



Synthèses optimisées et caractérisations avancées de nanotubes de titanate et de leurs fonctionnalisations : vers l'élaboration de nanovecteurs de molécules thérapeutiques

Fadoua Sallem

► To cite this version:

Fadoua Sallem. Synthèses optimisées et caractérisations avancées de nanotubes de titanate et de leurs fonctionnalisations : vers l'élaboration de nanovecteurs de molécules thérapeutiques. Chimie théorique et/ou physique. Université Bourgogne Franche-Comté, 2017. Français. NNT : 2017UBFCK030 . tel-01799041

HAL Id: tel-01799041

<https://theses.hal.science/tel-01799041>

Submitted on 24 May 2018

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

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

THESE DE DOCTORAT

en cotutelle de

L'Université de Tunis El Manar

Faculté des Sciences de Tunis

Unité de Recherche de Chimie Minérale Appliquée UR11ES18

École Doctorale *MISTM*

&

L'Université Bourgogne Franche-Comté

Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne

UMR 6303 CNRS

École Doctorale Carnot-Pasteur

Thèse pour obtenir le grade de Docteur en :

Chimie « UTM »

Chimie-Physique « UBFC »

par

Fadoua SALLEM

**Synthèses optimisées et caractérisations avancées de
nanotubes de titanate et de leurs fonctionnalisations : vers
l'élaboration de nanovecteurs de molécules thérapeutiques**

Thèse soutenue à Tunis, le 30 novembre 2017

Composition du Jury :

M. Ismail KHATTECH
Mme Latifa BERGAOUI
M. Mohamed CHEHIMI
M. Etienne DUGUET
Mme Nadine MILLOT
M. Adel MEGRICHE

Professeur à la FST/Université de Tunis El Manar
Professeur à l'INSAT/Université de Carthage
Directeur de recherche CNRS à l'Université Paris Est
Professeur à l'Université de Bordeaux
Professeur à l'Université de Bourgogne
Maître de Conférences à la FST/Université de Tunis El Manar

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse (France)
Directeur de thèse (Tunisie)

« Tout vient à point à qui sait attendre »

Clément Marot

A mes parents « Fattouma » et « Thoura »

A ma belle famille

Remerciements

Cette thèse a été réalisé en cotutelle entre l'Unité de Recherche de Chimie Minérale Appliquée (URCMA) sous la direction de M. Adel Megriche et le laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB) sous la direction du Pr. Alain Dereux que je tiens à remercier vivement pour m'avoir acceptée.

*Je tiens à remercier les membres de jury de thèse qui n'ont pas hésité à juger mes travaux de recherche et surtout à se déplacer pour assister à la soutenance, qui a eu lieu en Tunisie, et ce malgré leurs nombreux autres engagements. Je remercie tout d'abord **M. Ismail Khattech**, Professeur à la FST de l'université de Tunis El Manar, d'avoir accepté de présider mon jury de thèse et pour son intervention dans la discussion lors de la soutenance. Je suis très reconnaissante à **M. Mohamed Mehdi Chehimi**, Directeur de Recherche CNRS à l'université Paris Est pour l'honneur qu'il m'a fait d'avoir accepté de rapporter ce travail ainsi que pour ses remarques et ses conseils enrichissants. Je remercie également **Mme Latifa Bergaoui**, Professeur à l'INSAT de l'université de Carthage et rapporteur de ma thèse, d'avoir accepté de juger mon travail et de m'honorer par sa présence et ses conseils avant et durant la soutenance. Que **M. Etienne Duguet**, Professeur à l'université de Bordeaux, reçoive mes vifs remerciements pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner mes travaux de thèse et pour les corrections et les remarques précieuses dont il m'a fait profiter, très utiles pour la suite de mon parcours.*

*Durant trois ans j'ai eu de la chance d'appartenir à deux laboratoires et de bénéficier du savoir-faire de mes chers encadrants. A cette occasion je tiens à remercier mon encadrant en Tunisie monsieur **Adel Megriche**, pour son soutien, ses encouragements et ses orientations. Je vous remercie monsieur pour les efforts que vous avez faits pour me faciliter les démarches administratives compliquées, en particulier lors de mon séjour à l'étranger. Je vous remercie d'avoir accepté de prendre en charge cette lourde responsabilité.*

*J'adresse un merci vif et particulier au Professeur **Nadine Millot**, ma chère directrice de thèse en France, qui, avec ses précieux conseils et ses nombreuses corrections, donne de la valeur à chaque travail scientifique. Je vous suis très reconnaissante, tout d'abord, pour la confiance que vous m'avez témoignée lors de mon premier stage réalisé au laboratoire et puis, dans une deuxième occasion, pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de diriger cette thèse. Grâce à vous j'ai pu intégrer un domaine scientifique très intéressant, d'actualité et prometteur. Je ne vous remercierai jamais assez pour l'appui scientifique et moral que vous m'avez témoigné ainsi que pour les nombreuses occasions que vous m'avez offertes pour participer à des congrès internationaux. Merci pour votre encouragement continu et en particulier durant la dernière période de la rédaction de cette thèse. Merci également de m'avoir donné l'occasion d'encadrements d'étudiants durant mes séjours en France. J'aimerai bien vous dire à travers ce remerciement que vous êtes une directrice de thèse exceptionnelle et un exemple de femme qui réussit à suivre, dotée d'une perfection, d'un dynamisme, d'une ouverture d'esprit et d'une exigence scientifique fascinante. Je vous remercie pour les nombreuses invitations chez vous et pour l'accueil chaleureux que j'ai senti par chaque membre de votre petite famille que je remercie vivement. Maintenant après trois ans, j'ai encore*

l'honneur et la chance de continuer à travailler une autre année avec vous, ce qui sera certainement une expérience différente et très enrichissante.

*Je tenais à adresser mes plus sincères remerciements à Monsieur le Professeur **Mohamed El Maaoui**, l'ancien directeur de l'URCMA et mon premier encadrant, grâce à qui j'ai fait cette thèse et qui ne cesse de me suivre à chaque étape. Vous êtes un monsieur très particulier, ayant des valeurs humaines exceptionnelles et doté d'un grand savoir-faire. Je vous remercie pour votre aide et votre écoute aux moments les plus difficiles. Je vous remercie pour votre soutien scientifique et surtout moral et pour votre générosité qui dépasse toutes les limites. J'ai appris tellement de choses de vous que je suis fière et ravie d'avoir été un jour votre étudiante, je le serai pour toujours.*

*Je remercie **M. Julien Boudon**, Maître de Conférences à l'ICB qui est à la fois chimiste, informaticien, technicien, conseiller... Merci cher monsieur pour votre disponibilité et votre aide scientifique et technique à chaque fois que je vous sollicite et ce malgré votre emploi de temps chargé. Merci pour votre participation à la rédaction d'une de mes publications scientifiques, pour votre rigueur, vos conseils précieux. Que vous trouviez ici ma profonde gratitude et tout mon respect !*

*Je remercie également Monsieur **Lucien Saviot**, Directeur de Recherche au CNRS, pour m'avoir supportée trois mois dans son bureau ainsi que pour sa disponibilité et son aide technique et scientifique dans les analyses des spectres Raman. Merci à l'adorable **Lionel Maurizi**, Chargé de Recherche au CNRS et l'ami de tout le monde, pour sa gentillesse, sa sympathie et sa bonne humeur. Merci pour ton aide scientifique, tes conseils, tes orientations durant nos moments de discussion et surtout pour les chocolats ☺.*

*Mes remerciements vont également à Mme **Dominique Vervandier-Fasseur**, Maître de Conférences à l'ICMUB, et à **Rihab Hajji**, élève ingénieur de l'INSAT, pour leurs participations aux travaux de cette thèse par la synthèse de la molécule organique d'intérêt et à Mme **Johanna Chluba**, Professeur à l'UB, pour la réalisation du test de toxicité zebrafish.*

*J'exprime également ma reconnaissance aux personnels du laboratoire ICB en France qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse. Je désire exprimer ma sympathie à tous mes collègues de bureau à l'ICB. Je dis d'abord merci à **Alexis Loiseau**, la première personne que j'ai rencontrée au laboratoire et que j'ai eu la chance de connaître. Je te dis merci pour ton extrême gentillesse et ton aide infinie. Je n'oublierai jamais que tu m'as formée à toutes les techniques au laboratoire. Merci pour ton soutien moral avant chaque présentation orale, tu as toujours réussi à atténuer mon stress. Tu es et tu resteras toujours un très cher ami !. Je remercie mon très cher collègue et ami **Sylvain Lorand**, pour tous les bons moments que nous avons partagés et pour les invitations aux petites soirées chez toi. Merci pour les discussions enrichissantes pendant les pauses de midi où je trouve souvent des réponses à mes nombreuses questions ! D'ailleurs j'aime bien ta façon d'expliquer les choses! Merci à tous les deux car à travers vous j'ai connu et découvert pleins de choses!*

*Je veux dire merci aussi à **Annette Luce** ma chère voisine de bureau pour son soutien moral pendant la dernière période de la rédaction et pour les tasses de café qui ne manquent*

pas durant les pauses. Merci pour ton aide et ton implication aux manips de biologie. Je te dis bon courage pour la suite de ta thèse !

*Merci à **Adrien Fourmont**, notre cher collègue de bureau qui revient pour une thèse au sein de l'équipe et à qui je souhaite une bonne continuation et encore une année à passer ensemble.*

*Merci à la belle de l'équipe **Ludivine Munier** pour avoir partagé les moments de pause avec nous et pour les sympathiques petites attentions qu'elle nous accorde et à mon beau compatriote **Yacine Kchaou** pour sa bonne humeur, ses bons gâteaux et pour les moments de discussion et de repas que nous avons partagés.*

*Merci à la gentille **Clémentine Madec**, **Sophie Le Gallet**, **Florence Baras** et **Frédéric Bouyer**.*

*Un grand merci à mes stagiaires **Fanny Bouvet** et **Thomas Gay-Germain** pour le travail qu'ils ont fait et pour leur participation à mes travaux de thèse. Merci également à tous les autres étudiants stagiaires : **Margaux**, **Khouloud**, **Clément**, **Romain**, et **Coste**.*

*Bien évidemment, je souhaite remercier mes amis qui n'ont cessé de me soutenir durant ces trois ans en particulier **Hamed Issaoui**, **Nesserine Zaiter** et **Hela Ben Mansour** et mes collègues à l'URCMA **Wessila**, **Imen**, **Ibtihel**, **Rrawdha**, **Sihem**, **Sonia**, **Islem**, **Sawssen**, **Arij**, **nasseredine**, **Ameni** et **Radhia**.*

*Mes remerciements les plus profonds vont à ma famille qui a cru en moi, m'a soutenue et encouragée. A mes parents **Fatma** et **Taher** qui ont toujours été très présents en toutes circonstances, durant toute ma vie, merci de m'avoir donné des racines et des ailes et de me supporter toutes ces années. Merci pour tous vos sacrifices et de m'avoir inculqué de vraies valeurs et de m'avoir permis de devenir la personne que je suis aujourd'hui, je ne pourrai jamais vous remercier assez. A mes sœurs **Daddou**, **Imen** et **Henda**, à mon frère **Jihed** et à mes beaux-frères **Fathi** et **Ahmed**, merci d'être là pour moi et pour le soutien et l'aide que vous m'avez portés. Merci pour les bons moments que nous avons vécus ensemble, je suis si fière et contente de vous avoir dans ma vie. A ma nièce **Maryouma** et à mes neveux **Med Amine**, **Med Youssef** et **Moemen**, je vous souhaite une vie épanouie et pleine de réussite. Sachez que vous avez une famille si belle, solide et solidaire qu'elle vous protégera toujours et ne vous lâchera jamais.*

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	I
LISTE DES FIGURES	II
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I. ETAT DE L'ART SUR LA SYNTHÈSE HYDROTHERMALE DES NANOTUBES DE TITANATE (TIONTS) ET LEURS APPLICATIONS BIOMÉDICALES.....	9
I.1. Introduction	11
I.2. Généralités sur les nanotubes d'oxydes de titane.....	11
I.2.1. Le dioxyde de titane	11
I.2.2. Définition et méthodes de synthèse des nanotubes d'oxydes de titane	13
I.2.3. Structure et composition chimique des nanotubes de titanate	19
I.2.4. Les paramètres influant la synthèse hydrothermale des TiONts	20
I.3. Mécanismes de formation des nanotubes de titanate par voie hydrothermale : discussion de deux théories.....	27
I.3.1. Le phénomène de délamination/enroulement des feuillets	27
I.3.2. Le phénomène de dissolution/recristallisation	28
I.4. Les différentes applications des nanotubes de titanate	29
I.4.1. La photocatalyse	29
I.4.2. Les batteries au lithium.....	30
I.4.3. La production et le stockage de l'hydrogène	30
I.4.4. Les cellules photovoltaïques	30
I.4.5. Applications biomédicales des nanotubes de titanate	31
I.5. Les systèmes d'administration d'agents thérapeutiques : vers l'élaboration de « nanovecteurs »	31
I.5.1. Les nanotubes de titanate : des matériaux prometteurs pour une application médicale.....	31
I.5.2. Modification de surface des nanoparticules par des agents stabilisants.....	36
I.5.3. Modification de surface par des polymères biocompatibles	41
I.5.4. Le trans-resvératrol (TR) : une seule molécule, plusieurs applications.....	43
I.6. Conclusions	45
CHAPITRE II. ETUDE DE LA SYNTHÈSE HYDROTHERMALE DES NANOTUBES DE TITANATE	47
II.1. Introduction : contexte et objectifs	49

II.2. Description des méthodes de synthèses : les différents montages utilisés	49
II.2.1. Protocole expérimental des synthèses de TiONts réalisées au laboratoire URCMA (Tunisie)....	50
II.2.2. Protocole expérimental des synthèses de TiONts réalisées au laboratoire ICB (France)	51
II.3. Caractérisations du précurseur de départ : dioxyde de titane	51
II.4. Synthèse hydrothermale des TiONts en mode statique	52
II.4.1. Etude paramétrique de la synthèse des TiONts en mode statique	52
II.5. Synthèse hydrothermale des TiONts en mode dynamique	57
II.5.1. Etude de l'effet du temps d'agitation par heure de traitement sur la morphologie et les propriétés physico-chimiques des nanotubes : comparaison avec la synthèse en mode statique	58
II.5.2. Accélération de la cinétique de synthèse des nanotubes	68
II.6. Discussion du mécanisme de formation des nanotubes de titanate pour la synthèse en mode dynamique	77
II.7. Effet du changement des conditions expérimentales sur les propriétés des nanotubes : comparaison entre trois lots de synthèses différentes	79
II.7.1. Etude morphologique des différents lots	79
II.7.2. Comparaison entre les propriétés physico-chimiques des trois lots de TiONts, dits optimaux : ATG et XPS.....	81
II.8. Importance du lavage eau/acide dans la formation des nanotubes.....	82
II.8.1. Importance du lavage eau/acide.....	82
II.8.2. Importance du lavage acide	84
II.9. Résultats majeurs et conclusions	86
 CHAPITRE III. PREFONCTIONNALISATION DES NANOTUBES DE TITANATE PAR DIFFERENTS LIGANDS : CATECHOLS, ACIDE CITRIQUE OU ORGANOSILANES.....	 89
III.1. Introduction : contexte et objectifs	91
III.2. Les TiONts issus de la synthèse hydrothermale : charge de surface, stabilité et limites	91
III.3. Etude de la fonctionnalisation des TiONts par des catéchols : étude paramétrique du greffage ..	94
III.3.1. Effet du pH sur le greffage des catéchols.....	94
III.3.2. Effet du temps de réaction sur le rendement de greffage des catéchols	104
III.3.3. Suivi de la cinétique d'adsorption et quantification des catéchols à la surface des TiONts	105
III.3.4. Greffage des catéchols dans des conditions optimisées.....	109
III.4. Etude du greffage de l'acide citrique (AC) à la surface des TiONts en fonction du pH	112
III.5. Préfonctionnalisation des TiONts avec des organosilanes	116
III.5.1. Procédure expérimentale du greffage des organosilanes à la surface des TiONts	116
III.5.2. Analyse des nanotubes fonctionnalisés par l'APTES et le CPTES	117
III.6. Résultats majeurs et conclusions	122

CHAPITRE IV. VERS L'ELABORATION D'UN NOUVEAU NANOVECTEUR A BASE DE TIONTS... GREFFAGE D'UN PHENOL STILBENIQUE ET AMELIORATION DE LA BIOCOMPATIBILITE DES TIONTS PAR LE CHITOSAN.....125

IV.1. Introduction : contexte et objectifs	127
IV.2. Présentation de la molécule HAPtS, un phénol stilbénique	127
IV.2.1. Contexte et synthèse du phénol stilbénique HAPtS	128
IV.2.2. Etude de la conformité de la molécule synthétisée par rapport à la formule chimique espérée	129
IV.3. Modification de surface des TiONts par le phénol stilbénique 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)- <i>trans</i> -stilbène (HAPtS).....	131
IV.3.1. Greffage du phénol stilbénique sur des TiONts préfonctionnalisés par le DHCA : TiONts-DHCA-HAPtS.....	131
IV.3.2. Greffage du HAPtS sur des TiONts préfonctionnalisés par un organosilane : synthèse des TiONts-CPTES-HAPtS	137
IV.4. Amélioration de la biocompatibilité des TiONts : greffage du chitosan par deux approches différentes	143
IV.4.1. Présentation du chitosan (CT) utilisé dans cette étude	143
IV.4.2. Première approche : greffage du chitosan à la surface des TiONts par liaisons covalentes (étape par étape)	144
IV.4.3. Seconde approche du greffage du chitosan à la surface des TiONts : liaisons par interactions électrostatiques (une seule étape).....	150
IV.4.4. Comparaison entre les deux approches de greffage du chitosan.....	153
IV.5. Validation de la biocompatibilité des nanohybrides par des tests d'évaluation de la toxicité <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	159
IV.5.1. Tests de cytotoxicité	159
IV.5.2. Tolérance des TiONts-CT <i>in vivo</i> : tests sur des embryons de poisson zèbre	163
IV.6. Résultats majeurs et conclusions.....	163
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	167
ANNEXES.....	175
VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE.....	185
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	187

LISTE DES ABREVIATIONS

AC:	Acide citrique
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
APTES :	3-Aminopropyltriéthoxysilane
ATG :	Analyse Thermogravimétrique
BET :	Brunauer-Emmet-Teller
BH2N :	(Bio-)hybrid nanoparticles & nanostructures
CPTES :	3-chloropropyltriéthoxysilane
CR :	Cellulose Régénéré
CT :	Chitosan
CVD :	Chemical Vapor Deposition
DHCA :	Acide 3,4-dihydroxycinnamique
DIEA :	N,N-Diisopropyléthylamine
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DRX :	Diffraction des Rayons X
EDC :	N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride
EtOH	Ethanol
Glu :	Glutaraldéhyde
HAPtS :	4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-trans-stilbène
IR :	InfraRouge
L-DOPA :	3,4-dihydroxy-L-phénylalanine
MEB :	Microscopie Electronique à Balayage
MEM :	Minimum Essential Medium
MET :	Microscopie Electronique en Transmission
METHR :	Microscopie Electronique en Transmission à Haute Résolution
MSNs :	Nanoparticules de silice mésoporeuse
NHS :	N-hydroxysuccinimide
PBS :	Phosphate Buffer Solution
PEG :	Polyéthylène glycol
PEI :	Polyéthylène imine
PVA :	Alcool polyvinylique
PyBOP :	hexafluorophosphate de benzotriazoloxo-tris[pyrrolidino]-phosphonium
RMN MAS :	Résonance Magnétique Nucléaire Magic Angle Spinning
SDS :	dodécylsulfate de sodium
SPIONs :	Nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (Superparamagnetic iron oxide nanoparticles)
SVF :	Sérum de veau fœtal
THT :	Traitement hydrothermal
TiONts :	Nanotubes de titanates
TR :	<i>Trans</i> -resvératrol
UV-Vis :	Ultraviolet-visible
XPS :	Spectroscopie de photoélectron X

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Illustration des différentes utilisations biomédicales du titane et de ses alliages [5].	2
Figure 2 : Schéma qui illustre l'approche « bottom-up » de synthèse des nanomatériaux et les différentes dimensionnalités obtenues [1].	14
Figure 3 : Schéma montrant le principe de la méthode « template » et images MEB des nanotubes d'oxyde de titane obtenus à l'issue d'une synthèse effectuée par M. Lai <i>et al.</i> [55].	15
Figure 4 : Principe de l'oxydation anodique d'une feuille de titane dans une solution aqueuse de fluorures [63].	16
Figure 5 : Cliché MET de deux nanotubes de titanate synthétisés par voie hydrothermale statique (T=150°C, t=48 h, [NaOH]=10 M).	18
Figure 6 : Comparaison de la DRX expérimentale des TiONts et les positions théoriques des pics de diffraction de (a) $\text{H}_2\text{Ti}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$, (b) $\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ et (c) $\text{H}_2\text{Ti}_4\text{O}_9 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($\lambda=1.54060 \text{ \AA}$) selon T. Brunatova <i>et al.</i> [90].	20
Figure 7 : Diagrammes de transformation morphologique de trois précurseurs (anatase, rutile et Degussa P25) en fonction de la concentration de la base et de la température [96].	22
Figure 8 : Evolution de la concentration des nanotubes en fonction de la température et de la concentration de NaOH pour un précurseur P25 pendant 20 h [96].	23
Figure 9 : Effet de la concentration de la base et de la température sur le rendement de la synthèse des TiONts pendant 20 h [76].	23
Figure 10 : Images MET des nanostructures synthétisées à différentes conditions expérimentales selon R. Ma <i>et al.</i> [68] : (a) des TiONts de haute pureté obtenus dans les conditions optimales de synthèse (130°C et 48h), (b) des particules d'anatase résiduelles obtenues quand la température et la durée du THT sont faibles (110°C, 12h) et (c, d) images MEB et MET de nanorubans, obtenus à des conditions dures de synthèse (170°C pendant une semaine).	24
Figure 11 : Diagramme de transition de phase en fonction de la température du THT et de la concentration en acide nitrique lors de l'étape de lavage post-synthèse [100].	25
Figure 12 : Images MET des TiONts obtenus par THT assisté par microondes pendant 4h à 130°C (gauche) et 150°C (droite) [113].	26
Figure 13 : Représentation schématisée du mécanisme de formation des nanotubes et des nanorubans en relation avec la taille du précurseur [78].	27
Figure 14 : Schéma qui résume le mécanisme de formation des TiONts par dissolution/recristallisation, proposé par Kukovecs <i>et al.</i> [83].	29
Figure 15 : Modèle d'une nanoparticule multifonctionnelle qui permet de transporter un ou plusieurs agents thérapeutiques; le ciblage biomoléculaire par des anticorps ou d'autres espèces de reconnaissance; l'amplification du signal de l'imagerie par un agent de contraste; l'échappement des barrières biologiques par l'amélioration de la perméabilité dans les cellules à travers les jonctions et par le polyéthylène glycol (PEG) pour éviter l'absorption par des macrophages [136].	32
Figure 16 : Exemples des principaux nanovecteurs d'agents thérapeutiques [135].	34
Figure 17 : Schéma représentant les voies des réactions possibles de l'APTES sur la surface de l'oxyde de fer [163].	38
Figure 18 : Formules chimiques du (a) DHCA et de la (b) L-DOPA.	39
Figure 19 : Représentation des différentes conformations d'attachement « couché » (à droite) et « debout » (à gauche) de la L-DOPA à la surface du TiO_2 [167].	40
Figure 20 : Désacétylation de la chitine en chitosan [187].	42
Figure 21 : Structure du trans-resvératrol.	43
Figure 22 : Les différents réacteurs utilisés sont (de gauche à droite) un autoclave de synthèse en statique (URCMA), un réacteur de synthèse par agitation mécanique par balancement (URCMA) et un réacteur de synthèse avec une tige à palette tournante et pression contrôlée (ICB).	50

Figure 23 : Diffractogramme du TiO ₂ rutile utilisé comme précurseur ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$).	51
Figure 24 : Clichés MET du dioxyde de titane utilisé comme précurseur.....	52
Figure 25 : Evolution du diffractogramme des échantillons synthétisés en mode statique, à la température (120, 150 et 200°C) pendant 24 h dans [NaOH]=10 M.	52
Figure 26 : Clichés MET des échantillons synthétisés en mode statique pendant 24h, [NaOH]=10 M à (a-b) 120°C, (c-d) 150°C et (e-f) 200°C.	53
Figure 27 : Evolution des diffractogrammes des échantillons synthétisés en mode statique à 150°C dans [NaOH]=10 M pendant 24, 48 ou 96 h.	54
Figure 28 : Clichés MET des échantillons synthétisés en mode statique à 150°C, dans [NaOH]=10 M et pendant (a) 24 h, (b) 48 h et (c) 96 h.	55
Figure 29 : (a) DRX et (b-d) images MET des échantillons synthétisés à 150°C en mode statique, pendant 96 h et à différentes concentrations de soude : (b) 5 M, (c) 7 M et (d) 10 M.	55
Figure 30 : Clichés MET des nanotubes de titanate synthétisés en mode statique, à 150°C, dans NaOH 10M, dans le grand autoclave, pendant (a,b) 96 h et (c,d) 48 h. [NaOH]=10 M.....	57
Figure 31 : Images MET montrant l'évolution de la morphologie des TiONts en fonction du temps d'agitation à 150°C (a-c) TNT-48-0, (d-f) TNT-16-0 (16h, pas d'agitation), (g-i) TNT-16-5 (16h, agitation 5 min/h), (j-l) TNT-16-10, (m-o) TNT-16-15 et (p-r) TNT-16-20. TNT-48-0 est pris comme référence (synthèse en mode statique). [NaOH]=10 M.	59
Figure 32 : Mesure de la surface spécifique des produits de synthèse (méthode BET) en fonction du temps d'agitation à 150°C, pendant 16 heures, [NaOH]=10 M.	61
Figure 33 : DRX des produits synthétisés à 150°C pendant 16h sous différents temps d'agitation (5, 10, 15 et 20min/h). TNT-48-0 est pris comme référence ($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$). [NaOH]=10 M.	61
Figure 34 : Comparaison entre le diagramme DRX des TiONts de référence TNT-48-0 et (a) la carte ICDD du composé H ₂ Ti ₂ O ₅ .H ₂ O, (b) TNT-16-20 et les cartes des composés H ₂ Ti ₂ O ₅ .H ₂ O (ICDD 47-0124) et H ₂ Ti ₃ O ₇ (carte ICDD 47-0561).	62
Figure 35 : Spectres Raman des TiONts synthétisés à 150°C pour un processus statique et avec une agitation de 0 à 20 min/h, [NaOH]=10 M.	63
Figure 36 : Courbes ATG/DTG des nanotubes de référence TNT-48-0 montrant les intervalles de perte de masse (sous un débit d'air de 25 mL/min et à une rampe de température de 5°C/min).....	65
Figure 37 : Désomation des spectres XPS de l'oxygène O1s des TiONts de référence et des TiONts synthétisés à 150°C pendant 16 h et pour différents temps d'agitation qui varient de 0 à 20 min/h. [NaOH]=10 M.	67
Figure 38 : Diffractogrammes des TiONts synthétisés pendant 8 heures et sous agitation à 10 min/h en fonction de la température (150, 160, 170 et 180°C), [NaOH]=10 M, $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$	69
Figure 39 : Evolution de la morphologie et de la surface spécifique des TiONts en fonction de la température de la réaction, pendant 8 h de synthèse et sous une agitation à 10 min/h, [NaOH]=10 M.	70
Figure 40 : Courbes ATG des TiONts synthétisés à 150, 160, 170 et 180°C, pendant 8 h avec une agitation de 10min/h et [NaOH]=10 M.	70
Figure 41 : DRX des TiONts synthétisés à 180°C, avec une agitation de 10 min/h, pendant 2, 4, 6 et 8 h et [NaOH]=10 M.	71
Figure 42 : Images MET des TiONts synthétisés à 180°C et sous une agitation de 10 min/h pendant (a-c) 2h, (d-f) 4h, (g-i) 6h, (j-l) 8 h, [NaOH]=10 M.....	72
Figure 43 : DRX du TiO ₂ rutile et des TiONts synthétisés sous agitation mécanique continue à 180°C et pendant 30 min, 1 h et 2 h. [NaOH]=10 M.	73
Figure 44 : Evolution de la surface spécifique et de la morphologie des TiONts en fonction du temps (30 min, 1 et 2 h) de la réaction pour des synthèses en agitation continue à 180°C et [NaOH]=10 M.	74
Figure 45 : Images MET et METHR de (a, b) TNT-180-0.5 (tubes avec un grand nombre de couches) (c) TNT-180-1 (présence d'un nanofeuillet de titanate court entouré par des petits TiONts).	75

Figure 46 : Détermination de l'énergie de gap, par la méthode Kubelka-Munk, du TiO ₂ rutile et des TiONts synthétisés à 180°C, sous une agitation continue et pendant 0.5, 1 et 2 h dans [NaOH]=10 M.	76
Figure 47 : Spectres Raman des TiONts synthétisés pendant 30 min, 1 h et 2 h à 180°C sous agitation continue, [NaOH]=10 M.	76
Figure 48 : Illustration par images MET du mécanisme de formation des TiONts (a, d, f) TNT-180-0.5 (T=180°C, t=30 min, agitation continue) sans lavage eau/acide; (c) TNT-180-0.5 avec lavage acide (b, e, g) TNT-160-10 (T=160°C, t=8 h, agitation=10 min/h) avec lavage acide; (i) TNT-180-1 (T=180°C, t=1h, agitation continue) avec lavage acide; (h) TNT-180-2 (T=180°C, t=2h, agitation=10min/h) avec lavage acide.	78
Figure 49 : Images MET des trois lots de TiONts (a, b) TNT-155-dyn-36-ICB, (c, d) TNT-150-stat-48-CMA et (e, f) TNT-180-stat-2-CMA.	80
Figure 50 : Désommission des spectres XPS O1s des trois lots de TiONts dits optimaux.	81
Figure 51 : Comparaison entre les courbes ATG/DTG des TiONts des trois lots dits optimaux.	81
Figure 52 : Spectre Raman de l'échantillon TNT-180-0.5 sans et avec lavage eau/acide. Synthèse en mode dynamique dans [NaOH]=10 M.	82
Figure 53 : (a) Désommission du spectre XPS C1s et (b) spectre IR des TNT-180-0.5 sans lavage eau/acide. Synthèse en mode dynamique dans [NaOH]=10 M.	83
Figure 54 : Images MET de l'échantillon TNT-180-0.5 (a, b, c) récupéré directement après la synthèse hydrothermale ([NaOH]=10 M) sans aucun lavage eau/acide (la grille MET a été préparée dans l'éthanol) et (d, e) après un lavage eau/acide.	83
Figure 55 : Effet du lavage acide sur le diffractogramme des TiONts. Cas de l'échantillon TNT-180-8 obtenu avec une agitation de 10 min/h. [NaOH] = 10M.	84
Figure 56 : Images MET des TNT-180-2 (T=180°C, t=2h, agitation=10 min/h) (a) avec lavage eau, (b) après lavage eau/acide et des TNT-160-10 (T=160°C, t=8 h, agitation=10min/h) (c) avec lavage eau et (d) après le lavage eau/acide. [NaOH] = 10M lors des deux synthèses.	85
Figure 57: Mesures du potentiel zêta des nanotubes de titanate en fonction du pH et dans NaCl (10 ⁻² M). ...	92
Figure 58: Suivi de la stabilité d'une suspension de TiONts en fonction du temps dans l'eau ultra pure, pH=6,0 (photo d'une suspension de TiONts après 1 h).	92
Figure 59 : Image MET de nanotubes nus agglomérés.	93
Figure 60 : Evolution des courbes du potentiel zêta, en fonction du pH, des nanotubes nus et modifiés par le DHCA à pH=2,0, 6,5 et 10, T=25°C et pendant 48 h. Mesures dans NaCl 10 ⁻² M.	96
Figure 61 : Courbes ATG des nanohybrides TiONts-DHCA synthétisés à différents pH 2,0, 6,5 et 10,0 (T=25°C et t=48 h). Analyses sous un débit d'air de 25 mL/min et à une rampe de température de 5°C/min.	96
Figure 62 : Spectres IR des (a) nanohybrides greffés par le DHCA à différents pH en comparaison avec le spectre des TiONts nus et celui du DHCA pur ; (b) TiONts-DHCA préparés à pH 2,0 et DHCA pur entre 1000 et 1850 cm ⁻¹	97
Figure 63 : Evolution du spectre UV-visible de la L-DOPA en fonction du pH dans l'intervalle de pH 2-13,5. ..	98
Figure 64 : Schéma des étapes d'oxydation de la L-DOPA (inspiré des travaux de G. Robinson <i>et al.</i> [244]). ..	99
Figure 65 : Courbes du potentiel zêta des TiONts-DOPA synthétisés à différents pH. Mesures effectuées dans NaCl 10 ⁻² M.	100
Figure 66 : Comparaison de la stabilité des nanohybrides élaborés à des différents pH dans PBS 0,1 M (pH=7,4).	101
Figure 67 : Spectres UV-visible (a) des filtrats récupérés au moment du lavage des nanohybrides TiONts-DOPA après 48 h de réaction à pH=2, 4, 6 et 10 avec des photos des suspensions obtenues (b) de la L-DOPA pure à pH 2 ;6 ;9 et 11.	102
Figure 68 : Désommission des spectres XPS C1s et N1s des nanohybrides TiONts-DOPA_pH2 et TiONts-DOPA_pH10.	103
Figure 69 : Stabilité des nanohybrides (a) TiONts-DHCA et (c) TiONts-DOPA synthétisés à pH 2 pendant 2, 4, 6, 15, 24 et 48 h ; analyses effectuées dans le PBS 0,1 M (pH=7,4). Courbes ATG des nanohybrides (b) TiONts-DHCA et (d) TiONts-DOPA synthétisés à pH 2 pendant 2, 4, 6, 15, 24 et 48 h. Analyses effectuées sous un débit d'air de 25 mL/min et à une rampe de température de 5°C/min.	105

Figure 70 : Suivi de l'adsorption des catéchols à la surface des TiONts à pH 2, par des mesures de leurs concentrations en solution en fonction du temps et à deux concentrations (0,05 mg/mL et 0,2 mg/mL).	107
Figure 71 : Concentrations de DHCA et L-DOPA libérées des TiONts-DHCA et TiONts-DOPA en solution en fonction du temps et dans des conditions physiologiques simulées ([NaCl]=0,15 M, T=37°C, pH=7,4).	108
Figure 72: Comparaison entre les taux de greffage déterminés par UV-visible et par ATG pour deux séries d'expériences différentes. Pour la série 1 les nanohybrides ont été lavés par ultrafiltration alors que pour la série 2 ils ont été lavés par des cycles de centrifugation/redispersion.	109
Figure 73: Photos des suspensions de (a) TiONts non greffés (b) TiONts-DHCA (pH=2, t=48 h) (c) TiONts-DOPA (pH=2, t=24 h).	110
Figure 74 : Désommission des spectres XPS C1s des nanohybrides TiONts-DHCA et TiONts-DOPA en comparaison avec les spectres des molécules DHCA et L-DOPA pures.	111
Figure 75 : Clichés MET de TiONts-DHCA et des TiONts-DOPA synthétisés dans des conditions optimisées (pH=2,0, t=48 et 24h respectivement).	112
Figure 76 : Evolution du potentiel zêta des nanohybrides TiONts-AC synthétisés pour différents pH de réaction (T=25°C, t= 24h). Mesures dans NaCl 10 ⁻² M.	113
Figure 77 : Courbes ATG des TiONts nus et des nanohybrides TiONts-AC synthétisés à différents pH (T=25°C et t=24h). Analyses sous un débit d'air de 25 mL/min et à une rampe de température de 5°C/min.	114
Figure 78: Désommission des spectres XPS C1s et O1s de l'AC pur et des nanohybrides TiONts-AC synthétisés à pH 4,0 et 5,5 (T=25°C, t=24h).	115
Figure 79 : Suivi de la stabilité des TiONts non greffés en suspension et des nanohybrides TiONts-AC, en fonction du temps et dans le PBS 0,1 M (pH=7,4).	115
Figure 80 : Représentation schématisée du greffage de l'APTES sur les TiONts (pour le CPTES un chlore remplace le groupe NH ₂).	117
Figure 81 : Courbes du potentiel zêta en fonction du pH des TiONts non greffés et des deux nanohybrides TiONts-APTES et TiONts-CPTES (NaCl 10 ⁻² M).	117
Figure 82 : Courbes ATG/DTG des nanohybrides (a) TiONts-APTES et (b), analyse sous air, 25 mL/min, rampe 5°C/min.	118
Figure 83 : Spectre IR des nanohybrides (a) TiONts-APTES et (b) TiONts-CPTES. Pastilles KBr. Le spectre de référence soustrait est celui des TiONts nus.	119
Figure 84: Spectres XPS C1s, O1s, N1s (APTES) et Cl2p (CPTES) des nanohybrides TiONts-APTES et TiONts-CPTES.	121
Figure 85: Suivi de la stabilité des nanohybrides TiONts-APTES et TiONts-CPTES en fonction du temps en comparaison avec les TiONts-nus (PBS 0,1 M, pH=7,4).	121
Figure 86 : Clichés MET des nanohybrides (a-c) TiONts-APTES et (d-f) TiONts-CPTES dans l'eau.	122
Figure 87 : Formule semi-développée du dérivé stilbénique synthétisé, le 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)- <i>trans</i> -stilbène.	128
Figure 88 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de la synthèse organique du 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)- <i>trans</i> -stilbène (HAPtS).	128
Figure 89 : Caractérisation du 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)- <i>trans</i> -stilbène (HAPtS) (a) spectre IR (pastille KBr) (b) spectre UV-Visible (dans le DMSO).	129
Figure 90 : Désommission des spectres XPS C1s, O1s et N1s du 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)- <i>trans</i> -stilbène (HAPtS).	130
Figure 91 : Schéma représentant l'accrochage du composé stilbénique sur les TiONts.	131
Figure 92 : Schéma de synthèse des TiONts-DHCA-HAPtS (1) étape d'activation du COOH du DHCA par le couple EDC/NHS et formation d'un ester (2) étape de greffage du HAPtS par couplage peptidique.	132
Figure 93 : Schéma de synthèse des TiONts-DHCA-HAPtS en utilisant le PyBOP pour le couplage.	133
Figure 94 : Comparaison entre les deux méthodes de couplage (a) courbes ATG (sous air, 5°C/min de 50 à 800°C) (b) courbes du potentiel zêta en fonction du pH (NaCl 10 ⁻² M) des TiONts-DHCA-HAPtS préparés en utilisant le couple EDC/NHS ou le PyBOP.	134

Figure 95 : Courbes ATG/DTG des nanohybrides TiONts-DHCA, TiONts-DHCA-HAPtS (PyBOP) et TiONts-DHCA-HAPtS (EDC/NHS). En bas de chaque courbe, décomposition des courbes DTG avec localisation des pics de perte (°C) et le pourcentage de contribution de chaque pic (%) à la perte totale, entre 200 et 520°C (effectué avec le logiciel Fityk).	135
Figure 96 : Désomation des spectres XPS C1s, O1s et N1s (a) du HAPtS seul, (b) des TiONts-DHCA (c) des TiONts-DHCA-HAPtS (PyBOP), (d) des TiONts-DHCA-HAPtS (EDC/NHS).	137
Figure 97 : Schéma de synthèse des TiONts-CPTES-HAPtS par condensation.	138
Figure 98 : Courbes ATG/DTG des nanohybrides TiONts-CPTES-HAPtS et TiONts-CPTES-HAPtS. En bas de chaque courbe, décomposition des courbes DTG avec localisation des pics de perte (°C) et le pourcentage de contribution de chaque pic (%) à la perte totale, entre 150 et 550°C (avec le logiciel Fityk) (sous air, 5°C/min).	139
Figure 99 : Comparaison entre les courbes ATG des TiONts nus, TiONts-CPTES et TiONts-CPTES-HAPtS (sous air, 5°C/min).	139
Figure 100 : Effet du greffage du HAPtS sur la charge de surface des TiONts-CPTES (NaCl 10 ⁻² M).	140
Figure 101 : Désomation des spectres XPS C1s, O1s et N1s de (a) la molécule HAPtS seule, (b) des TiONts-CPTES (c) des TiONts-CPTES,-HAPtS.	141
Figure 102 : Comparaison entre les spectres IR du HAPtS seul (référence : KBr) et des TiONts-CPTES-HAPtS (référence : KBr+TiONts nus).	142
Figure 103 : Stabilité des suspensions de TiONts nus, TiONts-CPTES et TiONts-CPTES-HAPtS en fonction du temps (PBS 0,1 M, pH=7,4).	142
Figure 104 : Formule chimique du chitosan.	143
Figure 105 : Courbe du potentiel zêta du chitosan en fonction du pH (NaCl 10 ⁻² M).	144
Figure 106 : Représentation schématique des trois étapes de greffage du chitosan aux TiONts par une liaison covalente.	145
Figure 107 : Evolution du potentiel zêta des TiONts nus et greffés après chaque étape de la synthèse des TiONts-APTES-Glu-CT (NaCl 10 ⁻² M).	145
Figure 108 : Courbes ATG des nanohybrides après chaque étape de greffage des TiONts-APTES-Glu-CT, sous air (25 mL/min) avec une rampe de 5°C/min.	147
Figure 109 : Spectres IR du CT seul, des TiONts nus, des TiONts-APTES, des TiONts-APTES-Glu et des TiONts-APTES-Glu-CT.	148
Figure 110: Désomation des spectres XPS C1s, O1s et N1s du CT pur et des nanohybrides obtenus aux différentes étapes de la synthèse des TiONts-APTES-Glu-CT.	150

