>Fraction expérimentale</b>	48,9	18,9	13,7	8	3

Tableau 49. Concentration atomique théorique et expérimentale du DOTA – NHS

La décomposition du niveau C1s laisse apparaître 4 composantes. Tout d'abord, le DOTA est identifié par les liaisons  $\underline{C} - NH_2$  à 286,0 eV qui forment le cycle et par les liaisons  $(\underline{C} = O) - OH$  à 288,6 eV qui représentent les bras portant une fonction acide carboxylique. Les composantes à 284,5 eV et à 287,2 eV correspondent respectivement aux liaisons  $\underline{C} - C/$

<sup>14</sup> Site web de la société : <http://www.chematech-mdt.com/>, leader européen dans la conception, la synthèse et le design d'agents macrocycliques chélatants

$\underline{\text{C}}-\text{H}$  et  $\underline{\text{C}}=\text{O}$  et représentent la partie NHS du DOTA – NHS comme la composante ( $\underline{\text{C}}=\underline{\text{O}}$ ) [NHS] à 531,6 eV du niveau O1s. D'ailleurs, au niveau O1s, la composante se situant à 534,4 eV représente la liaison  $\underline{\text{N}}-\underline{\text{O}}$  entre le DOTA et le NHS. Les deux autres composantes du niveau O1s à 531,6 eV et à 533,0 eV coïncident avec les liaisons acides carboxyliques du DOTA (Figure 140).

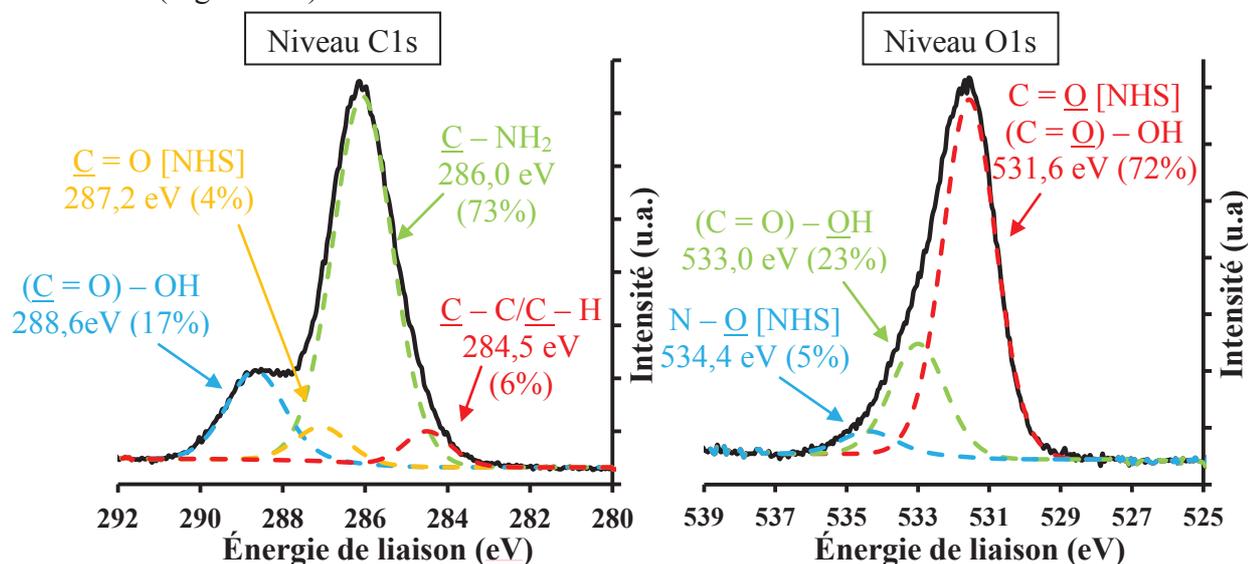


Figure 140. Analyse XPS : Décomposition des niveaux C1s et O1s du DOTA – NHS.

La décomposition du niveau N1s du DOTA – NHS met en évidence deux composantes à peu près égales en proportion. La première composante à 339,7 eV représente les liaisons  $\text{C}-\underline{\text{N}}\text{H}_2$  classiques. A 401,6 eV, se situe la composante des liaisons  $\text{C}-\underline{\text{N}}\text{H}_3^+$  soulignant qu'une partie des azotes du cycle est chargée ce qui permettra de complexer l'élément radioactif introduit à l'intérieur du cycle. Cette composante représente aussi dans une moindre mesure les liaisons  $\underline{\text{N}}-\text{O}$  du DOTA – NHS (Figure 141).

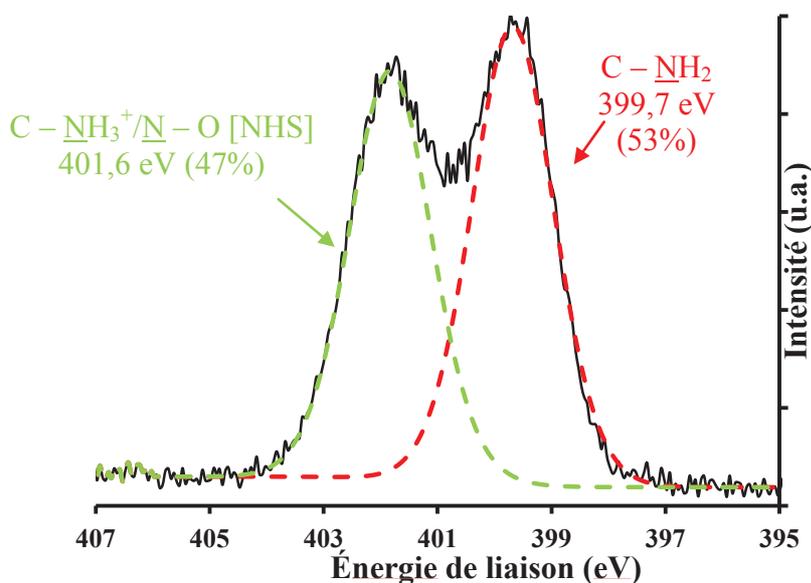


Figure 141. Analyse XPS : Décomposition du niveau N1s du DOTA – NHS

En XPS, les spectres du NOTA sont très semblable à ceux des DOTA. Sur les divers seuils (C1s, O1s et N1s), les mêmes composantes apparaissent aux mêmes énergies.

## II.2 - Fonctionnalisation de nanotubes de titanate à des fins d'imagerie SPECT

Dans le cadre de cette étude, l'élément radioactif utilisé pour l'imagerie SPECT est l'indium 111 sous sa forme cationique  $\text{In}^{3+}$ . Pour capter cet élément, il est nécessaire de greffer à la surface des nanotubes un agent macrocyclique adapté à sa taille. L'indium (III) est difficile à complexer dans la cavité du DOTA sans apport d'énergie. Cette difficulté du DOTA à piéger l'indium en fait un bon candidat car une fois l'indium complexé dans sa cavité, il est aussi compliqué à retirer ce qui limitera la transmétallation et le relargage. Pour complexer l'indium et le DOTA, il est alors nécessaire d'apporter de l'énergie sous forme de chaleur (Moreau *et al.* 2012). Dans le cas des nanoparticules, l'apport d'énergie n'est pas une limite contrairement aux biomolécules.

### II.2.1 - Conditions de greffage du DOTA – NHS sur les TiONts – $\text{NH}_2$

#### II.2.1.1 - Procédure expérimentale

Le couplage du DOTA – NHS avec les nanotubes aminés (TiONts –  $\text{NH}_2$ ) se déroule dans 10 mL d'un mélange de THF/DMSO (90/10 en volume) en présence de 100 mg de TiONts –  $\text{NH}_2$  et de DOTA – NHS dans un rapport massique [1 : 1] (Figure 142). Cette suspension est dispersée au bain à ultrasons pendant 15 minutes puis placée sous agitation magnétique (400 trs/min) et sous atmosphère inerte ( $\text{N}_2$ ) pendant 48 heures.

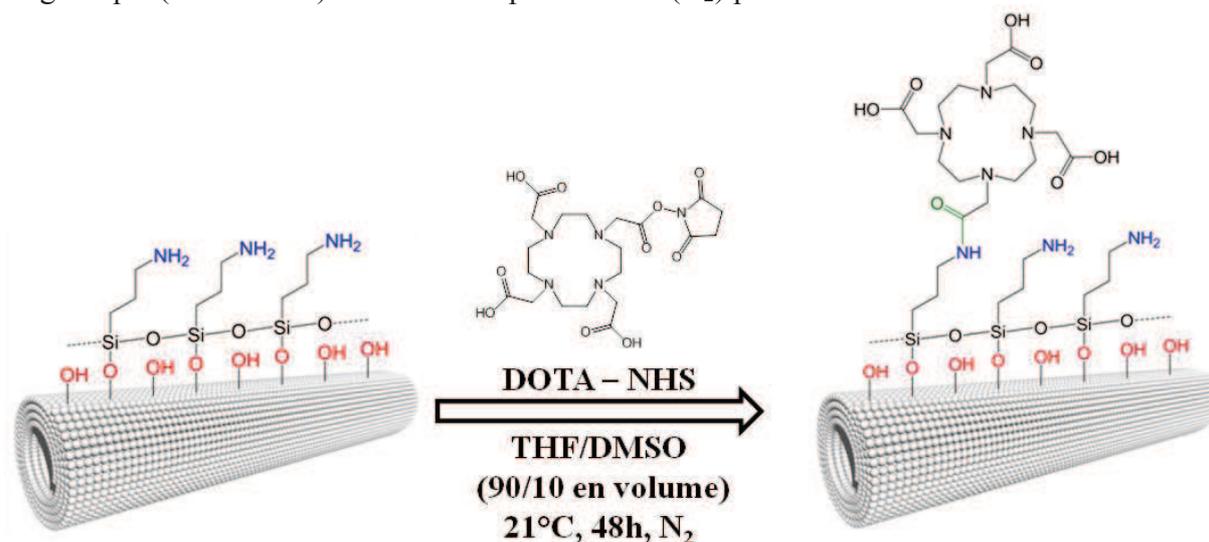


Figure 142. Représentation schématique du greffage du DOTA – NHS sur les TiONts –  $\text{NH}_2$ .  
Le NHS n'est pas représenté après couplage.

Après 48 heures de réaction, 20 mL d'eau déionisée sont ajoutés à la suspension qui est ensuite placée à l'évaporateur rotatif pour éliminer le THF (500 mbar/60°C). La suspension résultante (eau/DMSO) est ensuite ultrafiltrée sur des membranes de tailles de pores de 30 kDa, par des cycles d'eau déionisée (10 × 100 mL) et par un dernier cycle à l'eau ultrapure (2 × 100 mL) pour éliminer le DOTA n'ayant pas réagi. Pour finir, la suspension est lyophilisée pour être caractérisée.

Les nanotubes fonctionnalisés par le DOTA seront nommés **TiONts – DOTA** dans la suite du manuscrit.

## II.2.1.2 - Analyse des nanotubes fonctionnalisés par le DOTA – NHS

Les nanotubes fonctionnalisés par le DOTA ont été analysés par spectroscopie FTIR. Le spectre des TiONts – DOTA présente peu de différences par rapport à celui des TiONts – NH<sub>2</sub>. Les fonctions acide carboxylique du DOTA sont trop proches des modes de vibrations des hydroxyles de surface (1650 cm<sup>-1</sup>). De même, la double liaison C = O de la fonction amide (1650 – 1700 cm<sup>-1</sup>) n'est pas visible sur le spectre infrarouge (Figure 143). De plus, la vibration de la liaison N – H amide n'est pas observable car elle est confondue avec la vibration de la liaison N – H amine des TiONts – NH<sub>2</sub> à 3200 cm<sup>-1</sup>.

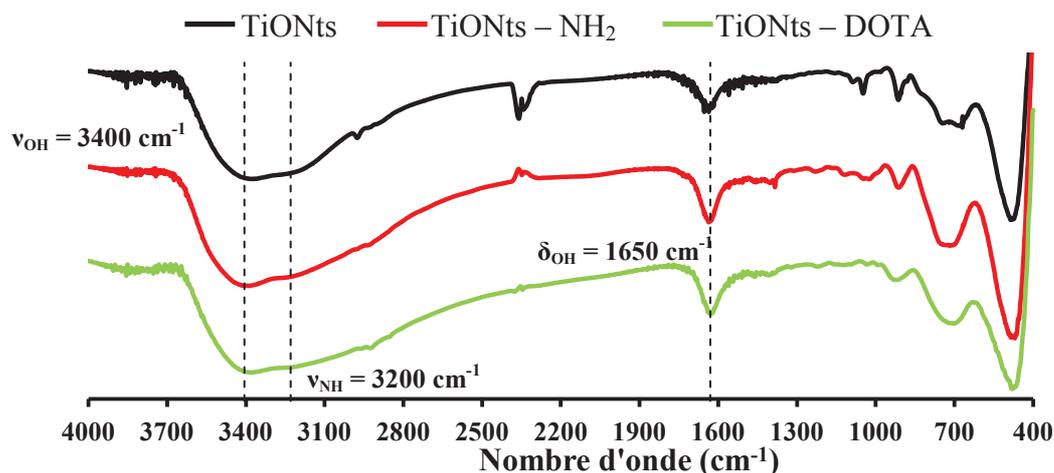


Figure 143. Spectres infrarouge des TiONts, TiONts – NH<sub>2</sub> et des TiONts – DOTA

La présence de DOTA à la surface des TiONts – NH<sub>2</sub> est par contre mise en évidence par l'analyse XPS (Tableau 50). L'augmentation des concentrations des éléments tels que l'azote et l'oxygène souligne la présence de DOTA à la surface des nanotubes aminés. Par ailleurs, ceci est confirmé par la diminution des concentrations en silicium et en sodium. D'autre part, l'apparition d'espèces comme le phosphore et le fluor présentes avec le DOTA – NHS indique également la présence de DOTA à la surface des nanotubes fonctionnalisés.

Synthèse	Concentration atomique (%)							
	Ti 2p	O 1s	C 1s	Na KLL	N 1s	Si 2p	P 2p	F 1s
TiONts	21	59	6	14	-	-	-	-
TiONts – NH <sub>2</sub>	19	54	13	8	3	3	-	-
TiONts – DOTA	20	60	11	1	5	1,5	1	0,5

Tableau 50. Analyse XPS : Concentrations atomiques des espèces présentes à la surface des TiONts, TiONts – NH<sub>2</sub> et TiONts – DOTA

La décomposition du niveau C1s des nanotubes fonctionnalisés par le DOTA révèle une nouvelle composante correspondant aux liaisons (C = O) – OH à 288,2 eV. Ce même type de liaison est observé lors de la décomposition du niveau O1s des TiONts – DOTA par l'apparition d'une nouvelle composante (C = O) – OH à 532,2 eV (Figure 144). L'apparition de ces composantes est due à la présence de liaisons carboxyliques. Ces dernières ne peuvent provenir que du DOTA greffé à la surface des TiONts – NH<sub>2</sub>. L'agent chélatant est bien sous la forme DOTA et non DOTA – NHS car les composantes C = O et N – O du NHS ne sont pas présentes à la surface des TiONts – NH<sub>2</sub>. Ainsi, l'XPS permet de conclure que le DOTA est bien greffé aux nanotubes (Figure 144).

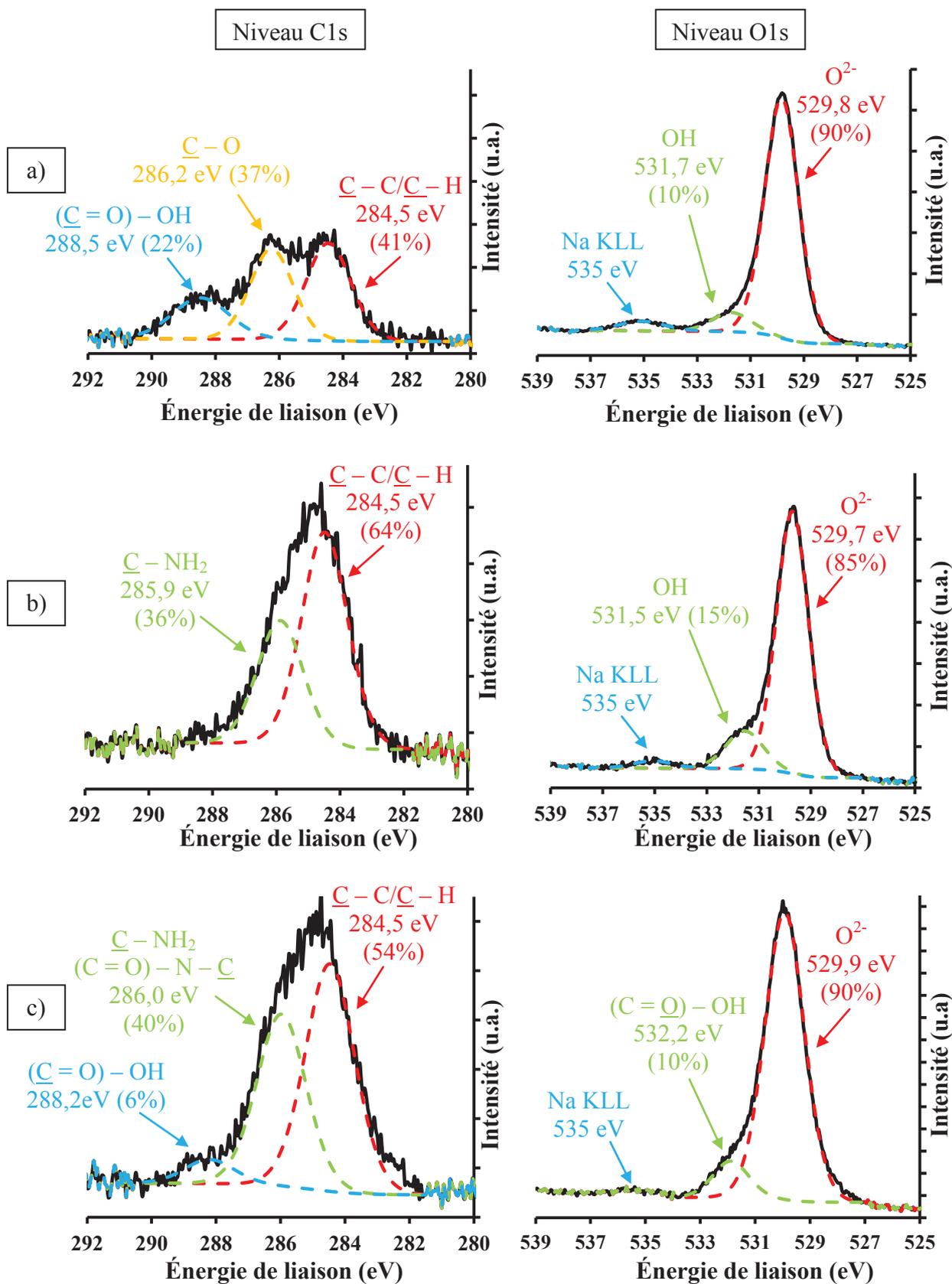


Figure 144. Analyse XPS : Décomposition des niveaux C1s et O1s, a) TiONts, b) TiONts - NH<sub>2</sub> et c) TiONts - DOTA

Pour confirmer ces résultats, l'analyse thermogravimétrique des TiONts – DOTA est réalisée de 30°C jusqu'à 800°C sous flux de N<sub>2</sub> avec une montée en température de 5°C.min<sup>-1</sup>. La présence de DOTA est mise en avant par le fait que la perte de masse des TiONts – DOTA est plus importante que celle des TiONts – NH<sub>2</sub> (Figure 145).

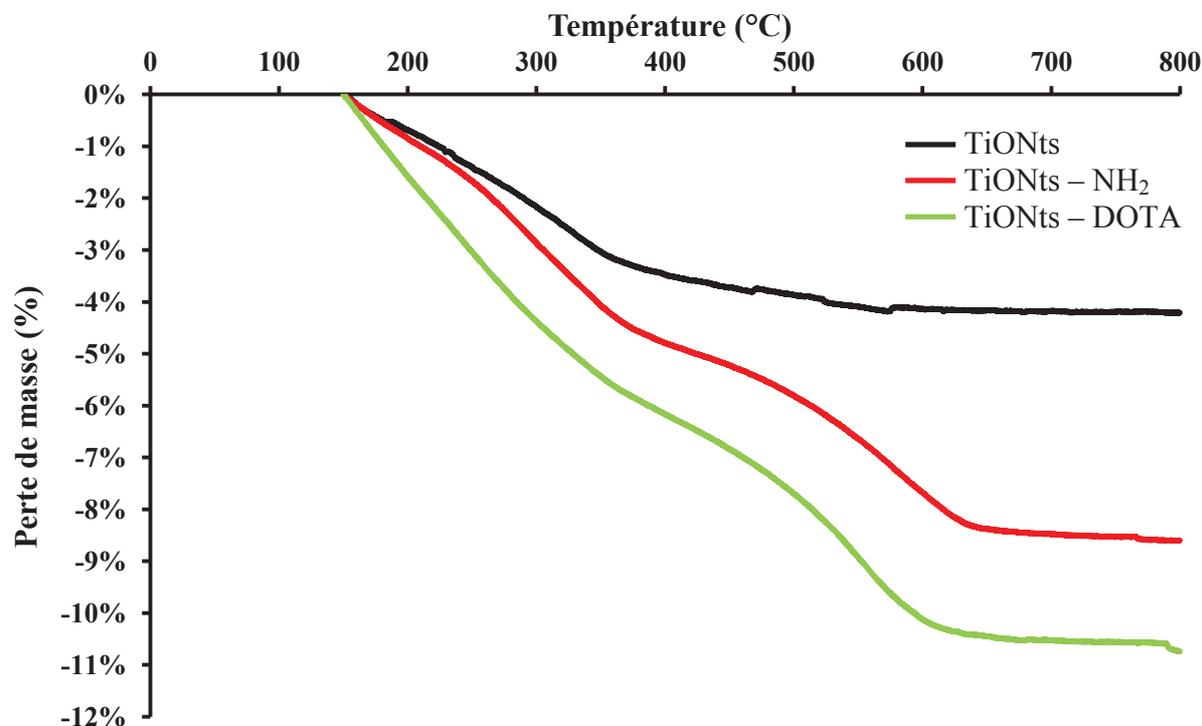


Figure 145. ATG des TiONts et des nanohybrides TiONts – NH<sub>2</sub> et TiONts – DOTA. Les mesures ont été réalisées sous flux de N<sub>2</sub> (25 mL.min<sup>-1</sup>) avec une rampe de montée en température de 5°C.min<sup>-1</sup>. Les courbes ont été normalisées à 150°C (annexe n°3) et sont représentatives d'un échantillon.

À partir de l'exploitation des pertes de masses en ATG entre 150°C et 800°C et en tenant compte que la surface spécifique des TiONts – NH<sub>2</sub> est de (163 ± 23) m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>, le calcul par le biais de l'équation 5 (annexe n°3) permet d'estimer le taux de greffage de l'ordre de 0,2 DOTA par nm<sup>2</sup> (Tableau 51).

	$\Delta m$ totale (%)	$\Delta m$ calcul (%)	Masse molaire à considérée pour la perte (g.mol <sup>-1</sup> )	Molécules/nm <sup>2</sup>	R (%)	n
TiONts	3,8	3,8	18	(6 ± 4) OH	-	12
TiONts – NH <sub>2</sub>	8,63	8,63	58	(5,7 ± 0,8) NH <sub>2</sub>	95	17
TiONts – DOTA	10,73	2,1	376	(0,2 ± n.d.) DOTA	4	1

Tableau 51. Estimation du taux de greffage du DOTA sur les TiONts. n.d. non déterminé car il n'y avait pas assez de valeurs pour être représentatif. R représente le rendement de greffage (%) et n le nombre d'échantillons analysés.

Le taux de DOTA est proche des données trouvées dans la littérature pour des nanomatériaux similaires tels que les nanotubes de carbones fonctionnalisés par le DOTA pour lesquels les valeurs sont de l'ordre de 0,1 à 0,3 DOTA/nm<sup>2</sup> (Liu *et al.* 2007; Mcdevitt *et al.* 2007).

Le taux d'agents chélatants ( $0,2 \text{ DOTA/nm}^2$ ) peut paraître faible mais cela conduit à environ 800 DOTA par TiONts, de plus, l'imagerie SPECT étant une imagerie nucléaire très sensible (cf. Tableau 1 page 18), le taux d'agents chélatants n'a pas besoin d'être très élevé pour obtenir un signal convenable en imagerie SPECT.

### II.2.1.3 - Étude de la stabilité en suspension des TiONts – DOTA

Le greffage du DOTA – NHS à la surface des TiONts –  $\text{NH}_2$  a comme conséquence de décaler le point isoélectrique des TiONts fonctionnalisés par le DOTA vers des pH plus acides. Cet effet est le même que celui qui est observé lors du greffage du PHA ( $\text{R} - \text{COOH}$ ) à la surface des nanoparticules. Ce phénomène est dû à la présence des acides carboxyliques du DOTA qui modifient les charges de surface des nanotubes et à la formation d'amide qui supprime des fonctions amine en surface (Figure 146).

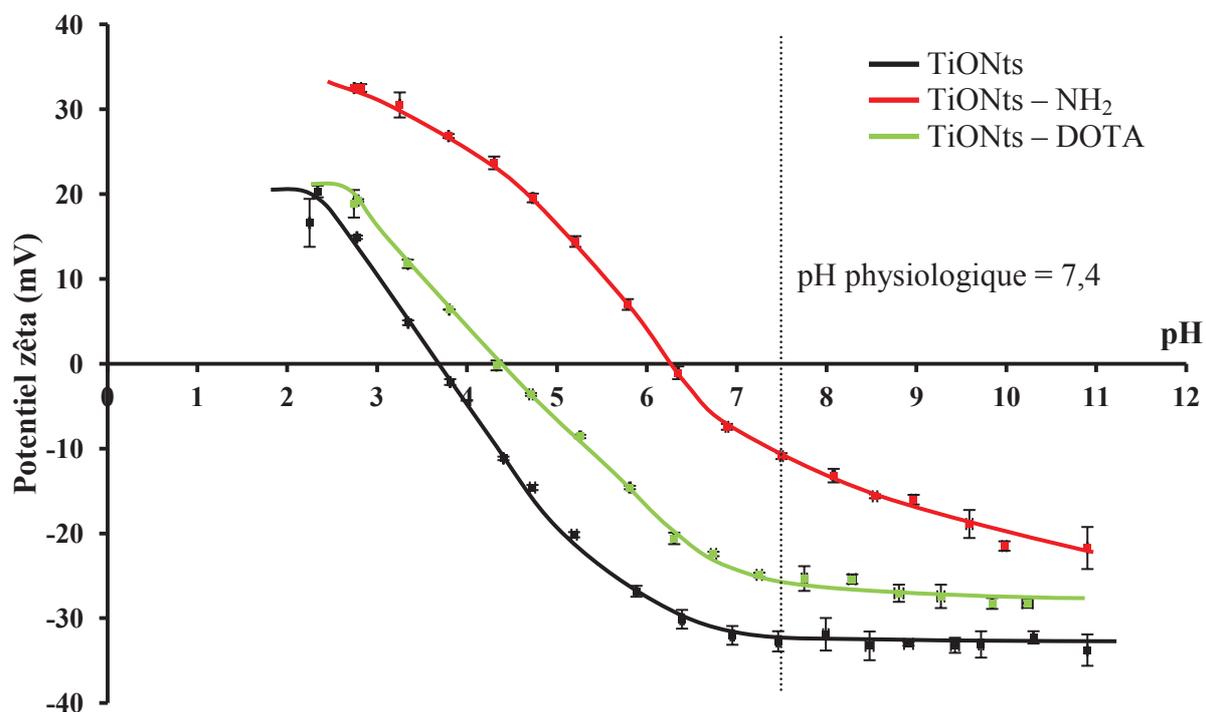


Figure 146. Évolution du potentiel zêta des TiONts, TiONts –  $\text{NH}_2$  et TiONts – DOTA dans  $\text{NaCl}$  ( $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ ) en fonction du pH. Courbes représentatives d'un échantillon.

Le Tableau 52 centralise les données essentielles sur la stabilité concernant les TiONts, TiONts –  $\text{NH}_2$  et TiONts – DOTA.

Synthèse	PIE	$\zeta$ à pH = 7,4 (mV)	n
TiONts	$3,3 \pm 0,2$	$-32 \pm 3$	6
TiONts – $\text{NH}_2$	$6,3 \pm 0,8$	$-13 \pm 4$	12
TiONts – DOTA	$4,3 \pm \text{n.d.}$	$-24 \pm 2$	1

Tableau 52. Récapitulatif des points isoélectriques et des valeurs du potentiel zêta pour les composés TiONts, TiONts –  $\text{NH}_2$  et TiONts – DOTA. n.d. non déterminé car il n'y avait pas assez de valeurs pour être représentatif. n représente le nombre d'échantillons analysés.

II.2.2 - Greffage de PEG sur les nanotubes fonctionnalisés par le DOTA

II.2.2.1 - Protocole de greffage du PEG<sub>3000</sub> – NHS sur les TiONts – DOTA

Pour permettre une meilleure biocompatibilité, un PEG<sub>3000</sub> – NHS (Source : Iris Biotech, réf. : PEG 1111) est greffé à la surface des nanotubes fonctionnalisés par le DOTA (Figure 147). Cette stratégie de fonctionnalisation est basée sur la réaction de l'ester activé (NHS) sur les amines restantes des TiONts – DOTA (5,5 NH<sub>2</sub> restants). La difficulté est de ne pas trop fonctionnaliser la surface des nanotubes car le PEG pourrait empêcher par gêne stérique le DOTA de complexer l'indium lors du radiomarquage.

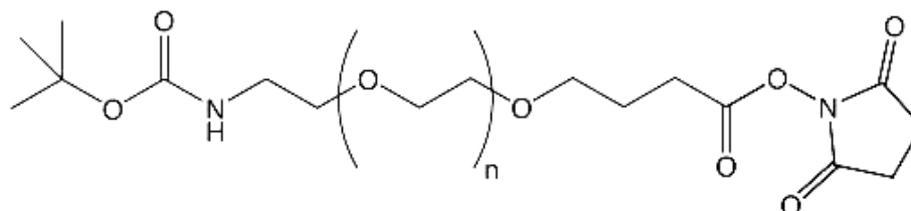


Figure 147. Formule du PEG<sub>3000</sub> – NHS greffé à la surface des TiONts – DOTA

50 mg de TiONts – DOTA et de PEG<sub>3000</sub> – NHS dans un rapport massique [1 : 1] sont mélangés aux ultrasons dans du THF fraîchement distillé (V = 50 mL) pendant 15 minutes. La suspension est ensuite placée sous agitation magnétique (400 trs/min) et sous atmosphère inerte (N<sub>2</sub>) pendant 48 heures à T = 21°C. Après le temps de réaction, 20 mL d'eau déionisée sont ajoutés à la suspension qui est ensuite placée à l'évaporateur rotatif pour éliminer le THF (500 mbar/60°C). La suspension résultante (eau/DMSO) est ensuite ultrafiltrée sur des membranes de tailles de pores de 30 kDa, par des cycles de lavage à l'eau déionisée (10 × 100 mL) et enfin à l'eau ultrapure (2 × 100 mL) pour éliminer le PEG<sub>3000</sub> n'ayant pas réagi. Pour finir, la suspension est lyophilisée.

Les nanotubes greffés par le PEG seront notés **PEG – TiONts – DOTA** par la suite.

II.2.2.2 - Analyse des nanotubes greffés par le PEG

L'analyse XPS révèle la présence de PEG à la surface des TiONts – DOTA. L'augmentation du carbone en est le meilleur exemple, le rapport C1s/Ti2p passe du simple au double (Tableau 53).

Synthèse	Concentration atomique (%)								C1s/Ti2p
	Ti 2p	O 1s	C 1s	Na KLL	N 1s	Si 2p	P 2p	F 1s	
TiONts	21	59	6	14	-	-	-	-	0,29
TiONts – NH <sub>2</sub>	19	54	13	8	3	3	-	-	0,68
TiONts – DOTA	20	60	11	1	5	1,5	1	0,5	0,55
<b>PEG – TiONts – DOTA</b>	19	57	20	0	3	1	0	0	1,05

Tableau 53. Analyse XPS : Concentration atomique des espèces présentes à la surface des TiONts, TiONts – NH<sub>2</sub>, TiONts – DOTA et PEG – TiONts – DOTA

La décomposition des niveaux C1s et O1s des PEG – TiONts – DOTA ne permet pas de conclure quant à la liaison entre le TiONts et le PEG (Figure 148). Par contre, la présence de PEG est confirmée par l'augmentation des composantes à 286,0 eV (C – O [PEG]) et à 530,7 eV avec l'apparition de la composante C – O [PEG] au niveau O1s (Rouxhet *et al.* 2011).

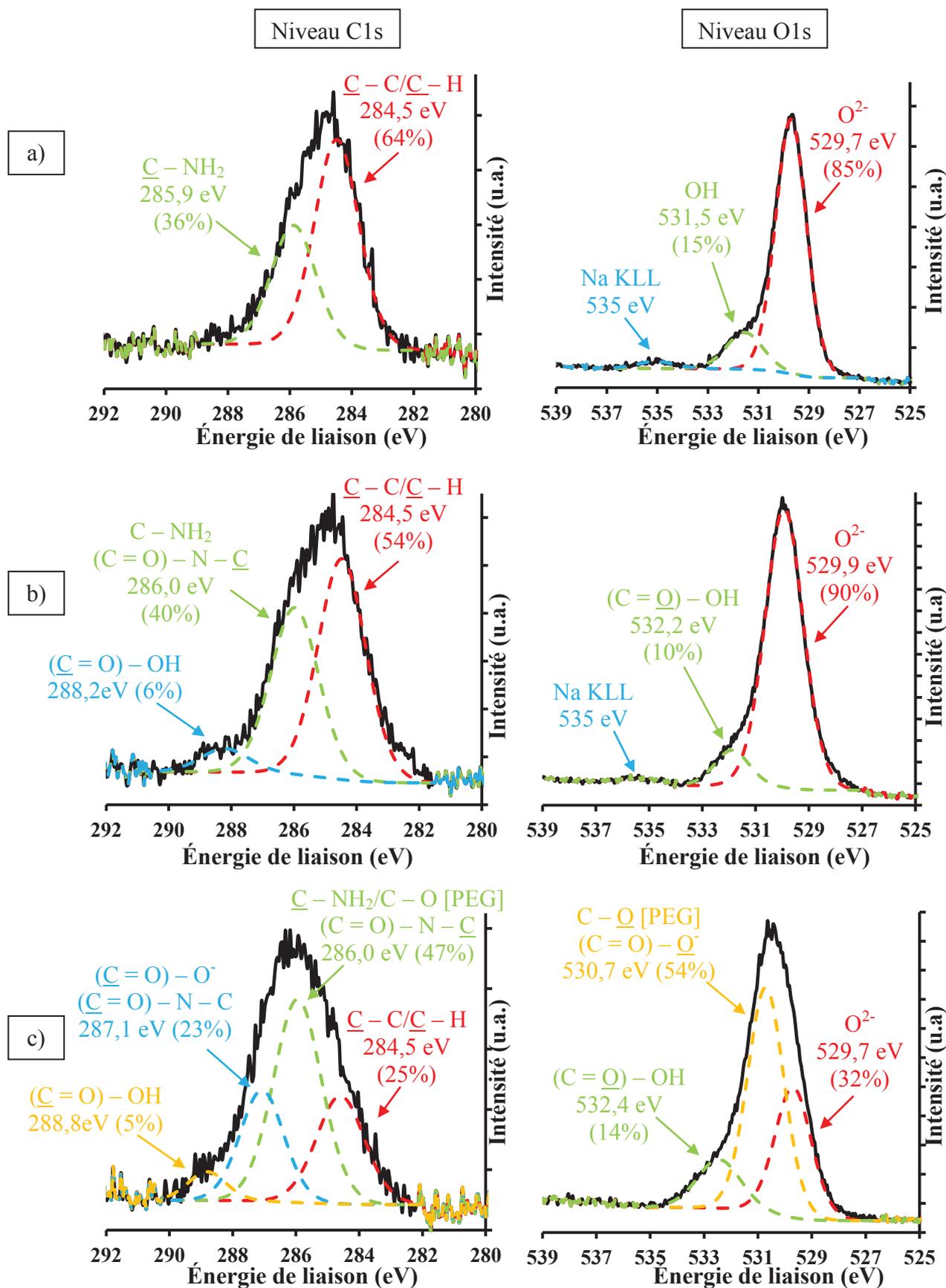


Figure 148. Analyse XPS : Décomposition des niveaux C1s et O1s, a) TiONts - NH<sub>2</sub>, b) TiONts - DOTA et c) PEG - TiONts - DOTA

Le composé PEG – TiONts – DOTA a été analysé par spectroscopie FTIR. Il y a très peu de changement entre le spectre des TiONts – DOTA et des PEG – TiONts – DOTA ce qui pourrait indiquer une faible présence de PEG à la surface des nanotubes. Malgré tout, une faible augmentation des vibrations des liaisons C – H à 2810 et 2915  $\text{cm}^{-1}$  et des liaisons C – C à 1110  $\text{cm}^{-1}$  est observée (Figure 149).

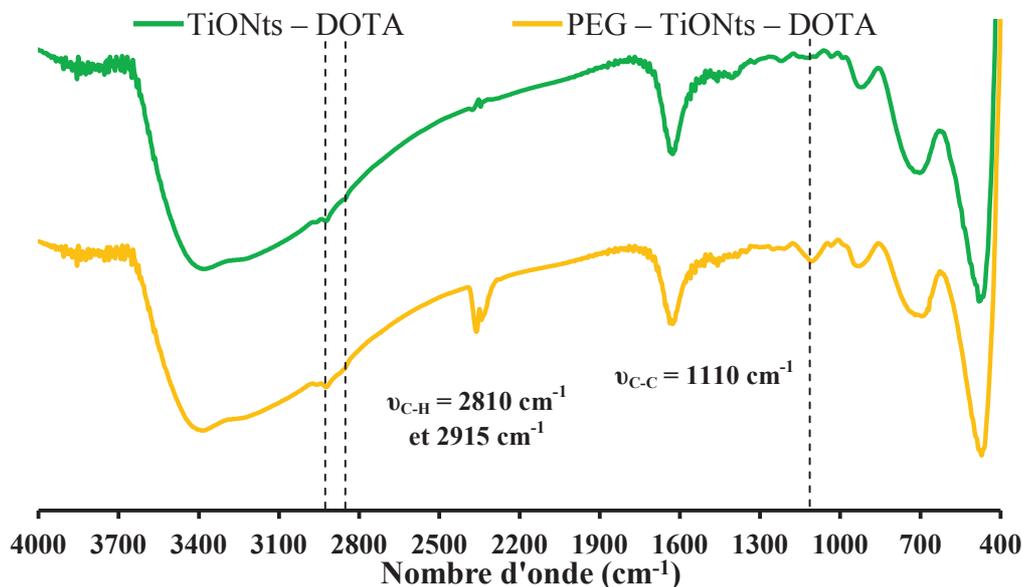


Figure 149. Spectre IR des composés TiONts, TiONts –  $\text{NH}_2$ , TiONts – DOTA et PEG – TiONts – DOTA

L'analyse thermogravimétrique des PEG – TiONts – DOTA montre que la perte de masses est plus importante que pour les TiONts – DOTA, révélant la présence de PEG (Figure 150).

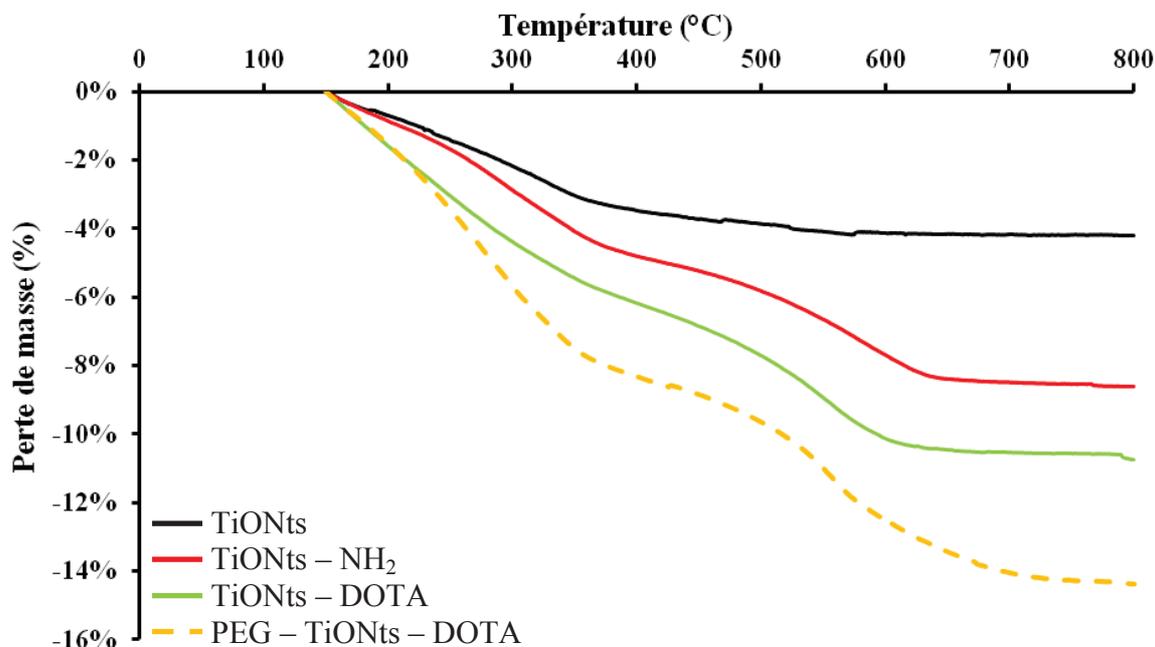


Figure 150. ATG des TiONts et des nanohybrides, TiONts –  $\text{NH}_2$ , TiONts – DOTA et PEG – TiONts – DOTA. Les mesures ont été réalisées sous flux de  $\text{N}_2$  ( $25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) avec une rampe de montée en température de  $5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ . Les courbes ont été normalisées à  $150^\circ\text{C}$  (annexe n°3) et sont représentatives d'un échantillon.

À partir de l'équation 3 (annexe n°3), le taux de greffage du PEG<sub>3000</sub> – NHS peut être estimé. En considérant la perte de masse des nanohybrides entre 150 et 800°C exclusivement due aux polymères et en retranchant la perte de masse des précurseurs de départ (TiONts – DOTA), le taux de PEG calculé est de l'ordre de 0,05 PEG/nm<sup>2</sup> (Tableau 54), la surface spécifique considérée étant de (163 ± 23) m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> pour les TiONts.

	$\Delta m$ totale (%)	$\Delta m$ calcul (%)	Masse molaire à considérée pour la perte (g.mol <sup>-1</sup> )	Molécules/nm <sup>2</sup>	R (%)	n
TiONts	3,8	3,8	18	(6 ± 4) OH	-	12
TiONts – NH <sub>2</sub>	8,63	8,63	58	(5,7 ± 0,8) NH <sub>2</sub>	95	17
TiONts – DOTA	10,73	2,1	376	(0,2 ± n.d.) DOTA	4	1
PEG – TiONts – DOTA	14,38	3,65	3121	(0,05 ± n.d.) PEG	1	1

Tableau 54. Estimation du taux de greffage du PEG sur les TiONts – DOTA. n.d. non déterminé car il n'y avait pas assez de valeurs pour être représentatif. R représente le rendement de greffage (%) et n le nombre d'échantillons analysés.

La valeur est faible par rapport à celles trouvées dans la littérature pour des nanoparticules d'oxydes de fer où le nombre de PEG est de 0,3 à 1 PEG/nm<sup>2</sup> (Butterworth *et al.* 2001). Le DOTA greffé au préalable occasionne sans doute un encombrement stérique qui limite le greffage du PEG sur les amines encore disponibles.

### II.2.2.3 - Stabilité en suspension du nanohybride PEG – TiONts – DOTA

La présence de PEG à la surface du nanohybride est prouvée en zétamétrie à force ionique constante (NaCl: 10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup>) par l'observation d'un écrantage de charges perceptible sur la courbe des PEG – TiONts – DOTA (Figure 151). De plus, le point isoélectrique des PEG – TiONts – DOTA diminue car le greffage du PEG<sub>3000</sub> – NHS consomme des amines lors du couplage, ce qui a tendance à diminuer la valeur du PIE.

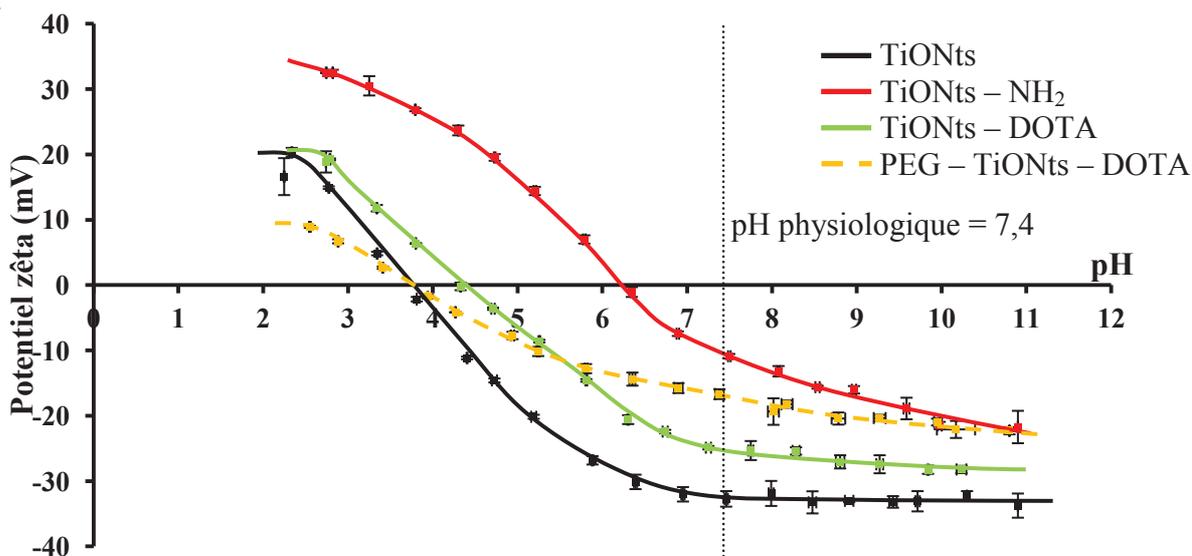


Figure 151. Évolution du potentiel zéta des TiONts, TiONts – NH<sub>2</sub>, TiONts – DOTA et des PEG – TiONts – DOTA dans NaCl (10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup>) en fonction du pH. Courbes représentatives d'un échantillon.

Le Tableau 52 regroupe les valeurs des points isoélectriques et du potentiel zêta des TiONts, TiONts – NH<sub>2</sub>, TiONts – DOTA et PEG – TiONts – DOTA.

Synthèse	PIE	ζ à pH = 7,4 (mV)	n
<b>TiONts</b>	3,3 ± 0,2	-32 ± 3	6
<b>TiONts – NH<sub>2</sub></b>	6,3 ± 0,8	-13 ± 4	12
<b>TiONts – DOTA</b>	4,3 ± n.d.	-24 ± 2	1
<b>PEG – TiONts – DOTA</b>	3,9 ± n.d.	-16 ± 2	1

Tableau 55. Récapitulatif des points isoélectriques et des valeurs du potentiel zêta pour les composés TiONts, TiONts – NH<sub>2</sub>, TiONts – DOTA et PEG – TiONts – DOTA. n.d. non déterminé car il n'y avait pas assez de valeurs pour être représentatif. n représente le nombre d'échantillons analysés.

L'observation en microscope électronique en transmission met en évidence des agglomérats de nanotubes de quelques centaines de nanomètres (Figure 152).

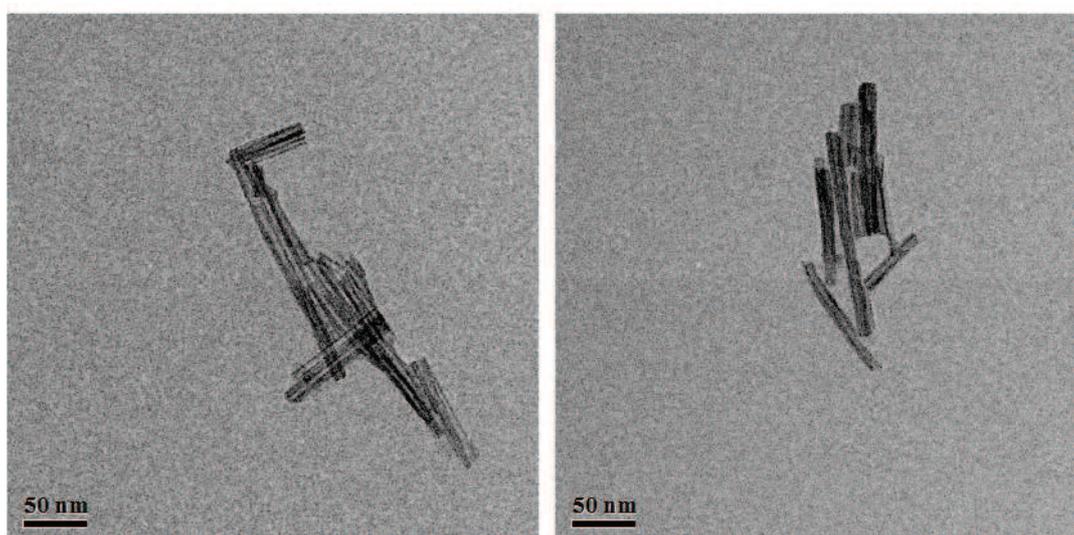


Figure 152. Clichés MET du nanohybride PEG – TiONts – DOTA

### III. Biodistribution des nanotubes de titanate marqués à l'indium par imagerie SPECT

#### III.1 - Radiomarquage à l'indium pour l'imagerie SPECT et biodistribution des TiONts fonctionnalisés par le DOTA

##### III.1.1 - Radiomarquage à l'indium 111

Le radiomarquage à l'indium 111 a été effectué sur la plateforme SPECT du CGFL (avec l'aide de Bertrand Collin et Alexandra Oudot) dans les conditions de protection optimales contre les radiations ionisantes. Toutes les expériences ont été réalisées derrière un écran plombé ou dans une cellule blindée suivant les activités manipulées.

L'indium 111 ( $t_{1/2} = 67,3$  h) est disponible commercialement sous forme de chlorure d'indium 111 solubilisé dans une solution d'acide chlorhydrique ( $\text{HCl } 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ ). Les quantités mises en jeu sont très faible (37 MBq d' $^{111}\text{In}$  représentent 21,3 pmol) car l'imagerie nucléaire est très sensible. Dans ces circonstances, il faut impérativement éviter toute contamination métallique. Pour soustraire ce risque, les solutions pour le radiomarquage sont préparées avec des produits TraceSelect® qui possèdent un haut taux de pureté (99,999%) et de l'eau ultrapure (18,4 M $\Omega$ ) ceci pour éviter la présence d'autres ions métalliques qui pourraient se complexer avec le DOTA. De plus, tous les consommables plastiques (pointes de micropipette, microtubes) ont été traités à l'acide chlorhydrique à  $3 \text{ mol.L}^{-1}$  puis rincés abondamment à l'eau ultra pure avant d'être séchés à l'étuve.

##### III.1.1.1 - Contrôle qualité du radiomarquage et pureté radiochimique

Le contrôle qualité du radiomarquage est établi par la technique ITLC (Instant Thin Layer Chromatography) grâce à un radiochromatographe  $\gamma$  qui va détecter la radioactivité. Le principe est le même que celui d'une chromatographie sur couche mince (Figure 153).

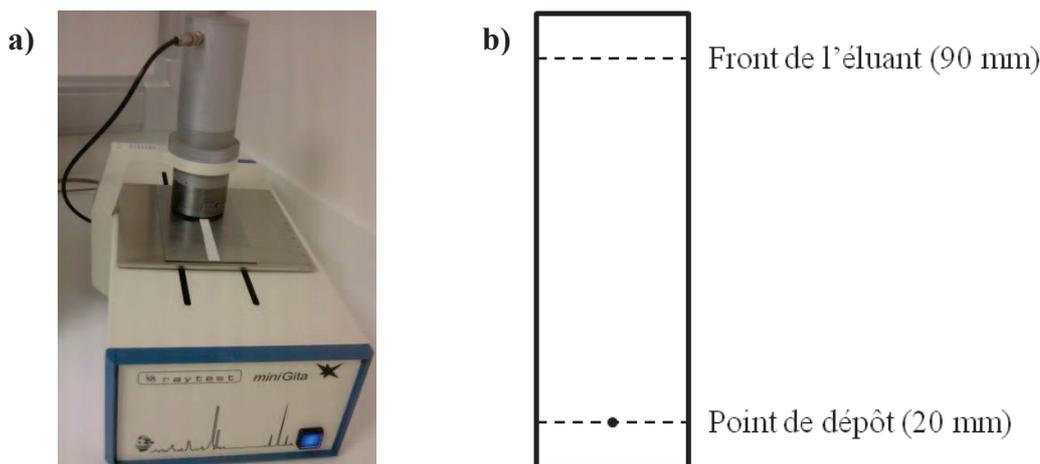


Figure 153. a) Photographie du radiochromatographe  $\gamma$  en cours de lecture et b) Représentation schématique de la phase stationnaire

Pour l'ITLC, la phase stationnaire est un papier de microfibrilles de verre imprégné de gel de silice et l'éluant est une solution de citrate de sodium à  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  à  $\text{pH} = 4$ . Cette solution permet de séparer l' $^{111}\text{In}$  libre, qui va migrer avec le front de l'éluant, de l' $^{111}\text{In}$

complexé par un agent chélatant, qui va rester sur le point de dépôt. Enfin, le radiochromatographe localise la radioactivité sur la bande chromatographique et trace un chromatogramme par rapport à la distance au point de dépôt. En outre, le chromatogramme obtenu permet de déterminer la Pureté RadioChimique (PRC) en intégrant les différents pics présents (Figure 154).