Figure 111 : Représentation schématisée de l'adsorption du CT sur un nanotube par interactions électrostatiques.	151
Figure 112: Evolution des courbes des mesures du potentiel zêta en fonction du pH des TiONts nus et greffés avec du CT adsorbé (10^{-2} NaCl).	152
Figure 113 : Comparaison entre les spectres IR des TiONts nus, des TiONts-CT et du CT pur.	152
Figure 114 : Désomation des spectres XPS C1s, O1s et N1s des TiONts-CT.....	153
Figure 115 : Courbes ATG du CT pur, des TiONts-CT et des TiONts-APTES-Glu-CT (analyses sous hélium, rampe de température : 5°C/min).	154
Figure 116 : Evolution du courant ionique des quatre principales espèces dégagées (m/z 18, 28, 32 et 44) lors de l'analyse thermogravimétrique du CT pur, des TiONts-CT et des TiONts-APTES-Glu-CT en fonction du temps et sous flux d'hélium.	155
Figure 117 : Etude de la stabilité colloïdale des suspensions de TiONts nus et des deux nanohybrides synthétisés par les deux approches de greffage TiONts-CT et TiONts-APTES-Glu-CT dans différents milieux à la concentration 100µg nanohybrides/mL (n=3).	158
Figure 118 : Clichés MET de l'état de dispersion des TiONts modifiés par le chitosan, dans l'eau (a,b) TiONts-APTES-Glu-CT (c,b) TiONts-CT.	159
Figure 119 : Photos des deux plaques 96 puits de cellules HepG2 + nanohybrides (a) avant (b) après ajout du rouge neutre.	160
Figure 120 : Pourcentage de viabilité cellulaire en fonction de la concentration des nanohybrides mis en contact avec les cellules HepG2 dans le MEM (n=3) : TiONts-APTES-Glu-CT et TiONts-CT. T ⁻ : cellules dans le milieu, T ⁺ : SDS.	161
Figure 121: Cinétique d'incorporation de l'uridine tritiée dans les cellules HepG2 en fonction du temps sur une gamme de concentrations en nanohybrides allant de 6,5 à 100 µg/mL en comparaison avec le T ⁻ (MEM sans nanohybrides, non cytotoxique) et T ⁺ (MEM + K ₂ Cr ₂ O ₇ , cytotoxique) (n=3).	162
Figure 122 : Histogramme présentant les pourcentages de viabilité cellulaire en fonction des concentrations en nanohybrides en comparaison avec le T ⁻ (MEM sans nanohybrides, non cytotoxique) et T ⁺ (MEM + K ₂ Cr ₂ O ₇ , cytotoxique).	162
Figure 123 : Pourcentage de (a) survie des embryons et (b) d'éclosion des œufs de poisson zèbre en fonction de la concentration en TiONts-CT.....	163

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Tableau comparatif entre les trois formes allotropique du TiO ₂ [43, 45].	12
Tableau 2: Les propriétés physico-chimiques du TiO ₂ [50].	13
Tableau 3 : Variation de la pression de la vapeur d'eau dans un réacteur fermé en fonction de la température [67].	17
Tableau 4 : Comparaison entre les trois principales méthodes de synthèse de nanotubes [52, 70-72].	18
Tableau 5 : Comparaison entre les diffractions des TiONts et les structures cristallines proposées dans la littérature (base de donnée JCPDS). d _{mesurée} correspond aux distances mesurées par DRX dans cette étude [77].	19
Tableau 6 : Caractéristiques biologiques de différents polymères (liste non exhaustive) [18, 28, 152].	41
Tableau 7 : Quelques exemples de systèmes d'encapsulation du trans-resvératrol [204]	45
Tableau 8 : Conditions expérimentales des échantillons synthétisés en mode dynamique. [NaOH]=10 M.	58
Tableau 9 : Dimensions des nanotubes et des nanorubans et distances intercouches mesurées par MET et DRX pour un THT (150°C, 16 h) à des temps d'agitations par heure différents pour une centaine de TiONts et quelques dizaines de nanorubans comptés. TNT-48-0 est pris comme référence. [NaOH]=10 M.	60
Tableau 10 : Propriétés structurales et thermiques du précurseur et des TiONts de référence et des TiONts synthétisés à des temps d'agitation différents à 150°C et dans [NaOH]=10 M.	65
Tableau 11 : Analyses élémentaires par XPS des différents échantillons synthétisés en mode dynamique à 150°C et dans [NaOH]=10 M (en pourcentage atomique).....	67
Tableau 12 : Caractéristiques des TiONts synthétisés en mode dynamique à 180°C, sous agitation mécanique en continu et pendant 30 min, 1 h et 2 h. [NaOH]=10 M.	73
Tableau 13: Les conditions expérimentales des synthèses des trois lots de TiONts, dits optimaux.	79
Tableau 14 : Comparaison entre les caractéristiques des trois lots de TiONts dits optimaux.	80
Tableau 15 : Analyse élémentaire par XPS en pourcentage atomique (%) des trois lots de TiONts dits optimaux.....	81
Tableau 16 : Analyse élémentaire en pourcentage atomique (%) de TNT-180-0.5 sans lavage eau/acide. Synthèse en mode dynamique dans [NaOH]=10 M.	83
Tableau 17 : Analyse élémentaire par XPS en pourcentage atomique (%) de l'échantillon TNT-180-8 (T=180°C, t=8h, 10 min/h d'agitation et [NaOH]=10M) sans et avec lavage acide.	85
Tableau 18 : Les caractéristiques et les limites des nanotubes de titanate.	93
Tableau 19 : Formule chimique et pKa du DHCA et de la L-DOPA.	94
Tableau 20: Evolution du point isoélectrique (PIE) et taux de greffage en DHCA calculé par ATG, en fonction du pH.	95
Tableau 21 : Positions des bandes IR et leurs attributions pour le DHCA pur et les nanohybrides TiONts-DHCA préparés à pH 2,0.	98
Tableau 22: Caractéristiques des nanohybrides TiONts-DOPA en fonctions du pH de mise en contact (greffage en molécule/nm ² , PIE et potentiel zêta).....	100
Tableau 23 : Analyses élémentaires par XPS des TiONts-DOPA synthétisés à pH 2 et pH 10.	103
Tableau 24 : Evolution du taux de greffage du DHCA et de la L-DOPA sur les TiONts, calculés par ATG, en fonction du temps de la réaction, à pH 2 et température ambiante (25°C).	104
Tableau 25 : Caractéristiques des nanohybrides TiONts-DHCA et TiONts-DOPA synthétisés dans les conditions optimales en comparaison avec celles des TiONts nus. Moyenne de trois synthèses indépendantes..	110
Tableau 26 : Comparaison entre les analyses élémentaires des TiONts nus et modifiés par le DHCA et la L-DOPA et les catéchols seuls.....	111
Tableau 27: Points isoélectriques (PIE) des TiONts-AC et taux de greffage de l'AC en fonction du pH de la réaction (T=25°C, t=24h).....	113

Tableau 28 : Analyses élémentaires par XPS des nanohybrides TiONts-AC synthétisés à pH 4,0, 5,5 (T=25°C et t= 24h).	114
Tableau 29 : Caractéristiques des nanohybrides TiONts-APTES et TiONts-CPTES (valeurs moyennes pour n échantillons, n=3).....	118
Tableau 30 : Analyse chimique élémentaire par XPS des TiONts-APTES et des TiONts-CPTES (pourcentage atomique, %).	119
Tableau 31 : Comparaison entre les pourcentages élémentaires expérimentaux obtenus par XPS et ceux théoriques du 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)- <i>trans</i> -stilbène (HAPtS).	130
Tableau 32 : Points isoélectriques et taux de greffage du DHCA et du HAPtS calculés par ATG.	133
Tableau 33 : Analyse chimique élémentaire par XPS des TiONts selon le type de greffage et la méthode de couplage (%).	135
Tableau 34 : Détail du calcul du taux de greffage pour les TiONts-CPTES et TiONts-CPTES-HAPtS.	138
Tableau 35 : Evolution de l'analyse élémentaire par XPS en fonction des étape de greffage du HAPtS (en pourcentage atomique,%).....	140
Tableau 36 : Caractéristiques des nanohybrides TiONts-APTES-Glu-CT obtenus après chaque étape de greffage (PIE et taux de greffage).	146
Tableau 37: Analyse élémentaire par XPS du CT seul, des TiONts nus et greffés (en pourcentage atomique, %) aux différentes étapes de l'élaboration des TiONts-APTES-Glu-CT et des TiONts-CT obtenus par adsorption.	148
Tableau 38: Comparaison entre les pourcentages expérimentaux et théoriques des liaisons du carbone dans les nanohybrides aux différentes étapes de la synthèse des TiONts-APTES-Glu-CT.	149
Tableau 39: Principales pertes de masse, taux de greffage et principaux gaz dégagés pendant le traitement thermique et déterminés à partir des analyses ATG-SM du CT pur et des nanohybrides (TiONts-CT et TiONts-APTES-Glu-CT).	154
Tableau 40 : Compositions des milieux utilisés pour les études de stabilité colloïdales des suspensions de nanohybrides nanotubes/chitosan et conditions de ces mesures (pH et température).....	156

INTRODUCTION GENERALE

Parce que la matière manifeste des propriétés surprenantes à l'échelle nanométrique, les nanotechnologies nous promettent un monde plus développé et nous proposent une révolution de l'invisible basée sur les nanomatériaux. Aujourd'hui, tout le monde parle de ces matériaux, vus par le grand public comme "magiques", d'où la nécessité de donner une définition à ce terme. En fait, les nanomatériaux peuvent être définis de deux façons : la première, est la plus commune et la plus utilisée dans la majorité des travaux de recherches, se limite à lier la définition à la taille ; les nanomatériaux se définissent alors comme des matériaux ayant au moins une dimension inférieure à 100 nm. La deuxième définition est beaucoup plus restrictive et indique que ces matériaux possèdent des propriétés qui dépendent, de façon intrinsèque, de la taille de leurs grains [1].

La recherche sur les nanomatériaux a contribué de manière significative à leur développement dans plusieurs secteurs technologiques tels que l'électronique, l'informatique, les télécommunications, le transport, le stockage de l'information, la conversion et le stockage de l'énergie et le domaine médical [2]. Dans ce dernier secteur, les nanomatériaux sont développés pour plusieurs applications comme le diagnostic, la bio-détection et la thérapie [2]. De nos jours, différents types de nanoparticules ont été développées pour transporter des molécules actives et cibler des zones spécifiques dans le corps [3]. Les avantages apportés par ces systèmes sont l'amélioration de la quantité et de la bioactivité du médicament, en protégeant l'agent thérapeutique des effets environnementaux dans les milieux biologiques, et la réduction des effets secondaires engendrés par les traitements conventionnels [4].

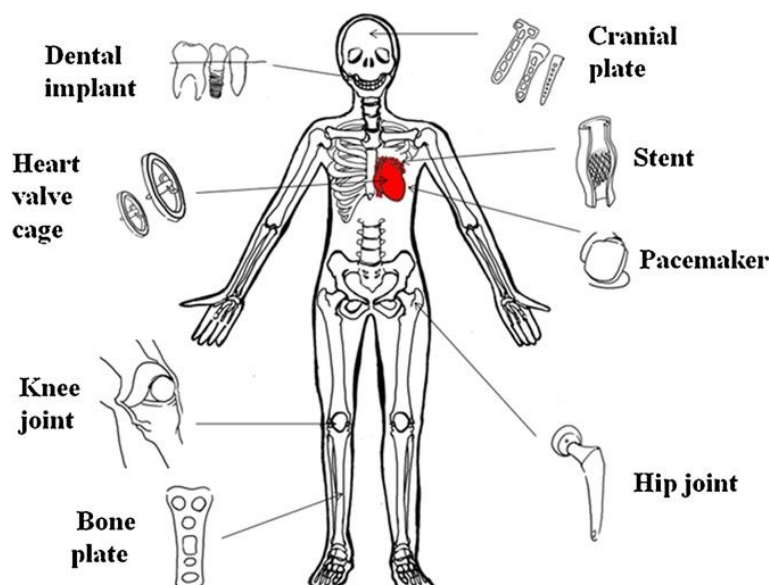


Figure 1: Illustration des différentes utilisations biomédicales du titane et de ses alliages [5].

La première utilisation du titane dans le domaine médical remonte à l'après deuxième guerre mondiale dans les appareils médicaux chirurgicaux et dentaires [6]. Il a été utilisé également dans les stimulateurs cardiaques, les cœurs artificiels et les dispositifs circulatoires [6] (Figure 1). L'utilisation accrue du titane et de ses alliages dans de nombreuses applications biomédicales provient de leur biocompatibilité et de leur résistance à la corrosion, en contact avec les fluides biologiques, par rapport aux alliages traditionnels [7]. Les nanotubes

d'oxyde de titane, quant à eux, ont tout d'abord été évalués dans les prothèses dentaires et osseuses [5]. En dépit de tous les avantages présentés par ces différents dérivés du titane, il est parfois indispensable d'apporter des modifications de surface à ces biomatériaux afin d'améliorer leur biocompatibilité et performance dans les systèmes biologiques [7].

Récemment une nouvelle forme de nanotubes d'oxyde de titane appelés nanotubes de titanate (TiONts) a été synthétisée par voie hydrothermale [8]. Ayant une taille nanométrique et une morphologie particulière en spirale, ces nanostructures ont étendu leurs domaines d'application à la photocatalyse [9, 10], la production et la conversion de l'énergie [11-13], les capteurs [14], les nanofluides [15] et de nouveaux secteurs du domaine médical [16]. En effet, ces nouvelles nanostructures ouvrent la porte à de nouvelles applications et rejoignent la famille des nanomatériaux utilisés pour la vectorisation des agents thérapeutiques [17, 18] on parle alors de « nanovecteurs ». Même si plusieurs applications des TiONts sont en cours développement, très peu d'équipes dans le monde orientent leurs recherches vers l'utilisation des TiONts pour véhiculer des médicaments. L'équipe (Bio-)Hybrid Nanoparticles & Nanostructures (BH2N), l'équipe d'accueil dans laquelle j'ai réalisé ma thèse, fut la première à ouvrir cette voie, au sein du département nanoscience au laboratoire ICB, sous la direction du Pr. Nadine Millot. En effet, il y a une dizaine d'années que l'équipe BH2N a initié une nouvelle thématique au sein de l'ICB, qui s'intéresse au développement des nanomatériaux destinés à des applications médicales. Différents types de nanomatériaux ont été étudiés depuis. En plus des nanotubes de titanate [16, 19, 20], des nanorubans de titanate ont été développés pour la médecine régénérative [21, 22], des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques pour l'imagerie bimodale [23-26], des nanoparticules mésoporeuses de silice [27] et récemment des nanoparticules d'oxyde de tantale, ces deux dernières pour le théranostic¹.

Grâce à des collaborations avec des partenaires régionaux notamment l'ICMUB (Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne), le CHU (Centre Hospitalier Universitaire) de Dijon, le CGFL (Centre Georges François Leclerc) et la société NVH Medicinal ainsi que *via* la participation de l'équipe aux projets 3MIM (Marquage de Molécules par les Métaux pour l'Imagerie Moléculaire), PharmImage® et à l'Equipex IMAPPI (Integrated Magnetic resonance And Positron emission tomography in Preclinical Imaging), il a été possible de développer les bioapplications des nanopoudres synthétisées (nanovecteurs thérapeutiques et agents de contraste) dans deux grands domaines que sont les maladies cardiovasculaires et l'oncologie. Ce travail s'inscrit dans cette thématique de l'équipe BH2N et s'intéresse au développement d'un nouveau nanovecteur basé sur les nanotubes de titanate pour véhiculer un agent de grand pouvoir anti-oxydant, utile notamment en oncologie [17].

Le cancer est l'une des principales causes de décès dans le monde. Les traitements conventionnels y compris la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et les thérapies biologiques (immunothérapie) sont limités par l'accessibilité à la tumeur, le risque de toxicité ou d'endommagement d'un organe vital, la propagation des cellules cancéreuses dans l'ensemble du corps et le manque de sélectivité vis-à-vis des cellules tumorales [3]. La

¹ Néologisme qui résulte de la contraction de deux termes «thérapeutique» et «diagnostic». C'est l'utilisation couplée d'un médicament et d'un outil de diagnostique pour une thérapie ciblée.

chimiothérapie est l'approche thérapeutique prépondérante pour le traitement du cancer local ou métastaté. Cependant, l'action de l'agent anticancéreux n'est pas spécifique aux tissus tumoraux, d'où l'intérêt de leur administration vers les cellules cibles [28]. Les nanoparticules colloïdales incorporant des agents anticancéreux peuvent surmonter la résistance des tissus tumoraux à l'action du médicament en augmentant sa sélectivité et en réduisant sa toxicité vis-à-vis des cellules saines [28]. La conception d'un vecteur doit répondre à un certain nombre de critères tels que la biocompatibilité, l'affinité pour les cellules cible, le transport de la molécule active jusqu'à sa cible avec une quantité suffisante tout en la protégeant d'une inactivation précoce [29]. Ce travail de thèse présente les différentes étapes de l'élaboration d'un nouveau vecteur à base de TiONts pour véhiculer une molécule synthétique à pouvoir anti-oxydant/anticancérogène qui est le phénol stilbénique, 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-*trans*-stilbène (HAPtS), molécule structurellement proche du *trans*-resvératrol (TR).

Le *trans*-resvératrol est un polyphénol stilbénique naturel, il est connu par son pouvoir à prévenir ou ralentir certains nombres de maladies y compris les maladies cardiovasculaires [30] et le cancer [31] en raison de ses propriétés anti-inflammatoires [32], antivirales, antitumorales [33] et antifongiques. Cette molécule qualifiée comme polyvalente [34], représente le cœur de plus de 22 000 publications dans les trois dernières décennies. Cependant, les propriétés de cette molécule restent toujours sous investigations. A l'Université de Bourgogne, l'activité anti-tumorale de ce polyphénol stilbénique a été étudiée sur des cellules cancéreuses colorectales et hépatiques par le Laboratoire BioPeroXIL [35] alors que son activité antifongique a été mise en évidence par l'UMR Agrosup INRA-Université de Bourgogne-Agroécologie [36]. Les dérivés du *trans*-resvératrol étudiés ont été synthétisés à l'ICMUB.

Malgré toutes les propriétés biologiques intéressantes du *trans*-resvératrol, sa faible biodisponibilité et solubilité [37], son prompt métabolisme et son élimination rapide dans les urines restent ses limites majeures. Une des solutions proposées ces dernières années pour augmenter l'efficacité du TR est de l'encapsuler dans des liposomes ou dans des nano- ou micro-systèmes d'encapsulation [38]. Dans ce cadre, un projet entre l'ICMUB et l'équipe BH2N de l'ICB vise à greffer la molécule HAPtS sur des nanoparticules d'oxyde de fer (SuperParamagnetic Iron Oxide) et des nanotubes de titanate TiONts et à évaluer sa capacité thérapeutique après greffage.

Les objectifs de la thèse :

L'objectif de ce travail est de synthétiser et de fonctionnaliser des nanotubes de titanate afin d'élaborer des nanohybrides capables d'immobiliser la molécule d'intérêt et qui remplissent certains critères leur permettant d'être utilisés dans le domaine biomédical en tant que nanovecteur. Pour atteindre cet objectif, un certain nombre de défis doivent être relevés :

La synthèse des nanotubes de titanate par voie hydrothermale est la première étape à maîtriser dans ce projet. Malgré les nombreuses études menées sur la synthèse des TiONts, l'obtention d'une phase pure de nanotubes, après une synthèse hydrothermale, n'est pas une évidence parce qu'elle est gouvernée par plusieurs paramètres de synthèse. Il est donc indispensable d'étudier les paramètres qui permettent d'aboutir à une synthèse réussie de ces nanostructures. Parmi les objectifs de cette première partie, on trouve la nécessaire optimisation

du temps de synthèse hydrothermale afin d'essayer de le réduire tout en conservant les propriétés physico-chimiques des TiONts. Une étude structurale et morphologique sont aussi nécessaires afin de mieux comprendre le mécanisme de synthèse des nanotubes qui reste toujours une énigme très débattue. La partie synthèse hydrothermale a été effectuée au laboratoire de chimie minérale appliquée (URCMA) à la faculté des sciences de Tunis par deux méthodes de traitement hydrothermal (statique et dynamique).

La préfonctionnalisation des TiONts par des ligands et des molécules organiques afin de rendre leur surface plus réactive et améliorer leur stabilité colloïdale est une étape primordiale dans l'élaboration des nanohybrides. Le choix de ces molécules doit remplir quelques critères dont certains sont communs (leur non-toxicité et leur stabilité chimique) et certains sont variables selon l'objectif final de l'utilisation (la fonction organique qu'ils présentent en surface des nanoparticules, leur charge...). Une étude des conditions de greffage ainsi qu'une quantification des groupements fonctionnels à la surface des TiONts représentent les principaux défis chimiques de cette partie.

La biocompatibilité est l'un des plus importants critères dans le développement d'un nanovecteur destiné à des applications biomédicales. Elle assure par exemple aux TiONts une furtivité, dans le cas de leur injection intraveineuse, leur permettant de franchir les barrières du système biologiques sans déclencher une réaction immunitaire dans l'organisme. Pour cette raison, il est indispensable d'améliorer la biocompatibilité des nanotubes par un polymère qui ne doit pas perturber les fonctions cellulaires normales, telles que la prolifération et l'adhésion des cellules et l'expression de leurs gènes [39].

Le dernier objectif de ce travail consiste à greffer la molécule d'intérêt. Il s'agit de trouver une méthode adéquate de greffage du HAPtS à la surface des nanotubes. Cette méthode doit répondre aux propriétés physico-chimiques de la molécule greffée telles que les choix du solvant et de la molécule de pré-fonctionnalisation. Par ailleurs, une quantité suffisante de la molécule active doit être greffée à la surface des TiONts afin d'assurer l'activité biologique.

Ce manuscrit est divisé en quatre chapitres :

Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique et il est subdivisé en deux parties principales ; une première partie est dédiée à la synthèse des TiONts y compris les différentes méthodes de synthèses ainsi que les principaux paramètres qui influencent la formation des nanotubes par voie hydrothermale. La deuxième partie est un aperçu bibliographique sur les différentes applications médicales des TiONts plus particulièrement leur utilisation comme nanovecteur de molécules thérapeutiques.

Le deuxième chapitre est scindé en deux parties. La première s'intéresse à la synthèse des TiONts en mode statique avec une étude paramétrique ainsi que des caractérisations physico-chimiques des nanotubes obtenus. La deuxième partie expose un mode particulier de synthèse hydrothermale des TiONts qui est le mode dynamique. Cette partie montre l'effet de l'agitation sur la réduction du temps de la réaction et la morphologie des nanostructures obtenues. Les synthèses en mode dynamique de cette partie ont été réalisées au laboratoire URCMA, à l'aide d'un dispositif qui permet d'assurer une agitation mécanique forte par balancement. Des études

structurales, morphologiques et physico-chimiques sont réalisées à l'aide de nombreuses techniques de caractérisation telles que la Diffraction des rayons X (DRX), la Microscopie Electronique en Transmission (MET), les mesures de surface spécifique, les spectroscopies Raman, UV-Vis et XPS *etc.* Des discussions sur l'effet de la variation des paramètres expérimentaux, avec notamment l'influence des lavages eau/acide ainsi que des propositions sur le mécanisme de formation des nanorubans et des TiONts sont également présentées.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude des différentes modifications de surface des TiONts qui visent à améliorer leur stabilité colloïdale et les adapter pour transporter la molécule d'intérêt et le polymère de biocompatibilité. Le greffage de trois types de molécules est présenté dans cette partie : deux catéchols, l'acide citrique et deux organosilanes. Le but de ces greffages est de garnir la surface des TiONts par des groupements fonctionnels organiques qui sont plus réactifs que les groupements hydroxyles inorganiques de surface des TiONts. L'état de dispersion et la stabilité colloïdale des nanohybrides synthétisés sont aussi évalués.

Le dernier chapitre s'intéresse, en premier lieu, à l'optimisation du greffage du HAPtS. Plusieurs méthodes ont été testées en changeant le ligand intermédiaire de greffage (DHCA et CPTES). La deuxième partie de ce dernier chapitre est consacrée à l'amélioration de la biocompatibilité des TiONts par le greffage d'un polymère naturel, le chitosan. Le choix de ce polymère découle de ses caractéristiques physico-chimiques intéressantes et de sa large utilisation dans le domaine biomédical en tant que polymère de biocompatibilité. Deux méthodes de greffage du chitosan sont proposées et discutées. La première méthode repose sur une liaison covalente et utilise deux molécules intermédiaires (l'aminopropyltriéthoxysilane (APTES) et le glutaraldéhyde (Glu)). La deuxième méthode est réalisée en une seule étape et est basée sur des interactions électrostatiques. Les différents greffages sont évalués par ATG, IR et XPS notamment. Une évaluation de la stabilité colloïdale de ces nanohybrides, dans différents milieux mimant les milieux biologiques est présentée. Finalement, des tests biologiques sont réalisés pour évaluer la cytotoxicité des nanohybrides élaborés.

Chapitre I.
ETAT DE L'ART SUR LA SYNTHÈSE
HYDROTHERMALE DES NANOTUBES DE
TITANATE (TiONts) ET LEURS
APPLICATIONS BIOMÉDICALES

I.1. Introduction

Depuis leur synthèse pour la première fois par Kasuga et *al.* en 1998 [8], les nanotubes de titanate (TiONts) ont attiré l'attention des chercheurs avec plus de 2700 publications². En effet, ces nanomatériaux présentent une morphologie et des propriétés intéressantes laissant prévoir des applications dans plusieurs domaines tels que la production et le stockage de l'énergie, les nanofluides, la photocatalyse et le domaine biomédical [40].

Ce chapitre est un aperçu bibliographique sur les différents matériaux qui seront étudiés dans ce manuscrit en commençant par le précurseur TiO_2 , en passant par les nanotubes de titanate et en arrivant jusqu'à la modification de surface des nanoparticules (en particulier des nanotubes) pour applications médicales. L'accent est mis en première partie sur les conditions expérimentales de la synthèse hydrothermale des TiONts, les différents facteurs influençant leur obtention et leurs principaux domaines d'applications. Dans la deuxième partie de ce chapitre, une introduction à la nanovectorisation de molécules d'intérêt biologique est faite, plus particulièrement sur les nanovecteurs à base d'oxydes inorganiques.

I.2. Généralités sur les nanotubes d'oxydes de titane

I.2.1. Le dioxyde de titane

I.2.1.1. Généralités sur le dioxyde de titane

Le titane est le neuvième élément d'un point de vue abondance dans la croûte terrestre. Il était appelé autrefois le premier fils de la terre, découvert par Gregor en 1791 et nommé par Klaproth en 1795 [41, 42]. Il se trouve principalement sous forme de minerais d'ilménite (FeTiO_3), de rutil (TiO_2) mais aussi sous d'autres formes très rares [43].

Il existe plusieurs formes allotropiques du dioxyde de titane dont les trois principales sont rutil, anatase et brookite [42]. La forme rutil est la plus abondante, vient ensuite l'anatase et après la brookite [43]. Chaque forme cristallographique est formée par un assemblage d'octaèdres de base TiO_6 , où l'ion Ti^{4+} est entouré par six ions O^{2-} . L'arrangement des octaèdres diffère selon le polymorphe de TiO_2 [44]. Les structures cristallines du rutil et de l'anatase sont tétraogonales. Les mailles conventionnelles sont formées respectivement de deux et quatre motifs TiO_2 . Par contre, la brookite a une structure cristalline orthorhombique et la maille contient huit motifs TiO_2 [45, 46].

² Source Web of Knowledge, consulté le 30/09/2017

Tableau 1: Tableau comparatif entre les trois formes allotropique du TiO₂ [43, 45].

Forme allotropique	Rutile	Anatase	Brookite
Structure cristalline	Tétraгонаle	Tétraгонаle	Orthorhombique
Température de transition de phase (°C)	Point de fusion 1830-1855°C*	Transformation en rutile à 915°C*	Transformation en rutile à 750°C*
Point d'ébullition (°C)	2500°C	2500°C	2500°C
Densité	4,13 - 4,24	3,8 – 3,9	4,13
Indice de réfraction	2,79 - 2,90	2,49 - 2,54	-
Gap énergétique (eV)	3,0	3,2	-

* pour les gros grains

Le dioxyde de titane peut être classé selon la taille des particules en :

- Dioxyde de titane fin (forme micrométrique) : la taille des particules est comprise entre 0,1 et 0,4 µm avec une surface spécifique BET (Brunauer – Emmet – Teller) d'environ 5 à 15 m²/g.
- Dioxyde de titane ultrafin (forme nanométrique) : la taille des particules est inférieure à 100 nm et la surface spécifique est entre 10 et 300 m²/g.

Il est bien connu depuis longtemps que le TiO₂ rutile est la phase la plus stable à haute température. Cependant, il a été montré que le TiO₂ anatase de taille nanométrique (<11 nm) est plus stable que la forme rutile. Ce renversement de stabilité est liée à l'énergie de surface des matériaux [47]. Une étude sur les transitions de phase d'un certain nombre de matériaux, y compris le TiO₂, a été menée par A. Navrotsky [48]. Dans cette étude, il a été montré que les phases métastables ont tendance à avoir une énergie de surface (exprimée en J/m²) plus faible, ce qui explique qu'elles deviennent plus stables quand la taille des grains constitutifs diminue, *i.e.* quand la surface spécifique augmente.

1.2.1.2. Propriétés physico-chimiques du TiO₂

Le dioxyde de titane est un semi-conducteur, chimiquement stable et non toxique sous sa forme « gros grains ». En présence des rayons UV, il devient un catalyseur puissant grâce à la production d'espèces réactives d'oxygène (radicaux hydroxyles, oxygène singulet, radicaux superoxyde) [49].

Tableau 2: Les propriétés physico-chimiques du TiO_2 [50].

Propriété	Caractéristique
Masse molaire (g/mol)	79,9
Aspect	Solide blanc réfringent (poudre)
Stabilité thermique	Thermostable
Odeur	Inodore
Solubilité	Insoluble dans l'eau, l'éthanol et d'autres solvants organiques
Réactivité	Peu réactif/ il peut être attaqué par l'acide H_2SO_4 à chaud, l'acide HF et les bases concentrées
Propriétés optiques	Absorbe les rayons UV (l'absorption dépend de la taille des particules)

1.2.1.3. Utilisations

Grâce à ces propriétés intéressantes, le dioxyde de titane de taille micrométrique a été utilisé depuis le début de l'année 1920 comme pigment blanc dans les peintures, les plastiques, le caoutchouc, les colorants alimentaires...[43]. Il représente environ 70% de la production mondiale des pigments devant le noir de carbone et l'oxyde de fer [50]. Depuis les années 1990, le TiO_2 de taille nanométrique connaît de nouveaux domaines d'applications comme absorbant de la lumière UV (dans les écrans solaires et d'autres produits cosmétiques) et photo-catalyseur (dans plusieurs produits de nettoyage, les systèmes domestiques de filtration de l'air...). Les cellules solaires et les composants électroniques (capteurs de gaz) sont aussi parmi les nouvelles applications du TiO_2 dû à ses propriétés de transfert d'électrons [51].

Le TiO_2 nanométrique a fait l'objet de nombreuses recherches dans le domaine médical également. En effet, il a été utilisé comme nanovecteur de certains ions connus pour leur pouvoir antimicrobien comme l'ion Ag^+ [52]. Un pouvoir anticancéreux a été prouvé récemment pour le cancer du cerveau à travers la génération des radicaux libres d'oxygène, sous l'effet d'une irradiation par la lumière visible, ces radicaux libres interagissent avec les mitochondries des cellules cancéreuses et déclenchent leur mort [43].

1.2.2. Définition et méthodes de synthèse des nanotubes d'oxydes de titane

1.2.2.1. Définition des nanomatériaux

«Qu'est ce qu'un nanomatériau ? ». Alors que la définition universelle d'un nanomatériau indique que c'est un matériau qui a au moins une de ses dimensions inférieure à 100 nm, la définition restrictive indique qu'un nanomatériau possède des propriétés qui dépendent de façon intrinsèque de la taille des grains [1]. Comme les nanomatériaux sont des matériaux assez coûteux, une définition aussi restrictive semble plus adéquate. La différence entre les propriétés physico-chimiques des nanomatériaux et des matériaux à gros grains est liée à deux effets principaux qui sont : l'effet de dimensionnalité et l'effet de surface.

- L'effet de dimensionnalité est à prendre en compte lorsque les propriétés physico-chimiques dépendent "d'une grandeur caractéristique". Cette grandeur peut être, par exemple, le libre parcours moyen des électrons dans le cas des propriétés électriques, le champ coercitif dans le cas des propriétés magnétiques ou la longueur d'onde du rayonnement incident, l'épaisseur de peau du matériau ou encore le diamètre de l'exciton dans le cas des propriétés optiques. L'évolution de ces propriétés avec la taille des particules est souvent non monotone et présente un extremum [53].
- L'effet de surface est lié à l'énergie de surface des nanomatériaux. Ce paramètre dépend, entre autre, de la surface spécifique des matériaux (où la taille intervient). En effet, à l'état nano, un grand nombre d'atomes se trouvent à la surface des matériaux, conduisant à des liaisons dites pendantes et par conséquent à une énergie de surface qui ne devient plus négligeable mais au contraire d'importance majeure. L'énergie de surface influe notamment sur la réactivité et la thermodynamique (températures de transition de phases notamment) [53]. Dans ce cas, l'évolution de la propriété varie de façon monotone avec la taille des particules.

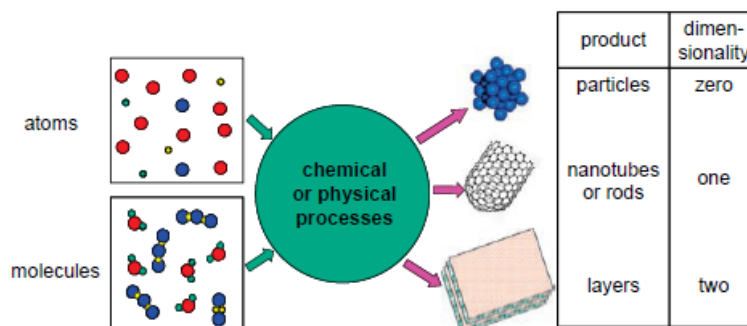


Figure 2 : Schéma qui illustre l'approche « bottom-up » de synthèse des nanomatériaux et les différentes dimensionnalités obtenues [1].

Les nanomatériaux peuvent être élaborés par deux différentes approches : l'une dite "top-down" et l'autre dite "bottom-up". L'approche "bottom-up" utilise les molécules ou les atomes comme des blocs de synthèse pour former des nanoparticules par voies physiques ou chimiques. L'approche "top-down" utilise des blocs massifs des matériaux pour produire la structure prévue à l'échelle nanométrique notamment par des méthodes mécaniques [1, 53].

L'approche "bottom-up" peut produire des nanoparticules de différentes dimensionnalités qui peuvent être classés selon leur forme soit quasi-isotrope (nanoparticule sphériques, cubes, fleurs...), unidimensionnelle (nanofils, nanotubes) ou bidimensionnelle (nanofeuillets, couches minces) comme le montre la Figure 2.

1.2.2.2. Les méthodes de synthèse des nanotubes d'oxyde de titane

Les nanotubes d'oxyde de titane sont des structures unidimensionnelles. Plusieurs méthodes ont été préconisées pour leur synthèse à savoir : le dépôt chimique en phase vapeur (CVD), la méthode « template », l'oxydation anodique d'une feuille de titane et les voies chimiques de synthèse (méthode sol-gel et traitement hydrothermal).

➤ Méthode « template »

C'est la première voie de synthèse des nanotubes d'oxydes de titane adoptée par Hoyer en 1995 [54]. La morphologie des matériaux obtenus dépend du moule et des paramètres de la synthèse. On distingue deux types de moule : positif si l'oxyde se forme sur la surface extérieure du moule dit « template » et négatif si l'oxyde se dépose à la surface interne du moule [5].

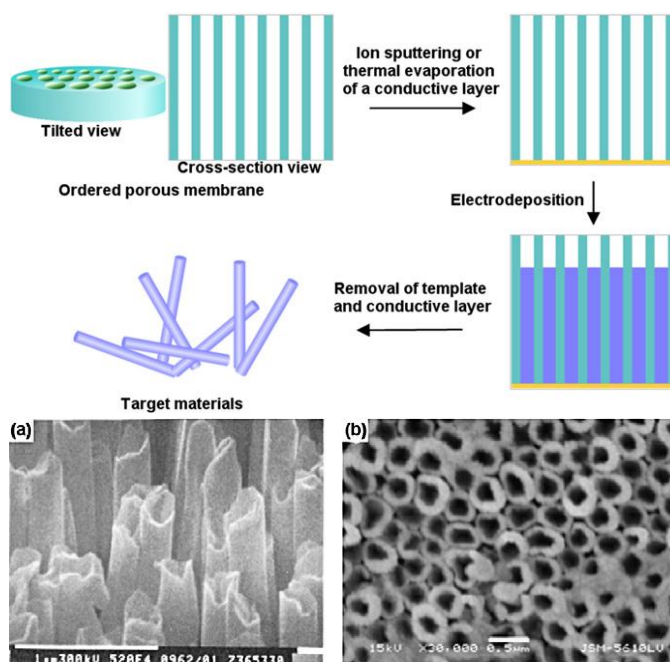


Figure 3 : Schéma montrant le principe de la méthode « template » et images MEB des nanotubes d'oxyde de titane obtenus à l'issue d'une synthèse effectuée par M. Lai *et al.* [55].

Cette méthode utilise comme précurseur une solution de Ti(IV) ($\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_4$ ou TiF_4). Les tubes de TiO_2 se déposent par voie électrochimique (électrodéposition) sur un moule qui peut être formé principalement par un oxyde d'aluminium ou une membrane de polycarbonate [56]. La déposition électrochimique à l'intérieur des pores se fait après le revêtement de la surface du moule avec un film conducteur (en général, soit par pulvérisation ionique ou par évaporation thermique des métaux) qui sert d'électrode de travail. Sous l'effet d'un potentiel appliqué entre deux électrodes, les cations qui se trouvent dans la solution migrent vers la cathode où ils se déposent et subissent une réaction de réduction. Les anions migrent vers l'anode pour subir une réaction d'oxydation. Le produit final est obtenu après l'enlèvement du revêtement métallique et du moule (Figure 3) [55]. Les tubes ainsi obtenus ont une longueur d'environ 8 μm , un diamètre intérieur $D_i = 70\text{-}100\text{ nm}$ et un diamètre extérieur $D_{\text{ext}} = 140\text{-}180\text{ nm}$ [54]. L'inconvénient de ce type de synthèse est que la longueur des nanotubes est limitée par l'épaisseur du moule qui est au minimum d'environ 50-60 μm [55]. Les tubes sont de composition TiO_2 et une étude structurale a montré que les tubes synthétisés sont monocristallins de la forme anatase [57].

➤ Synthèse par oxydation anodique d'une feuille de titane

Cette méthode a été découverte pour la première fois en 1953, par Keller *et al.* [58] et optimisée par Masuda et Fukuda en 1995 [59]. La première oxydation anodique du titane a été

réalisée en 1984 [60] mais la contribution importante a été faite par Zwilling en 1999 [61] et Gong en 2001 [62].

✓ Principe de la méthode

Le principe de la méthode consiste à appliquer une différence de potentiel à une plaque de titane ayant quelques mm d'épaisseur et placée en position d'anode dans une cellule électrochimique contenant une solution d'ions fluorures. Le potentiel appliqué permet d'oxyder le Ti métal en TiO_2 (équation 1). Les ions chargés négativement, OH^- et F^- , migrent vers l'anode. Sur la cathode se produit la réduction de l'eau avec un dégagement d'hydrogène (Figure 4). La présence des ions F^- est indispensable pour la formation des nanotubes car ils dissolvent partiellement le film de dioxyde de titane formé en surface de la plaque de titane, ce qui engendre la porosité dans la plaque du titane et donc les nanotubes, selon l'équation 2 [63].

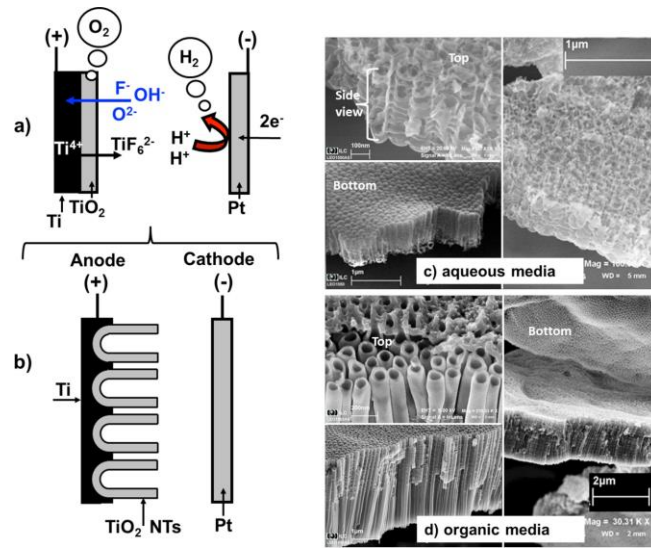
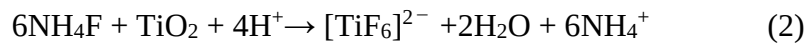
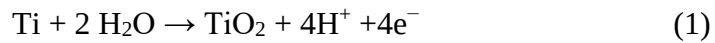


Figure 4 : Principe de l'oxydation anodique d'une feuille de titane dans une solution aqueuse de fluorures [63].



Le diamètre des nanotubes synthétisés par anodisation est étroitement lié au potentiel appliqué surtout dans l'intervalle 10-60V dans un milieu aqueux. Dans ce cas le diamètre varie de 20 à 130 nm [63].

La structure cristalline des nanotubes de TiO₂ obtenus a été étudiée par Z. Lockman *et al.* [64], ils ont montré, par des analyses DRX et Raman, que les nanotubes obtenus par anodisation sont de structure anatase.

✓ Facteurs influençant la synthèse

Les dimensions et la morphologie des nanotubes obtenus sont souvent contrôlées par la composition de l'électrolyte, le potentiel appliqué, le pH, la température, le potentiel de l'anodisation et le temps d'application de ce potentiel. Un pH faible favorise la précipitation du

TiO₂ ce qui explique l'utilisation de l'acide fluorhydrique au lieu d'un sel de fluorure. La concentration optimale en ions fluorures est entre 0,3 et 0,5 en pourcentage massique [65]. L'augmentation du potentiel appliqué conduit à une augmentation du diamètre des nanotubes obtenus [62].

La morphologie des nanotubes synthétisés est gouvernée par le type d'électrolyte employé. En effet, si l'électrolyte contient l'ion fluorure, perchlorate, chlorure ou bromure, une morphologie tubulaire et poreuse (nanotubes d'oxyde de titane) se développe perpendiculairement à la feuille du titane. Si l'électrolyte est différent de la composition précédente (par exemple une solution aqueuse d'acide sulfurique, phosphorique ou acétique), une couche non poreuse se développe. Durant le processus d'anodisation, l'épaisseur du film augmente aussi bien que sa résistance électrique et il se comporte comme une barrière contre le flux d'ions et d'électrons ce qui limite la croissance du film jusqu'à quelques milliers de nanomètres [63].

I.2.2.3. Synthèse hydrothermale de nanotubes de titanate (TiONts)

En 1998, une nouvelle voie de synthèse des nanotubes d'oxyde de titane est apparue et a abouti à des nanotubes de morphologie, chimie et structure différentes de ceux obtenus par les deux précédentes méthodes ; il s'agit de la synthèse hydrothermale initiée par Kasuga *et al.* [8]. Par conséquent, le terme nanotube de TiO₂ n'est plus adéquat pour ce type de matériau, car il s'agit en fait de « nanotubes de titanate » (TiONts). Avant de commencer à présenter ces tubes, il paraît indispensable de définir ce qu'est un système hydrothermal.

➤ Définition du traitement hydrothermal

La synthèse hydrothermale est un processus qui a fait ses preuves pour la préparation des particules fines d'oxyde de taille inférieure à 100 nm[66]. Elle est basée sur des réactions qui se produisent en présence d'un équilibre entre l'eau liquide et l'eau vapeur sous une température et une pression élevées ($T > 100^{\circ}\text{C}$ et $P > 1$ bar). Le traitement hydrothermal permet de cristalliser des matériaux céramiques dont la vitesse de cristallisation est trop lente dans les conditions standards ou de précipiter des phases qui ne sont pas stables dans ces conditions. La réaction se fait, généralement, sous une pression autogène qui correspond à la pression de vapeur saturante de la solution à température et composition de solution données (Tableau 3).

Tableau 3 : Variation de la pression de la vapeur d'eau dans un réacteur fermé en fonction de la température [67].

Température (°C)	100	110	120	130	140	150	160	170
Pression (bar)	1,033	1,46	2,025	2,75	3,68	4,87	6,3	8,08
Température (°C)	180	190	200	210	220	230	240	250
Pression (bar)	10,23	12,8	15,86	19,46	22,6	28,45	34,14	40,5

➤ Synthèse hydrothermale des nanotubes de titanate

Les nanotubes de titanate (TiONts), synthétisés par voie hydrothermale, sont des nanomatériaux unidimensionnels, creux, ayant de 3 à 5 couches d'octaèdres de TiO₆ dont le

nombre n'est pas le même de part et d'autre d'un nanotube. Le diamètre intérieur d'un nanotube varie entre 4 et 8 nm et le diamètre extérieur entre 10 et 12 nm (Figure 5). La longueur est de quelques centaines à quelques milliers de nanomètres [68]. Cette morphologie assez particulière est accompagnée par des propriétés intéressantes telles qu'une capacité d'échange d'ions, une conductivité électrique modérée et une grande capacité de stockage de l'hydrogène [40, 69]. La synthèse hydrothermale des nanotubes de titanate (TiONts) a été réalisée pour la première fois par Kasuga *et al.* en 1998 [8]. Les TiONts se forment par le traitement hydrothermal du TiO_2 dans la soude concentrée, à une température élevée et pendant un temps déterminé.

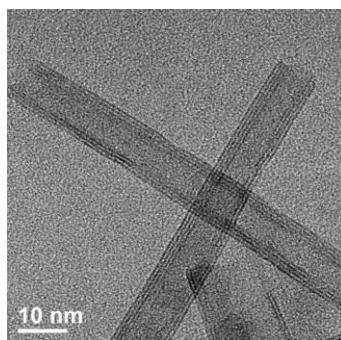


Figure 5 : Cliché MET de deux nanotubes de titanate synthétisés par voie hydrothermale statique ($T=150^{\circ}\text{C}$, $t=48\text{ h}$, $[\text{NaOH}]=10\text{ M}$).

La synthèse hydrothermale reste la méthode la plus avantageuse parmi les deux précédentes pour plusieurs raisons regroupées dans le Tableau 4. Elle est aussi la méthode la plus utilisée pour la synthèse des nanotubes de taille nanométrique [70]. Par conséquent, pour la suite de ce manuscrit nous ne nous intéressons qu'à la synthèse hydrothermale des nanotubes de titanate (TiONts).

Tableau 4 : Comparaison entre les trois principales méthodes de synthèse de nanotubes [52, 70-72].

Méthode	Avantages	Inconvénients	Caractéristiques des nanotubes
Méthode «Template»	Dimensions contrôlées des nanotubes par l'utilisation de plusieurs modèles	Procédé de fabrication compliqué Possibilité de déstructuration des nanotubes lors de la synthèse Méthode coûteuse	Structure ordonnée $70\text{ nm} < \varnothing_{\text{int}} < 100\text{ nm}$ $140\text{ nm} < \varnothing_{\text{ext}} < 180\text{ nm}$ $50\text{ }\mu\text{m} < L < 60\text{ }\mu\text{m}$ TiO_2 anatase
Oxydation anodique	Structure ordonnée et alignée des nanotubes avec un important rapport longueur/diamètre	Masse produite limitée Utilisation d'un électrolyte toxique (HF) Coût de fabrication très élevé Séparation film/substrat difficile	Structure orientée $20\text{ nm} < \varnothing_{\text{int}} < 130\text{ nm}$ $0,5\text{ }\mu\text{m} < L < 1000\text{ }\mu\text{m}$ TiO_2 anatase
Traitement hydrothermal	Méthode de synthèse simple et non coûteuse Diversité morphologique des nanotubes pour plusieurs applications Morphologie contrôlée par les paramètres de synthèse	Temps de réaction long Solution NaOH très concentrée Dimensions des nanotubes non uniformes	Alignement aléatoire des nanotubes (poudre) $4\text{ nm} < \varnothing_{\text{int}} < 8\text{ nm}$ $10\text{ nm} < \varnothing_{\text{ext}} < 12\text{ nm}$ Quelques dizaines nm $< L <$ quelques centaines nm

1.2.3. Structure et composition chimique des nanotubes de titanate

A cause de leur faible cristallinité et du nombre faible des pics de diffraction, la détermination de la structure cristalline des TiONts est une tâche très difficile et un sujet à controverses dans la littérature. De nombreuses tentatives de détermination de la phase cristalline des nanotubes ont été réalisées afin de se rapprocher le plus possible de la structure [72].

L'analyse par diffraction des rayons X (DRX) est la première méthode utilisée pour déterminer la structure cristalline des matériaux. Les positions des principaux pics caractéristiques des nanotubes de titanates sont à $2\theta = 10, 24, 28$ et 48° ($\lambda=1.54060 \text{ \AA}$). Le premier pic a la plus forte intensité et correspond à la distance intercouche, caractéristique des nanotubes [73]. La position et l'intensité des pics $2\theta=10^\circ$ et 28° peuvent varier avec la variation des conditions expérimentales y compris le lavage acide [74, 75]. L'élargissement des pics est dû à la taille nanométrique des nanotubes [76]. Quatre structures cristallines ont principalement été proposées pour les TiONts dans la littérature : deux structures monocliniques trititanique ($\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$) et tétratitanique ($\text{H}_2\text{Ti}_4\text{O}_9 \cdot \text{H}_2\text{O}$) et deux structures orthorhombiques dititanique ($\text{H}_2\text{Ti}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$) et lepidocrocite ($\text{H}_{0.7}\text{Ti}_{1.825}\square_{0.175}\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) [70] (Tableau 5).

Tableau 5 : Comparaison entre les diffractions des TiONts et les structures cristallines proposées dans la littérature (base de donnée JCPDS). $d_{\text{mesurée}}$ correspond aux distances mesurées par DRX dans cette étude [77].

Nanotubes	$\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7^a$		$\text{H}_2\text{Ti}_4\text{O}_9 \cdot \text{H}_2\text{O}^b$		$\text{H}_2\text{Ti}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}^c$		$\text{H}_{0.7}\text{Ti}_{1.825}\square_{0.175}\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}^d$	
$d_{\text{mesurée}}$	d_{hkl}	$h \ k \ l$	d_{hkl}	$h \ k \ l$	d_{hkl}	$h \ k \ l$	d_{hkl}	$h \ k \ l$
8,623	7,87	2 0 0	9,05	2 0 0	9,040	2 0 0	9,272	0 2 0
3,612	3,65	1 1 0	3,672	1 1 0	3,696	1 1 0	3,707	1 1 0
3,137	3,05	3 1 0	3,185	3 1 0	3,204	3 1 0	3,226	1 3 0
2,68	2,67	3 $\bar{1}$ $\bar{2}$	2,668	2 1 $\bar{3}$	2,684	3 0 1	2,686	0 3 1
2,305	2,37	1 1 $\bar{3}$	2,298	2 1 $\bar{4}$	2,306	5 0 1	2,324	0 5 1
1,872	1,88	0 2 0	1,876	0 2 0	1,893	0 2 0	1,891	2 0 0
1,474	-	-	-	-	1,478	2 0 2	1,491	0 0 2
Références	[69, 78-85]		[86-88]		[89-91]		[68, 77]	

^a JCPDS 47-0561 ; monoclinique ; $a=16,023 \text{ \AA}$, $b = 3,749 \text{ \AA}$, $c = 9,191 \text{ \AA}$

^b JCPDS 36-0655 ; monoclinique ; $a= 18,77 \text{ \AA}$, $b = 3,75 \text{ \AA}$, $c = 11,62 \text{ \AA}$

^c JCPDS 47-0124 ; orthorhombique ; $a = 18,03 \text{ \AA}$, $b= 3,783 \text{ \AA}$, $c = 2,998 \text{ \AA}$

^d JCPDS 83-0702 ; orthorhombique; $a = 3,783 \text{ \AA}$, $b =18,545 \text{ \AA}$, $c = 2,982 \text{ \AA}$

Il faut noter, que la structure monoclinique $\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ a été rapportée dans plusieurs études contrairement aux autres structures. Etant donnée les limites de la DRX pour ce système, elle n'était jamais suffisante pour la détermination de la structure des TiONts. C'est pour cela qu'elle est toujours accompagnée par d'autres méthodes de caractérisation. T. Brunatova *et al.* [90] et H. Kochkar *et al.* [91] ont proposé, en associant DRX et microscopie électronique en transmission à haute résolution (METHR), une structure orthorhombique de formule générale $\text{Na}_x\text{H}_{2-x}\text{Ti}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dont les paramètres de maille sont $a=18,03 \text{ \AA}$, $b=3,78 \text{ \AA}$ et $c=2,998 \text{ \AA}$. En effet, les deux protons de l'acide dititanique peuvent être échangés par les ions sodium à différents pH. Le raisonnement de Brunatova *et al.* a été basé sur une comparaison entre le

diffractogramme expérimental obtenu des nanotubes et les positions théoriques des pics de diffraction de trois acides titaniques différents comme le montre la Figure 6 [90].

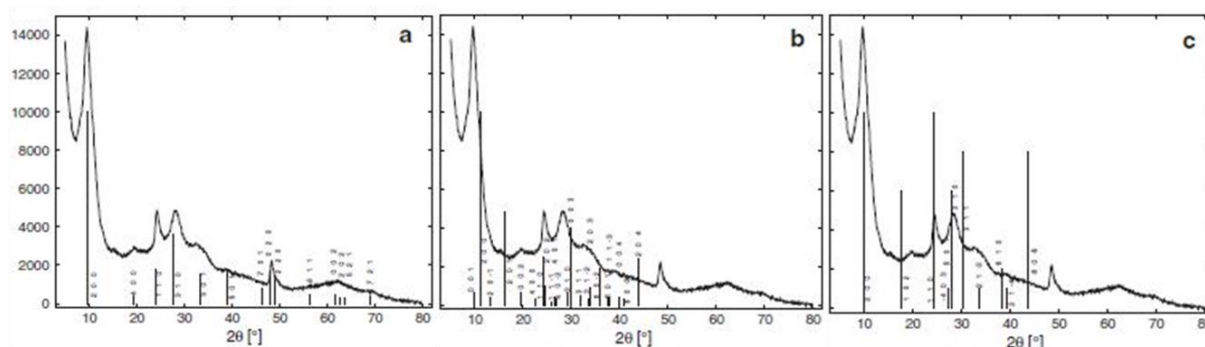


Figure 6 : Comparaison de la DRX expérimentale des TiONts et les positions théoriques des pics de diffraction de (a) $H_2Ti_2O_5.H_2O$, (b) $H_2Ti_3O_7$ et (c) $H_2Ti_4O_9.H_2O$ ($\lambda=1.54060 \text{ \AA}$) selon T. Brunatova *et al.* [90].

Bavykin *et al.* [69] ont proposé une structure monoclinique de formule $H_2Ti_3O_7$ en utilisant la résonance magnétique nucléaire de l'état solide (RMN MAS) et des analyses thermogravimétriques (ATG) pour étudier l'évolution des nanotubes en fonction de la température. A. Papa *et al.* [74] ont attribué la structure orthorhombique $H_2Ti_2O_5.H_2O$ moyennant des analyses élémentaires par XPS. Gao *et al.* [77] et Ma *et al.* [68] se sont servi de la spectroscopie Raman pour confirmer la structure orthorhombique lépidocrocite des nanotubes ($H_{0,7}Ti_{1,827}O_{0,175}O_4.H_2O$) en se basant sur une étude comparative entre le spectre des TiONts et des matériaux purs. F. Ramirez *et al.* [92] ont démontré dans leur étude, par des calculs de dynamique moléculaire, que la transformation de l'anatase en titanate de type lépidocrocite est énergétiquement favorable après un traitement hydrothermal.

Ainsi, une formule générale, retenue par Bavykin *et al.* pour les formes protonées des TiONts, peut être écrite $H_{2(1-z)}Ti_nO_{2n-m+(1-z)}(OH)_{2m}.xH_2O$, où les variables x et z sont associées à la quantité d'eau cristallographique et aux groupements OH obtenus par échange d'ions, tandis que n et m sont associés au type de la structure cristalline. La quantité d'eau peut être déterminée expérimentalement en utilisant les variables x, z, n et m comme suit : $y = (1+m+x-z)/n$ [69].

Plusieurs formules et structures cristallines ont donc été proposées dans de nombreuses études et chacune se base sur des argumentaires solides pour l'illustrer. Au final, il est clair que la structure cristalline dépend des conditions de synthèse et de l'efficacité du lavage acide. Cette question demande plus d'investigations ce que ce travail essaiera de montrer.

1.2.4. Les paramètres influant la synthèse hydrothermale des TiONts

1.2.4.1. Synthèse des TiONts par voie hydrothermale : une seule synthèse et plusieurs morphologies

Le principal inconvénient du traitement hydrothermal (THT) est que la réaction se fait dans un réacteur fermé ce qui rend le contrôle *in situ*, durant la synthèse, de la morphologie des nanotubes ainsi que l'obtention d'un rendement de synthèse de 100% difficile. En fait, une synthèse hydrothermale des TiONts est souvent accompagnée par d'autres morphologies

notamment des nanorubans³, des nanofeuillets et des structures intermédiaires (nanotubes malformés ou en cours de formation...). Malgré tous les efforts et les travaux réalisés, avoir une synthèse avec un rendement de 100 % en TiONts reste toujours un challenge à relever. Ainsi, plusieurs études ont été menée dans la littérature afin d'optimiser les paramètres de synthèse hydrothermale des TiONts.

Plusieurs paramètres gouvernent l'obtention des TiONts durant et après la synthèse hydrothermale. Pour cette raison, de nombreuses études ont été menées afin d'optimiser les conditions de synthèse et d'étudier l'effet de certains paramètres sur la morphologie des nanostructures synthétisées. Dans ce qui suit, un résumé bibliographique rapide des principaux paramètres étudiés et des différentes discussions rapportées dans la littérature est présenté.

1.2.4.2. Influence du précurseur

Lors d'une synthèse hydrothermale, la quantité, la cristallinité et la taille des grains du TiO₂ de départ, introduit dans l'autoclave, sont les premiers choix expérimentaux. Contrairement à certains travaux qui n'ont pas justifié le choix du précurseur employé, plusieurs études ont prouvé son importance dans l'obtention des TiONts.

La cristallinité du TiO₂ initial est un facteur déterminant dans la synthèse des TiONts. En effet, Yao *et al.* (2003) [93] ont montré l'importance de la cristallinité du TiO₂ précurseur en se basant sur le fait que la formation des TiONts passe par un processus de délaminage des particules de TiO₂. Ce résultat a été aussi illustré par Yuan *et al.* (2004) [76] qui ont montré que le TiO₂ amorphe ne permet pas de produire des nanotubes mais plutôt des « nanorubans ». Contrairement à ces deux travaux, Huang *et al.* [89] ont obtenus, en 2010, des TiONts en utilisant le dioxyde de titane amorphe ([NaOH]=8 M, T=150°C et t=72h). Ce résultat a été expliqué par le fait que le TiO₂ amorphe serait une étape intermédiaire de synthèse.

L'influence de la forme cristalline (rutile ou anatase) du TiO₂ a été largement étudiée dans la littérature. Morgan *et al.* [94] ont enregistré une cinétique de dissolution d'ordre deux pour le TiO₂ rutile et d'ordre zéro pour l'anatase. Ce résultat justifie la différence du temps de transformation en TiONts qui est plus lent en partant du le rutile. Le même résultat a été confirmé par Yu *et al.* [95] qui ont prouvé que le rutile nécessite un temps de réaction très long (144 heures) pour se transformer en tubes.

La taille des particules du précurseur est considérée comme un paramètre important dans le contrôle des morphologies obtenues. Il a été prouvé que les nanotubes issus de la synthèse hydrothermale d'une anatase de taille de grains très petite (8-10 nm) avaient un diamètre extérieur plus important (10-30 nm), des couches plus épaisses et une forme tubulaire mal définie ou incomplète [73, 80]. De même, Papa *et al.* [74] et Li *et al.* [78] ont reporté la formation des nanorubans au lieu des nanotubes en utilisant des nanoparticules d'anatase de taille de grains très petite (<17 nm et <13 nm respectivement). En contre partie, les particules

³ Suite aux précédents travaux de l'équipe BH2N, qui ont pointé du doigt et démontré les incohérences de la littérature sur les terminologies « nanobâtonnets », « nanotiges » et « nanorubans », analyses poussées en MET à l'appui (V. Bellat *et al.* [21]), il a été choisi d'utiliser le terme « nanorubans » comme un terme général qui définit ces trois morphologies pour tout le reste du manuscrit

de grande taille (environ 200 nm) conduisent à la formation, non pas de nanotubes, mais plutôt des feuillets à bord enroulé y compris quand la synthèse hydrothermale est assistée par une sonification [86].

Une comparaison entre trois types de précurseur (rutile, anatase et P25 qui est un mélange commercial de rutile et d'anatase), faite par D.L. Morgan *et al.* [96], montre que les trois paramètres : nature du précurseur, température et concentration de la base sont en fait reliés. En se basant sur les résultats obtenus, ils ont modélisé le système par un diagramme de morphologie pour chaque type de précurseur comme le montre la Figure 7. Les limites indiquent le pourcentage relatif des nanostructures formées dans chaque condition. Par exemple pour le précurseur P25 traité à 120°C dans une solution de NaOH 5 M, il y a formation d'un mélange TiONts/nanoparticules avec un pourcentage massique 70 : 30.

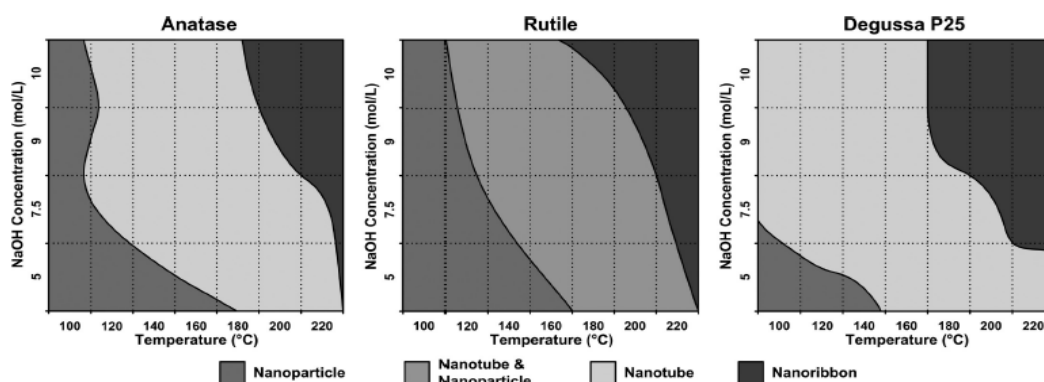


Figure 7 : Diagrammes de transformation morphologique de trois précurseurs (anatase, rutile et Degussa P25) en fonction de la concentration de la base et de la température [96].

1.2.4.3. Influence de la nature et de la concentration de la base

La nature et la concentration de la base utilisée sont considérées comme des facteurs clés dans la synthèse hydrothermale des TiONts, c'est pour cette raison que ces paramètres ont été bien étudiés. En effet, il a été prouvé que l'usage de la potasse (KOH) conduit à la synthèse de nanorubans au lieu des nanotubes habituellement obtenus avec NaOH [76]. Dans la même étude, l'effet de la concentration de NaOH a été étudié. Le meilleur rendement de synthèse en nanotubes a été obtenu pour une plage de concentration entre 10 et 15 M. Pas ou très peu de TiONts ont été obtenus à des concentrations de soude inférieures à 5 M ou supérieures à 20 M [76]. Morgan *et al.* [96] ont montré une relation entre la concentration de la soude et la température de synthèse des TiONts où l'augmentation de la concentration de NaOH de 5M à 10M diminue la température nécessaire à l'obtention des tubes de 220 à 180°C (Figure 8).

L'importance de l'emploi de la soude a été discutée dans l'étude de Chen *et al.* [97] qui l'ont remplacée par un mélange de KOH et LiOH, dans une première expérience, et par le NaCl pur dans une deuxième. L'absence des nanotubes à l'issue des synthèses, dans les deux expériences, conduit à illustrer l'importance de la présence simultanée d'une forte concentration en ion sodium et des conditions fortement basiques pour la formation des tubes. D'autre part, le rapport précurseur/NaOH a été étudié par Sreekantan *et al.* [98] qui ont rapporté qu'avec un rapport NaOH/TiO₂ inférieur à 13, il y a une formation de nanorubans de diamètres

environ 50 nm. Aucun changement de morphologie des TiONts n'a été noté pour des rapports entre 80 et 27.

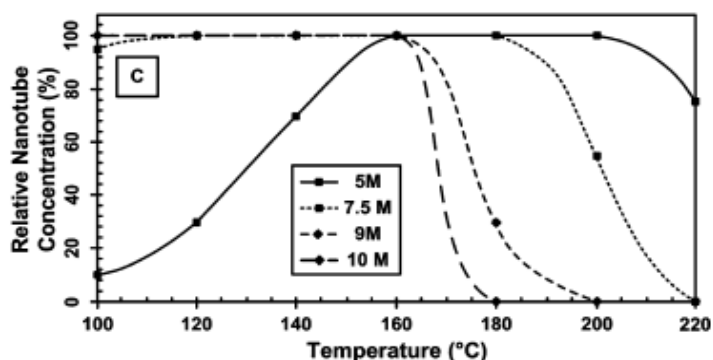


Figure 8 : Evolution de la concentration des nanotubes en fonction de la température et de la concentration de NaOH pour un précurseur P25 pendant 20 h [96].

1.2.4.4. Influence de la température et du temps de synthèse

La température et la durée de la réaction sont deux paramètres expérimentaux qui sont étroitement liés et largement étudiés dans la littérature.

➤ Influence de la température

La température optimale de la synthèse hydrothermale des nanotubes se situe entre 100 et 180°C [76, 99] (Figure 9). Des nanorubans ont été observés par S. Kim *et al.* à partir de 170°C [100]. La première synthèse des nanotubes a été faite par Kasuga *et al.* [8] à une température relativement faible (110°C). Des températures plus hautes ont été employées dans les études qui ont suivi dont les plus communes sont 130°C [75, 84, 101] et 150°C [16, 74, 99, 102, 103]. En fait, une température élevée facilite la rupture de la liaison Ti-O-Ti pour former des liaisons Ti-O-Na et Ti-OH. Une température supérieure à 130°C peut détruire la structure du TiO₂ qui est une étape intermédiaire et obligatoire pour la formation des TiONts [104]. Les températures élevées influent aussi sur la cristallinité des nanostructures obtenues [105].

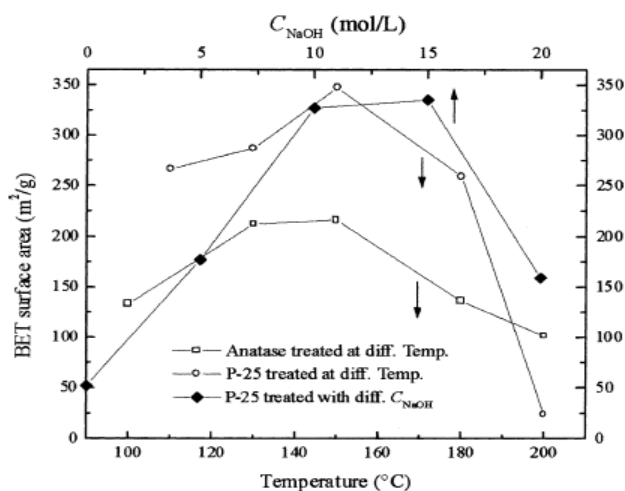


Figure 9 : Effet de la concentration de la base et de la température sur le rendement de la synthèse des TiONts pendant 20 h [76].

➤ Influence du temps de la réaction

La durée du traitement hydrothermal joue un rôle très important dans la synthèse. Par exemple, pour une synthèse sans agitation, R. Ma *et al.* [68] ont étudié, en se basant sur des observations MET (Figure 10), l'effet de la température et de la durée de la réaction sur la morphologie des nanomatériaux obtenus. Une durée optimale entre 24 h et 72 h est généralement obtenue pour une température entre 130 et 150°C afin de synthétiser des TiONts de grande pureté (Figure 10a). Pour une température plus élevée, c'est-à-dire entre 170-190°C et un temps de réaction entre 72 h et une semaine, les nanomatériaux obtenus sont des nanorubans (Figure 10c,d). Nakahira *et al.* [87] ont rapporté que le rendement de synthèse des TiONts en fonction du temps de séjour dans l'autoclave atteint une valeur optimale pour un temps de 96 h. Thorne *et al.* [106] ont suivi l'augmentation du taux de transformation de TiO_2 en TiONts de 0 à 80 % pendant un temps de réaction entre 2 et 72 h à une température de 150°C. Contrairement aux études précédentes qui demandent de très longues durées du traitement hydrothermal (THT), 15 heures ont été suffisantes pour S. Sreekantan *et al.* [98] pour synthétiser des TiONts à 150°C.

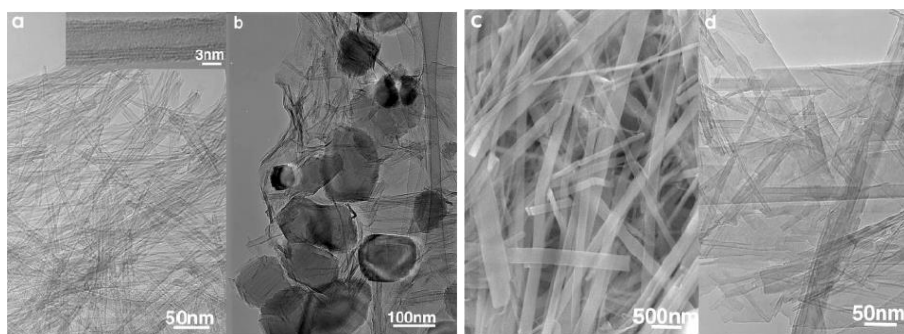


Figure 10 : Images MET des nanostructures synthétisées à différentes conditions expérimentales selon R. Ma *et al.* [68] : (a) des TiONts de haute pureté obtenus dans les conditions optimales de synthèse (130°C et 48h), (b) des particules d'anatase résiduelles obtenues quand la température et la durée du THT sont faibles (110°C, 12h) et (c, d) images MEB et MET de nanorubans, obtenus à des conditions dures de synthèse (170°C pendant une semaine).

1.2.4.5. Influence du lavage eau/acide

Le lavage acide post-synthèse hydrothermale est un point important dans la synthèse hydrothermale des TiONts et une étape controversée dans la littérature. D'après Kasuga *et al.*, le lavage acide est une étape cruciale dans le mécanisme de formation des nanotubes [8]. Plusieurs chercheurs partagent ce point de vue, d'autres considèrent que cette étape ne sert que pour un échange d'ions entre Na^+ et H^+ ce qui permet la conversion de titanate de sodium en titanate d'hydrogène [105]. Ainsi, Tsai *et al.* [104] ont montré que la concentration optimale du HCl durant le lavage est de 0,2 M car elle permet un changement ionique rapide. Une étude similaire avec l'acide nitrique a été réalisée par S. Kim *et al.* [100] qui ont rapporté que le lavage acide sous reflux à 80°C est accompagné d'une transition de phase du titanate en TiO_2 rutile ou anatase avec l'apparition de nouvelles morphologies (Figure 11). En effet, un lavage avec un acide nitrique dilué de concentration 0.05 M conduit à la formation des nanoparticules de phase anatase. D'autre part, des nanorubans de structure rutile apparaissent après un lavage avec de l'acide nitrique concentré (2,65 M).

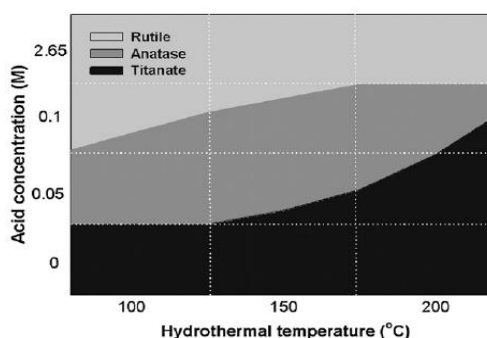


Figure 11 : Diagramme de transition de phase en fonction de la température du THT et de la concentration en acide nitrique lors de l'étape de lavage post-synthèse [100].

Pas très loin des résultats de S. Kim, Lee *et al.* [107] ont prouvé que seulement les produits traités par une concentration d'acide chlorhydrique faible (10^{-3} à 10^{-2} M) donnent la morphologie tubulaire. Par contre, les fortes concentrations détruisent la structure des tubes et diminuent la teneur en sodium. La relation entre le lavage acide et la teneur en Na a été aussi étudiée par A. Turki *et al.* [103]. Dans cette étude, une teneur en sodium plus importante a été obtenue pour les nanotubes qui n'ont pas subi un lavage acide. D'autre part, il a été prouvé que la présence du sodium dans la structure des titanates retarde la transformation structurale, en température, des titanates en anatase et conserve ainsi la morphologie tubulaire jusqu'à des températures plus élevées.

Contrairement à ce qui a été proposé par Kasuga *et al.*, certains chercheurs ont négligé le rôle du lavage acide et son intervention dans le mécanisme de formation des nanotubes en limitant son rôle à l'échange d'ions. Ce point de vue a été illustré par Wang *et al.* [75] et Seo *et al.* [12] moyennant plusieurs techniques de caractérisations (DRX, XPS et EDX). A travers ces deux études, il a été montré que l'ion sodium affecte la stabilité et la cristallinité des nanotubes ; c'est pour cette raison qu'il faut l'éliminer par un lavage acide. Par ailleurs, selon Morgado *et al.* [79], la présence du sodium dans la structure affecte la distance intercouche (distance entre les couches des nanotubes) qui devient plus grande. Papa *et al.* [74] quant à eux, ont montré que le lavage acide n'est nécessaire que lorsque le THT ne conduit pas à la formation des nanotubes.

1.2.4.6. Influence d'un prétraitement et de l'agitation sur la morphologie et le temps de synthèse des nanotubes

➤ Effet d'un prétraitement aux ultrasons ou microondes sur la synthèse des TiONts

Le principal inconvénient du THT est le temps de réaction qui peut atteindre 170 h [108]. Ainsi, de nombreuses études ont été menées pour réduire le temps de la synthèse en utilisant un prétraitement par sonification ou microondes. Zhu *et al.* [109] ont réussi à synthétiser des nanotubes, d'environ 300 nm de longueur, en utilisant un THT assisté par une sonification avec une puissance 280 W. Le temps de la réaction devient alors 4 h. Quant à Ma *et al.* [86], ils ont prouvé que la puissance aussi bien que la durée de la sonification affectent la morphologie des nanostructures obtenues. Ainsi, l'augmentation du temps de la sonification de 15 min à 60 min à 380 W aboutit à la formation des nanorubans qui après un traitement acide se transforment en

nanotubes. I. Kustiningsih *et al.* [110] ont également synthétisé des TiONts en utilisant un traitement par ultrasons pendant 12 heures suivi d'un THT pendant 15 h.

Le traitement par microonde a été aussi réalisé par Y. Peng *et al.* [111] et Y.-C. Chen *et al.* [112] qui ont réduit le temps de réaction à 3 heures en utilisant un THT assisté par microondes en une seule étape avec des puissances différentes. Cependant, on ne voit aucune image MET claire qui montre la présence des nanotubes dans ces deux études. Malgré tout, D. Manfroi *et al.* [113] ont réussi à synthétiser des nanotubes TiONts par THT assisté par microondes à 130°C en 4 h comme le montre la Figure 12.

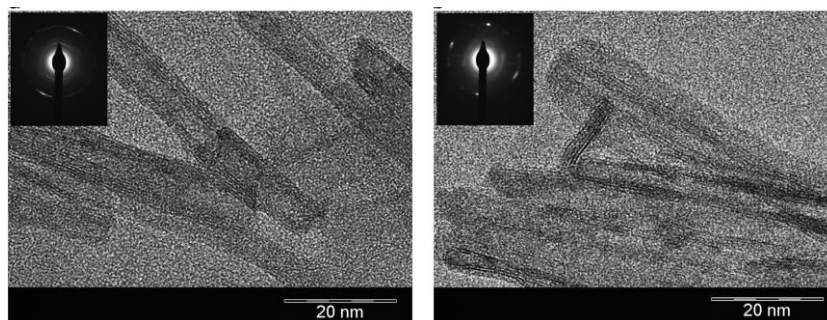


Figure 12 : Images MET des TiONts obtenus par THT assisté par microondes pendant 4h à 130°C (gauche) et 150°C (droite) [113].

Malgré tous ces efforts pour réduire le temps du THT des nanotubes, la synthèse des nanotubes assistée par microondes reste limitée à cause de sa difficulté de mise en œuvre et de son coût. Par ailleurs, les TiONts obtenus suite à l'utilisation des microondes ou d'un prétraitement par ultrason présentent des anomalies au niveau de la morphologie. Pour toutes ces raisons, d'autres méthodes ont été adoptées y compris l'utilisation de l'agitation lors du THT.

➤ Influence de l'agitation

L'agitation est un paramètre expérimental important qui affecte la synthèse des TiONts et qui n'a pas été suffisamment abordé dans la littérature. L'effet de l'agitation sur la morphologie des nanostructures synthétisées a été étudié pour la première fois par Papa *et al.* en 2009 [74] en utilisant deux types d'agitation (magnétique et table vibrante). Ils ont montré que les nanotubes peuvent être obtenus, à partir du précurseur P25, si l'agitation appliquée durant la synthèse provient d'une table vibrante, alors qu'une faible agitation magnétique (~115 tours/min) est suffisante quand la matière première est le rutil. Ils ont rapporté aussi que l'agitation augmente le taux de transformation des nanoparticules en nanotubes. L'agitation magnétique a été aussi utilisée plus tard par plusieurs auteurs [114-116] car elle homogénéise le mélange et augmente la vitesse de la réaction, réduisant ainsi le temps de synthèse des TiONts [116]. B. Santara *et al.* [115] ont réussi à réduire le temps du THT à 6 h en utilisant une vitesse d'agitation de 250 tours/min. De même, T.H. Vu *et al.* [116] l'ont réduit à seulement 3 h avec une vitesse de 300 tours/min. La morphologie des nanotubes est aussi affectée par la vitesse d'agitation utilisée. Y. Tang *et al.* [114] ont trouvé que le diamètre et la longueur des nanotubes augmentent avec l'augmentation de la vitesse d'agitation de 0 à 500 tours/min.

L'agitation mécanique par un autoclave rotatif a été aussi adoptée pour la synthèse de TiONts pour la première fois en 2007 par E. Harvath *et al.* [117] afin d'étudier la transformation nanotubes-nanorubans. Le même type d'agitation a été utilisé plus tard par X. Li *et al.* [118] et L. Torrente-Murciano *et al.* [119]. Ces derniers, ont étudié l'effet de la variation de la vitesse d'agitation sur la morphologie des nanotubes obtenus.

I.3. Mécanismes de formation des nanotubes de titanate par voie hydrothermale : discussion de deux théories

Les propriétés des TiONts et par conséquent leurs applications sont étroitement liées à leur morphologie assez particulière. Une connaissance approfondie du mécanisme de formation des nanotubes s'avère importante pour contrôler les conditions de synthèses qui permettent de les adapter à des utilisations spécifiques. La complexité du phénomène qui se passe dans un réacteur fermé durant le THT est à l'origine de l'absence d'une explication complète du mécanisme de formation des TiONts jusqu'à ce jour. Cependant, il y a deux principales hypothèses qui ont été fortement défendues dans la littérature : la première est la délamination/enroulement des feuillets et la deuxième est la dissolution/recristallisation.

I.3.1. Le phénomène de délamination/enroulement des feuillets

C'est le mécanisme le plus défendu dans la littérature [40, 97, 120] dont le principe est le suivant : certaines liaisons Ti-O-Ti des octaèdres organisés en 3D dans le réseau cristallin de TiO_2 subissent une coupure en présence d'une forte concentration de NaOH (10 M). Sous l'effet du THT, des nanofeuillets de TiO_6 en une, deux ou trois couches se forment par exfoliation. Sous l'effet de la forte concentration de la base, ces nanofeuillets commencent lentement à s'enrouler (Figure 13) [76].

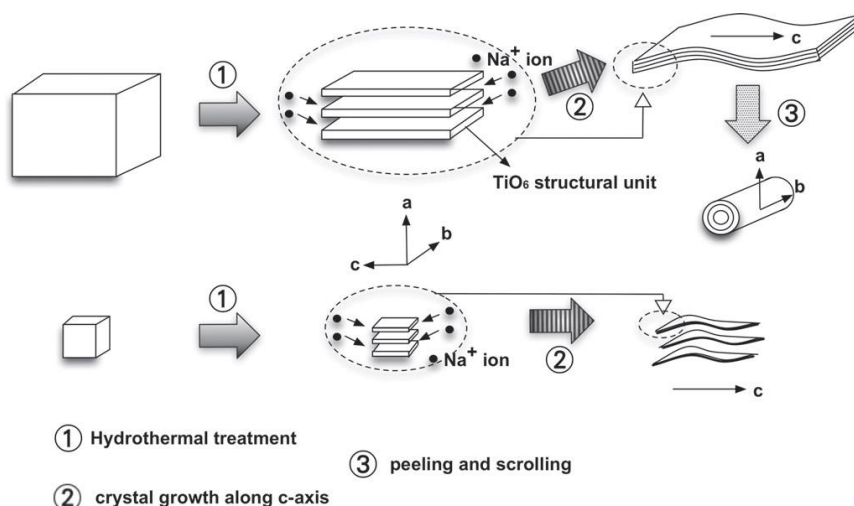


Figure 13 : Représentation schématisée du mécanisme de formation des nanotubes et des nanorubans en relation avec la taille du précurseur [78].

Comme le montre la Figure 13, ce mécanisme se déroule en trois étapes :

- Dans la première étape, les liaisons Ti-O-Ti sont attaquées par les ions OH^- ce qui entraîne une exfoliation des feuillets à une seule couche composées d'octaèdres de TiO_6 . En se basant sur les calculs de Zhang *et al.* [120], la formation des nanotubes stables se fait selon un rayon de courbure de 4,16 nm. Dans cette étape, les ions Na^+ s'intercalent entre les feuilles de TiO_6 pour neutraliser leur charge négative ce qui forme des structures multicouches (étape 1, Figure 13). Cette étape se fait à un stade précoce du traitement.
- Durant la deuxième étape, il se produit une croissance épitaxiale des cristaux le long de l'axe *c* (étape 2, Figure 13) et une plus grande structure lamellaire peut être obtenue.
- La troisième étape est l'enroulement des feuillets selon l'axe *b* lorsque la surface plane devient trop grande pour maintenir la stabilité [78].

1.3.2. Le phénomène de dissolution/recristallisation

Cette hypothèse a été suggérée en 2005 par Kukovecz *et al.* [83]. Le mécanisme proposé repose sur la dissolution progressive du précurseur au cours de laquelle la quantité de matière quitte l'anatase cristallin (utilisée dans cette étude) et recristallise ensuite en solution, en feuilles de trititanate qui se courbent en « nanoloop » de différentes morphologies (uni ou multi-spirale(s)). Le cœur de l'anatase se transforme en nanotubes par croissance cristalline orientée des blocs de TiO_6 fournis par le démantèlement alcalin de la matière première (Figure 14).

Pour illustrer cette hypothèse, Kukovecz *et al.* a utilisé comme matériau de départ des feuillets de $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$, pour simuler les feuillets obtenus expérimentalement par voie hydrothermale et les a traité dans les mêmes conditions hydrothermales (130°C et 72h). Il a obtenu, images MET à l'appui, des feuillets de trititanate coupées en morceaux de 20 nm au lieu des nanotubes. Les résultats Raman et les images MET ne montrent aucune courbure des feuillets de départ et aucun changement de structure après une longue durée de THT (168 h). Suite à cette expérience, des conditions plus dures de synthèse ont été appliquées (190°C, 240 h) et ont conduit aux mêmes résultats. Dans son étude, Kukovecz *et al.* a défendu un mécanisme de formation des TiONts qui exclu le phénomène d'enroulement des feuillets et privilège un enroulement qui ne peut se produire qu'à la surface des particules, contredisant ainsi l'hypothèse présenté avant.