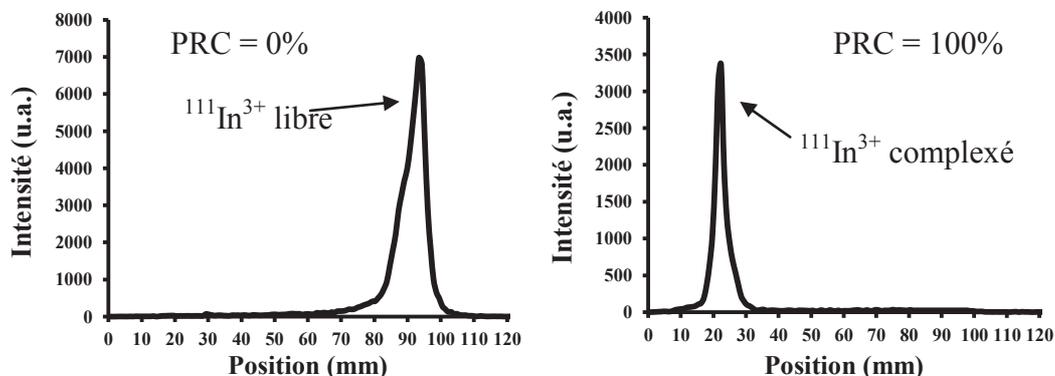


Figure 154. Exemples de chromatographe dans les cas extrêmes d'une PRC= 0% (radiomarquage défaillant) et d'une PRC = 100% (radiomarquage réussi)

### III.1.1.2 - Interaction possible entre l'indium et les nanotubes de titanate

Lors du radiomarquage, l'indium est sous sa forme cationique  $\text{In}^{3+}$ . De plus, ce dernier forme un précipité  $\text{In}(\text{OH})_3$  avec les hydroxyles lorsque le pH est supérieur à 5,2. De plus, il faut éviter d'hydrolyser la liaison amide qui est assez sensible au pH très acide en même temps que les hautes températures (100°C et plus), conditions de radiomarquage envisagées. Alors, le pH minimal de travail est fixé arbitrairement à pH = 3,5 (Maurizi 2010). Ces conditions particulières pour le radiomarquage de nanotubes peuvent engendrer des liaisons électrostatiques entre le nanotube chargé négativement (OH de surface) et l'indium chargé positivement à pH optimal (pH = 5). Ainsi, la gamme de pH pour effectuer le radiomarquage des TiONts – DOTA est assez restreinte  $3,5 \leq \text{pH} \leq 3,7$  (Figure 155).

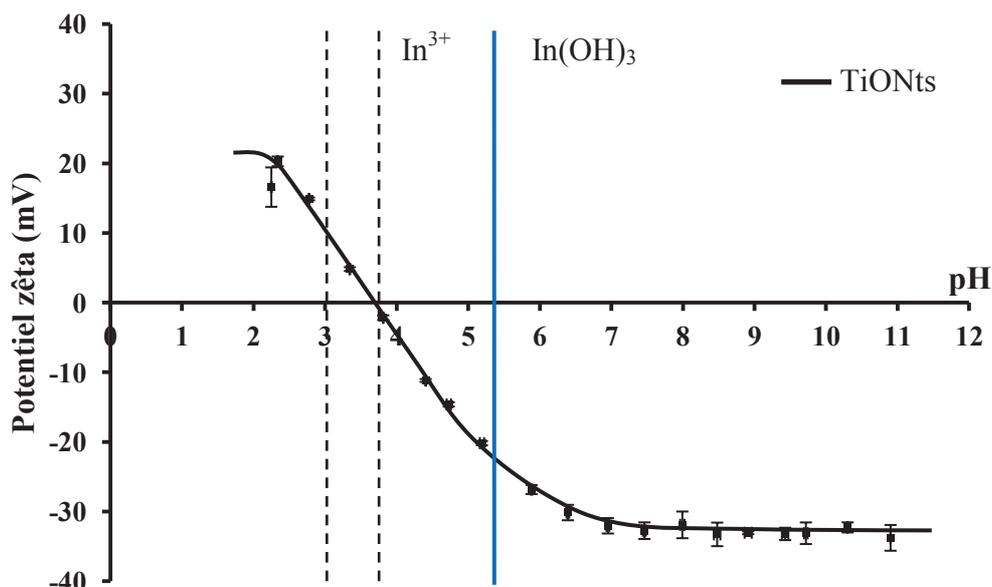


Figure 155. Évolution du potentiel zêta des TiONts et TiONts –  $\text{NH}_2$ . Le trait plein représente la limite de la forme cationique de l' $\text{In}^{3+}$ . Les pointillés représentent la zone possible du radiomarquage  $3,5 \leq \text{pH} \leq 3,7$

III.1.2 - Conditions du radiomarquage de l'indium 111 des nanotubes fonctionnalisés par le DOTA

Pour les études de biodistribution *in vivo*, les TiONts – DOTA ont été marqués à l'indium 111.

100 µg de TiONts – DOTA sont dispersés aux ultrasons dans 250 µL de tampon acétate d'ammonium à pH = 5,8, soit une concentration de 0,4 mg.mL<sup>-1</sup>. 5 µL de la suspension contenant les TiONts – DOTA sont ajoutés à 5 µL de la solution d'indium libre (<sup>111</sup>In<sup>3+</sup>, 15 MBq, pH = 1). Le pH après ajout de l'indium 111 est de 3,5. La suspension finale de 10 µL est ensuite placée sous agitation et à température constante (80°C) dans un thermomixeur pendant 1 heure (Figure 156).

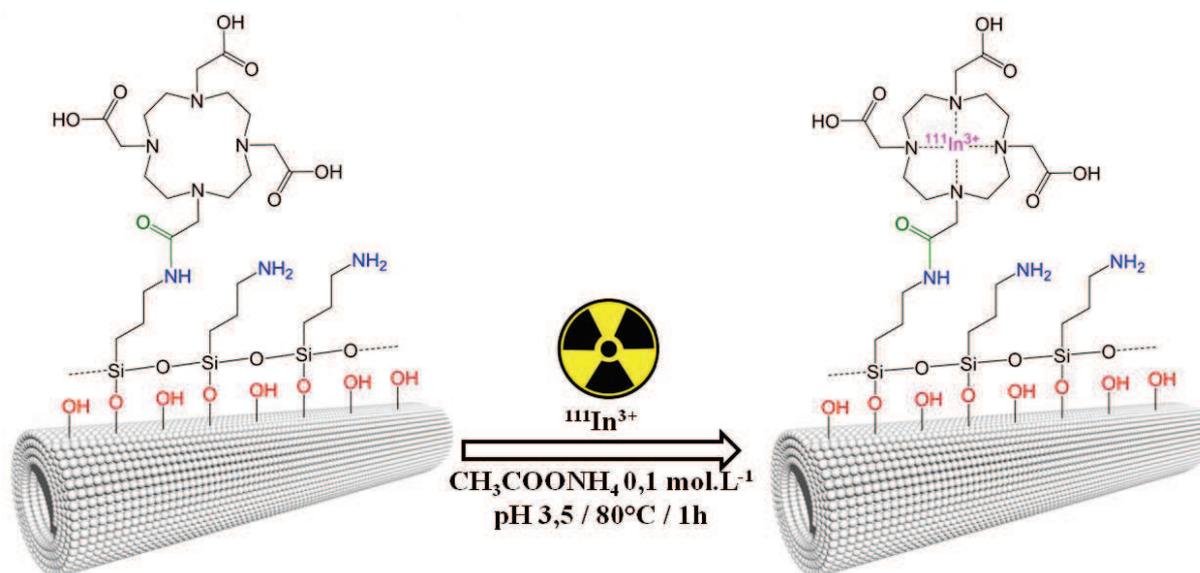


Figure 156. Représentation schématique du radiomarquage des TiONts – DOTA par l'<sup>111</sup>In<sup>3+</sup>

Après l'heure d'incubation, la suspension contenant les TiONts – DOTA marqués à l'indium 111 (notés **TiONts – DOTA [<sup>111</sup>In]** par la suite) est mise en présence de 5 µL de DTPA à 20 mmol.L<sup>-1</sup> (solubilisé dans l'acétate d'ammonium à 0.1 mol.L<sup>-1</sup>) pour capter l'indium libre résiduel à T = 21°C pendant 15 minutes. Le DTPA est utilisé pour nettoyer la suspension car celui-ci est le meilleur agent complexant de l'indium (cf. Tableau 48) et va permettre de piéger les ions indium (III) qui sont libres. La transmétallation de l'indium complexé dans le DOTA est limitée à température ambiante. Après, cette étape de 15 minutes à 21°C, la suspension est purifiée par centrifugation (14000 × g pendant 10 minutes) *via* l'utilisation de microtubes possédant une membrane poreuse de 30 kDa qui retient les TiONts – DOTA [<sup>111</sup>In] mais pas l'indium complexé par le DTPA (M = 393 g.mol<sup>-1</sup>).

La formulation des TiONts – DOTA [<sup>111</sup>In] récupérés sur la membrane est faite avec 10 µL de PBS (0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH = 7,4). Cette suspension formulée dans le PBS sera injectée dans les souris mais avant cela, la pureté radiochimique du marquage a été vérifiée.

La référence choisie comme témoin lors des tests *in vivo* est l'indium complexé par le DOTA libre (noté **DOTA [<sup>111</sup>In]** dans la suite du manuscrit). Le radiomarquage reste le même avec quelques variantes telles que le tampon acétate d'ammonium de départ qui est à pH = 6,9 ainsi le pH après ajout d'indium est à pH = 5 (Moreau *et al.* 2012). Les étapes de lavage, de purification et de formulation restent les mêmes.

### III.1.2.1 - Pureté radiochimique des TiONts – DOTA [ $^{111}\text{In}$ ]

Dans le cas des nanotubes,  $^{111}\text{In}$  libre va migrer jusqu'au front de l'éluant et les TiONts – DOTA marqués à  $^{111}\text{In}$  vont rester au point de dépôt. La microgoutte déposée au point de dépôt est de 0,5  $\mu\text{L}$ . Après compétition au DTPA, la qualité du radiomarquage est déterminée par ITLC. Cette procédure a permis d'obtenir un rendement du radiomarquage de 90% avec une pureté radiochimique supérieure à 99% après purification par ultrafiltration (centrifugation sur des membranes de 30 kDa). Ce rendement est similaire aux produits commerciaux injectés au patient.

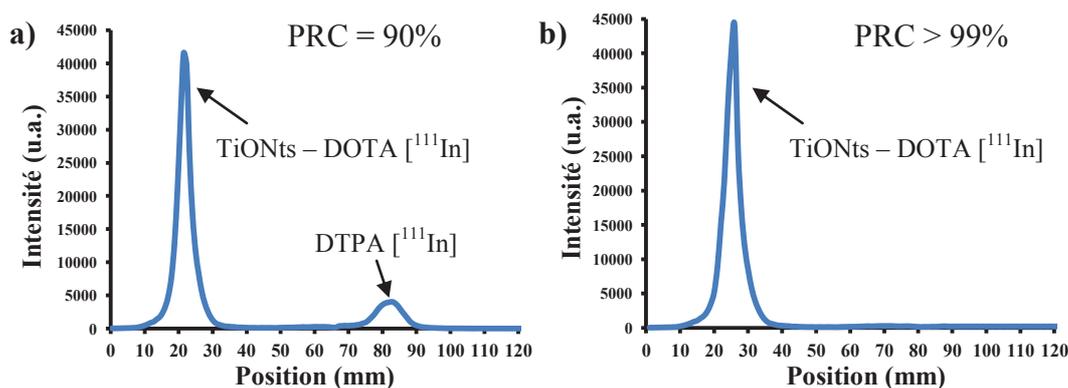


Figure 157. Radiochromatogrammes établi par ITLC a) après ajout du DTPA et b) après purification

### III.1.2.2 - Stabilité du complexe TiONts – DOTA [ $^{111}\text{In}$ ]

La stabilité du complexe TiONts – DOTA [ $^{111}\text{In}$ ] a été déterminée par la concurrence d'un excès de DTPA (le meilleur agent chélatant possible pour  $^{111}\text{In}^{3+}$ ) pendant cinq jours consécutif dans du PBS à température corporelle (37°C). Le complexe a montré une excellente stabilité sans transmétallation ni relargage, vérifié par ITLC. Ce résultat suggère que le complexe TiONts – DOTA [ $^{111}\text{In}$ ] est stable dans la formulation PBS durant ces 5 jours, temps suffisant pour faire de l'imagerie.

## III.2 - Imagerie SPECT et biodistribution des TiONts – DOTA [ $^{111}\text{In}$ ]

Deux modes de suivi de la biodistribution des nanotubes peuvent être distingués. Premièrement, l'imagerie nucléaire qui permet de localiser les radiations émises par le radioélément grâce à des détecteurs spécifiques. Ce mode demande l'emploi d'activité radioactive forte (15 MBq dans l'expérience réalisée). Deuxièmement, la méthode de comptage de la radioactivité dans les organes des animaux après sacrifice sera réalisée. Cette voie permet d'engager moins d'activité radioactive (1 MBq dans l'expérience réalisée).

### III.2.1 - Le modèle animal étudié

Les 24 souris utilisées proviennent de l'élevage Janvier et sont des souris swiss albinos mâles d'environ 30 grammes. Les animaux ont été placés, à l'animalerie de la plateforme SPECT, 7 jours avant le début de l'expérience et maintenus sur un cycle de 12 heures nuit/jour inversé (10h-22h) avec un accès à l'eau et à la nourriture. Toutes les procédures ont

été exécutées conformément à la législation sur l'utilisation d'animaux de laboratoire et a reçu l'autorisation n° A21-231-016EA du ministère de l'agriculture.

Deux groupes expérimentaux ont été choisis pour cette étude. Les souris pour chaque groupe sont réparties comme suit pour l'imagerie (n = 3) et pour la biodistribution (n = 9) :

- Le groupe témoin DOTA [<sup>111</sup>In] (n = 12)
- Le groupe test TiONts – DOTA [<sup>111</sup>In] (n = 12)

### III.2.2 - Images SPECT/CT et biodistribution des nanotubes de titanate

Les produits marqués à l'indium ont été injectés aux souris, après une semaine d'acclimatation. Les animaux sont maintenus sous anesthésie générale par le biais de l'isoflurane pendant toute la durée de la manipulation.

#### III.2.2.1 - Imagerie SPECT/CT

L'imagerie SPECT n'est jamais utilisée seule, elle est couplée à la TomoDensitoMétrie (TDM ou CT<sup>15</sup> en anglais) pour faire apparaître les informations anatomiques et ainsi faciliter la localisation de la radioactivité par superposition des deux types d'imageries.

Pour l'imagerie, l'activité radioactive doit être plus forte pour permettre à un maximum de radiation d'atteindre le détecteur. Ainsi, 15 MBq sont engagés, ce qui représente 20 à 30 µg de TiONts – DOTA [<sup>111</sup>In]. L'acquisition des images a été répétée sur les mêmes animaux 1h, 4h et 24 heures après injection. L'acquisition des images a commencé par la TDM (55kVp, 34 mAs) pendant 15 à 20 minutes, suivie par des acquisitions SPECT pendant 90 à 120 secondes par cadre de projection aboutissant à un temps d'acquisition de 45 à 60 minutes. Ensuite, les deux types d'images obtenues sont traités pour reconstruire l'image finale de l'imagerie SPECT/CT couplée (Figure 158).

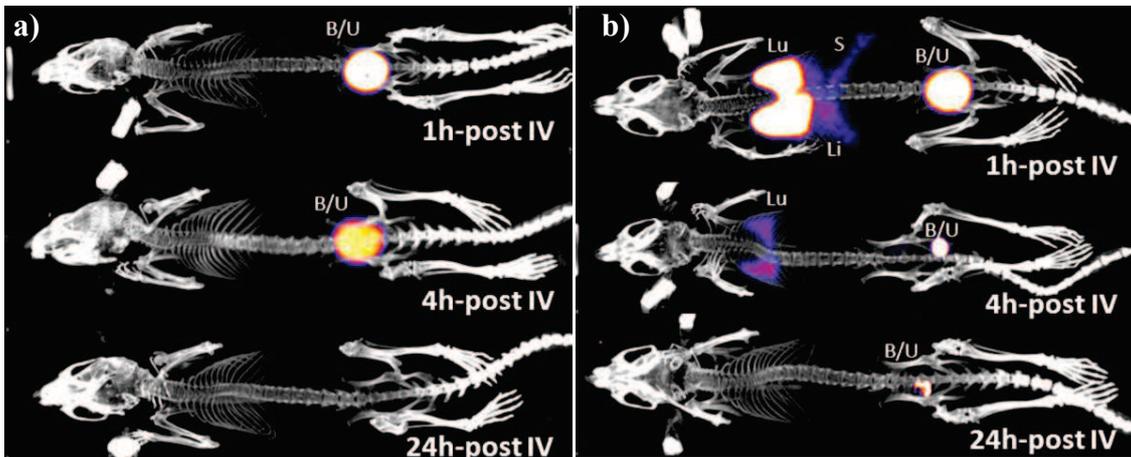


Figure 158. Imagerie couplée SPECT/CT des souris (n = 3) après injection d'une activité de 15 MBq après 1h, 4h et 24h. a) DOTA [<sup>111</sup>In] et b) TiONts – DOTA [<sup>111</sup>In]. Les lettres indiquent les organes qui ont un signal radioactif B/U : Vessie/Urine (Bladder/Urine); Lu : Poumons (Lung); Li : Foie (Liver) et S : Rate (Spleen)

<sup>15</sup>CT, acronyme anglais pour Computed Tomography ; c'est la radiographie X qui fournit les informations anatomiques.

Sur ces images, la différence entre les deux composés est flagrante soulignant la réussite de la fonctionnalisation et du radiomarquage des TiONts – DOTA. En effet, le composé DOTA libre est rapidement éliminé car la radioactivité se situe dans la vessie au bout d'une heure et est ensuite éliminé continuellement par excrétion jusqu'à élimination totale.

Au contraire, les TiONts – DOTA [ $^{111}\text{In}$ ] circulent par les poumons, le foie et la rate mais ils sont aussi peu à peu éliminés par excrétion par la vessie. À 24 heures, les TiONts – DOTA [ $^{111}\text{In}$ ] ne sont plus présents que dans la vessie et seront très probablement éliminés ultérieurement par les voies naturelles (imagerie non réalisée à plus de 24h).

### III.2.2.2 - Biodistribution des nanotubes fonctionnalisés par le DOTA chez la souris

La biodistribution s'effectue par comptage de la radioactivité présente avec un compteur gamma (Wizard 1480, Perkin Elmer). Pour cela, un sous-ensemble de souris ( $n = 3$ ) a été sacrifié à 1h, 4h et 24h pour les deux composés soit au total 18 souris. L'activité injectée est de 1 MBq (soit 1 à 2  $\mu\text{g}$  de TiONts – DOTA [ $^{111}\text{In}$ ]). Les organes tels que le cerveau, le cœur, les poumons, le foie, la rate ainsi que la vessie, l'urine et le sang ont été prélevés et placés au congélateur. Chaque échantillon a été pesé avant d'être congelé. Environ quinze jours plus tard, la radioactivité pour chaque organe a été quantifiée puis corrigée en tenant compte de la décroissance radioactive. Le résultat indique la radioactivité correspondant au pourcentage de dose injectée rapportée à la masse de tissus, exprimé en %ID/g. Les figures 158 et 159 représentent respectivement la biodistribution du composé DOTA [ $^{111}\text{In}$ ] et celle du nanohydrure TiONts – DOTA [ $^{111}\text{In}$ ].

Le composé DOTA [ $^{111}\text{In}$ ] est rapidement éliminé par l'organisme car au bout d'une heure, la majorité de la radioactivité se situe dans l'urine, la vessie et faiblement dans les reins. Après, le conjugué est éliminé progressivement par excrétion. Au-delà de 24 heures, la radioactivité est faiblement présente dans les urines soulignant l'élimination totale du composé DOTA [ $^{111}\text{In}$ ] (figure 158). Ces résultats confirment ceux obtenues par imagerie SPECT/CT (Figure 158).

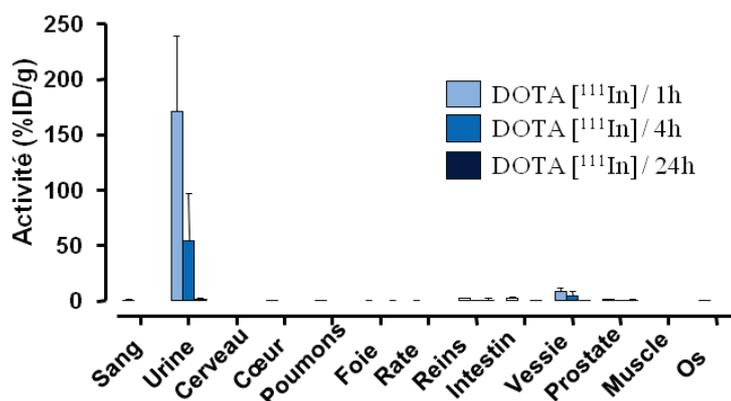


Figure 159. Activité présente dans les différents organes (en % de dose injectée par gramme) pour le composé DOTA [ $^{111}\text{In}$ ] après injection à 1h, 4h et 24h ( $n = 3$ ) pour chaque temps

En revanche, au bout d'une heure les TiONts – DOTA [ $^{111}\text{In}$ ] sont présents dans les poumons (58 %ID/g), l'urine (37 %ID/g) et dans une moindre mesure dans le foie et la rate. Au bout de 4 heures, le conjugué TiONts – DOTA [ $^{111}\text{In}$ ] est distribué de la même façon dans les poumons (39 %ID/g) et l'urine (8 %ID/g) mais l'élimination par excrétion a déjà commencée. À 24 heures, le composé TiONts – DOTA [ $^{111}\text{In}$ ] est essentiellement présent

dans les urines (3,5 %ID/g) montrant que le composé est éliminé des autres organes comme les poumons, le foie et la rate (Figure 160).

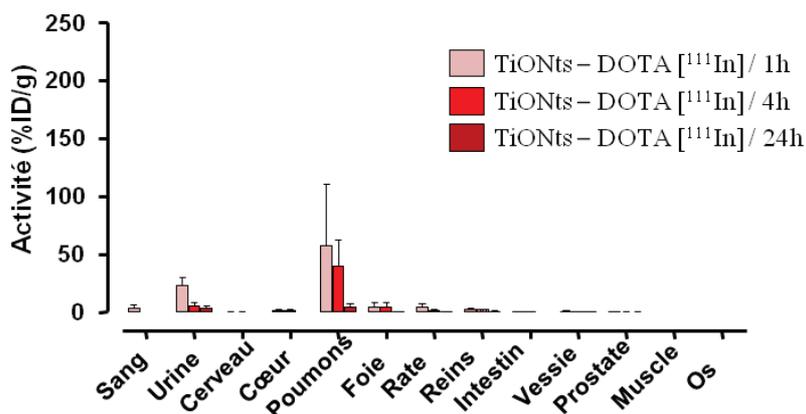


Figure 160. Activité présente dans les différents organes (en % de dose injectée par gramme) pour le composé TiONts – DOTA [ $^{111}\text{In}$ ] après injection à 1h, 4h et 24h ( $n = 3$ ) pour chaque temps

### III.3 - Conclusion sur les nanotubes fonctionnalisés par le DOTA en vue d'imagerie SPECT/CT

Les nanotubes de titanate ont été fonctionnalisés avec succès par le DOTA – NHS en vue de connaître leur biodistribution *in vivo* (modèle : souris mâle swiss nude). L'accroche du DOTA s'effectue par la réaction de l'ester activé sur les TiONts –  $\text{NH}_2$  dans un mélange THF/DMSO (90/10). Le lien entre les nanotubes et le DOTA est une fonction amide qui n'a pas été mise en évidence par les différentes techniques de caractérisation (XPS, IR). Cependant, ces mêmes caractérisations suggèrent que le DOTA est présent à la surface des nanotubes alors même que les éléments non greffés ont été ultrafiltrés. Le taux de DOTA déterminé par ATG est de l'ordre de 0,2 par  $\text{nm}^2$  soit 800 DOTA par TiONts. Cette valeur est similaire aux valeurs trouvées dans la littérature (Liu *et al.* 2007; Mcdevitt *et al.* 2007).

Le DOTA est un agent chélatant macrocyclique qui permet de complexer des radioéléments comme l'indium 111 pour l'imagerie SPECT. Le radiomarquage de l'indium 111 se déroule dans une solution d'acétate d'ammonium à un  $\text{pH} = 3,5$  pendant 1h à  $80^\circ\text{C}$ . Ce radiomarquage a un rendement de 90% et une pureté radiochimique supérieure à 99% déterminée par ITLC après purification (centrifugation + challenge au DTPA). Ce nanohydrure radioactif TiONts – DOTA [ $^{111}\text{In}$ ] a été injecté dans des souris swiss nude pour connaître sa biodistribution. Les images SPECT/CT et le comptage de la radioactivité dans chaque organe ont montré qu'au bout d'une heure, les nanotubes se situent dans les poumons (58% ID/g), dans l'urine (37% ID/g) et dans une moindre mesure dans le foie et la rate. Ensuite, les nanotubes sont progressivement éliminés par excrétion pour n'être plus présents que dans les urines à 24 heures. Leurs homologues, les nanotubes de carbone se comporte différemment *in vivo* car 3 heures après injection, ces derniers se retrouvent dans le foie, la rate, les reins et dans le squelette osseux. La différence ne s'arrête pas à cette conclusion puisque les nanotubes de carbones ne sont pas éliminés au bout de 24 heures et se situent toujours dans les mêmes organes mais en plus faible quantité (Mcdevitt *et al.* 2007).

Les TiONts – DOTA ont été fonctionnalisés par du PEG<sub>3000</sub> pour améliorer leur biocompatibilité. Le taux de PEG est de l'ordre de 0,05 par  $\text{nm}^2$ . Les études de biodistribution n'ont pas encore été effectuées avec le PEG mais ce dernier permettrait d'augmenter sûrement le temps de circulation du nanohydrure ce qui pourrait être intéressant dans le cas de l'aspect thérapeutique. Ce travail fait l'objet d'une publication prochainement soumise.

## IV. Agents de contraste bimodaux pour l'imagerie nucléaire (SPECT ou TEP) couplée à l'imagerie par résonance magnétique

Cette partie est consacrée à la fonctionnalisation de nanoparticules d'oxydes de fer par des agents macrocycliques chélatants en vue d'applications comme agents de contraste pour l'imagerie bimodale IRM/SPECT ou IRM/TEP.

### IV.1 - Stratégie de fonctionnalisation pour la création d'agents de contraste bimodaux IRM/SPECT et/ou IRM/TEP

#### IV.1.1 - Protocole de greffage des agents chélatants macrocycliques

Le protocole de greffage reste le même que pour celui des TiONts – DOTA (II.2.1 - page 156). Au lieu d'utiliser des TiONts – NH<sub>2</sub>, les nanoparticules d'oxydes de fer modifiées par l'APTES (SPIO – NH<sub>2</sub>) sont exploitées (Figure 161). En bref, 10 mL d'un mélange de THF/DMSO (90/10 en volume) en présence de 100 mg de SPIO – NH<sub>2</sub> et de DOTA – NHS (ou NOTA – NHS) dans un rapport massique [1 : 1] sont dispersés aux ultrasons pendant 15 minutes puis placés sous agitation magnétique (400 trs/min) sous atmosphère inerte (N<sub>2</sub>) pendant 48 heures. Ensuite, 20 mL d'eau déionisée sont ajoutés à la suspension qui est ensuite placée à l'évaporateur rotatif pour éliminer le THF (500 mbar/60°C). La suspension résultante (eau/DMSO) est ensuite ultrafiltrée, sur des membranes de tailles de pores de 30 kDa, par des cycles de lavage à l'eau déionisée (10 × 100 mL) et enfin à l'eau ultrapure (2 × 100 mL) pour éliminer le DOTA (ou NOTA) n'ayant pas réagi. Pour finir, la suspension est lyophilisée pour être caractérisée.

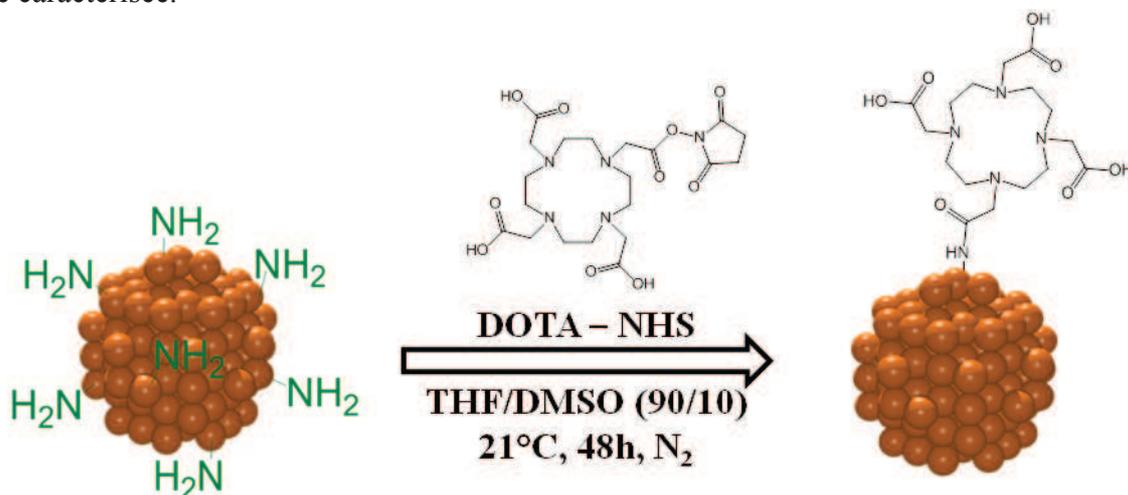


Figure 161. Représentation du greffage du DOTA – NHS à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer. Le NHS après couplage n'est pas représenté.

Les nanoparticules d'oxydes de fer fonctionnalisées par le DOTA ou par le NOTA seront dénommées respectivement **SPIO – DOTA** et **SPIO – NOTA** dans la suite du manuscrit.

IV.1.2 - Caractérisation des agents de contraste bimodaux IRM/SPECT ou IRM/TEP

IV.1.2.1 - Analyse des nanoparticules d'oxydes de fer fonctionnalisées par le DOTA – NHS ou le NOTA – NHS

Les nanoparticules d'oxydes de fer fonctionnalisées par le DOTA et le NOTA ont été analysées par XPS. L'augmentation des concentrations atomiques des espèces provenant des agents chélatants comme l'azote ou le carbone indique la présence de ces agents à la surface des nanoparticules (Tableau 56). De plus, l'augmentation du rapport C1s/Fe2p dans les cas du greffage du DOTA et du NOTA confirme la présence des agents chélatants à la surface des nanoparticules.

Synthèse	Concentration atomique (%)						C1s/Fe2p
	Fe2p	O 1s	C 1s	N 1s	Si 2s	F 1s	
<b>SPIO</b>	38	56	6	-	-	-	0,16
<b>SPIO – NH<sub>2</sub></b>	28	55	13	2	2	-	0,46
<b>SPIO – NOTA</b>	25	50	21	3	1	0	0,84
<b>SPIO – DOTA</b>	28	46	20	4	1	1	0,71

Tableau 56. Analyse XPS : Concentration atomique des espèces présentes à la surface des SPIO, SPIO – NH<sub>2</sub>, SPIO – NOTA et SPIO – DOTA.

La décomposition du niveau C1s des nanoparticules fonctionnalisées par les agents chélatants macrocycliques indique la présence de ces derniers à la surface des nanoparticules (Figure 162). Pour chaque nanohybrides, la concentration atomique des composantes peuvent être calculée grâce à l'équation 6 :

$$[C]_{composante} = C1s_{SPIO-X} \times C1s_{composante} \quad (\text{Équation 6})$$

Avec  $[C]_{composante}$ , la concentration atomique (%) d'une composante donnée ;  $C1s_{SPIO-X}$ , la concentration atomique(%) du niveau C1s d'un nanohydrure portant une fonction X et  $C1s_{composante}$ , le pourcentage de la composante du niveau C1s d'un nanohydrure.

Par exemple, pour le composé SPIO – NOTA, la concentration atomique de la composante  $\underline{C} - NH_2$  est de 5,0% avec  $C1s_{SPIO-NOTA} = 21\%$  et  $C1s_{composante} = 23,6\%$ .

L'augmentation des composantes du niveau C1s confirme la présence des agents complexants à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer car cette hausse ne peut que provenir de l'ajout de molécules possédant ces types de liaisons telles que les molécules DOTA et NOTA.

	Concentration atomique (%)			
	C1s	$\underline{C} - C/\underline{C} - H$	$\underline{C} - NH_2$	$(\underline{C} = O) - OH$
<b>SPIO – NH<sub>2</sub></b>	13	8,4	3,2	1,4
<b>SPIO – NOTA</b>	21	14,0	5,0	2,0
<b>SPIO – DOTA</b>	20	13,0	4,9	2,1

Tableau 57. Concentration atomique des différentes composantes du niveau C1s des composés SPIO – NH<sub>2</sub>, SPIO – NOTA et SPIO – DOTA.

Au niveau O1s, l'apparition de la composante (C = O) – OH à 531,4 eV des acides carboxyliques du DOTA ou du NOTA permet d'arriver à la même conclusion que pour le niveau C1s. La présence des hydroxyles de surface est aussi possible à 531,4 eV (Figure 162).

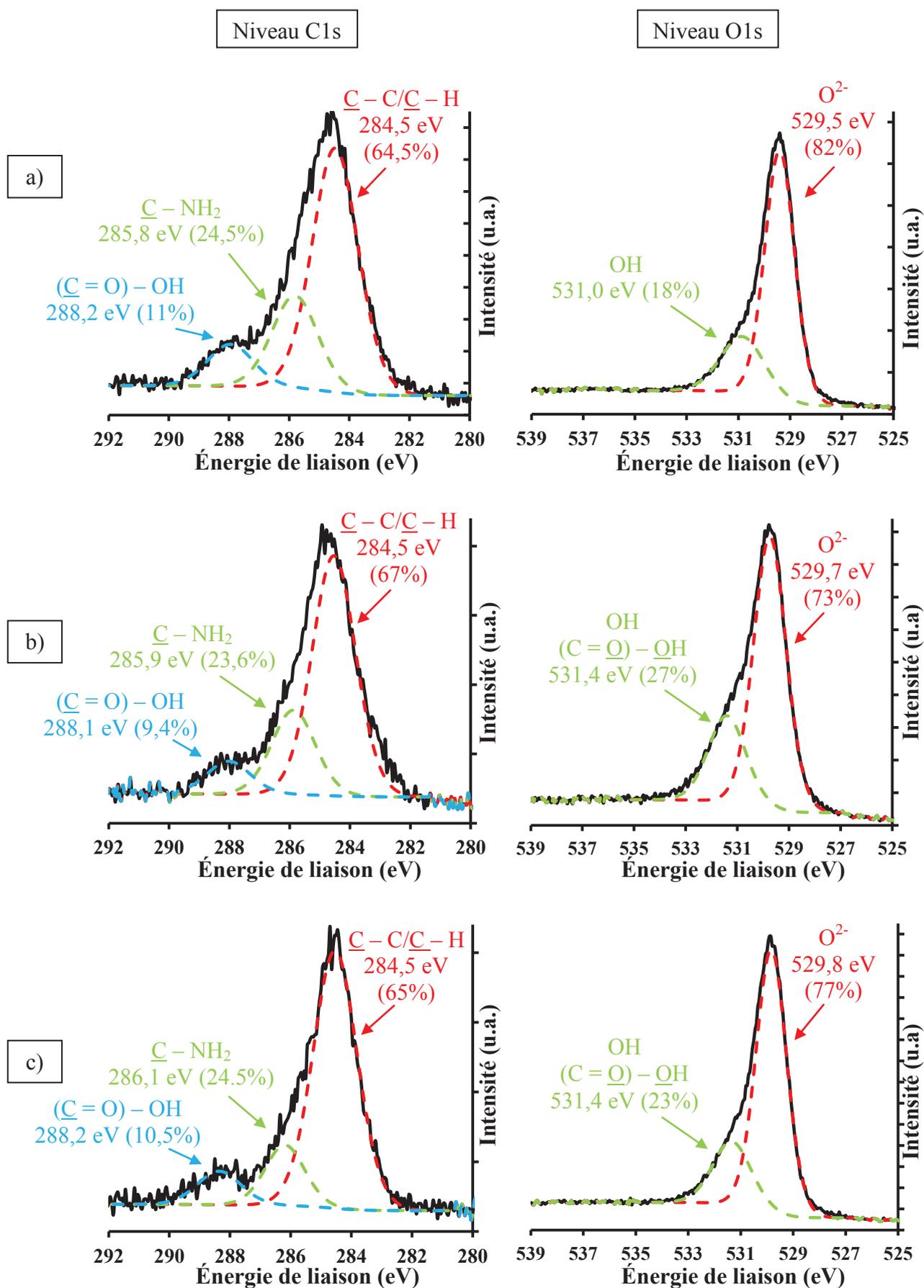


Figure 162. Analyse XPS : Décomposition des niveaux C1s et O1s, a) SPIO-NH<sub>2</sub>, b) SPIO-NOTA et c) SPIO-DOTA

L'analyse FTIR des nanoparticules d'oxydes de fer par les agents chélatants semble montrer que le DOTA est présent en plus grandes quantités car la signature des vibrations des liaisons C – H à 2810 et 2915  $\text{cm}^{-1}$  est plus importante. De plus, les bandes vibrationnelles caractéristiques des SPIO (580 – 640  $\text{cm}^{-1}$ ) sont plus atténuées sur le spectre du composé SPIO – DOTA (Figure 163).

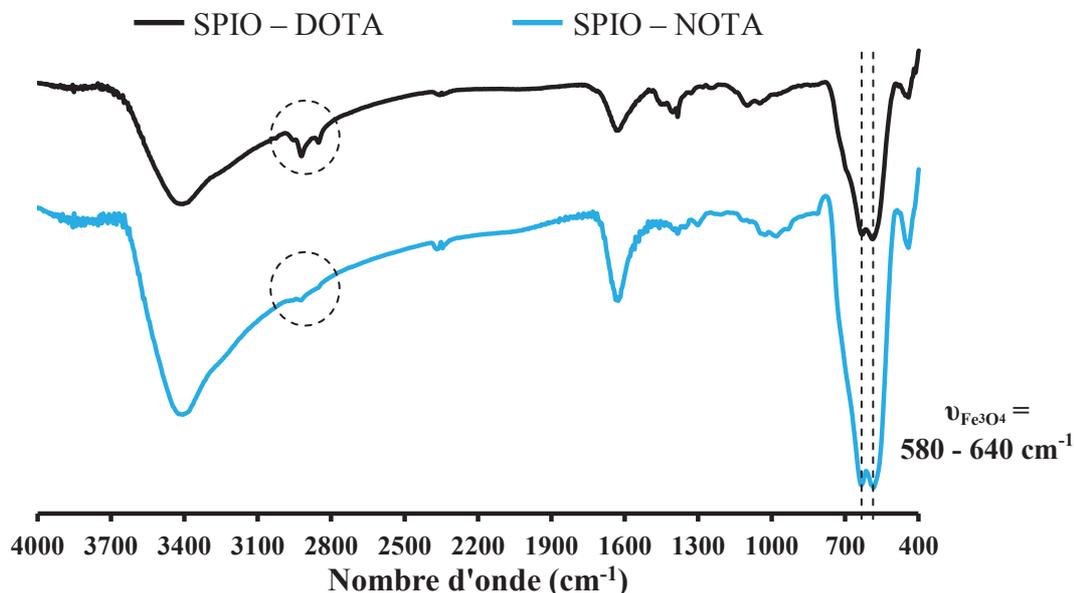


Figure 163. Spectre IR des composés SPIO – NOTA et SPIO – DOTA

#### IV.1.2.2 - Estimation du taux de greffage des agents macrocycliques à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer

Le taux de greffage des agents macrocycliques chélatants est estimé en ATG en prenant en compte les pertes de masse entre 150°C et 800°C (Figure 164).

Après avoir retranché la perte de masse due aux SPIO –  $\text{NH}_2$  et en considérant la surface spécifique des SPIO à  $92 \pm 10 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  (estimée en BET), les estimations du taux de greffage du NOTA et du DOTA sont respectivement de l'ordre de 0,4  $\text{NOTA}/\text{nm}^2$  et de 1,8  $\text{DOTA}/\text{nm}^2$  (Tableau 58).

	$\Delta m$ totale (%)	$\Delta m$ calcul (%)	Masse molaire à considérée pour la perte ( $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	Molécules/ $\text{nm}^2$	R (%)	n
SPIO	0,9	0,9	18	$(6,7 \pm 0,6) \text{ OH}^*$	-	5
SPIO – $\text{NH}_2$	3,6	3,6	58	$(5,0 \pm 0,7) \text{ NH}_2$	75	13
SPIO – NOTA	5,2	1,6	286	$(0,4 \pm \text{n.d.}) \text{ NOTA}$	8	1
SPIO – DOTA	14,1	8,9	376	$(1,8 \pm \text{n.d.}) \text{ DOTA}$	36	1

Tableau 58. Estimation du taux de greffage des agents chélatants macrocycliques à la surface des SPIO –  $\text{NH}_2$ . \*Perte de masse comprise entre 300°C et 800°C. n.d. non déterminé car il n'y avait pas assez de valeurs pour être représentatif. R représente le rendement de greffage (%) et n le nombre d'échantillons analysés.

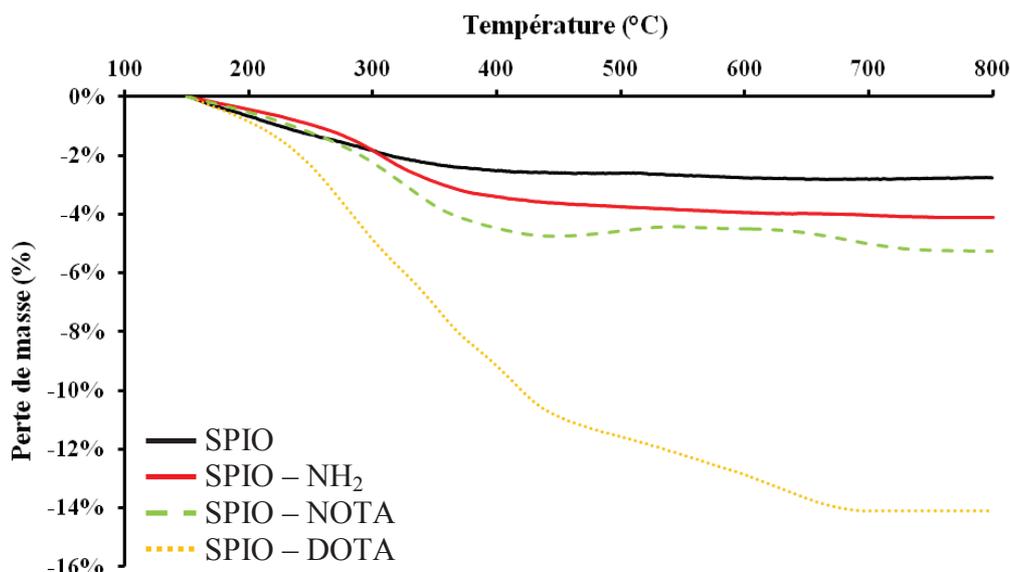


Figure 164. ATG des SPIO et des nanohybrides, SPIO – NH<sub>2</sub>, SPIO – NOTA et SPIO – DOTA. Les mesures ont été réalisées sous flux de N<sub>2</sub> (25 mL.min<sup>-1</sup>) avec une rampe de montée en température de 5°C.min<sup>-1</sup>. Les courbes ont été normalisées à 150°C (annexe n°3) et sont représentatives d'un échantillon.

Par rapport aux TiONts – DOTA (0,2 DOTA/nm<sup>2</sup>), le taux de greffage du NOTA est supérieur et très élevé pour les SPIO – DOTA. Dans la littérature, les valeurs trouvées sont de l'ordre de 0,1 DOTA/nm<sup>2</sup> (Lee *et al.* 2008), valeurs faibles par rapport aux valeurs estimées ici par ATG.

#### IV.1.2.3 - Stabilité des suspensions des nanohybrides SPIO – DOTA et SPIO – NOTA

Les nanoparticules d'oxydes de fer modifiées par le NOTA et le DOTA ont été caractérisées par zétamétrie à force ionique constante (NaCl, 10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup>). Le PIE est faiblement décalé par rapport à celui des SPIO – NH<sub>2</sub> soulignant la présence des agents complexants. Le point isoélectrique diminue de 8,3 à 7,9 dans les deux cas. Cette diminution est due à la présence des acides carboxyliques des agents chélatants à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer (Figure 165).

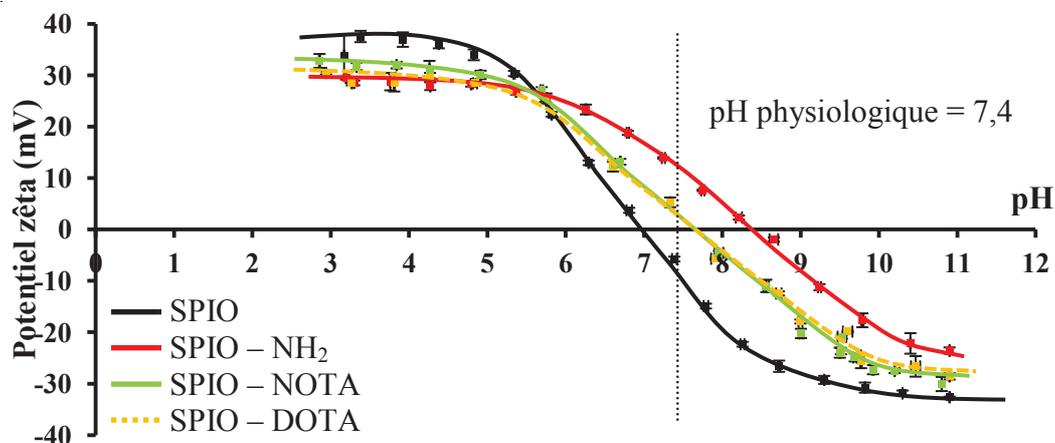


Figure 165. Évolution du potentiel zêta des SPIO, SPIO – NH<sub>2</sub>, SPIO – NOTA et des SPIO – DOTA dans NaCl (10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup>) en fonction du pH. Courbes représentatives d'un échantillon.

Le Tableau 59 regroupe les valeurs des PIE, des potentiels zêta et des diamètres hydrodynamiques des composés SPIO, SPIO – NH<sub>2</sub>, SPIO – NOTA et SPIO – DOTA.

Synthèse	PIE	$\zeta$ à pH = 7,4 (mV)	$d_H$ à pH = 7,4 (nm)	n
SPIO	7,2 ± 0,2	-8 ± 3	1368 ± 93	7
SPIO – NH <sub>2</sub>	8,9 ± 0,8	+17 ± 2	19 ± 3	13
SPIO – NOTA	7,9 ± n.d.	+2,9 ± 0,3	296 ± 49	1
SPIO – DOTA	7,9 ± n.d.	+2,4 ± 0,2	395 ± 40	1

Tableau 59. Valeurs des PIE et des diamètres hydrodynamiques des composés SPIO, SPIO – NH<sub>2</sub>, SPIO – NOTA et SPIO – DOTA. n.d. non déterminé car il n'y avait pas assez de valeurs pour être représentatif. n représente le nombre d'échantillons analysés.

Les suspensions ne sont pas stables dans le PBS à pH = 7,4 car leur point isoélectrique est proche du pH physiologique. Ainsi, les charges de surface ne permettent pas de stabiliser les nanoparticules qui s'agglomèrent et décantent (Figure 166).

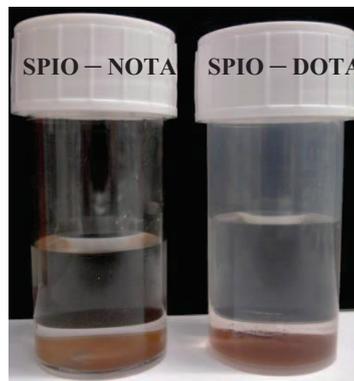


Figure 166. Photographie des suspensions SPIO – NOTA et SPIO – DOTA

Les clichés MET obtenus après ultrasons (Figure 167) montrent que les nanoparticules d'oxydes de fer fonctionnalisées forment des agglomérats de plusieurs centaines de nanomètres confirmant les diamètres hydrodynamiques obtenus en DLS.

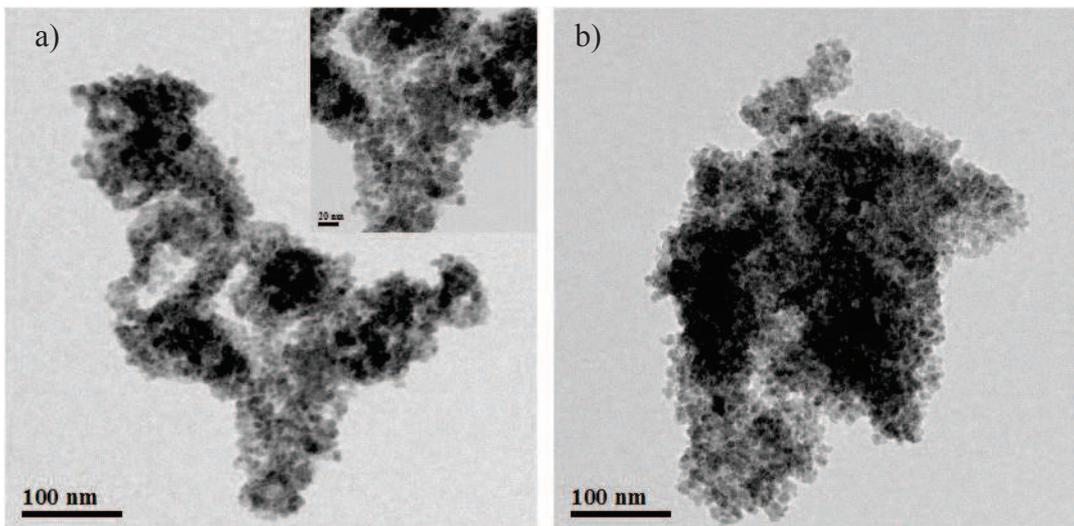


Figure 167. Clichés MET a) SPIO – NOTA et b) SPIO – DOTA

## IV.2 - Fonctionnalisation des agents de contraste bimodaux SPIO – NOTA et SPIO – DOTA par le PEG<sub>3000</sub> – NHS

De même que pour les nanotubes, les agents de contraste bimodaux SPIO – DOTA et SPIO – NOTA ont été fonctionnalisés avec le PEG<sub>3000</sub> – NHS (Figure 147) pour augmenter la biocompatibilité et éviter l'adsorption non spécifique des protéines sur les nanoparticules en milieu *in vivo* (Kim *et al.* 2008). Le protocole reste le même que celui déjà utilisé pour le greffage du PEG<sub>3000</sub> – NHS sur les nanotubes (Chapitre 3.II.2.2.1 - ). La fonctionnalisation par ce PEG est basée sur la réaction de l'ester activé avec les amines restantes (Figure 168).

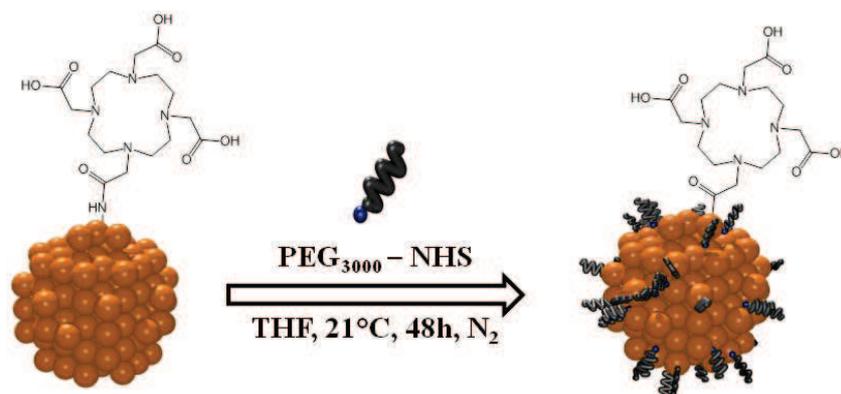


Figure 168. Illustration du greffage du PEG<sub>3000</sub> – NHS à la surface des SPIO – DOTA (même réaction pour le NOTA)

Les nanoparticules modifiées par le DOTA et le NOTA qui sont fonctionnalisées par le PEG<sub>3000</sub> – NHS seront notées **PEG – SPIO – NOTA** et **PEG – SPIO – DOTA** dans la suite du manuscrit.

### IV.2.1 - Analyse de la surface des nanohybrides fonctionnalisés avec le PEG<sub>3000</sub> – NHS

En XPS, la présence du PEG est confirmée par l'augmentation de la concentration atomique du carbone et la diminution de la concentration atomique du fer (Tableau 60).

Synthèse	Concentration atomique (%)					
	Fe2p	O 1s	C 1s	N 1s	Si 2s	F 1s
<b>SPIO – NOTA</b>	25	49,5	21	3	1,5	0
<b>PEG – SPIO – NOTA</b>	23	44	30	2	1	0
<b>SPIO – DOTA</b>	28	46	20	4	1	1
<b>PEG – SPIO – DOTA</b>	19	38	39	2	2	0

Tableau 60. Analyse XPS : Concentrations atomiques des espèces présentes à la surface des SPIO – NOTA, PEG – SPIO – NOTA, SPIO – DOTA et PEG – SPIO – DOTA.

L'analyse par spectroscopie FTIR confirme l'analyse faite par XPS (Figure 169). La présence de PEG est moins flagrante sur les PEG – SPIO – NOTA, elle est remarquée par la forte atténuation des bandes de la structure spinelle (580 – 640 cm<sup>-1</sup>) et l'augmentation des bandes de vibrations des liaisons C – H (2810 et 2915 cm<sup>-1</sup>). En revanche, ces dernières sont très visibles sur le spectre du composé PEG – SPIO – DOTA (zone en pointillée). De plus, sur ce spectre, la déformation des liaisons N – H est visible à 1600 cm<sup>-1</sup> (Pretsch 2000; Zhang *et al.* 2002), mais rien ne permet de conclure si c'est celle des amines ou des amides. Cependant,

il semblerait plus judicieux de l'accorder à la déformation des liaisons N – H amide car elle n'était pas visible avant greffage du PEG<sub>3000</sub> – NHS.