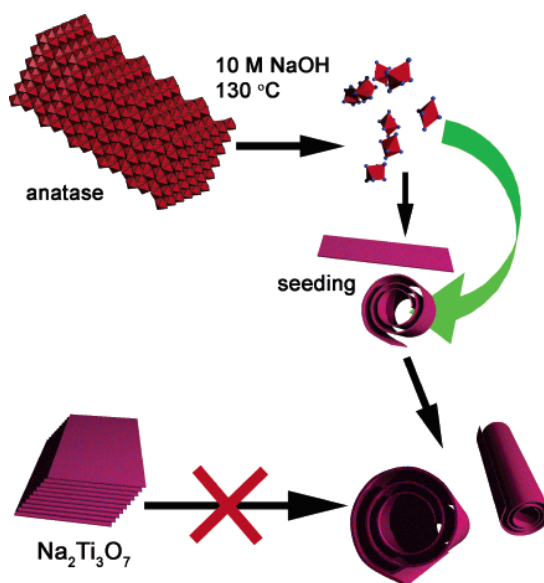


Figure 14 : Schéma qui résume le mécanisme de formation des TiONts par dissolution/recristallisation, proposé par Kukovecs *et al.* [83].

Deux mécanismes controversés basés sur deux différentes hypothèses ont été défendus dans la littérature et chacun est bien illustré par des preuves solides. Ceci prouve que la formation des nanotubes reste toujours une énigme difficile à résoudre et que sans doute ces deux mécanismes apportent une part de vérité. Ce point sera rediscuté dans le manuscrit avec de nouveaux éléments.

I.4. Les différentes applications des nanotubes de titanate

I.4.1. La photocatalyse

Le processus de la réaction photocatalytique est basé sur l'excitation par un photon dont l'énergie ($h\nu$) dépasse ou correspond à la largeur de la bande d'un semi-conducteur. Cette énergie peut exciter un électron de la bande de valence en laissant un trou avec une charge positive dans la bande de conduction. Par conséquent, il se crée une paire électron-trou et un transfert de charge à la surface se produit pour réagir avec les molécules qui sont adsorbées à la surface permettant ainsi leur décomposition [121].

Les nanostructures unidimensionnelles (1D) de titane, y compris les nanotubes, sont considérées comme des photocatalyseurs efficaces et respectueux de l'environnement. L'avantage des TiONts est leur surface spécifique importante qui améliore le transfert de masse des réactifs. Toutefois, malgré cette propriété, l'efficacité des nanotubes de titanate synthétisés par voie hydrothermale restent insuffisante. Aussi, il est apparu indispensable de les traiter thermiquement (calcination) ou de modifier leur surface [103, 122, 123]. En effet, les TiONts, comme le TiO₂, ne sont pas sensibles à la lumière visible à cause de leur bande interdite élevée (environ 3,2 eV), donc ils sont activés par voie photocatalytique sous irradiation de la lumière UV. Ainsi, seulement 5 % du rayonnement incident de la lumière naturelle sont utilisés pour la photoexcitation. Pour cette raison, plusieurs méthodes sont utilisées pour améliorer l'activité

photocatalytique des TiONts sous la lumière visible qui est la partie principale du spectre solaire. Parmi ces méthodes, il y a la calcination et la modification de leur surface par des composés à faible énergie de gap comme le ZnS et le CdS [121] ou par du fluor et des phosphonates [124].

1.4.2. Les batteries au lithium

Les nanotubes de titanates peuvent être utilisés comme électrode négative dans les batteries au lithium grâce à leur morphologie (extrémités ouvertes des deux côtés), leur structure en multicouches, leur efficacité de transport des ions Li^+ et leurs propriétés d'échange d'ions. Toutes ces caractéristiques rendent les électrodes à base de TiONts prometteuses avec une grande capacité de charge/décharge à une vitesse rapide. La distance intercouche des nanotubes d'environ 0,78 nm est beaucoup plus grande que celle dans les électrodes commerciales à base de couches de LiCoO_2 , ce qui permet une intercalation plus facile des ions lithium tout le long des nanotubes dans les distance intercouche. Ainsi, J. Li *et al.* [125] ont pu développer une électrode nanostructurée à base de TiONts avec une grande capacité d'intercalation du lithium, un taux de décharge/charge amélioré et des excellentes stabilités cycliques [125].

1.4.3. La production et le stockage de l'hydrogène

La capacité des TiONts à accumuler de manière réversible l'hydrogène moléculaire avec une adsorption relativement élevée sur une large gamme de température [-196 ; +125°C] ouvre la possibilité de stockage d'hydrogène dans ces nanomatériaux et à des applications connexes. La morphologie tubulaire des nanotubes leur permet d'être un bon adsorbant de l'hydrogène qui s'intercale dans les cavités interstitielles et entre les couches des nanotubes sans même établir de liaisons chimiques. En outre, les liaisons OH stabilisent les molécules d'hydrogène par des interactions de van der Waals. La vitesse d'intercalation de l'hydrogène est inversement proportionnelle au carré de la longueur des nanotubes [121]. Une fonctionnalisation des TiONts par $\text{Cd}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ permet d'améliorer la capacité d'absorption d' H_2 de 4 % à 12,5% en masse [13].

1.4.4. Les cellules photovoltaïques

Combinés avec un colorant organique ou un semi-conducteur inorganique de faible bande interdite, les TiONts peuvent absorber la lumière dans le domaine visible et convertir l'énergie solaire en énergie électrique pour une application dans les cellules solaires. L'utilisation des nanotubes pour cette application présente certaines limites dont la faible adsorption des colorants chargés négativement comme le complexe cis-di(thiocyanate) bis(2,2-bipyridyl-4,4-di-carboxylate) de ruthénium (II) dans l'éthanol. Ce colorant est souvent utilisé dans les cellules solaires. D'autre part, la calcination des nanotubes à 450°C est une étape clé pour fixer les nanoparticules sur les substrats, cette étape peut entraîner la perte de la morphologie tubulaire ce qui entraîne la diminution de la surface spécifique et de la capacité d'échange d'ions [121].

Des résultats encourageants ont cependant été obtenus en utilisant les TiONts dans les cellules solaires en changeant de colorant. En effet, la charge négative de surface des TiONts (Figure 57) permet d'adsorber un grand nombre de molécules chargées positivement à partir d'une solution aqueuse. Par ailleurs, l'utilisation des nanotubes de titanate, au lieu de

nanoparticules de TiO_2 , améliore l'efficacité de la collecte de charges et le transport des électrons de la cellule photovoltaïque jusqu'à l'électrode négative (ou contre électrode). En effet, Ohsaki *et al.* [126] ont trouvé que la densité électronique augmente dans les TiONts en comparaison avec le TiO_2 P25 et que la durée de vie des électrons est plus longue.

1.4.5. Applications biomédicales des nanotubes de titanate

1.4.5.1. La régénération osseuse

Le titane et les matériaux à base d'oxyde de titane sont des matériaux qui ont été largement étudiés dans le domaine des implants et prothèses en raison de leur résistance à la corrosion, leur excellente biocompatibilité, leurs propriétés biomécaniques (résistance élevée et élasticité faible) et biochimiques améliorées par rapport aux autres matériaux comme l'acier inoxydable et les alliages à base de cobalt [127, 128]. Les TiONts ont été utilisés comme revêtement sur des supports en titane, déposé par « spin coating », afin d'étendre leurs applications et améliorer leur activité ostéoconductrice et en conséquence leur propriété de régénération osseuse. Ils ont été aussi utilisés dans les prothèse de hanche et les implants dentaires [129].

1.4.5.2. La détection de la dopamine

La dopamine est l'un des neurotransmetteurs les plus importants qui joue un rôle essentiel pour le transfert des messages dans les systèmes nerveux central, rénal, hormonal et cardiovasculaire des mammifères et ce à des faibles concentrations [130]. La perte de dopamine dans les neurones peut entraîner des troubles neurologiques graves telles que la maladie de Parkinson et la dépendance [131]. Pour cette raison, il est extrêmement important de déterminer sa concentration dans le liquide extracellulaire. Plusieurs électrodes ont été utilisées pour détecter la dopamine tels que des films à base de nanotubes de carbone ou à base de nanoparticules [132]. La première bioélectrode à base de TiONts a été développée par Liu *et al.* [133], elle était constituée par une membrane de TiONts sur une électrode de carbone vitreux. Cette étude a montré une détection spécifique de la dopamine avec un rendement amélioré. Une modification de cette électrode a été faite ultérieurement par Niu *et al.* [132] par ajout du dodécylsulfate de sodium (SDS) au moment de la synthèse hydrothermale des TiONts. Cette modification a permis d'améliorer le signal de la détection de la dopamine.

I.5. Les systèmes d'administration d'agents thérapeutiques : vers l'élaboration de « nanovecteurs »

1.5.1. Les nanotubes de titanate : des matériaux prometteurs pour une application médicale

1.5.1.1. Généralités sur les matériaux utilisés comme vecteurs d'agents thérapeutiques

➤ Qu'est-ce qu'un « nanovecteur » d'un agent thérapeutique ?

Pour le traitement du cancer, chaque traitement (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie) présente des avantages et des inconvénients, de sorte que la combinaison des traitements est recommandée pour obtenir un résultat optimal. Le problème avec la chimiothérapie est que l'agent thérapeutique est cytotoxique et peut agir, non seulement sur les cellules cancéreuses mais aussi sur des cellules saines. L'administration et le maintien de la substance anticancéreuse dans la tumeur peut être une bonne méthode pour surmonter ce problème, les « nanovecteurs » permettent de relever ce défi [28, 134].

Les avantages apportés par le système de nanovectorisation des médicaments sont :

- protéger le médicament contre une détérioration prématurée,
- empêcher l'interaction prématurée de la molécule active avec son environnement biologique,
- améliorer l'absorption des médicaments dans les tissus cibles,
- contrôler la distribution de l'agent thérapeutique dans les tissus,
- améliorer la pénétration intracellulaire [135].

Un nanovecteur doit remplir certains critères pour aboutir à une intervention clinique efficace en oncologie (Figure 15) :

- avoir une taille nanométrique,
- être constitué d'un matériau de base biocompatible et facilement fonctionnalisé (exemple : liposome, nanoparticule...),
- avoir une absorption préférentielle dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines (avoir des agents biologiques en surface qui améliorent la biodistribution et le ciblage tumoral des nanoparticules),
- contenir l'agent thérapeutique et un agent de contraste pour l'imagerie (gadolinium, oxyde de fer nanométrique ou points quantiques),
- être soluble ou colloïdal dans des conditions aqueuses pour une efficacité accrue,
- avoir une demi-vie circulante prolongée, un faible taux d'agrégation et une longue durée de conservation [135, 136].

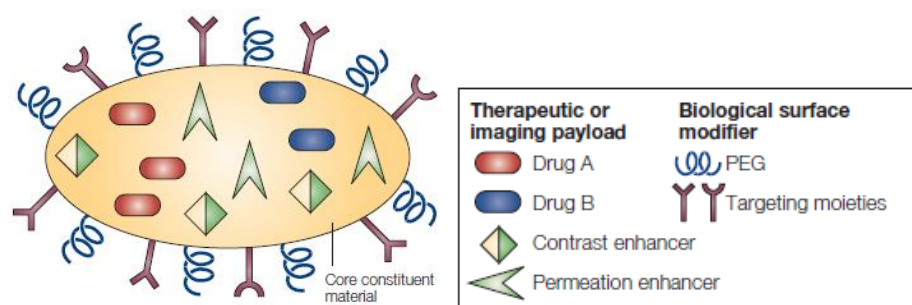


Figure 15 : Modèle d'une nanoparticule multifonctionnelle qui permet de transporter un ou plusieurs agents thérapeutiques; le ciblage biomoléculaire par des anticorps ou d'autres espèces de reconnaissance; l'amplification du signal de l'imagerie par un agent de contraste; l'échappement des barrières biologiques par l'amélioration de la perméabilité dans les cellules à travers les jonctions et par le polyéthylène glycol (PEG) pour éviter l'absorption par des macrophages [136].

➤ **Les différents types de « nanovecteurs »**

Liposomes : Ce sont des vésicules fermées qui se forment par hydratation des phospholipides au-dessus de leur température de transition. Ils sont de structures bicouches, de taille inférieure à 100 nm, entourant le médicament qui peut être piégé soit dans l'espace aqueux ou entre les couches. Ils furent les premiers nanovecteurs à atteindre l'utilisation clinique [28].

Micelles : Ce sont des agrégats amphiphiles de taille inférieure à 50 nm, constitués de copolymères hydrophiles (A) et hydrophobes (B) (AB ou ABA), dans lesquels le médicament (hydrophobes ou hydrophile) est piégé ou greffé par liaison covalente. Les médicaments peuvent inclure des acides nucléiques pour la transfection et la thérapie génique [28].

Nanosphères : Elles sont formées par agrégats de polymères dans lesquels le médicament est dissous, piégé, encapsulé ou attaché de manière covalente [28].

Nanoparticules glucides-céramique: Elles sont composées d'un noyau de phosphate de calcium ou autre céramique, entouré d'un film oligomère polyhydroxylé, sur lequel les médicaments sont adsorbés (Figure 16).

Dendrimères: Ce sont des macromolécules tridimensionnelles, fortement ramifiées qui croissent par polymérisation contrôlée vers l'extérieur. Le médicament est lié par liaison covalente à la surface (Figure 16) [28].

Cette liste de nanovecteurs est non exhaustive, il existe de nombreux autres types de nanovecteurs à base de nanoparticules inorganiques y compris les nanoparticules mésoporeuses de silice (MSN), d'oxydes de fer, de phosphates de calcium, d'oxyde de gadolinium (Gd_2O_3), d'oxyde d'hafnium (HfO_2), d'or (AuNPs), les nanotubes de carbone CNTs (voir le paragraphe suivant pour plus de détails sur certaines de ces compositions) ... [137]. Plusieurs études sur ces systèmes sont passées au stade des essais cliniques en France dont deux sont sur les oxydes de fer, quatre sur l'oxyde de hafnium et une sur les nanoparticules d'or [138].

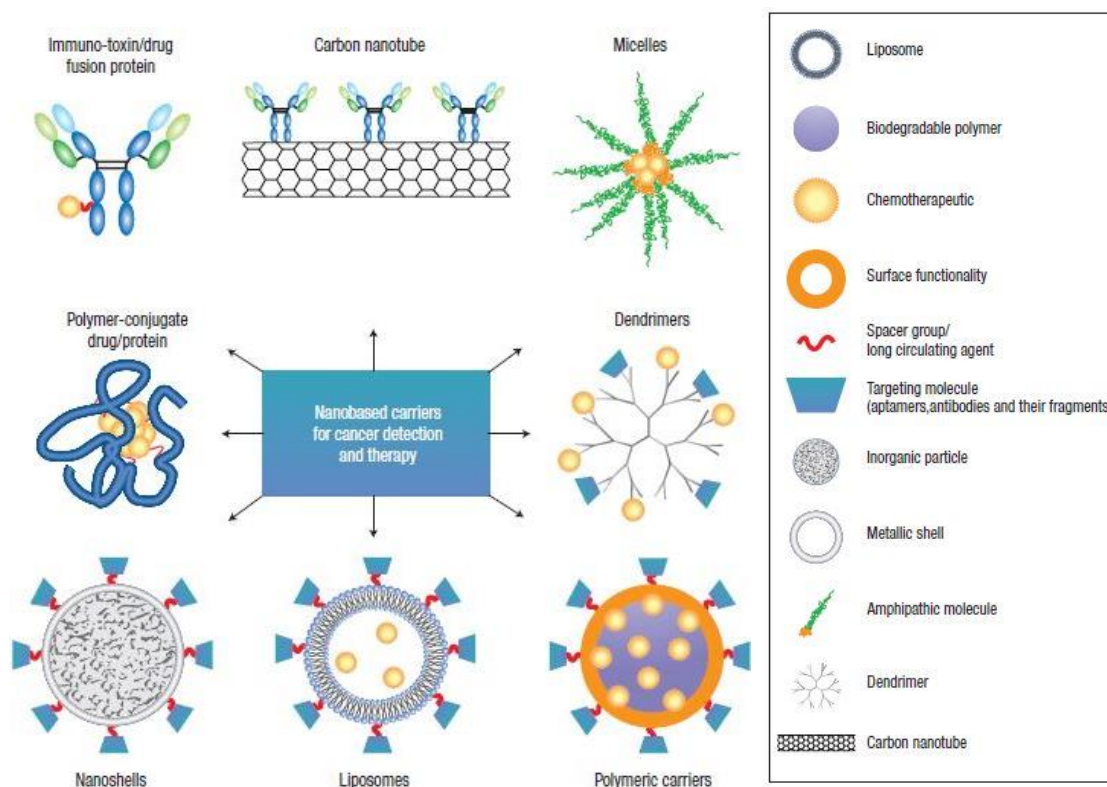


Figure 16 : Exemples des principaux nanovecteurs d'agents thérapeutiques [135].

1.5.1.2. Exemples de systèmes d'administration des médicaments à base de nanoparticules inorganiques

L'utilisation des nanoparticules inorganiques dans le domaine biomédical est en plein essor grâce au grand nombre des travaux réalisés sur la synthèse et la modification des matériaux. Ces nanomatériaux fournissent une base solide dans laquelle plusieurs composants peuvent être incorporés pour conduire à des capacités multifonctionnelles [139]. Les matériaux inorganiques deviennent de plus en plus utilisés dans les systèmes d'administration des molécules thérapeutiques, en raison de leurs propriétés intrinsèques (pouvant conduire à de l'hyperthermie, à la génération de ROS (reactive oxygen species), à de la luminescence *etc.*) et à leurs caractéristiques intéressantes telles qu'une bonne stabilité biologique et une capacité de libération de l'agent thérapeutique.

Plusieurs matériaux poreux ont été utilisés, y compris les zéolithes synthétiques et les xérogels de silice [140]. Les nanoparticules de silice mésoporeuse (MSN) sont des matériaux ayant une structure poreuse en forme de nid d'abeille et formés de centaines de canaux capables de piéger une quantité importante d'agent thérapeutique grâce à leur surface spécifique très élevée, qui peut atteindre 900 m²/g [141].

L'hydroxyapatite de calcium poreuse a également été utilisée comme vecteur d'un agent anticancéreux. La libération du cis-platine a été confirmée par des expériences *in vitro* [142]. La zéolithe poreuse CuX a été synthétisée pour incorporer le cyclophosphamide (CP). Les évaluations biochimiques et anatomopathologiques montrent que l'effet antitumoral du

nanohybride (Zéolithe-CP), administré par voie orale, est similaire à celui du CP seul, d'où la performance du système [143].

Les nanoparticules d'or illustrent l'exemple de la multifonctionnalité par la possibilité de contrôle de leur taille, forme et chimie de surface. Ainsi, la modification de surface de ces nanoparticules par des anticorps permet une imagerie sélective et induit la mort des cellules cancéreuses par photothermie⁴ [144].

Les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIONs) sont l'exemple historique de nanoparticules combinant l'aspect thérapeutique et diagnostic (on parle alors de théranostic) [145, 146]. Elles peuvent être conjuguées avec divers composants tels que des molécules fluorescentes, des agents de ciblage de la tumeur, des agents anticancéreux ou des petits ARN interférents (siARN). Ces nanoparticules multifonctionnelles peuvent alors, non seulement cibler les tumeurs mais aussi être suivies dans le corps humain à la fois par imagerie par résonance magnétique (IRM, grâce au cœur magnétique d'oxyde de fer) et par fluorescence (imagerie optique, grâce aux molécules greffées) [147, 148].

L'utilisation des nanotubes de titanate pour la vectorisation des agents thérapeutiques est assez récente. Un aperçu bibliographique sur ces applications est donné dans le paragraphe suivant.

1.5.1.3. Les applications des TiONts pour la nanovectorisation des médicaments

Le nombre des travaux de recherches menés sur les TiONts pour une application médicale est très restreint. L'équipe BH2N est pionnière dans l'élaboration de nanovecteurs à base des nanotubes de titanate. Les premiers travaux ont été réalisés dans le cadre de la thèse de A.L. Papa, entre 2006 et 2009, où les TiONts ont été fonctionnalisés par la polyéthylène imine (PEI) pour être utilisés comme agent de transfection des cardiomyocytes, dans le cadre du traitement de pathologies cardiovasculaires [149]. Une internalisation plus importante des TiONts dans les cardiomyocytes a été observée en comparaison avec le TiO₂ P25. Il a été aussi démontré que les TiONts franchissent la membrane cellulaire par deux mécanismes : l'endocytose et la diffusion [16]. Par le même groupe et en 2011, les TiONts ont été fonctionnalisés par des SPIONs afin d'élaborer un nouveau nanovecteur détectable par IRM et qui combine les propriétés des deux nanomatériaux [19]. Une autre combinaison entre les TiONts et une phtalocyanine de zinc a également été réalisée, par J. Paris *et al.* en 2015, afin d'élaborer un nanovecteur détectable par imagerie optique [20].

Toujours dans le même groupe, en 2013, les travaux réalisés par C. Mirjolet *et al.* sur des cellules du glioblastome multiforme (GBM) (une tumeur du cerveau) ont montré que les TiONts n'induisaient aucune cytotoxicité même après dix jours d'incubation [150]. Par contre,

⁴ La photothermie est une technique qui détruit les cellules cancéreuses par réchauffement induit, ici par les nanoparticules, suite à une irradiation par la lumière.

un effet radiosensibilisant⁵ a été observé pour ces cellules à forte et faible doses de TiONts. Plus tard, en 2016, un autre groupe, T. Baati *et al.* ont montré l'efficacité d'un nanovecteur à base de TiONts contre ce type de tumeur avec une administration contrôlée de la génistéine (flavonoïde⁶ biologiquement actif) dans les cellules du glioblastome [151]. Les résultats de cette étude montrent que le nanovecteur élaboré a une efficacité de piégeage de 51,2% et permet une libération contrôlée de l'agent thérapeutique. A. Loiseau *et al.* ont réussi, dernièrement dans l'équipe BH2N, à greffer le docétaxel (DTX : molécule active notamment contre le cancer de la prostate) sur les TiONts et à prouver son efficacité. Les tests *in vivo* de cette étude ont montré que les nanohybrides TiONts-DTX restent dans la tumeur jusqu'à sept jours après injection intratumorale, ce qui a conduit à une efficacité thérapeutique, associée à la radiothérapie, plus importante pour ce nanovecteur en comparaison avec le DTX injecté seul [17].

1.5.1.4. Les limites de l'utilisation des TiONts dans le domaine biomédical

Les nanotubes de titanates sont des matériaux qui présentent une tendance forte à s'agglomérer. Malgré le grand nombre de groupements hydroxyles de surface, ils présentent une faible stabilité colloïdale dans les milieux aqueux ainsi que dans les solvants organiques, sans doute en raison de leur taille malgré tout assez importante (longueur d'environ 150 nm pour un diamètre de 10 nm) et de leur faible potentiel zêta à pH physiologique (environ -15 mV, Figure 57). Ces inconvénients limitent leur utilisation dans le domaine médical et plus particulièrement comme système d'administration de molécules thérapeutiques [152].

Bien que les TiONts présentent de nombreux groupements hydroxyles de surface, la réactivité de ces derniers reste faible et ne peut pas initier le greffage direct des molécules thérapeutiques à la surface. Par conséquent, il est nécessaire d'introduire de nouveaux groupements organiques plus réactifs à la surface des TiONts, pour une fonctionnalisation personnalisée et adaptée selon les applications prévues [152]. On appelle cette étape la préfonctionnalisation.

1.5.2. Modification de surface des nanoparticules par des agents stabilisants

1.5.2.1. Les différentes approches de stabilisation

Pour un usage pratique, les nanoparticules vectrices des médicaments doivent être stables et bien dispersées dans les liquides. Pour cette raison, une modification de leur surface par des agents stabilisants est considérée comme une étape primordiale dans l'élaboration des nanovecteurs. Ces agents stabilisants limitent les interactions entre les particules et les

⁵ Radiosensibilisation : traitement ou technique qui rend les cellules cancéreuses plus sensibles aux irradiations et en conséquence à la radiothérapie. La radiothérapie est une technique de traitement local du cancer par des radiations qui tuent les cellules cancéreuses.

⁶ Métabolite secondaire des plantes à structure de base formée de deux cycles aromatiques liés par trois carbones. Il représente une source importante d'antioxydants.

maintiennent dans un état dispersé par des répulsions électrostatiques ou stériques, d'où la distinction de deux types de stabilisants.

➤ **Les stabilisants électrostatiques**

Ce sont des molécules qui génèrent des forces répulsives électrostatiques à la surface des nanoparticules. Les répulsions électrostatiques peuvent être suivies par les mesures du potentiel zêta (ζ) qui dépend du pH et de la force ionique du milieu [153]. Les principaux stabilisants utilisés sont : les carboxylates, les phosphonates, les silanes [154]...

➤ **Les stabilisants stériques**

Ce sont des molécules de grande taille (généralement des macromolécules) qui créent un encombrement stérique à la surface des particules et empêchent leur rapprochement. Les espèces les plus couramment utilisées sont les dérivés du dextran⁷[155], du polyéthylèneglycol (PEG), des poloxamères⁸, de l'alcool polyvinylique (PVA) et du chitosan [156, 157]. Les principaux stabilisants utilisés pour améliorer la stabilité colloïdale des TiONts sont la polyéthylène imine [18], la polycaprolactone [152], le PEG [17, 18] et le polystyrène [158].

1.5.2.2. Stabilisation des nanoparticules par des molécules organiques

➤ **Les agents silaniques de couplage : exemple du 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES)**

✓ *Généralités sur l'APTES*

Les organosilanes sont des silanes qui contiennent au moins une liaison Si-C. Ce sont des molécules à propriétés uniques grâce à leur capacité à former une liaison covalente entre les composés inorganiques et organiques ainsi que grâce à leur stabilité inhérente et à la flexibilité de leurs liaisons siloxane (Si-O-Si). Ils ont fourni des avantages multiples dans une large gamme de systèmes de revêtement [159]. Le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) a été largement utilisé comme un agent de couplage des nanoparticules inorganiques [160]. Il a la formule semi-développée suivante : $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_3\text{-Si-(CH}_2)_3\text{-NH}_2$ et une masse molaire de 221 g/mol. Il permet non seulement d'améliorer la stabilité colloïdale des nanoparticules par sa fonction amine mais sert aussi de lien (linker) entre les nanoparticules et diverses molécules comme des polymères [17, 161].

✓ *Le mécanisme de greffage de l'APTES*

Chaque molécule d'APTES possède deux types de groupements fonctionnels : trois éthoxyyles ($-\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$) et un groupement aminopropyle ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$). Son greffage sur les nanomatériaux se fait par les éthoxyyles qui réagissent avec les groupements hydroxyyles des TiONts. Le mécanisme de fonctionnalisation a lieu comme le montre la Figure 17.

⁷ Dextran : polymère ramifié de dextrose (glucose) de masse moléculaire très élevée.

⁸ Les poloxamères sont des copolymères non ioniques à trois blocs, un bloc central hydrophobes et deux blocs externes hydrophiles.

1^{ère} étape d'hydrolyse : comme ils ne sont pas suffisamment réactifs pour réagir directement avec les OH inorganiques, une première étape d'hydrolyse des groupements éthoxyles est indispensable. Cette réaction nécessite un milieu partiellement aqueux comme condition minimale et conduit à la formation des groupements silanols. Cette étape a été proposée par Pluedemann *et al.* [162].

2^{ème} étape de condensation : les silanols formés dans la première étape interagissent entre eux pour former un polysiloxane, on appelle cette étape oligomérisation ou condensation. Afin d'avoir un greffage optimal, les conditions de la réaction doivent favoriser l'hydrolyse et ralentir la vitesse de condensation des silanols. Le taux d'hydrolyse le plus lent se produit à pH environ 7 et une vitesse minimale de condensation est observée à environ pH 4. En outre, le choix de la proportion d'éthanol et d'eau dans le solvant intervient dans les deux étapes de la réaction [162].

3^{ème} étape formation des ponts hydrogène : au cours de cette étape, des liaisons hydrogène se produisent entre les OH des siloxanes et les OH de surface des oxydes inorganiques.

4^{ème} étape de greffage : c'est la formation d'une liaison covalente entre les silanols et les OH inorganiques (formation de la liaison Ti-O-Si dans le cas des TiONts).

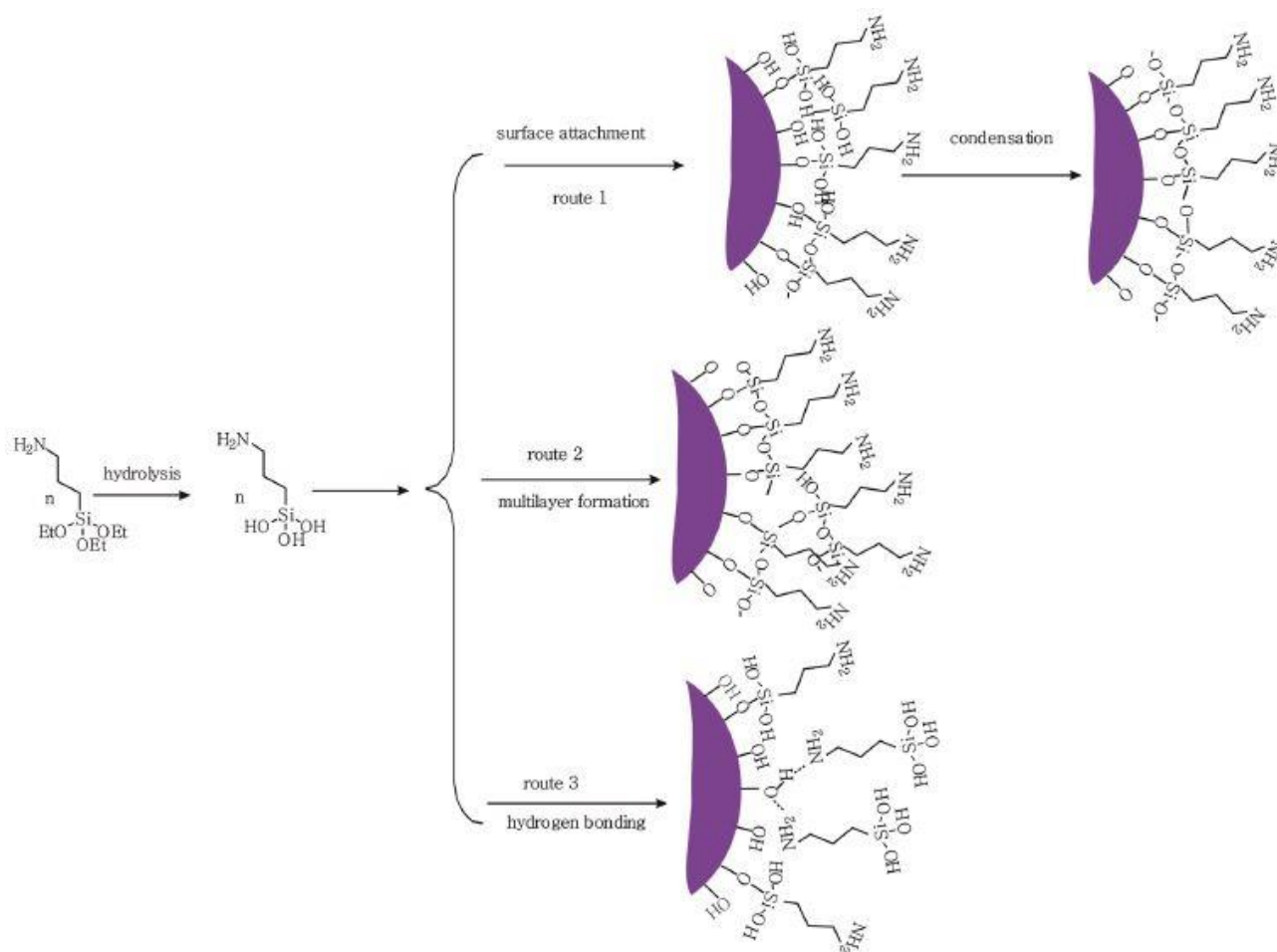


Figure 17 : Schéma représentant les voies des réactions possibles de l'APTES sur la surface de l'oxyde de fer [163].

Comme le montre la Figure 17, la silanisation de la surface des particules par l'APTES peut prendre plusieurs voies d'accrochage à la surface. En effet, il est possible que l'APTES forme plusieurs couches à la surface ou qu'il s'adsorbe par liaisons hydrogène entre les groupements hydroxyles de surface de la particule et la fonction amine du silane.

➤ **Les catéchols : l'acide 3,4-dihydroxycinnamique (DHCA) et la 3,4 dihydroxy-L-phénylalanine (L-DOPA)**

Les molécules contenant des groupements catéchols (isomère *ortho* du benzènediol) ont été utilisées pour stabiliser les nanoparticules d'oxyde de fer et de titane [164].

✓ *Généralités sur le DHCA et la L-DOPA*

L'acide 3,4-dihydroxycinnamique (DHCA) provient de la décomposition microbienne de la lignine (Figure 18). Il présente deux groupements chélateurs avec deux pouvoirs de complexation différents : un catéchol et un groupement acide carboxylique. Les deux sites sont *a priori* assez loin pour qu'ils n'interagissent pas ensemble lors de la complexation [165].

La 3,4-dihydroxy-L-phénylalanine (L-DOPA) permet non seulement d'améliorer la dispersion des nanoparticules mais aussi leur bioadhésion [166] (Figure 18). Elle présente un groupement amine en plus, par rapport au DHCA, ce qui lui confère un caractère basique et un point d'attache supplémentaire aux oxydes métalliques ou à diverses molécules [167].

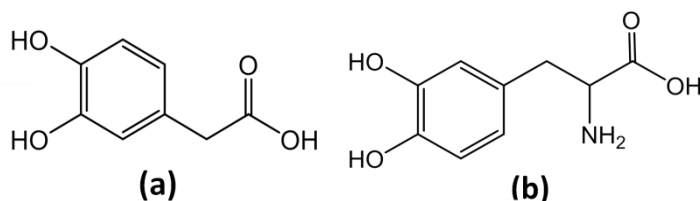


Figure 18 : Formules chimiques du (a) DHCA et de la (b) L-DOPA.

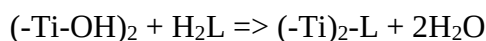
✓ *Mécanisme de greffage des catéchols*

Généralement, l'adsorption des molécules organiques sur les surfaces d'oxydes minéraux se produit par l'une des deux interactions fondamentales : la première est l'adsorption chimique ou appelée encore « complexe de sphère interne », dans laquelle l'anion organique forme une liaison chimique forte avec un cation de la surface inorganique. La deuxième adsorption est l'adsorption physique ou « complexe de sphère externe », elle est réversible. L'anion organique est maintenu à la surface inorganique par interactions électrostatiques, grâce aux forces de van der Waals [168, 169]. L'adsorption physique est influencée par la présence d'un autre ligand et dépend de la composition du milieu, comme la force ionique [170].

Il a été prouvé, par des mesures spectroscopiques, que les composés hydroxy-aromatiques tels que les catéchols interagissent fortement avec le Ti(IV) pour former un complexe de sphère interne [171, 172]. L'effet du ligand donneur a été prouvé pour l'adsorption des catéchols sur le dioxyde de titane [173].

Jusqu'à ce jour, aucune étude ne s'est intéressée à l'interaction des catéchols avec la surface des TiONts. Les études faites sur le dioxyde de titane sont très peu nombreuses. Pour

cette raison, on se réfère dans ce manuscrit particulièrement aux études faites sur le TiO_2 et sur les oxydes inorganiques de façon plus générale, afin d'appréhender le mécanisme de greffage des catéchols sur les TiONts. P. Araujo *et al.* [171] ont pu conclure que l'adsorption des catéchols se fait selon l'équation suivante :



W.M. Chirdon *et al.* ont montré que les catéchols ont une énergie d'adsorption plus importante (90 mJ/m^2) que celles des groupements alcools, amines et carboxyles ($60\text{-}70 \text{ mJ/m}^2$) sur les phosphates de calcium, c'est-à-dire qu'ils forment des complexes plus stables [174].

Par ailleurs, il a été montré que la conformation des molécules greffées à la surface du TiO_2 , dépend du pH. Ainsi, des modifications de pH (entre 2 et 6) entraînent des variations dans l'orientation de la molécule sur la surface. Un pH égal à 2 tend à orienter la molécule de manière parallèle à la surface de la nanoparticule alors qu'un pH égal à 6 induit une orientation perpendiculaire à la surface de la nanoparticule (Figure 19).

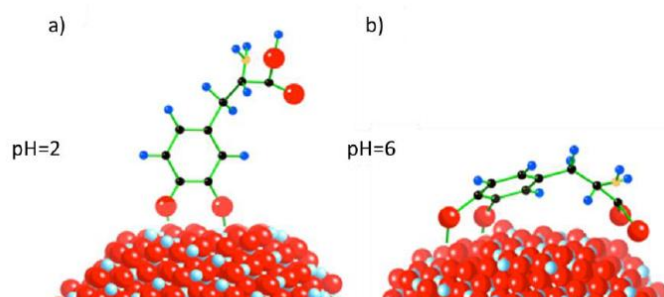


Figure 19 : Représentation des différentes conformations d'attachement « couché » (à droite) et « debout » (à gauche) de la L-DOPA à la surface du TiO_2 [167].

➤ L'acide citrique : un complexant universel !

L'acide citrique (AC) est un acide organique très commun dans la nature et un stabilisant qui a été largement utilisé dans la synthèse de plusieurs nanomatériaux notamment les oxydes de fer [25], de zinc [175], de chrome [176] et de titane [177]. C'est un acide organique relativement fort, ayant trois constantes de dissociation relatives à ses trois acides carboxylique; $K_{a1} = 8,2 \times 10^{-4}$, $K_{a2} = 1,77 \times 10^{-5}$ et $K_{a3} = 3,9 \times 10^{-7}$. Il est très soluble dans l'eau (735 g/L à 20°C), soluble dans les alcools et insoluble dans d'autres solvants organiques tels que le toluène, le benzène et le chloroforme [178].

✓ Mécanisme de complexation

L'AC est considéré comme un agent chélatant puisqu'il peut former des complexes avec des ions métalliques. Un agent chélatant est une molécule qui a au moins deux atomes donneurs d'une paire d'électrons et qui, comme un ligand, s'attache à l'ion métallique. Il peut être di-, tri-, tétra-, penta- ou hexadenté. En fait, la formation de complexes est une réaction entre une base et un acide de Lewis. Contrairement aux réactions acido-basiques habituelles, la chélation des ions métalliques est régie par une contribution entropique relativement élevée, en raison du remplacement de nombreuses molécules de solvant, par un ligand chélatant, autour de l'ion

métallique. Grâce à ce comportement, la plupart des complexes métalliques présentent une stabilité relativement élevée [179].

1.5.3. Modification de surface par des polymères biocompatibles

1.5.3.1. Les polymères de biocompatibilité

La biocompatibilité est l'une des considérations les plus importantes dans l'élaboration de nanomatériaux pour des applications biomédicales. Un matériau biocompatible est un matériau qui ne perturbe pas les fonctions cellulaires normales, telles que la prolifération et l'adhésion des cellules et l'expression des gènes [180]. Quelques exemples de polymères, utilisés pour améliorer la biocompatibilité des nanomatériaux, sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Caractéristiques biologiques de différents polymères (liste non exhaustive) [18, 28, 152].

Polymère	Efficacité
Polyéthylène glycol (PEG)	(+) la biocompatibilité
	(+) le temps de circulation
	(-) absorption par les macrophages
Dextran	(+) le temps de circulation
	(-) l'agrégation et l'absorption par les macrophages
PVA	(-) l'agrégation/coagulation
Polyacrylates	(+) la biostabilisation, biocompatibilité et bioadhésion
Polypeptides	(+) le ciblage
Poly(vinylpyrrolidone)	(+) temps de circulation,
	(-) l'agrégation, l'opsonisation et l'absorption par les macrophages
Acide polylactique	(+) la biocompatibilité, (-) la cytotoxicité
Chitosan	(+) la biocompatibilité et l'hydrophilicité
PEI	(+) effet éponge d'hydrogène et vectorisation des gènes (-) toxicité
Poly(ϵ-caprolactone)	(+) la biocompatibilité, (-) agrégation

1.5.3.2. Le chitosan : un biopolymère avec des propriétés très intéressantes

➤ Généralités sur le chitosan

Parmi les polymères cités dans le paragraphe 1.5.3.1 (Tableau 6), seul le PEG [17, 18], la PEI [18] et la poly(ϵ -caprolactone) [152] ont déjà été greffés sur les TiONts pour améliorer leur stabilité colloïdale ainsi que leur biocompatibilité. Jusqu'à présent, le PEG est le polymère le plus utilisé à des fins de biocompatibilité. Cependant, les principales limites du PEG sont sa non-biodégradabilité [181], une possibilité d'activation du système du complément⁹ ainsi

⁹ Système du complément : un ensemble de 25 protéines qui font partie de l'immunité innée.

qu'une induction du phénomène de peroxydation après plusieurs injections [182]. Afin de faire face à ces limites, le chitosan s'avère une bonne alternative.

Le chitosan est un biopolymère cationique obtenu par désacétylation alcaline de la chitine qui est le deuxième biopolymère le plus abondant sur terre après la cellulose, extrait des crustacés (Figure 20) [183, 184]. Son utilisation dans le domaine biomédical dérive de ses propriétés physico-chimiques et biologiques uniques, y compris sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et ses propriétés antimicrobiennes et antibactériennes [185, 186]. Il présente deux types de groupements fonctionnels réactifs, les amines ($-NH_2$) et les hydroxyles ($-OH$), qui confèrent au chitosan la propriété hydrophile et lui donnent la possibilité d'interaction avec d'autres polymères et molécules biologiques [187]. Le chitosan est aussi considéré comme un bon complexant des métaux lourds en particulier le cuivre [188]. Contrairement au PEG, le chitosan présente une biodégradabilité complète en composés non toxiques. Il a également été utilisé comme polymère antiadhésif qui empêche l'adhérence des bactéries à l'interface titane/ostéoblastes (cellules osseuses) grâce à ses propriétés antibactériennes [189, 190].