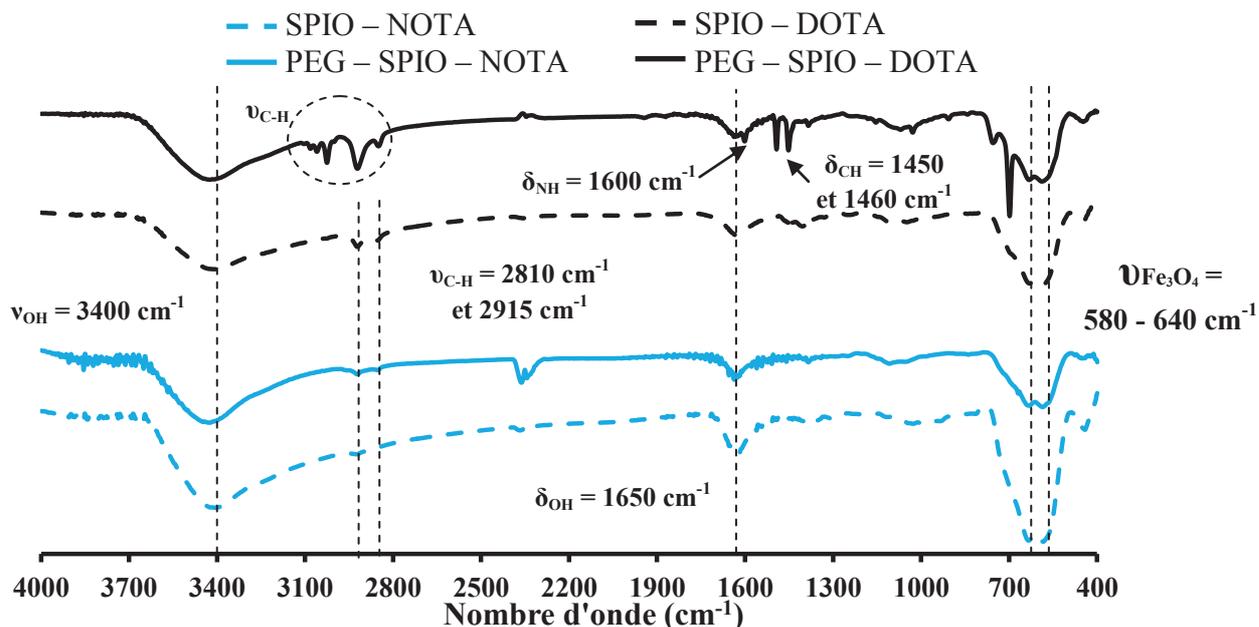


Figure 169 Spectre IR des nanohybrides SPIO – NOTA, PEG – SPIO – NOTA, SPIO – DOTA, et PEG – SPIO – DOTA.

#### IV.2.2 - Estimation du taux de greffage du PEG<sub>3000</sub> – NHS à la surface des nanohybrides

Pour déterminer le taux de PEG greffé à la surface des nanoparticules, les nanohybrides ont été analysés par ATG de 30°C à 800°C (Figure 170).

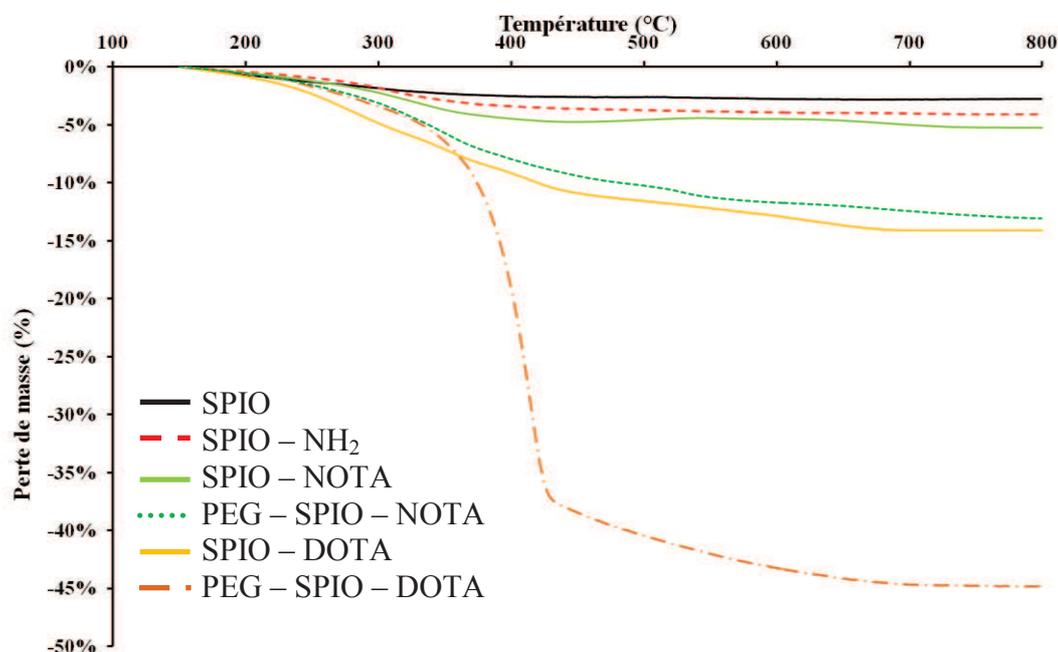


Figure 170. ATG des composés SPIO, SPIO – NH<sub>2</sub>, SPIO – NOTA, SPIO – DOTA, PEG – SPIO – NOTA et PEG – SPIO – DOTA. Les mesures ont été réalisées sous flux de N<sub>2</sub> (25 mL.min<sup>-1</sup>) avec une rampe de montée en température de 5°C.min<sup>-1</sup>. Les courbes ont été normalisées à 150°C (annexe n°3) et sont représentatives d'un échantillon.

Le taux de greffage du PEG est estimé à  $0,2 \text{ PEG}/\text{nm}^2$  pour les PEG – SPIO – NOTA et à  $0,6 \text{ PEG}/\text{nm}^2$  pour les PEG – SPIO – DOTA (Tableau 61). Il a été considéré que la surface spécifique des nanohybrides est de  $92 \pm 10 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$  (déterminée par BET), que les pertes de masse sont comprises entre  $150^\circ\text{C}$  et  $800^\circ\text{C}$  et il a fallu retrancher les pertes de masse dues aux étapes précédentes.

	$\Delta m$ totale (%)	$\Delta m$ calcul (%)	Masse molaire à considérée pour la perte ( $\text{g}.\text{mol}^{-1}$ )	Molécules/ $\text{nm}^2$	R (%)	n
<b>SPIO</b>	0,9	0,9	18	$(6,7 \pm 0,6) \text{ OH}$	-	5
<b>SPIO – NH<sub>2</sub></b>	3,6	3,6	58	$(5,0 \pm 0,7) \text{ NH}_2$	75	13
<b>SPIO – NOTA</b>	5,2	1,6	286	$(0,4 \pm \text{n.d.}) \text{ NOTA}$	8	1
<b>PEG – SPIO – NOTA</b>	13,1	8	3121	$(0,2 \pm \text{n.d.}) \text{ PEG}$	9	1
<b>SPIO – DOTA</b>	14,1	8,9	376	$(1,8 \pm \text{n.d.}) \text{ DOTA}$	36	1
<b>PEG – SPIO – DOTA</b>	44,8	35,9	3121	$(0,6 \pm \text{n.d.}) \text{ PEG}$	19	1

Tableau 61. Estimation du taux de greffage du PEG<sub>3000</sub> à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer fonctionnalisés par les agents chélatants. n.d. non déterminé car il n'y avait pas assez de valeurs pour être représentatif. R représente le rendement de greffage (%) et n le nombre d'échantillons analysés.

Ainsi, le taux de greffage du PEG est sensiblement égal à la moitié du taux de NOTA et dans des proportions d'un tiers dans le cas du DOTA. Ce taux de greffage du PEG est similaire à ceux de la littérature (Butterworth *et al.* 2001).

#### IV.2.3 - Stabilité des agents de contraste bimodaux fonctionnalisés par le PEG

La présence de PEG est mise en évidence par zétamétrie par l'observation d'un écrantage des charges pour les composés fonctionnalisés avec le PEG. L'ajout de PEG conduit à une faible variation du point isoélectrique de 7,9 à 7,4 ou 7,3 (Figure 171).

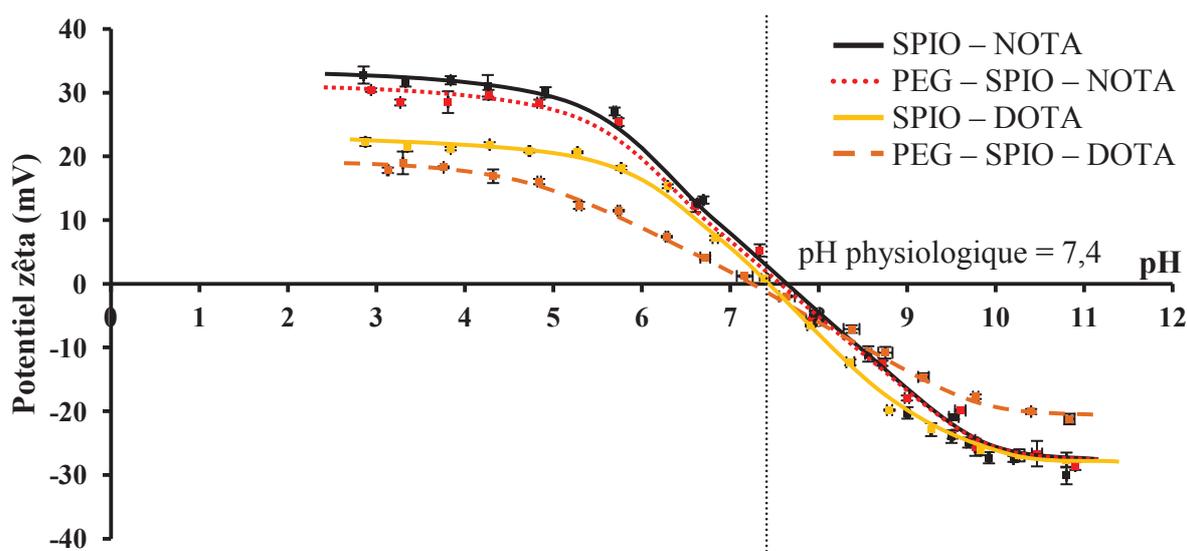


Figure 171. Évolution du potentiel zêta des SPIO – NOTA, PEG – SPIO – NOTA, SPIO – DOTA et PEG – SPIO – DOTA dans  $\text{NaCl}$  ( $10^{-2} \text{ mol}.\text{L}^{-1}$ ) en fonction du pH. Courbes représentatives d'un échantillon.

Le Tableau 62 regroupe les valeurs des PIE, potentiel zêta et des diamètres hydrodynamiques des composés agents de contraste bimodaux fonctionnalisés par le PEG.

Synthèse	PIE	$\zeta$ à pH = 7,4 (mV)	$d_H$ à pH = 7,4 (nm)	n
<b>SPIO</b>	7,2 ± 0,2	-8 ± 3	1368 ± 93	7
<b>SPIO – NH<sub>2</sub></b>	8,9 ± 0,8	+17 ± 2	19 ± 3	13
<b>SPIO – NOTA</b>	7,9 ± n.d.	+2,9 ± 0,3	296 ± 49	1
<b>PEG – SPIO – NOTA</b>	7,4 ± n.d.	+0,7 ± 0,3	223 ± 5	1
<b>SPIO – DOTA</b>	7,9 ± n.d.	+2,4 ± 0,2	395 ± 40	1
<b>PEG – SPIO – DOTA</b>	7,3 ± n.d.	+1,3 ± 0,3	627 ± 40	1

Tableau 62. Données caractéristiques de la stabilité des composés SPIO – NOTA, PEG – SPIO – NOTA, SPIO – DOTA et PEG – SPIO – DOTA. n.d. non déterminé car il n'y avait pas assez de valeurs pour être représentatif. n représente le nombre d'échantillons analysés.

Les deux nanohybrides se comportent différemment en suspension (Figure 172).

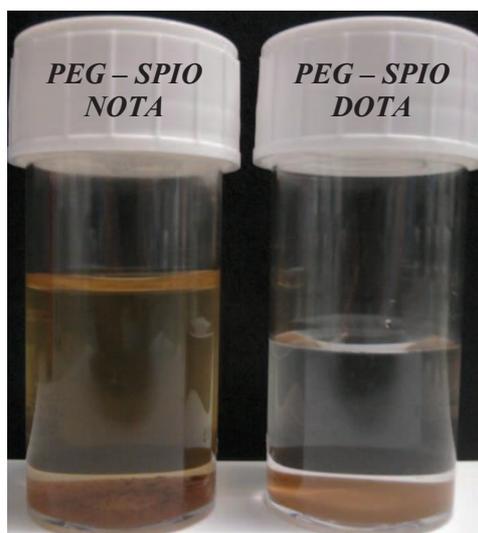


Figure 172. Photographie des suspensions PEG – SPIO – NOTA (à gauche) et PEG – SPIO – DOTA (à droite) dans le PBS à 48 heures

La suspension PEG – SPIO – DOTA est totalement instable ( $\zeta_{\text{à pH} = 7,4} \approx 0$  mV) alors que dans le cas des PEG – SPIO – NOTA, la suspension n'est pas totalement stable et seulement une partie des nanoparticules décante (les plus gros agglomérats). La suspension a été analysée en microscopie électronique en transmission et révèle deux populations : une population de plusieurs micromètres et une autre avoisinant quelques dizaines de nanomètres (Figure 173).

Pour éliminer les agrégats de plusieurs micromètres, la suspension PEG – SPIO – DOTA est centrifugée à  $108 \times g$ . Le surnageant est prélevé et puis caractérisé par DLS après ultrasons. Le diamètre hydrodynamiques mesuré est de  $d_H = (29 \pm 3)$  nm. De plus, la suspension est stable dans le PBS. Pour conclure, le greffage du PEG joue son rôle en stabilisant les plus petits agrégats de la suspension du nanohybride PEG – SPIO – NOTA.

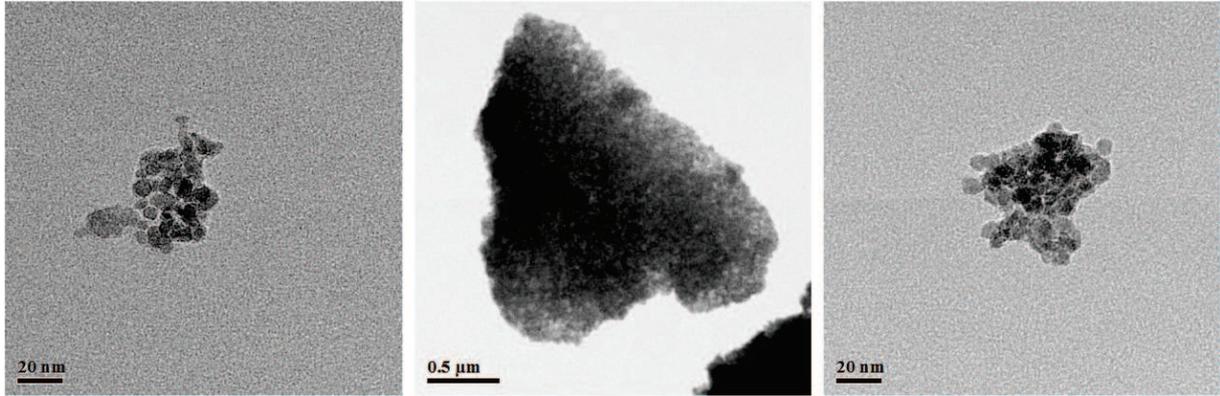


Figure 173. Clichés MET du nanohybrides PEG – SPIO – NOTA

Dans le cas des PEG – SPIO – DOTA, les agglomérats observés en microscopie avoisinent la valeur trouvée en DLS (Figure 174), il n'y a qu'une seule population.

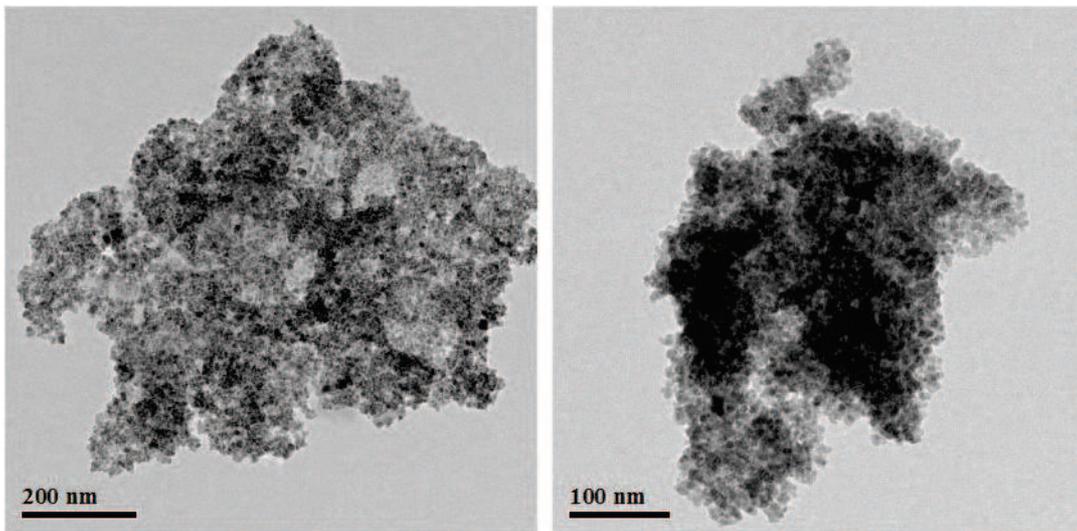


Figure 174. Clichés MET du nanohybrides PEG – SPIO – DOTA

La formation des agglomérats des PEG – SPIO – DOTA ne provient pas de l'étape du greffage précédent mais du fait que les charges de surface ne sont pas assez importantes pour stabiliser les nanoparticules dans le PBS à  $\text{pH} = 7,4$  ( $\zeta \approx 0$  mV) et ne permettent pas la répulsion électrostatique et stérique, ainsi les nanoparticules s'agglomèrent puis décantent. Cette hypothèse est confirmée par DLS à  $\text{pH} = 4$  où le diamètre hydrodynamique des PEG – SPIO – DOTA n'est que de  $d_H = (107 \pm 33)$  nm. Il faudra trouver une meilleure manière de les stabiliser pour les prochaines expériences.

#### IV.2.4 - Propriétés magnétiques des agents de contraste bimodaux

Les propriétés magnétiques des agents de contraste sont mesurées sur l'IRM clinique 3T du CHU de Dijon. Les nanoparticules sont dispersées dans des gels d'acrylamide et d'après la démarche (annexe n°6), les relaxivités des agents de contraste bimodaux sont calculées (Tableau 63).

Synthèse	$r_2$ (L.mmolFe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
<b>SPIO</b>	331 ± 23
<b>SPIO – NOTA</b>	607 ± 14
<b>PEG – SPIO – NOTA</b>	628 ± 31
<b>SPIO – DOTA</b>	256 ± 40
<b>PEG – SPIO – DOTA</b>	318 ± 5

Tableau 63. Valeurs de la relaxivité trouvées pour les divers agents de contraste bimodaux sur l'IRM clinique du CHU de Dijon

Les valeurs de la relaxivité sont plus importantes dans le cas de l'agent de contraste bimodal fonctionnalisé par le NOTA que lorsque celui-ci est fonctionnalisé par le DOTA. Le nombre de NOTA plus faible à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer et la taille plus petite du NOTA facilitant l'accès des molécules d'eau jusqu'au cœur magnétique peuvent être les causes de la valeur élevée de la relaxivité dans le cas des nanohybrides fonctionnalisés par le NOTA. Les valeurs de la relaxivité des composés avec le PEG sont équivalentes aux valeurs des nanohybrides sans PEG. La taille plus petite des agrégats des nanohybrides SPIO – NOTA et PEG – SPIO – NOTA conduisant à une surface beaucoup plus grande exposée à l'eau, pourrait expliquer une meilleure accessibilité de l'eau au cœur magnétique augmentant ainsi la relaxivité. Les valeurs sont du même ordre de grandeur que celle trouvée dans la littérature (Maurizi 2013).

#### IV.3 - Conclusion sur la création d'agents de contraste bimodaux pour l'imagerie IRM/SPECT ou IRM/TEP

Les nanoparticules d'oxydes de fer ont été modifiées avec réussite par le DOTA – NHS et le NOTA – NHS afin de fabriquer des agents de contraste bimodaux IRM/SPECT ou IRM/TEP. Par contre, la fonction amide qui lie l'agent chélatant aux nanoparticules n'a pas été mise en évidence par les différences techniques d'analyses. Cependant, la détermination du taux de greffage des agents complexant par ATG a conduit à 0,4 NOTA/nm<sup>2</sup> et à 1,8 DOTA/nm<sup>2</sup> respectivement. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur à celle trouvée lors de la fonctionnalisation des nanotubes de titanate par le DOTA (0,2 DOTA/nm<sup>2</sup>) alors que les valeurs de la littérature sont inférieures, elles sont de l'ordre de 0,1 DOTA/nm<sup>2</sup> (Lee *et al.* 2008).

Pour améliorer leur stabilité et leur biocompatibilité, les nanohybrides ont été fonctionnalisés avec du PEG<sub>3000</sub> – NHS. Les différentes techniques d'analyses ont permis de mettre en évidence la présence du PEG à la surface des nanoparticules et un taux de greffage du PEG a été calculé dans le cas de chacun des macrocycles soit 0,2 PEG/nm<sup>2</sup> (pour 0,4 NOTA/nm<sup>2</sup>), et 0,6 PEG/nm<sup>2</sup> (pour 1,8 DOTA/nm<sup>2</sup>). Dans le cas du composé PEG – SPIO – DOTA, la suspension, après centrifugation (108 × g) et élimination des gros agrégats (quelques micromètres) est stable dans le PBS. Les mesures magnétiques sur une IRM clinique des agents de contraste bimodaux ont permis d'obtenir les valeurs des relaxivités de l'ordre de 300 L.mmolFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> pour les nanoparticules d'oxydes de fer fonctionnalisées par le DOTA et DOTA/PEG et d'environ 600 L.mmolFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> dans les cas du greffage avec le NOTA.

## V. Conclusion sur la fonctionnalisation des nanoparticules pour l'imagerie nucléaire

Tout d'abord, les nanotubes de titanate ont été fonctionnalisés avec succès par le DOTA en vue de connaître leur biodistribution *in vivo* (modèle : souris mâles swiss nude). L'accroche du ligand macrocyclique s'effectue par la réaction de l'ester activé du DOTA sur les TiONts – NH<sub>2</sub> dans un mélange THF/DMSO (90/10). La liaison entre les nanotubes et le DOTA devrait être une fonction amide qui n'a cependant pas été mise en évidence par les différentes techniques de caractérisation (XPS, IR). En revanche, ces mêmes caractérisations suggèrent que le DOTA est présent à la surface des nanotubes. Le taux de DOTA est de l'ordre de 0,2 DOTA par nm<sup>2</sup> (soit 800 DOTA par TiONts), taux similaire aux valeurs trouvées dans la littérature (Liu *et al.* 2007; Mcdevitt *et al.* 2007).

Le DOTA est un agent chélatant macrocyclique qui permet de complexer des radioéléments comme l'indium 111 pour l'imagerie SPECT. Le radiomarquage de l'indium 111 se déroule dans une solution d'acétate d'ammonium à pH = 3,5 pendant 1h à 80°C. Ce radiomarquage a un rendement de 90% et une pureté radiochimique supérieure à 99% déterminé par ITLC après purification (centrifugation + challenge au DTPA). Ce nanohydrate radioactif TiONts – DOTA [<sup>111</sup>In] a été injecté à des souris mâles swiss nude pour connaître leur biodistribution. Les images SPECT/CT et le comptage de la radioactivité dans chaque organe ont montré qu'au bout d'une heure, les nanotubes se situent principalement dans les poumons (58%ID/g), dans la vessie (37%ID/g) et dans une moindre mesure dans le foie et la rate. Ensuite, les nanotubes sont progressivement éliminés par excrétion pour n'être présents que dans la vessie à 24 heures.

Leurs homologues, les nanotubes de carbone se comportent différemment *in vivo* car trois heures après injection, ces derniers se retrouvent dans le foie, la rate, les reins et dans le squelette osseux. La différence ne s'arrête pas à cette conclusion puisque les nanotubes de carbone ne sont pas éliminés au bout de 24 heures et se situent toujours dans les mêmes organes mais en plus faible quantité.

Les TiONts – DOTA ont été fonctionnalisés par du PEG<sub>3000</sub> pour améliorer leur biocompatibilité et la stabilité en suspension. Le taux de PEG est de l'ordre de 0,05 PEG par nm<sup>2</sup> (Figure 175).

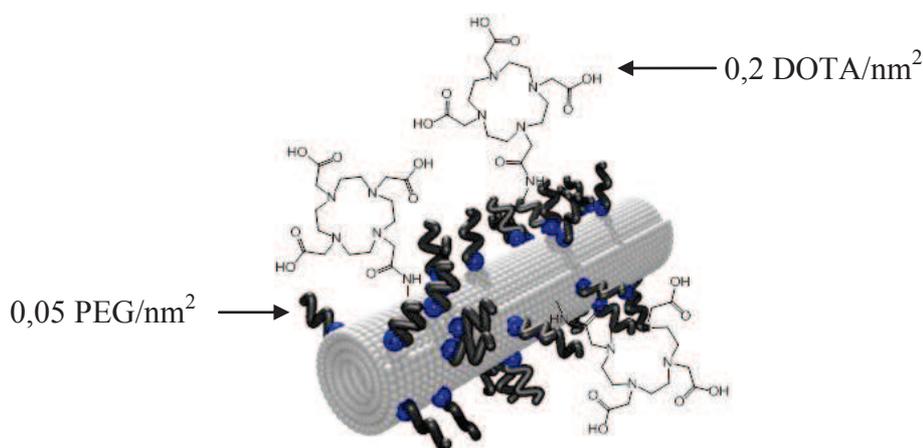


Figure 175. Représentation schématique du nanohydrate PEG – TiONts - DOTA

Ensuite, afin de créer des agents de contraste bimodaux IRM/SPECT ou IRM/TEP, les nanoparticules d'oxydes de fer ont été modifiées par le DOTA – NHS et le NOTA – NHS. Les diverses techniques de caractérisation montrent que le DOTA ou le NOTA sont présents à

la surface des nanoparticules. En revanche, la fonction amide qui lie l'agent chélatant aux nanoparticules n'a pas été mise en évidence par ces différentes techniques d'analyses. Cependant grâce à l'ATG, une estimation du taux de greffage des agents complexants a été déterminée à 0,4 NOTA/nm<sup>2</sup> et à 1,8 DOTA/nm<sup>2</sup>. Ces valeurs sont supérieures à celle trouvées lors de la fonctionnalisation des nanotubes de titanate par le DOTA (0,2 DOTA/nm<sup>2</sup>) et les valeurs de la littérature sont très inférieures, de l'ordre de 0,1 DOTA/nm<sup>2</sup> (Lee *et al.* 2008).

Les nanohybrides ont été ensuite fonctionnalisés avec du PEG<sub>3000</sub> – NHS pour améliorer leur stabilité et un taux de greffage du PEG a été évalué dans les deux cas à 0,2 PEG/nm<sup>2</sup> (pour 0,4 NOTA/nm<sup>2</sup>) et à 0,6 PEG/nm<sup>2</sup> (pour 1,8 DOTA/nm<sup>2</sup>). Ainsi, le taux de greffage du PEG est sensiblement égal à la moitié du taux de NOTA et dans des proportions d'un tiers dans le cas du DOTA. Le PEG joue son rôle de stabilisateur stérique dans le cas des PEG – SPIO – NOTA car la suspension est stable en condition physiologique alors que la suspension PEG – SPIO – DOTA décante dans ces mêmes conditions. Les caractéristiques de diagnostic de ces nanohybrides ont été déterminées par IRM et sont de l'ordre de 300 L.mmol<sub>Fer</sub><sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> pour le greffage du DOTA et d'environ 600 L.mmol<sub>Fer</sub><sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> dans les cas du greffage avec le NOTA (Figure 176). Donc, les nanoparticules d'oxydes de fer fonctionnalisées par les agents macrocycliques pourront être utilisées en tant qu'agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique. La partie de diagnostic pour l'imagerie nucléaire reste à tester.

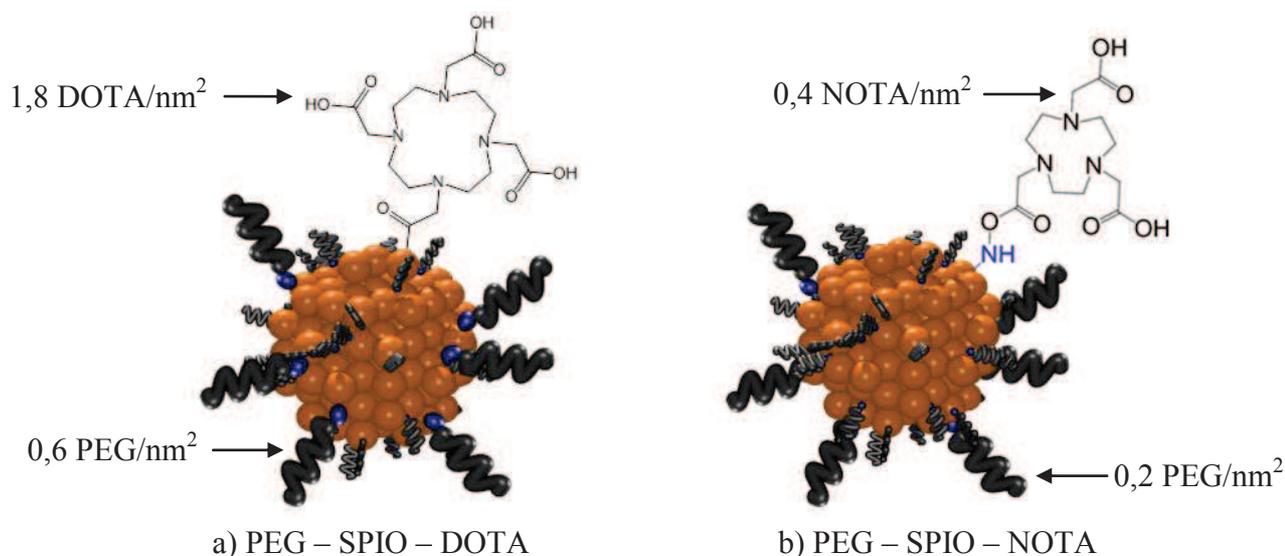


Figure 176. Représentation schématique des agents de contraste pour l'imagerie bimodale IRM/SPECT ou IRM/TEP à base de nanoparticules d'oxydes de fer

## Références bibliographiques

- Butterworth, M.D., Illum, L. and Davis, S.S. (2001). "Preparation of ultrafine silica- and PEG-coated magnetite particles." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **179**(1): 93-102.
- Cheon, J. and Lee, J.-H. (2008). "Synergistically Integrated Nanoparticles as Multimodal Probes for Nanobiotechnology." Accounts of Chemical Research **41**(12): 1630-1640.
- Clarke, E.T. and Martell, A.E. (1991a). "Stabilities of the Fe(III), Ga(III) and In(III) chelates of N,N',N''-triazacyclononanetriacetic acid." Inorganica Chimica Acta **181**(2): 273-280.
- Clarke, E.T. and Martell, A.E. (1991b). "Stabilities of trivalent metal ion complexes of the tetraacetate derivatives of 12-, 13- and 14-membered tetraazamacrocycles." Inorganica Chimica Acta **190**(1): 37-46.
- De Rosales, R.T.M., Tavaré, R., Glaria, A., Varma, G., Protti, A., Blower, P.J., De Rosales, R.T.M., Tavaré, R., Glaria, A., Varma, G., Protti, A. and Blower, P.J. (2011). "Tc-99m-Bisphosphonate-Iron Oxide Nanoparticle Conjugates for Dual-Modality Biomedical Imaging." Bioconjugate Chemistry **22**(3): 455-465.
- Glaus, C., Rossin, R., Welch, M.J. and Bao, G. (2010). "In Vivo Evaluation of <sup>64</sup>Cu-Labeled Magnetic Nanoparticles as a Dual-Modality PET/MR Imaging Agent." Bioconjugate Chemistry **21**(4): 715-722.
- Harris, W.R., Chen, Y. and Wein, K. (1994). "Equilibrium Constants for the Binding of Indium(III) to Human Serum Transferrin." Inorganic Chemistry **33**(22): 4991-4998.
- Harris, W.R. and Messori, L. (2002). "A comparative study of aluminum(III), gallium(III), indium(III), and thallium(III) binding to human serum transferrin." Coordination Chemistry Reviews **228**(2): 237-262.
- Hwang, D.W., Ko, H.Y., Kim, S.-K., Kim, D., Lee, D.S. and Kim, S. (2009). "Development of a Quadruple Imaging Modality by Using Nanoparticles." Chemistry – A European Journal **15**(37): 9387-9393.
- Kim, J., Kim, H.S., Lee, N., Kim, T., Kim, H., Yu, T., Song, I.C., Moon, W.K. and Hyeon, T. (2008). "Multifunctional Uniform Nanoparticles Composed of a Magnetite Nanocrystal Core and a Mesoporous Silica Shell for Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging and for Drug Delivery." Angewandte Chemie International Edition **47**(44): 8438-8441.
- Kryza, D., Taleb, J., Janier, M., Marmuse, L., Miladi, I., Bonazza, P., Louis, C.D., Perriat, P., Roux, S.P., Tillement, O. and Billotey, C. (2011). "Biodistribution Study of Nanometric Hybrid Gadolinium Oxide Particles as a Multimodal SPECT/MR/Optical Imaging and Theragnostic Agent." Bioconjugate Chemistry **22**(6): 1145-1152.
- Lau, E.Y., Lightstone, F.C. and Colvin, M.E. (2006). "Environmental Effects on the Structure of Metal Ion-DOTA Complexes: An ab Initio Study of Radiopharmaceutical Metals." Inorganic Chemistry **45**(23): 9225-9232.
- Lee, H.-Y., Li, Z., Chen, K., Hsu, A.R., Xu, C., Xie, J., Sun, S. and Chen, X. (2008). "PET/MRI Dual-Modality Tumor Imaging Using Arginine-Glycine-Aspartic (RGD)-Conjugated Radiolabeled Iron Oxide Nanoparticles." Journal of Nuclear Medicine **49**(8): 1371-1379.
- Liu, S. (2004). "The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals." Chemical Society Reviews **33**(7): 445-461.
- Liu, S. and Edwards, D.S. (2001). "Synthesis and Characterization of Two <sup>111</sup>In-Labeled DTPA-Peptide Conjugates." Bioconjugate Chemistry **12**(4): 630-634.

- Liu, Z., Cai, W., He, L., Nakayama, N., Chen, K., Sun, X., Chen, X. and Dai, H. (2007). "*In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice.*" Nat Nano **2**(1): 47-52.
- Maurizi, L. (2010). Elaboration de nanoparticules fonctionnelles : applications comme agents de contraste en IRM. Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne, Université de Bourgogne.
- Maurizi, L.P., A-L. ; Dumont, L. ; Bouyer, F. ; Walker, P. ; Vandroux, D. And Millot, N. (2013). "*Influence of surface charge and polymer coating on internalization and biodistribution of PEG-modified iron oxide nanoparticles.*" soumise à Nanomedicine.
- Mcdevitt, M.R., Chattopadhyay, D., Jaggi, J.S., Finn, R.D., Zanzonico, P.B., Villa, C., Rey, D., Mendenhall, J., Batt, C.A., Njardarson, J.T. and Scheinberg, D.A. (2007). "*PET Imaging of Soluble Yttrium-86-Labeled Carbon Nanotubes in Mice.*" PLoS ONE **2**(9): e907.
- Moreau, M., Raguin, O., Vrigneaud, J.-M., Collin, B., Bernhard, C., Tizon, X., Boschetti, F.D.R., Duchamp, O., Brunotte, F.O. and Denat, F. (2012). "*DOTAGA-Trastuzumab. A New Antibody Conjugate Targeting HER2/Neu Antigen for Diagnostic Purposes.*" Bioconjugate Chemistry.
- Park, J.-A., Kim, H.-K., Kim, J.-H., Jeong, S.-W., Jung, J.-C., Lee, G.-H., Lee, J., Chang, Y. and Kim, T.-J. (2010). "*Gold nanoparticles functionalized by gadolinium-DTPA conjugate of cysteine as a multimodal bioimaging agent.*" Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **20**(7): 2287-2291.
- Park, J.-A., Reddy, P.a.N., Kim, H.-K., Kim, I.-S., Kim, G.-C., Chang, Y. and Kim, T.-J. (2008). "*Gold nanoparticles functionalised by Gd-complex of DTPA-bis(amide) conjugate of glutathione as an MRI contrast agent.*" Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **18**(23): 6135-6137.
- Pretsch, E., P. Buhlmann and C. Affolter (2000). Structure determination of organic compounds. Tables of spectra data.
- Rehor, I., Vilimova, V., Jendelova, P., Kubicek, V., Jirak, D., Herynek, V., Kapcalova, M., Kotek, J., Cerny, J., Hermann, P. and Lukes, I. (2011). "*Phosphonate-titanium dioxide assemblies: platform for multimodal diagnostic-therapeutic nanoprobess.*" J Med Chem **54**(14): 5185-94.
- Reichert, D.E., Lewis, J.S. and Anderson, C.J. (1999). "*Metal complexes as diagnostic tools.*" Coordination Chemistry Reviews **184**(1): 3-66.
- Rouxhet, P.G. and Genet, M.J. (2011). "*XPS analysis of bio-organic systems.*" Surface and Interface Analysis **43**(12): 1453-1470.
- Safavy, A., Smith, D.C., Bazooband, A. and Buchsbaum, D.J. (2002). "*De Novo Synthesis of a New Diethylenetriaminepentaacetic Acid (DTPA) Bifunctional Chelating Agent.*" Bioconjugate Chemistry **13**(2): 317-326.
- Sandiford, L., Phinikaridou, A., Protti, A., Meszaros, L.K., Cui, X., Yan, Y., Frodsham, G., Williamson, P.A., Gaddum, N., Botnar, R.M., Blower, P.J., Green, M.A. and De Rosales, R.T.M. (2012). "*Bisphosphonate-Anchored PEGylation and Radiolabeling of Superparamagnetic Iron Oxide: Long-Circulating Nanoparticles for in Vivo Multimodal (T<sub>1</sub> MRI-SPECT) Imaging.*" ACS Nano **7**(1): 500-512.
- Wu, W., Li, R., Bian, X., Zhu, Z., Ding, D., Li, X., Jia, Z., Jiang, X. and Hu, Y. (2009). "*Covalently Combining Carbon Nanotubes with Anticancer Agent: Preparation and Antitumor Activity.*" ACS Nano **3**(9): 2740-2750.
- Zhang, Y., Kohler, N. and Zhang, M. (2002). "*Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake.*" Biomaterials **23**(7): 1553-1561.

## Chapitre 4. Vers la création de nouvelles sondes théranostiques

Précédemment, la fonctionnalisation des nanoparticules a permis de suivre leur biodistribution par imagerie nucléaire. Ce chapitre traite de la fonctionnalisation des nanoparticules par des fluorophores, les phtalocyanines, pour la création de sondes théranostiques pour l'imagerie optique (IO) et en vue d'une application thérapeutique : la thérapie photodynamique. La première partie traitera de la fonctionnalisation des nanotubes de titanate préfonctionnalisés par les phtalocyanines par deux voies : la voie peptidique et la voie par chimie clic. La deuxième partie rédigée sous forme de publication, précisera le développement de sondes multimodales IRM/IO à base de nanoparticules d'oxydes de fer.

### I. Sondes pour l'imagerie multimodale IRM/IO

Les nanoparticules, que ce soit d'oxydes de fer ou d'autres métaux ont souvent été fonctionnalisées par des fluorophores comme la rhodamine ou la fluorescéine pour visualiser les nanoparticules à l'intérieur des cellules (Maurizi 2010) et plus récemment pour l'imagerie optique du petit animal (Cheon *et al.* 2008).

Par exemple, les nanoparticules d'oxydes de fer ont été fonctionnalisées par de la rhodamine pour créer des sondes bimodales IRM/fluorescence (Maurizi *et al.* 2009) ou, en dopant des nanobilles de silice par de la rhodamine et en fonctionnalisant le tout par des nanoparticules d'oxydes de fer (Lee *et al.* 2006) (Figure 177).

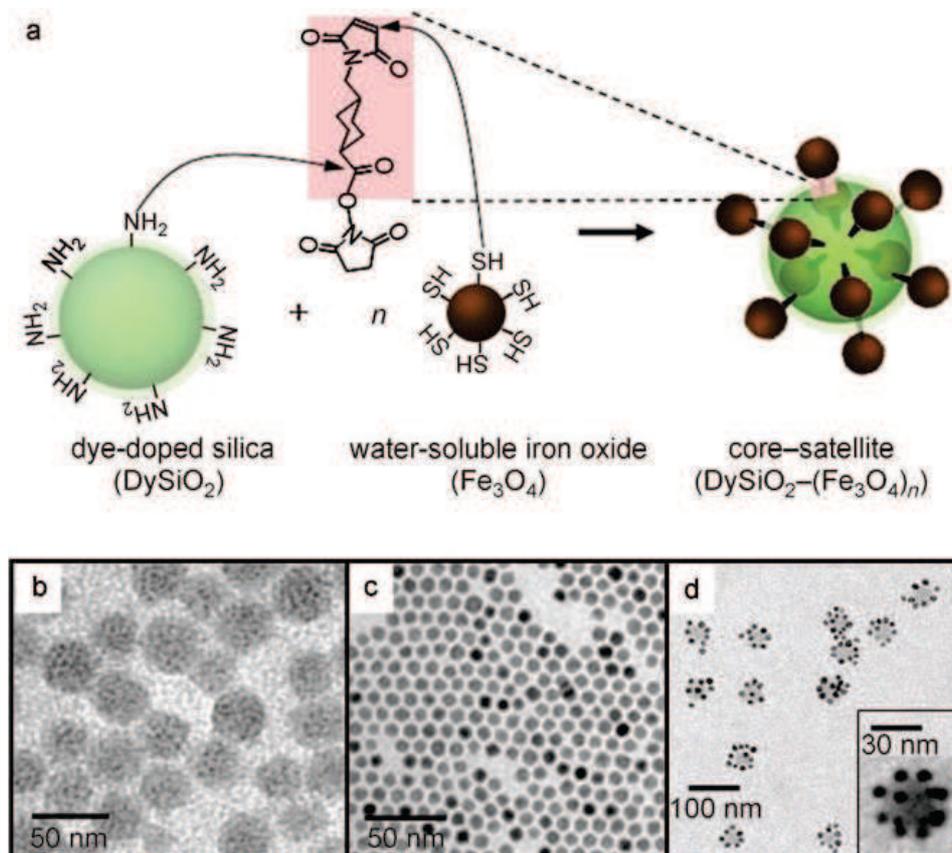


Figure 177. a) Représentation schématique du greffage et clichés MET b) des nanobilles de silice dopées par la rhodamine, c) nanoparticules d'oxydes de fer et d) nanobilles de silice fonctionnalisées par des nanoparticules d'oxydes de fer selon (Lee *et al.* 2006)

De plus en plus de travaux sur la fonctionnalisation des nanoparticules par des fluorophores traitent de la création de sondes bimodales pour l'IRM et pour l'imagerie optique *in vivo* (Kim *et al.* 2008; Xie *et al.* 2010; Wang *et al.* 2013), par exemple, le greffage de la Cyanine 5.5 sur les nanoparticules d'oxydes de fer pour l'imagerie optique du petit animal. L'accumulation du nanohybride est observée dans la tumeur grâce à des molécules de ciblages greffées préalablement aux nanoparticules (Figure 178).

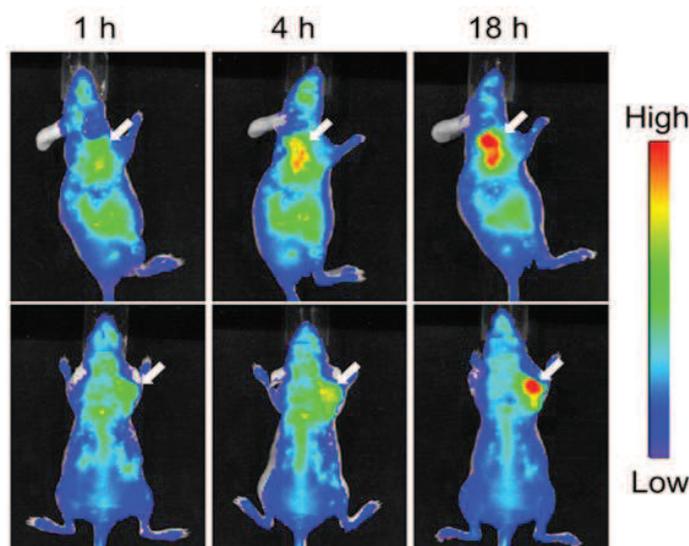


Figure 178. Imagerie optique : clichés d'une souris qui contient une tumeur de type glioblastome (U87MG) sous-cutanée à 1, 4 et 18 heures. L'accumulation des nanohybrides dans la tumeur est observée (flèche blanche) d'après (Xie *et al.* 2010)

Dans cette étude, les fluorophores choisis sont des phtalocyanines qui présentent un intérêt supérieur du point de vue diagnostique et thérapeutique à ceux utilisés généralement comme la rhodamine ou la fluorescéine.

## II. Les phtalocyanines pour l'imagerie optique et la thérapie photodynamique

### II.1.1 - Les phtalocyanines

Les phtalocyanines sont des molécules qui ont une structure similaire à celle des porphyrines (comme le DOTA). Leur structure macrocyclique résulte de la condensation de quatre groupements iso-indole composés d'atomes de carbone, d'hydrogène et d'azote. Ce système entièrement conjugué dérive du système porphyrinique qui n'existe pas tel quel dans la nature, mais qui est à l'origine de substances essentielles comme l'hème du sang (Sorokin 2013). Ce système confère aux phtalocyanines la possibilité de former des complexes métalliques grâce à la présence d'une cavité centrale pouvant accueillir un ion métallique. La norme pour définir les phtalocyanines est basée sur le nombre de groupements iso-indole différents. Par exemple, si aucun n'est substitué, la phtalocyanine est définie comme A<sub>4</sub>, si un iso-indole est substitué, elle sera nommée A<sub>3</sub>B (Figure 179). De plus, elles sont souvent écrites MPc avec M, le métal dans la cavité tel que CuPc, ZnPc ou InPc.

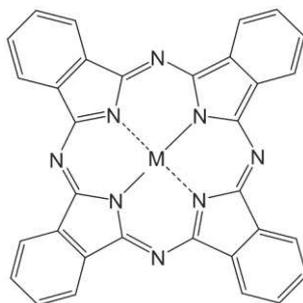


Figure 179. Représentation schématique d'une phthalocyanine  $A_4$ . Le  $M$  représente le métal complexé dans la cavité

Divers ions métalliques peuvent être complexés et donne ainsi différentes propriétés aux phthalocyanines. Les phthalocyanines ont la possibilité d'incorporer au sein de leur cavité 70 cations métalliques différents. Il est aussi possible de leur greffer différents substituants. Par exemple, les phthalocyanines à base de cuivre sont très utilisées comme pigments artistiques et sont référencées au Colour Index comme Pigment Blue 15 depuis 1935 (Defeyt 2010).

## II.1.2 - Intérêts des phthalocyanines

### II.1.2.1 - Propriétés optiques des phthalocyanines

Les phthalocyanines possèdent des propriétés optiques intéressantes pour l'imagerie optique grâce à leur longueur d'onde d'absorption qui varie entre 600 et 700 nm et le fait qu'elles émettent de la fluorescence à des longueurs d'onde supérieures à 650 nm. Elles sont aussi caractérisées par la différence entre ces deux longueurs d'onde (absorption et émission), appelée déplacement de Stokes (Tableau 64).

Phtalocyanine	Longueur d'onde d'absorption $\lambda_{\text{abs}_{\text{max}}}$ (nm)	Longueur d'onde d'émission $\lambda_{\text{em}_{\text{max}}}$ (nm)	Déplacement de Stokes (nm)
AlPc	680	688	8
GaPc	680	691	11
InPc	686	700	14
ZnPc*	675	678	4

Tableau 64. Propriétés optiques des diverses phthalocyanines dans le DMSO d'après (Yanik et al. 2009). \* Dans le DMF selon (Manneville 2006)

Ainsi, les phthalocyanines sont des molécules capables d'absorber la lumière. Cette capacité à absorber la lumière est définie par le coefficient d'extinction molaire  $\epsilon$ . La loi de Beer – Lambert établit la proportionnalité entre la concentration d'une espèce absorbante en solution à l'absorbance de celle-ci :

$$A_{\lambda} = \epsilon \cdot L \cdot C \quad (\text{Équation 7})$$

Avec  $A_{\lambda}$ , l'absorbance de la solution à une longueur d'onde donnée<sup>16</sup> ;  $\epsilon$ , le coefficient d'extinction molaire ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) ;  $L$ , la longueur du trajet parcouru par la lumière dans la solution (cm) et  $C$ , la concentration molaire du fluorophore en solution ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

<sup>16</sup> L'absorbance est définie par  $A = \log(I_0/I)$  avec  $I_0$ , l'intensité du faisceau incident ;  $I$ , l'intensité du faisceau transmis. L'absorbance est une valeur positive sans unité.

Pour les phtalocyanines, cela se traduit par une différence du coefficient d'extinction molaire en fonction du cation métallique central et des substituants (Tableau 65).

Phtalocyanine	Coefficient d'extinction molaire $\epsilon$ ( $10^5 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )
ZnPc	2,0
AlPc	2,5
AlPcS	1,2
AlPcS <sub>4</sub>	2,5
SiPc	2,3
H <sub>2</sub> Pc	0,95

Tableau 65. Coefficient d'extinction molaire pour quelques phtalocyanines par rapport à la phtalocyanine libre (H<sub>2</sub>Pc) selon (Manneville 2006)

Ces propriétés font des phtalocyanines des fluorophores très intéressants pour l'imagerie optique car c'est dans cette région (600 – 1400 nm) que la pénétration tissulaire du spectre visible est la meilleure (Van Lier *et al.* 2001). En possédant des longueurs d'onde d'émission proche de 680 nm (Tableau 64), les phtalocyanines se retrouvent à émettre dans la fenêtre optique idéale pour l'imagerie optique *in vivo* (Figure 180).

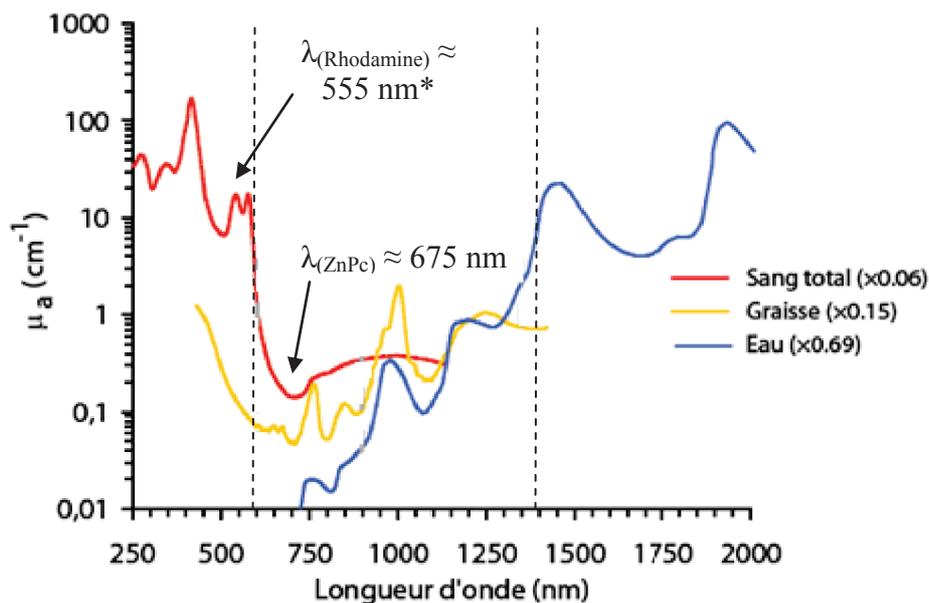


Figure 180. Absorbance de différents tissus en fonction de la longueur d'onde. La fenêtre optique idéale (600 – 1400 nm) est représentée par les traits en pointillés d'après (Pansare *et al.* 2012). \* Selon (Maurizi *et al.* 2009)

Par exemple, la rhodamine qui est généralement utilisée se situe dans une zone où le coefficient d'absorbance est dix plus fois plus élevé que pour les phtalocyanines ( $\mu_{\text{Pc}} = 0,2 \text{ cm}^{-1}$  à 670 nm contre  $20 \text{ cm}^{-1}$  à 555 nm pour la rhodamine). De plus, la lumière pénètre mieux dans les tissus lorsque les longueurs d'onde sont proches de l'infrarouge (Figure 181).

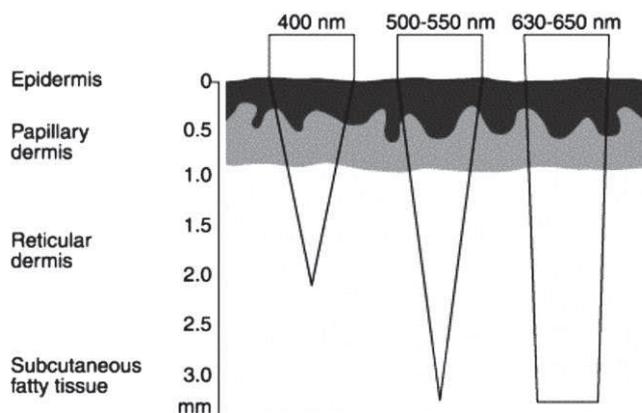


Figure 181. Pénétration de la lumière dans les tissus en fonction de la longueur d'onde selon (Manneville 2006)

De plus, les phtalocyanines sont des molécules robustes qui ont un faible photoblanchiment (perte de fluorescence). Elles présentent une faible cinétique de photoblanchiment contrairement à la fluorescéine, un des fluorophores les plus utilisés qui perd de la fluorescence dès les premières minutes (Figure 182).