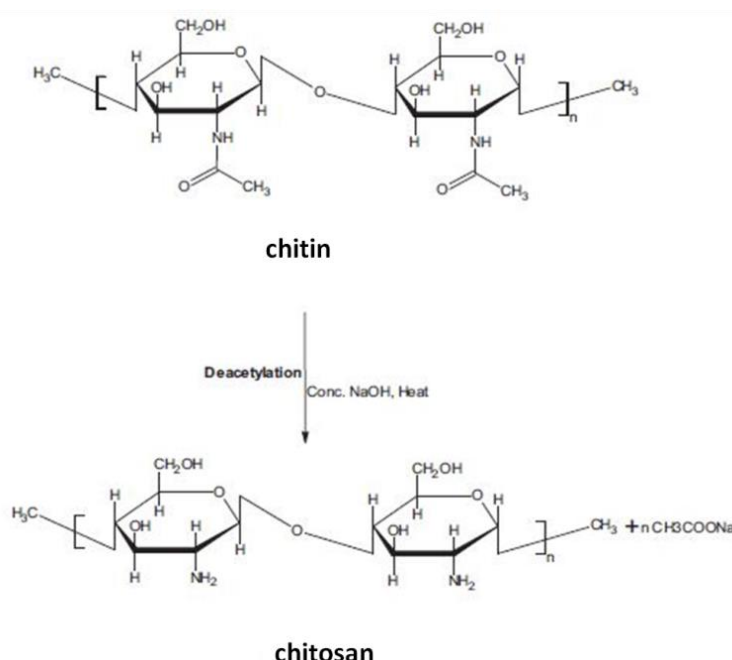


Figure 20 : Désacétylation de la chitine en chitosan [187].

➤ Les applications potentielles :

Le chitosan est un polymère qui a prouvé son efficacité dans plusieurs applications médicales grâce à : sa capacité à délivrer de façon contrôlée des médicaments, ses propriétés mucoadhésives, sa capacité à améliorer la perméabilité cellulaire et la transfection de l'ADN [191].

Administration de l'ADN : La forme protonée du chitosan en solution présente une bonne affinité vis-à-vis des plasmides chargés négativement, ce qui favorise la formation d'un complexe. Ce complexe est capable de délivrer un ADN intact aux cellules. Ainsi, des recherches ont été réalisées pour synthétiser des matrices de livraison des gènes à base du chitosan pour diverses applications en ingénierie tissulaire et médecine régénératrice [192].

Livraison de molécules actives : la charge positive du chitosan a été exploitée pour délivrer des médicaments chargés négativement en se basant sur des interactions électrostatiques. K.S. Bhise *et al.* [193], par exemple, ont conçu un système de libération contrôlée d'un médicament anionique le « naproxène » (un anti-inflammatoire non stéroïdien) en utilisant le chitosan comme matrice support du médicament. Avec les médicaments polyanioniques, les interactions entre le chitosan et l'agent thérapeutique sont plus prononcées et la libération du médicament peut se faire sur une période de temps plus prolongée.

En dépit de ses propriétés intéressantes, certaines applications nécessitent la modification de surface du chitosan. En effet, le chitosan a été combiné avec d'autres polymères dans plusieurs travaux tels que le PEG [194] et la PEI [195] pour un transport contrôlé des protéines et de l'ADN respectivement.

1.5.4. Le trans-resvératrol (TR) : une seule molécule, plusieurs applications

1.5.4.1. Le trans-resvératrol : structure, biodisponibilité et découverte

Le resvératrol (3,4',5-trihydroxy-trans-stilbène) est un composé polyphénolique qui appartient à la famille des stilbènes. La majorité des stilbènes, dans les plantes, agissent comme des phytoalexines antifongiques en cas d'infection ou de blessure. Le resvératrol est très répandu dans le règne végétal et se trouve essentiellement dans le raisin (le vin) et les arachides [196].

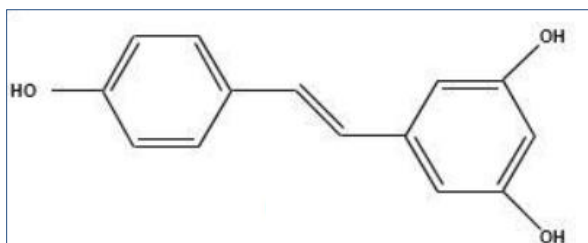


Figure 21 : Structure du trans-resvératrol.

La découverte du resvératrol dans le vin rouge [197] suite à ce qui s'appelle le « French paradox » [198] était le point de départ de la carrière de cette molécule. Ce paradoxe a été découvert par une équipe américaine en 1980 lors d'une comparaison entre deux populations (française et américaine) ayant le même régime alimentaire. Le taux des maladies cardiovasculaires au sein de la population française était beaucoup plus faible en comparaison avec celle de la population américaine. Ce résultat a été expliqué par une consommation régulière et plus importante de vin rouge chez les français et confirmé plus tard par P. Jeandet

et al. [199]. Depuis cette date, le resvératrol a connu une augmentation exponentielle du nombre d'études réalisées à son sujet.

1.5.4.2. Propriétés biologiques du trans-resvératrol

De nombreuses études *in vitro* ont montré les différents effets biologiques du resvératrol dont les principaux sont l'effet antioxydant [200], anti-inflammatoire [36] et œstrogénique ainsi que les activités anticancéreuses [33] et chimiopréventives¹⁰ [201].

L'effet préventif et curatif du trans-resvératrol contre plusieurs types de cancer a été prouvé, récemment, par de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* chez les animaux. En effet, grâce à son pouvoir antioxydant puissant, il a prouvé son efficacité contre le cancer de la peau, du sein, du poumon, de la prostate, du pancréas... [202].

En revanche, l'utilisation du TR chez l'homme reste restreinte due à certaines limites de cette molécule telles que sa photosensibilité, son oxydation facile [203] et sa faible biodisponibilité [196]. De plus, des évaluations de la pharmacocinétique¹¹ du TR libre ont rapporté un temps de demi-vie très court (30-45 min) et un métabolisme rapide [204]. De fortes doses de ce polyphénol seraient nécessaires pour qu'il soit efficace dans l'organisme humain mais sa faible solubilité dans l'eau limite forcément son utilisation médicamenteuse. Afin de pallier ces limites, une encapsulation ou un greffage du TR dans/sur des nanoparticules, qui protégeraient son activité biologique et augmenteraient son temps de demi-vie, s'avère une bonne alternative.

1.5.4.3. Les systèmes d'encapsulation généralement utilisés pour le TR

Il existe plusieurs systèmes d'encapsulation du transresvératrol (Tableau 7) :

Les microémulsions : Ce sont des dispersions colloïdales thermodynamiquement stables. Elles se forment spontanément lorsque certaines combinaisons de tensioactif, d'huile et d'eau sont mélangées dans des conditions appropriées. Elles ont généralement une forme sphérique ($d < 100$ nm) et constituées d'un noyau hydrophobe (partie hydrophobe du tensioactif et l'huile) et une coquille hydrophile (la tête hydrophile du tensioactif).

Les liposomes/niosomes : Ce sont des vésicules sphériques uni- ou multicouches. Elles sont composées de bicouches concentriques de phospholipides et d'un tensioactif non ionique.

Les biopolymères : il s'agit de systèmes d'administration synthétisés à partir de biopolymères alimentaires tels que les protéines, les polysaccharides ... [205].

¹⁰ Chimioprévention : prévention des maladies grâce à des substances chimiques.

¹¹ Pharmacocinétique : Science qui étudie le devenir d'une substance chimique (principe actif) dans l'organisme y compris son absorption, sa distribution, son métabolisme et son excrétion.

Tableau 7 : Quelques exemples de systèmes d'encapsulation du trans-resvératrol [205]

Type d'encapsulation	Système d'encapsulation	Propriété évaluée	Référence
Microémulsion	Emulsion eau/huile	Activité anti-oxydante	Spigno <i>et al.</i> [206]
	Emulsions huile/eau	Activité antioxydante et anti-inflammatoire	Lee <i>et al.</i> [207]
Liposome	Phospholipe/cholestérol	Efficacité d'encapsulation. Activité antioxydante. Libération. Cytotoxicité	Isailovic <i>et al.</i> [208]
	La phosphatidylcholine de soja	Peroxydation du lipide	Blond <i>et al.</i> [209]
	Span 60 et cholestérol	Efficacité de piégeage et libération dans le liquide gastrique simulé	Pando <i>et al.</i> [210] [211]
Biopolymère-particules	Chitosan réticulé avec la vanilline	Efficacité d'encapsulation	Peng <i>et al.</i> [212]
	Pectine réticulée avec du zinc	Libération et stabilité du stockage	Isailovic <i>et al.</i> [208]
	Hydroxypropylméthyl cellulose	Solubilité	Kim <i>et al.</i> [213]

Jusqu'à ce jour, il n'y a que des vésicules organiques qui ont été utilisées pour l'encapsulation du TR et aucun système n'a utilisé un oxyde métallique pour la vectorisation. Pour cet effet, ce manuscrit présentera, dans le dernier chapitre, l'élaboration d'un nouveau nanovecteur à base de nanotubes de titanate pour la vectorisation d'un phénol stilbénique, le 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-*trans*-stilbène (HAPtS), structurellement similaire au TR. Ce composé est synthétisé exclusivement à l'ICMUB, un laboratoire de chimie organique dijonnais. Des composés structurellement proches de ce dérivé ont prouvé une activité anti-tumorale importante [35]. Le HAPtS est adapté pour être accroché sur des supports inorganiques comme les TiONts *via* sa fonction amine.

I.6. Conclusions

Cet aperçu bibliographique a tout d'abord introduit le dioxyde de titane, le précurseur de la synthèse hydrothermale des nanotubes de titanate (TiONts). Les différentes formes cristallographiques de ce matériau, en particulier les formes rutil et anatase, leurs propriétés physico-chimiques ainsi que leurs applications ont été rapportées.

Les principaux facteurs influençant la synthèse hydrothermale des TiONts ont été ensuite exposés. La dépendance de leur morphologie, structure et composition chimique avec de nombreux paramètres expérimentaux justifie l'importance de la discussion de la deuxième partie de ce chapitre. Les effets de la nature du précurseur (structure et taille de grains), de la concentration et du type de base, de la température, du temps de réaction, du lavage acide, du prétraitement et de l'agitation sur la morphologie et le rendement de la synthèse des TiONts ont

été détaillés. La structure cristalline, les propriétés physico-chimiques et les principaux mécanismes de formation des TiONts ont également été discutés.

En dépit de la diversité des protocoles adoptés dans la littérature pour la synthèse hydrothermale des TiONts, ces derniers présentent, dans la majorité des cas, des propriétés communes et intéressantes (une surface spécifique élevée et une morphologie tubulaire en multicouches) qui les ont amené à être utilisés pour plusieurs applications telles que la photocatalyse, la production et le stockage de l'énergie ainsi que dans le domaine biomédical (régénération osseuse, détection de la dopamine et vectorisation d'agents thérapeutiques).

L'utilisation des nanotubes de titanate en nanomédecine comme nanovecteur d'agents thérapeutiques est l'objet de la dernière partie de ce chapitre. Etant donné que la notion de nanovecteur est assez récente, une définition de ce terme a été détaillée au début et illustrée ensuite par quelques exemples de systèmes d'administration de molécules thérapeutiques.

Un nanovecteur doit remplir un certain nombre de conditions qui lui permettent d'être utilisé pour une telle application (non toxique, biocompatible, stable en suspension, capable de véhiculer la molécule d'intérêt jusqu'à sa cible...). Ces conditions exigent, souvent, la présence de certaines fonctionnalités qui ne sont pas présentes dans le matériau de départ. Pour cette raison, la modification de leur surface est une étape essentielle. Ainsi, un aperçu bibliographique sur les modifications de surface des nanoparticules, en vue d'une utilisation comme nanovecteur d'agents thérapeutiques, a été rapporté.

Finalement, les principaux stabilisants utilisés pour la préfonctionnalisation des TiONts dans ce manuscrit ont été présentés à savoir les catéchols (DHCA et L-DOPA), l'acide citrique (AC) et l'organosilane (APTES). Les principales caractéristiques du polymère de biocompatibilité proposé pour cette étude, le chitosan (CT), ainsi que les propriétés de la molécule d'intérêt, un analogue du trans-resvératrol, ont également été rapportées

Chapitre II.
ETUDE DE LA SYNTHÈSE
HYDROTHERMALE DES NANOTUBES DE
TITANATE

II.1. Introduction : contexte et objectifs

La synthèse hydrothermale des nanotubes de titanate est une tâche qui paraît simple dans son principe mais qui devient difficile quand la morphologie et les dimensions doivent être maîtrisées. En effet, comme il a été vu au chapitre 1 (voir paragraphe I.2.4), un grand nombre de paramètres expérimentaux est à considérer pour contrôler la synthèse. L'optimisation de la synthèse signifie, dans notre cas, avoir un bon rendement en nanotubes *i.e.* éviter la formation d'autres morphologies : nanofeuillets, nanorubans, particules résiduelles du précurseur et nanotubes malformés [74] (partie bibliographie I.2.4). La complexité de la synthèse des TiONts provient de la complexité de leur mécanisme de formation. C'est pour cette raison que plusieurs hypothèses ont été proposées pour l'expliquer [121] et que des études sont encore nécessaires (voir paragraphe I.3).

Dans ce chapitre, la synthèse hydrothermale est effectuée par deux méthodes : une méthode classique en mode statique et une méthode de synthèse dynamique, à l'aide d'un réacteur qui assure une agitation mécanique forte par balancement. Une étude paramétrique est envisagée pour chaque méthode afin d'optimiser les paramètres de synthèse des TiONts et réduire leur temps de traitement hydrothermal. Enfin, une discussion du mécanisme de formation des TiONts est proposée. Une grande partie de ce chapitre fait l'objet d'un article scientifique publié dans le Journal of Alloys and Compounds, intitulé : Effect of mechanical stirring and temperature on dynamic hydrothermal synthesis of titanate nanotubes (<https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.06.172>).

II.2. Description des méthodes de synthèses : les différents montages utilisés

Trois montages différents sont utilisés pour synthétiser les nanotubes de titanates ; un montage en statique et deux en dynamique (l'un des dispositifs en mode dynamique n'a été que faiblement utilisé, il s'agit du réacteur de l'équipe BH2N de l'ICB, qui sera malgré tout présenté brièvement dans cette partie). La synthèse en mode statique est réalisée au laboratoire URCMA, en Tunisie, moyennant deux autoclaves avec deux capacités ; le petit volume (20 mL) pour optimiser les paramètres de synthèse et le grand volume (1000 mL) pour reproduire les synthèses à plus grande échelle. La méthode dynamique de la synthèse a été faite par deux dispositifs : le premier à l'URCMA qui assure une agitation mécanique par balancement. Ce type d'agitation est très original et a fait l'objet de plusieurs publications dans le cadre d'autres thèses dans l'équipe pour la synthèse des matériaux diélectriques mais il n'a jamais été utilisé pour la synthèse des TiONts [67, 214, 215]. Le deuxième dispositif est à l'ICB, pour lui l'agitation se fait à l'aide d'une tige à palette tournante (voir Figure 22).

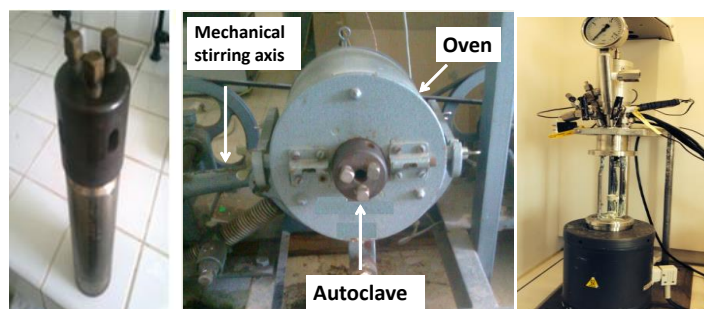


Figure 22 : Les différents réacteurs utilisés sont (de gauche à droite) un autoclave de synthèse en statique (URCMA), un réacteur de synthèse par agitation mécanique par balancement (URCMA) et un réacteur de synthèse avec une tige à palette tournante et pression contrôlée (ICB).

II.2.1. Protocole expérimental des synthèses de TiONts réalisées au laboratoire URCMA (Tunisie)

II.2.1.1. Synthèse des TiONts en mode statique

Une masse de 0,2 g de TiO_2 rutile commercial (99,5%, Interchim) est mise en contact avec 15 mL d'une solution de NaOH (pastilles 98%, Alfa Aesar). Le mélange est soumis à une agitation magnétique continue (250 tr/min) pendant 30 minutes puis introduit dans l'autoclave en téflon. A l'issue du traitement hydrothermal (pendant un temps et à une température donnés), la poudre est lavée à l'eau distillée jusqu'à un pH d'environ 7-8, puis avec de l'acide chlorhydrique HCl (0,1M) jusqu'à pH 2. La suspension est maintenue dans l'acide pendant 3 heures puis relavée encore à l'eau distillée jusqu'au pH neutre. Il a été choisi de ne pas faire un lavage acide pour la moitié de la quantité de la poudre de certains échantillons, afin d'étudier l'effet du lavage acide. Toutes les étapes de lavage sont effectuées par décantation et la poudre obtenue à la fin est séchée à l'étuve à 70°C pendant une nuit.

La synthèse hydrothermale statique dans le grand autoclave a été reproduite de la même façon mais avec juste une variation de la masse du précurseur. Le même rapport TiO_2/NaOH a été conservé pour une solution de 500 mL de soude, une masse de 6,6 g de TiO_2 est donc utilisée.

II.2.1.2. Synthèse des TiONts en mode dynamique

Une masse de 1 g de TiO_2 rutile commercial (99.5%, Interchim) est ajoutée à 100 mL d'une solution de NaOH 10 M (pastilles 98%, Alfa Aesar). Après 30 minutes d'agitation magnétique continue (250 tr/min), le mélange est transféré dans un autoclave en téflon de capacité 250 mL. La température de synthèse est fixée à X°C telle que $X = 150, 160, 170$ ou 180, pendant Y heures ($Y = 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 16$ ou 48). L'ensemble du réacteur hydrothermal (autoclave et four) est soumis à une agitation mécanique par balancement, intermittent ou continu de 2,33 Hz [214]. Dans le cas de l'agitation intermittente, l'agitation est appliqué pendant Z min/h où $Z=0, 5, 10, 15, 20$ ou 60. Ensuite, la suspension récupérée est lavée avec de l'eau distillée plusieurs fois jusqu'à pH 7. Un second lavage avec la solution de HCl (0,1 M) est effectué jusqu'au pH 2-3. Après 3 heures, le précipité est séparé par décantation puis de nouveau lavé plusieurs fois à l'eau distillée jusqu'à neutralisation du pH. Les produits obtenus

sont enfin séchés à 70°C pendant une nuit à l'étuve. Tous les échantillons préparés et étudiés sont présentés dans le Tableau 8 avec les conditions expérimentales correspondantes.

II.2.2. Protocole expérimental des synthèses de TiONts réalisées au laboratoire ICB (France)

1 g de TiO_2 rutile commercial (Tioxide), précurseur différent du premier, sont incorporés dans 250 mL d'une solution de soude 10 M (Sigma-Aldrich). Le mélange est traité par une canne à ultrasons pendant 15 min (pulse 2s marche/2s arrêt) à 50% de la puissance maximale, puis transvasé dans le réacteur en téflon. La synthèse est effectuée à une température de 150°C, $P \approx 4,5$ bar et sous une agitation à palette de 120 tours/min. A la sortie du réacteur, la poudre est centrifugée deux fois pour éliminer l'excès de NaOH ($g=200$) et lavée par dialyse (pendant 3 jours à travers une membrane de cellulose régénérée de 12 kDa) et par ultrafiltration (une membrane de cellulose régénérée de 30kDa). La poudre récupérée est enfin séchée par lyophilisation pendant 2-3 jours (les différentes méthodes de lavages sont détaillées en annexe A2).

La poudre issue de cette synthèse ne sera étudiée que dans le paragraphe II.7 pour comparaison avec les synthèses réalisées en Tunisie.

II.3. Caractérisations du précurseur de départ : dioxyde de titane

Le précurseur de cette partie d'étude est le dioxyde de titane rutile commercial (99.5%, Interchim). Il a été analysé par DRX, le diffractogramme obtenu est donné à la Figure 23.

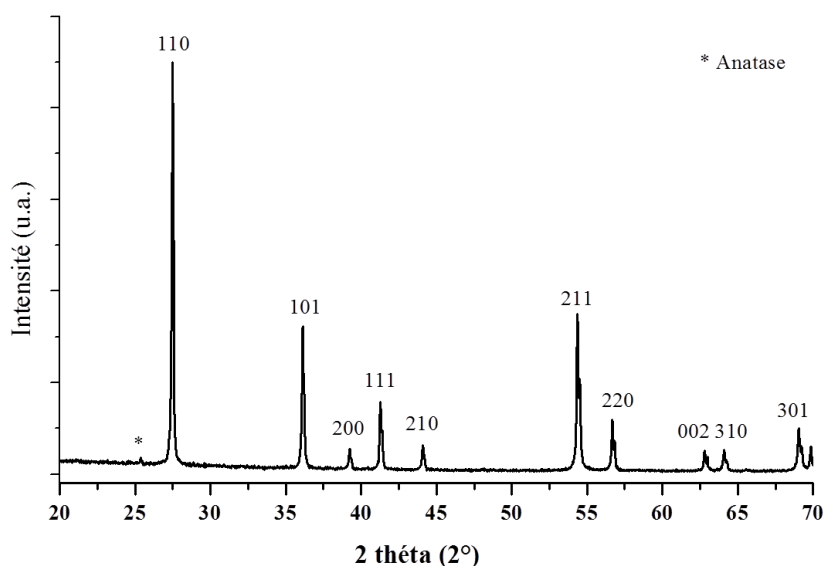


Figure 23 : Diffractogramme du TiO_2 rutile utilisé comme précurseur ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$).

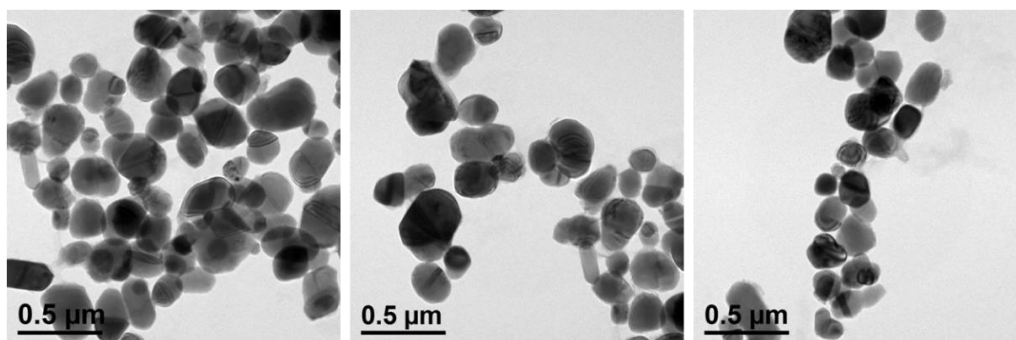


Figure 24 : Clichés MET du dioxyde de titane utilisé comme précurseur.

Le diffractogramme obtenu montre la présence majoritaire de la phase rutile avec une trace de la phase anatase, repérée par la présence de son pic le plus intense (101) vers la position $2\theta = 25,37^\circ$. La microscopie électronique en transmission (MET) montre une forme des particules quasi-sphérique avec une taille moyenne des grains, déterminée par comptage d'une centaine de particules, d'environ (244 ± 37) nm (Figure 24). La mesure de surface spécifique, calculée par la méthode BET (Brunauer-Emmett-Teller), après un dégazage pendant 24 h à 100°C donne une valeur de $(13,6 \pm 0,1)$ m^2/g .

II.4. Synthèse hydrothermale des TiONts en mode statique

II.4.1. Etude paramétrique de la synthèse des TiONts en mode statique

II.4.1.1. Influence de la température sur l'obtention des TiONts

Afin d'optimiser les conditions expérimentales de la synthèse des nanotubes de titanate en mode statique, les expériences ont été faites avec un autoclave de capacité 20 mL. L'étude de l'effet de la température sur la synthèse a été effectuée à un temps de réaction et une concentration de NaOH fixes, soit 24 h et 10M respectivement. La température est quant à elle modifiée entre 120°C et 200°C .

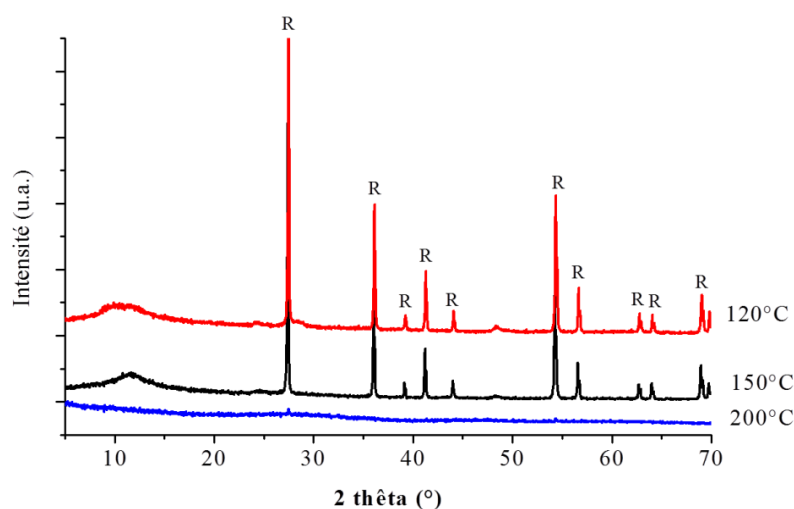


Figure 25 : Evolution du diffractogramme des échantillons synthétisés en mode statique, à la température (120, 150 et 200°C) pendant 24 h dans $[\text{NaOH}] = 10 \text{ M}$.

Les diffractogrammes obtenus (Figure 25) montrent que la proportion de la phase rutile diminue avec l'augmentation de la température jusqu'à ce qu'elle disparaisse à 200°C. Aucun pic relatif aux nanotubes n'est formé même à une température très élevée (200°C). Ce résultat peut être expliqué par le fait que le TiO_2 rutile, avec une taille de grains d'environ 250 nm, est un matériau thermostable et nécessite des conditions plus dures pour se transformer en nanotubes, c'est-à-dire une température plus élevée ou un temps de traitement hydrothermal plus long [94, 95].

Les images MET enregistrées pour ces échantillons illustrent les résultats obtenus par DRX et montrent l'absence totale des TiONts. La Figure 26a,b montre une présence abondante du précurseur avec des particules de TiO_2 rutile presque intactes à 120°C. Chaque particule est entourée par des feuillets (Figure 26b). La vue de loin, à un plus faible grandissement, donne l'impression que les nanoparticules sont piégées dans une « gangue » de feuillets (Figure 26a). L'augmentation de la température, à 150°C, a un effet différent de ce qui vient d'être noté. En effet, les particules du précurseur se trouvent alors entourées par des particules très fines qui n'ont pas un contour bien défini (Figure 26c,d). A une température de 200°C, on voit qu'il n'y a plus de particules de TiO_2 rutile de départ, elles se sont transformées en particules de très petite taille, d'environ 10 nm (Figure 26e,f). Ces mêmes particules commencent à apparaître à 150°C mais d'une façon moins abondante (Figure 26c,d). La réalisation d'une SAD (Selected Area Diffraction), sur des régions où il n'y a que ces nouvelles nanoparticules, montre la présence de la phase anatase (Figure 26e).

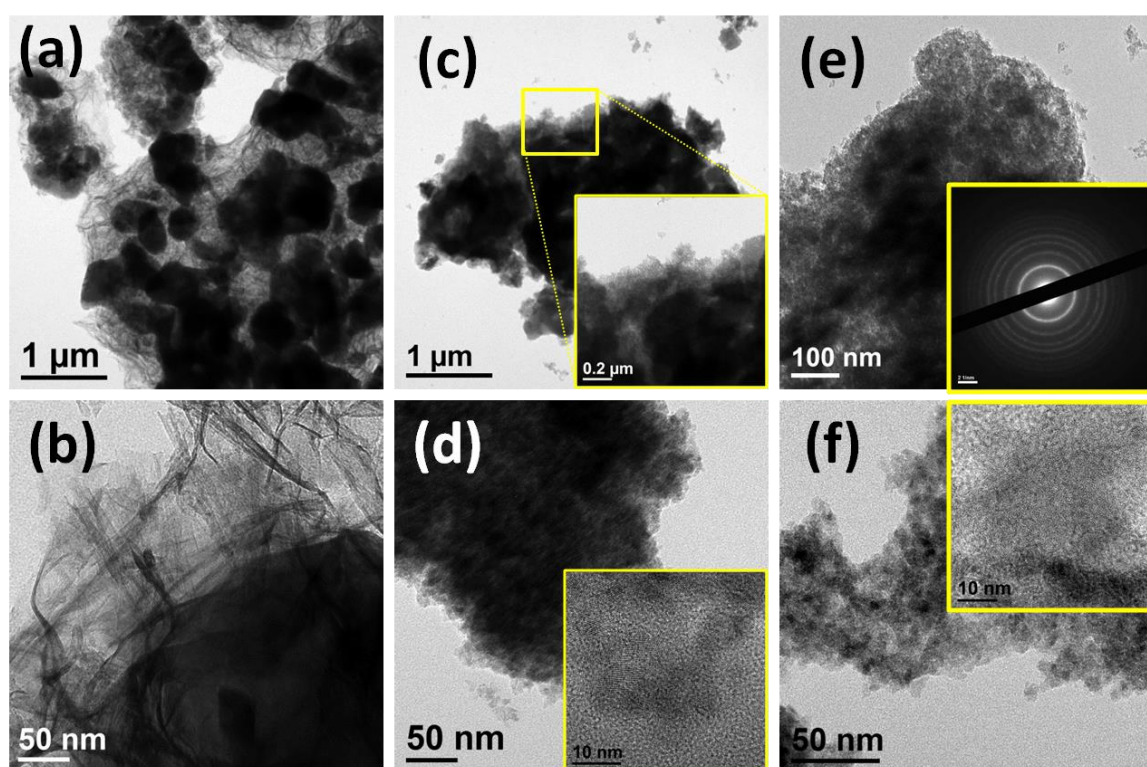


Figure 26 : Clichés MET des échantillons synthétisés en mode statique pendant 24h, $[\text{NaOH}]=10\text{ M}$ à (a-b) 120°C, (c-d) 150°C et (e-f) 200°C.

Partant de cette constatation, on peut dire qu'il y a une transition de phase du rutil en anatase induite par la taille des cristaux, ce phénomène a déjà été évoqué dans le paragraphe I.2.1.1 du chapitre précédent. Ce phénomène a été expliqué dans l'HDR de N. Millot et provient du fait que ce type de transition n'est pas une conséquence de l'augmentation de la température mais plutôt de la surface spécifique des matériaux [53]. Effectivement, la mesure de la surface spécifique de ces trois échantillons donne les valeurs $66,0 \pm 0,4$; $154,1 \pm 1,2$ et $168,4 \pm 2,1$ m²/g pour les températures respectives de 120, 150 et 200°C et pour une surface spécifique de départ de 13 m²/g. Ce phénomène a ici naturellement été initié par la dissolution des grains de TiO₂ rutil, conduisant à des grains de tailles beaucoup plus faible soit par dissolution seule, soit par des phénomènes de dissolution/reprécipitation. Ces grains présentant des surfaces spécifiques élevées sont donc stables en phase anatase.

Etant donné que l'augmentation de la température au-dessus de 200°C n'est pas conseillée pour la formation des TiONts car elle favorise la synthèse des nanorubans [12], il a été décidé d'augmenter le temps de la réaction pour tenter d'obtenir des nanotubes.

II.4.1.2. Optimisation du temps de la synthèse des TiONts en mode statique

Après avoir fixé la température de synthèse à 150°C et la concentration de NaOH à 10 M, l'effet du temps a été étudié en effectuant des réactions à 24, 48 ou 96 h. La Figure 27 montre qu'après 24 h de la réaction, comme cela a déjà été vu (II.4.1.1), la phase majoritaire est le précurseur rutil qui persiste en grande quantité. Après 48 heures, la phase rutil persiste mais les pics caractéristiques des nanotubes apparaissent dans les positions suivantes $2\theta \approx 10$, 24, 28 et 48° ($\lambda = 1.5406$ Å), sous forme d'une phase majoritaire. La Figure 28b montre la présence de feuillets et de nanotubes en cours de formation, ce qui prouve une formation non complète des TiONts après 48 h de temps de réaction. La Figure 27 et la Figure 28c prouvent l'obtention d'une phase pure de titanate avec une morphologie tubulaire uniforme après 96 heures de THT à 150°C. Ce temps de synthèse optimal a aussi été obtenu par A. Nakahira *et al.* qui ont obtenu un rendement maximal de synthèse des TiONts après 96 h de synthèse ($T = 110^\circ\text{C}$, $[\text{NaOH}] = 10$ M, $V = 20$ mL, TiO₂ anatase) [87].

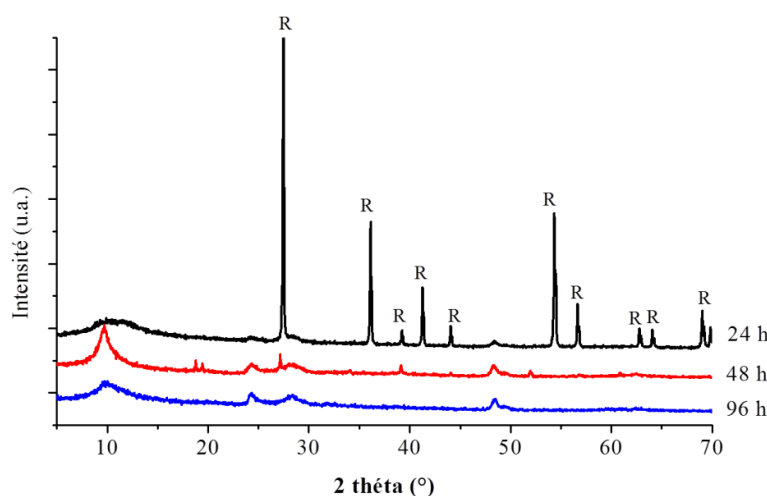


Figure 27 : Evolution des diffractogrammes des échantillons synthétisés en mode statique à 150°C dans $[\text{NaOH}] = 10$ M pendant 24, 48 ou 96 h.

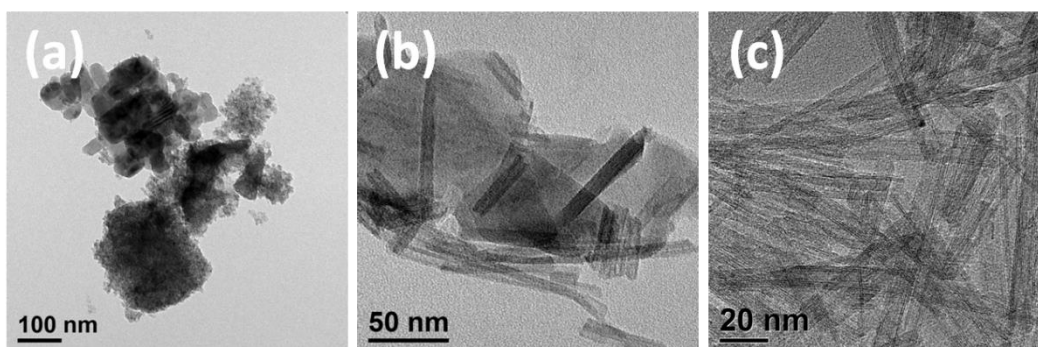


Figure 28 : Clichés MET des échantillons synthétisés en mode statique à 150°C, dans [NaOH]=10 M et pendant (a) 24 h, (b) 48 h et (c) 96 h.

II.4.1.3. Influence de la concentration de la base sur la morphologie des nanostructures synthétisées

Dans le but d'étudier l'effet de la concentration de la soude sur la synthèse des nanotubes, une série d'expériences est réalisée en fixant la température à 150°C et le temps de synthèse à 96 h. Les concentrations de NaOH étudiées sont : 5 M, 7 M, 10 M.

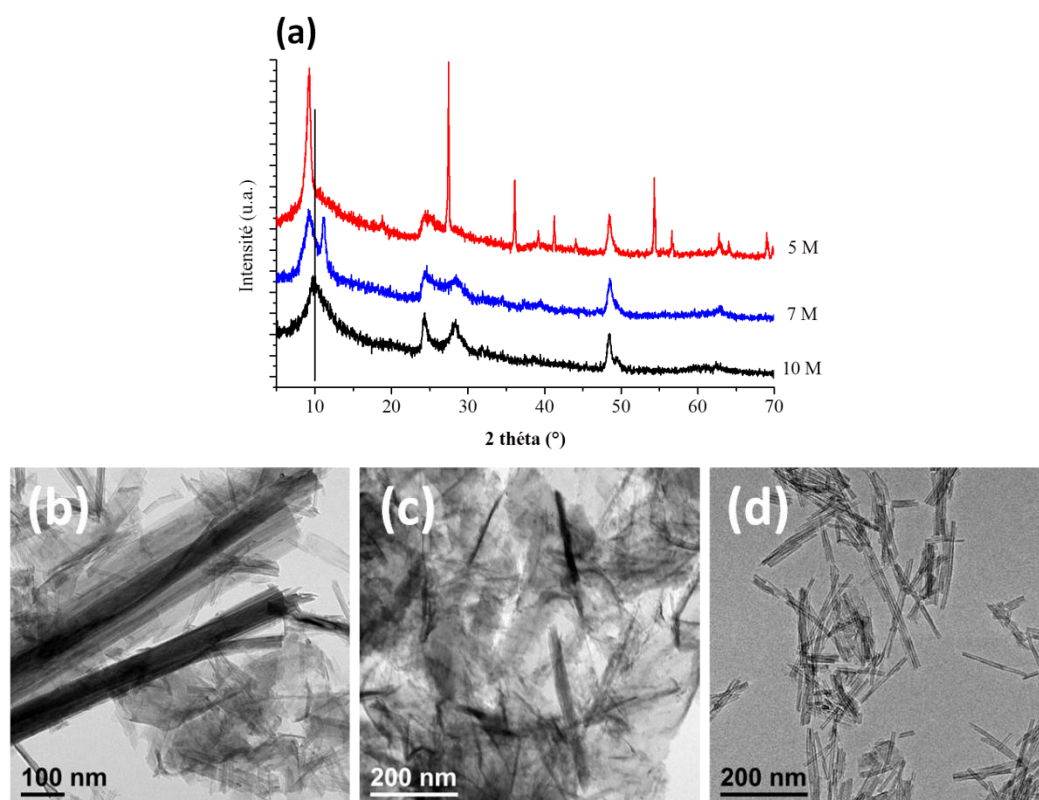


Figure 29 : (a) DRX et (b-d) images MET des échantillons synthétisés à 150°C en mode statique, pendant 96 h et à différentes concentrations de soude : (b) 5 M, (c) 7 M et (d) 10 M.

La principale différence entre les diffractogrammes de la Figure 29a concerne le premier pic ($2\theta \approx 10^\circ$). Cette position est caractéristique des nanotubes car elle correspond à la distance

intercouches [121]. En se référant à la concentration 10 M, le premier pic de l'échantillon synthétisé à 7 M est dédoublé avec un décalage vers les faibles 2θ ($2\theta=9,24^\circ$) pour l'une des contributions. Le même décalage est aussi observé dans le diffractogramme de la poudre synthétisée à 5 M mais avec une plus forte intensité, ce qui peut être le signe d'une cristallinité améliorée. Une proportion importante du précurseur est aussi présente dans cet échantillon indiquant une transformation incomplète du TiO_2 . Le décalage de la position du premier pic pour des concentrations faibles de NaOH a été expliqué par Z.Y. Yuan *et al.* [76] par l'apparition des nanostructures concurrentes aux nanotubes qui sont essentiellement les nanorubans. Cela a été aussi démontré dans les travaux de thèse de A. L. Papa qui a attribué le décalage du premier pic de diffraction, vers les faibles 2θ , à la formation des nanorubans [149].

En réalisant des observations au MET (Figure 29), un grand nombre de nanorubans est en effet observé dans la synthèse à une concentration 5 M de NaOH (Figure 29b). La présence de ces morphologies diminue dans la synthèse à 7 M de NaOH qui présente essentiellement des feuillets non enroulés ou bien des nanorubans de taille beaucoup moins importante (Figure 29b). En revanche, des nanotubes de forme régulière ont été obtenus à 10 M de NaOH. Ces résultats confirment les interprétations de la littérature et prouvent que la concentration 10 M en NaOH est la concentration adéquate et optimale pour avoir une morphologie tubulaire des TiONts.

II.4.1.4. Importance de la capacité de l'autoclave sur la morphologie des nanotubes

Une synthèse dans les conditions expérimentales optimisées précédemment (150°C, 96 h et 10 M NaOH), a été reproduite dans un autoclave de plus grande capacité (1L). Contrairement à ce qui était espéré, la synthèse dans le grand autoclave n'a pas abouti aux mêmes résultats. En effet, les images MET prouvent l'obtention de nanorubans de grande taille au lieu de nanotubes, comme le montre la Figure 30a,b. Cependant, la même synthèse à 48 h a abouti à la formation des TiONts avec un rendement de synthèse de presque 100% (Figure 30c,d).

Une explication possible pour ce résultat provient du fait que le facteur influent, dans le cas de ce changement d'échelle, est la surface de contact entre le précurseur et la solution de NaOH. En effet, dans le grand autoclave, la surface de contact entre le TiO_2 et la soude est beaucoup plus importante sachant que le rapport molaire TiO_2/NaOH est fixe. En fait, dans le cas des petits volumes, le petit autoclave est mis debout (en position verticale) dans l'étuve alors que pour le grand volume (autoclave de capacité 1 L), l'autoclave est mis couché (en position horizontale) en raison de sa grande taille. Cette position met un plus grand nombre de particules du précurseur en contact avec la solution de soude et augmente la surface d'échange entre le TiO_2 et la solution de NaOH. Par conséquent, la cinétique de formation des tubes s'accélère permettant de produire des nanotubes avec un temps de réaction réduit de moitié (48 h au lieu de 96 h dans le petit autoclave). Ce facteur n'a jamais été discuté dans la littérature mais il peut être assimilé à l'effet du pourcentage de remplissage de l'autoclave, étudié par B. Poudel *et al.* [216]. Dans son étude, B. Poudel a rapporté que le pourcentage de remplissage de l'autoclave a un effet sur la pureté et la cristallinité des nanostructures obtenues. Il a trouvé que

les pourcentages optimaux de remplissage de l'autoclave sont de 84 % et 90 % pour des tailles de précurseur micrométriques et nanométriques respectivement.

En conclusion, il s'avère qu'en mode statique, qu'au-delà de la taille de l'autoclave, c'est la surface de contact entre le précurseur et la solution de soude concentrée qui est un facteur important et qui influe énormément sur la cinétique de synthèse des nanotubes et par conséquent sur leur temps de synthèse.

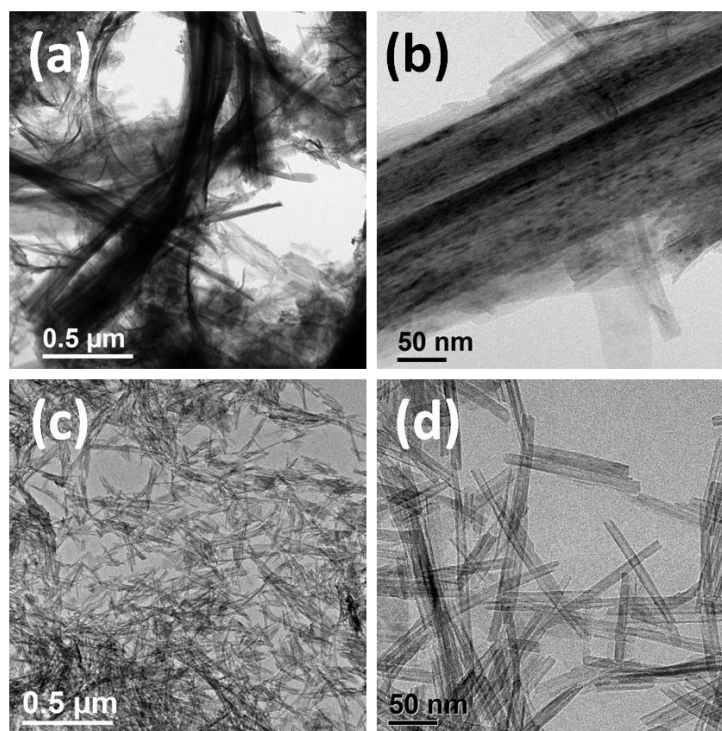


Figure 30 : Clichés MET des nanotubes de titanate synthétisés en mode statique, à 150°C, dans NaOH 10M, dans le grand autoclave, pendant (a,b) 96 h et (c,d) 48 h. [NaOH]=10 M.

En dépit des efforts entrepris pour réduire le temps de synthèse des TiONts, ce dernier reste conséquent (48 h à 150°C). Il a été montré dans la partie (I.2.4) que la cinétique de la réaction de formation des nanotubes dépend de plusieurs autres facteurs : la taille des particules de TiO_2 [98, 217], leur structure cristalline [94, 96], le type de prétraitement utilisé avant la synthèse, [86, 110-113] et l'agitation [115, 117, 118]. Pour cette raison, une étude de la synthèse hydrothermale en mode dynamique est réalisée dans le paragraphe suivant, à l'aide d'un réacteur qui assure une agitation mécanique forte.

II.5. Synthèse hydrothermale des TiONts en mode dynamique

Les différentes conditions expérimentales des synthèses réalisées dans ce paragraphe et l'identification des échantillons correspondants sont résumées dans le Tableau 8. Il faut noter que l'échantillon TNT-48-0 a été synthétisé en mode statique dans des conditions expérimentales optimisées (partie II.4.1.4) à savoir : réacteur 1L, 150°C, 48h, [NaOH]=10 M et sera pris comme référence pour la suite de ce paragraphe (le diffractogramme de ce produit est considéré comme un diffractogramme de référence des nanotubes).

Tableau 8 : Conditions expérimentales des échantillons synthétisés en mode dynamique. [NaOH]=10 M.

Échantillon	Température (°C)	Temps de réaction (h)	Temps d'agitation/h (min)
TNT-48-0	150	48	0
TNT-16-0	150	16	0
TNT-16-5	150	16	5
TNT-16-10	150	16	10
TNT-16-15	150	16	15
TNT-16-20	150	16	20
TNT-150-10	150	8	10
TNT-160-10	160	8	10
TNT-170-10	170	8	10
TNT-180-10	180	8	10
TNT-180-2	180	2	60
TNT-180-1	180	1	60
TNT-180-0.5	180	0,5	60

II.5.1. Etude de l'effet du temps d'agitation par heure de traitement sur la morphologie et les propriétés physico-chimiques des nanotubes : comparaison avec la synthèse en mode statique

II.5.1.1. Effet du temps d'agitation par heure de traitement sur la morphologie des nanotubes

Dans le but d'étudier l'effet de l'agitation sur la morphologie des nanotubes, durant la synthèse hydrothermale, le temps d'agitation par balancement, dans le réacteur de l'URCMA, a varié de 0 à 20 min/h pendant 16 h à une température de 150°C. Il a été décidé de garder la même température que pour la synthèse en mode statique (150°C) et de réduire le temps du THT à 16 h. En effet, un paramètre s'ajoute et intervient pour accélérer la cinétique de la réaction : l'agitation par balancement du réacteur.

Les images MET de l'échantillon de référence (TNT-48-0), données dans la Figure 31a-c, illustrent la morphologie tubulaire. Les diamètres internes et externes varient respectivement de 4,4 à 5,2 nm et de 9 à 10 nm et la distance intercouches est de 7,9 Å pour une centaine de tubes (Tableau 9). Les observations microscopiques de l'échantillon TNT-16-0 (Figure 31d-f), synthétisé en mode statique pendant 16 h, montrent la présence d'une grande quantité de précurseur résiduel. Ce résultat confirme celui obtenu par DRX qui montre la présence d'une phase rutile majoritaire dans cet échantillon (Figure 33). Néanmoins, grâce à l'analyse de la position des pics effectuée en DRX (plus précise que les observations au MET), il apparaît que les nanotubes obtenus en mode statique en 16h, présentent une distance intercouches légèrement plus petite que la référence (Tableau 9). Ce résultat peut être dû à la teneur faible en sodium de cet échantillon, par rapport à la référence, comme il est indiqué par les analyses élémentaires par XPS (Tableau 11 dans la partie II.5.1.3). En effet, les ions Na⁺

s'intercalent entre les couches des nanotubes ce qui engendre une légère variation de ce paramètre [79].

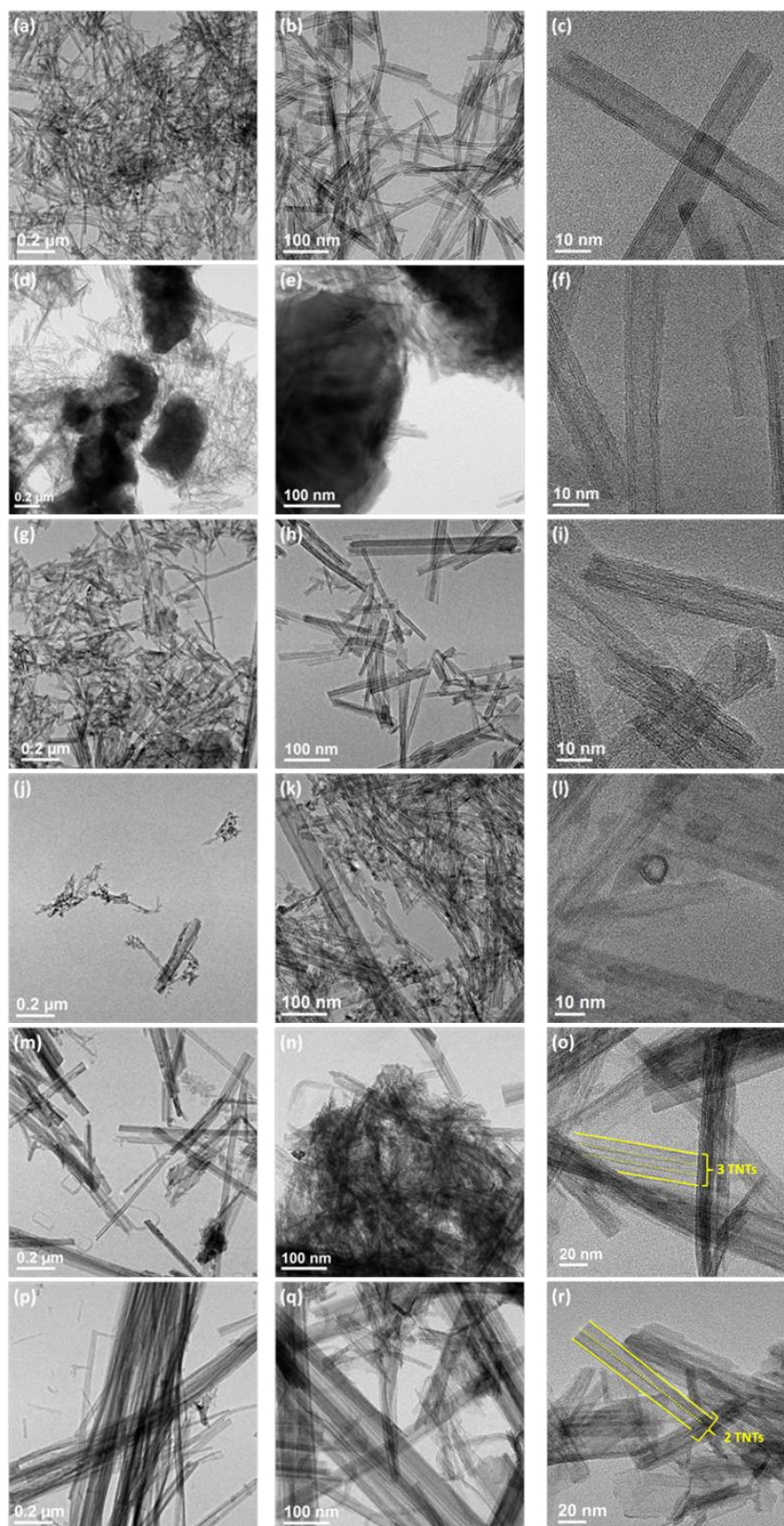


Figure 31 : Images MET montrant l'évolution de la morphologie des TiONts en fonction du temps d'agitation à 150°C (a-c) TNT-48-0, (d-f) TNT-16-0 (16h, pas d'agitation), (g-i) TNT-16-5 (16h, agitation 5 min/h), (j-l) TNT-16-10, (m-o) TNT-16-15 et (p-r) TNT-16-20. TNT-48-0 est pris comme référence (synthèse en mode statique). [NaOH]=10 M.

Pour des durées d'agitation faibles, c'est-à-dire de 5 et 10 min/h, les TiONts synthétisés présentent une morphologie et des dimensions similaires aux nanotubes de référence (TNT-48-0) comme le montre les images MET Figure 31g-l. Une fois que l'agitation mécanique dépasse 10 min/h (TNT-16-15 et TNT-16-20), le nombre des nanotubes diminue significativement et des morphologies concurrentes aux nanotubes, les nanorubans, apparaissent. Le nombre des nanorubans augmente avec l'augmentation du temps d'agitation à partir de 10 min/h (Figure 31m-r).

Le Tableau 9 résume les dimensions des différentes morphologies (nanotubes et nanorubans) obtenues en fonction du temps d'agitation mécanique appliquée, y compris la distance intercouches. Cette dernière a été mesurée par microscopie (MET) et par diffraction (DRX). Une diminution des diamètres intérieurs et extérieurs et de la distance intercouches des nanotubes a été notée à partir d'une agitation de 10 min/h. Inversement, la taille des nanorubans augmente à partir de cette valeur. Les plus grands rubans se trouvent ainsi dans l'échantillon TNT-150-20 synthétisé sous une agitation de 20 min/h.

Tableau 9 : Dimensions des nanotubes et des nanorubans et distances intercouches mesurées par MET et DRX pour un THT (150°C, 16 h) à des temps d'agitations par heure différents pour une centaine de TiONts et quelques dizaines de nanorubans comptés. TNT-48-0 est pris comme référence. [NaOH]=10 M.

Echantillon	Diamètre extérieur $\varnothing_{ex}$ (nm)	Diamètre intérieur $\varnothing_{in}$ (nm)	Longueur des TiONts et nanorubans	Distance intercouches (MET) d_{MET} (Å)	Position du premier pic (DRX) 2θ (°)		Distance intercouches (DRX) d_{DRX} (Å)	
TNT-48-0(réf)	9,5 ± 0,6	4,8 ± 0,4	195 ± 45 nm	7,9 ± 0,8	9,805		9,02	
TNT-16-0	10,7 ± 1,4	4,8 ± 1,0	190 ± 50 nm	8,0 ± 0,7	10,842		8,16	
TNT-16-5	9,7 ± 0,7	4,0 ± 0,7	240 ± 65 nm	8,7 ± 0,7	9,275	10,036	9,35	8,81
TNT-16-10	10,3 ± 0,6	5,4 ± 1,2	205 ± 80 nm	8,2 ± 0,5	9,024	10,049	9,80	8,80
TNT-16-15	8,7 ± 1,0	4,0 ± 0,7	740 ± 330 / 4,2 ± 1,4 μ m	7,2 ± 0,5	9,327	11,414	9,48	7,75
TNT-16-20	7,7 ± 0,8	3,8 ± 0,6	930 ± 390 / 5,5 ± 1,8 μ m	7,0 ± 0,6	10,059	11,862	8,79	7,49

La Figure 32 montre quant à elle une augmentation de la surface spécifique jusqu'à un temps d'agitation de 10 min/h où elle atteint son maximum, suivi d'une diminution jusqu'à 20 min/h. Etant donné que la surface spécifique BET augmente avec l'augmentation des structures tubulaires et creuses, cette mesure peut donner une idée de l'évolution du rendement de synthèse en TiONts. Il est donc clair que la diminution de surface spécifique entre 10 min/h et 20 min/h d'agitation est due essentiellement à la formation des nanorubans. Le phénomène de la diminution de la surface spécifique avec l'augmentation du nombre de nanorubans a également été observé par E. Horvath *et al.* lors de l'augmentation du temps de la réaction jusqu'à 72 h avec une synthèse sous agitation [117].

En résumé, à 150°C et pendant 16 h de réaction, l'agitation favorise, à partir d'une valeur critique de 10 min/h, la formation des nanorubans au lieu des nanotubes. La question qui se

pose maintenant est la suivante : ce changement morphologique est-il accompagné par un changement structural ?

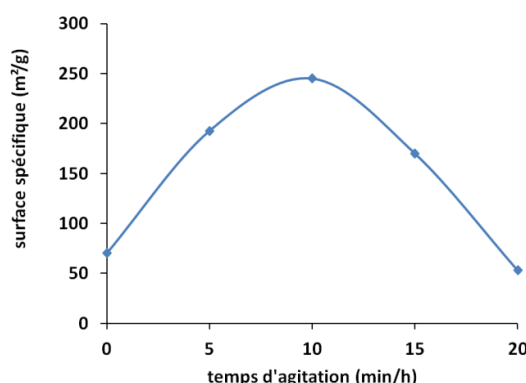


Figure 32 : Mesure de la surface spécifique des produits de synthèse (méthode BET) en fonction du temps d'agitation à 150°C, pendant 16 heures, [NaOH]=10 M.

II.5.1.2. Evolution de la structure des nanotubes en nanorubans sous l'effet de l'agitation : étude par DRX et spectroscopie Raman

➤ Discussion de la structure cristalline des nanotubes de titanate

Les diffractogrammes des nanotubes synthétisés à 150°C sous différents temps d'agitation ainsi que celui des TiONts de référence sont présentés Figure 33. Le pic caractéristique des nanotubes est situé à $2\theta=9.805^\circ$ (TNT-48-0, $\lambda=1,5406 \text{ \AA}$) et correspond à la distance interréticulaire $d_{hkl}=9.02 \text{ \AA}$ relative à la distance intercouches des TiONts. Cette valeur est similaire à celle obtenue par E. Morgado *et al.* [79] (9.0 Å) pour des nanotubes ayant une teneur élevée en sodium.

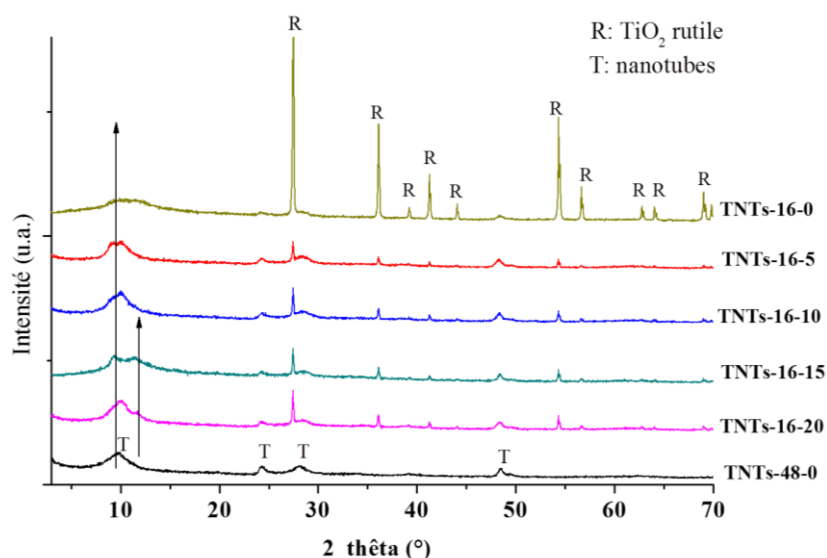


Figure 33 : DRX des produits synthétisés à 150°C pendant 16h sous différents temps d'agitation (5, 10, 15 et 20min/h). TNT-48-0 est pris comme référence ($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$). [NaOH]=10 M.

Le diffractogramme de l'échantillon TNT-16-0, synthétisé en mode statique, présente des pics intenses de TiO₂ rutile indiquant la persistance d'une grande quantité du précurseur

dans cet échantillon. Une fois que l'agitation commence, même à un faible taux de balancement (TNT-16-5), la majeure partie du TiO_2 se transforme en TiONts. Ce résultat prouve l'efficacité du type d'agitation mécanique appliquée, dans l'accélération du phénomène de dissolution du précurseur. En effet, le mouvement par balancement du réacteur permet de heurter les particules contre la paroi de l'autoclave ce qui conduit, dans un premier temps, à leur désagglomération. De plus, il accélère le phénomène de diffusion à la surface des particules par le renouvellement continu de la solution de soude autour de ces dernières.

La structure cristalline des TiONts est une vraie controverse (voir paragraphe I.2.3). En fait, parmi les quatre structures proposées dans la littérature : $\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ (carte ICDD 47-0561) [79, 111], $\text{H}_2\text{Ti}_4\text{O}_9 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (ICDD 36-0655) [13, 87], $\text{H}_2\text{Ti}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (ICDD 47-0124) [89-91] et $\text{H}_{0.7}\text{Ti}_{1.825}\square_{0.175}\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (déduite de la carte ICDD 83-0702) [68, 77, 218], aucune de ces structures ne se confond parfaitement au diffractogramme des TiONts de référence TNT-48-0. Cependant, après une comparaison entre les cartes ICDD précitées et le diffractogramme expérimental de l'échantillon TNT-48-0, ce dernier présente plus de similarité avec la structure cristalline orthorhombique des deux formules $\text{H}_2\text{Ti}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ et $\text{H}_{0.7}\text{Ti}_{1.825}\square_{0.175}\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, avec des pourcentages de similitudes de 61% et 44% respectivement (utilisation du logiciel X'pert HighScore Plus qui permet d'estimer le taux de similitude entre un diagramme expérimental et un diagramme de la base de données ICDD).

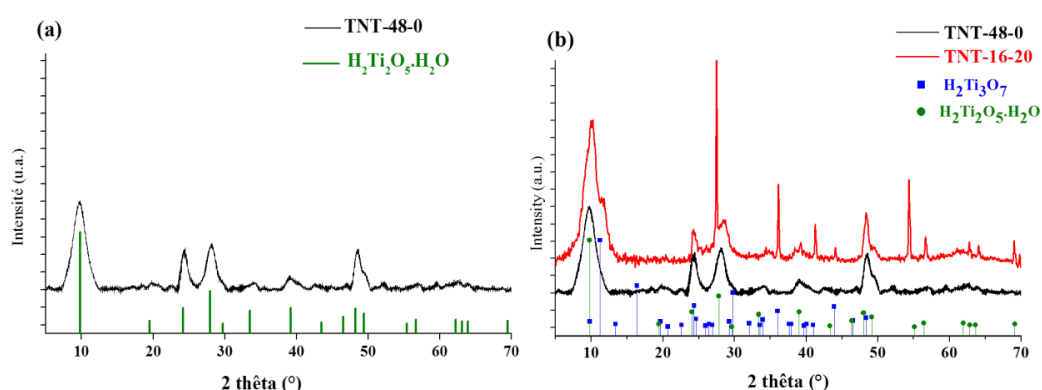


Figure 34 : Comparaison entre le diagramme DRX des TiONts de référence TNT-48-0 et (a) la carte ICDD du composé $\text{H}_2\text{Ti}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$, (b) TNT-16-20 et les cartes des composés $\text{H}_2\text{Ti}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (ICDD 47-0124) et $\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ (carte ICDD 47-0561).

Une comparaison entre le diffractogramme des TiONts de référence TNT-48-0 et la structure orthorhombique du composé $\text{H}_2\text{Ti}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$, présentée dans la Figure 34a, montre la présence de la majorité des diffractions principales de cette structure orthorhombique qui a également été défendue dans plusieurs travaux antérieurs [68, 74, 92, 103]. En effet, F. A.-Ramirez et Y. R.-Morales [92] ont prouvé que la transformation de l'anatase en titanate de structure orthorhombique lamellaire est énergiquement favorable après un THT, en se basant sur des calculs de la dynamique moléculaire. Par ailleurs, d'après les analyses élémentaires par XPS présentées dans le Tableau 11, le rapport O/Ti est de 2,5 pour presque tous les échantillons ; ce qui confirme encore les similitudes avec la formule $\text{H}_2\text{Ti}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ de nos composés.

La spectroscopie Raman est une technique qui a prouvé son efficacité dans l'étude de la structure cristalline des nanotubes. Elle a été utilisée pour observer les modifications structurales qui ne sont pas clairement détectables par des analyses DRX [21, 74, 77, 219]. La Figure 35 présente les spectres Raman des échantillons synthétisés sous agitation, en comparaison avec la référence qui présente neuf bandes situées à 191, 275, 287, 386, 449, 665, 704, 828 et 918 cm^{-1} . Ces bandes sont différentes de celles du TiO_2 anatase (146, 199, 398, 517 et 641 cm^{-1}) [66, 67] et rutile (237, 445, 605, 828 cm^{-1}) [77] ce qui suggère un arrangement d'octaèdres de TiO_6 très différent au niveau des TiONts. Les vibrations de la liaison Ti-O-Ti sont à 275, 449 et 665 cm^{-1} [78, 111, 220]. La bande située à 828 cm^{-1} est attribuée à la vibration de la liaison Ti-O-H [96] et la bande à environ 918 cm^{-1} est attribuée à Ti-O-Na [69, 111]. Ces bandes peuvent être décalées vers de plus grandes ou de plus faibles valeurs en fonction de l'environnement chimique de la liaison Ti-O, tel que l'eau ou la teneur en sodium [77, 103].

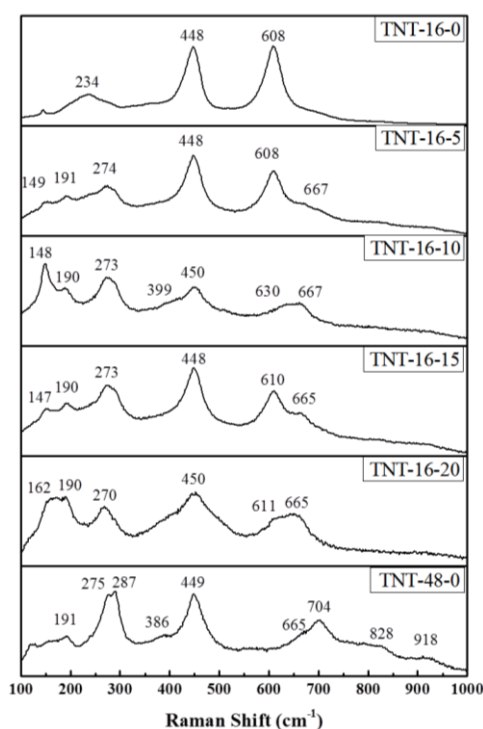


Figure 35 : Spectres Raman des TiONts synthétisés à 150°C pour un processus statique et avec une agitation de 0 à 20 min/h, [NaOH]=10 M.

Les résultats rapportés dans la littérature, concernant l'identification de la structure cristalline des nanotubes par spectroscopie Raman divergent de la même façon que pour la DRX. Par contre, une des études les plus développées est celle de T. Gao *et al.* qui ont rapporté que ces neuf bandes correspondent à la structure orthorhombique de formule $\text{H}_2\text{Ti}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ou $\text{H}_{0.7}\text{Ti}_{1.825}\square_{0.175}\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [77]. De la même façon R. Ma *et al.* [68] ont prouvé que la structure orthorhombique lépidocrocite est la structure probable des TiONts. En tenant compte des travaux de ces deux études, des analyses élémentaires par XPS (rapport O/Ti dans le Tableau 11) ainsi que des résultats de la DRX, on peut conclure que la structure orthorhombique de formule chimique $\text{H}_2\text{Ti}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ est la structure la plus probable des TiONts synthétisés dans nos conditions expérimentales.

➤ Transformation structurale des nanotubes en nanorubans

Afin de mieux comprendre l'effet de l'agitation sur la structure, une décomposition du premier pic des diffractogrammes a été effectuée et les résultats sont présentés dans le Tableau 9 (partie II.5.1.1). Dès les temps d'agitation courts (échantillons TNT-16-5 et TNT-16-10), le premier pic est subdivisé (Figure 33). Cette subdivision n'est pas visible lors des mesures MET (Tableau 9). A partir d'une agitation de 15 min/h, l'effet de l'agitation devient plus visible et l'apparition d'un deuxième pic vers les angles les plus élevés devient plus nette pour les échantillons TNT-16-15 et TNT-16-20. Ce deuxième pic correspond à l'apparition de distances intercouches plus faibles que les distances habituelles. Ce changement au niveau des diffractogrammes suggèrent un changement structural.

La subdivision et le décalage du premier pic dans les deux échantillons TNT-16-15 et TNT-16-20 (Figure 33 et Tableau 9) peuvent être attribués à un début de transformation structurale probable de la structure orthorhombique vers une structure monoclinique de formule $\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$. En effet, le pourcentage de similarité de cette dernière avec le diffractogramme de l'échantillon TNT-16-20 est de 37% selon la base des données PDF 2003 (Figure 34-b). Un résultat similaire a été obtenu et discuté par J. Huang *et al.* qui ont considéré que la transformation morphologique des nanotubes en nanorubans est accompagnée d'une amélioration de la cristallinité et d'une modification structurale du système orthorhombique vers le système monoclinique [89].

Le changement structural est plus visible dans le spectre Raman de l'échantillon TNT-16-20 qui révèle l'apparition de deux bandes caractéristiques des nanorubans aux positions 162 et 190 cm^{-1} , comme il a été indiqué dans l'étude de V. Bellat *et al.* [21] et Y.V. Kolen'ko *et al.* [221]. La bande située à 190 cm^{-1} ne peut pas être attribuée à la phase anatase, présente sous forme de trace dans le précurseur, car la bande la plus intense, caractéristique de l'anatase (148 cm^{-1}) est absente. En résumé, d'après les résultats DRX et Raman, la transformation morphologique des nanotubes en nanorubans est probablement accompagnée par un changement structural du système orthorhombique vers le système monoclinique.

II.5.1.3. Effet de l'agitation sur les propriétés physico-chimiques des nanotubes : étude par XPS, ATG

La stabilité thermique des différents échantillons a été étudiée par analyse thermogravimétrique (ATG) de 25°C à 800°C. Les différentes pertes de masse des TiONts synthétisés en mode dynamique à différents temps d'agitation, ainsi que celles de la référence (TiONts synthétisés en 48h en mode statique) sont présentées dans le Tableau 10. Les détails des courbes ATG/DTG des TiONts de référence sont donnés Figure 36 (les autres courbes sont en annexe A3). La Figure 36 montre essentiellement deux pertes de masse : la première entre 25°C et 220°C et la deuxième entre 220 et 430°C. La perte de masse qui se produit en-dessous de 100°C n'a pas été prise en compte parce qu'elle est liée à l'eau physisorbée à la surface (humidité) [222] et ne fournit aucune information importante sur la structure et la stabilité des TiONts.

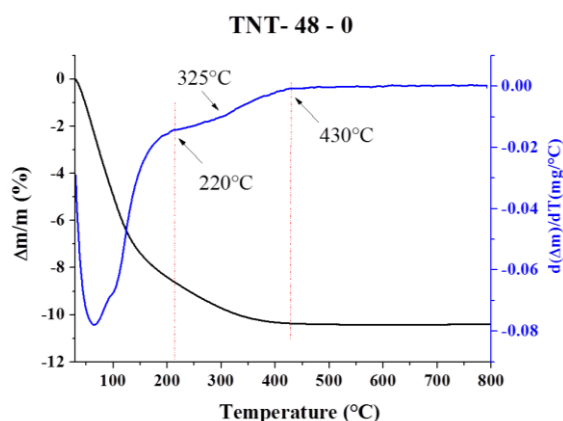


Figure 36 : Courbes ATG/DTG des nanotubes de référence TNT-48-0 montrant les intervalles de perte de masse (sous un débit d'air de 25 mL/min et à une rampe de température de 5°C/min).

Les pertes de masse des TiONts essentiellement sous forme de molécules d'eau sont obtenues soit par déshydratation ou déshydroxylation. Elles sont différenciées par leurs températures de début de phénomène. La première se produit entre 100 et 220°C, elle est rapide et peut être associée aux molécules d'eau physisorbées à la surface des nanotubes ou piégées dans leurs cavités [223, 224]. La deuxième perte se produit dans l'intervalle de températures entre 220 et 430°C et est centrée vers 325°C. Elle est lente, beaucoup moins importante que la première et peut être associée au phénomène de déshydroxylation, c'est-à-dire à la perte de groupements OH provenant des liaisons Ti-OH. Ces intervalles de perte de masse sont en accord avec ceux obtenus par D.V. Bavykin *et al.* [69] qui ont démontré, en utilisant l'ATG et la RMN MAS, que la perte de masse en dessous de 250°C est réversible alors que celle entre 250 et 450°C est irréversible.

Tableau 10 : Propriétés structurales et thermiques du précurseur et des TiONts de référence et des TiONts synthétisés à des temps d'agitation différents à 150°C et dans [NaOH]=10 M.

Échantillon	Perte de masse $\Delta m/m$ (%)			Contribution de l'OH dans le pic XPS O1s (%)	OH (XPS)/OH (TGA)
	100-220°C	220-430°C	Totale		
TiO ₂	0,07	0,07	0,14	-	-
TNT-48-0	3,9	1,9	5,8	8,3	4,4
TNT-16-0	1,3	0,6	1,9	6,2	10,3
TNT-16-5	4,5	1,9	6,4	8,4	4,5
TNT-16-10	4,3	1,9	6,2	7,9	4,2
TNT-16-15	5,6	2,3	7,9	10	4,3
TNT-16-20	5,0	2,6	7,6	11,6	4,5

Tous les résultats des analyses thermogravimétriques (ATG) sont résumés dans le Tableau 10. L'échantillon TNT-16-0 présente la perte de masse la plus faible parmi tous les échantillons puisqu'il contient une grande quantité du précurseur. Pour cette raison, il n'a pas été pris en compte dans le reste de ce paragraphe. La perte de masse totale pour le reste des échantillons est d'environ 7%, à l'exception de TNT-48-0 qui a une perte de 5,8%. La faible perte de masse de la référence, au-delà de 200°C, est vraisemblablement due à une teneur

importante en Na, d'après les analyses XPS du Tableau 11, ainsi moins d'hydrogène sont présents dans la structure pour la formation de molécules d'eau par déshydroxylation [103]. Cette grande teneur en sodium, par rapport aux TiONts synthétisés en mode dynamique, peut être due à l'état aggloméré de l'échantillon après un long temps de THT en mode statique. En fait, l'agglomération de l'échantillon limite l'incorporation de l'eau lors de l'étape de lavage, ce qui diminue, par conséquent, l'efficacité des échanges Na^+/H^+ au sein de l'échantillon. Il faut noter que les TiONts contenant un pourcentage élevé en sodium dégagent plus de molécules d'eau à des températures faibles ($<150^\circ\text{C}$). Ceci est dû à la solvation de l'ion Na^+ qui conduit à plus de perte de masse [79]. Les échantillons TNT-16-5 et TNT-16-10 présentent les pertes de masse les plus proches de la référence, ce qui est compatible avec les images MET (rendement élevé en TiONts). Cependant, les échantillons contenant un grand nombre de nanorubans (TNT-16-15 et TNT-16-20) présentent une plus grande quantité d'eau physisorbée et chimisorbée. Ce résultat est en bon accord avec l'étude de Y. Lan *et al.* [105] qui ont rapporté que l'interaction des molécules d'eau avec les octaèdres TiO_6 est plus forte dans les nanorubans qu'avec les nanotubes.

Afin de mieux illustrer l'effet de l'agitation sur la chimie de surface, des analyses élémentaires de surface par XPS ont été effectuées pour tous les échantillons étudiés précédemment. L'XPS est une technique d'analyse qui n'a pas été très utilisée pour caractériser les TiONts dans la littérature [21, 74]. Une décomposition du pic de l'oxygène O1s a été effectuée pour tous les échantillons synthétisés à des temps d'agitation différents. Ce pic est composé de deux contributions : la contribution principale est attribuée à la liaison Ti-O dans Ti-O-Ti (530,2-530,3 eV), l'autre contribution est associée à la liaison O-H dans Ti-OH (531,5-532,0 eV) [12] (Figure 37).

Le rapport $\text{OH}_{\text{XPS}}/\text{OH}_{\text{ATG}}$ entre le nombre des OH calculé par XPS et celui estimé par ATG (Tableau 10) est constant pour tous les échantillons (environ 4,3) à l'exception de l'échantillon TNT-16-0 où le rapport est égal à 10,3 (le nombre des OH calculé par ATG est déterminé en utilisant la Formule (1)). Ce rapport élevé signifie que le nombre des groupements OH de structure mesuré par XPS est beaucoup plus important que celui calculé par ATG. Cette valeur aberrante peut être expliquée par le fait que cet échantillon présente une quantité importante du précurseur qui reste dans l'échantillon TNT-16-0 après la synthèse. En fait, après un THT qui dure 16 h, la chimie de surface des particules de TiO_2 change par une attaque basique de la solution de NaOH fortement concentrée. Dans ces conditions, la surface des particules se trouve « corrodée » et par conséquent un grand nombre de OH peut se trouver à la surface [225]. En outre, l'XPS est une technique de surface (profondeur d'analyse de l'ordre de 5 nm) et ne va donc sonder, dans le cas de l'échantillon TNT-16-0, que la surface des grains de taille de l'ordre de 250 nm, la quantité des groupements OH détectée par XPS est par conséquent surestimée par rapport à la quantité mesurée par ATG.

$$\text{Nombre de OH calculés par ATG}(\text{OH}/\text{nm}^2) = \frac{2 \times \Delta m \times N_A}{18 \times 5 \times 10^{18}} \quad \text{Formule (1)}$$

Δm : la perte de masse en (%) entre 220°C et 430°C

N_A : le nombre d'Avogadro 6.022×10^{23}

18 : la masse molaire de l'eau g/mol (perte sous forme de molécule d'eau)

Le facteur (2) correspond au nombre d'hydroxyles engagés pour former une molécule d'eau

$S \times 10^{18}$: la surface spécifique des TiONts exprimée en (nm²/g)

La constance du rapport OH_{XPS}/OH_{ATG} d'un échantillon à un autre prouve qu'il s'agit du même type des groupements hydroxyles mesuré par les deux techniques et qu'il s'agit bien d'OH de structure. La Figure 37 rassemble les différents spectres XPS des pics O1s de tous les échantillons avec leurs désomptions. Cette figure montre un déplacement faible de l'énergie de liaison des OH vers les plus grandes valeurs à 20 min/h d'agitation. Ce résultat prouve que les groupements hydroxyles de l'échantillon TNT-16-20 sont liés plus fortement aux octaèdres TiO₆. L'analyse ATG de cet échantillon est en accord avec ce dernier résultat puisque la deuxième perte de masse de l'échantillon TNT-16-20 commence à une température plus élevée (250°C au lieu de 220°C) par rapport aux autres échantillons (annexeA3).

Tableau 11 : Analyses élémentaires par XPS des différents échantillons synthétisés en mode dynamique à 150°C et dans [NaOH]=10 M (en pourcentage atomique).

Eléments (%)	C 1s	O1s	Na KLL	Cl2p	Ti2p
TNT-48 - 0	5,6	62,7	5,1	0,4	26,2
TNT-16 - 0	1,8	69,5	1,0	0	27,7
TNT-16 - 5	6,5	65,8	1,7	0,1	25,9
TNT-16 - 10	2,4	69,2	0,6	0	27,8
TNT-16 - 15	3,0	69,1	0,3	0	27,6
TNT-16 - 20	8,8	63,4	1,7	0,7	25,4

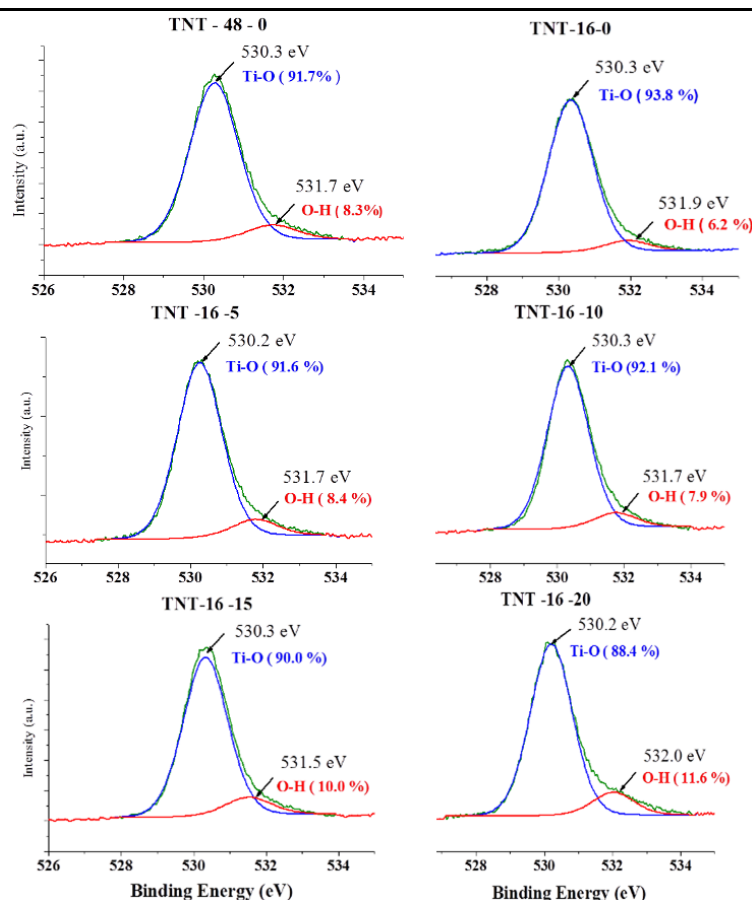


Figure 37 : Désommission des spectres XPS de l'oxygène O1s des TiONts de référence et des TiONts synthétisés à 150°C pendant 16 h et pour différents temps d'agitation qui varient de 0 à 20 min/h. [NaOH]=10 M.

II.5.1.4. Explication du mécanisme de formation des nanorubans

Selon les résultats obtenus dans les trois parties précédentes (II.5.1.1, II.5.1.2 et II.5.1.3) et en se basant sur les travaux antérieurs, deux mécanismes peuvent être proposés pour expliquer la formation des nanorubans : elle résulterait soit d'un assemblage des nanotubes de titanate, soit d'une croissance non-contrôlée des nanofeuillets [40]. Le premier mécanisme est illustré dans les images MET de la Figure 31o et Figure 31r qui montrent des TiONts qui partagent les mêmes couches extérieures. Ce phénomène qui est dû à un rassemblement des nanotubes conduit à la diminution de leur distance intercouches et de leurs diamètres extérieurs (Tableau 9). La théorie du rassemblement des tubes a également été défendue dans la littérature par X. Li *et al.* [118] qui ont rapporté que l'agitation conduit à l'auto-assemblage des TiONts. Les TiONts assemblés se convertissent en nanorubans plus longs par recristallisation. Pas très loin de ce qui a été décrit dans l'étude de X. Li, E. Horvath *et al.* [117] ont également supposé que les TiONts se regroupent en faisceaux par des liaisons orientées pour former au début des nanorubans qui se convertissent après en d'autres nanostructures plus dures. Ce mécanisme est alors gouverné par la thermodynamique, la conversion des nanotubes de même orientation en nanorubans, réduisant l'enthalpie libre de surface [117].

D'après les images MET de la Figure 31m,p,q, la taille des nanorubans augmente avec la durée de l'agitation appliquée durant la synthèse pour atteindre une taille maximale à 20 min/h (quelques micromètres de longueur). Ce résultat peut être expliqué de deux façons différentes. La première implique que l'agitation conduirait, tout d'abord, à l'assemblage des nanotubes pour former des nanorubans puis, à l'assemblage des nanorubans entre eux pour en former de plus grande taille. La deuxième explication repose sur le deuxième mécanisme proposé pour la formation des nanorubans, basé sur la croissance non contrôlée des nanofeuillets. En effet, ce mécanisme a été défendu par D. Bavykin *et al.* [40] qui ont indiqué que la synthèse des nanorubans nécessite des conditions de synthèse très dures (soit un THT plus long, une température élevée, l'utilisation d'un prétraitement ou une forte agitation durant la synthèse). Dans ces conditions, la vitesse de recristallisation des nanofeuillets de titanate s'accélérerait d'une façon qu'elle dépasserait la vitesse de leur enroulement. Une fois que l'épaisseur de ces nanofeuillets surpasserait une certaine limite, elles deviendraient rigides et incapable de s'enrouler pour former finalement des nanorubans. Dans le cas de notre expérience, l'utilisation d'une agitation mécanique forte accélère la cinétique de la dissolution du TiO_2 , ce qui a été prouvé par la diminution significative de la phase rutile à partir d'un temps d'agitation de 5 min/h. Plus le temps d'agitation est long (>10 min/h), plus la vitesse de cristallisation des nanofeuillets devient importante et plus les nanorubans deviennent longs.