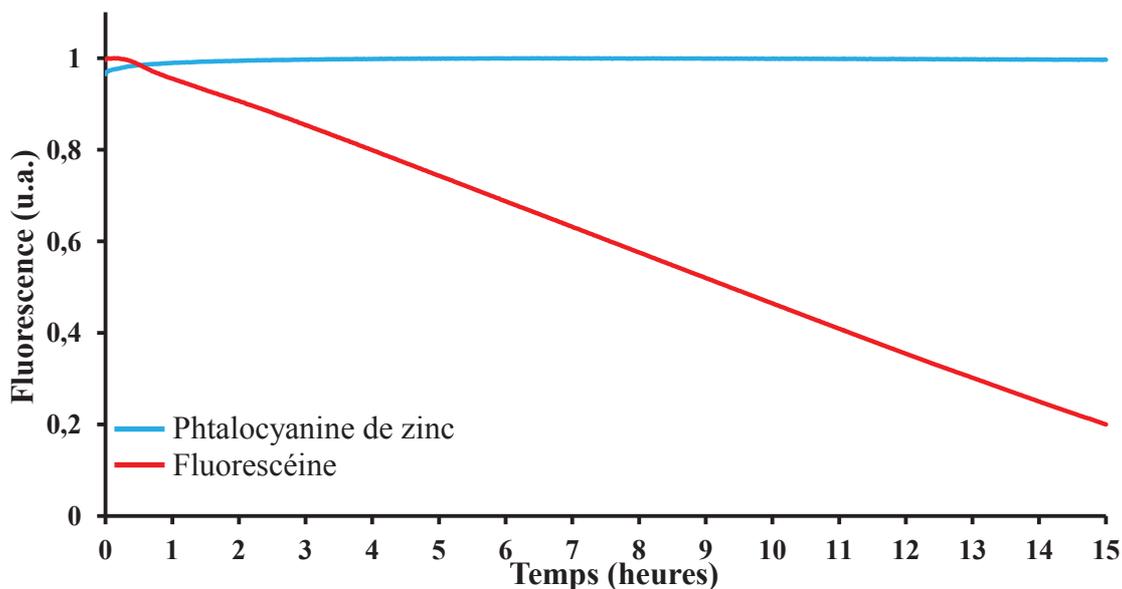


Figure 182. Évolution de la fluorescence en fonction du temps de la fluorescéine et des phtalocyanine de zinc dans le DMSO d'après (Boudon et al. 2013)

L'efficacité de fluorescence en comparaison des autres voies de désexcitation pour un fluorophore est déterminée par le rendement quantique  $\Phi_F$  (Tableau 66). Il est défini par l'équation 8 comme étant le rapport entre le nombre de photons émis par fluorescence ( $I_F$ ) et le nombre de photons absorbés par la molécule ( $I_A$ ) et il est toujours compris entre 0 et 1 :

$$\Phi_F = \frac{I_F}{I_A} \quad (\text{Équation 8})$$

La fluorescence d'une molécule est influencée par son environnement : polarité, solvant, pH, pression, viscosité, température et potentiel électrique (Valeur 2004).

Afin de déterminer ce rendement quantique de fluorescence, une relation empirique à l'aide des propriétés d'une référence est utilisée (Biyıklıoğlu et al. 2010) :

$$\Phi_F = \Phi_{F_{ref}} \cdot \frac{A_{ref}}{A} \frac{I}{I_{ref}} \left( \frac{n}{n_{ref}} \right)^2 \quad (\text{Équation 9})$$

Avec :

- $\Phi_F$  et  $\Phi_{F_{ref}}$ , le rendement quantique de fluorescence de l'échantillon et de la référence ;
- $A$  et  $A_{ref}$ , l'absorbance de l'échantillon et de la référence ;
- $I$  et  $I_{ref}$ , l'aire sous la courbe d'émission de l'échantillon et de la référence ;
- $n$  et  $n_{ref}$ , l'indice de réfraction des solvants de l'échantillon et de la référence.

Le terme de brillance  $B$  est souvent rencontré pour caractériser un fluorophore, il s'agit de l'intensité de fluorescence émise. Elle est calculée de la façon suivante :

$$B = \Phi_F \cdot \epsilon. \quad (\text{Équation 10})$$

Molécule	$\lambda_{abs}$ (nm)	$\lambda_{emi}$ (nm)	$\Delta$ Stokes (nm)	$\epsilon$ ( $10^5 \cdot L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ )	$\Phi_F$	B (u.a.)
ZnPc*	677	681	4	2	0,3	60000
Rhodamine B <sup>•</sup>	555	610	55	0,8	0,6	48000
fluorescéine <sup>▲</sup>	495	521	26	0,8	0,9	72000

Tableau 66. Caractéristiques de divers fluorophores. \* d'après (Ogunsipe et al. 2004a) ; <sup>•</sup> d'après (Savarese et al. 2012) ; <sup>▲</sup> d'après (Magde et al. 2002)

### II.1.2.2 - Propriétés thérapeutiques des phtalocyanines

La thérapie photodynamique (PDT : PhotoDynamic Therapy) implique une association de trois éléments qui sont la lumière, l'oxygène et un photosensibilisant. Cette combinaison entraîne la formation d'espèces réactives qui provoquent des réactions d'oxydation au sein des cellules et ainsi la mort cellulaire (principe de la PDT annexe n°9).

Les phtalocyanines peuvent être utilisées comme photosensibilisant car les photosensibilisants les plus utilisés en PDT *in vivo* sont les porphyrines, les chlorines ou les bactériochlorines qui ont une structure proche et des propriétés similaires aux phtalocyanines (Figure 183). Ces trois composés ont un maximum d'absorption dans le rouge et sont de bons générateurs d'oxygène singulet ( $\Phi_{\Delta} = 0,55$  pour la tétraphényl porphyrine dans le chloroforme). Les porphyrines présentent en général un maximum d'absorption vers 630 nm, alors que les chlorines ou les bactériochlorines ont respectivement un maximum d'absorption vers 650 nm et 710 nm (Manneville 2006).

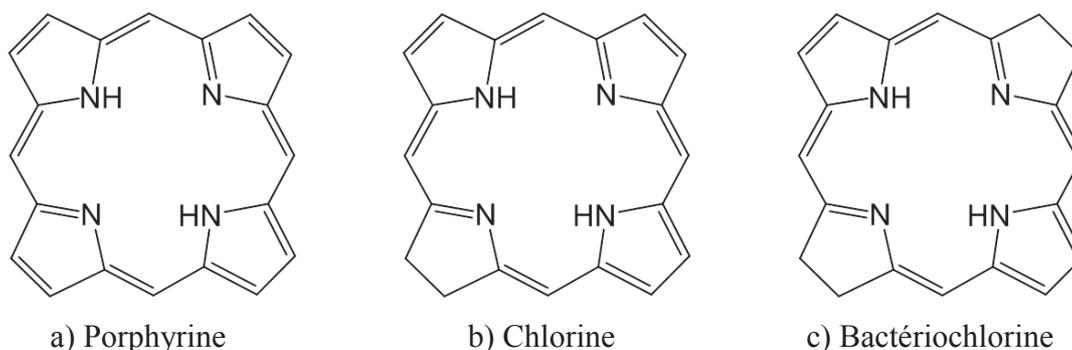


Figure 183. Structure chimique de base de porphyrine, chlorine et bactériochlorine d'après (Manneville 2006)

La phtalocyanine de zinc (ZnPc) est un fluorophore qui possède les deux caractéristiques recherchées pour les applications visées. En effet, la ZnPc émet de la fluorescence à une longueur d'onde dans la fenêtre idéale pour l'imagerie (Figure 180) et possèdent un excellent rendement de production de l'oxygène singulet pour être utilisée en thérapie. En conclusion, la phtalocyanine de zinc est une **phtalocyanine théranostique**.

### II.1.3 - Les phtalocyanines de zinc disponibles

Les phtalocyanines sont fabriquées par l'équipe P2DA (Polyamines, Porphyrines, Développements et Applications) de l'Institut Moléculaire de Chimie de l'Université de Bourgogne (ICMUB) dans le cadre d'une collaboration avec Richard Decréau et son doctorant Yann Bernhard. Ce groupe peut synthétiser des phtalocyanines avec diverses fonctions organiques d'accroche comme une amine, un acide carboxylique ou un alcène (Figure 184). Les phtalocyanines sont obtenues dans un mélange A<sub>4</sub> (sans bras d'accroche) et A<sub>3</sub>B (avec le bras d'accroche) dans une proportion 50/50.

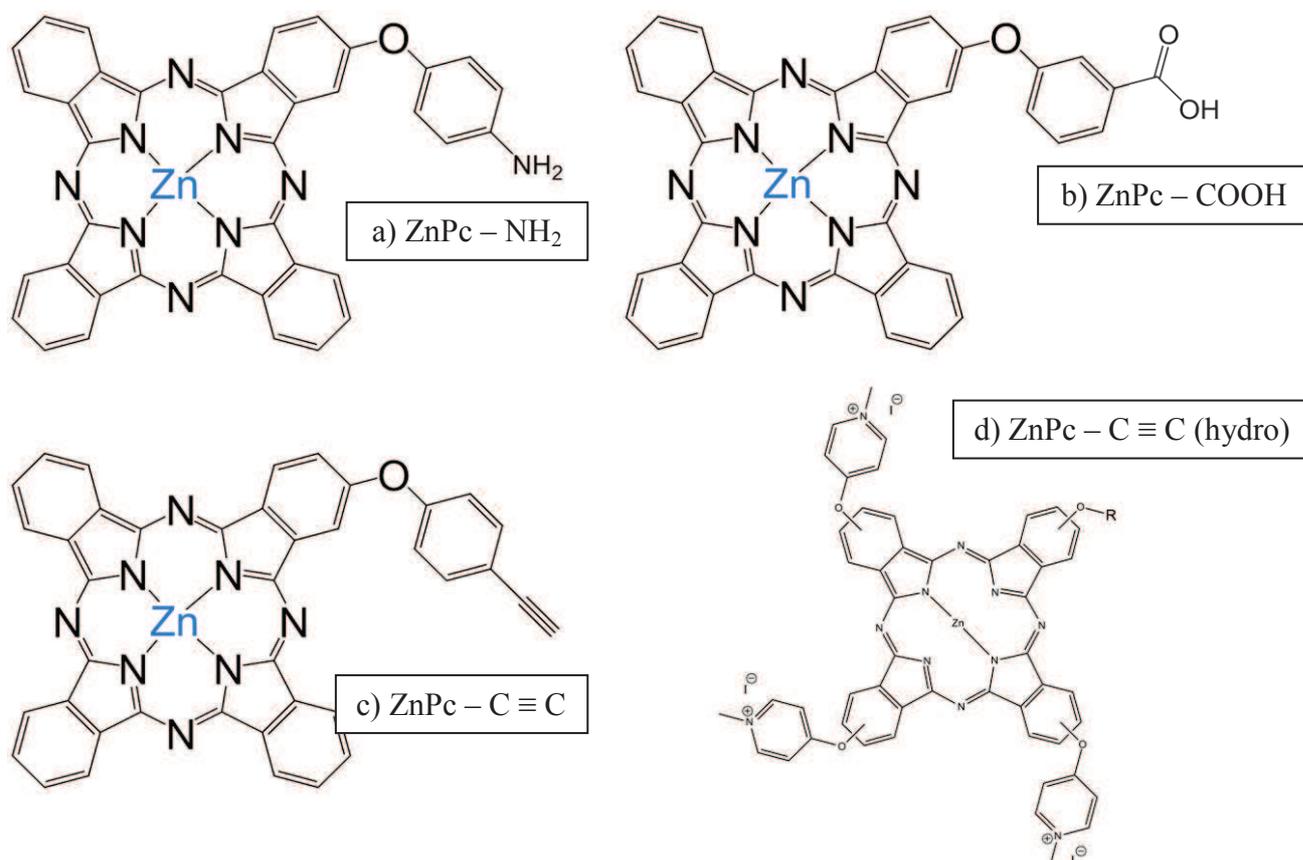


Figure 184. Les différentes phtalocyanines de zinc A<sub>3</sub>B

La composition de chaque phtalocyanine est déterminée en XPS (Tableau 67). Les éléments provenant des phtalocyanines sont identifiés tels que le carbone, l'oxygène, l'azote ou le zinc. Le silicium est une impureté qui provient de l'étape de purification des phtalocyanines lors du passage sur gel de silice. L'iode est le contre ion des groupements pyridinium de la phtalocyanine hydrosoluble (ZnPc – C ≡ C (hydro)). Les concentrations atomiques mesurées sont proche des concentrations atomiques calculées. Cependant, la concentration atomique mesurée en oxygène est très élevée pour les quatre phtalocyanines ce qui indique la présence d'une impureté (SiO<sub>2</sub>, ...) même si en XPS, la concentration atomique en oxygène est toujours surexprimée.

		Concentration atomique (%)					
		C 1s	O 1s	N 1s	Zn 2p3	I 3d5	Si 2p
ZnPc – NH <sub>2</sub>	mesurée	71	11	12	3	-	3
	théorique	78	1	19	2	-	-
ZnPc – COOH	mesurée	75	11	11	2	-	1
	théorique	77	3	17	2	-	-
ZnPc – C ≡ C	mesurée	78	6	13	2	-	1
	théorique	79	1	18	2	-	-
ZnPc – C ≡ C (hydro)	mesurée	70	12	11	2	3	2
	théorique	78	1	17	2	3	-

Tableau 67. Analyse XPS : Concentrations atomiques mesurées et théoriques des différentes phtalocyanines

La molécule ZnPc a une structure plane incluant deux types de carbone : les carbones aromatiques des cycles de benzène (C1) et les carbones des pyrroles (C2) liés avec les atomes d'azote, comme indiqué dans l'encart de la Figure 185. Ainsi en XPS, les niveaux C1s des phtalocyanines se composent de deux contributions principales (Figure 185).

La première contribution est celle des cycles benzène (C1) qui peut être partagée en deux composantes (C1a et C1b) à 284,5 eV ( $\underline{C} = C - C$ ) et à 285,8 eV ( $\underline{C} = C - N$ ). Cette première contribution est liée au pic satellite (S1) à 289,2 eV correspondant aux transitions d'électrons  $\pi \rightarrow \pi^*$  des cycles du benzène vers des orbitales moléculaires de plus hautes énergies.

La deuxième contribution est celle des carbones des pyrroles (C2) à 287,8 eV liée aux pics satellites (S2) à 291,6 eV (Cossaro *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2005).

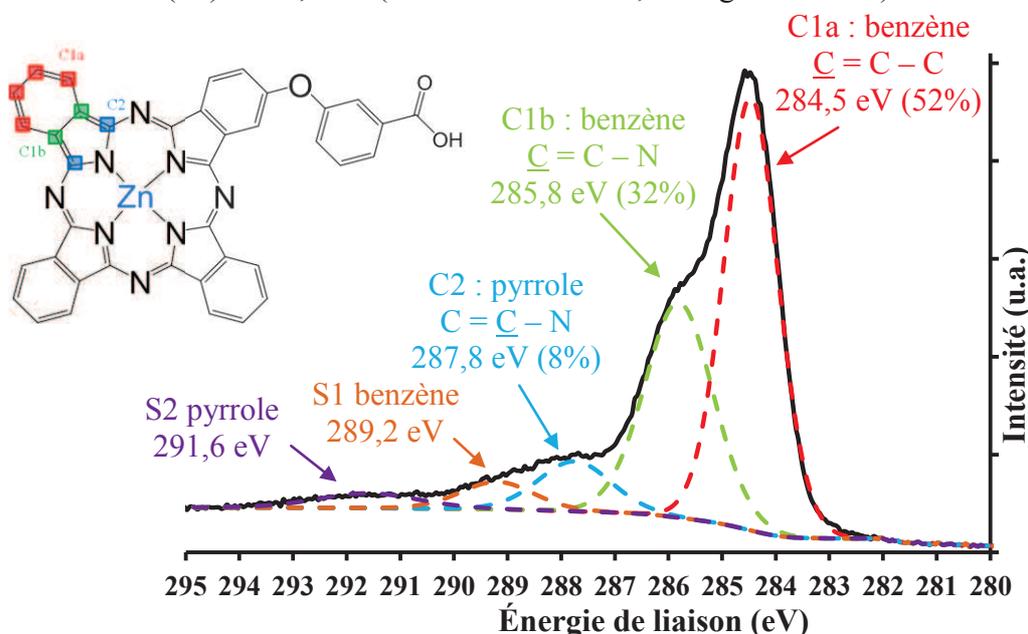


Figure 185. Analyse XPS : Décomposition du niveau C1s de la ZnPc – COOH

D'ailleurs, le niveau N1s des phtalocyanines est aussi très spécifique avec quatre composantes. La première est la plus intéressante car elle possède une largeur à mi-hauteur caractéristique d'une valeur de 1,2 eV et une position caractéristique à 398,5 eV. Cependant,

il est trop difficile de faire correspondre les types de liaisons aux composantes. Même si il existe seulement deux environnements chimiques pour l'azote qui correspondrait aux composantes à 398,5 eV et à 400,4 eV. Les deux autres composantes sont des pics satellites liés aux deux premières composantes et représentent les transitions  $\pi \rightarrow \pi^*$  des cycles d'azote (Figure 186).

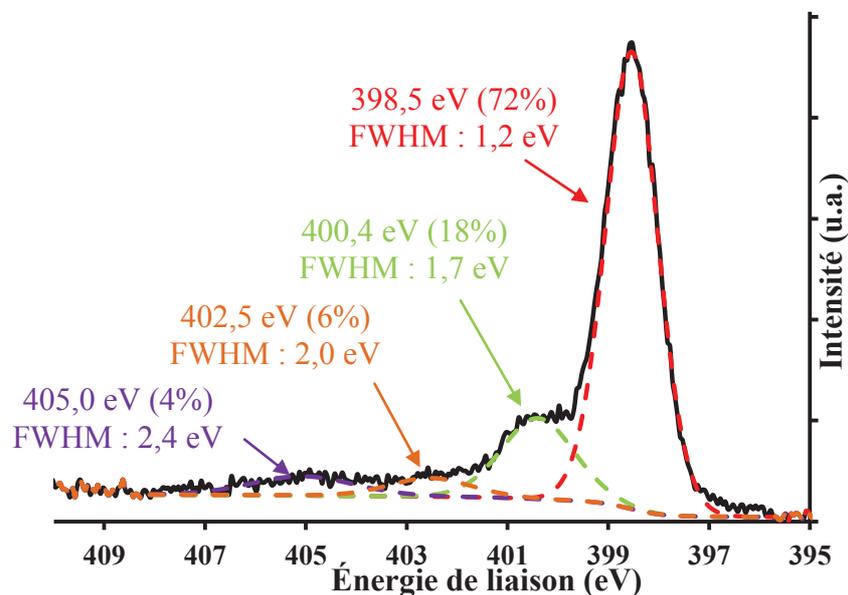


Figure 186. Analyse XPS : Décomposition du Niveau N1s de la ZnPc – COOH

Par ailleurs, les phtalocyanines ont un spectre d'absorption spécifique (Figure 187) avec une bande d'absorption vers 340 nm (bande de Soret), des pics plus faibles vers 610 nm et 635 nm, une bande d'absorption maximale à environ 673 nm (bandes Q). Ces bandes Q dépendent de la substitution de la Pc et leur position varie entre 600 et 800 nm (Wróbel *et al.* 2002). Par exemple, des groupements pyridinium peuvent être substitués pour augmenter la solubilité de la phtalocyanine alcyne dans l'eau et modifier légèrement ces propriétés.

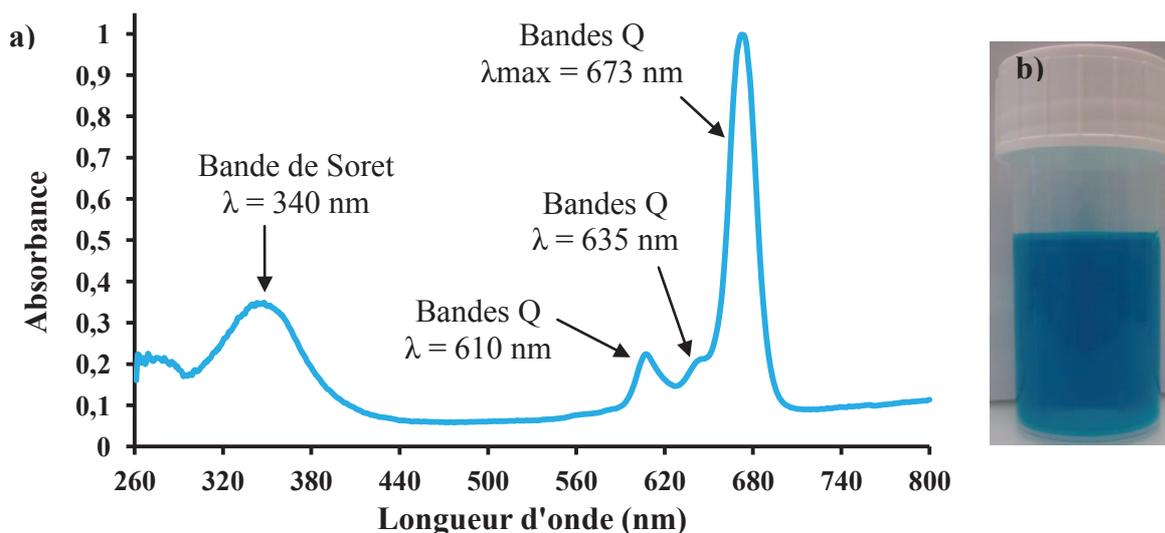


Figure 187. a) Spectres d'absorption dans le DMSO de la phtalocyanine alcyne  
b) Solution de ZnPc dans le DMSO

D'ailleurs, le spectre d'émission de fluorescence est aussi très particulier (Figure 188). Il est composé de trois bandes. Une bande d'émission maximale à 673 nm qui émet donc dans la fenêtre optique idéale pour l'imagerie optique *in vivo* (Figure 180). Les deux autres bandes à 705 nm et 745 nm sont moins intense mais émettent aussi dans cette fenêtre optique.

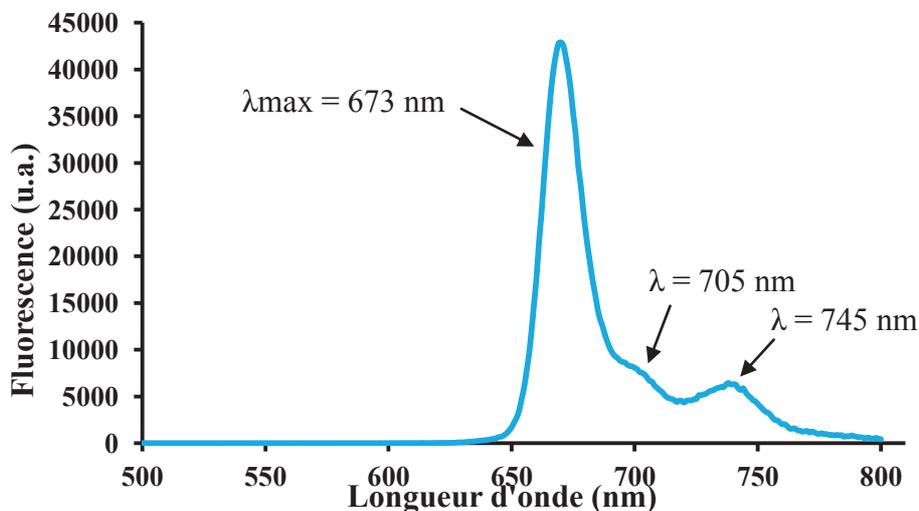


Figure 188. Spectres d'émission dans le DMSO de la phtalocyanine alcyne

Les phtalocyanines de zinc A<sub>3</sub>B étant structurellement très proches de la phtalocyanine A<sub>4</sub> alors elles possèdent les mêmes propriétés optiques que la phtalocyanine de zinc A<sub>4</sub> comme la longueur d'onde maximale d'adsorption et d'émission (Tableau 68).

	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	$\Phi_F$	$\Phi_{\Delta}$	$\epsilon$ ( $10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	B (u.a.)
ZnPc A <sub>4</sub>	673	673	0,3	0,5	2	60000

Tableau 68. Caractéristiques de la phtalocyanine de zinc A<sub>4</sub>. Les mesures ont été effectuées dans du DMSO.

Par ailleurs, dans le DMSO, toutes les phtalocyanines substituées sont solubles et stables en solution. En revanche, certaines phtalocyanines sont moins solubles et moins stables dans l'eau (Figure 189). La solubilité des phtalocyanines ainsi que leur propriétés vont dépendre du solvant et des groupements substituants (Ogunsipe *et al.* 2003; Ogunsipe *et al.* 2004b; Ghani *et al.* 2012).

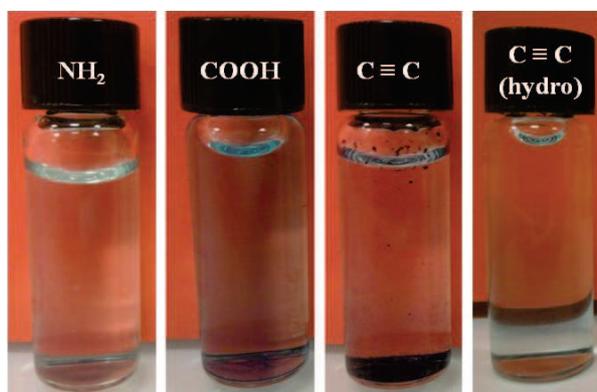


Figure 189. Photographie des solutions des différentes phtalocyanines dans l'eau

En effet, l'expérience ci-dessus met en évidence une différence de solubilité des ZnPc en fonction du groupement substituant. Par exemple, la ZnPc – NH<sub>2</sub> reste soluble dans l'eau et ne décantent pas alors que la ZnPc – COOH ou C ≡ C sont moins solubles et finissent par décantent. En revanche, la phtalocyanine alcyne substituée par les groupements pyridinium est davantage soluble dans l'eau par rapport à la phtalocyanine alcyne non substituée. Cela est dû aux groupements pyridinium plus polaires qui augmentent la solubilité de la phtalocyanine dans l'eau.

Ce manque de solubilité est aussi observé sur les spectres UV – Visible des phtalocyanines dans l'eau qui est différent de celui dans le DMSO (Figure 187). Ce phénomène résulte de l'agrégation des phtalocyanines (oligomères) et donc de l'empilement des phtalocyanines. En UV – Visible, cet effet se traduit par des pics plus larges et moins intenses des bandes Q ou de Soret (Figure 190).

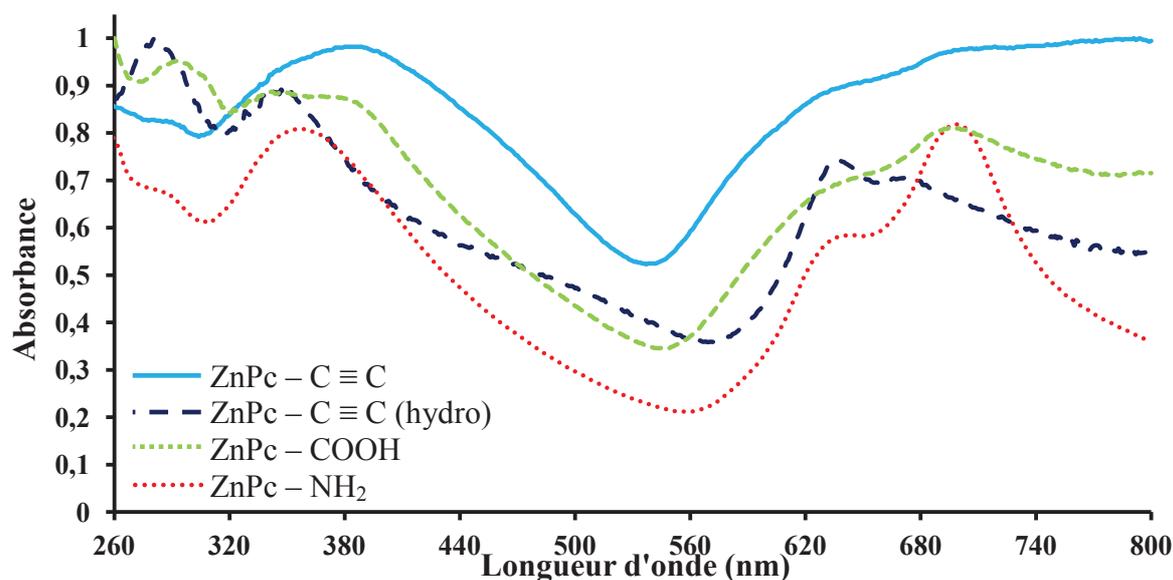


Figure 190. Spectres d'absorption des différentes phtalocyanines dans l'eau

#### II.1.4 - Les nanohybrides à base de phtalocyanines dans la littérature

Dans la littérature, il existe différentes possibilités pour immobiliser les phtalocyanines sur un substrat (Figure 191) comme l'encapsulation (Fu *et al.* 2002) ou par interaction électrostatique (Li *et al.* 2011). Les phtalocyanines sont rarement utilisées avec les nanoparticules. Cependant, le greffage covalent (Kim *et al.* 2009) ou l'adsorption (Silva *et al.* 2002) de phtalocyanines de zinc sur les nanoparticules d'oxydes de fer ou avec des nanoparticules d'or (Camerin *et al.* 2010; Stuchinskaya *et al.* 2011) a été déjà réalisé.

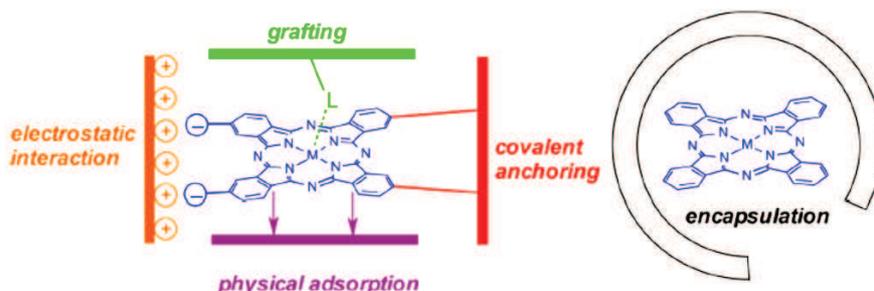


Figure 191. Les différentes possibilités pour immobiliser les phtalocyanines d'après (Sorokin 2013)

En revanche, les nanotubes de titanate ont déjà été fonctionnalisés par des phtalocyanines de zinc pour améliorer les propriétés photocatalytiques des nanotubes (Li *et al.* 2011) ou par des phtalocyanines de cuivre pour augmenter les propriétés photophysiques (Alves *et al.* 2011). Cependant, aucun travail n'a encore été effectué sur la conception de nanohybride TiONts – ZnPc pour des applications en biologie.

De plus, les porphyrines sont déjà utilisées en biologie pour la thérapie anticancéreuse et sont greffés aux nanoparticules d'oxydes de fer pour en faire des agents de thérapie bimodale hyperthermie/PDT (Gu *et al.* 2005; Carvalho *et al.* 2010).

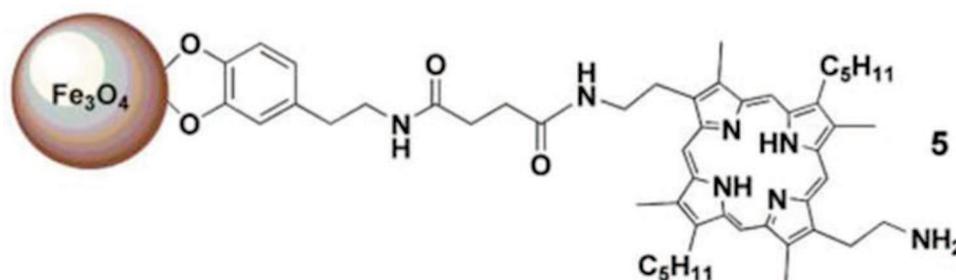


Figure 192. Représentation schématique des nanoparticules d'oxydes de fer fonctionnalisées par des porphyrines

Cependant, les nanoparticules fonctionnalisées par les porphyrines n'émettent pas dans la fenêtre optique idéale (650 nm – 1400 nm) pour l'imagerie optique *in vivo* car le greffage a pour effet de diminuer la longueur d'onde d'émission (Figure 193).

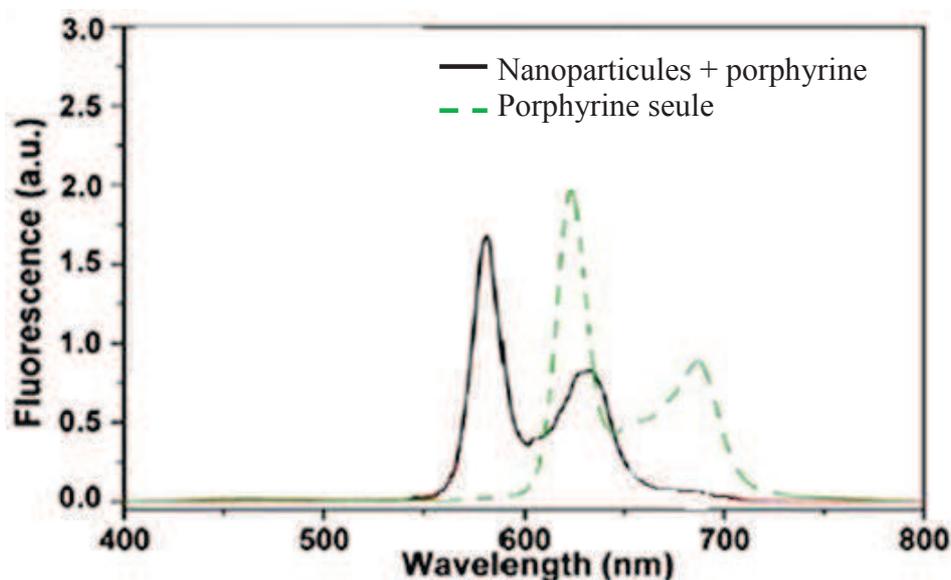


Figure 193. Spectres d'émission de fluorescence d'après (Gu *et al.* 2005)

Contrairement aux porphyrines, le greffage de phtalocyanines à la surface des nanoparticules n'a pas pour effet de diminuer la longueur d'onde d'émission pour des nanoparticules et des linkers identiques. Ainsi, les phtalocyanines sont d'excellents candidats pour être greffés aux nanoparticules d'oxydes de fer ou aux nanotubes de titanate.

### III. Fonctionnalisation des nanotubes de titanate par les phtalocyanines de zinc

Diverses possibilités de fonctionnalisation sont envisageables avec les différentes phtalocyanines et les nanoparticules modifiées par le PHA (COOH) ou l'APTES (NH<sub>2</sub>). Tout d'abord, le greffage entre les fonctions COOH et NH<sub>2</sub> est envisageable : il s'agit de la voie peptidique. Ensuite, une autre possibilité pour greffer les phtalocyanines sur les nanoparticules est la voie par chimie clic qui utilise la phtalocyanine alcyne pour réaliser une réaction de chimie clic. Ce qui signifie qu'il faut alors introduire une nouvelle fonction réactive : une fonction azote.

#### III.1 - Fonctionnalisation des nanotubes par voie peptidique

La voie peptidique nécessite l'utilisation des phtalocyanines aminées ou carboxyliques avec les nanotubes carboxyliques ou aminés respectivement.

##### III.1.1 - Protocole de greffage des phtalocyanines sur les nanotubes de titanate

50 mg de TiONts modifiés sont mélangés avec 100 mg de phtalocyanine A<sub>4</sub> et A<sub>3</sub>B dans 20 mL de DMSO en présence de DCC<sup>17</sup>/NHS. Le mélange est homogénéisé aux ultrasons puis placé sous agitation magnétique (400 trs/min) pendant 48 heures sous atmosphère inerte N<sub>2</sub>.

Ensuite, les nanoparticules sont lavées par plusieurs cycles d'ultrafiltration (de taille de pores de 30 kDa) pour éliminer les agents de couplage, la phtalocyanine A<sub>4</sub> et la phtalocyanine A<sub>3</sub>B qui n'a pas réagi (Figure 194) :

- par cycles de 100 mL de DMSO, jusqu'à disparition de la couleur du surnageant ;
- par cycles de 5 × 100 mL d'éthanol/H<sub>2</sub>O ;
- par cycles de 3 × 100 mL d'eau ultra pure.



Figure 194. Photographie du montage d'ultrafiltration en cours de lavage du nanohybride TiONts – Pc peptidique

Les composés fabriqués par cette voie seront notés **TiONts – PcCOOH** et **TiONts – PcNH<sub>2</sub>** dans la suite pour nommer respectivement les nanotubes aminés fonctionnalisés par la ZnPc – COOH et les nanotubes carboxyliques fonctionnalisés par la ZnPc – NH<sub>2</sub>.

<sup>17</sup> DCC : N,N'-dicyclohexylcarbodiimide

III.1.2 - Greffage ou adsorption des phtalocyanines à la surface des nanotubes ?

III.1.2.1 - Mise en évidence des phtalocyanines par UV - Visible

Les nanotubes fonctionnalisés par les phtalocyanines ont été caractérisés en tout premier lieu par UV – Visible pour mettre en évidence le fluorophore (Figure 195). Dans l'eau, les bandes Q des deux échantillons sont écrasées et plus larges traduisant une agrégation des phtalocyanines. Visuellement, cet effet est remarqué sur le composé TiONts – PcCOOH (Figure 195). La bande d'absorption des TiONts est présente à 290 nm.

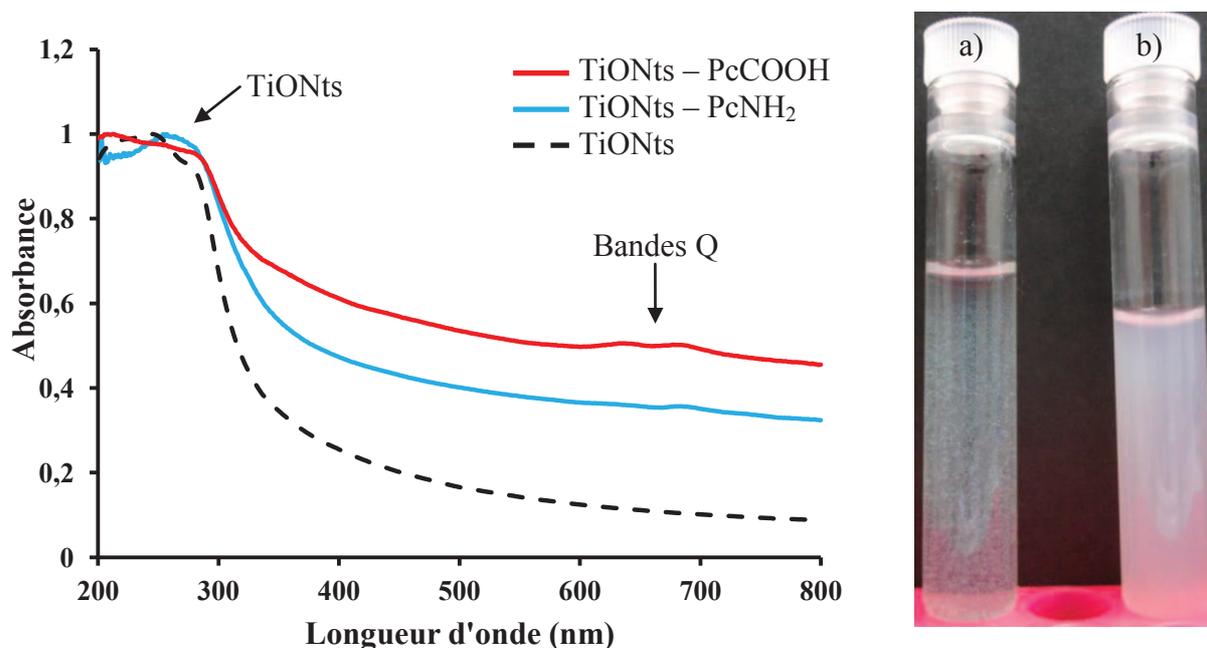


Figure 195. A gauche, : Spectres d'absorption des composés TiONts, TiONts – Pc synthétisés par voie peptidique dans l'eau et à droite, photographie des suspensions des nanohybrides dans l'eau a) TiONts – PcCOOH ; b) TiONts – PcNH<sub>2</sub>

En revanche, dans le DMSO, les bandes Q de la phtalocyanine (Figure 187) sont visibles, soulignant la présence de celles-ci à la surface des nanotubes (Figure 196).

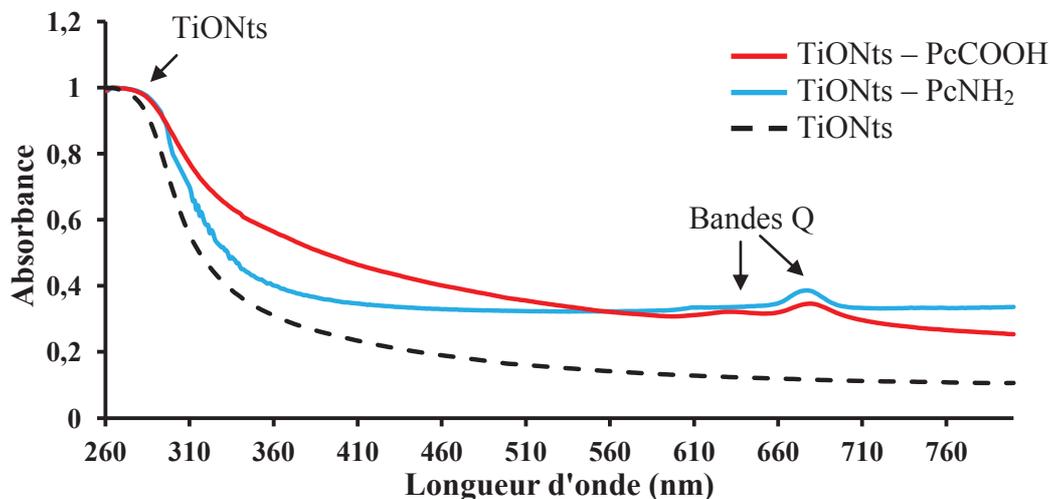


Figure 196. UV- Visible : Spectres d'absorption dans le DMSO des composés TiONts, TiONts – Pc synthétisés par voie peptidique

L'agrandissement de la zone entre 500 et 800 nm montre des signaux qui correspondent aux bandes Q de la phtalocyanines (Figure 197). Les bandes d'adsorption sont légèrement décalées par rapport à la bande d'adsorption maximale de la phtalocyanine de zinc seule dans le DMSO ( $\lambda = 673$  nm). La longueur de la chaîne carbonée du ligand est plus grande dans le cas du PHA

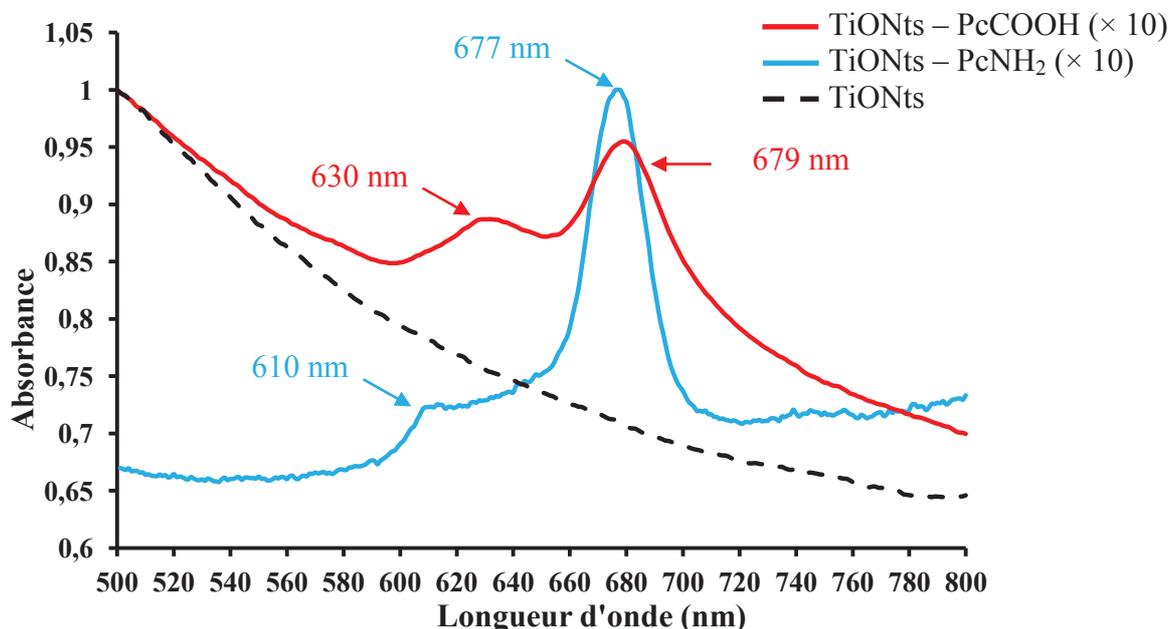


Figure 197. UV – Visible : Spectres d'adsorption dans le DMSO dans la zone 500 – 800 nm pour les composés fonctionnalisés par la phtalocyanines

### III.1.2.2 - Analyse des nanotubes fonctionnalisés par voie peptidique

Pour corrélérer ces résultats, une analyse de surface des nanohybrides est effectuée par XPS. Les éléments comme le carbone, l'azote ou le zinc appartenant aux phtalocyanines sont retrouvés à la surface des nanotubes. De plus, la diminution de la concentration en titane plus prononcée dans le cas des TiONts – PcCOOH et la faible concentration en zinc indiquent que les phtalocyanines sont bien en plus grande proportions dans le cas du nanohybride TiONts – PcCOOH. Par contre, l'analyse XPS ne met pas en évidence la liaison entre les deux éléments mais suggère bien la présence de phtalocyanines de zinc à la surface des nanotubes dans les deux cas (Tableau 69).

Synthèse	Concentration atomique (%)							
	Ti 2p	O 1s	C 1s	Na KLL	N 1s	Si 2p	P 2p	Zn 2p3
<b>TiONts</b>	21	59	6	14	-	-	-	-
<b>TiONts – NH<sub>2</sub></b>	19	54	13	8	3	3	-	-
<b>TiONts – PcCOOH</b>	6	49	28	3	5	9	-	0,2

<b>TiONts</b>	21	59	6	14	-	-	-	-
<b>TiONts – COOH</b>	21	59	16	3	-	-	1	-
<b>TiONts – PcNH<sub>2</sub></b>	17	55	18	2	3	4	1	-

Tableau 69. Analyse XPS : Concentrations atomiques des espèces à la surface des nanotubes fonctionnalisés par voie peptidique

Les niveaux 1s du carbone et de l'azote sont décomposés (Figure 198). Pour les composés TiONts – PcCOOH, la présence de phtalocyanines est mise en évidence par l'apparition d'une nouvelle composante au niveau 1s du carbone à 287,8 eV correspondant aux liaisons des carbones des pyrroles (C2). Les deux autres composantes sont dues à la contribution des amines des TiONts – NH<sub>2</sub> à 286 eV et aux liaisons  $\underline{\text{C}} - \text{C}/\underline{\text{C}} - \text{H}$  à 284,5 eV mais aussi aux liaisons des benzènes C1a et C1b (Figure 185). Au niveau 1s de l'azote, l'apparition de la composante des phtalocyanines à 398,3 eV (possèdent une largeur à mi-hauteur particulière, FWHM = 1,2 eV) prouvent leur présence sur les nanotubes. Les deux autres composantes sont dues aux amines des TiONts – NH<sub>2</sub>.

Dans le cas du nanohybride TiONts – PcNH<sub>2</sub>, la composante C1b du benzène est visible à 285,9 eV prouvant la présence de phtalocyanines à la surface. Les deux autres composantes proviennent des liaisons de l'acide carboxylique à 288,6 eV et des liaisons carbonées  $\underline{\text{C}} - \text{C}/\underline{\text{C}} - \text{H}$  à 284,5 eV des TiONts – COOH. Les carbones benzènes de la phtalocyanine apportent leur contribution en augmentant la proportion de la composante à 284,5 eV. De plus, la composante caractéristique des phtalocyanine à 398,3 eV possédant une largeur à mi-hauteur caractéristique est présente (Rouxhet *et al.* 2011).

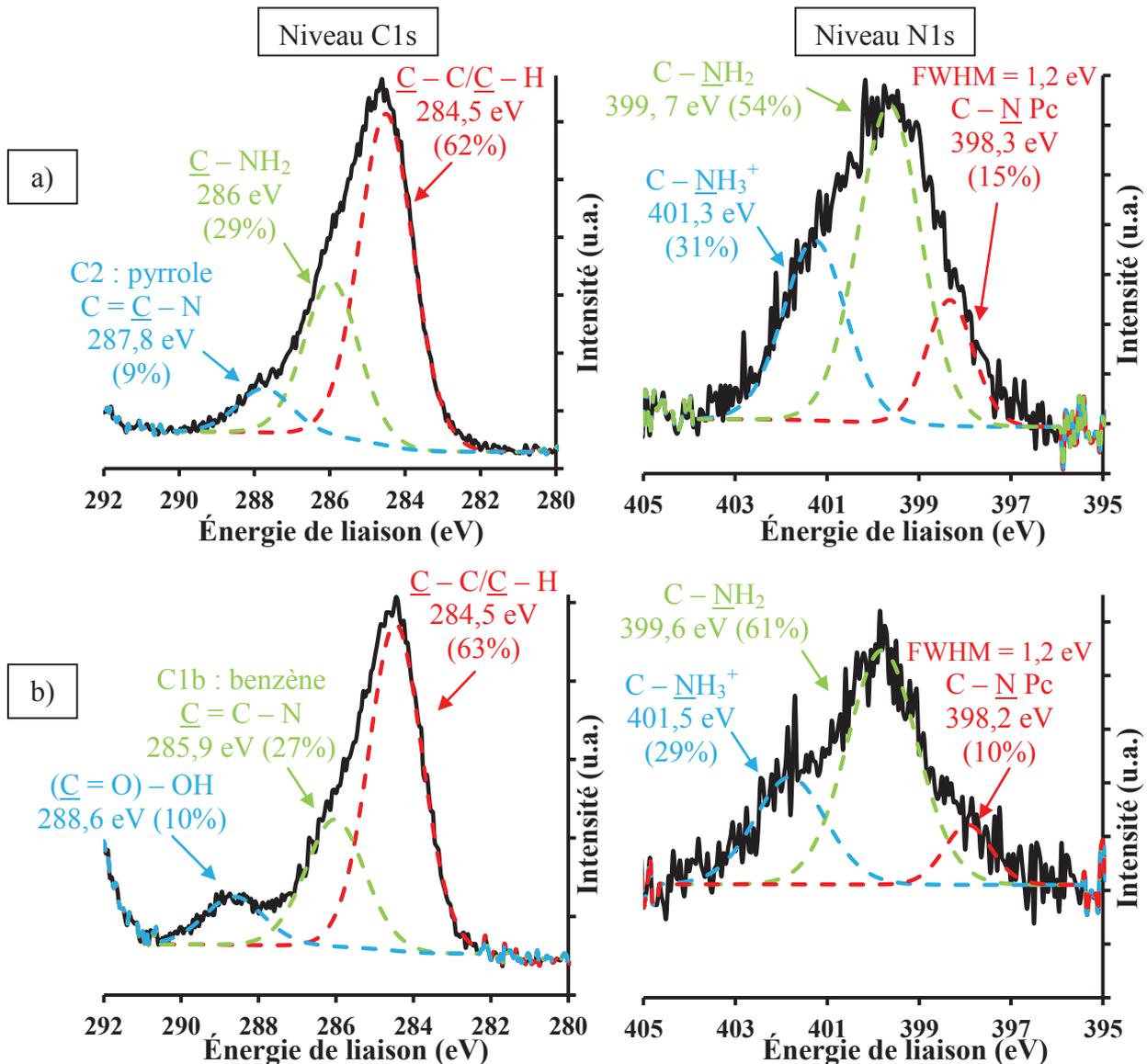


Figure 198. Analyse XPS : Décomposition des niveaux C1s et N1s des nanohybrides  
a) TiONts – PcCOOH et b) TiONts – PcNH<sub>2</sub>

L'analyse en spectroscopie infrarouge ne permet pas dans le cas des TiONts – Pc de mettre en évidence la liaison amide ( $\nu = 1700 \text{ cm}^{-1}$ ) car comme pour le greffage du DOTA sur les nanotubes, la déformation des hydroxyles de surface à  $1650 \text{ cm}^{-1}$  masque la possible présence de la bande de vibration due à la liaison amide.

### III.1.2.3 - Test à blanc : greffage des phtalocyanines sans agents de couplage

La présence de phtalocyanines à la surface des nanotubes après purification a été mise en évidence par les différentes techniques d'analyses physico-chimiques. Cependant, aucune n'a prouvé que les phtalocyanines aient été greffées à la surface des nanotubes. Ainsi, un test de greffage entre TiONts –  $\text{NH}_2$  et  $\text{ZnPc} - \text{COOH}$  a été effectué dans les mêmes conditions mais sans agents de couplage (DCC/NHS) pour savoir si les phtalocyanines peuvent s'adsorber sur les nanotubes aminés.

Après purification par ultrafiltration, la suspension est analysée en UV – Visible et ne met en évidence aucun pic caractéristique des phtalocyanines dans le DMSO. Ce qui prouve qu'aucune phtalocyanine ne s'adsorbe à la surface des nanotubes aminés (Figure 199). De plus, par un contrôle visuel, la suspension après greffage sans agents de couplage n'est pas colorée en bleu phtalocyanine (Figure 200). Elle a gardé la couleur blanche des nanotubes de départ. Par conséquent, il est fortement probable qu'il y a création d'une liaison amide entre les nanotubes et les phtalocyanine, liaison qui n'a malheureusement pas pu être mise en évidence par les différentes techniques d'analyses employées.

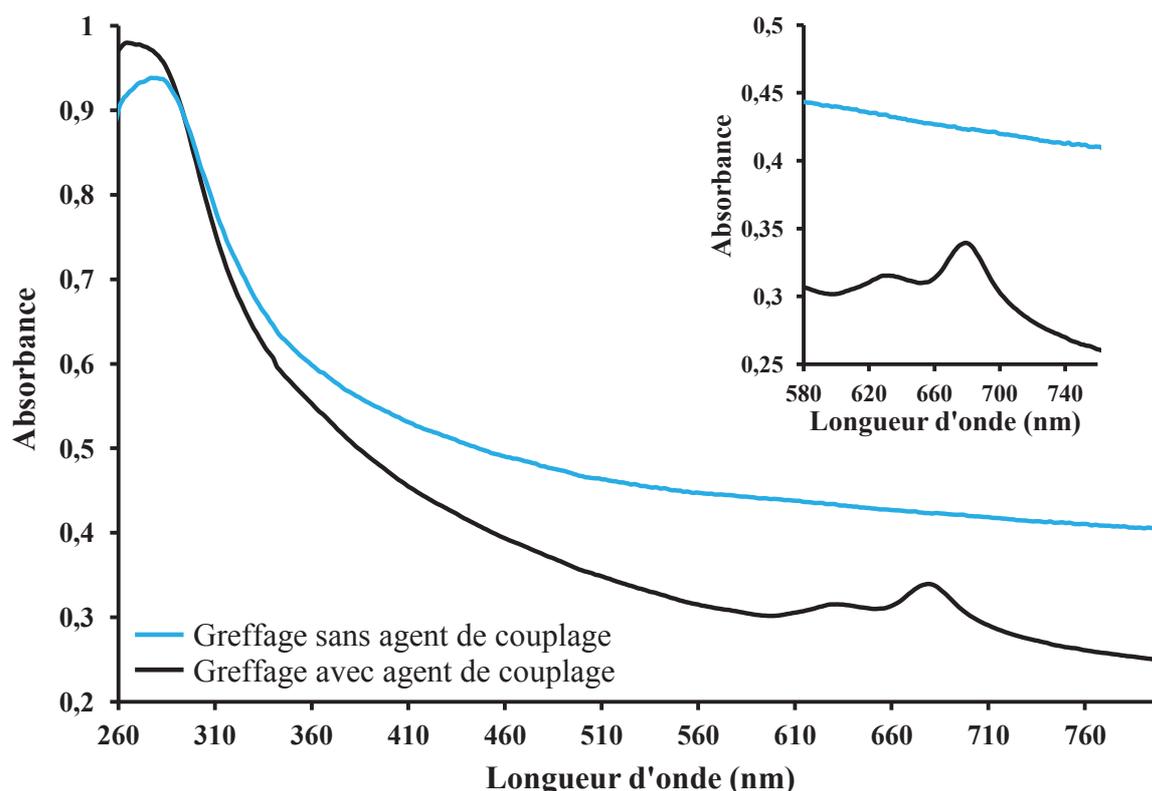


Figure 199. Spectres d'absorption : comparaison d'un greffage de phtalocyanines par voie peptidique avec et sans agents de couplage (DCC/NHS) dans le DMSO.

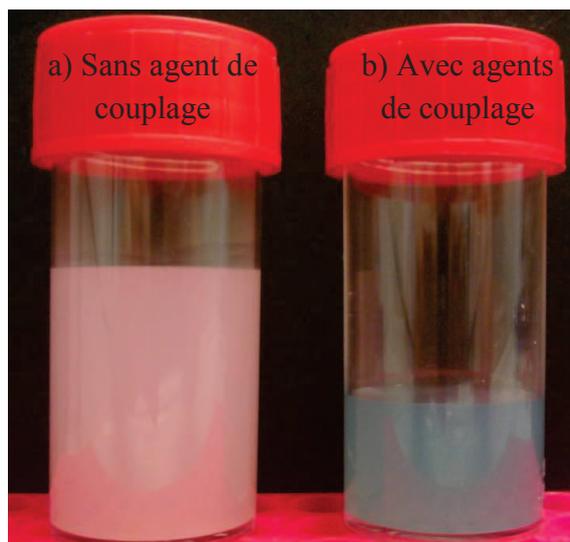


Figure 200. Photographie des suspensions après greffage a) sans agent de couplage et b) avec agents de couplage

### III.1.3 - Estimation du taux de greffage des phtalocyanines à la surface des nanotubes

Comme aucune phtalocyanine ne s'adsorbe à la surface des nanotubes, celles-ci ne peuvent être que greffées. Ainsi, pour estimer le taux de greffage des phtalocyanines sur les nanotubes une analyse thermogravimétrique est réalisée de 30°C à 800°C (Figure 201).

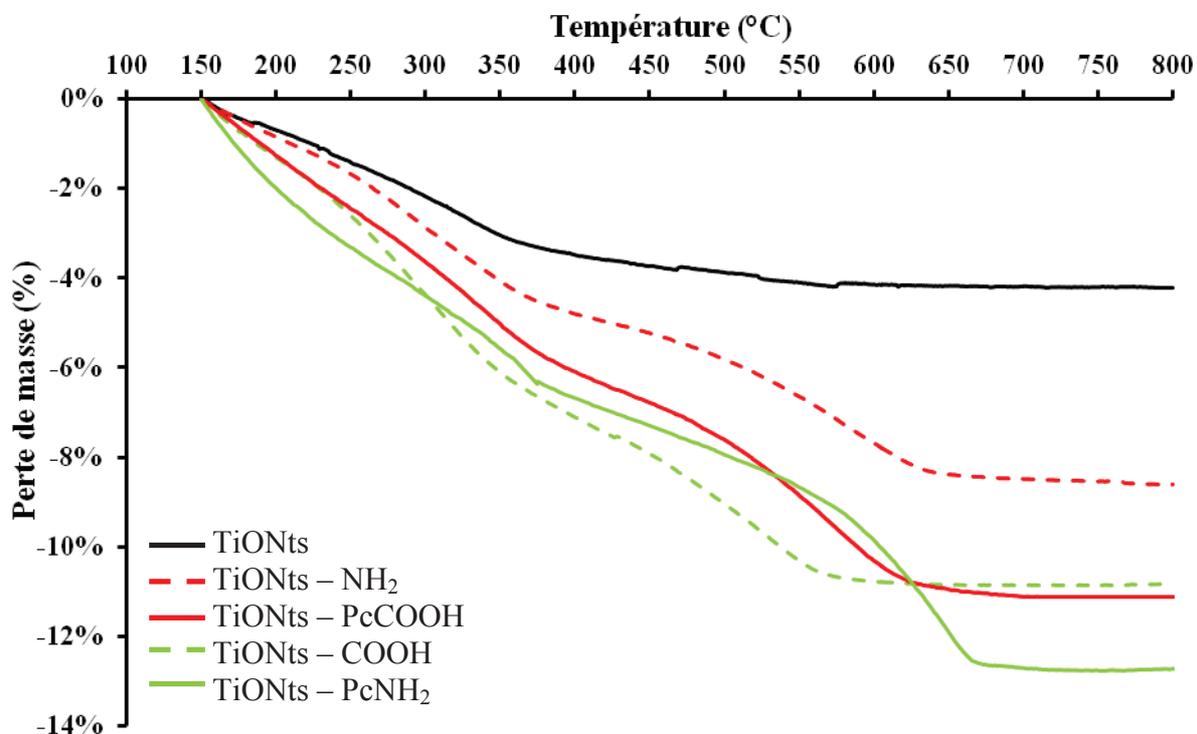


Figure 201. ATG des nanohybrides TiONts – PcCOOH et TiONts –PcNH<sub>2</sub> par voie peptidique. Les mesures ont été réalisées sous flux de N<sub>2</sub> (25 mL.min<sup>-1</sup>) avec une rampe de montée en température de 5°C.min<sup>-1</sup>. Les courbes ont été normalisées à 150°C (annexe n°3) et sont représentatives d'un échantillon.

En considérant la perte de masse des nanohybrides entre 150 et 800°C exclusivement due à la partie organique et en retranchant la perte de masse des nanoparticules préfonctionnalisées (TiONts – NH<sub>2</sub> ou TiONts – COOH), le taux de phtalocyanines peut être estimé grâce à l'équation 3 (annexe n°3) avec une surface spécifique de  $(163 \pm 23) \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  (Tableau 70). Ainsi, le taux de phtalocyanines calculé est de l'ordre de 0,1 Pc/nm<sup>2</sup>.

	$\Delta m$ totale (%)	$\Delta m$ calcul (%)	Masse molaire considérée (g.mol <sup>-1</sup> )	molécules/nm <sup>2</sup>	R (%)	n
TiONts	3,8	3,8	18	(6 ± 4) OH	-	12
TiONts – NH <sub>2</sub>	8	8	58	(5,7 ± 0,8) NH <sub>2</sub>	95	17
TiONts - PcCOOH	11,12	3,12	714,02	(0,15 ± n.d.) Pc	3	1
TiONts – COOH	10,9	10,9	115	(3,1 ± 0,5) COOH	52	10
TiONts - PcNH <sub>2</sub>	12,78	1,88	685,03	(0,1 ± n.d.) Pc	3	1

Tableau 70. Estimation du taux de greffage des phtalocyanines à la surface des nanotubes synthétisés par voie peptidique. n.d. non déterminé car il n'y avait pas assez de valeurs pour être représentatif. R représente le rendement de greffage (%) et n le nombre d'échantillons analysés.

#### III.1.4 - Fluorescence des nanotubes fonctionnalisés par voie peptidique

Les nanotubes fonctionnalisés par les phtalocyanines sont analysés par spectroscopie d'émission de fluorescence pour déterminer leur longueur d'onde d'émission dans le DMSO. Les longueurs d'onde d'émissions maximales des deux nanohybrides sont très proches respectivement 685 nm et 687 nm pour le nanohybride TiONts –PcCOOH et pour le nanohybride TiONts –PcNH<sub>2</sub>. Donc, les nanohybrides émettent dans la fenêtre optique idéale pour l'imagerie *in vivo* (Figure 180) et les composés vont pouvoir être utilisés en imagerie optique.

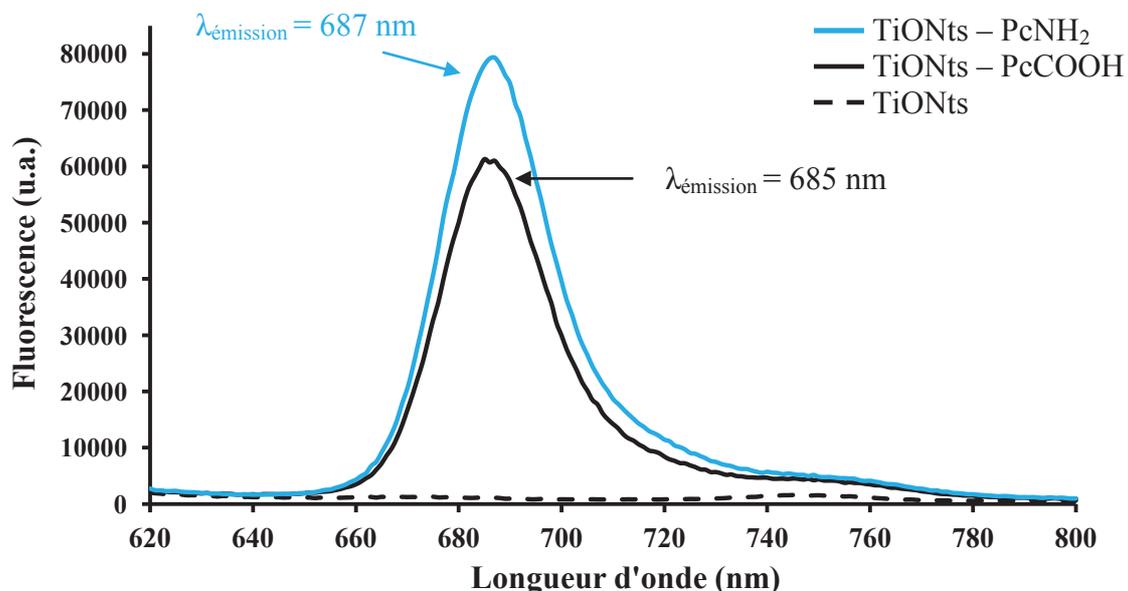


Figure 202. Spectre d'émission de fluorescence dans le DMSO des nanohybrides synthétisés par voie peptidique, excitation à 600 nm

### III.1.5 - Conclusion sur le greffage de phtalocyanines par voie peptidique

Par voie peptidique, les phtalocyanines (NH<sub>2</sub> ou COOH) sont greffées aux nanotubes préfonctionnalisés par l'APTES (pour les ZnPc COOH) et le PHA (pour les ZnPc NH<sub>2</sub>) dans le DMSO en présence de DCC et NHS. La présence de phtalocyanines a été mise en évidence par spectroscopie UV – Visible. Cette même technique indique que les phtalocyanines s'agrègent dans l'eau. A l'inverse dans le DMSO, les bandes Q sont visibles. Un test de greffage sans agents de couplage (DCC/NHS) a permis de mettre en avant qu'aucune adsorption des phtalocyanines n'est possible à la surface des nanotubes. Alors, le taux de greffage des phtalocyanines peut être estimé en ATG et est de l'ordre de 0,1 Pc/nm<sup>2</sup>. De plus, les nanotubes fonctionnalisés par les phtalocyanines émettent de la fluorescence vers 680 nm, une longueur d'onde comprise dans la fenêtre optique idéale (600 – 1400 nm) pour l'imagerie *in vivo* (Pansare *et al.* 2012).

## III.2 - Fonctionnalisation des nanotubes par chimie clic

### III.2.1 - Qu'est que la chimie clic ?

L'exemple le plus rencontré de chimie clic dans la littérature est la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre un alcyne et un azoture catalysée par le cuivre, conduisant à la formation d'un 1,2,3-triazole (Figure 203). C'est avec la découverte simultanée en 2002 de l'utilisation du cuivre au degré d'oxydation (I) comme catalyseur de cette cycloaddition-1,3 par les équipes de Sharpless (Rostovtsev *et al.* 2002) et de Meldal (Tornøe *et al.* 2002), que le potentiel de cette réaction s'est considérablement développé.

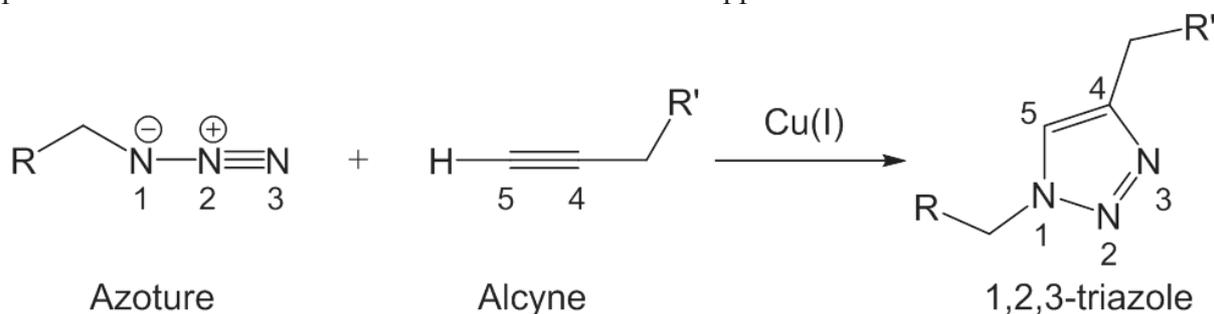


Figure 203. Représentation d'une réaction de chimie clic de Huisgen.

Ainsi, cette voie nécessite de modifier les nanoparticules préfonctionnalisées (NH<sub>2</sub>, COOH) pour obtenir un azoture à la surface des nanotubes car la chimie clic est une réaction entre un azoture et un alcyne (Ranjan *et al.* 2007; Balamurugan *et al.* 2009).

### III.2.2 - Préparation de la surface en vue de la chimie clic

#### III.2.2.1 - Les PEG – N<sub>3</sub> hétérobifonctionnels choisis

La fonctionnalisation des nanoparticules préalablement modifiées par l'APTES et le PHA est faite par un espaceur hétérobifonctionnel X – PEG – N<sub>3</sub> avec X = NH<sub>2</sub>, COOH (noté **PEG – N<sub>3</sub>**) qui pourra réagir avec les nanoparticules. L'utilisation d'un PEG – N<sub>3</sub> est nécessaire pour fonctionnaliser les deux types de nanoparticules préfonctionnalisées pour ensuite réaliser la chimie clic.

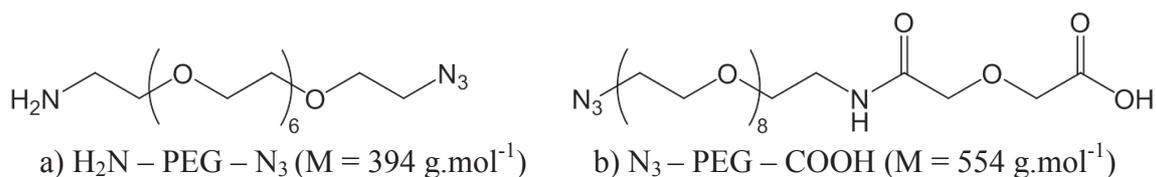


Figure 204. Formules semi – développées des PEG hétérobifonctionnel utilisés

Le PEG – N<sub>3</sub> a été caractérisé par spectroscopie FTIR et par XPS car le signal de l'azoture dans ces deux techniques est très particulier (Figure 205). En effet, en FTIR, la vibration de l'azoture se situe à 2110 cm<sup>-1</sup> (Martin *et al.* 2008; Yadav *et al.* 2011) et en XPS, le signal de l'azoture est constitué de trois composantes (Devadoss *et al.* 2007).

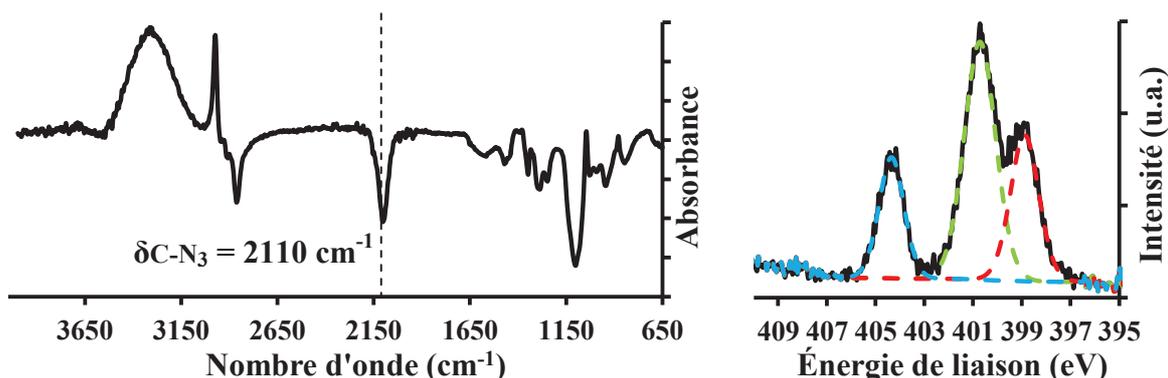


Figure 205. a) Spectre IR du COOH – PEG – N<sub>3</sub> obtenu par la technique ATR, enregistré en absorbance, b) Analyse XPS : décomposition de niveau N1s du COOH – PEG – N<sub>3</sub>

Ces deux signaux spécifiques vont permettre d'identifier l'azoture à la surface des nanotubes.

### III.2.2.2 - Protocole de greffage du PEG – N<sub>3</sub> à la surface des nanotubes modifiés

50 mg de nanotubes modifiés (NH<sub>2</sub> ou COOH) sont ajoutés en présence de NHS/EDC dans un mélange THF/H<sub>2</sub>O (75/25) à 50 µL de PEG – N<sub>3</sub>, le tout est homogénéisé aux ultrasons. Le mélange est ensuite placé sous agitation magnétique (400 tours/minute) pendant 48 heures sous atmosphère inerte N<sub>2</sub> à 21°C.

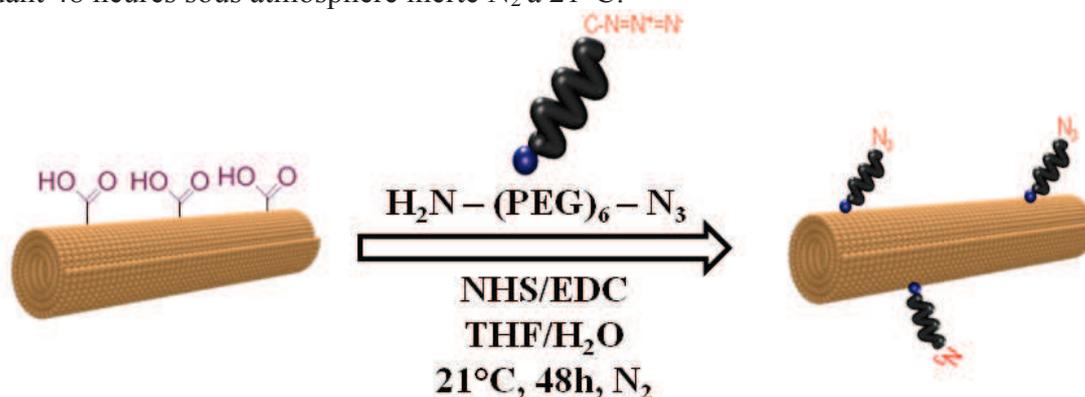


Figure 206. Représentation schématique du greffage du PEG – N<sub>3</sub> sur les nanotubes fonctionnalisés par le PHA (TiONts – COOH)

Le mélange est ensuite lavé par plusieurs cycles d'ultrafiltration (taille des pores : 30 kDa) à l'eau ultrapure pour éliminer les agents de couplage et le PEG - N<sub>3</sub> qui n'a pas réagi.

Les nanotubes modifiés par les deux PEG - N<sub>3</sub> seront notés dans la suite du manuscrit respectivement **TiONts(COOH) - N<sub>3</sub>** et **TiONts(NH<sub>2</sub>) - N<sub>3</sub>** pour les nanotubes carboxyliques fonctionnalisés par le polymère N<sub>3</sub> - PEG - NH<sub>2</sub> et les nanotubes aminés fonctionnalisés par le polymère N<sub>3</sub> - PEG - COOH.

### III.2.2.3 - Analyse des nanohybrides TiONts - N<sub>3</sub>

En premier lieu, les nanotubes modifiés par le PEG - N<sub>3</sub> ont été caractérisés par spectroscopie FTIR. Cette analyse a permis de mettre en évidence la présence de l'azoture à la surface des nanotubes dans les deux cas à 2110 cm<sup>-1</sup> (Figure 207).

De plus, par rapport aux nanotubes modifiés par l'APTES ou le PHA les seules différences sont dans l'apparition du mode de vibration de la liaison  $\nu_{N=N}$  à 1560 cm<sup>-1</sup> et l'augmentation du signal des modes de vibrations des liaisons C - H dans la zone 2800 - 2900 cm<sup>-1</sup>.

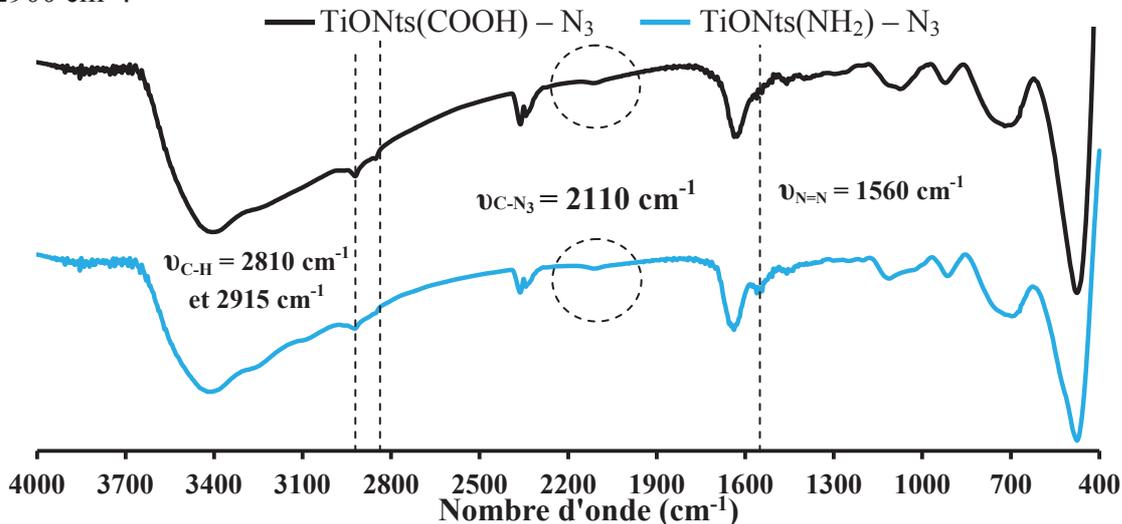


Figure 207. Spectres IR des nanotubes modifiés par le PEG - N<sub>3</sub>

L'agrandissement de la zone 2000 - 2200 cm<sup>-1</sup> des spectres IR des nanotubes modifiés par le PEG - N<sub>3</sub> confirme la présence de la raie caractéristique à 2110 cm<sup>-1</sup> (Figure 208).

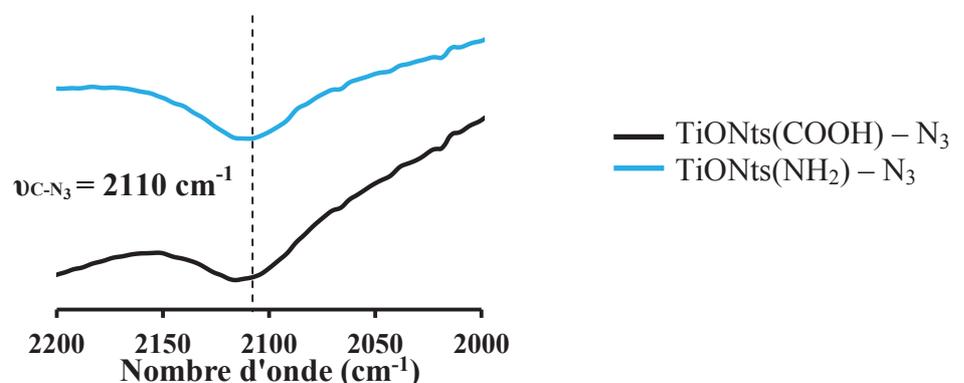


Figure 208. Agrandissement de la zone 2000 - 2200 cm<sup>-1</sup> des spectres IR des nanotubes fonctionnalisés par le PEG - N<sub>3</sub>

D'autre part, la présence du PEG – N<sub>3</sub> est aussi visible en XPS grâce à l'augmentation de la concentration du carbone et de l'azote. De plus, la diminution de la concentration en titane accrédite cette conclusion car cela souligne la présence d'une nouvelle couche à la surface des nanotubes (Tableau 71).

Synthèse	Concentration atomique (%)						
	Ti 2p	O 1s	C 1s	Na KLL	N 1s	Si 2p	P 2p
<b>TiONts</b>	21	59	6	14	-	-	-
<b>TiONts – NH<sub>2</sub></b>	19	54	13	8	3	3	-
<b>TiONts(NH<sub>2</sub>) – N<sub>3</sub></b>	16	49	23	4	6	2	-

<b>TiONts</b>	21	59	6	14	-	-	-
<b>TiONts – COOH</b>	21	59	16	3	-	-	1
<b>TiONts(COOH) – N<sub>3</sub></b>	19	53	22	1	4	-	1

Tableau 71. Analyse XPS : Concentration atomique des espèces présentes à la surface des nanotubes fonctionnalisés par les PEG – N<sub>3</sub>

La décomposition des niveaux C1s et N1s des nanotubes fonctionnalisés par le PEG – N<sub>3</sub> est effectuée pour connaître l'environnement chimique de ces deux éléments (Figure 209). Le signal spécifique du PEG – N<sub>3</sub> (Figure 205) n'est pas retrouvé lorsque celui-ci est greffé aux nanotubes.

Par contre, la contribution de la liaison amide (C = O) – NH – C est visible au niveau N1s à 399,8 eV dans le cas des composés TiONts(COOH) – N<sub>3</sub>. En revanche, la contribution des liaisons amides est confondue avec celle des liaisons amines dans le cas des composés TiONts(NH<sub>2</sub>) – N<sub>3</sub> mais avec une composante légèrement décalée à 399,6 eV qui laisse penser à une contribution des liaisons amides.

Cependant, au niveau du carbone pour les nanohybrides TiONts(NH<sub>2</sub>) – N<sub>3</sub>, la liaison amide est visible avec l'apparition d'une nouvelle composante (C = O) – NH – C à 287,8 eV mais qui peut être due aussi à celle déjà présente dans le HOOC – PEG – N<sub>3</sub> (Figure 204).

D'autre part, les composantes des liaisons habituelles des TiONts –NH<sub>2</sub> ou TiONts – COOH sont trouvées. De plus, la présence du PEG – N<sub>3</sub> est remarquée par l'augmentation de la composante à 286 eV correspondant aux liaisons C – O du PEG – N<sub>3</sub>.

Ainsi, la décomposition des niveaux C1s et N1s permet de conclure que le PEG – N<sub>3</sub> est greffé par liaison covalente *via* une fonction amide aux nanotubes grâce à l'apparition des composantes (C = O) – NH – C à 287,8 eV pour les TiONts(NH<sub>2</sub>) – N<sub>3</sub> et (C = O) – NH – C à 399,8 eV pour les TiONts(COOH) – N<sub>3</sub> (Rouxhet *et al.* 2011).

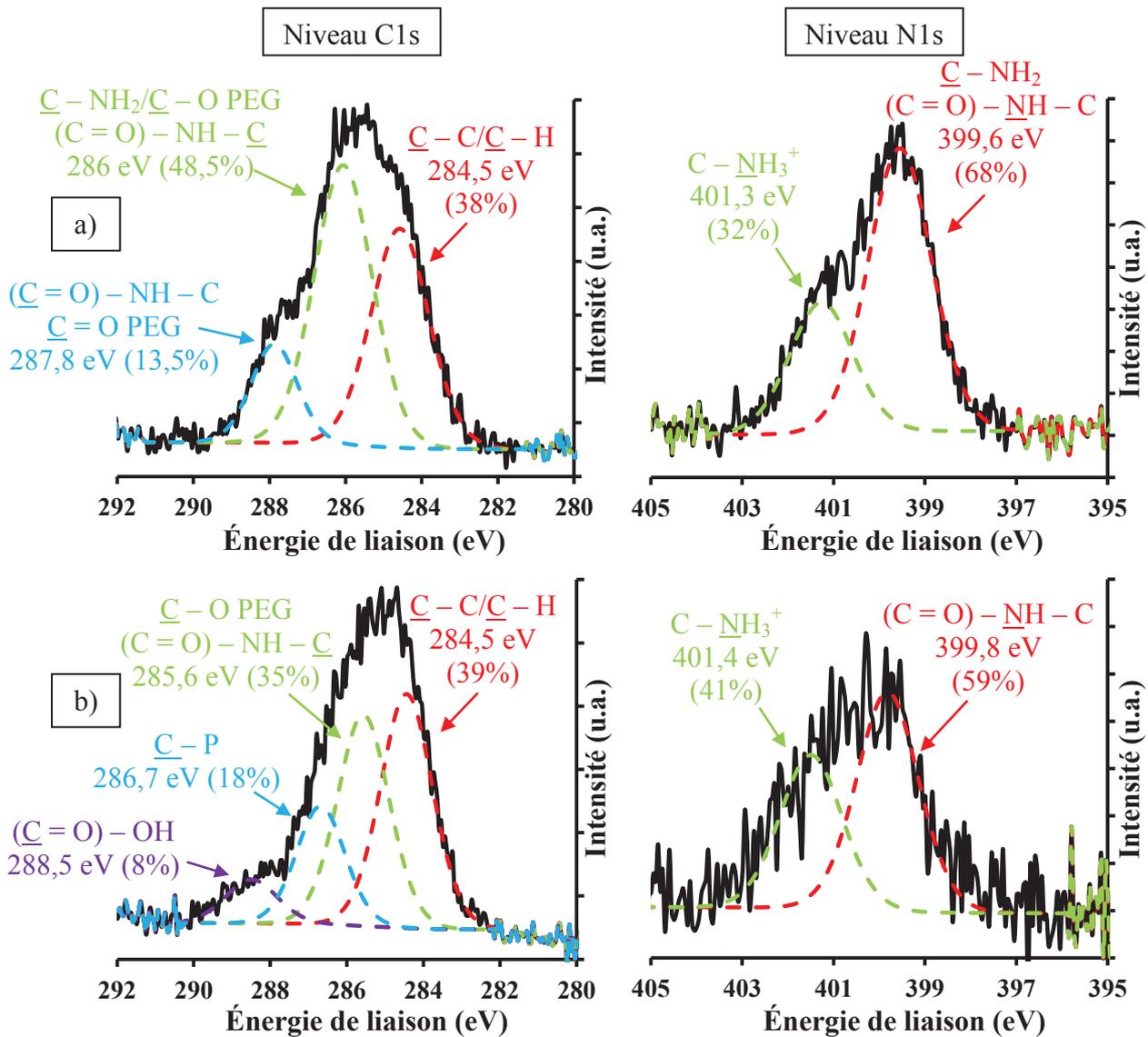


Figure 209. Analyse XPS : Décomposition des niveaux C1s et N1s des nanohybrides fonctionnalisés par le PEG - N<sub>3</sub> a)  $\text{TiONts}(\text{NH}_2) - \text{N}_3$  et b)  $\text{TiONts}(\text{COOH}) - \text{N}_3$

D'autre part, la modification du point isoélectrique déterminé par zétamétrie des nanotubes modifiés par le PEG - N<sub>3</sub> révèle la présence de ce PEG à la surface des nanotubes. Cette observation va dans le sens d'un greffage covalent entre les nanotubes et le PEG - N<sub>3</sub> puisque le PIE diminue dans le cas des  $\text{TiONts}(\text{NH}_2) - \text{N}_3$ , donc des amines sont consommées pour former une liaison amide et des acides carboxyliques dans les cas des  $\text{TiONts}(\text{COOH}) - \text{N}_3$ . De plus, un écrantage pour les deux approches des charges est observé confirmant la présence du PEG - N<sub>3</sub> sur la surface des nanotubes fonctionnalisés (Figure 210).

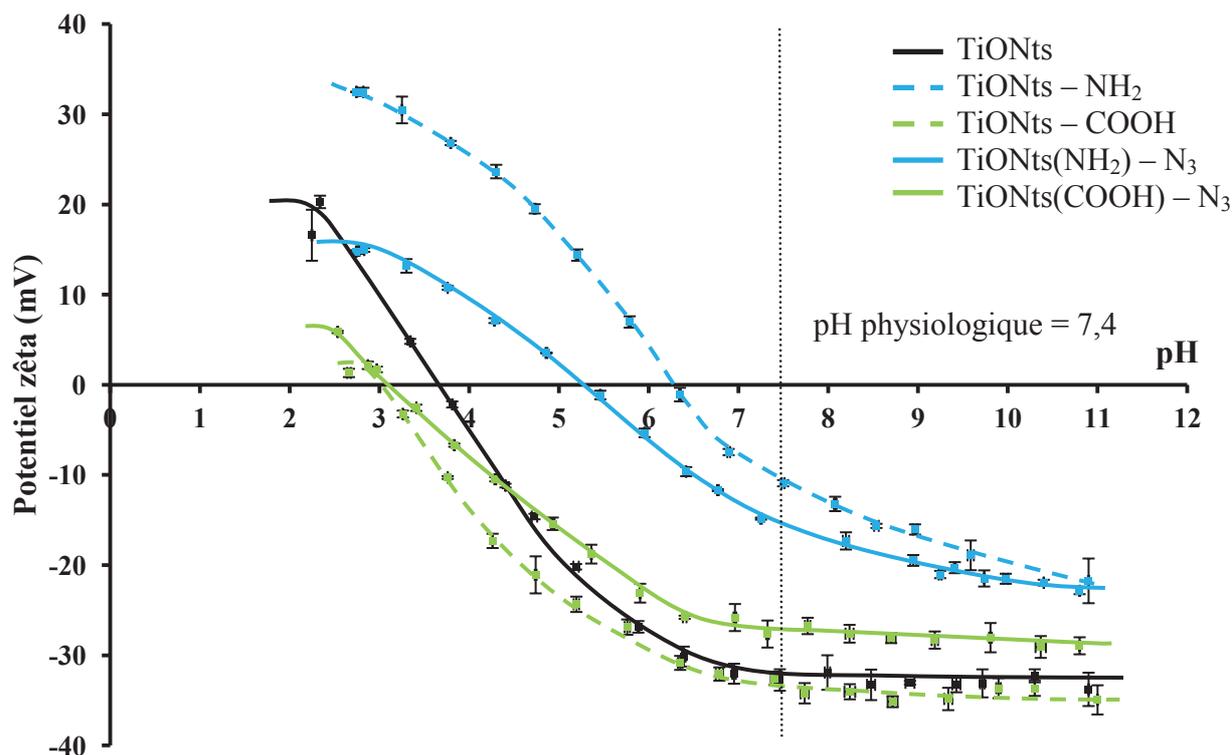


Figure 210. Évolution du potentiel zêta des nanohybrides fonctionnalisés par les PEG – N<sub>3</sub> dans NaCl (10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup>) en fonction du pH. Courbes représentatives d'un échantillon.

Le Tableau 74 regroupe les valeurs des points isoélectriques et les valeurs du potentiel zêta à pH = 7,4 pour les nanohybrides modifiés par les deux PEG – N<sub>3</sub>.

Synthèse	PIE	ζ à pH = 7,4 (mV)	n
<b>TiONts</b>	3,3 ± 0,2	-32 ± 3	6
<b>TiONts – NH<sub>2</sub></b>	6,3 ± 0,8	-13 ± 4	12
<b>TiONts(NH<sub>2</sub>) – N<sub>3</sub></b>	5,3 ± 0,3	-15 ± 2	1
<hr/>			
<b>TiONts</b>	3,3 ± 0,2	-32 ± 3	6
<b>TiONts – COOH</b>	3,2 ± 0,3	-35 ± 3	6
<b>TiONts(COOH) – N<sub>3</sub></b>	3,2 ± 0,2	-27 ± 1	1

Tableau 72. Points isoélectriques et potentiel zêta à pH = 7,4 des nanohybrides TiONts – N<sub>3</sub>. n représente le nombre d'échantillons analysés.

Les nanotubes fonctionnalisés par le PEG – N<sub>3</sub> présentent une stabilité colloïdale limitée dans le PBS après deux heures (Figure 211). La suspension à partir des TiONts–COOH semble légèrement plus stable (jusqu'à 2 h), probablement parce que ces nanotubes possèdent un plus fort potentiel zêta (-35 mV) que ceux obtenus à partir des TiONts–NH<sub>2</sub> (-13 mV).



Figure 211. A gauche, les suspensions de  $TiONts(NH_2) - Pc$  et  $TiONts(COOH) - Pc$  à  $t = 2$  heures et à droite, les mêmes suspensions à  $t = 24$  heures dans le PBS.

En raison de la réactivité élevée voire de la tendance explosive de certains azotures organiques, les nanotubes fonctionnalisés par le PEG - N<sub>3</sub> n'ont pas été caractérisés par ATG (Kolb *et al.* 2001; Kolb *et al.* 2003).

### III.2.3 - Fonctionnalisation des nanotubes par les phtalocyanines alcyne par chimie clic

Pour fonctionnaliser les nanotubes par chimie clic, la phtalocyanine azoture hydrosoluble est utilisée pour essayer d'augmenter la stabilité du nanohydrate dans l'eau.

#### III.2.3.1 - Protocole de greffage des phtalocyanines sur les $TiONts - N_3$ par chimie clic

Le couplage par chimie clic des phtalocyanines sur les nanotubes (Figure 212) est réalisé dans un mélange DMSO/H<sub>2</sub>O [4 : 1] auquel sont ajoutés 100 mg de  $TiONts - N_3$  et 25 mg de  $ZnPc - C \equiv C$  (hydro) en présence de sulfate de cuivre pentahydraté ( $CuSO_4, 5H_2O$ ) et d'ascorbate de sodium (AsNa) qui va permettre de réduire le cuivre (II) en cuivre (I), condition *sine qua none* pour que la réaction clic ait lieu (Rostovtsev *et al.* 2002).

Le mélange est ensuite placé sous agitation magnétique (400 tours/minutes) pendant 24 heures sous atmosphère inerte N<sub>2</sub> à 21°C. Ensuite, les nanoparticules sont lavées par plusieurs cycles d'ultrafiltration pour éliminer les agents de couplage, la phtalocyanine A<sub>4</sub> ne pouvant être couplée et la phtalocyanine A<sub>3</sub>B qui n'a pas réagi (Figure 194) :

- par cycles de 100 mL de DMSO, jusqu'à disparition de la couleur du surnageant ;
- par cycles de 5 × 100 mL d'éthanol/H<sub>2</sub>O ;
- par cycles de 3 × 100 mL d'eau ultra pure.

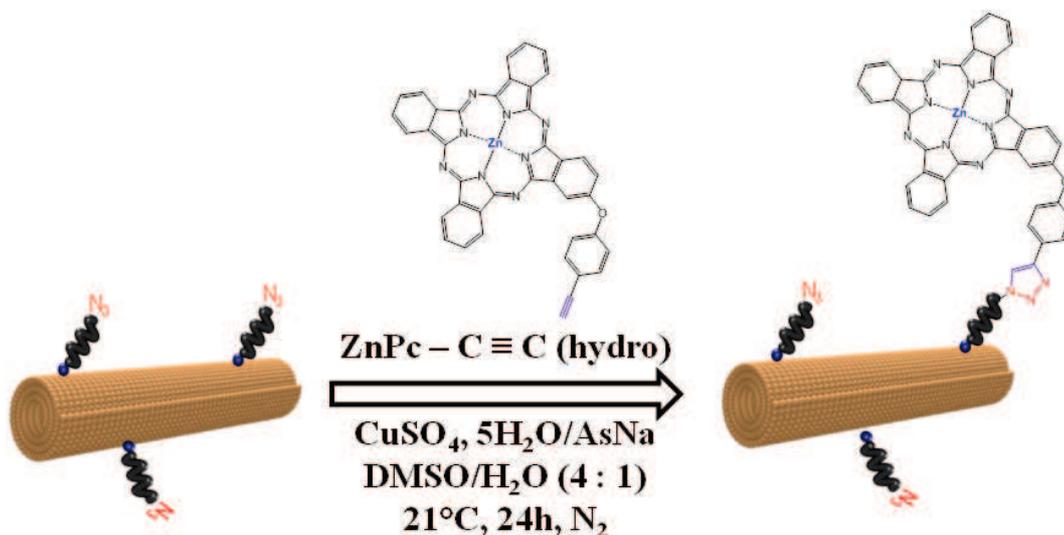


Figure 212. Réaction de chimie clic entre  $\text{TiONts} - \text{N}_3$  et  $\text{ZnPc} - \text{C} \equiv \text{C}$

Les nanohybrides fonctionnalisés par les phtalocyanines alcyne hydrosoluble seront notés  $\text{TiONts}(\text{COOH}) - \text{Pc}$  (à partir de  $\text{TiONts}(\text{COOH}) - \text{N}_3$ ) et  $\text{TiONts}(\text{NH}_2) - \text{Pc}$  (à partir de  $\text{TiONts}(\text{NH}_2) - \text{N}_3$ ) dans la suite du manuscrit.

### III.2.3.2 - Analyse de la surface des nanotubes fonctionnalisés par les phtalocyanines par la méthode chimie clic

En première intention, les nanotubes modifiés ont été analysés par spectroscopie UV – visible. La présence des phtalocyanines est confirmée par l’observation des bandes caractéristiques de celle-ci comme la bande de Soret et les différentes bandes Q. De plus, la bande d’adsorption des  $\text{TiONts}$  est aussi présente (Figure 213). Le signal des  $\text{TiONts} - \text{N}_3$  est identique à celui des nanotubes nus.

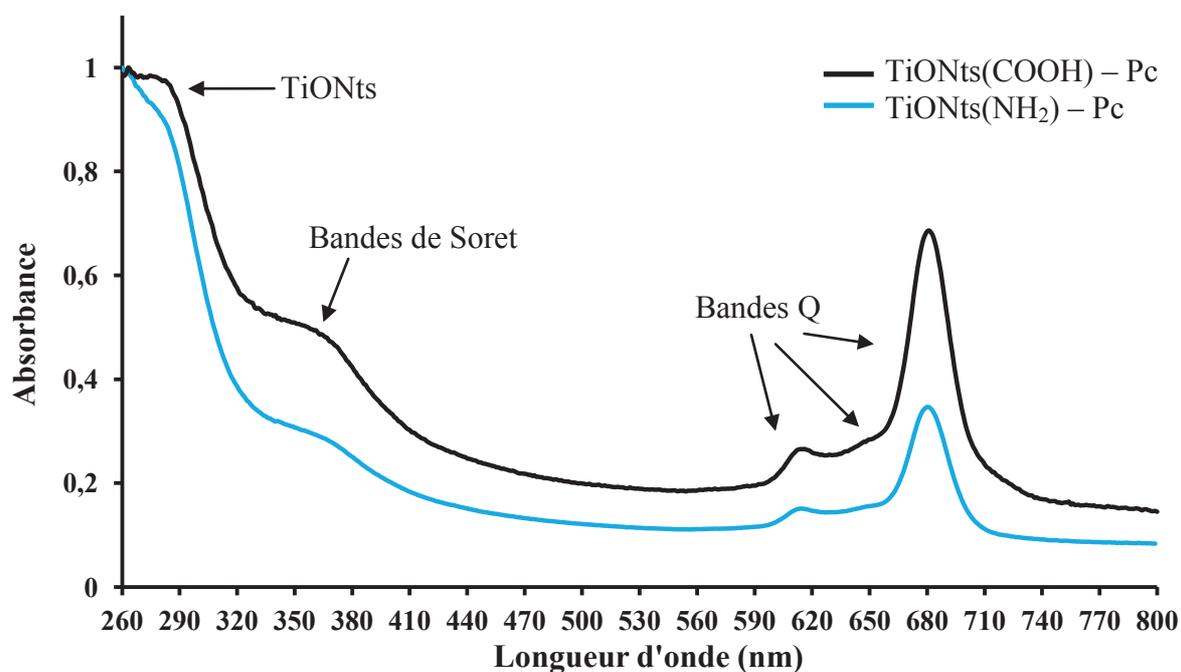


Figure 213. UV – Visible : Spectres d’absorption dans le DMSO des nanotubes fonctionnalisés par chimie clic

Ensuite, la présence de phtalocyanines à la surface des nanotubes est mise en évidence par XPS avec l'augmentation des proportions des éléments provenant des phtalocyanines comme le carbone ou l'azote voire l'apparition du zinc lorsqu'il y a beaucoup de phtalocyanines. Cette nouvelle couche a pour effet de diminuer la concentration en titane renforçant la thèse de la présence de phtalocyanines à la surface des nanotubes (Tableau 73).

Synthèse	Concentration atomique (%)							
	Ti 2p	O 1s	C 1s	Na KLL	N 1s	Si 2p	P 2p	Zn 2p3
TiONts	21	59	6	14	-	-	-	-
TiONts – NH <sub>2</sub>	19	54	13	8	3	3	-	-
TiONts(NH <sub>2</sub> ) – N <sub>3</sub>	16	49	23	4	6	2	-	-
TiONts(NH <sub>2</sub> ) – Pc	14	48	28	1	7	2	-	-
TiONts	21	59	6	14	-	-	-	-
TiONts – COOH	21	59	16	3	-	-	1	-
TiONts(COOH) – N <sub>3</sub>	19	53	22	1	4	-	1	-
TiONts(COOH) – Pc	14	45	35	0	6	-	0	0,5

Tableau 73. Analyse XPS : Concentration atomique des espèces à la surface des nanotubes fonctionnalisés par chimie clic

Par ailleurs, la modification du point isoélectrique des nanotubes azoture pourrait indiquer la présence de phtalocyanines. Le PIE est très décalé, de 3 unité de pH, dans le cas des TiONts(COOH) – Pc alors que celui des TiONts(NH<sub>2</sub>) – Pc est seulement décalé d'une unité de pH (Figure 214). Il semblerait qu'il y ait plus de phtalocyanines à la surface des TiONts(COOH) – Pc, ce qui est confirmé par la détection du zinc en XPS.

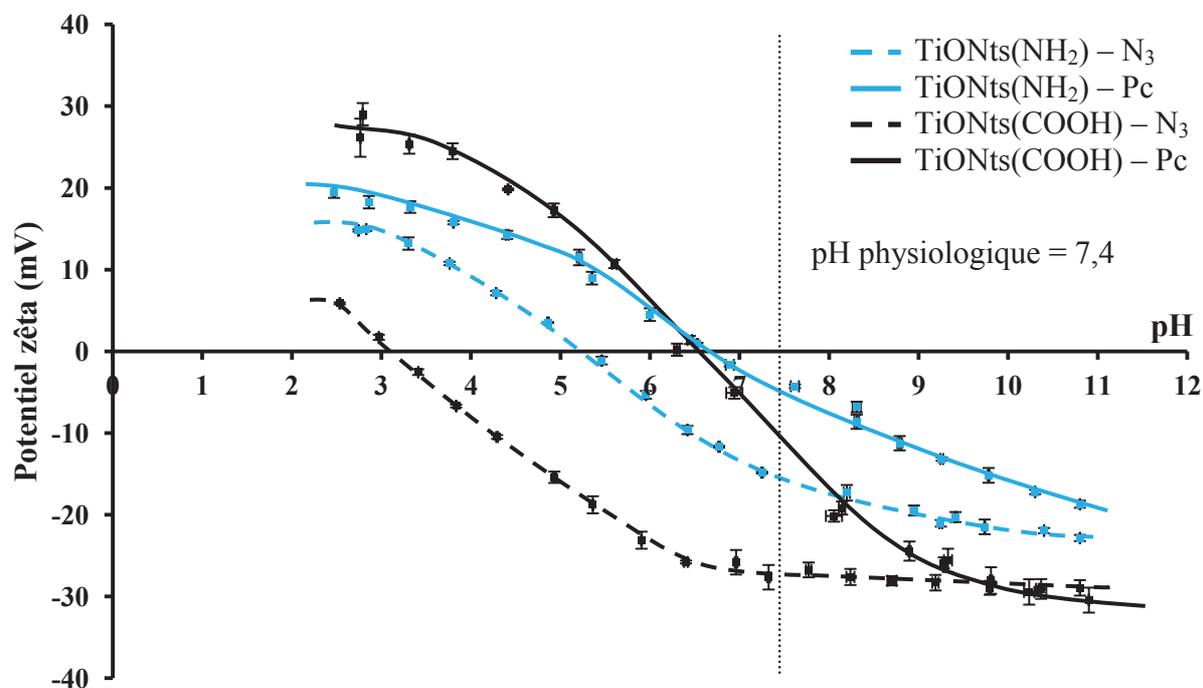


Figure 214. Évolution du potentiel zêta en fonction du pH des nanohybrides fonctionnalisés par chimie clic dans NaCl ( $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup>) en fonction du pH. Courbes représentatives d'un échantillon.

Le Tableau 74 regroupe les valeurs des points isoélectriques et les valeurs du potentiel zêta à pH = 7,4 pour les nanohybrides fonctionnalisés par la phtalocyanines par voie chimie clic.

Synthèse	PIE	$\zeta$ à pH = 7,4 (mV)	n
<b>TiONts</b>	3,3 ± 0,2	-32 ± 3	6
<b>TiONts – NH<sub>2</sub></b>	6,3 ± 0,8	-13 ± 4	12
<b>TiONts(NH<sub>2</sub>) – N<sub>3</sub></b>	5,3 ± 0,3	-15 ± 2	1
<b>TiONts(NH<sub>2</sub>) – Pc</b>	6,4 ± n.d.	-7 ± 2	1
<hr/>			
<b>TiONts</b>	3,3 ± 0,2	-32 ± 3	6
<b>TiONts – COOH</b>	3,2 ± 0,3	-35 ± 3	6
<b>TiONts(COOH) – N<sub>3</sub></b>	3,2 ± 0,2	-27 ± 1	1
<b>TiONts(COOH) – Pc</b>	6,3 ± n.d.	-10 ± 1	1

Tableau 74. Points isoélectriques et potentiel zêta des nanohybrides TiONts – Pc fonctionnalisés par chimie clic. n.d. non déterminé car il n'y avait pas assez de valeurs pour être représentatif. n représente le nombre d'échantillons d'analysés.

Les nanotubes fonctionnalisés par les phtalocyanines ne sont pas stables dans le PBS au bout de deux heures (Figure 215) car les phtalocyanines greffées ne sont probablement pas assez hydrosolubles malgré les groupements pyridinium (ZnPc – C ≡ C (hydro) sur Figure 184).

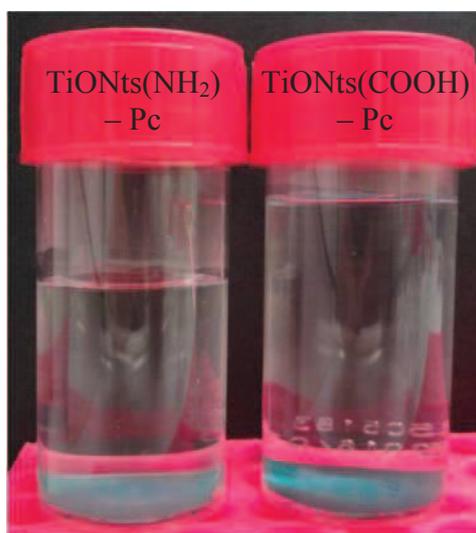


Figure 215. A gauche, les suspensions de TiONts(NH<sub>2</sub>) – Pc et TiONts(COOH) – Pc à t = 2 heures dans le PBS

Le taux de greffage des phtalocyanines par chimie clic est estimé par ATG entre 150°C et 800°C. L'analyse thermogravimétrique montre que les pertes de masses sont plus importantes dans le cas des nanotubes fonctionnalisés avec les phtalocyanines que celle des nanotubes préfonctionnalisés révélant la présence des phtalocyanines (Figure 216).

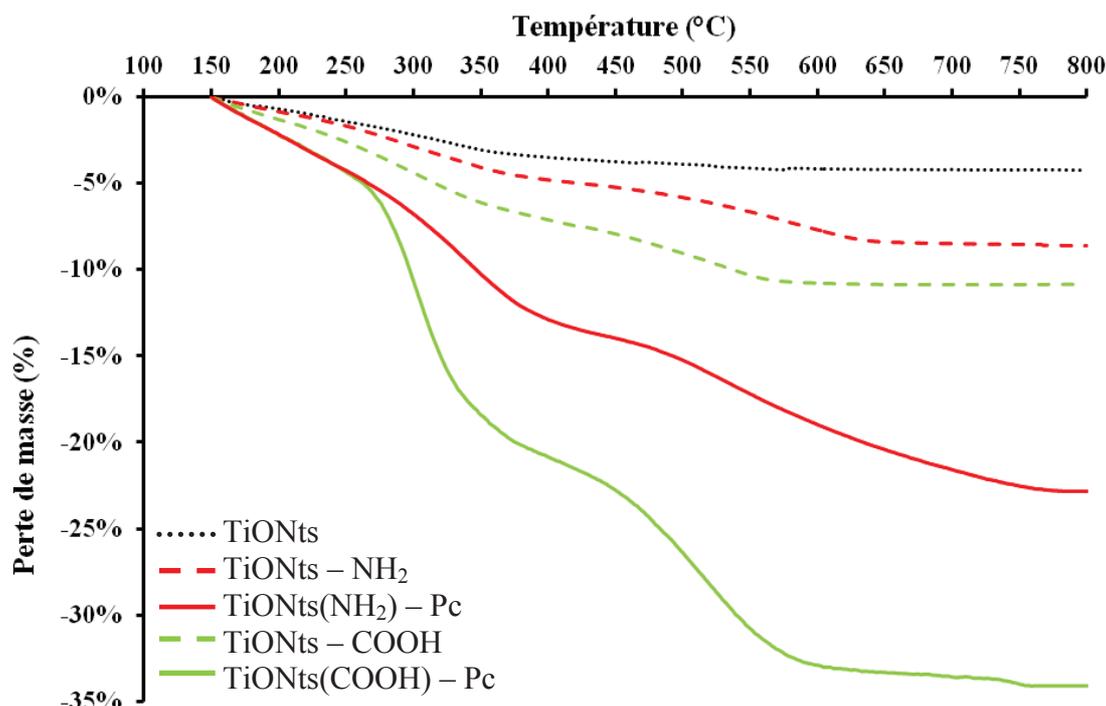


Figure 216. ATG des nanohybrides fonctionnalisés par chimie clic.