II.5.2. Accélération de la cinétique de synthèse des nanotubes

II.5.2.1. Effet de la température sur la cinétique de la synthèse des nanotubes

Il a été noté dans le paragraphe précédent que le précurseur persiste même après 16 heures de réaction à 150°C et à n'importe quel temps d'agitation (Figure 33). Cela peut être expliqué par le fait que le TiO_2 rutile est thermostable par rapport à l'anatase [226] à cette taille

de grains. D. Morgan *et al.* [94] avaient également du précurseur rutile résiduel à la fin d'une synthèse de 32 h à 160°C.

La dissolution du TiO_2 rutile semble être l'étape cinétiquement limitante de la formation des nanotubes. Pour cette raison, K. Knauss *et al.* [227] ont choisi de l'accélérer par une augmentation de la température. Forts de ces considérations, il a été décidé d'étudier l'effet de l'augmentation de la température dans la gamme comprise entre 150°C et 180°C, tout en gardant les conditions suivantes : un temps de réaction de 8 h et un temps d'agitation de 10 min/h. Le temps de réaction a été réduit à 8 heures en raison de l'interdépendance connue entre la température et le temps de la réaction. Le choix du temps d'agitation est basé sur les conclusions tirées du paragraphe II.5.1.

La Figure 38 présente les diffractogrammes des échantillons synthétisés à quatre températures différentes: 150, 160, 170 et 180°C pour un temps de synthèse de 8 h. Cette figure montre la diminution significative de la phase rutile en fonction de l'augmentation de la température jusqu'à une disparition totale à 180°C. A cette température, une phase pure de TiONts a été synthétisée. Afin de confirmer ce résultat, des observations microscopiques et des mesures de la surface spécifique ont été réalisées (Figure 39).

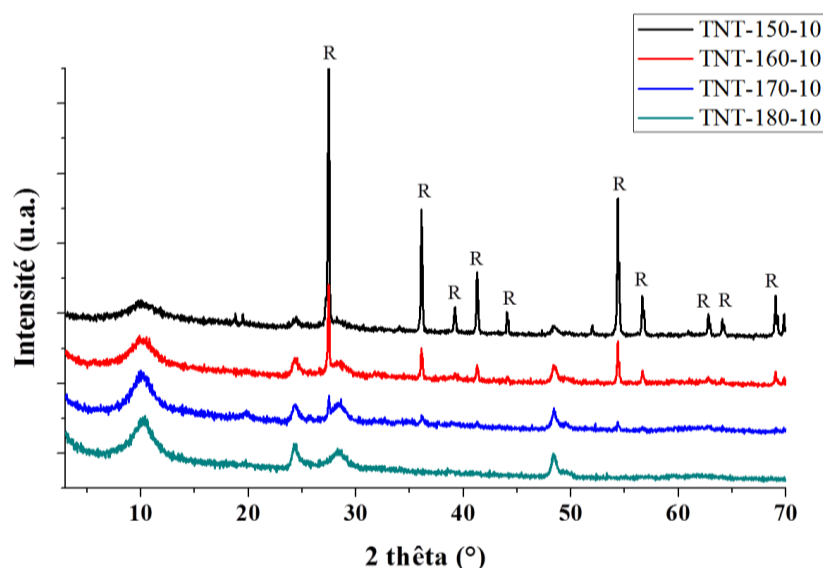


Figure 38 : Diffractogrammes des TiONts synthétisés pendant 8 heures et sous agitation à 10 min/h en fonction de la température (150, 160, 170 et 180°C), $[\text{NaOH}]=10 \text{ M}$, $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$.

La Figure 39 présente l'évolution de la surface spécifique des produits obtenus en fonction de la température, illustrée par des images MET. La surface spécifique augmente avec la température entre 150°C et 170°C où elle atteint une valeur quasi stable : $(204 \pm 2) \text{ m}^2/\text{g}$ à 170°C, $(207 \pm 2) \text{ m}^2/\text{g}$ à 180°C. Cette augmentation peut être attribuée à une augmentation du rendement de synthèse en nanotubes, en fonction de la température. Les images MET illustrent les résultats de l'analyse DRX, en révélant la présence du précurseur dans les échantillons synthétisés à des températures inférieures à 180°C. Des morphologies autres que les nanotubes sont aussi présentes dans les échantillons synthétisés à $T < 180^\circ\text{C}$, comme des nanofeuillets et des nanotubes mal formés ; alors que seuls des nanotubes bien formés et sans précurseur résiduel, sont obtenus pour l'échantillon TNT-180-0.

Les mesures des dimensions des nanotubes montrent une homogénéité dans les tailles des diamètres extérieurs et intérieurs, la distance intercouches et la longueur des tubes : $(9,6 \pm 1,6)$ nm, $(4,8 \pm 1,0)$ nm, $(0,74 \pm 0,08)$ nm et (160 ± 60) nm respectivement.

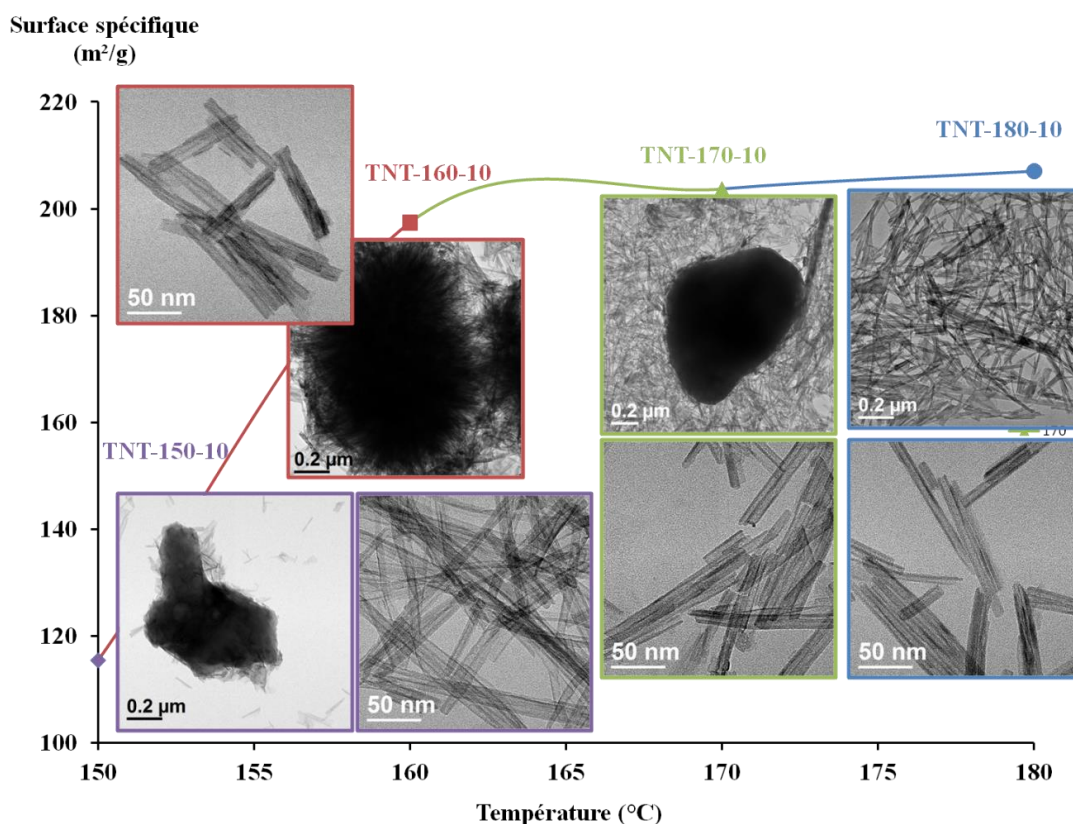


Figure 39 : Evolution de la morphologie et de la surface spécifique des TiONts en fonction de la température de la réaction, pendant 8 h de synthèse et sous une agitation à 10 min/h, [NaOH]=10 M.

Des analyses thermogravimétriques sont réalisées. La Figure 40 montre une augmentation de la perte de masse avec la température du traitement hydrothermal, à relier à l'augmentation du rendement de synthèse en TiONts et à la diminution de la teneur en TiO₂.

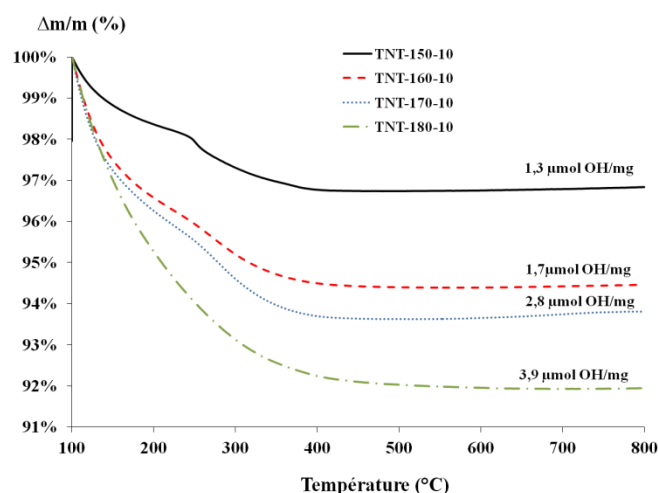


Figure 40 : Courbes ATG des TiONts synthétisés à 150, 160, 170 et 180°C, pendant 8 h avec une agitation de 10min/h et [NaOH]=10 M.

En résumé, l'augmentation de la température pendant un temps de synthèse de 8 heures n'a pas influencé la morphologie des nanotubes synthétisés et n'a pas abouti à la formation de nanorubans. D'autre part, il est clair d'après les résultats obtenus que la température est un paramètre important dans l'accélération de la synthèse des nanotubes en intervenant dans la dissolution du précurseur rutile.

Dans les deux dernières parties, il a été prouvé que l'agitation et la température sont deux paramètres importants dans la synthèse des TiONts. Les études de ces deux paramètres séparément ont abouti à une synthèse complète en TiONts au bout de 8 heures de réaction, à 180°C et sous une agitation à 10 min/h. D'un côté, l'agitation intervient pour augmenter l'échange de matière entre la surface des particules du précurseur et la solution de soude. D'un autre côté, la température accélère la dissolution du TiO_2 dans la solution de soude concentrée ($[\text{NaOH}] = 10 \text{ M}$).

II.5.2.2. Synthèse des nanotubes de titanate avec un temps réduit

Suite aux résultats précédents, une étude sur la variation du temps de la réaction a été menée dans les conditions optimales (180°C, 10 min/h) avec un temps allant de 2 à 8 heures.

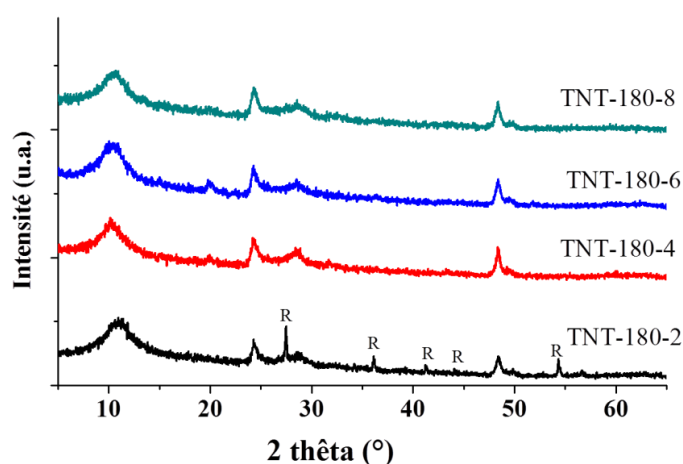


Figure 41 : DRX des TiONts synthétisés à 180°C, avec une agitation de 10 min/h, pendant 2, 4, 6 et 8 h et $[\text{NaOH}] = 10 \text{ M}$.

Les diffractogrammes obtenus pour tous les échantillons sont semblables sauf celui des TNT-180-2, synthétisés pendant 2 h, qui présente une faible quantité de rutile indiquant que la réaction n'est pas complète à ce stade (Figure 41). A partir de 4 h de réaction, le rutile disparaît totalement et ne restent que les pics de diffraction caractéristiques des TiONts. L'étude de la morphologie, Figure 42, montre la présence des nanotubes et l'absence des nanorubans. Ces résultats prouvent que la formation des nanotubes se fait très tôt, c'est-à-dire pendant les premières heures du traitement hydrothermal.

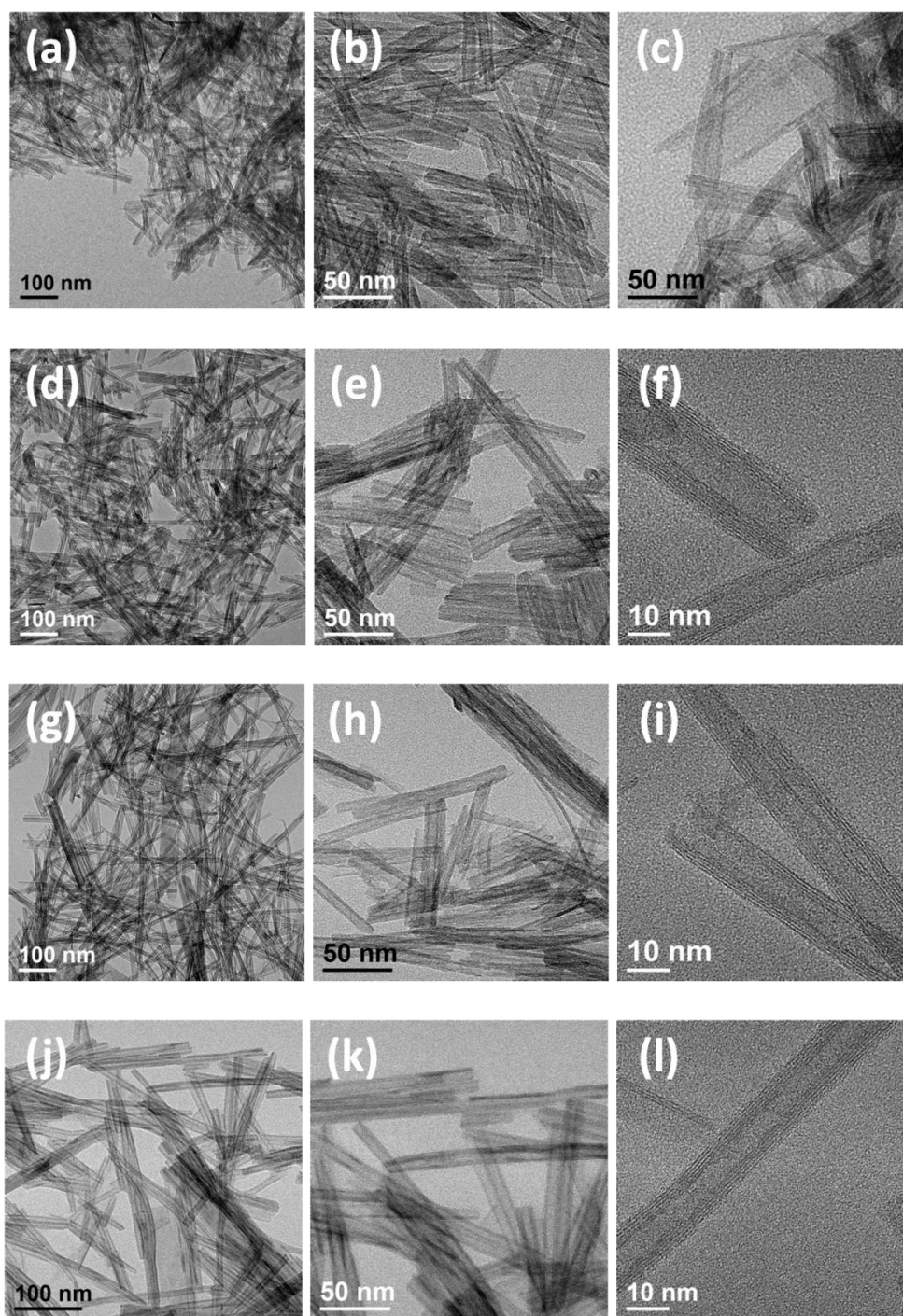


Figure 42 : Images MET des TiONts synthétisés à 180°C et sous une agitation de 10 min/h pendant (a-c) 2h, (d-f) 4h, (g-i) 6h, (j-l) 8 h, [NaOH]=10 M.

II.5.2.3. Des nanotubes de titanates formés dès la première heure de la synthèse hydrothermale : effet de l'agitation continue sur la synthèse

Afin de mieux comprendre ce qui se passe durant les premières heures de la synthèse et vérifier l'hypothèse de la formation des nanotubes en ces temps courts, une agitation en continu est appliquée pendant 30 minutes, 1 et 2 heures de synthèse. Le dispositif utilisé est toujours le réacteur agité par balancement. Les diffractogrammes sont présentés Figure 43.

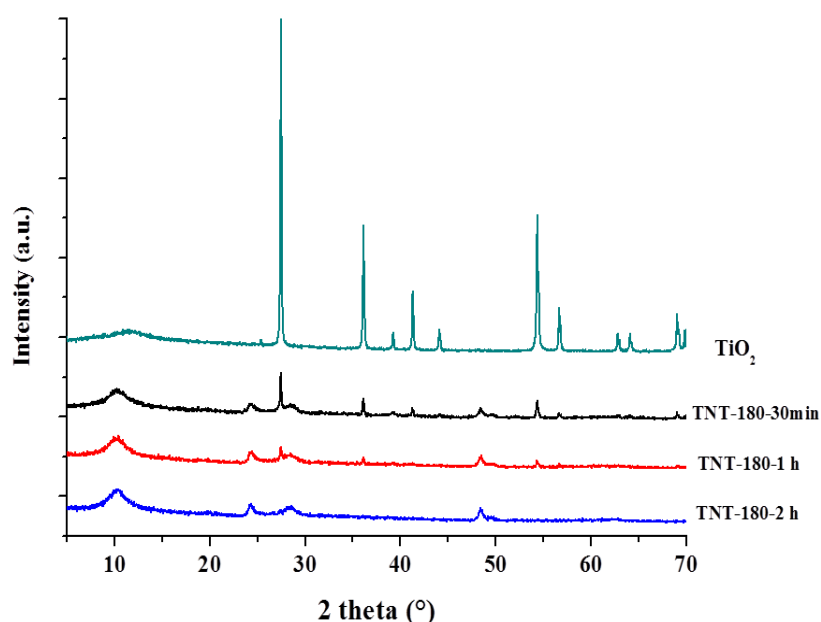


Figure 43 : DRX du TiO_2 rutile et des TiONts synthétisés sous agitation mécanique continue à 180°C et pendant 30 min, 1 h et 2 h. $[\text{NaOH}]=10\text{ M}$.

Une diminution importante de la phase du précurseur dès les 30 premières minutes du THT et une disparition totale au bout de 2 heures de synthèse sont notées. Par ailleurs, la phase des nanotubes apparait comme une phase majoritaire après 30 minutes. A notre connaissance, ce résultat n'a jamais été obtenu par aucune méthode statique ou dynamique auparavant. Il est expliqué par une accélération de la vitesse de dissolution du TiO_2 suite à l'optimisation combinée de deux paramètres expérimentaux importants que sont l'agitation en mode balancement (permise par ce réacteur) et la température [228].

Les dimensions des TiONts, présentées dans le Tableau 12, sont calculées à partir des observations au MET, de plusieurs dizaines de TiONts. Les valeurs moyennes des diamètres intérieurs des TiONts sont presque toujours les mêmes (environ 5,5 nm) quelle que soit la durée de la synthèse. Des images MET des morphologies obtenues sont présentées Figure 44. Cette figure montre la présence du précurseur dans l'échantillon TNT-180-0.5.

Tableau 12 : Caractéristiques des TiONts synthétisés en mode dynamique à 180°C , sous agitation mécanique en continu et pendant 30 min, 1 h et 2 h. $[\text{NaOH}]=10\text{ M}$.

Echantillon	D_{ext} (nm)	D_{int} (nm)	Distance intercouches (Å)	Longueur (nm)
TNT-180-0.5	$14,5 \pm 3,5$	$5,5 \pm 1,4$	$7,4 \pm 0,5$	200 ± 80
TNT-180-1	$11,0 \pm 2,1$	$5,4 \pm 1,0$	$7,1 \pm 0,9$	180 ± 65
TNT-180-2	$10,8 \pm 1,4$	$5,6 \pm 0,7$	$7,3 \pm 0,6$	138 ± 40

D'après les images MET enregistrées pour les deux échantillons TNT-180-0.5 et TNT-180-1, un grand nombre de nanotubes présentent une morphologie particulière. Cette morphologie se manifeste par un grand nombre de couches qui peut atteindre une dizaine dans certains TiONts. Ces morphologies sont montrées grâce aux images METHR (Figure 45). Ce nombre élevé de couches engendre une augmentation du diamètre extérieur des TiONts qui

atteint 18 nm dans certains cas (Figure 45). Cette valeur est plus grande que les diamètres conventionnels des TiONts qui sont généralement d'environ 10 nm. C'est la première fois que des nanotubes synthétisés par voie hydrothermale présentent un nombre de couche aussi élevé pour un temps de synthèse aussi court. Des nanotubes ayant des diamètres relativement importants ($10 \text{ nm} < \varnothing_{\text{ext}} < 20 \text{ nm}$) ont également été obtenus par A.L. Papa *et al.* [74] qui ont utilisé une agitation magnétique en continu durant la synthèse hydrothermale (150°C , 36 h). I. Lopez *et al.* [229] ont aussi synthétisé des TiONts avec de grands diamètres (15 nm) après un THT en mode statique pendant 60 h à 130°C . Il est donc clair que l'augmentation du diamètre n'est pas liée à l'utilisation de l'agitation dans ce cas. D.V. Bavykin [230] a expliqué quant à lui ce phénomène, par l'augmentation de la température de la synthèse. Dans notre cas, cette augmentation du diamètre des TiONts n'a pas été observée dans les échantillons synthétisés à 180°C avec une agitation de 10 min/h (partie II.5.2.1), donc il ne peut être la conséquence de l'augmentation de la température seulement. Néanmoins, il a été observé après l'augmentation simultanée de la température et du temps d'agitation (forte agitation mécanique en continu). Ces deux conditions simultanées permettent d'accélérer la dissolution du précurseur et par conséquent la cinétique de formation des nanotubes. Ainsi, le phénomène de formation des TiONts à grand nombre de couches peut être associé à l'accélération de la cinétique de la synthèse suite à l'utilisation d'une forte agitation mécanique à température relativement élevée.

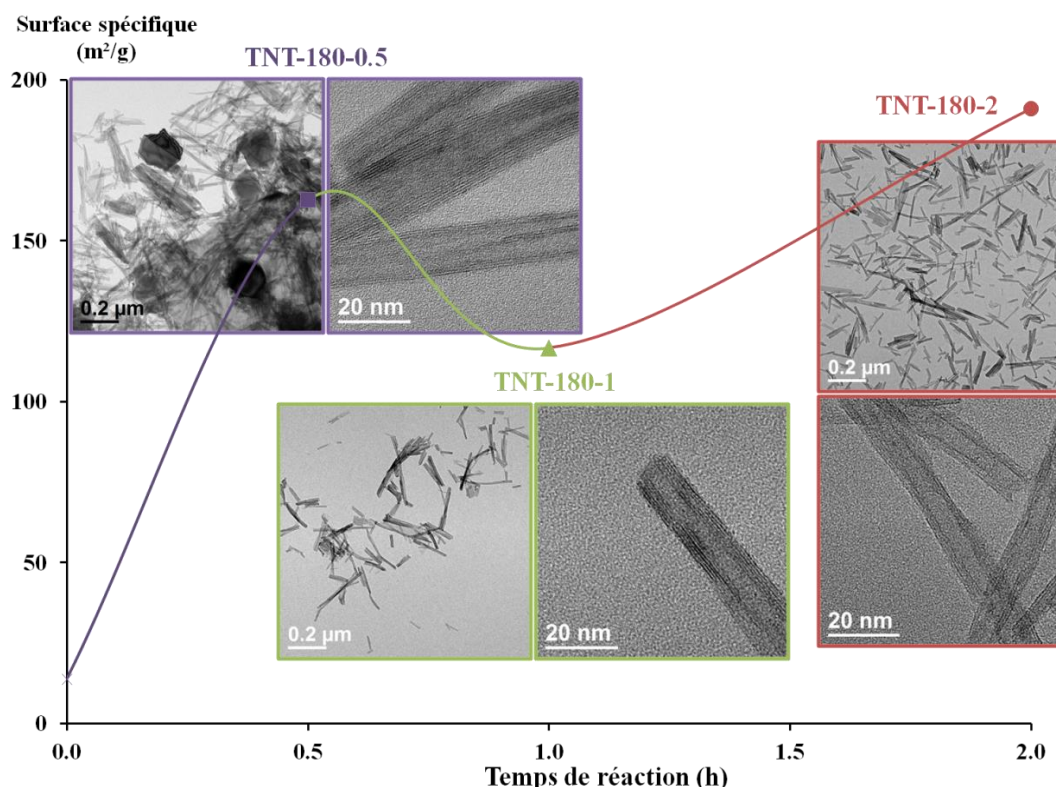


Figure 44 : Evolution de la surface spécifique et de la morphologie des TiONts en fonction du temps (30 min, 1 et 2 h) de la réaction pour des synthèses en agitation continue à 180°C et $[\text{NaOH}] = 10 \text{ M}$.

Contrairement à ce qui a été observé pour les diamètres, la longueur des TiONts a subi une diminution après deux heures de synthèse comme le montre le Tableau 12 pour l'échantillon TNT-180-2. Cela peut être expliqué comme suit : au début de la synthèse, la

formation des nanofeuillets se produit par un processus de délamination des particules du rutile ou par recristallisation conduisant à la formation des nanotubes. Après une heure d'agitation mécanique en continu, ces nanofeuillets sont divisés ou cassés en plus petits morceaux ce qui entraîne l'apparition de nanotubes plus courts pendant la phase d'enroulement (Figure 45-c). Le phénomène de cassure des nanotubes par une forte agitation a également été rapporté par B. Santara *et al.* [115]. Cependant, le diamètre intérieur et la distance intercouches ne sont pas changés et gardent les valeurs standard de environ 5,5 nm et 7,3 Å respectivement.

La surface spécifique atteint environ 200 m²/g (Figure 44) après seulement 2 heures de traitement hydrothermal. La même valeur a été obtenue par A. Nakahira *et al.* [87] pour un temps de réaction de 96 heures et cette valeur est proche de celle obtenue pour l'échantillon TNT-180-10 (207±2) m²/g. La valeur élevée (de façon transitoire) de la S_{BET} après 30 minutes de synthèse provient probablement de la grande surface spécifique des nanofeuillets alors présents.

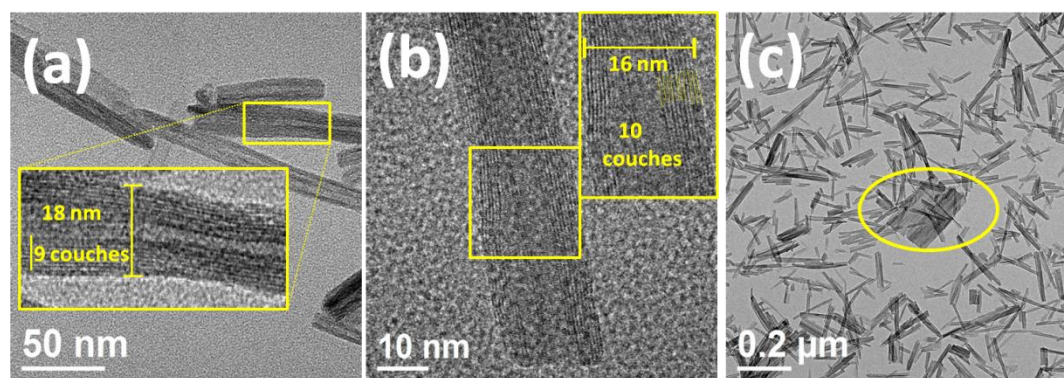


Figure 45 : Images MET et METHR de (a, b) TNT-180-0.5 (tubes avec un grand nombre de couches) (c) TNT-180-1 (présence d'un nanofeuillet de titanate court entouré par des petits TiONts).

Les spectres de la réflexion diffuse des échantillons préparés à 180°C, sous une agitation continue et du précurseur TiO₂ rutile sont présentés Figure 46. L'énergie de la bande interdite E_g est définie comme l'énergie nécessaire pour exciter un électron de la bande de valence pour passer à la bande de conduction [88]. Elle a été déterminée par la méthode de Kubelka-Munk où E_g est déterminée par l'intersection entre l'extrapolation de la partie linéaire de la courbe $(F(R) \times hv)^{1/2}$ et l'axe des énergies hv (axe des abscisses), où $F(R)=(1-R)/2R$ et R est la réflectance mesurée [220].

Les valeurs de l'énergie du gap publiées dans la littérature sont très variables, ce qui prouve que les propriétés optiques des TiONts dépendent des paramètres de synthèse. L'énergie de la bande interdite du rutile est de 3,01 eV alors que les énergies E_g des nanotubes synthétisés avec un temps réduit sont 3,24, 3,25 et 3,27 eV pour 30 minutes, 1 et 2 heures de THT respectivement. Ces valeurs sont proches de celles obtenues par R. Campesco *et al.* [88] (3,29 eV) et S. Mozia *et al.* [220] (3.28 eV) pour des temps de synthèse plus élevés (24 h et 48 h respectivement).

De façon originale, l'analyse UV-Vis est ici utilisée, pour la première fois, pour évaluer la pureté de l'échantillon obtenu. En effet, l'échantillon TNT-180-0.5 qui contient deux phases

(précurseur restant et TiONts) présente dans sa courbe deux parties linéaires. Par contre, la présence d'une phase pure de TiONts se voit très clairement pour la courbe de l'échantillon TNT-180-2 (Figure 46).

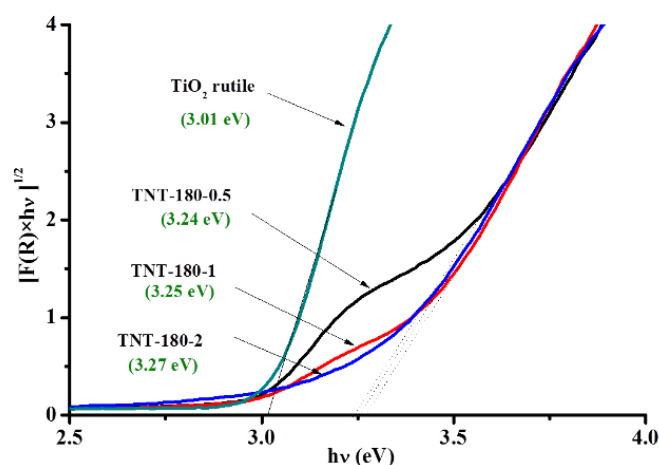


Figure 46 : Détermination de l'énergie de gap, par la méthode Kubelka-Munk, du TiO_2 rutile et des TiONts synthétisés à 180°C , sous une agitation continue et pendant 0.5, 1 et 2 h dans $[\text{NaOH}]=10 \text{ M}$.

Les spectres de diffusion Raman des échantillons sont présentés Figure 47. Les spectres illustrent les résultats obtenus précédemment concernant la présence résiduelle du précurseur pour les échantillons TNT-180-0.5 et TNT-180-1. Une phase pure de nanotubes est obtenue pour l'échantillon TNT-180-2 qui se caractérise par la présence des bandes caractéristiques des TiONts situées à 191, 275, 287, 383, 451, 666, 820 et 914 cm^{-1} [73].

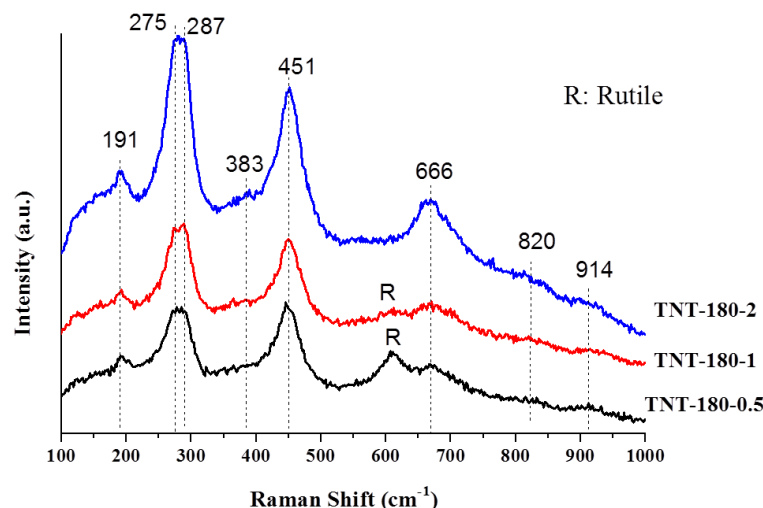


Figure 47 : Spectres Raman des TiONts synthétisés pendant 30 min, 1 h et 2 h à 180°C sous agitation continue, $[\text{NaOH}]=10 \text{ M}$.

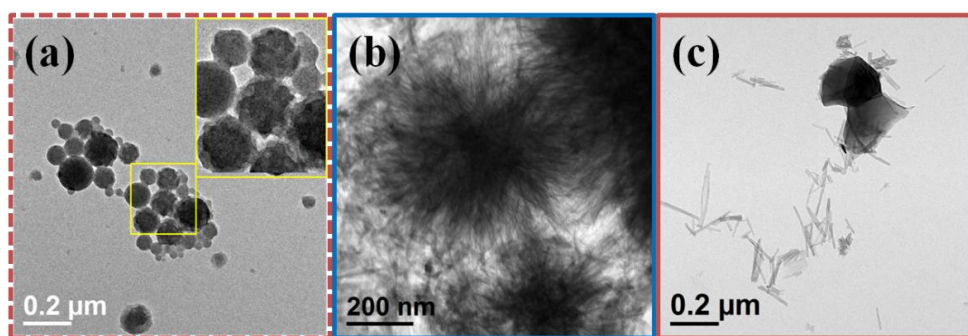
II.6. Discussion du mécanisme de formation des nanotubes de titanate pour la synthèse en mode dynamique

Comme expliqué dans le chapitre bibliographique, malgré tous les efforts dans la littérature pour expliquer le mécanisme de formation des TiONts, il reste toujours une controverse (paragraphe I.3). En tenant compte des études précédentes et des résultats obtenus dans ce manuscrit, il semble que le mécanisme soit clairement divisé en trois étapes. La première étape est la dissolution du TiO_2 ; elle est accompagnée d'un gonflement anisotrope de particules comme il a été rapporté dans les études de D.V. Bavykin *et al.* [230] et J. Yang *et al.* [231]. Ce phénomène est illustrée Figure 48a par des particules de TiO_2 ayant une surface rugueuse et qui tendent à se regrouper et se lier les unes aux autres. Cette phase n'a pas été clairement décrite dans la littérature et semble être l'étape cinétiquement limitante dans la synthèse des TiONts [94]. C'est pour cette raison que le rutile, à gros grains, nécessite une température plus élevée ou un temps de synthèse plus long par rapport à l'anatase, pour se transformer en TiONts [118]. La phase de dissolution du TiO_2 rutile (Figure 48b) est également illustrée par la présence de particules sous forme de « fleur ». Cette morphologie est obtenue à une température relativement faible (160°C) et peut être expliquée par une attaque régulière des OH^- , de la surface vers cœur de la particule, qui coupe certaine liaisons Ti-O-Ti des octaèdres TiO_6 [231]. La Figure 48c illustre une autre forme de dissolution du précurseur qui consiste en l'exfoliation des nanofeuillets de titanate à partir de particules du TiO_2 comme il a été décrit dans la littérature [76, 87]. Ce phénomène est observé à des températures élevées (180°C) puisqu'elles fournissent une force motrice plus importante pour le processus d'exfoliation. Les deux mécanismes en concurrence dans la littérature pourraient au final dépendre des paramètres de la synthèse et en particulier de la température. Dans cette étude, l'étape de dissolution du précurseur est accélérée grâce à l'utilisation d'une agitation continue et d'une température élevée (180°C). L'agitation augmente la vitesse de diffusion des réactifs qui entrent en contact plus rapidement et la température augmente quant à elle la constante cinétique de la réaction.

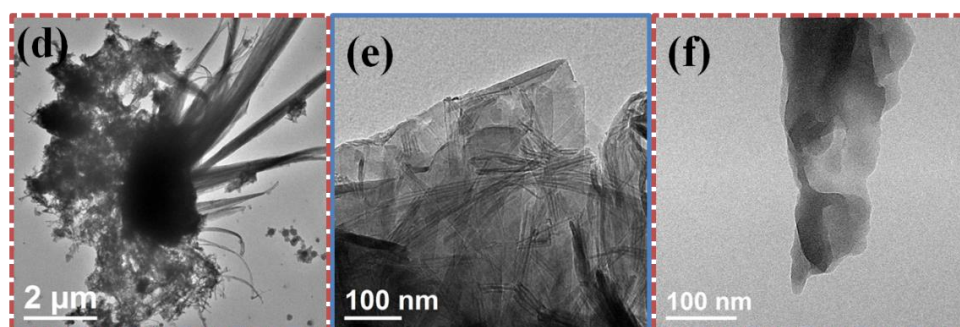
La deuxième étape du mécanisme de synthèse est la recristallisation et la croissance de nanofeuillets de titanate (Figure 48d-f). En effet, il existe plusieurs façons de former des nanofeuillets. Selon, A. Kukovecz *et al.* [83], la formation des TiONts se fait par une croissance orientée des blocs de TiO_6 , comme le présente la Figure 48d qui montre une croissance orientée des nanofeuillets obtenus, après 30 minutes du THT ici sans aucun lavage eau ou acide. Cependant, S. Zhang *et al.* [120] ont rapporté que la recristallisation des feuillets se produit après la formation d'une phase désordonnée (Figure 48-f). B. Yao *et al.* [93] défendent une formation des TiONts par exfoliation des particules de TiO_2 par rupture des liaisons Ti-O-Ti conduisant à la formation de liaisons pendantes de Ti-O^- (Figure 48c,e).

La troisième étape du mécanisme de formation des TiONts est l'enroulement des feuillets de titanate. Cette étape est illustrée par des images MET dans les Figure 48g-i avec différents types d'enroulement. Dans la littérature, une partie des études explique cet enroulement par l'asymétrie de l'environnement des deux côtés du nanofeuillet de titanate durant la synthèse hydrothermale [120, 230]. Le deuxième groupe d'études a établi que le phénomène de l'enroulement se fait sous l'effet du lavage eau/acide [73, 232]. Cette dernière hypothèse semble

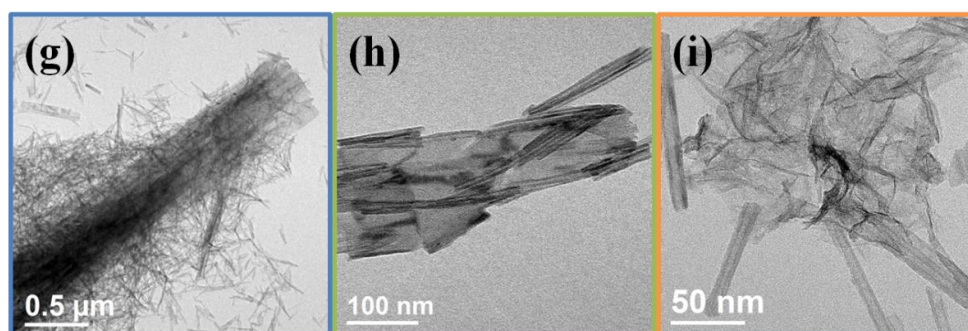
la plus plausible dans nos conditions de synthèse. En effet, après un THT dans une solution très basique, les nanofeuillets se trouvent chargés négativement des deux côtés ce qui induit une répulsion électrostatique. Une fois lavés avec de l'eau et/ou acide, les ions Na^+ sont enlevés par un échange avec les protons et un grand nombre de groupements hydroxyles (Ti-OH) se crée. Ainsi, les nanofeuillets s'enroulent par formation des liaisons hydrogènes pendant le lavage. Les observations microscopiques de l'échantillon TNT-180-0.5 qui n'a pas subi un lavage eau/acide montrent une absence totale de nanotube ce qui confirme cette hypothèse (Figure 48a,d,f).



Etape 1. La dissolution du TiO_2 .



Etape 2. Recrystallisation et croissance des nanofeuillets de titanate : différents mécanismes.



Etape 3. Formation des nanotubes : phénomène d'enroulement des nanofeuillets.

Figure 48 : Illustration par images MET du mécanisme de formation des TiONt s (a, d, f) TNT-180-0.5 ($T=180^\circ\text{C}$, $t=30$ min, agitation continue) sans lavage eau/acide; (c) TNT-180-0.5 avec lavage acide (b, e, g) TNT-160-10 ($T=160^\circ\text{C}$, $t=8$ h, agitation=10 min/h) avec lavage acide; (i) TNT-180-1 ($T=180^\circ\text{C}$, $t=1$ h, agitation continue) avec lavage acide; (h) TNT-180-2 ($T=180^\circ\text{C}$, $t=2$ h, agitation=10min/h) avec lavage acide.

II.7. Effet du changement des conditions expérimentales sur les propriétés des nanotubes : comparaison entre trois lots de synthèses différentes

Les nanotubes de titanate sont des matériaux très sensibles aux variations des conditions expérimentales et leurs caractéristiques changent d'une synthèse à une autre. Une illustration de cette constatation est ici présentée. En effet, une étude comparative entre trois lots de TiONts synthétisés par trois méthodes de synthèses différentes est menée. Ces trois lots sont réalisés dans les deux laboratoires : URCMA (Tunis) et ICB (Dijon). Deux synthèses sont réalisées en mode dynamique mais avec deux réacteurs différents, selon les protocoles décrits dans la partie (II.2) et une synthèse est réalisée en mode statique. Les échantillons sont identifiés par leurs lieux de synthèse c'est-à-dire (CMA et ICB) et synthétisés dans les conditions de synthèse optimales. Une comparaison entre les différentes conditions expérimentales est présentée dans le Tableau 13. Le lot TNT-155-dyn-36-ICB est réalisé dans le cadre de la thèse d'Alexis Loiseau (thèse qui sera soutenue le 15/11/17 à Dijon).