Les mesures ont été réalisées sous flux de  $N_2$  ( $25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) avec une rampe de montée en température de  $5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ . Les courbes ont été normalisées à  $150^\circ\text{C}$  (annexe n°3) et sont représentatives d'un échantillon.

À partir de l'équation 3 (annexe n°3), le taux de greffage des phtalocyanines peut être estimé. Pour calculer ce taux, il faut tenir compte de la masse molaire de la phtalocyanine ( $M = 970 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) en rajoutant celle des PEG -  $N_3$  (Figure 204) qui contribue aussi à la perte de masse entre  $150^\circ\text{C}$  et  $800^\circ\text{C}$ .

Ainsi, en considérant la perte de masse des nanohybrides entre  $150$  et  $800^\circ\text{C}$  exclusivement due aux polymères et en retranchant la perte de masse des nanoparticules préfonctionnalisées ( $\text{TiONts} - \text{NH}_2$  ou  $\text{TiONts} - \text{COOH}$ ), le taux de phtalocyanines a été calculé, de l'ordre de  $0,4 \text{ Pc}/\text{nm}^2$  pour les  $\text{TiONts}(\text{NH}_2) - \text{Pc}$  et environ  $0,6 \text{ Pc}/\text{nm}^2$  dans le cas des  $\text{TiONts}(\text{COOH}) - \text{Pc}$  (Tableau 75). La surface spécifique est de  $(163 \pm 23) \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ .

	$\Delta m$ totale (%)	$\Delta m$ calcul (%)	Masse molaire considérée ( $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	molécules/ $\text{nm}^2$	R (%)	n
<b>TiONts</b>	3,8	3,8	18	$(6 \pm 4) \text{ OH}$	-	12
<b>TiONts - <math>\text{NH}_2</math></b>	8	8	58	$(5,7 \pm 0,8) \text{ NH}_2$	95	17
<b>TiONts(<math>\text{NH}_2</math>) - Pc</b>	22,86	14,86	1344	$(0,4 \pm \text{n.d.}) \text{ Pc}$	7	1
<b>TiONts</b>	3,8	3,8	18	$(6 \pm 4) \text{ OH}$	-	12
<b>TiONts - COOH</b>	10,9	10,9	115	$(3,1 \pm 0,5) \text{ COOH}$	52	10
<b>TiONts(COOH) - Pc</b>	34,15	23,25	1364	$(0,6 \pm \text{n.d.}) \text{ Pc}$	19	1

Tableau 75. Estimation du taux de greffage des phtalocyanines à la surface des nanotubes synthétisés par chimie clic. n.d. non déterminé car il n'y avait pas assez de valeurs pour être représentatif. R représente le rendement de greffage (%) et n le nombre d'échantillons analysés.

### III.3 - Greffage de PEG à la surface des nanotubes fonctionnalisés par les phtalocyanines

Pour augmenter la stabilité des nanohybrides fonctionnalisés par les phtalocyanines, les premiers essais avec du PEG<sub>2000</sub> – Si ont été réalisés. Le caractère hydrophile des PEG pourrait permettre de contrecarrer le manque de solubilité des phtalocyanines dans les conditions physiologiques.

#### III.3.1 - Utilisation du PEG<sub>2000</sub> – Si

Le protocole reste le même que lors du greffage du PEG<sub>2000</sub> – Si sur les TiONts – SPIO Orga (Chapitre 2. Fonctionnalisation avec le PEG<sub>2000</sub> – Si). En bref, dans un mélange eau/éthanol (50/50 en volume), 20 mg de nanohybrides sont ajoutés à 0,026 mmol de PEG<sub>2000</sub> – Si. L'ensemble est mis sous atmosphère d'azote et placé sous agitation magnétique (300 tours/minute) pendant 48 heures. Ensuite, la suspension est lavée par dix cycles d'ultrafiltration et enfin lyophilisée pour les futures caractérisations. Le nanohybride synthétisé sera dénommé **PEG – TiONts – Pc** dans la suite de ce travail.

##### III.3.1.1 - Analyse de la surface du nanohybride PEG – TiONts – Pc

Tout d'abord, le nanohybride PEG – TiONts – Pc est analysé par XPS (Tableau 76). Cette analyse révèle la présence de PEG à la surface des nanotubes car seuls les éléments propres au PEG comme le carbone et l'oxygène sont présents en grandes quantités à la surface. Les éléments provenant des nanotubes comme le titane sont en très faible proportion, ce qui confirme la présence du PEG à la surface par l'apparition d'une nouvelle couche qui recouvre les nanotubes et masque le nanotube sous la couche organique.

Synthèse	Concentration atomique (%)						
	Ti 2p	O 1s	C 1s	Na KLL	N 1s	Si 2p	Zn 2p3
<b>TiONts</b>	21	59	6	14	-	-	-
<b>TiONts – NH<sub>2</sub></b>	19	54	13	8	3	3	-
<b>TiONts(NH<sub>2</sub>) – N<sub>3</sub></b>	16	49	23	4	6	2	-
<b>TiONts(NH<sub>2</sub>) – Pc</b>	14	48	28	1	7	2	-
<b>PEG – TiONts – Pc</b>	1	33	64	0	1	1	-

Tableau 76. Analyse XPS : Concentration atomique des espèces présentes à la surface du nanohybride PEG – TiONts – Pc

La décomposition du niveau C1s du composé PEG – TiONts – Pc ressemble aux composantes du niveau C1s du PEG<sub>2000</sub> – Si (Maurizi 2010). En effet, les quatre composantes du PEG sont retrouvées au niveau C1s du nanohybride (Figure 217). Cette analyse confirme la présence de PEG à la surface des nanotubes.

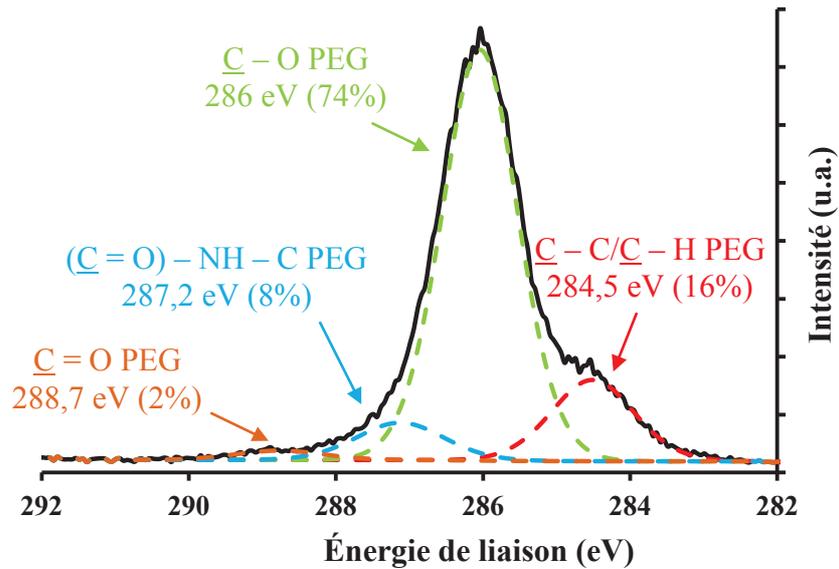


Figure 217. Analyse XPS : Décomposition du niveau C1s du nanohybride PEG – TiONts – Pc

Enfin, le taux de greffage du PEG<sub>2000</sub> – Si est estimé par ATG. Les pertes de masse entre 150°C et 800°C sont bien plus importantes avec le composé PEG – TiONts – Pc par rapport au composé TiONts(NH<sub>2</sub>) – Pc (Figure 218). À partir de l'équation 3 (annexe n°3116), le taux de PEG a été estimé en considérant les pertes de masse exclusivement dues aux polymères et en retranchant la proportion de la partie organique des étapes précédentes. Ainsi, ce taux est estimé à 0,8 PEG/nm<sup>2</sup> (Tableau 77).

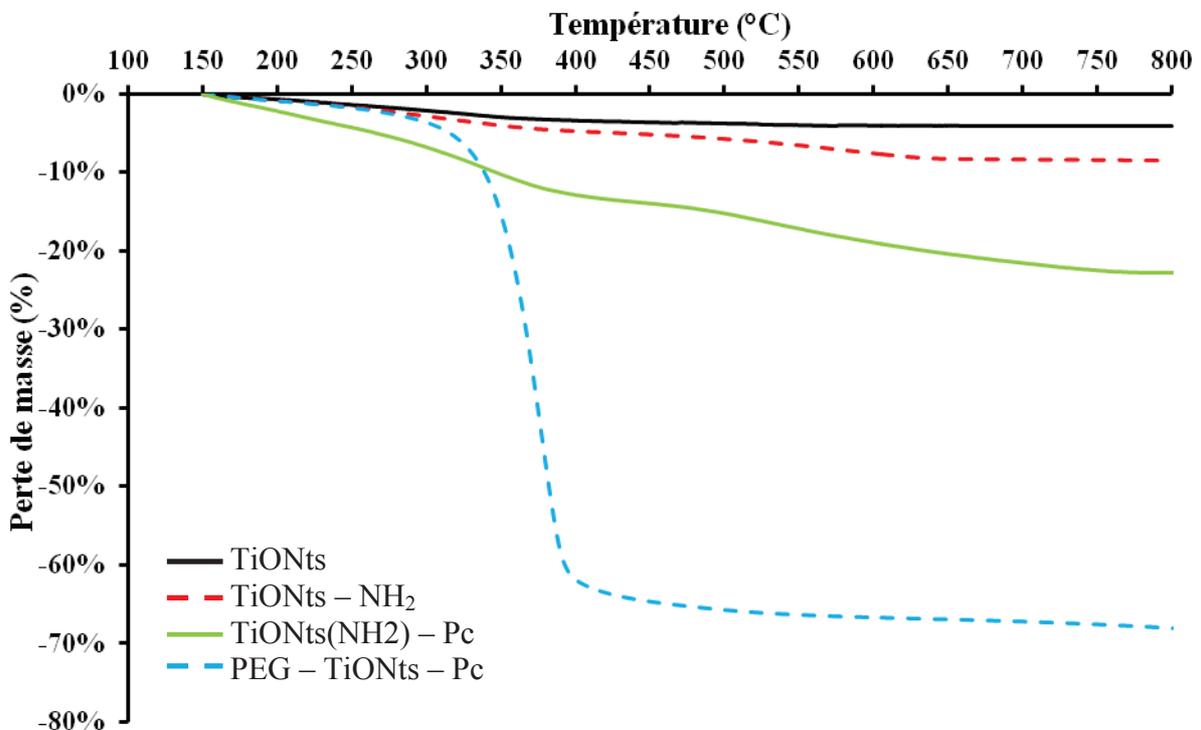


Figure 218. ATG des nanohybrides fonctionnalisés par le PEG<sub>2000</sub> – Si  
 Les mesures ont été réalisées sous flux de N<sub>2</sub> (25 mL.min<sup>-1</sup>) avec une rampe de montée en température de 5°C.min<sup>-1</sup>. Les courbes ont été normalisées à 150°C (annexe n°3) et sont représentatives d'un échantillon.

	$\Delta m$ totale (%)	$\Delta m$ calcul (%)	Masse molaire considérée ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	molécules/ $\text{nm}^2$	R (%)	n
TiONts	3,8	3,8	18	( $6 \pm 4$ ) OH	-	12
TiONts – NH <sub>2</sub>	8	8	58	( $5,7 \pm 0,8$ ) NH <sub>2</sub>	95	17
TiONts(NH <sub>2</sub> ) – Pc	22,86	14,86	1344	( $0,4 \pm \text{n.d.}$ ) Pc	7	1
PEG – TiONts – Pc	69,77	46,91	2052	( $0,8 \pm \text{n.d.}$ ) PEG	15	1

Tableau 77. Estimation du taux de greffage du PEG à la surface des nanotubes fonctionnalisés par les phtalocyanines. n.d. non déterminé car il n'y avait pas assez de valeurs pour être représentatif. R représente le rendement de greffage (%) et n le nombre d'échantillons analysés.

### III.3.1.2 - Propriétés optiques des TiONts – Pc fonctionnalisés par le PEG<sub>2000</sub> – Si

Les longueurs d'onde d'émission des nanohybrides PEG – TiONts – Pc sont déterminées par spectroscopie de fluorescence dans l'eau et le DMSO (Figure 219). Leur comportement dans les deux solvants est très différent, l'intensité maximale dans l'eau est à 664 nm et dans le DMSO à 685 nm. Dans l'eau, une extinction de fluorescence est observée à cause de la faible solubilité des phtalocyanines dans ce solvant à cause des bandes larges et écrasées. Le PEG ne permet donc pas de contrecarrer suffisamment le manque de solubilité des phtalocyanines greffées sur les nanotubes.

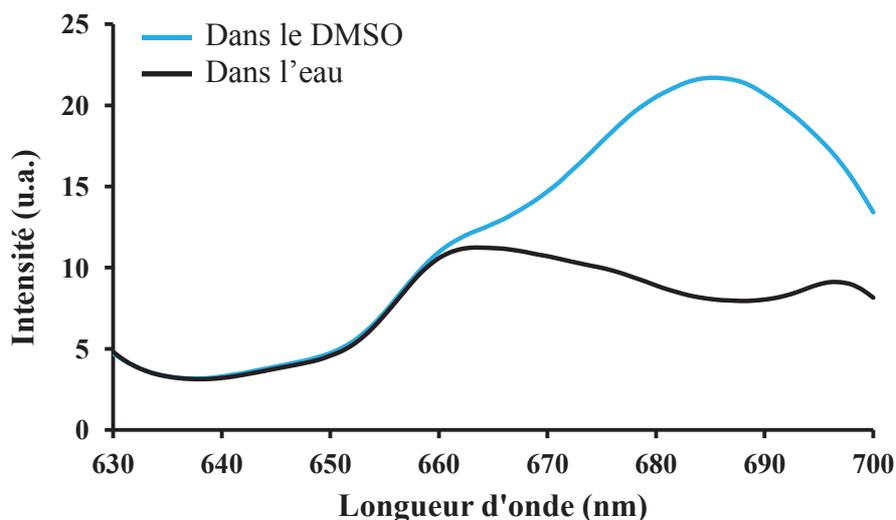


Figure 219. Spectre d'émission des PEG – TiONts – Pc dans l'eau et le DMSO, excitation à 600 nm

### III.3.1.3 - Etudes préliminaires de toxicité des nanohybrides fonctionnalisés par chimie clic

La toxicité *in vivo* des nanohybrides fonctionnalisés par le PEG – N<sub>3</sub>, par les phtalocyanines et par le PEG<sub>2000</sub> – Si évalué sur les zebrafish (annexe n°7). La toxicité des nanohybrides n'est pas avérée pour une concentration de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figure 220 a) car le taux de survie est proche de 100%. De plus, le développement des zebrafish au bout de 96 heures n'est pas dérégulé (Figure 220 c). En revanche, l'éclosion des zebrafish en présence de nanohybrides est retardée car au bout de 48 heures (Figure 220 b) moins de 90% des œufs n'ont pas éclot dans le cas des TiONts(NH<sub>2</sub>) – N<sub>3</sub> et dans le cas des TiONts(NH<sub>2</sub>) – Pc.

Habituellement, l'éclosion a lieu entre 48 heures et 72 heures. A 72 heures, l'éclosion retrouve son évolution normale. Les zebrafish ne présentent pas de malformation une fois éclos, quelque soit le type de nanoparticules.

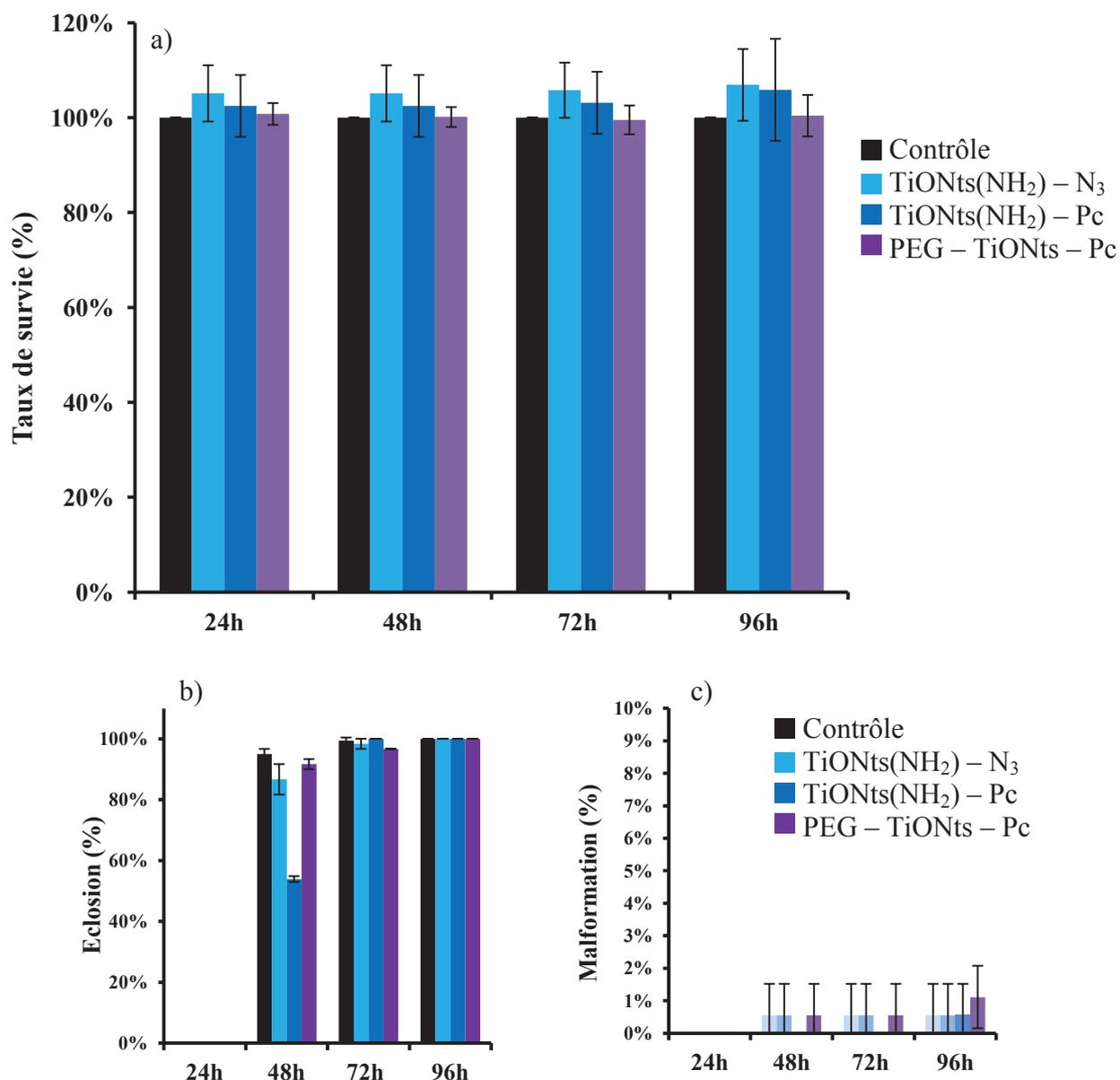


Figure 220. a) Taux de survie, b) éclosion et c) Malformation des zebrafish aux différentes étapes de construction du nanohybrides PEG - TiONts - Pc

### III.4 - Conclusion sur la fonctionnalisation des nanotubes par les phthalocyanines pour l'imagerie optique

La fonctionnalisation des nanotubes de titanate par les phthalocyanines a été une réussite. Deux voies ont été envisagées : la voie peptidique et la voie par chimie clic.

La voie peptidique est réalisée en partant de nanotubes modifiés par l'APTES (NH<sub>2</sub>) ou par le PHA (COOH) en y greffant respectivement la ZnPc - COOH et la ZnPc - NH<sub>2</sub>. La présence de phthalocyanines a été soulignée par spectroscopie UV - Visible car les bandes

caractéristiques de celle-ci sont observées. De plus, l'analyse XPS a prouvé la présence de phtalocyanines à la surface des nanotubes avec l'augmentation des éléments provenant des phtalocyanines et l'apparition des composantes des amides au niveau N1s. Cette conclusion est renforcée par un test de greffage sans agents de couplage qui ne montre aucune adsorption des phtalocyanines à la surface des nanotubes en spectroscopie UV – Visible. Le taux de phtalocyanines greffées a été déterminé par ATG et il est de l'ordre de 0,1 Pc/nm<sup>2</sup> dans les deux cas. Ainsi, les nanohybrides émettent de la fluorescence à une longueur d'onde d'émission avoisinant 680 nm qui se situe dans la fenêtre optique idéale pour l'imagerie optique *in vivo*.

La synthèse par chimie clic est possible en présence d'un azoture et d'un alcyne. Alors, il a été nécessaire de modifier la surface des nanotubes pour obtenir un azoture *via* un PEG – N<sub>3</sub> à la surface des nanotubes pour lier les phtalocyanines alcyne aux nanotubes. La présence de l'azoture a été mise en évidence par spectroscopie FTIR avec la bande caractéristique de l'azoture à 2110 cm<sup>-1</sup>. Ainsi, la réaction par chimie clic a pu avoir lieu entre les TiONts – N<sub>3</sub> et les phtalocyanines. Ces dernières ont été mises en évidence par spectroscopie UV – Visible avec l'apparition des bandes Q spécifiques de la phtalocyanine mais aussi en XPS par la diminution du titane, soulignant la présence d'une nouvelle couche à la surface des nanotubes. En ATG, le taux de phtalocyanine a été estimé à environ 0,4 Pc/nm<sup>2</sup> dans le cas des TiONts(NH<sub>2</sub>) – Pc et de l'ordre de 0,6 Pc/nm<sup>2</sup> dans le cas des TiONts(COOH) – Pc.

#### **IV. Création d'une sonde théranostique pour l'imagerie bimodale IRM – imagerie optique et pour la thérapie photodynamique associé à l'hyperthermie**

Le but de cette partie est l'assemblage de la phtalocyanine avec les nanoparticules d'oxydes de fer pour la fabrication d'une sonde théranostique en cumulant les propriétés des deux objets. Cette sonde est théranostique car les nanoparticules peuvent être utilisées à la fois en IRM (diagnostique) et en hyperthermie (thérapie) mais aussi car les phtalocyanines sont utilisées en imagerie optique (diagnostique) et en Thérapie PhotoDynamique (PDT). Cette partie a fait l'objet d'une publication (annexe n°10).

Pour cela, les nanoparticules d'oxydes de fer ont été fonctionnalisées avec les phtalocyanines par chimie clic. Tout d'abord, les nanoparticules ont été préfonctionnalisées par des amines en surface grâce à l'APTES pour obtenir environ 5 NH<sub>2</sub>/nm<sup>2</sup>. Ce taux a été déterminé par ATG.

L'étape suivante est le greffage du PEG – N<sub>3</sub> pour réaliser la chimie clic avec la phtalocyanine alcyne non hydrosoluble (ZnPc – C ≡ C). La présence de l'azoture a été confirmée par analyse FTIR avec le pic spécifique des azotures à 2110 cm<sup>-1</sup>.

Ensuite, la dernière étape est le greffage des phtalocyanines par chimie clic. La présence des phtalocyanines a été déterminée par spectroscopie UV – visible grâce aux bandes Q caractéristiques de la phtalocyanine. Le nombre de phtalocyanines a été estimé par spectrométrie par torche à plasma (ICP-AES) de l'ordre de 2 Pc/nm<sup>2</sup> soit environ 690 Pc par nanoparticule (Boudon *et al.* 2013).

De plus, les caractéristiques intrinsèques que sont la relaxivité et la longueur d'onde d'émission du nanohybride SPIO – Pc ont été déterminées (Figure 221). Ainsi, le nanohybride SPIO – Pc émet de la fluorescence à une longueur d'onde d'émission  $\lambda = 673$  nm et possède une relaxivité  $r_2 = (73 \pm 4) \text{ L.mmolFe}_3\text{O}_4^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .

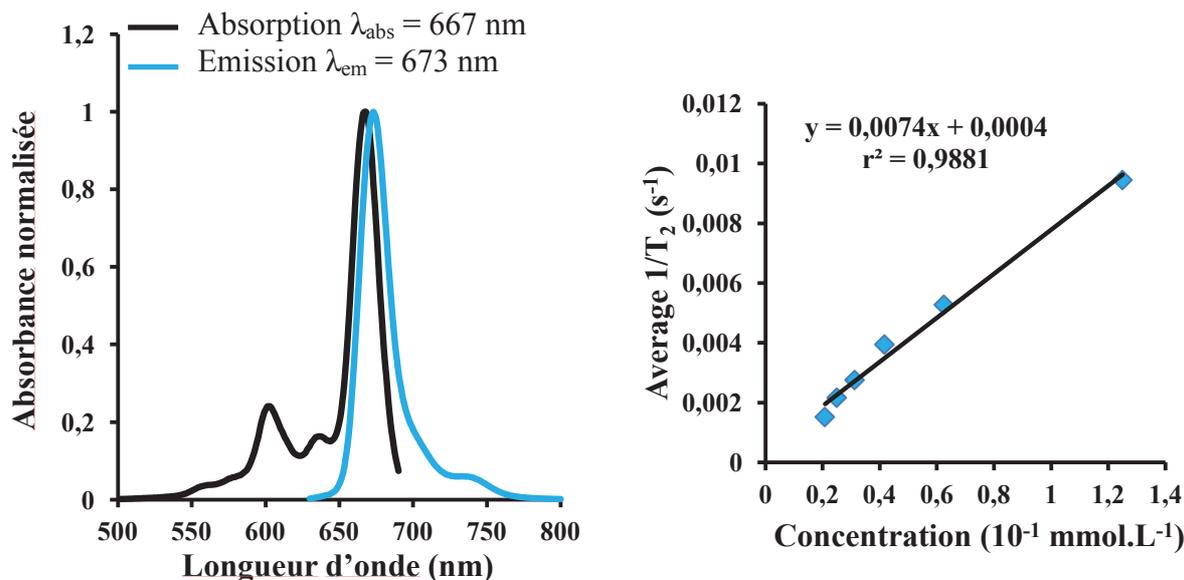


Figure 221. Fluorescence (à gauche) et relaxivité (à droite) du nanohybride SPIO – Pc

Le nanohybride synthétisé a donc les propriétés pour être une sonde utilisable en imagerie bimodale IRM/IO. La partie thérapeutique (hyperthermie et PDT) devra être testée pour connaître ses limites.

## V. Conclusion sur le greffage de phtalocyanines sur les nanoparticules

Le greffage de phtalocyanines à la surface des nanoparticules a été une réussite pour les deux voies envisagées : la voie peptidique et la voie par chimie clic.

Par voie peptidique, le greffage des phtalocyanines (ZnPc – NH<sub>2</sub> ou ZnPc – COOH) se déroule directement en partant des nanoparticules préfonctionnalisées (NH<sub>2</sub> ou COOH) en présence d'agents de couplage (DCC/NHS) dans le DMSO. Cette voie ne nécessite pas d'espaceur entre les nanoparticules et les phtalocyanines.

Cependant, la voie par chimie clic nécessite l'utilisation d'une autre fonction entre les nanoparticules et les phtalocyanines. La chimie clic est la réaction entre un azoture et un alcyne. Ainsi, un PEG – N<sub>3</sub> hétérobifonctionnel est choisi. Cette réaction de cycloaddition a lieu en présence de Cu(I) dans un mélange THF/H<sub>2</sub>O [4 : 1].

La présence de phtalocyanines a été mise en évidence par UV – Visible, par XPS, par zêtamétrie et par fluorescence.

Un test de greffage par voie peptidique sans agents de couplage ne montre aucune adsorption des phtalocyanines à la surface des nanotubes en spectroscopie UV – Visible

Sur les nanotubes de titanate, le taux de phtalocyanines déterminé par ATG est de l'ordre de 0,1 Pc/nm<sup>2</sup> dans le cas de la voie peptidique et environ 0,5 Pc/nm<sup>2</sup> dans le cas de la voie par chimie clic.

Un travail similaire a été effectué, uniquement par chimie clic, dans le cas des nanoparticules d'oxydes de fer (travail présenté ici sous la forme d'une publication, annexe n°10). Le taux de phtalocyanines a été déterminé par ICP-AES et a permis de trouver 2 Pc/nm<sup>2</sup> à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer. De plus, les caractéristiques du nanohybride SPIO – Pc ont été déterminées, il émet de la fluorescence à une longueur d'onde d'émission  $\lambda = 673 \text{ nm}$  et possède une relaxivité  $r_2 = (73 \pm 4) \text{ L.mmolFe}_3\text{O}_4^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , valeur attestant des possibilités de l'utilisation comme agent de contraste en IO et en IRM.

## Références bibliographiques

- Alves, W., Ribeiro, A.O., Pinheiro, M.V.B., Krambrock, K., Haber, F.E., Froyer, G., Chauvet, O., Ando, R.A., Souza, F.L. and Alves, W.A. (2011). "Quenching of Photoactivity in Phthalocyanine Copper(II) -Titanate Nanotube Hybrid Systems." The Journal of Physical Chemistry C **115**(24): 12082-12089.
- Balamurugan, S.S., Soto-Cantu, E., Cueto, R. and Russo, P.S. (2009). "Preparation of Organosoluble Silica-Polypeptide Particles by "Click" Chemistry." Macromolecules **43**(1): 62-70.
- Bıyıklıođlu, Z., Durmuş, M. and Kantekin, H. (2010). "Synthesis, photophysical and photochemical properties of quinoline substituted zinc (II) phthalocyanines and their quaternized derivatives." Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry **211**(1): 32-41.
- Boudon, J., Paris, J., Bernhard, Y., Popova, E., Decreau, R.A. and Millot, N. (2013). "Magneto-optical nanomaterials: a SPIO-phthalocyanine scaffold built step-by-step towards bimodal imaging." Chem Commun (Camb) **49**(67): 7394-6.
- Camerin, M., Magaraggia, M., Soncin, M., Jori, G., Moreno, M., Chambrier, I., Cook, M.J. and Russell, D.A. (2010). "The in vivo efficacy of phthalocyanine-nanoparticle conjugates for the photodynamic therapy of amelanotic melanoma." European Journal of Cancer **46**(10): 1910-1918.
- Carvalho, C.M.B., Alves, E., Costa, L., Tomé, J.P.C., Faustino, M.a.F., Neves, M.G.P.M.S., Tomé, A.C., Cavaleiro, J.a.S., Almeida, A., Cunha, Â., Lin, Z. and Rocha, J. (2010). "Functional Cationic Nanomagnet-Porphyrin Hybrids for the Photoinactivation of Microorganisms." ACS Nano **4**(12): 7133-7140.
- Cheon, J. and Lee, J.-H. (2008). "Synergistically Integrated Nanoparticles as Multimodal Probes for Nanobiotechnology." Accounts of Chemical Research **41**(12): 1630-1640.
- Cossaro, A., Cvetko, D., Bavdek, G., Floreano, L., Gotter, R., Morgante, A., Evangelista, F. and Ruocco, A. (2004). "Copper-Phthalocyanine Induced Reconstruction of Au(110)." The Journal of Physical Chemistry B **108**(38): 14671-14676.
- Defeyt, C. (2010). "Influence des solvants aromatiques sur les propriétés optiques du bleu de phthalocyanine de cuivre en milieu pictural." CeROArt [En ligne].
- Devadoss, A. and Chidsey, C.E.D. (2007). "Azide-Modified Graphitic Surfaces for Covalent Attachment of Alkyne-Terminated Molecules by "Click" Chemistry." Journal of the American Chemical Society **129**(17): 5370-5371.
- Fu, J., Li, X.-Y., Ng, D.K.P. and Wu, C. (2002). "Encapsulation of Phthalocyanines in Biodegradable Poly(sebacic anhydride) Nanoparticles." Langmuir **18**(10): 3843-3847.
- Ghani, F., Kristen, J. and Riegler, H. (2012). "Solubility Properties of Unsubstituted Metal Phthalocyanines in Different Types of Solvents." Journal of Chemical & Engineering Data **57**(2): 439-449.
- Gu, H., Xu, K., Yang, Z., Chang, C.K. and Xu, B. (2005). "Synthesis and cellular uptake of porphyrin decorated iron oxide nanoparticles-a potential candidate for bimodal anticancer therapy." Chemical Communications(34): 4270-4272.
- Kim, H.-J., Shin, K.-J., Han, M.K., An, K., Lee, J.-K., Honma, I. and Kim, H. (2009). "One-pot synthesis of multifunctional mesoporous silica nanoparticle incorporated with zinc(II) phthalocyanine and iron oxide." Scripta Materialia **61**(12): 1137-1140.
- Kim, J., Kim, H.S., Lee, N., Kim, T., Kim, H., Yu, T., Song, I.C., Moon, W.K. and Hyeon, T. (2008). "Multifunctional Uniform Nanoparticles Composed of a Magnetite Nanocrystal Core and a Mesoporous Silica Shell for Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging and for Drug Delivery." Angewandte Chemie International Edition **47**(44): 8438-8441.

- Kolb, H.C., Finn, M.G. and Sharpless, K.B. (2001). "*Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions.*" Angewandte Chemie International Edition **40**(11): 2004-2021.
- Kolb, H.C. and Sharpless, K.B. (2003). "*The growing impact of click chemistry on drug discovery.*" Drug Discovery Today **8**(24): 1128-1137.
- Lee, J.-H., Jun, Y.-W., Yeon, S.-I., Shin, J.-S. and Cheon, J. (2006). "*Dual-Mode Nanoparticle Probes for High-Performance Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging of Neuroblastoma.*" Angewandte Chemie International Edition **45**(48): 8160-8162.
- Li, X., Liu, L., Kang, S.-Z., Mu, J. and Li, G. (2011). "*Differences between Zn-porphyrin-coupled titanate nanotubes with various anchoring modes: Thermostability, spectroscopic, photocatalytic and photoelectronic properties.*" Applied Surface Science **257**(14): 5950-5956.
- Magde, D., Wong, R. and Seybold, P.G. (2002). "*Fluorescence Quantum Yields and Their Relation to Lifetimes of Rhodamine 6G and Fluorescein in Nine Solvents: Improved Absolute Standards for Quantum Yields.*" Photochemistry and Photobiology **75**(4): 327-334.
- Manneville, V. (2006). Les phtalocyanines utilisées en cancérologie expérimentale et clinique Synthèse d'une métallophthalocyanine de zinc vectorisable pour des applications en thérapie photodynamique. Faculté de Pharmacie, Université Henri Poincaré - Nancy I.
- Martin, A.L., Bernas, L.M., Rutt, B.K., Foster, P.J. and Gillies, E.R. (2008). "*Enhanced Cell Uptake of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Functionalized with Dendritic Guanidines.*" Bioconjugate Chemistry **19**(12): 2375-2384.
- Maurizi, L. (2010). Elaboration de nanoparticules fonctionnelles : applications comme agents de contraste en IRM. Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne, Université de Bourgogne.
- Maurizi, L., Bisht, H., Bouyer, F. and Millot, N. (2009). "*Easy Route to Functionalize Iron Oxide Nanoparticles via Long-Term Stable Thiol Groups.*" Langmuir **25**(16): 8857-8859.
- Ogunsipe, A., Chen, J.-Y. and Nyokong, T. (2004a). "*Photophysical and photochemical studies of zinc(II) phthalocyanine derivatives-effects of substituents and solvents.*" New Journal of Chemistry **28**(7): 822-827.
- Ogunsipe, A., Maree, D. and Nyokong, T. (2003). "*Solvent effects on the photochemical and fluorescence properties of zinc phthalocyanine derivatives.*" Journal of Molecular Structure **650**(1-3): 131-140.
- Ogunsipe, A. and Nyokong, T. (2004b). "*Effects of substituents and solvents on the photochemical properties of zinc phthalocyanine complexes and their protonated derivatives.*" Journal of Molecular Structure **689**(1-2): 89-97.
- Pansare, V.J., Hejazi, S., Faenza, W.J. and Pruda, R.K. (2012). "*Review of Long-Wavelength Optical and NIR Imaging Materials: Contrast Agents, Fluorophores, and Multifunctional Nano Carriers.*" Chemistry of Materials **24**(5): 812-827.
- Ranjan, R. and Brittain, W.J. (2007). "*Combination of Living Radical Polymerization and Click Chemistry for Surface Modification.*" Macromolecules **40**(17): 6217-6223.
- Rostovtsev, V.V., Green, L.G., Fokin, V.V. and Sharpless, K.B. (2002). "*A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes.*" Angewandte Chemie International Edition **41**(14): 2596-2599.
- Rouxhet, P.G. and Genet, M.J. (2011). "*XPS analysis of bio-organic systems.*" Surface and Interface Analysis **43**(12): 1453-1470.
- Savarese, M., Aliberti, A., De Santo, I., Battista, E., Causa, F., Netti, P.A. and Rega, N. (2012). "*Fluorescence Lifetimes and Quantum Yields of Rhodamine Derivatives: New*

- Insights from Theory and Experiment.* The Journal of Physical Chemistry A **116**(28): 7491-7497.
- Silva, J.C.O., Sousa, M.H., Tourinho, F.A. and Rubim, J.C. (2002). "Raman Spectroscopic Investigation of Maghemite Ferrofluids Modified by the Adsorption of Zinc Tetrasulfonated Phthalocyanine." Langmuir **18**(14): 5511-5515.
- Sorokin, A.B. (2013). "Phthalocyanine Metal Complexes in Catalysis." Chemical Reviews.
- Stuchinskaya, T., Moreno, M., Cook, M.J., Edwards, D.R. and Russell, D.A. (2011). "Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody-phthalocyanine-gold nanoparticle conjugates." Photochemical & Photobiological Sciences **10**(5): 822-831.
- Tornøe, C.W., Christensen, C. and Meldal, M. (2002). "Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides." The Journal of Organic Chemistry **67**(9): 3057-3064.
- Valeur, B. (2004). Molecular Fluorescence Principles and Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Van Lier, J.E., Allen, C.M. and Sharman, W.M. (2001). "Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer." Journal of Porphyrins and Phthalocyanines **05**(02): 161-169.
- Wang, J., Wang, X., Song, Y., Zhu, C., Wang, J., Wang, K. and Guo, Z. (2013). "Detecting and delivering platinum anticancer drugs using fluorescent maghemite nanoparticles." Chemical Communications **49**(27): 2786-2788.
- Wróbel, D. and Boguta, A. (2002). "Study of the influence of substituents on spectroscopic and photoelectric properties of zinc phthalocyanines." Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry **150**(1-3): 67-76.
- Xie, J., Chen, K., Huang, J., Lee, S., Wang, J., Gao, J., Li, X. and Chen, X. (2010). "PET/NIRF/MRI triple functional iron oxide nanoparticles." Biomaterials **31**(11): 3016-3022.
- Yadav, S.K., Madeshwaran, S.R. and Cho, J.W. (2011). "Synthesis of a hybrid assembly composed of titanium dioxide nanoparticles and thin multi-walled carbon nanotubes using click chemistry." Journal of Colloid and Interface Science **358**(2): 471-476.
- Yanık, H., Aydın, D., Durmuş, M. and Ahsen, V. (2009). "Peripheral and non-peripheral tetrasubstituted aluminium, gallium and indium phthalocyanines: Synthesis, photophysics and photochemistry." Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry **206**(1): 18-26.
- Zhang, L., Peisert, H., Biswas, I., Knupfer, M., Batchelor, D. and Chassé, T. (2005). "Growth of zinc phthalocyanine onto ZnS film investigated by synchrotron radiation-excited X-ray photoelectron and near-edge absorption spectroscopy." Surface Science **596**(1-3): 98-107.



## Conclusion générale

Ce travail de thèse consistait à élaborer des nanohybrides à base de nanoparticules d'oxydes de fer (SPIO) et de nanotubes de titanate (TiONts) pouvant être utilisés comme agents de contraste bimodaux et comme nouveaux nanovecteurs à des fins théranostiques.

Plusieurs objectifs avaient été énoncés en introduction de ce travail :

### 1) Synthétiser des nanoparticules possédant des propriétés d'imagerie ou de thérapie

Des nanoparticules d'oxydes de fer et des nanotubes de titanate pour les applications ont été choisies. Dans un premier temps, par synthèse hydrothermale de type Kasuga, les nanotubes de titanate (TiONts) sont obtenus en partant de 440 mg de poudre rutile Tioxide® dans la soude à  $10 \text{ mol.L}^{-1}$  pendant 36 heures à  $155^\circ\text{C}$  sous agitation à 120 trs/min avec un réacteur laboratoire ( $V = 110 \text{ mL}$ ). Après purification par dialyse, puis par ultrafiltration, la suspension est analysée en microscopie électronique en transmission pour déterminer les caractéristiques morphologiques par comptage de 100 nanotubes. La longueur déterminée par ce comptage est de  $L = (156 \pm 53) \text{ nm}$ , le diamètre extérieur est  $d_{\text{ext}} = (9,1 \pm 1,3) \text{ nm}$  et le diamètre intérieur est de  $d_{\text{int}} = (3,8 \pm 0,6) \text{ nm}$ . Les dimensions obtenues pour chaque synthèse de TiONts sont similaires (20 synthèses au total). Ainsi, cette voie permet de produire des TiONts de morphologie désirée et de dimensions contrôlées. Cependant, la microscopie a aussi révélé la présence d'autres nano-objets tels que les nanorubans et les nanofeuilles dans des proportions moindres (inférieures à 5% en nombre). La surface spécifique déterminée par BET sur plusieurs synthèses de TiONts ( $n = 20$ ) est de  $S_{\text{BET}} = (163 \pm 25) \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ . Par ailleurs, un changement d'échelle a permis de produire plus de quantité de nanotubes ( $m = 1 \text{ g}$ ) à partir d'un réacteur commercial ( $V = 250 \text{ mL}$ ). Les TiONts synthétisés avec ce réacteur ont des dimensions similaires à ceux obtenus avec le réacteur laboratoire. De plus, la production des sous-produits (nanorubans et nanofeuilles) avec ce réacteur commercial est en proportion plus faible qu'avec le réacteur laboratoire ( $\leq 1\%$  d'impuretés contre 5%).

La résistance mécanique des nanotubes a été éprouvée par broyage planétaire avec des énergies faibles ( $150/-50$ )<sup>18</sup> et fortes ( $300/-600$ ) dans l'air et dans l'eau. Dans l'air, les conditions de broyage « douce » n'altèrent pas les nanotubes alors qu'en conditions « fortes » les nanotubes sont agglomérés et réduits en nanoplaques au bout de deux heures, constaté par observation au MET. En revanche, dans l'eau, en conditions « fortes » ( $300/-600$ ), les nanotubes ne sont pas altérés au bout de 48 heures, soulignant une résistance mécanique élevée des TiONts dans des conditions extrêmes.

Dans un second temps, l'obtention de nanoparticules d'oxydes de fer de structure spinelle (notées SPIO) est effectuée par méthode de co-précipitation dans de la soude avec un rapport  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+} = 1/2$ . Par analyse en diffraction des rayons X, la phase obtenue est la structure spinelle voulue avec un état d'oxydation entre celui de la magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) et celui de la maghémite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). La déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène a été déterminée par la méthode de Poix et conduit à une composition de formule  $\text{Fe}_{(1-0,035)}\text{O}_4$ . Par comptage de 100 nanoparticules en MET, le diamètre moyen a été estimé à  $d_{\text{MET}} = (9 \pm 2) \text{ nm}$ , corrélé par l'analyse en DRX et en BET. Leur surface spécifique est de l'ordre de  $S_{\text{BET}} = (92 \pm 1) \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ . Les nanoparticules d'oxydes de fer de structure spinelle obtenues présentent un comportement superparamagnétique à température ambiante.

L'association des deux types de nanoparticules par voie inorganique a été réalisée plus particulièrement par des variantes des méthodes de synthèse de type Kasuga en ajoutant une solution de sels de fer dans différents ratios. Après lavage par dialyse et par ultrafiltration, les

<sup>18</sup> Les valeurs ( $\Omega/\omega$ ) correspondent à des vitesses définies en tours par minute avec  $\Omega$ , la vitesse de rotation de plateau et  $\omega$ , la vitesse des jarres.

clichés en microscopie électronique en transmission montrent des nanoparticules d'oxydes de fer accrochées aux nanotubes de titanate. Le rapport [1 : 0,5] semble être celui qui fonctionne le mieux car, par des observations MET, plus de nanoparticules d'oxydes de fer sont assemblées aux nanotubes de titanate. La liaison entre les nanoparticules pourrait être de type covalent Fe – O – Ti et correspondrait donc à la liaison identifiée en XPS à 532,5 eV. Ces nanoparticules d'oxydes de fer de structure spinelle associées aux nanotubes de titanate confèrent à ce nouveau nanomatériau des propriétés magnétiques. Ainsi, la relaxivité, le pouvoir contrastant en IRM, a été mesurée par IRM et s'élève à environ  $80 \text{ L.mmolFe}_3\text{O}_4^{-1}.\text{s}^{-1}$ .

Les nanoparticules d'oxydes de fer et les nanotubes de titanate en sortie de synthèse, c'est-à-dire sans modification de surface ultérieure, ne sont pas stables en suspension dans les conditions physiologiques (pH = 7,4 ; 0,9% NaCl) et possèdent respectivement en surface un taux d'hydroxyles, estimé par analyses thermogravimétriques, de  $(6,7 \pm 0,6) \text{ OH/nm}^2$  et de  $(6 \pm 4) \text{ OH/nm}^2$ . Ces nano-objets nécessitent alors d'être modifiés en surface pour augmenter la stabilité de leur suspension colloïdale.

## 2) Préfonctionnalisation de la surface des nanoparticules par des ligands

L'instabilité des nanoparticules en conditions physiologiques empêche cependant leur utilisation telles quelles pour des applications biomédicales et a engendré toute une série de fonctionnalisation pour permettre leur utilisation.

Il a été ainsi nécessaire de préfonctionnaliser la surface des nanoparticules pour disposer d'une surface plus réactive. Pour cela, deux ligands ont été choisis : le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES, fonction  $\text{NH}_2$ ) et l'acide 6-phosphonohexanoïque (PHA, fonction  $\text{COOH}$ ) ont été utilisés pour modifier la surface des nanoparticules après synthèse. La modification se déroule dans un mélange  $\text{H}_2\text{O}$ /éthanol sous agitation ( $v = 400$  tours/min) et sous atmosphère inerte. La présence de ces ligands a été mise en évidence par les différentes techniques d'analyses (XPS, IR, zétamétrie) et un taux de recouvrement a été estimé par ATG. Les estimations sont de l'ordre de  $(5,0 \pm 0,7) \text{ NH}_2/\text{nm}^2$  et  $(5,3 \pm 0,6) \text{ COOH/nm}^2$  dans le cas des nanoparticules d'oxydes de fer et avoisinant  $(5,7 \pm 0,8) \text{ NH}_2/\text{nm}^2$  et  $(3,1 \pm 0,5) \text{ COOH/nm}^2$  pour les nanotubes.

Par DLS, la taille des agrégats des nanoparticules d'oxydes de fer préfonctionnalisées par les amines est d'environ 20 nanomètres et dans le cas des acides carboxyliques, la taille avoisine 70 nanomètres. Les nanoparticules préfonctionnalisées sont stabilisées par répulsion électrostatique à pH physiologique mais dans le cas de solutions à fortes forces ioniques la stabilité n'est pas conservée sauf dans le cas des nanotubes fonctionnalisés par le PHA. Cependant, la surface des nanoparticules a été modifiée et a permis d'obtenir des fonctions organiques plus réactives sur cette surface ce qui va permettre le couplage avec des molécules d'intérêt biologique comme des fluorophores ou des macrocycliques.

Les premiers essais de couplages organiques avec les nanoparticules préfonctionnalisées ont été réalisés entre elles pour essayer de développer un nouveau nanocomposite organique à base de nanotubes et de nanoparticules d'oxydes de fer noté TiONts – SPIO Orga. Pour cela, les couplages ont été réalisés dans l'eau en présence de NHS et d'EDC. Après observation en microscopie électronique en transmission, seul le couplage entre SPIO –  $\text{NH}_2$  et TiONts –  $\text{COOH}$  montre des nanoparticules d'oxydes de fer combinées aux nanotubes. Les suspensions ont été purifiées par décantation magnétique et ensuite fonctionnalisées par du PEG<sub>2000</sub> – Si. La présence du PEG a été mise en évidence par IR, XPS et par zétamétrie. D'après ces techniques le PEG<sub>2000</sub> – Si ne serait probablement greffé que sur les nanoparticules d'oxydes de fer préfonctionnalisées par l'APTES ; ceci est peut être dû à une meilleure affinité du PEG<sub>2000</sub> – Si avec le silane des SPIO –  $\text{NH}_2$  ou en raison d'une gêne stérique plus importante dans le cas des TiONts –  $\text{COOH}$  (PHA). La relaxivité mesurée sur des gels permet d'envisager la détection des nanohybrides TiONts – SPIO Orga en IRM.

### 3 et 4) Développer des agents de contraste bimodaux et des nanohybrides théranostiques

Des agents macrocycliques chélatants (DOTA et NOTA) ont ensuite été greffés à la surface des nanoparticules préfonctionnalisées par les amines. Le DOTA ou le NOTA sont des agents chélatants macrocycliques qui permettent de complexer des radioéléments comme l'indium 111 pour l'imagerie SPECT ou le gallium 64 pour l'imagerie TEP. Ce greffage se déroule dans un mélange THF/DMSO en présence d'agents macrocycliques qui possèdent un ester activé sous agitation magnétique ( $v = 400$  tours/min) et sous atmosphère inerte  $N_2$  à  $21^\circ C$  pendant 48 heures.

Dans le cas des nanotubes, le nombre de DOTA déterminé par ATG est de l'ordre de  $0,2 \text{ DOTA/nm}^2$  soit 800 DOTA par TiONts. Le radiomarquage des nanotubes a été effectué avec de l'indium 111 dans une solution d'acétate d'ammonium à  $pH = 3,5$  pendant 1h à  $80^\circ C$ . Après purification (centrifugation + compétition au DTPA), le radiomarquage a un rendement de 90% et possède une pureté radiochimique supérieure à 99%, déterminée par ITLC.

Ce nanohydrate radioactif TiONts – DOTA [ $^{111}In$ ] a été injecté à des souris mâles Swiss nude pour connaître sa biodistribution. Les images SPECT/CT et le comptage de la radioactivité dans chaque organe ont montré qu'au bout d'une heure, les nanotubes se situent principalement dans les poumons ( $58\%ID/g$ ), dans la vessie ( $37\%ID/g$ ) et dans une moindre mesure dans le foie et la rate. Au bout de 24 heures, les nanotubes ne sont plus présents que dans la vessie, avant d'être également éliminés par excrétion.

Dans le cas de nanoparticules d'oxydes de fer, le nombre d'agents macrocycliques estimé par ATG est de  $0,4 \text{ NOTA/nm}^2$  et de  $1,8 \text{ DOTA/nm}^2$ . Pour améliorer leur stabilité en suspension, les nanoparticules ont été fonctionnalisées avec du  $PEG_{3000} - NHS$  et un taux de greffage du PEG a été évalué dans les deux cas à  $0,2 \text{ PEG/nm}^2$  (pour  $0,4 \text{ NOTA/nm}^2$ ) et à  $0,6 \text{ PEG/nm}^2$  (pour  $1,8 \text{ DOTA/nm}^2$ ). Ainsi, le taux de greffage du PEG est sensiblement égal à la moitié du taux de NOTA et dans des proportions d'un tiers dans le cas du DOTA. Le PEG joue son rôle de stabilisateur stérique dans le cas des  $PEG - SPIO - NOTA$  car la suspension est stable en conditions physiologiques alors que la suspension  $PEG - SPIO - DOTA$  décante dans ces mêmes conditions. Les caractéristiques d'imagerie de ces nanohybrides ont été déterminées par IRM et sont de l'ordre de  $300 \text{ L.mmol}_{\text{nanohybride}}^{-1}.s^{-1}$  pour le greffage du DOTA et d'environ  $600 \text{ L.mmol}_{\text{nanohybride}}^{-1}.s^{-1}$  dans les cas du greffage avec le NOTA. Ainsi, les nanoparticules d'oxydes de fer pourront être utilisées en tant qu'agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique. La multimodalité *via* l'imagerie nucléaire reste à tester en complexant du gallium 64 ou de l'indium 111 à ces nanohybrides.

D'autre part, des fluorophores ont été greffés à la surface des nanoparticules préfonctionnalisées par deux voies : la voie peptidique et la voie chimie clic. Dans le premier cas, les nanotubes de titanate ont été fonctionnalisés par les phtalocyanine amine et acide carboxylique dans le DMSO en présence de DCC et de NHS sous atmosphère inerte  $N_2$  à  $21^\circ C$  pendant 48 heures. Un essai sans agent de couplage a permis de mettre en évidence que les phtalocyanines ne s'adsorbent pas à la surface des nanotubes. Ainsi, il a été possible d'estimer le taux de greffage des phtalocyanines à  $0,1 \text{ Pc/nm}^2$ .

Le manque de solubilité des phtalocyanines limite la stabilité en conditions physiologiques des nanohybrides. Le greffage par chimie clic a permis d'utiliser des phtalocyanines substituées par des groupements pyridinium rendant les phtalocyanines plus solubles dans l'eau. Pour réaliser la chimie clic, il a été nécessaire de modifier la surface des nanoparticules pour obtenir un azoture qui a réagi avec des phtalocyanines alcyne. L'azoture est greffé à la surface des nanoparticules par le biais d'un  $PEG - N_3$  dans un mélange THF/ $H_2O$  en présence de NHS et d'EDC pendant 48 heures sous atmosphère inerte à  $21^\circ C$ . La présence de l'azoture à la surface des nanoparticules a été mise en évidence par FTIR à

2110  $\text{cm}^{-1}$  mais aussi en XPS par l'augmentation de la concentration atomique en carbone et en azote. La réaction chimie clic est ensuite réalisée dans un mélange DMSO/ $\text{H}_2\text{O}$  en utilisant le cuivre (I) comme catalyseur pendant 24 heures sous atmosphère inerte  $\text{N}_2$  à 21°C. Les phtalocyanines sont mises en évidence par spectroscopie UV – Visible par la présence de leurs bandes Q entre 600 nm et 700 nm. De plus, l'augmentation des concentrations atomiques du carbone et de l'azote observée en XPS ainsi que l'écrantage des charges et le décalage des points isoélectriques en zêtamétrie à force ionique constante soulignent la présence des phtalocyanines à la surface des nanoparticules.

Le taux de greffage des phtalocyanines est estimé en ATG à 0,5  $\text{Pc}/\text{nm}^2$  dans le cas des nanotubes et à 2  $\text{Pc}/\text{nm}^2$  dans le cas des nanoparticules d'oxydes de fer. Cette nouvelle phtalocyanine plus hydrosoluble ralentit la décantation des nanohybrides en conditions physiologiques.

Des premiers essais avec du  $\text{PEG}_{2000}$  – Si ont été effectués dans un mélange eau/éthanol pour contrecarrer le manque de solubilité des phtalocyanines. La présence du  $\text{PEG}_{2000}$  – Si a été mise en avant par un écrantage des charges visible par zêtamétrie à force ionique constante et par la forte augmentation de la concentration atomique du carbone en XPS. Par ATG, le taux de PEG a été estimé à 0,8  $\text{PEG}/\text{nm}^2$ . Par contre, le  $\text{PEG}_{2000}$  – Si ne permet pas de mieux stabiliser des nanohybrides mais des premiers essais avec un  $\text{PEG}_{3000}$  – NHS, présentant une chaîne plus longue, sont prometteurs car la décantation des nanohybrides est diminuée.

Après excitation, les nanohybrides (nanotubes de titanate et nanoparticules d'oxydes de fer) qui émettent de la fluorescence vers 680 nm, longueur d'onde comprise dans la fenêtre optique idéale pour l'imagerie *in vivo*, pourront être utilisés en imagerie optique. En plus, la relaxivité des nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées par des phtalocyanines a été déterminé à  $r_2 = (73 \pm 4) \text{ L.mmolFe}_3\text{O}_4^{-1}.\text{s}^{-1}$ , ainsi le nanohybride à base de nanoparticules d'oxyde de fer a les propriétés pour être une sonde utilisable en imagerie bimodale IRM/IO.

## 5) Valider la biocompatibilité de ces nanohybrides par des tests *in vitro* et *in vivo*

Les premiers essais *in vivo* sur le modèle zebrafish montrent que les nanotubes nus, les nanoparticules d'oxydes de fer nues et le nanocomposite formé des deux n'induisent pas de toxicité mais aussi que l'éclosion ou le développement des embryons ne sont pas perturbés par la présence des nanoparticules pour une concentration testée de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

De même, les SPIO –  $\text{NH}_2$  et les TiONts –  $\text{NH}_2$  se sont révélés non toxiques et non perturbateurs pour le modèle zebrafish en éclosion et en développement. Des premiers tests de cytotoxicité, laquelle est évaluée *via* la cinétique de synthèse des ARN totaux dans des cellules HepG2, ont démontré la sensibilité de ce test par rapport aux tests conventionnels (MTT, MTS, etc.). Un effet cytotoxique a été mis en évidence en fonction de la dose dans le cas des SPIO –  $\text{NH}_2$ , la dose seuil en dessous de laquelle il n'y a pas de cytotoxicité a été déterminée à 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Les TiONts –  $\text{NH}_2$  ne présentent quant à eux pas de cytotoxicité dans la gamme 25 à 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

En revanche, les nanotubes fonctionnalisés par le PEG –  $\text{N}_3$ , puis les phtalocyanines (nanohybride intermédiaire) ralentissent l'éclosion des œufs de zebrafish bien que l'éclosion de tous les œufs se fasse au bout de 72 heures (l'éclosion des œufs du contrôle se fait sous 48 h). Cependant, Les nanotubes fonctionnalisés par le PEG –  $\text{N}_3$ , les phtalocyanines et le  $\text{PEG}_{2000}$  – Si (nanohybride final) ne perturbent pas le développement des embryons de zebrafish et n'induisent pas de toxicité pour une concentration testée de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

## Perspectives de ce travail

Une première perspective sera de synthétiser en plus grandes quantités des nanotubes de titanate. En effet, dans le réacteur laboratoire, la limite de production est actuellement de 1,3 grammes mais elle n'a pas été atteinte. Des synthèses futures avec les réacteurs laboratoire et commercial en augmentant la masse de précurseur rutile ( $440 \text{ mg} \times 5, \times 10$ ) pourront sûrement produire plusieurs grammes de nanotubes de titanate.

Concernant toujours les nanotubes de titanate, il serait intéressant de connaître leur taux d'hydrogène pour déterminer la composition exacte des nanotubes. Une collaboration avec l'Institut de Chimie des Milieux et Matériaux de Poitiers (IC<sub>2</sub>MP) a été initiée pour déterminer le taux d'hydrogène par échange isotopique avec du deutérium. Par cette technique, il devrait être possible de remonter au taux d'hydrogène des TiONts et proposer une composition plus juste des nanotubes de titanate.

Il serait également intéressant d'étudier les nanotubes de titanate par résonance magnétique nucléaire du solide de plusieurs éléments comme le titane, le sodium et le proton pour affiner la structure des nanotubes de titanate.

D'une part, des tests de toxicité *in vitro* et *in vivo* devront être poursuivis pour déterminer ou confirmer la concentration seuil de toxicité des nanohybrides.

D'autre part, la biodistribution *in vivo* des agents de contraste bimodaux pour l'IRM/TEP ou l'IRM/SPECT devra être déterminée.

La solubilité des phtalocyanines dans l'eau devra également être améliorée avec, par exemple, l'ajout de groupements pyridine qui seront probablement protonés ( $\text{ZnPc}(\text{Pyrr})_8, \text{xHCOOH}$ ). Les premières synthèses de phtalocyanines sont en cours et permettent déjà de produire des phtalocyanines A<sub>4</sub> très solubles dans l'eau comme le souligne le spectre d'absorption réalisé dans l'eau (Figure 222).

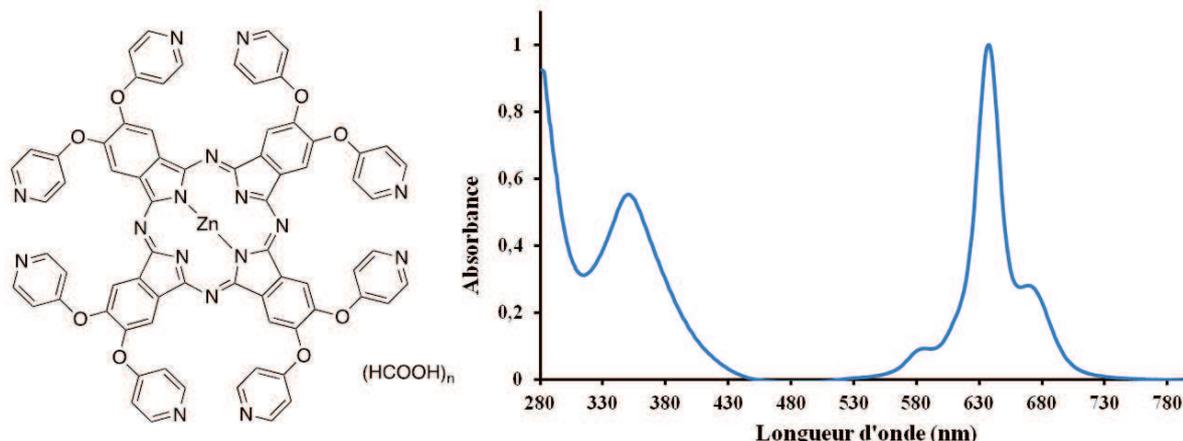


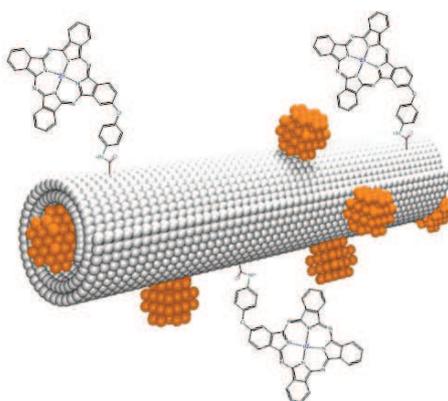
Figure 222. Représentation de la phtalocyanine hydrosoluble ainsi que son spectre d'absorption dans l'eau

La plus importante perspective est bien entendu de tester la partie thérapeutique des nanohybrides théranostiques développés dans un premier temps pour de l'imagerie *in vitro* et ensuite *in vivo*. Il serait intéressant de connaître l'effet des nanoparticules d'oxydes de fer seules en hyperthermie et celle de nanotubes de titanate en radiothérapie.

La création d'un nouveau nanocomposite a permis d'associer les propriétés des deux types de particules et il serait fort intéressant de connaître le comportement de ce nanocomposite en thérapie associée (hyperthermie plus radiothérapie).

De plus, d'autres nanohybrides développés dans ce travail peuvent être utilisés en bithérapie comme les sondes théranostiques réalisées à partir de phtalocyanines de zinc. En effet, ces dernières peuvent être utilisées en thérapie photodynamique (PDT). Associées aux nanoparticules d'oxydes de fer, il serait avantageux de tester la bithérapie hyperthermie/PDT. D'ailleurs, il serait également intéressant de connaître l'effet de la bithérapie radiothérapie/PDT du nanohybrides nanotubes de titanate fonctionnalisés par des phtalocyanines.

La trithérapie est aussi envisageable si les phtalocyanines sont greffées aux TiONts – SPIO Orga par le biais des fonctions carboxylates à la surface des TiONts. Les premiers essais de couplages sont en cours (*Figure 223*).



*Figure 223. Représentation schématique du nanocomposite fonctionnalisé par les phtalocyanines*

## Valorisation de ce travail

### Publications

N°	Titre	Auteurs	Revue
P1	<i>One step continuous hydrothermal synthesis of very fine stabilized superparamagnetic nanoparticles of magnetite</i>	L. Maurizi, F. Bouyer, <u>J. Paris</u> , F. Demoisson, L. Saviot, N. Millot	<i>Chem. Commun.</i> <b>47</b> , 11706 (2011)
P2	<i>Magneto-Optical Nanomaterial: towards a step-by-step SPIO-Phthalocyanine scaffold with a view to bimodal imaging p</i>	J. Boudon, <u>J. Paris</u> , Y. Bernhard, E. Popova, R. Decréau, N. Millot	<i>Chem. Commun.</i> <b>49</b> (67), 7394 – 7396 (2013)
P3	<i>Titanate Nanotubes : A New Nanocarrier Detectable in Optical Imaging</i>	<u>J. Paris</u> , Y. Bernhard, J. Boudon, C. Chassagnon, O. Heintz, R. Decréau, N. Millot	<i>A soumettre en courant 2014</i>
P4	<i>Radiolabelling and biodistribution study of titanate nanotubes</i>	R. Mayap Talom, <u>J. Paris</u> , J. Boudon, C. Bernhard, F. Denat, A. Oudot, B. Collin, N. Millot	<i>A soumettre en courant 2014</i>
P5	<i>Continuous synthesis of spinel structured iron oxide nanoparticles without base under supercritical water conditions: influence of iron cations and citrates ratios</i>	L. Maurizi, F. Bouyer, J. Paris, M. Ariane, N. Millot	<i>A soumettre en courant 2014</i>
P6	<i>Titanate nanotubes with inherently high thermal and mechanical stability</i>	A.L. Papa, <u>J. Paris</u> , L.L. Hütsch, L. Saviot, N. Millot	<i>A soumettre en courant 2014</i>

### Communications orales (présentées par la personne dont le nom est souligné)

N°	Titre	Auteurs	Congrès
O1	<i>Nanotubes d'oxydes de titane fonctionnalisés : une plateforme multifonctionnelle potentielle pour le diagnostic et la thérapie</i>	<u>J. Boudon</u> , J. Paris, A.L. Papa, C. Mirjolet, P. Maingon, L. Dumont, D. Vandroux, N. Millot	<b>Nanohybrides 8, Bastia, 5-9 juin 2011</b>
O2	<i>Functionalized Titanate Nanotubes: a Potential Versatile Platform for Diagnostic and Therapeutics</i>	J. Boudon, J. Paris, A.L. Papa, C. Mirjolet, P. Maingon, L. Dumont, D. Vandroux, <u>N. Millot</u>	<b>UK Colloids, Londres, 3-5 juillet 2011</b>
O3	<i>XPS study of steric and electrostatic stabilization of iron oxide nanoparticles and titanate nanotubes</i>	<u>O. Heintz</u> , L. Maurizi, J. Paris, J. Boudon, F. Bouyer, N. Millot	<b>ECASIA'11, Cardiff, 4-9 septembre 2011</b>
O4	<i>Fonctionnalisation de nanotubes d'oxydes de titane pour des applications en imagerie médicale : apport de l'XPS</i>	<u>J. Paris</u> , O. Heintz, J. Boudon, R. Mayap Talom, Y. Bernhard, C. Bernhard, R. Decréau, F. Denat, N. Millot	<b>ELSPEC 2012, Louvain La Neuve (Belgique), 22-25 mai 2012</b>
O5	<i>Multimodal SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Versatile Probes for the in Vivo Imaging of specific pathologies</i>	<u>J. Boudon</u> , J. Paris, L. Maurizi, Y. Bernhard, R. Decréau, P. Walker, N. Millot	<b>Word Molecular Imaging Congress, Dublin, 5-8 septembre 2012</b>
O6	<i>Biodistribution Study of a Novel Theranostic Versatile Platform Composed of Surface-modified Titanate Nanotubes</i>	<u>J. Boudon</u> , J. Paris, R. Mayap Talom, A-L Papa, M Moreau, C Bernhard, Y Bernhard, R Decréau, F. Denat, P. Walker, A. Oudot, A. Courteau, J.-M. Vrigneaud, B. Collin, N. Millot	<b>International Conference on Nanotechnology in Medicine, Londres, 7-9 novembre 2012</b>

<b>O7</b>	<i>Bimodal Contrast Agents for the in Vivo Imaging: The Elaboration of Functionalized SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles</i>	<u>J. Paris</u> , J. Boudon, Y. Bernhard, R. Decréau, R. Mayap Talom, L. Maurizi, F. Bouyer, P. Walker, L. Dumont, D. Vandroux, F. Denat, N. Millot	<b>International Conference on Nanotechnology in Medicine, Londres, 7-9 novembre 2012</b>
<b>O8</b>	<i>Development of a novel theranostic versatile platform from titanate nanotubes: Study of their biodistribution</i>	J. Boudon, J. Paris, R. Mayap Talom, <u>F. Bouyer</u> , A.-L. Papa, M. Moreau, C. Bernhard, Y. Bernhard, R. Decréau, F. Denat, P. Walker, A. Oudot, A. Courteau, J.-M. Vrigneaud, B. Collin, N. Millot	<b>Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, Sorrento, 3-7 mars 2013</b>
<b>O9</b>	<i>Functionalized titanate nanotubes and iron oxide nanoparticles for the in vivo imaging: contribution of XPS</i>	<u>O. Heintz</u> , J. Paris, J. Boudon, N. Millot	<b>6<sup>th</sup> International Symposium on Practical Surface Analysis, 10-15 novembre 2013, Okinawa (Japon)</b>

Communications par affiche (présentée par la personne dont le nom est souligné)

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Auteurs</b>	<b>Congrès</b>
<b>A1</b>	<i>Protein grafting on nanometer-sized metallic oxides for biomedical applications in the field of cardiovascular diseases</i>	<u>J. Boudon</u> , J. Paris, V. Bellat, A.-L. Papa, D. Vandroux and N. Millot	<b>Hybrid Materials, Strasbourg 6-10 mars 2011</b>
<b>A2</b>	<i>Synthèse de nanotubes d'oxydes de titane marqués par des USPIO en vue d'applications diagnostic et thérapeutiques</i>	<u>J. Paris</u> , J. Guichard, J. Boudon, A.-L. Papa, N. Millot	<b>Journée "Particules, Molécules et Surfaces", 1<sup>er</sup> avril 2011, Besançon</b>
<b>A3</b>	<i>Synthèse de nanotubes d'oxydes de titane marqués par des USPIO en vue d'applications diagnostic (IRM) et thérapeutiques (radiosensibilisant)</i>	<u>J. Paris</u> , J. Guichard, J. Boudon, A.-L. Papa, N. Millot	<b>Nanohybrides 8, Bastia, 5-9 juin 2011</b>
<b>A4</b>	<i>Functionalized titanate nanotubes for applications in medical imaging</i>	<u>J. Boudon</u> , J. Paris, R. Decreau, C. Bernhard, F. Denat, N. Millot	<b>Particles 2011, Berlin, 9-12 juillet</b>
<b>A5</b>	<i>Functionalized titanate nanotubes as a potential versatile platform for theranostic</i>	<u>R. Mayap Talom</u> , J. Boudon, J. Paris, B. Collin, N. Millot	<b>Colloids and Nanomedicine 2012, Amsterdam, juillet</b>
<b>A6</b>	<i>Iron oxide nanoparticles as multimodal probes for in vivo imaging</i>	J. Paris, <u>R. Mayap Talom</u> , J. Boudon, L. Maurizi, Y. Bernhard, R. Decréau, P. Walker, C. Bernhard, F. Denat, N. Millot	<b>Colloids and Nanomedicine 2012, Amsterdam, 15-17 juillet 2012</b>
<b>A7</b>	<i>Functionalized titanate nanotubes as a new versatile platform for theranostic application</i>	<u>J. Boudon</u> , R. Mayap Talom, J. Paris, A.L. Papa, C. Bernhard, R. Decréau, Y. Bernhard, F. Denat, D. Vandroux, P. Walker, C. Mirjolet, A. Oudot, B. Collin and N. Millot	<b>Word Molecular Imaging Congress, Dublin, 5-8 septembre 2012</b>

A8	<i>Syntheses of phthalocyanines and subphthalocyanines for multimodal imaging</i>	Y. <u>Bernhard</u> , J. Paris, J. Boudon, N. Millot, R. Decréau	<b>3<sup>rd</sup> French-Czech Vltava Chemistry Meeting, Dijon, 10-11 septembre 2012</b>
A9	<i>Nanomaterial-based Multimodal Contrast Agents for in Vivo Imaging: Advanced Surface-modified SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles</i>	J. Paris, J. Boudon, Y. Bernhard, R. Decréau, L. Maurizi, <u>F. Bouyer</u> , P. Walker, L. Dumont, D. Vandroux, F. Denat, N. Millot	<b>Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, Sorrento, 3-7 mars 2013</b>

## Récapitulatif des taux de greffages des différentes molécules sur les deux types de nanoparticules

	Nanohybrides	Molécules	molécules/nm <sup>2</sup>	μmol/nm <sup>2</sup>
<b>TiONts</b>	<b>TiONts</b>	OH	6 ± 4	9,97 ± 6,6
	<b>TiONts - NH<sub>2</sub></b>	NH <sub>2</sub>	5,7 ± 0,8	9,25 ± 1,3
	<b>TiONts - COOH</b>	COOH	3,1 ± 0,5	5,15 ± 0,8
	<b>TiONts - DOTA</b>	DOTA	0,2	0,33
	<b>PEG - TiONts - DOTA</b>	PEG	0,05	0,08
	<b>TiONts(NH<sub>2</sub>) - Pc</b>	Pc alcyne	0,4	0,66
	<b>TiONts - PcNH<sub>2</sub></b>	PcNH <sub>2</sub>	0,1	0,17
	<b>TiONts(COOH) - Pc</b>	Pc alcyne	0,6	0,99
	<b>TiONts - PcCOOH</b>	PcCOOH	0,15	0,25
<b>SPIO</b>	<b>SPIO</b>	OH	6,7 ± 0,6	11,1 ± 1,0
	<b>SPIO - NH<sub>2</sub></b>	NH <sub>2</sub>	5,0 ± 0,7	8,3 ± 1,2
	<b>SPIO - COOH</b>	COOH	5,3 ± 0,6	8,8 ± 1,0
	<b>SPIO - DOTA</b>	DOTA	1,8	2,99
	<b>PEG - SPIO - DOTA</b>	PEG	0,6	0,99
	<b>SPIO - NOTA</b>	NOTA	0,4	0,66
	<b>PEG - SPIO - NOTA</b>	PEG	0,2	0,33
	<b>SPIO - Pc</b>	Pc alcyne	2	3,3

## Annexes

### Annexe n°1 : Liste des appareils utilisés

	Appareil	Caractéristiques
Synthèse TiONts	Réacteur Laboratoire Réacteur commercial Parr	V = 110 mL V = 250 mL
Broyage	PULVERISETTE P4 FRITSCH	Jarres et billes en WC
BET	BELSORP	Molécule sonde : N <sub>2</sub> Désorption : 100°C pendant 24 heures pour les TiONts, 150°C pendant 16 heures pour les SPIO P = 0,05 mbar (poudre)
Diffusion de la lumière et zétamétrie	Zetasizer Nano ZS (Malvern)	Mesure de taille et potentiel zêta (NaCl : 10 <sup>-2</sup> M) Logiciel : DTS (nano) V 7.2 (suspension)
FTIR	Bruker IFS 28	Logiciel : OPUS V3.1 3 mg de poudre broyée dans 150 mg de KBr
MET	JEOL JEM - 2100 LaB <sub>6</sub>	Résolution 0,25 nm ; 200 kV (suspension)
ICP	ThermoScientific cAP 6000 series ICP Spectrometer	2 mg dissout dans un mélange HCl/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [5 : 1] solutions diluée à 1/10 et 1/50
Magnétométrie	M2100 PPMS (Versailles)	T = 77 K à 15 kOe (poudre) T = 353 K à 13 kOe (poudre)
ATG	TGA Discovery	5°C/min jusqu'à 800°C ; 25 mL/min N <sub>2</sub> 1-5 mg d'échantillon (poudre)
UV – Visible	Shimadzu UV – 2550	Cuvette en Quartz (260 à 800 nm) Logiciel : UV-Probe 2.34 (suspension)
XPS	PHI Versaprobe 5000	Al K $\alpha$ (1486,6 eV ; spot size 200 $\mu$ m) Logiciel : CasaXPS V 2.2 102 Dépôts de poudre sur feuille d'indium
Raman	RENISHAW inVia	LASER : 532 nm (poudre) Enregistrement : 1s $\times$ 100
DRX	Siemens D5000	$\lambda$ (Cu K $\beta$ ) = 1,39222 Å (poudre)
Fluorescence	Jasco FP-8500	Excitation à 600 nm (suspension) Absorbance à 600 nm comprise entre 0,03 et 0,07
Analyse élémentaire	Thermo Electron Flash EA 1112 Series	Dosage sur poudre de C, N et H (poudre)

## Annexe n°2 : Informations obtenues par diffraction des Rayons X

(Tiré du cours « Méthodes d'analyses et de caractérisations des solides » du Prof. N. Millot Université de Bourgogne, version de mai 2010)

Une analyse soignée des diffractogrammes permet d'accéder à diverses caractéristiques d'un matériau cristallisé :

- la position des raies nous permet de remonter à la phase cristalline et à ses paramètres de maille,
- la forme des raies nous informe sur la taille des domaines cohérents de diffraction et au taux de défauts de structure présents dans l'échantillon,
- l'intensité relative des raies nous permet de remonter à la teneur des différentes phases cristallines d'un mélange, à la position des différents atomes dans la maille cristalline. Elle peut être aussi influencée par des phénomènes de texturation.

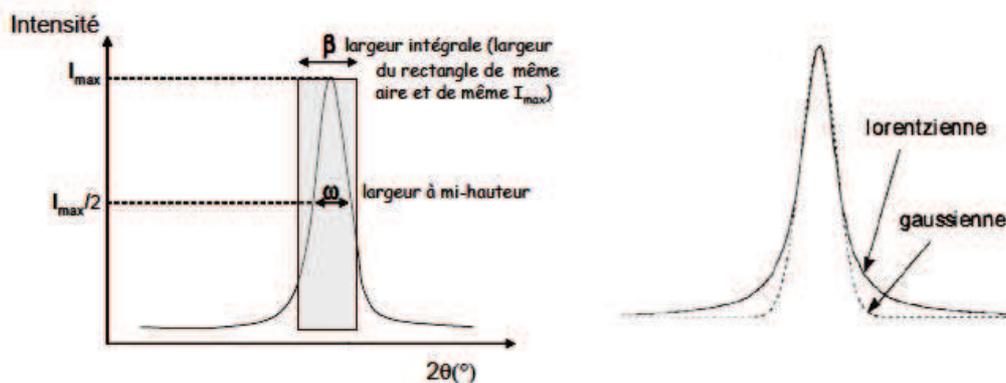
### Analyse de profils de raies

Un élargissement des raies de diffraction est observé:

- lorsque les cristaux de l'échantillon ne satisfont pas à l'hypothèse du cristal infini (cristaux nanométriques)
- lorsque les cristaux présentent des défauts cristallins (dislocations, mâcles...)

#### Méthode de Scherrer

Nombreux sont encore à ce jour les travaux où la taille des particules est déterminée à partir des profils des raies de diffraction par cette méthode.



$$d = \frac{180\lambda}{\pi\omega \cos\vartheta}$$

Avec  $d$ , la taille des cristallites ;

$\lambda$ , la longueur d'onde du rayonnement incident ;

$\omega$ , la largeur à mi hauteur de la raie de diffraction ;

$\theta$ , l'angle de diffraction.

Des modèles plus élaborés, dépendants de la nature du profil des raies de diffraction ont été développés : les méthodes d'Halder et Wagner et de Williamson et Hall

### Correction instrumentale

Afin de procéder à l'analyse microstructurale d'un matériau et d'accéder aux informations contenues dans le profil d'une raie de diffraction, il est nécessaire de remonter au profil vrai de la raie. Pour cela il faut déconvoluer le profil expérimental du profil instrumental. La courbe de résolution instrumentale a pour but de quantifier la déformation, en termes d'élargissement, que subit un signal lorsqu'il est enregistré. Chaque appareil a sa propre résolution qui peut dépendre des conditions de réglage et du domaine d'enregistrement. La correction instrumentale sur l'élargissement des raies est déterminée à l'aide d'un matériau de référence : BaF<sub>2</sub> recuit. Ce matériau est supposé parfait (taille des grains importante et pas de microdistorsions).

Pour remonter au profil vrai de la raie, il faut alors déconvoluer le profil expérimental du profil instrumental. Si ces profils sont lorentziens, la déconvolution est simple :

$$\beta_{\text{vrai}} = \beta_{\text{exp}} - \beta_{\text{inst}}$$

Avec  $\beta$ , la largeur intégrale de la raie de diffraction.

Si les profils sont de Voigt, l'approximation de Wagner est utilisée :

$$\beta_{\text{vrai}} = \sqrt{\beta_{\text{vrai}}^2 - \beta_{\text{exp}} \times \beta_{\text{inst}}}$$

### Méthode d'Halder & Wagner

C'est la méthode appropriée au profil de Voigt des raies de diffraction. L'élargissement des profils de raies dû au matériau est alors calculé de la façon suivante :

$$\left(\frac{\beta_{\text{vrai}}^*}{d^*}\right)^2 = \frac{1}{\varepsilon} \times \frac{\beta_{\text{vrai}}^*}{d^{*2}} + \left(\frac{\eta}{2}\right)^2$$

Avec  $\beta$ , la largeur intégrale ;

$\varepsilon$ , le paramètre lié à la taille ou à la forme des particules,

$\eta$ , le paramètre lié aux contraintes.

$\beta^* = \beta \cos \theta / \lambda$  et  $d^* = 2 \sin \theta / \lambda$  sont les coordonnées réduites dépendant de l'angle de diffraction  $\theta$  et de la longueur d'onde du rayonnement  $\lambda$ . La taille apparente des domaines cohérents de diffraction  $\varepsilon$  (ou la taille des cristallites égale à  $4/3 \varepsilon$  si les grains sont sphériques) et le taux de défauts de structure  $\left(\frac{\eta}{5}\right)$  sont déduits des diagrammes d'Halder et Wagner tracés à partir de l'équation précédente. Les incertitudes sur ces paramètres découlent du coefficient de régression linéaire de la droite d'Halder et Wagner.

### Méthode de Williamson & Hall

Cette méthode est utilisée dans le cas d'un profil de raies lorentzien. L'élargissement des profils de raies dû au matériau est calculé de la façon suivante :

$$\beta_{\text{vrai}}^* = \frac{1}{\varepsilon} + \eta \times d^*$$

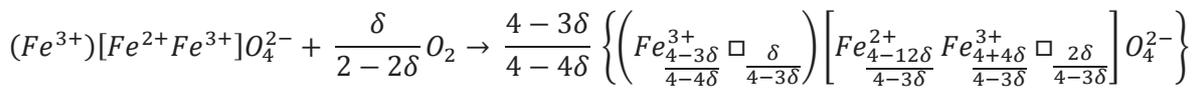
La taille des domaines cohérents de diffraction ( $\varepsilon$ ) et le taux de défauts de structure ( $\eta \times d^*$ ) sont déduits des diagrammes de Williamson et Hall tracés à partir l'équation précédente. Les incertitudes sur ces paramètres découlent, là encore, du coefficient de régression linéaire de la droite de Williamson et Hall.

Si les points de ce diagramme ne s'alignent pas : il faut alors regarder les différentes ordonnées à l'origine des droites tracées par famille d'harmoniques. On a alors des dimensions différentes selon les directions cristallographiques : les grains ne sont pas sphériques (phénomène observé pour des matériaux issus de traitements mécaniques par exemple).

### *Évaluation de la déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène ( $\delta$ ) avec la méthode de Poix*

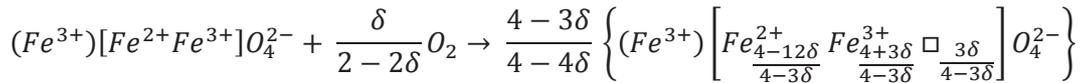
$\delta$  est la déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène. Dans le cas de la magnétite,  $\delta$  est donc reliée aux taux de cations  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ .

Par la méthode de Poix, il est possible d'estimer  $\delta$ . En suivant cette notation, l'oxydation de la magnétite ( $Fe_3O_4$ ) peut s'écrire sous la forme d'une fixation d'oxygène et de création de nouvelles entités structurales :



Cependant, des cations  $Fe^{3+}$  migrent des sites octaédriques vers les sites tétraédriques de manière à ce qu'il n'apparaisse des lacunes cationiques que dans les sites octaédriques.

Ainsi, la réaction globale d'oxydation devient :



$\square$  représente une lacune,  $()$  et  $[\ ]$  indiquent respectivement les sites tétraédriques et octaédriques et  $\frac{4-3\delta}{4-4\delta}$  correspond au nombre d'unités de structure présentes à un état d'oxydation donné.

En mesurant le paramètre de maille par diffraction des rayons X, il est possible par la méthode de Poix d'obtenir la déviation  $\delta$ .

On peut ainsi définir une distance tétraédrique moyenne  $d_4$  et une distance octaédrique moyenne  $d_6$  :

$$d_4 = \sum x_i d_{Ai-O}$$

$$d_6 = \sum x_i d_{Bi-O}$$

où  $x_i$  est la teneur en cation  $i$  dans ce site,  $d_{Ai-O}$  la distance du cation  $i$  – oxygène et  $d_{Bi-O}$  la distance du cation  $i$  – oxygène.

Selon Poix, le paramètre de maille d'une structure spinelle est relié aux distances cations – anions par la formule:

$$a = \frac{40}{11\sqrt{3}}d_4 + \frac{64}{11}d_6^2 - \frac{512}{363}d_4^2$$

Chaque distance caractéristique d'un cation est définie suivant l'état de valence et de coordination et est unique.

Cations	Distance cation - anion (nm)
Fe <sup>3+</sup> tétraédrique	0,1858
Fe <sup>3+</sup> octaédrique	0,202
Fe <sup>2+</sup> octaédrique	0,2132
□	0,22394

Tableau 78. Distances caractéristiques moyennes cation – anion définies pour les sites tétraédriques et octaédriques et utilisées pour le calcul par la méthode de Poix du paramètre  $\delta$  d'après (Belin 2002) et (Guigue-Millot 1998). □ représente les lacunes en sites octaédriques.

Les distances  $d_4$  et  $d_6$  ont donc les valeurs suivantes et peuvent être injectées dans l'équation reliant  $\delta$  au paramètre de maille. Ainsi, en connaissant le paramètre de maille de  $\text{Fe}_{3(1-\delta)}\text{O}_4$ , il est possible de retrouver  $\delta$ .

$$d_4 = 0,18580$$

$$d_6 = \frac{0,8304 - 0,6403\delta}{4 - 3\delta}$$

A titre d'exemple :

$$\begin{array}{llll} \delta_0 \text{ de la magnétite} = 0 & \rightarrow & \text{Fe}_{3(1-0)}\text{O}_4 = \text{Fe}_3\text{O}_4 & a = 8,396 \text{ \AA} \\ \delta_{\text{max}} \text{ de la maghémite} = 1/9 = 0,111 & \rightarrow & \text{Fe}_{3(1-0,111)}\text{O}_4 & a = 8,345 \text{ \AA} \end{array}$$

### Annexe n°3 : Analyses thermogravimétriques

Les analyses thermogravimétriques des nanoparticules ou des nanohybrides se déroulent de 30°C à 800°C avec une montée en température de 5°C/minute sous flux de N<sub>2</sub> (25 mL/min). Les courbes ont été normalisées à 150°C pour une meilleure comparaison.

#### Pour les SPIO :

Le taux de recouvrement des hydroxyles peut être mesuré à partir de la relation suivante :

$$N_{OH} = \frac{2.(\Delta m).N_a}{M_{H_2O}.S_{BET}.10^{18}} \quad (\text{Équation 1})$$

Avec  $N_{OH}$ , le nombre d'hydroxyle par nm<sup>2</sup> ;  $\Delta m$  la perte de masse entre 300°C et 800°C ;  $N_a$ , le nombre d'Avogadro (mol<sup>-1</sup>) ;  $M_{H_2O}$ , la masse molaire de l'eau (g.mol<sup>-1</sup>) et  $S_{BET}$ , la surface spécifique des SPIO (92 ± 1 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>) déterminée par BET.

#### Pour les TiONts :

Le taux de recouvrement des hydroxyles peut être mesuré à partir de la relation suivante :

$$N_{OH} = \frac{2.(\Delta m).N_a}{M_{H_2O}.S_{BET}.10^{18}} \quad (\text{Équation 1})$$

Avec  $N_{OH}$ , le nombre d'hydroxyle par nm<sup>2</sup> ;  $N_a$ , le nombre d'Avogadro (mol<sup>-1</sup>) ;  $M_{H_2O}$ , la masse molaire de l'eau (g.mol<sup>-1</sup>) et  $S_{BET}$ , la surface spécifique des TiONts (163 ± 25 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>) déterminée par BET. La perte de masse  $\Delta m$  est comprise entre la température où l'eau physisorbée a fini de dégazer (après la deuxième inflexion) et 800°C. Cette température de dégazage de l'eau physisorbée varie pour chaque synthèse de nanotubes (Tableau 79).

T°C	Δm à T°C	Δm à 800°C	Δm entre T°C et 800°C	OH/nm <sup>2</sup>
369	-0,132278	-0,138546	0,6%	2,6
349	-0,125564	-0,133448	0,8%	3,2
363	-0,125964	-0,134497	0,9%	3,5
333	-0,13371	-0,168563	3,5%	14,3
336	-0,122033	-0,144817	2,3%	9,3
320	-0,111262	-0,137435	2,6%	10,7
315	-0,152454	-0,176625	2,4%	9,9
354	-0,132129	-0,138904	0,7%	2,8
376	-0,130615	-0,142942	1,2%	5,1
366	-0,124899	-0,133261	0,8%	3,4
370	-0,126961	-0,131668	0,5%	1,9
379	-0,114213	-0,138999	2,5%	10,2
370	-0,152621	-0,157481	0,5%	2,0
370	-0,129083	-0,133585	0,5%	1,8
368	-0,136983	-0,143052	0,6%	2,5

Tableau 79. Caractéristiques des ATG des synthèses de TiONts. La température de dégazage est représentée par la colonne T°C.

**Pour les nanohybrides :**

Cette technique permet d'estimer le taux de greffage des molécules organiques liées à la surface des nanoparticules en appliquant la formule :

$$N_{\text{Molécules}} = \frac{(\Delta m_{\text{calcul}}) \cdot N_A}{M_{XX} \cdot S_{\text{BET}} \cdot 10^{18}} \quad (\text{Équation 3})$$

Avec  $N_{\text{Molécules}}$ , le nombre de molécules par  $\text{nm}^2$  ;  $\Delta m$ , la perte de masse entre  $150^\circ\text{C}$  et  $800^\circ\text{C}$  (%);  $M_{XX}$ , la masse molaire considérée de la partie organique ( $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ );  $S_{\text{BET}}$ , la surface spécifique des nanoparticules nues et  $N_A$ , le nombre d'Avogadro ( $\text{mol}^{-1}$ ).

Le taux de greffage peut être aussi donné en  $\text{mol}/\text{m}^2$  par l'équation suivante :

$$t_R = \frac{\Delta m_{\text{calcul}}}{M_{XX} \cdot S_{\text{BET}}} \quad (\text{Équation 11})$$

Avec  $t_R$ , le taux de recouvrement en  $\text{mol}/\text{m}^2$ .

**Incertitude :**

Les incertitudes des résultats ATG ont été calculées sur un nombre d'échantillons représenté par **n** dans les tableaux. Le Tableau 80 regroupe le nombre d'échantillons ayant été utilisés pour l'estimation du taux de greffage (ou d'hydroxyles) par ATG à la surface des nanoparticules.

	<b>n</b>
<b>SPIO</b>	7
<b>SPIO – NH<sub>2</sub></b>	13
<b>SPIO – COOH</b>	10
<b>TiONts</b>	15
<b>TiONts – NH<sub>2</sub></b>	17
<b>TiONts – COOH</b>	8

Tableau 80. Nombre d'échantillons ayant servi pour le calcul des incertitudes pour l'estimation du nombre de molécules à la surface des nanoparticules

**Présentation des résultats :**

Les estimations des taux de recouvrement sont présentées sous forme de tableau.

<b>Références</b>	<b><math>\Delta m</math> totale (%)</b>	<b><math>\Delta m</math> calcul (%)</b>	<b>Masse molaire à considérer pour la perte (<math>\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}</math>)</b>	<b>Molécules/<math>\text{nm}^2</math></b>	<b>R (%)</b>	<b>n</b>
-------------------	---	---	---	---	------------------	----------

Avec  $\Delta m$  totale (%), la perte de masse des échantillons :

entre  $300^\circ\text{C}$  et  $800^\circ\text{C}$  pour les SPIO ;

entre  $T^\circ\text{C}$  et  $800^\circ\text{C}$  pour les TiONts ;

entre  $150^\circ\text{C}$  et  $800^\circ\text{C}$  pour les nanohybrides.

Avec  $\Delta m$  calcul (%), la perte de masse utilisée pour le calcul ;

Molécules/ $\text{nm}^2$ , le nombre de molécules par  $\text{nm}^2$  ;

R (%), le rendement de la fonctionnalisation par rapport au nombre de fonctions disponibles initialement ; et n, le nombre d'échantillons ayant permis le calcul du taux de recouvrement et son incertitude.

### Annexe n°4 : Potentiel zêta des nanoparticules (d'après Maurizi 2010)

Les nanoparticules mises en suspension créent un système bi-phasique avec une interface solide/liquide. C'est à cette interface que vont apparaître des phénomènes influençant la stabilité des nanoparticules. Les cations en surface vont pouvoir compléter leurs charges avec les molécules d'eau environnantes et ainsi être hydratés. Une couche d'eau sera ainsi chimisorbée formant des groupements hydroxyles (OH) à la surface. D'autres molécules d'eau seront physisorbées et entraînées avec la nanoparticule dans son mouvement. Ces molécules, immobilisées par un réseau de liaisons hydrogène, vont former la couche compacte de Stern.

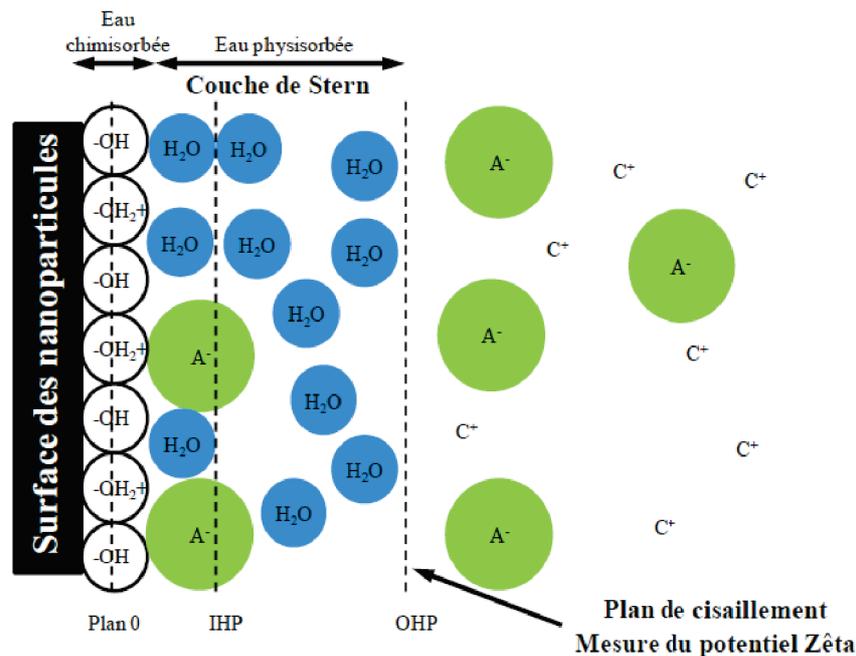


Figure 224. Représentation schématique de l'adsorption de l'eau sur une surface d'oxyde de fer.

$A^-$  représentent les anions et  $C^+$  les cations en solution.  
IHP : plan interne de Helmholtz et OHP : plan externe de Helmholtz.

Les groupements hydroxyles formés en surface présentent des propriétés acido-basiques qui vont charger les particules.

Il faut distinguer le point isoélectrique (**PIE**) du point charge nulle (**PCN**) qui sont deux notions différentes. Le terme PCN est utilisé quand la charge de surface s'annule par l'absence de charge et le terme PIE est employé quand la charge de surface s'annule par compensation des charges on parle de PIE.

La couche de Stern se sépare en double couche (Figure 224 et Figure 225) :

1) une première couche est composée d'ions ayant une affinité particulière pour la surface. Parce qu'ils sont fortement hydratés, ils préservent l'ordre local du milieu et peuvent donc s'approcher davantage de la surface jusqu'au niveau de la surface (on dit qu'ils sont spécifiquement adsorbés). Ces ions neutralisent partiellement la charge de surface des particules par interactions électrostatiques (un cation s'adsorbe sur une surface négative et un anion sur une positive). Ces ions sont éloignés de la surface jusqu'à un plan interne de Helmholtz (IHP) (distance de l'ordre de l'Angström).

2) La deuxième partie de la couche de Stern est une couche de diffusion. Une partie de cette couche suit le mouvement de la nanoparticule. Elle est incluse dans la couche de Stern jusqu'au plan de cisaillement nommé plan externe de Helmholtz (OHP). Son épaisseur appelée longueur de Debye ( $\kappa^{-1}$ ) est de l'ordre de la dizaine d'Angströms (Jolivet 1994) et peut être calculée par l'équation suivante :

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\delta \cdot R \cdot T}{2000 \cdot I \cdot e^2 \cdot N_a}} \quad (\text{Équation 12})$$

Avec :  $\delta$  la permittivité relative, R la constante des gaz parfaits, T la température absolue en Kelvin,  $N_a$  la constante d'Avogadro, e la charge électrique en Coulomb et I la force ionique défini par :  $I = \frac{1}{2} \sum C_i z_i^2$  avec  $z_i$ , la charge de l'espèce i et  $C_i$  sa concentration.

L'épaisseur de la couche diffuse de Stern dépend de la force ionique. Plus le milieu est concentré en sel, plus la couche diffuse est faible (force ionique élevée) et plus la taille hydrodynamique de la particule est proche de la taille « réelle ».

La couche de Stern augmente ainsi la taille de la particule nue expliquant la différence entre la mesure d'un diamètre MET et celle d'un diamètre hydrodynamique qui prend en compte la double couche ionique qui est souvent de l'ordre de plusieurs dizaines d'Angströms

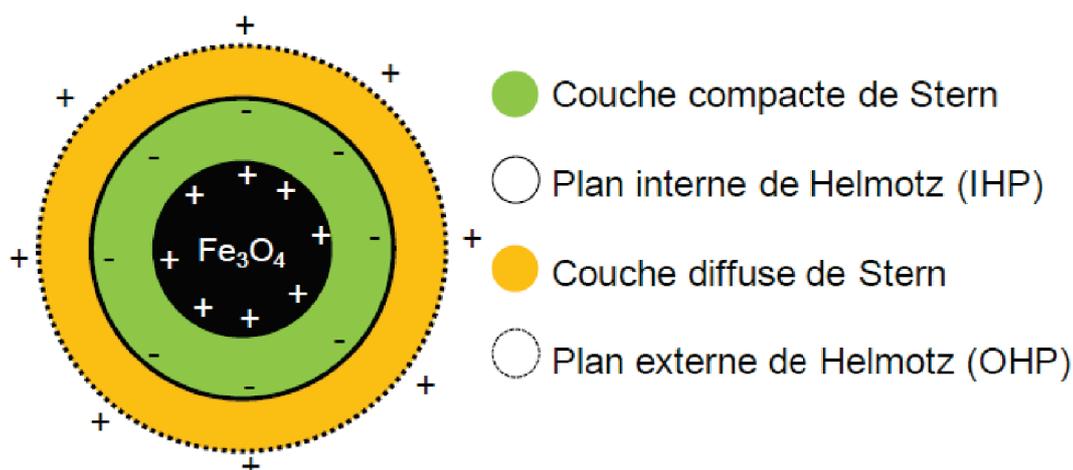


Figure 225. Représentation de la double couche électronique entourant une nanoparticule

Les valeurs données pour le potentiel zêta sont des valeurs moyennes calculées sur un nombre d'échantillons représenté par **n**.

	<b>n</b>
<b>SPIO</b>	7
<b>SPIO – NH<sub>2</sub></b>	13
<b>SPIO – COOH</b>	10
<b>TiONts</b>	6
<b>TiONts – NH<sub>2</sub></b>	12
<b>TiONts – COOH</b>	6

Tableau 81. Nombre d'échantillons ayant servi pour le calcul des valeurs moyennes et des incertitudes en zétamétrie

## Annexe n°5 : Détermination de la taille par DLS

La taille des agrégats en suspension est déterminée par la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS). Cette technique est fondée sur la mesure du mouvement brownien des particules dans un solvant car ceux-ci sont aléatoires en raison de l'interaction causée par l'agitation thermique entre les molécules du solvant et les particules. C'est une technique d'analyse spectroscopique (d'où son autre nom, spectroscopie par corrélation de photons, PCS) non destructive permettant de mesurer la taille de particules en suspension d'un nanomètre à quelques micromètres.

L'équation de Stokes-Einstein considère la vitesse de déplacement des particules par le coefficient de diffusion translationnel  $D$  comme proportionnelle au diamètre hydrodynamique  $d_H$  d'un grain sphérique :

$$d_H = \frac{k.T}{3.\pi.\eta.D} \quad (\text{Équation 13})$$

Avec  $d_H$  le diamètre hydrodynamique (en nm),  $k$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température (en K),  $\eta$  la viscosité (en centiPoise, cP) et  $D$  le coefficient de diffusion translationnel.

Le diamètre hydrodynamique est défini par la somme du diamètre de la particule et de sa double couche ionique. Pour éviter les variations de la couche ionique dépendant de la force ionique du milieu, les mesures ont été faites dans une solution de chlorure de sel à  $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup>.

Les diamètres sont mesurés en intensité mais seront donnés ici en nombre pour refléter au mieux la réalité car d'après Rayleigh, l'intensité diffusée est fonction du diamètre à la puissance 6 ( $d^6$ ). Donc, les plus grosses particules vont largement diffuser par rapport aux plus petites et ainsi entraîner une surestimation du diamètre des particules.

## Annexe n°6 : Procédure de calcul de la relaxivité sur les gels d'IRM

Pour un échantillon, une série de six concentrations en nanoparticules de 1, 3, 5, 7, 10 et de 20 mg.L<sup>-1</sup> est préparée et est répétée trois fois soit au total 18 tubes contenant les nanoparticules piégées dans le gel d'acrylamide. Les nanoparticules ont été mélangées à la solution d'acrylamide, la réaction a été amorcée par 15 µL de TEMED et par 20 µL d'une solution de PSA (10% massique). Les gels sont ensuite placés à 60°C pendant 10 minutes. Après cette étape les gels sont formés et homogènes. Les relaxivités ont été exprimées par rapport aux concentrations de fer quelles que soient les modifications de surface utilisées.

Les tubes contenant le mélange de nanoparticules piégées dans le gel d'acrylamide sont analysés grâce à l'IRM clinique à 32 temps d'échos T<sub>E</sub> différents allant de 8,5 à 272 ms avec un pas de 8,5 ms pour un temps de relaxation T<sub>2</sub>. Plus le temps d'écho sera élevé, plus le contraste sera négatif (noir) pour un temps de relaxation T<sub>2</sub> (Figure 226).

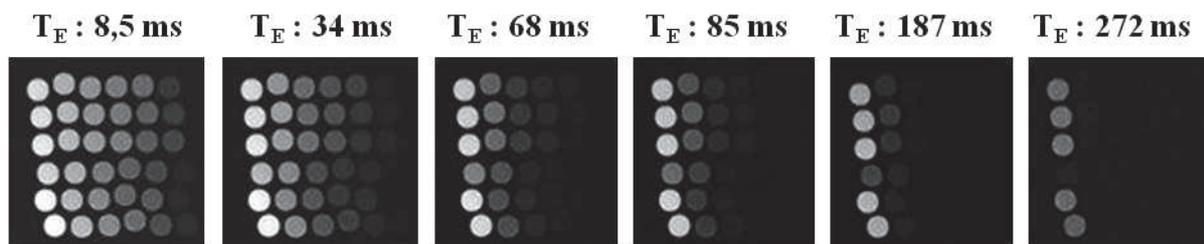


Figure 226. Coupe IRM T<sub>2</sub> de 2 échantillons de nanotubes – SPIO pour 6 temps d'écho dans une IRM clinique de 3T

Grâce au logiciel Image J, les mesures des niveaux de gris (noté S) sont déterminés pour chaque tube et pour les 32 temps d'échos (avec 0 pour le noir absolu et 2047 pour le blanc pur et donc 2048 niveaux de gris). En traçant, les niveaux de gris en fonction des temps d'écho (Figure 227), il est possible de trouver un temps de relaxation T<sub>2</sub> (en ms) d'après l'équation :

$$S_{T_E} = S_0 \cdot e^{-\left(\frac{T_E}{T_2}\right)} + \varepsilon \quad (\text{Équation 14})$$

Avec S<sub>T<sub>E</sub></sub>, le contraste à un T<sub>E</sub> donné ; S<sub>0</sub>, le contraste à T<sub>E</sub> = 0 (l'ordonnée à l'origine) et ε, le bruit de fond de la mesure.

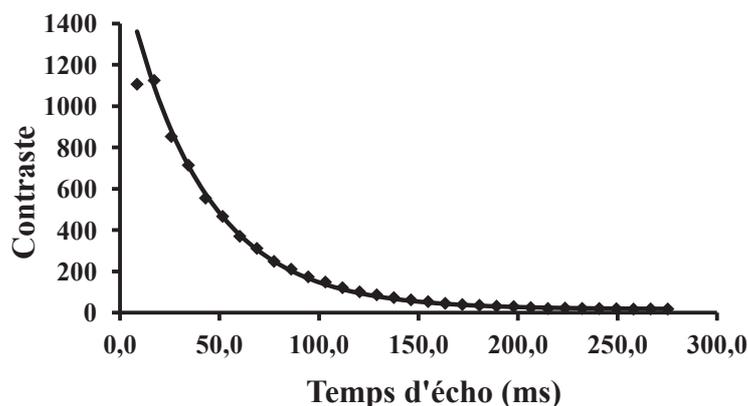


Figure 227. Courbe du contraste d'un tube analysé dans une IRM clinique 3T en fonction des temps d'écho des mesures.

Par cette méthode et pour les 6 concentrations en fer, les mesures des temps T<sub>2</sub> sont obtenues. A partir des temps de relaxation T<sub>2</sub> (ou l'inverse, noté R<sub>2</sub> en s<sup>-1</sup>), la relaxivité r<sub>2</sub>'

(coefficient directeur de la droite) peut être déterminée en fonction de la concentration en fer (Figure 228) par l'équation de la droite suivante :

$$R_2 = r_2' \cdot C + R_2^0 \quad (\text{Équation 115})$$

Avec  $r_2'$  la relaxivité ( $\text{L} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) et  $R_2^0$ , le taux de relaxation en absence d'agent de contraste

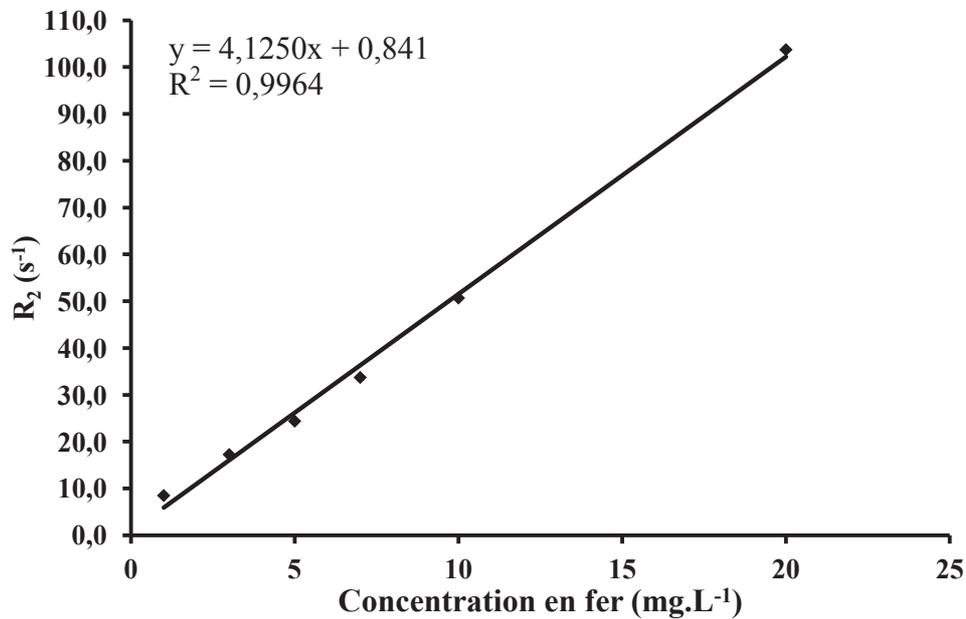


Figure 228. Courbe de relaxation  $R_2$  en fonction de la concentration en en fer

Pour finir, il faut ramener la relaxivité  $r_2$  par rapport au nombre de fer de la magnétite par l'équation suivante :

$$r_2 = \frac{r_2' \times M_{\text{Fe}_3\text{O}_4}}{3} \quad (\text{Équation 16})$$

Avec  $r_2$ , la relaxivité par rapport au nombre de fer de la magnétite ( $\text{L} \cdot \text{mmolFe}_3\text{O}_4^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) ;  
 $r_2'$ , le coefficient directeur de la courbe de relaxation  $R_2$  ;  
 et  $M_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$ , la masse molaire de la magnétite ( $M = 231,5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ )

Par exemple, ici,  $r_2' = 4,1250 \text{ L} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  soit  $r_2 = 318 \text{ L} \cdot \text{mmolFe}_3\text{O}_4^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  par rapport à la quantité de fer dans la magnétite.

## **Annexe n°7 : Le modèle *in vivo* : le zebrafish**

Le poisson-zèbre est un poisson d'eau douce originaire d'Asie (Inde, Pakistan, Bangladesh, Népal). On le trouve dans des plans d'eaux stagnantes, les rivières à faible courant et les rizières. Les embryons du poisson zèbre, transparents et se développant en dehors de la mère, ont fait du poisson zèbre un outil puissant pour l'étude du développement des poissons, et par extension, celui des vertébrés. Aujourd'hui, la communauté scientifique l'utilise aussi pour mieux comprendre les mécanismes cellulaires fondamentaux qui s'opèrent lors de la propagation de certaines maladies, telles que le cancer. De plus, ses excellentes capacités reproductives (ponte en abondance toute l'année) et les conditions d'élevage simple, en facilitent l'utilisation.

Ponte des œufs (récupération dans milieu d'embryon + comptage)

### **Rappel :**

Pas de déchoriation (dégradation totale de l'enveloppe entourant les œufs) :

- ✓ les pores du chorion font entre 300 nm et 1 µm, permettant le passage des nanoparticules
- ✓ La déchoriation est un paramètre de toxicologie (éclosion)

Pas de bleaching (stérilisation) des œufs, car cela durcit le chorion (enveloppe), ce qui rend plus difficile l'éclosion et l'évaluation de ce paramètre.

### **Protocole :**

t = 0 (4h après la ponte)

10 embryons par puits X 6 par chaque condition :

- ✓ Contrôles non traités + 1 mL de milieu d'embryon (eau Volvic)
- ✓ Nanoparticules : 1 mL suspension à 50µg/ml

Incubation pendant 24h à 28°C.

24h, 48h et 72h : Observation sous microscope, retrait des morts, changement du milieu d'embryon pour le contrôle et des suspensions pour les nanoparticules.

## Annexe n°8 : Protocole du test de cinétique de synthèse des ARN totaux sur le modèle cellulaire HepG2

### Jour 1

A partir d'une flasque T25 ou T75 à 80% de confluence, ensemercer deux microplaques 96 puits → 50 000 cellules HepG2 par puits soit une concentration de  $2,5 \times 10^5$  cellules.mL<sup>-1</sup>. Placer les microplaques à l'incubateur ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$  et  $5 \pm 1\%$  CO<sub>2</sub>) pendant 24h.

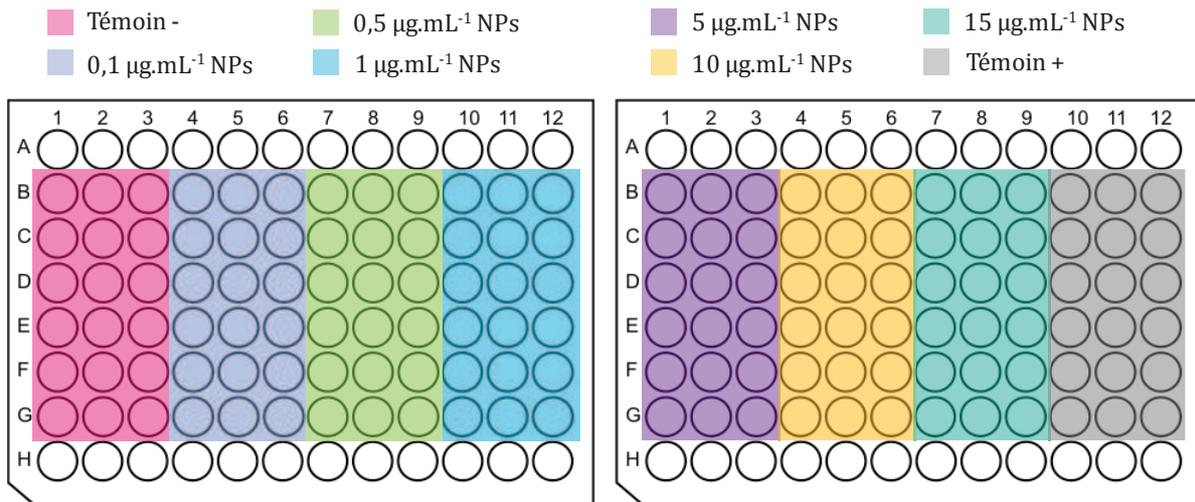
### Jour 2

Préparation des gammes de traitement en conditions stériles :

- Préparation des suspensions de nanoparticules
  - Solution mère de NPs à  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (700  $\mu\text{L}$ ) → 592  $\mu\text{L}$  suspension de NPs de départ à  $118,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$  + 108  $\mu\text{L}$  MEM 10x complet (0,5% SVF). La solution mère formée est mélangé aux ultrasons (canne US, 5 min, 750W) pour limiter le phénomène d'agrégation des NPs.
  - Préparation des solutions filles de NPs

Concentration suspension NPs	Volume suspension NPs	Volume solution mère NPs à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Volume MEM 1x complet (0,5% SVF)
$0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$	2 mL	2 $\mu\text{L}$	1998 $\mu\text{L}$
$0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$	2 mL	10 $\mu\text{L}$	1990 $\mu\text{L}$
$1 \mu\text{g.mL}^{-1}$	2 mL	20 $\mu\text{L}$	1980 $\mu\text{L}$
$5 \mu\text{g.mL}^{-1}$	2 mL	100 $\mu\text{L}$	1900 $\mu\text{L}$
$10 \mu\text{g.mL}^{-1}$	2 mL	200 $\mu\text{L}$	1800 $\mu\text{L}$
$15 \mu\text{g.mL}^{-1}$	2 mL	300 $\mu\text{L}$	1700 $\mu\text{L}$

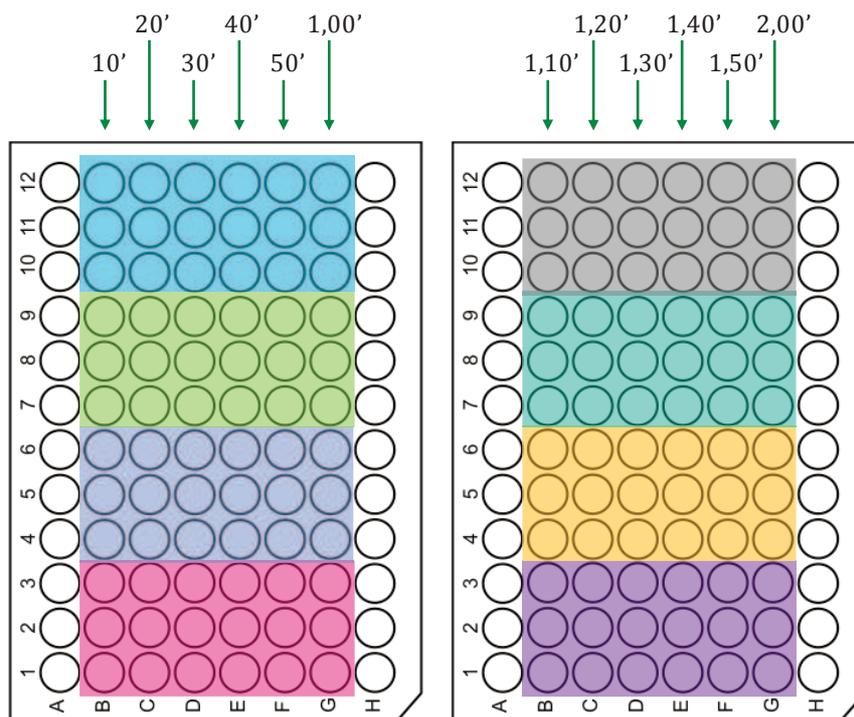
- Préparation des témoins
  - Témoin – (2 mL pour 1 plaque) → 320  $\mu\text{L}$  MEM 10x (0,5% SVF) + 1680  $\mu\text{L}$  eau stérile.
  - Témoin + (2 mL pour 1 plaque) → 310  $\mu\text{L}$  MEM 10x (0,5% SVF) + 1690  $\mu\text{L}$  eau stérile + 2  $\mu\text{L}$  dichromate de potassium (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) à  $2,9 \text{ mg.mL}^{-1}$  (composé cytotoxique reconnu).
- Traitement des cellules (réalisé à Jour 3 dans le cas d'un traitement de 4h)
  - Observer les cellules au microscope pour contrôler leur morphologie et leur développement. A ce stade, les cellules doivent former un tapis cellulaire adhérent aux alentours de 50% de confluence et doivent être en phase exponentielle de croissance.
  - Éliminer le milieu de culture par retournement des plaques sur du papier absorbant.
  - Introduire 100  $\mu\text{L}$ /puits de suspensions de nanoparticules (cf. schéma).



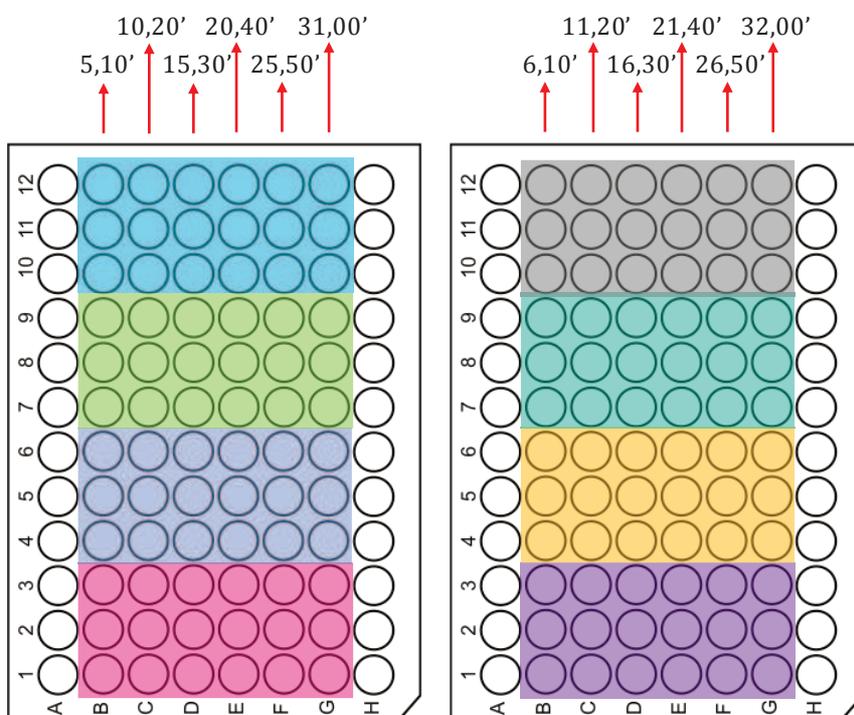
- Replacer les microplaques à l'incubateur ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $5 \pm 1\%$  de  $\text{CO}_2$ ) pour une durée de 24h.

### **Jour 3**

- Préparation de l'uridine tritiée en conditions stériles
  - 6 mL pour 2 plaques → 6 mL MEM 1x + 60 µL d'uridine tritiée (attention solution radioactive).
- Préparation des cellules
  - Observer les cellules au microscope. Une croissance d'au moins 50% des cellules témoin négatif doit être observable (tapis cellulaire à 80 ~ 90% de confluence).
  - Éliminer le milieu de traitement par retournement.
  - Rincer les cellules avec 50 µL/puits de PBS (pipette multicanaux x8).
  - Éliminer le milieu de rinçage par retournement.
  - Introduire 50 µL/puits de MEM 1x préchauffé à  $37^\circ\text{C}$  (pipette multicanaux x8).
- Cinétique
  - Placer les 2 microplaques sur une table chauffante ( $37^\circ\text{C}$ ) et vibrante (vitesse 2).
  - A  $t = 10$  s, introduire 30 µL d'uridine tritiée dans tous les puits de la première colonne (pipette multicanaux x12) puis avancer d'une colonne toutes les 10 s (cf. schéma).



- Après 5, 10, 15, 20, 25 et 30 min, enlever le milieu contenant l'uridine (pipette multicanaux x12 réglée sur 200  $\mu$ L main droite) puis ajouter instantanément 30  $\mu$ L/puits de SDS (sodium dodecylsulfate) à 3% (pipette multicanaux x12 main gauche) pour arrêter la réaction (cf. schéma).



- Laisser reposer 5 minutes.

- Transfert dans plaques à filtre
  - Ajouter 100µL/puits de TCA (acide trichloroacétique) à 20% permettant de lyser les cellules dans les plaques à filtre placées sur les modules de filtration (pipette multicanaux x12).
  - Transférer le contenu des puits des microplaques dans lesquelles ont eu lieu la cinétique dans les plaques à filtre (pipette multicanaux x 6 réglée sur 100 µL).
  - Ajouter 50 µL/puit de TCA (pipette multicanaux x12) au dessus du lysat cellulaire de façon à prendre en sandwich les acides nucléiques.
  - Laisser reposer 10 minutes pour que les acides nucléiques précipitent.
  - Filtrer sous vide à l'aide du système Integra Vacusafe.
  - Rincer les filtres avec 300 µL d'éthanol froid (à faire 2 fois).
  - Placer les plaques à l'étuve (50°C) pour les sécher.

#### **Jour 4**

- Lecture des plaques et comptage
  - Éteindre l'étuve et attendre environ 1h pour que les plaques reviennent à température ambiante.
  - Coller un adhésif backseal sous la plaque à filtre.
  - Introduire 30 µL/puits de liquide microscintillant (pipette multicanauxx12).
  - Sceller le dessus de la plaque à filtre à l'aide d'un adhésif topseal.
  - Poser la plaque sur le lecteur Topcount (Packard) et appuyer sur start (compter 1h30 à 2h de lecture).
  - Jeter la plaque dans la poubelle à déchets radioactifs.

#### **Analyse des résultats**

La vitesse de synthèse d'ARN est linéaire pendant 30 minutes. La cinétique comprend 6 points et chaque point correspond aux valeurs moyennées de 3 puits. La vitesse d'incorporation de l'uridine tritiée est déterminée en calculant la pente de la droite de régression correspondant aux valeurs expérimentales obtenues. La pente de la droite de l'échantillon est alors rapportée à celle obtenue pour le témoin négatif, arbitrairement fixée à 100%. Le résultat est donc exprimé en % de synthèse d'ARN par rapport au témoin négatif. Le résultat est considéré comme positif si le pourcentage de synthèse d'ARN par rapport au témoin négatif est égal ou inférieur à 70%. Ce test est répété 3 fois ( $n = 3$ ) puis les résultats sont moyennés et leurs déviations standards illustrant les variabilités inter et intra population inhérentes au test sont calculées. Dans le cas d'une étude réalisée sur une gamme de concentration, les coefficients directeurs des droites de régression en pourcentage sont exprimés dans un histogramme permettant de mettre en évidence l'évolution de la cytotoxicité par un effet dose.

## Annexe n°9 : Principe de la PDT

Lorsque le photosensibilisant est soumis à la lumière, il passe de son niveau fondamental (état triplet) à l'état singulet excité (1). Le retour à l'état initial peut se faire de différentes manières (Figure 229) :

- par émission de fluorescence (2)
- par désexcitation non radiative (3)

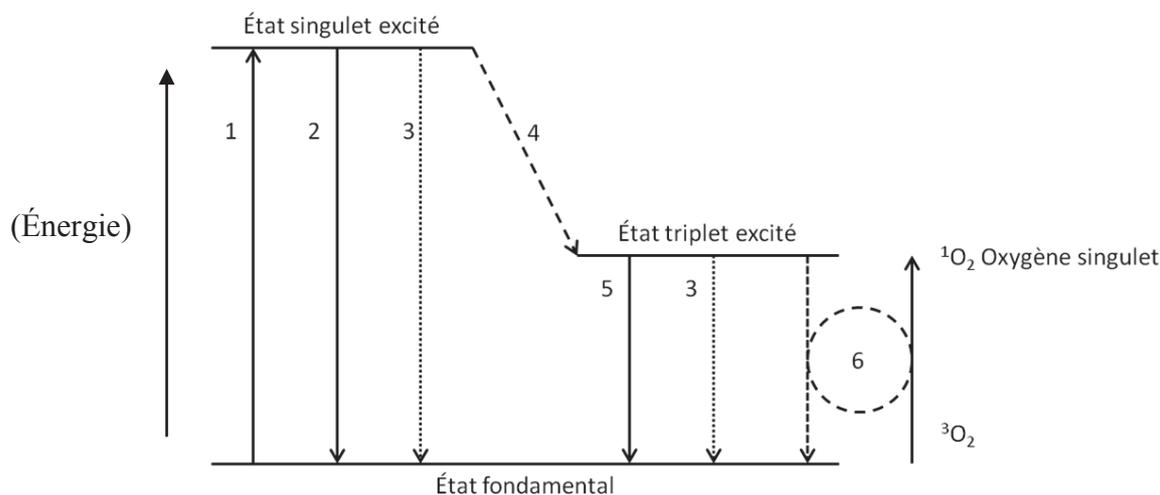


Figure 229. Diagramme simplifié de Jablonski

Cependant, le photosensibilisant peut passer de son état singulet excité à un état triplet excité par conversion intersystème (4). De même, le retour à l'état fondamental peut suivre différentes voies :

- par émission de phosphorescence (5)
- par désexcitation non radiative (3)
- par transfert d'énergie non radiatif à l'oxygène triplet environnant  $^3\text{O}_2$  (mécanisme de type II) ou à des radicaux environnant (mécanisme de type I) (6)

Le résultat du transfert d'énergie de l'état triplet excité du photosensibilisant vers une molécule d'oxygène produit une molécule réactive, l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$ . Cette molécule est une espèce cytotoxique qui réagit rapidement et entraîne une oxydation cellulaire pour aboutir à la mort cellulaire. C'est ce mécanisme de type (II) qui prédomine lors de la PDT. Ce mécanisme est possible car l'oxygène possède un niveau de base triple et des niveaux excités de faible niveau énergétique.

Le rendement quantique de formation d'oxygène singulet est donné par la relation suivante, qui n'est valable que si la molécule de référence et le fluorophore sont étudiés dans le même solvant (Yanik *et al.* 2009) :

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta_{ref}} \cdot \frac{R_{ref}}{R} \cdot \frac{A}{A_{ref}} \quad (\text{Équation 17})$$

Avec :

- $\Phi_{\Delta}$  et  $\Phi_{\Delta_{ref}}$ , le rendement quantique de formation d'oxygène singulet de l'échantillon et de la référence ;

- $R$  et  $R_{ref}$ , l'absorbance de la molécule de dosage en présence de l'échantillon et de la référence après irradiation<sup>19</sup> ;
- $A$  et  $A_{ref}$ , l'absorbance de l'échantillon et de la référence ;

Le cation métallique complexé dans la cavité des phtalocyanines a son importance car celui-ci joue un rôle sur les propriétés optiques et thérapeutiques des phtalocyanine et ainsi toutes les phtalocyanines ne peuvent pas être utilisées à des fins thérapeutiques comme la phtalocyanine de cuivre ou de fer. En revanche, la phtalocyanine de zinc a un excellent rendement de production de l'oxygène singulet (Tableau 82).

Photosensibilisant	$\Phi_{\Delta}$
ZnPc	0,50
AlPc	0,34
H <sub>2</sub> Pc	0,14
CuPc	0
FePc	0

Tableau 82. Rendement de la production d'oxygène singulet pour diverses phtalocyanines dans le DMSO selon (Manneville 2006)

L'état triplet excité du photosensibilisant peut par ailleurs réagir selon un autre type de mécanisme, un mécanisme de type (I). Ce phénomène implique l'élimination d'un atome d'hydrogène ou un transfert d'électron permettant la création de radicaux libres, ce qui induit la formation d'espèces oxygénées réactives (ROS : Reactive Oxygen Species). Quand la concentration en oxygène diminue ou dans des milieux polaires, les réactions de type (I) deviennent plus importantes et produisent des ROS comme des anions superoxydes ou des radicaux hydroxyles. Par exemple, la phtalocyanine de zinc permet la création des ROS selon ces mécanismes :

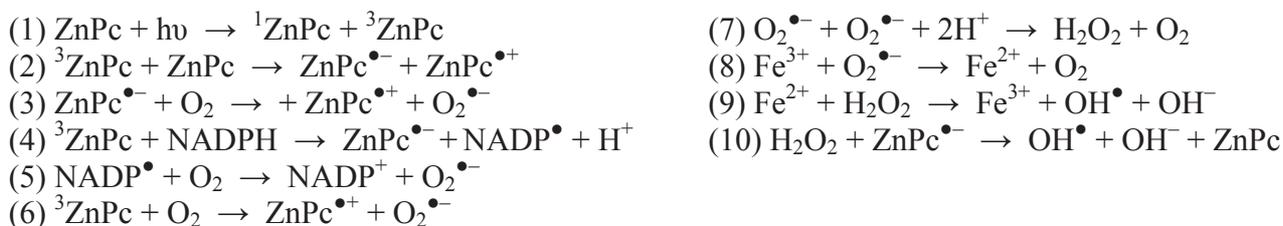


Figure 230. Mécanisme de production de l'ion superoxyde (à gauche)<sup>20</sup> et du radical hydroxyle (à droite) d'après (Hadjur et al. 1997)

Le photosensibilisant peut générer de grandes quantités d'espèces réactives car il retourne à chaque fois à l'état fondamental, pouvant être de nouveau excité. Cependant, il peut être dégradé par la lumière, ce qui n'est pas le cas des phtalocyanines car elles ont une faible cinétique de photoblanchiment.

<sup>19</sup> Ce taux est mesuré par un dosage en spectroscopie UV – visible en ajoutant une molécule (DPBF, le plus souvent) qui en réagissant avec l'oxygène singulet possède une perte de fluorescence.

<sup>20</sup> La production peut avoir lieu en présence de donneur d'électron comme le nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADPH) ou le glutathion (GSH).

## Annexe n°10 : Publication

ChemComm

RSC Publishing

COMMUNICATION

View Article Online  
View JournalMagneto-optical nanomaterials: a SPIO-phthalocyanine scaffold built *step-by-step* towards bimodal imaging†

Cite this: DOI: 10.1039/c3cc41898g

Received 13th March 2013,  
Accepted 21st June 2013

DOI: 10.1039/c3cc41898g

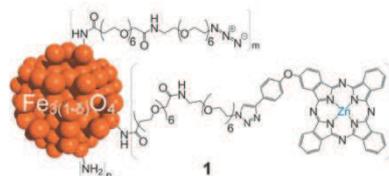
www.rsc.org/chemcomm

Julien Boudon,<sup>a</sup> Jérémy Paris,<sup>a</sup> Yann Bernhard,<sup>b</sup> Elena Popova,<sup>c</sup>  
Richard A. Decréau<sup>\*b</sup> and Nadine Millot<sup>\*a</sup>

A SPIO-phthalocyanine nanohybrid is developed as a bimodal contrast agent for Optical and Magnetic Resonance Imaging. The organic coating was covalently attached onto SPIO in a *step-by-step* approach. Each coated-SPIO was thoroughly characterized. The hydrodynamic size of the SPIO-Pc is ca. 60 nm with a coverage of ca. 690 Pc/SPIO.

Bimodal Medical Imaging relying on Magnetic Resonance Imaging (MRI),<sup>1</sup> coupled to Optical Imaging (OI),<sup>2</sup> may improve the accuracy of a diagnosis<sup>3</sup> by combining the sensitivity of OI<sup>4</sup> and the resolution of MRI.<sup>5</sup> Reported hybrid MRI-OI probes bear MRI and OI imaging probes, but their design does not usually address either of the following issues: (a) the *difference in sensitivity* between the two methods (mM– $\mu$ M for MRI compared with nM–pM for OI) is not addressed when a fluorophore is bound to one MRI-active metal complex (1 : 1 ratio),<sup>4</sup> but is more relevant when the probe (Cy5.5, fluorescein, rhodamine) is immobilized on nanoparticles (NPs) (CLIO, SPIO, Gd-doped NPs), because it contains multiple paramagnetic centers;<sup>4–6</sup> (b) the *photostability* of fluorophores; (c) a *step-by-step* construction of reported magneto-optical nanohybrids was not carried out, hence the precise composition of the coating on the nanoparticle may not be accurate enough. Conjugate 1 may overcome these drawbacks: (a) combining Super Paramagnetic Iron Oxide (SPIO;  $T_2$ -weighted MRI contrast agents)<sup>6,7</sup> and the zinc phthalocyanine fluorophore (ZnPc)<sup>8</sup> together in a single bimodal contrast agent may better address the *difference in sensitivity* between MRI and OI (a favorable ratio of one optical probe per a large number of magnetic probes). ZnPc has appealing optical properties:<sup>8</sup> (i) an absorption band in the 650–800 nm region where light penetration in tissues is the greatest

(*i.e.* the so-called imaging window);<sup>3</sup> (ii) a fluorescence quantum yield ( $\Phi_f$  (ZnPc) = 0.3) in the range of known fluorophores,<sup>9</sup> and a high molar extinction coefficient ( $\epsilon = 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), resulting in high brightness ( $\epsilon \times \Phi_f$ ), making ZnPc very competitive compared to other near-IR emitting fluorophores.<sup>9</sup> (b) Moreover, ZnPc is one of the most photostable fluorophores reported to date (degradation quantum yield of  $10^{-6}$ , *i.e.* about 30 times more robust than rhodamine or Cy5).<sup>6,10</sup> † (c) Our experience in SPIO<sup>6,11</sup> and in the step-by-step immobilization of functional porphyrin/porphyrinoid models on gold<sup>12</sup> prompted us to investigate a similar strategy for the immobilization of ZnPc onto SPIO (Fig. 1). ‡ Each coated-SPIO was thoroughly characterized by an array of analytical techniques, which allowed us to keep track of the precise composition of the coated-SPIO at a given step. We stuck to the highest standards of characterization of hybrid materials.



SPIO nanoparticles were prepared according to the classical Massart method.<sup>6</sup> † The NPs obtained were crystallized in the spinel phase  $a = (8.381 \pm 0.002) \text{ \AA}$ . The NPs crystallite size was obtained using X-Ray Diffraction  $d_{\text{XRD}} = (9.1 \pm 0.2) \text{ nm}$  and the mean diameter using Transmission Electron Microscopy  $d_{\text{TEM}} = (9 \pm 3) \text{ nm}$  (on 100 spinel crystallites at least). These NPs are superparamagnetic at room temperature: a blocking temperature of 170 K is measured for the applied field of 100 Oe (Field Cooling, FC, and Zero Field Cooling, ZFC, Fig. 2A). † The agglomerate size  $d_{\text{TEM}} = (25 \pm 2) \text{ nm}$  correlates with the hydrodynamic diameter determined using Dynamic Light Scattering (DLS)  $d_{\text{DLS}} = (44 \pm 1) \text{ nm}$ . The BET specific surface area of the powder is  $S = (103 \pm 1) \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ .  $\zeta$ -Potential measurements (Fig. 2B–A) indicated an Isoelectric Point (IEP) at pH 7.4 and maximum potentials reached 30 mV. FTIR data ‡ are consistent with those of previous studies.<sup>13</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB),

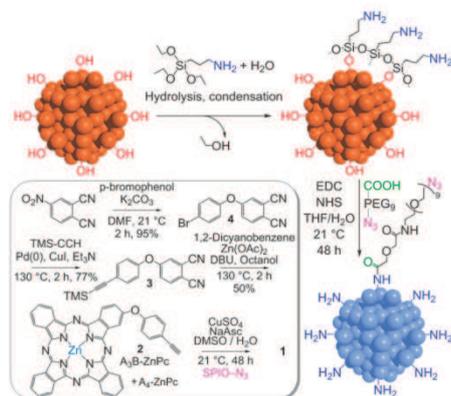
UMR 6303 CNRS-Université de Bourgogne, BP 47870, F-21078, Dijon Cedex, France. E-mail: Nadine.Millot@u-bourgogne.fr

<sup>b</sup> Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB),

UMR 6302 CNRS-Université de Bourgogne, BP 47870, F-21078, Dijon Cedex, France. E-mail: Richard.Decreau@u-bourgogne.fr

<sup>c</sup> Groupe d'étude de la matière condensée (GEMaC), UMR 8635 CNRS-UVSQ, F-78035 Versailles, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental procedures, spectroscopic details, additional figures and references. See DOI: 10.1039/c3cc41898g



**Fig. 1** Step-by-step synthesis. Top and right: SPIO-NH<sub>2</sub>, SPIO-N<sub>3</sub>; bottom left: Pc 2, and SPIO-Pc conjugate 1.

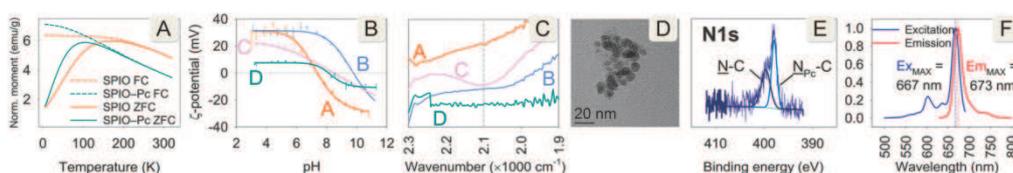
Free hydroxyl groups (TGA gave  $7 \text{ OH}^- \text{ nm}^{-2}$ ,  $12 \mu\text{mol m}^{-2}$ ) on the surface of bare SPIO NPs were reacted with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) to afford amine-functionalized SPIO NPs. Both the average size and size distribution of agglomerates are increased when compared to bare SPIO NPs ( $d_{\text{TEM}} = (35 \pm 8) \text{ nm}$  and  $d_{\text{DLS}} = (91 \pm 2) \text{ nm}$ ). The BET specific surface area of the SPIO-NH<sub>2</sub> powder increased to  $S = (148 \pm 1) \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ .  $\zeta$ -Potential measurements (Fig. 2B-B) indicated an IEP at pH 9.8, which shifted higher because of the presence of amine functions at the NP surface and preserving maximum potential values. The elemental analysis suggests about  $5 \text{ NH}_2 \text{ per nm}^2$  ( $8.3 \mu\text{mol m}^{-2}$ ) on SPIO-NH<sub>2</sub>. XPS measurements showed that the C 1s peak decomposes into C-C/C-H, C-N and O-C=O contributions and that the N 1s peak only corresponds to the N-C contribution.† The latter are correlated by the FTIR measurements† that exhibit the characteristic band of secondary amines and protonated amine bands. SPIO-NH<sub>2</sub> nanohybrids were subsequently coupled with azide/carboxyl terminated-PEG chains by EDC coupling, to afford azido-functionalized SPIO (SPIO-N<sub>3</sub>). The observed size and dispersion state are given by TEM observations: the agglomerate sizes are  $d_{\text{TEM}} = (73 \pm 25) \text{ nm}$ .†

The SPIO-N<sub>3</sub> NPs were characterized using FTIR spectroscopy, and the spectra exhibited a characteristic azide stretch at  $2100 \text{ cm}^{-1}$  (Fig. 2C-C).  $\zeta$ -Potential measurements (Fig. 2B-C) indicated an IEP shifted down to pH 8.4, along with a 10 mV decrease in the maximum potential. These observations are

consistent with the modification of the NP surface by introducing azide groups (IEP variation) at the end of short ethylene oxide chains (slight shielding effect). The XPS measurements are in correlation with other characterizations: the N 1s peak corresponds to the N-C contribution; the C 1s peak decomposes into three different contributions, C-N and C-C/C-H components are in equal proportions meaning that the C-N contribution increased because of the presence of the azide groups on the particle surface.

Phthalocyanine 2 was synthesized according to the synthetic pathway described in Fig. 1 and ESI.† Briefly, the mixed condensation of compound 3 with phthalonitrile in the presence of a zinc salt led to a statistical mixture containing the alkyne-bearing A<sub>3</sub>B-ZnPc 2 and the click-unreactive A<sub>1</sub>ZnPc counterpart. This mixture was purified by a series of washings, leading to the removal of the non-phthalocyanine material.†

As for SPIO-NH<sub>2</sub> and SPIO-N<sub>3</sub>, the working hypothesis was to ensure a successful coupling and to supply a proof of concept, *i.e.* to achieve a significant coverage in Pc to reliably characterize SPIO-Pc 1. Cu-catalyzed Azide-Alkyne Coupling (CuAAC)<sup>14</sup> between the alkyne-containing species 2 and the azide-containing SPIO-N<sub>3</sub> was achieved in the presence of a Cu salt and sodium ascorbate to afford conjugate 1.† To ensure that no material was adsorbed a series of thorough washing-filtration was performed by resuspending the SPIO-Pc material in THF, magnetically precipitating down the adsorbents, removing the supernatant and ultrafiltering the mixture. The observed agglomerate mean size is about  $d_{\text{TEM}} = (56 \pm 5) \text{ nm}$  (Fig. 2D).† The agglomerate size of conjugate 1 is in agreement with the DLS agglomerate size which is known to be less than 100 nm according to the biomedical application for which it was designed.<sup>15</sup> Commercial contrast agents are indeed a compromise between rapid elimination in kidneys (monodisperse state) or no cell incorporation (very large agglomerates).  $\zeta$ -Potential measurements indicated (a) an IEP around pH 8.1 close to that of the previous functionalization stage (SPIO-N<sub>3</sub>), and (b) a distinct shielding effect due to the high proportion of grafted ZnPc. This is consistent with the Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES) analysis that indicates a significant Zn:Fe ratio of about 1:24. However, all azide groups were not reacted with alkynephthalocyanine 2. Given the characterization data, our calculation indicates about 2 ZnPc per nm<sup>2</sup> ( $3.3 \mu\text{mol m}^{-2}$ ); *i.e.* ca. 690 ZnPc per NP (ca. 15 700 Fe atoms).† This corresponds to about 40% coverage when compared to SPIO-NH<sub>2</sub>. The ZnPc steric bulk could be at stake here leading to non-quantitative coverage of the SPIO-NH<sub>2</sub> NP surface. XPS analysis showed that the C 1s peak decomposes into three different contributions† and the N 1s peak



**Fig. 2** Characterization of SPIO-Pc and precursors: (A) FC and ZFC measurements between 5 and 320 K; (B)  $\zeta$ -potential and (C) FTIR (both labeled A: SPIO-OH, B: SPIO-NH<sub>2</sub>; C: SPIO-N<sub>3</sub>; D: SPIO-Pc); (D) SPIO-Pc TEM; (E) SPIO-Pc XPS contributions of nitrogen 1s; (F) SPIO-Pc fluorescence.

is shared into two contributions (Fig. 2E). The appearance of a new N 1s contribution at 397 eV is thus attributed to the presence of ZnPc ( $N_{\text{ZnPc}}-C$  contribution). The C-C/C-H component also increased because of the presence of the ZnPc aromatics. FTIR (Fig. 2C-D) spectra showed the disappearance of the azide stretch ( $\nu_{\text{as}} N_3$ ) at  $2100 \text{ cm}^{-1}$ , which indicates that the reaction with the alkyne occurred, leading to the formation of a triazole linker. UV-Visible spectroscopy in ethanol† showed the characteristic ZnPc absorption bands: Q bands (667, 640 and 603 nm) and the Soret band (344 nm). At high surface coverage in **2**, the SPIO-Pc spectrum in ethanol is still comparable to that of the monomeric ZnPc with no significant shift indicating that no  $\pi$ -stacking occurred; hence, the optical properties of immobilized (**1**) and free (**2**)  $A_4$ B-ZnPc are comparable to each other and to that of the parent  $A_4$ -ZnPc species.† The relevant indicator of the step-by-step nanoparticle-coating achievement is the surface coverage rates that are expressed as a function of the available surface groups in the previous step. At the different stages of conjugate **1** elaboration, coverage rates were determined to be: (a)  $7 \text{ OH}^-$  per  $\text{nm}^2$  ( $12 \mu\text{mol m}^{-2}$ ) on initial bare SPIO; (b)  $5 \text{ NH}_2$  per  $\text{nm}^2$  ( $8.3 \mu\text{mol m}^{-2}$ ) on SPIO-NH<sub>2</sub> (71% yield); (c)  $5 \text{ N}_3$  per  $\text{nm}^2$  ( $8.3 \mu\text{mol m}^{-2}$ ) on SPIO-N<sub>3</sub> (quantitative yield assuming that all amines were acylated);† and (d)  $2 \text{ ZnPc}$  per  $\text{nm}^2$  ( $3.3 \mu\text{mol m}^{-2}$ ) on SPIO-Pc (40% yield). Therefore, the overall yield is ca. 30% grafting on bare SPIO NPs. This was achieved because of the low steric hindrance of neighboring ZnPc and the positioning of the short PEG chains (9 ethylene oxide units) that probably do not imbed the azide function inside the organic layer.

Subsequent spectroscopic studies were performed to address the imaging capabilities of each probe in the well characterized SPIO-Pc conjugate **1**: fluorescence (ZnPc probe for OI) and relaxivity (SPIO probe for MRI) measurements. Upon excitation of **1** at 600 nm in ethanol solution, a fluorescence emission (Fig. 2F) at 673 nm was observed, which is comparable to the fluorescence emission of the parent free ZnPc **2**. The results seem to indicate that there is no Aggregation Caused Quenching (ACQ) due to  $\pi$ -stacking and Förster Resonance Energy Transfer (FRET) quenching in the organic solvent. The relaxivity measurements led to  $R_2$  and  $R_1$  values of  $73 \text{ mM}_{\text{Fe}}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and  $3 \text{ mM}_{\text{Fe}}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectively ( $R_2/R_1 = 24$ ).† These values are reminiscent of currently available  $T_2$  contrast agents.<sup>16</sup> The thickness of the organic coating on the SPIO core is known to affect the  $R_2$  relaxivity, and the outer "hydrophobic phthalocyanine belt" may prevent, to a certain extent, the access of water molecules to the inner superparamagnetic iron oxide core of **1**.<sup>17</sup> In addition magnetic measurements showed that SPIO-Pc remain superparamagnetic and their blocking temperature decreases to 105 K indicating the decrease in dipolar magnetic interactions due to organic shells (Fig. 2A). Hence the hydrophilic nature of **1** may be increased upon tuning down the Pc coverage rate (or reacting the remaining azides with alkyne-PEG). Finally, conjugate **1** may be considered as a putative theranostic agent (*i.e.* a species that can be used to perform imaging and therapy simultaneously)<sup>12,18,19</sup> † because it could be used in hyperthermia (SPIO)<sup>20,21</sup> and photodynamic therapy (ZnPc).<sup>8,22</sup>

In summary, SPIO NPs were successfully functionalized three consecutive times (a) by setting a higher proportion of magnetic probes with respect to the optical ones to address the difference in sensitivity; (b) by using zinc phthalocyanines as

actual photostable fluorophores;† and (c) by proceeding in a step-by-step manner using classical reactions of organic synthesis (silanization, acylation, cycloaddition) with the following functional groups or molecules found at the SPIO surface: hydroxyl groups (bare SPIOs), amine groups (first stage coating), azide groups (second stage coating), and phthalocyanines (third stage coating), respectively. These reactions proceeded smoothly and each SPIO end-product was well identified and thoroughly characterized by an extensive number of spectroscopic techniques. Based on preliminary data (fluorescence and relaxivity measurements), we are confident on the relevant nature of **1**.

JB and RAD thank the Burgundy National Council, CRB (FABER Programs), RAD thanks CNRS for Chaire d'Excellence; JB and YB thank CRB (JCE, FABER grants respectively). EP acknowledges financial support from "C'Nano IdF" network (grant no. IF-08-1453/R). This work was supported by the 3MIM agreement (CNRS, uB and CRB), and labelled by the PharmImage<sup>®</sup> consortium. Dr Olivier Heinz is acknowledged for XPS measurements.

## Notes and references

† Pc groups have been immobilized on other NPs for other applications in a *direct* (as opposed to *step-by-step*) approach.<sup>23,24</sup> The remaining  $A_4$ -ZnPc coproduct that does not bear the alkyne moiety could not be clicked, hence it was easily washed away after the coupling reaction with SPIO NPs. A mixture of ZnPc and SPIO NPs treated without the Cu catalyst did not lead to the SPIO-Pc conjugate. Hence, this indicates that these spectroscopic observations such as UV-Vis do not reflect an artifact, *i.e.* adsorption of ZnPc onto NP, but a covalent linkage instead.

- C. Rümenapp, B. Gleich and A. Haase, *Pharm. Res.*, 2012, **29**, 1165–1179.
- V. J. Pansare, S. Hejazi, W. J. Faenza and R. K. Prud'homme, *Chem. Mater.*, 2012, **24**, 812–827.
- C. I. Olariu, H. H. P. Yiu, L. Bouffier and T. Nedjadi, *et al.*, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 12650–12659.
- J. Cheon and J.-H. Lee, *Acc. Chem. Res.*, 2008, **41**, 1630–1640.
- O. Veisich, J. W. Gunn and M. Zhang, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2010, **62**, 284–304.
- L. Maurizi, H. Bisht, F. Bouyer and N. Millot, *Langmuir*, 2009, **25**, 8857–8859.
- S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset and E. Duguet, *J. Mater. Chem.*, 2004, **14**, 2161–2175.
- N. Sekkat, H. v. d. Bergh, T. Nyokong and N. Lange, *Molecules*, 2011, **17**, 98–144.
- L. D. Lavis and R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.*, 2008, **3**, 142–155.
- T. Nyokong, *Coord. Chem. Rev.*, 2007, **251**, 1707–1722.
- L. Maurizi, F. Bouyer, J. Paris and F. Demoisson, *et al.*, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 11706–11708.
- J. P. Collman, N. K. Devaraj, R. A. Decréau and Y. Yang, *et al.*, *Science*, 2007, **315**, 1565–1568.
- S. Mornet, J. Portier and E. Duguet, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2005, **293**, 127–134.
- H. C. Kolb, M. G. Finn and K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 2004–2021.
- F. M. Kievit and M. Zhang, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 853–862.
- S. Srivastava, R. Awasthi, D. Tripathi and M. K. Rai, *et al.*, *Small*, 2012, **8**, 1099–1109.
- L. E. W. LaConte, N. Nitin, O. Zurkiya and D. Caruntu, *et al.*, *J. Magn. Reson. Imaging*, 2007, **26**, 1634–1641.
- D. Yoo, J.-H. Lee, T.-H. Shin and J. Cheon, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 863–874.
- R. A. Decréau, J. P. Collman, Y. Yang and Y. Yan, *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 2794–2802.
- S. S. Kelkar and T. M. Reineke, *Bioconjugate Chem.*, 2011, **22**, 1879–1903.
- M. De, S. S. Chou, H. M. Joshi and V. P. Dravid, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2011, **63**, 1282–1299.
- R. A. Decréau, M. J. Richard, P. Verrando and M. Chanon, *et al.*, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1999, **48**, 48–56.
- R. Lin, L. Zhou, Y. Lin and A. Wang, *et al.*, *Spectroscopy*, 2011, **26**, 179–185.
- T. Stuchinskaya, M. Moreno, M. J. Cook and D. R. Edwards, *et al.*, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, **10**, 822–831.

## Annexe n°11 : Les imageries nucléaires

### Principe de la scintigraphie

La scintigraphie est une imagerie d'émission (c'est-à-dire que le rayonnement vient du patient après injection d'un traceur appelé radiopharmaceutique), par opposition à l'imagerie radiographique qui est une imagerie de transmission (le faisceau est externe et traverse le patient comme l'IRM).

Pour effectuer une scintigraphie, il est alors nécessaire d'injecter préalablement au patient un traceur radiopharmaceutique composé d'une molécule vectrice et d'un marqueur radioactif émetteur de rayonnements  $\gamma$ . La détection du marqueur radioactif dans l'organisme se fait à l'aide de  $\gamma$ -caméras composée d'un collimateur et de détecteurs de rayon  $\gamma$ . Ces caméras permettent de réaliser et de reconstruire en 3D l'activité radioactive et donc la biodistribution du radiopharmaceutique dans l'organisme.

### L'imagerie SPECT

L'imagerie SPECT de l'anglais *Single Photon Emission Computed Tomography* (ou Tomographie d'Emission MonoPhotonique dite TEMP en français) est une des techniques d'imagerie médicale nucléaire basée sur le principe de la scintigraphie.

De nombreux marqueurs utilisés en SPECT existent tels que des biphosphonates marqués ou encore des ligands marqués pour la détection de zones spécifiques comme des tumeurs. Les isotopes le plus souvent utilisés sont le  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$  ou  $^{131}\text{I}$ .

L'imagerie SPECT permet de réaliser une imagerie fonctionnelle tout comme l'imagerie TEP décrite ci-dessous,

### L'imagerie TEP

L'imagerie TEP de l'anglais *Positron Emission Tomography* (ou PET : Tomographie par Émission de Positron) est aussi basée sur le principe de la scintigraphie (injection d'un radiopharmaceutique). Contrairement à la SPECT, la TEP est sensible aux rayons  $\gamma$  d'énergie égale à 511 keV émis de façon synchrone dans des directions opposées par l'annihilation de positons avec des électrons. L'imagerie TEP tire profit de ce phénomène pour repérer la provenance de ces deux rayons synchrones grâce à une couronne de détecteur.

Les radionucléides utilisés en TEP sont relativement divers comme le  $^{18}\text{F}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$  et  $^{89}\text{Zr}$ .

### L'apport des rayons X en imagerie nucléaire

Les imageries nucléaires seules offrent peu d'informations anatomiques ainsi pour pallier cette limite, les appareils d'imagerie SPECT et TEP ont été couplés à des scanners à rayons X pour donner naissance à des machines appelés SPECT/CT ou TEP/CT (CT pour *Computed Tomography*). Les rayons X permettent d'obtenir les informations anatomiques car ceux-ci sont absorbés de manière différente selon les tissus. Le couplage de ces deux techniques d'imagerie médicale permet de localiser plus précisément la source du radioélément dans l'organisme.

## Avenir de l'imagerie médicale : l'hybridation

Aujourd'hui, les techniques d'imagerie médicales présentent des performances élevées mais tolèrent également de nombreuses limites. Cependant, il est possible de coupler certaines techniques d'imagerie pour associer leurs avantages et ainsi permettre la limitation de leurs faiblesses inhérentes, comme par exemple, le couplage de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) avec l'imagerie nucléaire (TEP) pour donner naissance à l'imagerie hybride IRM/PET (Figure 231).

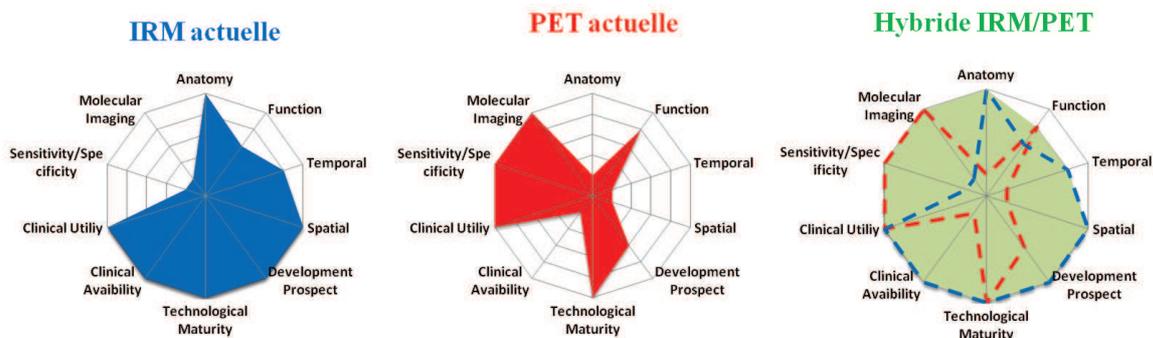


Figure 231. Représentation schématisques des avantages des techniques IRM, PET et l'imagerie hybride IRM/PET d'après N. Jon Shah, Director Institute of Neuroscience and Medicine, Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich, Germany







**Titre :** Nanoparticules d'oxydes de fer et nanotubes de titanate pour l'imagerie multimodale et à destination de la thérapie anticancéreuse.

**Résumé :** Les possibilités offertes par les applications en médecine des nanoparticules sont l'un des facteurs essentiels des progrès médicaux attendus pour ce XXI<sup>ème</sup> siècle. Ainsi, le domaine de l'imagerie médicale est aussi touché par cette évolution technologique. Ce présent travail a consisté à élaborer des sondes théranostiques à base de nanoparticules d'oxydes de fer (SPIO) et de nanotubes de titanate (TiONts) pour l'imagerie multimodale (magnétique/nucléaire ou magnétique/optique) et possédant aussi un effet thérapeutique (hyperthermie/PDT ou radiosensibilisation/PDT).

Les nanotubes de titanate de cette étude, d'une longueur moyenne d'environ 150 nm, ont été obtenus par synthèse hydrothermale selon la méthode de Kasuga. Ces nanotubes présentent un diamètre extérieur de l'ordre de 10 nm et une cavité interne de 4 nm. Les nanoparticules d'oxydes de fer ont quant à elles été synthétisées par méthode de co-précipitation "Massart". Ces nanoparticules d'oxydes de fer de structure spinelle possèdent des cristallites de 9 nm de diamètre et présentent un comportement superparamagnétique mis en évidence par des mesures FC/ZFC.

Pour préparer ces nanoparticules à recevoir des molécules d'intérêt biologique, deux ligands possédant des fonctions organiques plus réactives (APTES : NH<sub>2</sub> et PHA : COOH) ont été greffés à la surface de ces deux types de nanoparticules. La présence de l'un ou l'autre a été mise en évidence par différentes techniques d'analyses (XPS, IR, zétamétrie). La quantité de molécules greffées a été déterminé par ATG, elle est dans tous les cas d'environ 5 molécules/nm<sup>2</sup>. Dans un premier temps, les nanotubes de titanate ont été fonctionnalisés par un agent macrocyclique (0,2 DOTA/nm<sup>2</sup>). Après radiomarquage à l'indium 111, les TiONts – DOTA[In] ont été injectés dans des souris Swiss mâle pour connaître leur biodistribution en imagerie SPECT/CT. Les images obtenues et le comptage de la radioactivité dans chaque organe ont montré qu'au bout d'une heure, les nanotubes se situent dans les poumons et dans l'urine. Ensuite, les nanotubes sont progressivement éliminés pour n'être plus présents que dans les urines à 24 heures. Ces mêmes agents chélatants ont été greffés à la surface des SPIO pour la création de sondes multimodales IRM/SPECT ou IRM/TEP. En parallèle de cette étude, un fluorophore (phthalocyanine de zinc, ZnPc) a été greffé à la surface des nanoparticules. Le nanohybride SPIO – Pc synthétisé possède les propriétés requises pour être une sonde utilisable en imagerie bimodale IRM/IO grâce à sa longueur d'émission vers 670 nm et sa relaxivité de l'ordre de 70 L.mmolFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>. De plus, les nanohybrides ont été fonctionnalisés par du PEG pour les rendrefurtifs, biocompatibles et stables. La toxicité de certains de ces nanohybrides a été évaluée avec le modèle *in vivo* zebrafish. Les nanohybrides étudiés n'ont pas présenté de toxicité, n'ont pas perturbé l'éclosion et n'ont pas provoqué de malformations sur les larves des zebrafish.

**Mots clés :** Sondes théranostiques, imagerie multimodale, SPIO, nanotubes de titanate, nanohybrides, APTES, phthalocyanines, agents macrocycliques, cytotoxicité, IRM, SPECT/CT, IO, XPS, zebrafish, radiomarquage.

---

**Title:** Iron oxides nanoparticles and titanate nanotubes dedicated to multimodal imaging and anticancer therapy.

**Abstract:** The new implementations of nanoparticles in the medical field are one of the essential factors of the medical progress expected at the beginning of this XXI<sup>st</sup> century. Thus, the domain of the medical imaging is also affected by this technological evolution. This work consisted in developing theranostic probes with iron oxides nanoparticles (SPIO) and titanate nanotubes (TiONts) for multimodal imaging (magnetic/nuclear or magnetic/optical) and also possessing a therapeutic effect (hyperthermia/PDT or radiosensitization/PDT).

The titanate nanotubes of this study have an average length of about 150 nm and were obtained by Kasuga's hydrothermal synthesis. These nanotubes present an outside diameter of about 10 nm and an intern cavity of 4 nm. On the other hand, iron oxides nanoparticles were synthesized by soft chemistry ("Massart" method). These spinel-like iron oxides nanoparticles have a crystallite size of 9 nm in diameter and exhibit a superparamagnetic behavior which was highlighted by FC / ZFC measurements.

To get these nanoparticles ready to receive molecules of biological interest, two linkers of more reactive organic functions (APTES: NH<sub>2</sub> or PHA: COOH) were grafted to the surface of these two types of nanoparticles. Their presence was shown by different techniques (XPS, IR, UV-vis). The amount of grafted linkers was determined by TGA and in all cases this amount is close to 5 molecules/nm<sup>2</sup>. First, titanate nanotubes were coated by a macrocyclic chelating agent (0.2 DOTA/nm<sup>2</sup>). After radiolabelling with indium 111, the TiONts – DOTA[In] nanohybrids were injected in Swiss nude mice and observed by SPECT/CT imaging to characterize their biodistribution. The SPECT/CT images and the radioactivity measured in each organ showed that after one hour, nanotubes are located in lungs and in urine. Then, the nanotubes are gradually eliminated and are only found in urines after 24 hours. The same macrocyclic agent was grafted to the SPIO's surface for the creation of multimodal probes MRI/SPECT or MRI/PET. Alongside this study, a fluorophore (Zinc phthalocyanine) was also grafted to the surface of nanoparticles. The synthesized SPIO – Pc nanohybrid has the required properties of bimodal imaging MRI/OI probe thanks to his emission wavelength around 670 nm and its relaxivity is about 70 L.mmolFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>. Furthermore, nanohybrids were coated by PEG to make them stealth, biocompatible and stable.

In this study, the toxicity of most nanohybrids was evaluated by the *in vivo* zebrafish model. The studied nanohybrids did not present any toxicity, hatching disruption or malformation on zebrafish larvae.

**Key words:** Theranostic probes, multimodal imaging, SPIO, titanate nanotubes, nanohybrids, APTES, phthalocyanines, macrocyclic chelating agent, cytotoxicity, MRI, SPECT/CT, XPS, zebrafish, radiolabelling.