Tableau 13: Les conditions expérimentales des synthèses des trois lots de TiONts, dits optimaux.

Conditions expérimentale	TNT-150-stat-48-CMA	TNT-180-dyn-2-CMA	TNT-155-dyn-36-ICB
Laboratoire	URCMA	URCMA	ICB
Prétraitement	Ø	Ø	15 min par canne à ultrasons
Température (°C)	150	180	155
Type d'agitation	Statique	Agitation mécanique continue par balancement	Agitation continue par tige à palettes tournantes (120 tr/min)
Précurseur	Rutile ($\phi = 245$ nm)	Rutile ($\phi = 245$ nm)	Rutile ($\phi = 175$ nm)
[NaOH] (M)	10 M	10 M	10 M
Temps (h)	48	2	36
Lavage	Eau/acide (HCl 0,1 M)	Eau/acide (HCl 0,1 M)	Eau
Type de lavage	Par décantation	Par décantation	Centrifugation-dialyse-ultrafiltration
Mode de séchage	Température	Température	Lyophilisation

II.7.1. Etude morphologique des différents lots

L'étude morphologique des trois lots n'a pas abouti à une grande différence entre eux (Figure 49). Cependant, la présence d'un certain nombre de nanorubans est observée pour l'échantillon TNT-155-dyn-36-ICB. Ce résultat se confirme par une surface spécifique moins importante pour cet échantillon (Tableau 14). Les dimensions des TiONts sont très semblables du point de vue des diamètres externe et interne, par contre, les nanotubes de l'échantillon TNT-

180-2-CMA sont moins longs, par rapport aux deux autres synthèses (Tableau 14). Ce résultat a été attribué à l'utilisation d'une forte agitation mécanique qui implique la synthèse de nanofeuillets de titanate plus petits et par conséquent des TiONts moins longs (paragraphe II.5.2.3).

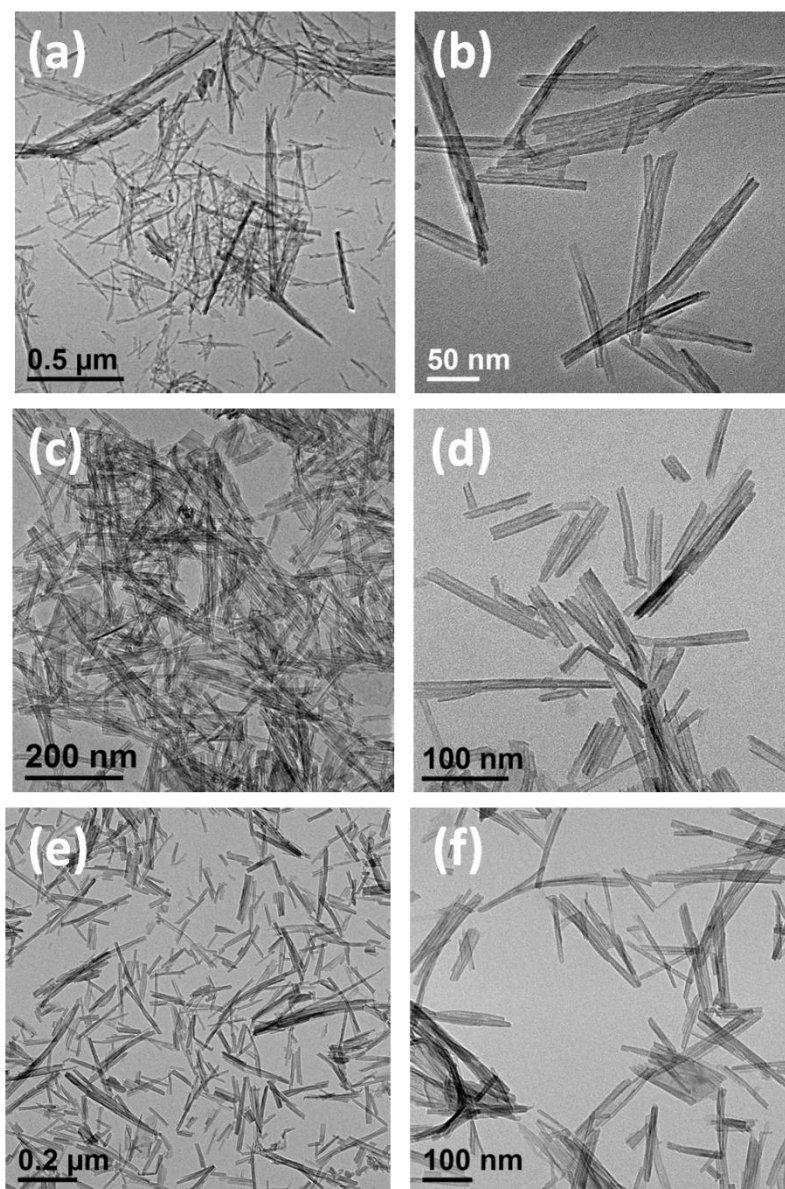


Figure 49 : Images MET des trois lots de TiONts (a, b) TNT-155-dyn-36-ICB, (c, d) TNT-150-stat-48-CMA et (e, f) TNT-180-stat-2-CMA.

Tableau 14 : Comparaison entre les caractéristiques des trois lots de TiONts dits optimaux.

Echantillon	D_{ext} (nm)	D_{int} (nm)	Longueur (nm)	S_{BET} (m ² /g)
TNT-155-dyn-36-ICB	$10,0 \pm 1,0$	$4,0 \pm 1,0$	170 ± 50	174 ± 2
TNT-150-stat-48-CMA	$9,5 \pm 0,6$	$4,8 \pm 0,4$	195 ± 45	238 ± 2
TNT-180-dyn-2-CMA	$10,8 \pm 1,4$	$5,6 \pm 0,7$	138 ± 40	195 ± 6

II.7.2. Comparaison entre les propriétés physico-chimiques des trois lots de TiONts, dits optimaux : ATG et XPS

L'analyse élémentaire par XPS des trois lots montre que l'échantillon TNT-155-dyn-36-ICB présente la teneur en sodium la plus élevée. Ce pourcentage en sodium est expliqué par le fait que ce lot ne subit pas de lavage acide comme les deux autres (Tableau 15). D'un autre côté, la composition chimique des deux échantillons synthétisés à l'URCMA est très semblable (rapport Na/Ti et O/Ti du Tableau 15). La désomation des spectres XPS de l'oxygène montre que la contribution des groupements hydroxyles pour l'échantillon TNT-155-dyn-ICB est plus importante malgré sa grande teneur en sodium (Figure 50).

Tableau 15 : Analyse élémentaire par XPS en pourcentage atomique (%) des trois lots de TiONts dits optimaux.

Elément	C1s	O1s	NaKLL	Ti2p	Cl2p	Na/Ti	O/Ti
TNT-150-48-CMA	5,6	62,7	5,1	26,2	0,4	0,19	2,4
TNT-180-2-CMA	5,4	64,9	3,3	25,9	0,5	0,13	2,5
TNT-155-36-ICB	7,3	58,7	13,5	20,5	-	0,66	2,8

En analysant les courbes ATG des trois lots (Figure 51) on voit que le lot synthétisé à l'ICB présente une perte de masse plus importante après une température de 220°C (2,9 %) par rapport aux échantillons TNT-150-stat-48-CMA (1,9%) et TNT-180-dyn-2-CMA (2,3%). Ce résultat confirme celui de l'XPS et prouve que le nombre de groupements hydroxyles, obtenus par déshydroxylation des liaisons Ti-OH, est plus important pour l'échantillon synthétisé à l'ICB, malgré sa grande teneur en sodium.

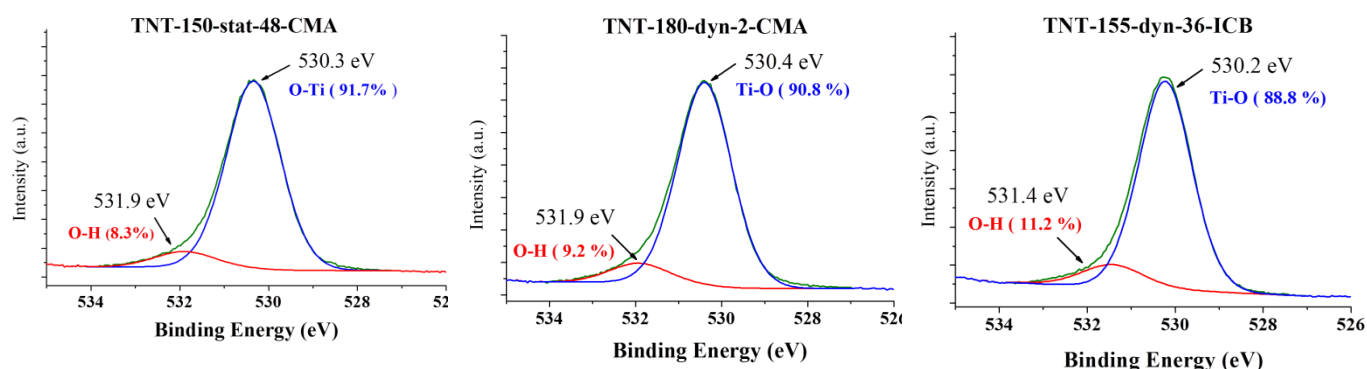


Figure 50 : Désomation des spectres XPS O1s des trois lots de TiONts dits optimaux.

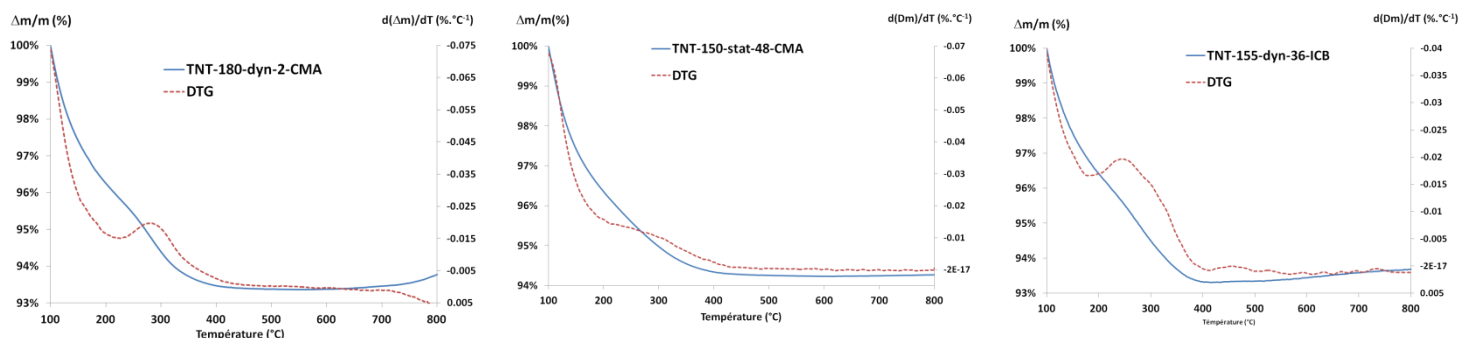


Figure 51 : Comparaison entre les courbes ATG/DTG des TiONts des trois lots dits optimaux.

II.8. Importance du lavage eau/acide dans la formation des nanotubes

Plusieurs recherches ont été consacrées à l'étude du rôle du lavage acide dans la formation des TiONts mais peu se sont intéressées à l'étude de l'importance du lavage à l'eau après le THT. Dans ce paragraphe, une discussion sur l'importance du lavage (eau ou acide) à l'issue de la synthèse hydrothermale est présentée dans la première partie. Ensuite, le rôle du lavage acide est discuté dans la deuxième partie.

II.8.1. Importance du lavage eau/acide

Afin de bien comprendre l'importance de l'étape du lavage après le THT, ici on parle du lavage soit par eau uniquement ou par eau/acide, dans le mécanisme de synthèse des nanotubes, une partie de l'échantillon TNT-180-0.5 est récupérée directement à l'issue de la synthèse hydrothermale et avant de procéder aux lavages. Des observations au MET et le spectre Raman de cet échantillon sont donnés Figure 52 et Figure 54. Plusieurs images MET prouvent l'absence quasi-totale de la morphologie conventionnelle des TiONts dans le produit obtenu. En fait, les quelques nanotubes observés sont très mal formés. On ne peut en outre exclure qu'ils soient dûs aux traces d'eau présentes au moment de la préparation de la grille MET (éthanol non absolu). D'un autre côté, le spectre Raman montre aussi l'absence des pics caractéristiques des TiONts qui sont présents dans le spectre du produit lavé (191, 175, 288, 450 et 667 cm^{-1}), Figure 52. Par contre le spectre de l'échantillon non lavé présente quatre bandes Raman fines qui apparaissent pour la première fois et sont situées à 115, 136, 166 et 1068 cm^{-1} . Ces bandes peuvent être attribuées au carbonate de sodium [233] puisque l'échantillon n'a subi aucun lavage après la synthèse hydrothermale et le milieu est très concentré en sodium (Tableau 16). Cette attribution est confirmée par les analyses élémentaires XPS et la décomposition du spectre C1s qui montre la présence des carbonates avec un pourcentage de 92,1 % (Figure 53a). De même, la spectroscopie IR illustre la présence des carbonates à travers les bandes de vibrations à 1740 cm^{-1} et 1320-1530 cm^{-1} [234].

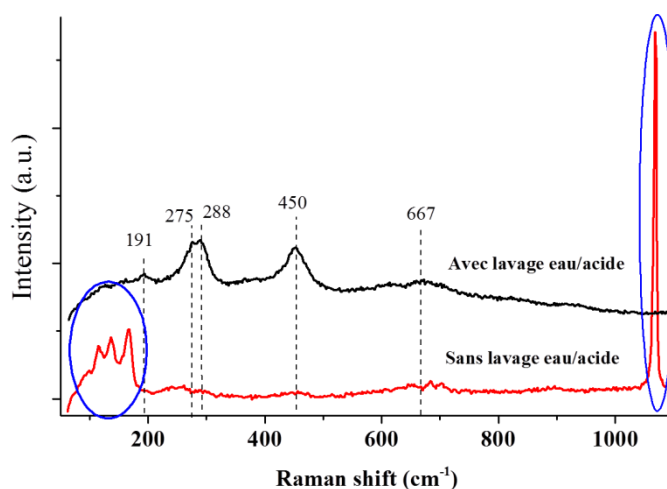
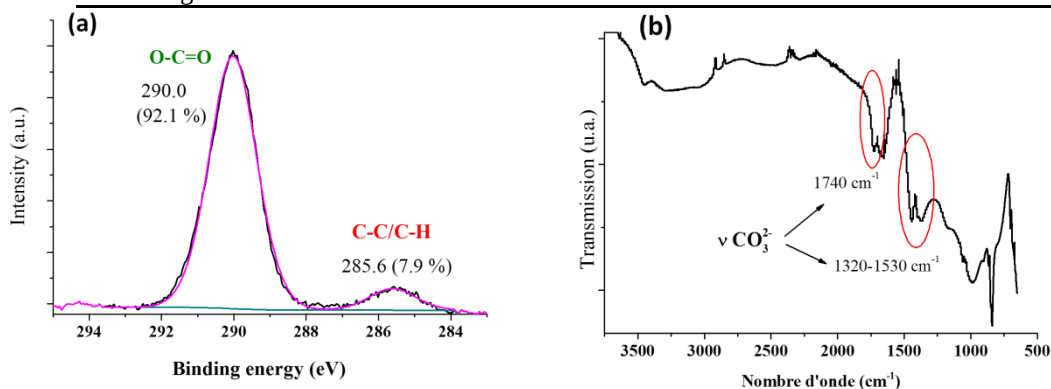


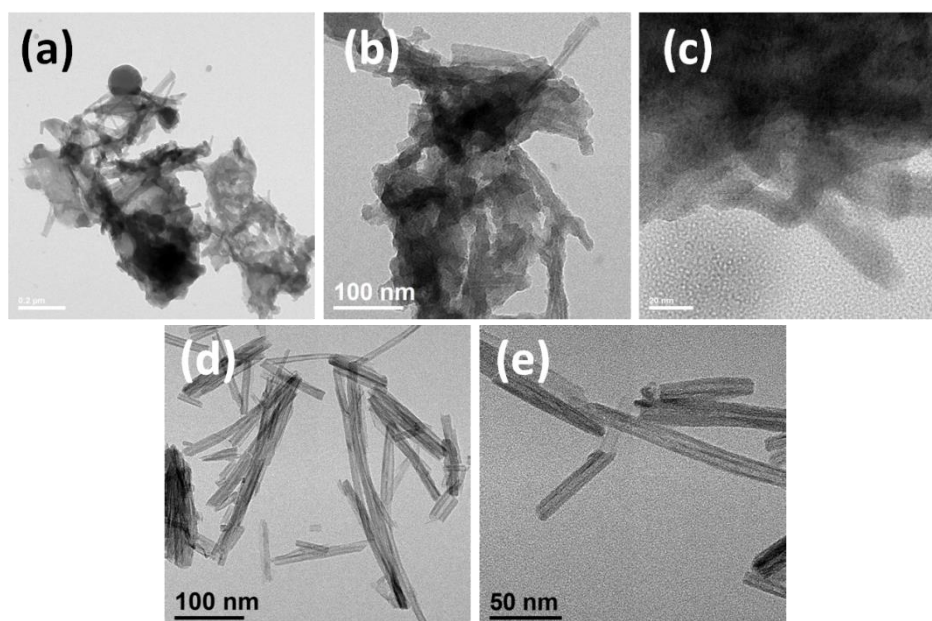
Figure 52 : Spectre Raman de l'échantillon TNT-180-0.5 sans et avec lavage eau/acide. Synthèse en mode dynamique dans $[\text{NaOH}]=10 \text{ M}$.

Tableau 16 : Analyse élémentaire en pourcentage atomique (%) de TNT-180-0.5 sans lavage eau/acide. Synthèse en mode dynamique dans [NaOH]=10 M.

Elément	C1s	O1s	NaKLL	Ti2p	Si2p
TNT-180-0.5-sans lavage eau/acide	14,1	43,9	38,2	3,0	0,8

**Figure 53 : (a) Désommission du spectre XPS C1s et (b) spectre IR des TNT-180-0.5 sans lavage eau/acide. Synthèse en mode dynamique dans [NaOH]=10 M.**

Les images MET du même échantillon (TNT-180-0.5) mais cette fois avec un lavage eau/acide (lavage à l'eau distillée plusieurs fois jusqu'à pH neutre suivis d'un lavage acide avec HCl 0,1 M jusqu'à pH 2-3 et enfin à nouveau un lavage à l'eau jusqu'à pH neutre) montrent une présence abondante de nanotubes bien formés avec leur structure multicouche conventionnelle. Cela permet de conclure que la formation des nanotubes se fait après le lavage eau/acide et même si elle commence durant la synthèse hydrothermale, elle conduit à des nanotubes malformés et avec une morphologie mal définie. Ce résultat était aussi défendu par X. Sun *et al.* [232] qui n'ont pas observé la morphologie tubulaire avant le processus de lavage.

**Figure 54 : Images MET de l'échantillon TNT-180-0.5 (a, b, c) récupéré directement après la synthèse hydrothermale ([NaOH]=10 M) sans aucun lavage eau/acide (la grille MET a été préparée dans l'éthanol) et (d, e) après un lavage eau/acide.**

La conclusion précédente concerne le lavage conjugué avec de l'eau puis de l'acide. Il est important de savoir quel est le rôle du lavage acide, par lui-même, dans la procédure de lavage et son effet sur la morphologie des nanotubes.

II.8.2. Importance du lavage acide

Après la synthèse hydrothermale, le précipité obtenu subit un premier type de lavage avec de l'eau distillée, plusieurs fois par décantation, pour éliminer l'excès de soude en solution jusqu'à pH 7-8. Une partie de la poudre est récupérée à ce stade et analysée (poudre "lavage à l'eau").

Ensuite, un deuxième type de lavage est mis en œuvre, le pH de la suspension est ajusté à 2-3 avec une solution HCl 0,1 M pendant 3 heures sous agitation magnétique (250 rpm). Il faut noter que durant l'ajout de l'acide, le pH de la suspension descend instantanément puis il remonte lentement. Ce phénomène prouve que les ions H^+ en solution sont consommés par la poudre. Ainsi, l'ajout de l'acide continue jusqu'à avoir un pH constant. Enfin, la poudre est relavée avec de l'eau pour éliminer l'excès de HCl et remonter le pH à 6-7. Cet échantillon est appelé poudre "lavage eau/acide".

II.8.2.1. Effet du lavage acide sur la chimie des TiONts

Le premier effet, clairement visible, du lavage acide par rapport au lavage avec de l'eau seulement se manifeste dans le diffractogramme (Figure 55). En effet, le lavage acide engendre un décalage du premier pic de diffraction vers des angles plus élevés, ce qui correspond à de plus petites distances interréticulaires qui sont dans ce cas les distances intercouches. Ce décalage est dû à l'échange entre les ions Na^+ et H^+ durant le lavage (Tableau 17). En effet, les ions sodium sont plus gros par rapport aux ions H^+ , aussi leur élimination réduit la distance entre les couches des TiONts. La Figure 55 montre aussi une diminution des intensités des deux pics à $2\theta \approx 10^\circ$ et $2\theta \approx 28^\circ$ et cela pour tous les échantillons qui ont subi un lavage acide. Ce phénomène a été discuté dans la littérature et avait déjà été mis en évidence dans les travaux de thèse de A.L. Papa [149]. Ces deux pics ont été associés aux plans cristallins contenant le sodium [73].

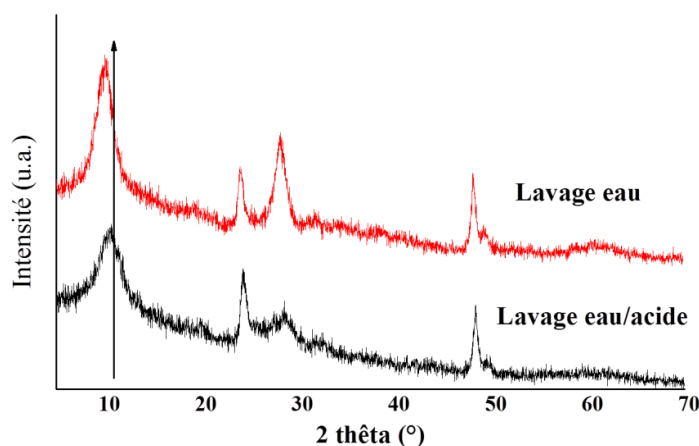


Figure 55 : Effet du lavage acide sur le diffractogramme des TiONts. Cas de l'échantillon TNT-180-8 obtenu avec une agitation de 10 min/h. $[NaOH] = 10M$.

L'efficacité de l'échange ionique entre les ions Na^+ et H^+ lors du lavage acide est illustré par l'analyse élémentaire de l'échantillon TNT-180-8 sans et avec lavage acide. Cette efficacité est témoignée par la diminution du pourcentage élémentaire en sodium de 10,7 à 2,6 % (Tableau 17).

Tableau 17 : Analyse élémentaire par XPS en pourcentage atomique (%) de l'échantillon TNT-180-8 ($T=180^\circ\text{C}$, $t=8\text{h}$, 10 min/h d'agitation et $[\text{NaOH}]=10\text{M}$) sans et avec lavage acide.

Elément	C1s	O1s	NaKLL	Ti2p	Cl2p	Na/Ti
TNT-180-8-lavage eau seulement	3,8	61,5	10,7	24,0	-	0,44
TNT-180-8 avec lavage eau/acide	1,8	68,1	2,6	27,0	0,5	0,09

II.8.2.2. Effet du lavage acide sur la morphologie des TiONts

La Figure 56 illustre l'effet du lavage acide sur la morphologie des nanotubes avec deux cas de figure différents. Le premier cas (Figure 56a,b) montre l'intervention du lavage acide dans la transformation des nanofeuillets en nanotubes. Le deuxième cas (Figure 56c,d) montre l'effet du lavage acide dans la transformation des nanorubans en nanotubes. Il est ainsi possible d'observer le détachement apparent des nanotubes, des nanorubans. Ce phénomène a aussi été observé par A.L. Papa *et al.* [74] qui ont rapporté que le lavage acide transforme les nanorubans en nanotubes si le précurseur utilisé est le TiO_2 rutile.

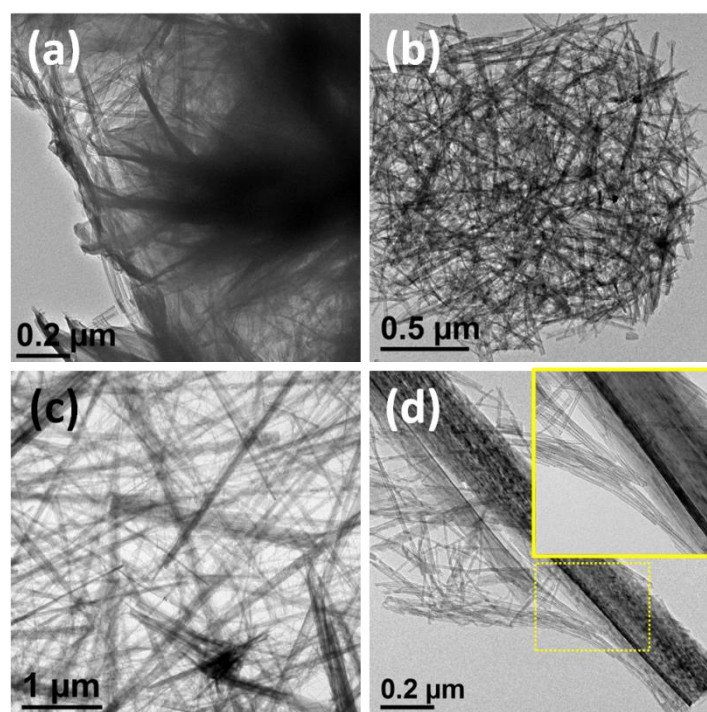


Figure 56 : Images MET des TNT-180-2 ($T=180^\circ\text{C}$, $t=2\text{h}$, agitation=10 min/h) (a) avec lavage eau, (b) après lavage eau/acide et des TNT-160-10 ($T=160^\circ\text{C}$, $t=8\text{h}$, agitation=10min/h) (c) avec lavage eau et (d) après le lavage eau/acide. $[\text{NaOH}] = 10\text{M}$ lors des deux synthèses.

En conclusion, le lavage à l'eau est une étape cruciale pour la formation des nanotubes et le lavage acide améliore l'efficacité de ce processus, ce qui conduit à améliorer le rendement de la synthèse des TiONts et assure l'obtention d'une morphologie mieux contrôlée des tubes.

II.9. Résultats majeurs et conclusions

L'optimisation des paramètres expérimentaux de la synthèse hydrothermale des nanotubes de titanate en mode statique, à partir de précurseur TiO_2 rutil, a abouti à un temps de réaction de 48 h, à une température de 150°C et une concentration de NaOH de 10 M. Un paramètre influençant la synthèse a été discuté pour la première fois : la taille de l'autoclave ou plutôt la surface de contact entre la poudre précurseur et la solution de soude concentrée. En fait, une surface de contact plus grande (grand autoclave couché) a permis, dans nos conditions, de réduire le temps de synthèse de moitié (de 96 à 48 h).

L'originalité principale de ce chapitre concerne la synthèse hydrothermale en mode dynamique. Ce mode de synthèse a été assuré par un réacteur hydrothermal qui fournit une agitation mécanique forte par balancement. L'utilisation d'un tel réacteur pour la synthèse des TiONts est une première. L'étude de la variation du temps d'agitation de 0 à 20 min/h a conduit à conclure qu'une longue agitation (> 10 min/h), pendant un temps relativement long (16 h), favorise la formation des nanorubans. Ces derniers se développent selon deux mécanismes possibles : soit par rassemblement et compaction des nanotubes sous l'effet de conditions « dures » de synthèse, soit par une croissance excessive et non contrôlée des nanofeuillets de titanate.

L'étude de la structure cristalline des nanotubes, associée à des analyses chimiques élémentaires par XPS, a montré que la structure orthorhombique de formule $\text{H}_2\text{Ti}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ est la plus proche des nanotubes synthétisés dans nos conditions de synthèse. Le changement morphologique des TiONts en nanorubans, sous l'effet de l'agitation, est accompagné par un changement structural de la phase orthorhombique à la phase monoclinique de formule $\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$. L'étude des propriétés physico-chimiques de ces derniers a prouvé que les nanorubans ont plus de OH de structure et retiennent plus d'eau que les TiONts.

L'application d'une agitation mécanique en continu, à une température élevée (180°C) pendant 2 heures a abouti à une synthèse de TiONts avec un rendement très proche de 100% (au lieu de 48 h en mode statique à 150°C). La pureté de l'échantillon a été vérifiée par plusieurs techniques de caractérisation telles que DRX, Raman, UV-Vis du solide et MET. L'explication possible de ce résultat est que l'agitation assure une excellente homogénéité de la solution et renouvelle constamment la couche autour des particules de TiO_2 , ce qui conduit à l'accélération de la dissolution du précurseur et à la synthèse des TiONts dès les 30 premières minutes de traitement. A ce stade de la synthèse, des nanotubes de morphologie particulière ont été

obtenus : des TiONts ayant un diamètre externe qui peut atteindre 18 nm et un nombre de couches élevé (jusqu'à 10 couches).

Une discussion concernant le mécanisme de synthèse des nanotubes a été illustrée par des images MET et a montré trois étapes principales lors de la synthèse : une première étape de dissolution du précurseur où l'agitation intervient pour l'accélérer. La deuxième étape est le développement des nanofeuillets de titanate sous plusieurs formes. Il a été montré que ces deux étapes de synthèse peuvent être influencées par les conditions expérimentales, essentiellement la température. La troisième étape du mécanisme de formation des TiONts est l'enroulement des feuillets. Cette étape qui a été niée dans la littérature a été illustrée dans ce manuscrit par des images MET.

Enfin, l'une des nouveautés dans ce chapitre est la discussion de l'importance du lavage à l'eau des TiONts issus de la synthèse hydrothermale. Il a été montré, images MET à l'appui, qu'il s'agit d'une étape cruciale et indispensable pour l'obtention des TiONts bien formés, avec une structure multicouche, contrairement à ce qui est prétendu dans nombreuses études. Le lavage acide, quant à lui, améliore l'efficacité du lavage et accélère l'échange Na^+/H^+ et par conséquent améliore le rendement de la synthèse des TiONts.

Chapitre III.
PREFONCTIONNALISATION DES
NANOTUBES DE TITANATE PAR
DIFFERENTS LIGANDS : CATECHOLS,
ACIDE CITRIQUE OU ORGANOSILANES

III.1. Introduction : contexte et objectifs

L'objectif de cette thèse est d'élaborer des nanotubes de titanate (TiONts) fonctionnalisés, destinés à une application biomédicale comme nanovecteur d'une molécule thérapeutique. Pour une telle application, les nanotubes doivent remplir certains critères y compris une bonne stabilité colloïdale dans l'eau et les milieux biologiques afin d'éviter leur agrégation, ainsi qu'une bonne furtivité pour ne pas être éliminés par le système immunitaire [235].

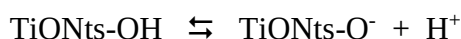
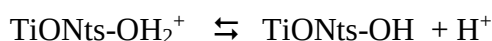
A la sortie de la synthèse hydrothermale, les TiONts en poudre présentent une mauvaise stabilité colloïdale dans l'eau. Pour cette raison, le greffage à leur surface de ligands hydrophiles contenant des groupements fonctionnels semble être une bonne solution pour les maintenir en suspension le plus longtemps possible [236]. Ainsi, des modifications chimiques de surface des TiONts doivent avoir lieu par des molécules organiques qui permettent à la fois d'améliorer leur dispersion et qui garnissent leur surface par des groupements fonctionnels réactifs. Ces derniers peuvent être utilisés ultérieurement pour le greffage d'un agent thérapeutique, d'agent de contraste et/ou d'un polymère de biocompatibilité. Cette étape préliminaire est l'étape dite de « préfonctionnalisation ».

Dans ce troisième chapitre, la préfonctionnalisation des TiONts par des agents de trois familles de molécules organiques est présentée : deux catéchols qui sont l'acide 3,4-dihydroxycinnamique (DHCA) et la 3,4-dihydroxy-L-phénylalanine (L-DOPA), l'acide citrique (AC) et des organosilanes, le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) et le 3-chloropropyltriéthoxysilane (CPTES). Ces études ont comme objectif d'optimiser les paramètres expérimentaux de greffage de chaque molécule, d'évaluer leur effet sur la stabilité colloïdale des TiONts et de quantifier les molécules greffées par plusieurs méthodes chimiques.

III.2. Les TiONts issus de la synthèse hydrothermale : charge de surface, stabilité et limites

Comme il a été rapporté dans le deuxième chapitre, les nanotubes de titanate sont des matériaux avec une grande surface spécifique ($237,8 \pm 2,5$) m²/g due à leur structure creuse et en multicouche. Un grand nombre d'hydroxyles de surface a été estimé par ATG et vérifié par analyses de surface XPS dans la partie II.5.1.3.

Les mesures du potentiel zêta (ζ) réalisées sur les TiONts indiquent un potentiel maximal d'environ 20 mV et un point isoélectrique (PIE) de $3,3 \pm 0,3$ (Figure 57). La charge de surface des TiONts varie en fonction du pH selon les équilibres suivant [237] :



Selon ces réactions, il est clair que les groupements hydroxyles présentent des propriétés acido-basiques qui sont à l'origine de la charge de surface des TiONts. A un certain pH (le point

isoélectrique), les nombres de sites positifs et négatifs à la surface sont égaux, la surface est alors considérée comme non chargée par rapport à la solution [238].

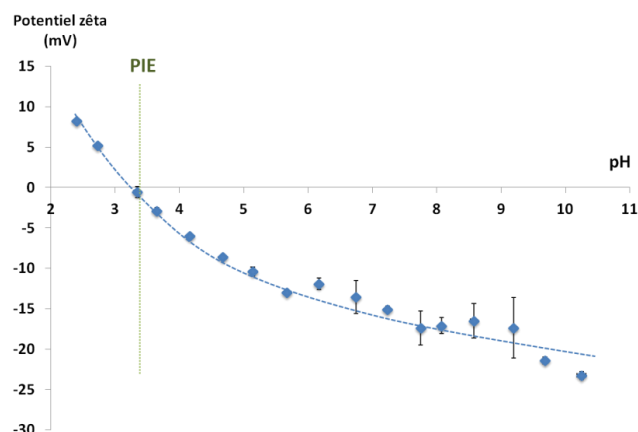


Figure 57: Mesures du potentiel zêta des nanotubes de titanate en fonction du pH et dans NaCl (10^{-2} M).

Le potentiel- ζ est un paramètre important dans la caractérisation des nanomatériaux développés comme vecteurs d'agents thérapeutiques. En fait, comme les membranes cellulaires sont chargées négativement, le potentiel zêta peut affecter la tendance d'une nanoparticule à passer au travers de la membrane cellulaire (par différents mécanismes tels que l'endocytose ou la diffusion [149]) et à interagir avec celle-ci.

En plus des mesures du potentiel- ζ , la stabilité colloïdale des TiONts issus de la synthèse hydrothermale est évaluée par turbidimétrie (des mesures de l'absorbance d'une suspension de TiONts en fonction du temps) comme le montre la Figure 58. L'évolution de la stabilité des nanotubes en suspension, en fonction du temps, montre qu'au bout de 20 min, 50 % de la quantité initiale des TiONts décante alors qu'après 80 min, il ne reste que 25 % en suspension (Figure 58). Ce résultat prouve la mauvaise stabilité des TiONts qui s'agglomèrent très rapidement en suspension (Figure 59).

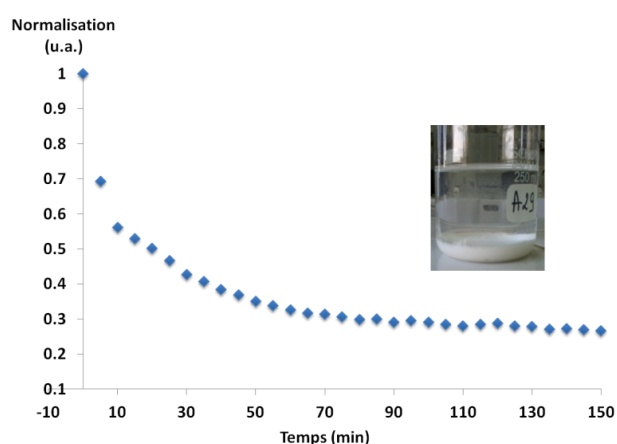


Figure 58: Suivi de la stabilité d'une suspension de TiONts en fonction du temps dans l'eau ultra pure, pH=6,0 (photo d'une suspension de TiONts après 1 h).

Une mauvaise dispersion des TiONts en suspension est considérée comme un vrai handicap pour leur application comme nanovecteurs d'agents thérapeutiques car elle conduit à

une augmentation de la taille des agglomérats des TiONts. Pour une application *in vivo*, ces agglomérats peuvent déclencher une réponse immunitaire dans l'organisme et être piégés par le système immunitaire avant d'atteindre leur cible. Pour une utilisation ou une évaluation *in vitro*, une décantation rapide conduit à une répartition hétérogène des TiONts ce qui ne permet pas un contact homogène avec les cellules.

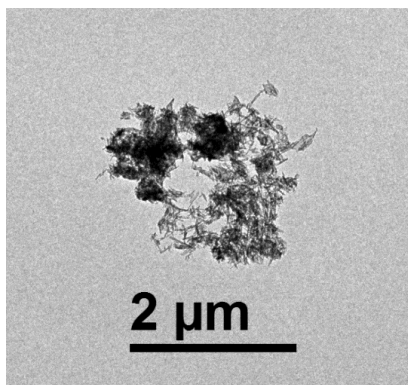


Figure 59 : Image MET de nanotubes nus agglomérés.

Il est bien connu que la stabilité colloïdale est en général régit par les forces répulsives ou attractives de surface [238]. Il devient donc évident qu'un changement au niveau de la chimie de surface des nanotubes, par l'augmentation de la charge de surface, peut générer des forces répulsives entre les TiONts et améliorer leur stabilité colloïdale (Tableau 18).

Les hydroxyles de surface sont considérés comme des groupes donneurs qui peuvent former des complexes avec des ions métalliques ou des ligands organiques et interagir avec des polycations [238].

Tableau 18 : Les caractéristiques et les limites des nanotubes de titanate.

Caractéristiques	Limites
Grand nombre de groupements OH ($6,7 \pm 1,7$ OH/nm ² ou $2,7 \pm 0,5$ mmol/g TiONts)	Agglomération
Point isoélectrique $3,3 \pm 0,3$	Mauvaise stabilité colloïdale (décantation rapide), notamment au pH physiologique
Des OH accessibles à la surface	OH inorganiques moins réactifs que les OH organiques
Surface spécifique 238 ± 2 m ² /g	

III.3. Etude de la fonctionnalisation des TiONts par des catéchols : étude paramétrique du greffage

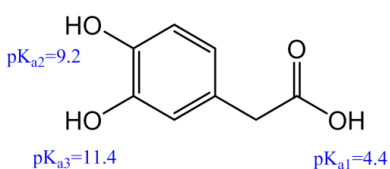
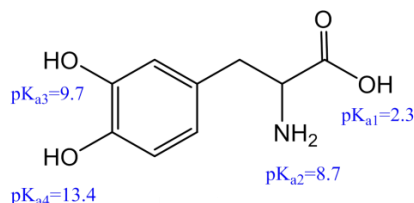
Comme il a été mentionné dans l'introduction de ce chapitre, les deux types de catéchols étudiés sont le DHCA et la L-DOPA. Le choix de ces deux molécules est basé sur leur grande affinité avec les surfaces des oxydes métalliques, notamment avec le TiO_2 (partie bibliographie I.5.2.2) [239, 240] et sur le fait que les TiONts ont une chimie qui se rapproche de cet oxyde. Cependant, l'interaction catéchol-oxyde dépend de la chimie de surface de l'oxyde inorganique, du type de catéchols, ainsi que des paramètres expérimentaux [171, 239]. D'après la littérature, le greffage des catéchols sur des oxydes métalliques dépend de plusieurs paramètres expérimentaux comme le pH, le temps, la température, la force ionique...

Afin d'optimiser l'interaction TiONts-catéchols et optimiser leur greffage, une étude des paramètres expérimentaux a été réalisée.

III.3.1. Effet du pH sur le greffage des catéchols

L'influence du pH de réaction sur le greffage des catéchol est bien connue. Cette dépendance a été prouvée sur plusieurs types d'oxyde métalliques tels que Cr_2O_3 , MnO_2 , Fe_2O_3 et TiO_2 [170]. A notre connaissance aucune étude n'a été réalisée sur les TiONts. Dans ce paragraphe, l'effet de la variation du pH est discuté pour les deux catéchols.

Tableau 19 : Formule chimique et pKa du DHCA et de la L-DOPA.

DHCA	L-DOPA
	

III.3.1.1. Influence du pH sur le greffage du DHCA

Le greffage de DHCA à différents pH est effectué à température ambiante (25°C), pendant 48 h à l'abri de la lumière. Le lavage est effectué par ultrafiltration et le contrôle de l'efficacité du lavage se fait par des mesures UV-visible du filtrat. Trois expériences sont réalisées pour trois valeurs de pH différentes : 2,0 ; 6,5 et 10,0. Les valeurs de pH sont choisies de façon à encadrer les deux premiers pKa du DHCA qui sont 4,4, 9,2 et 11,4 (Tableau 19). La quantité de DHCA introduite est deux fois en excès (en mol) par rapport à la quantité des groupements hydroxyles des TiONts, quantité déterminée par ATG (Tableau 18).

Tableau 20: Evolution du point isoélectrique (PIE) et taux du greffage en DHCA calculé par ATG, en fonction du pH.

Echantillon	Point isoélectrique	Taux de greffage (DHCA/nm ²)
TiONts-nus	3,3	-
TiONts-DHCA pH=2,0	3,8	2,7
TiONts-DHCA pH=6,5	2,7	0,7
TiONts-DHCA pH=10,0	3,4	0,9

L'analyse des courbes du potentiel zêta des TiONts modifiés par le DHCA, à différentes valeurs de pH de mise en contact (Figure 60 et Tableau 20), montre une légère évolution, de surcroît non régulière, du potentiel zêta et du point isoélectrique (PIE) en fonction de l'augmentation du pH de réaction. Afin de comprendre ce comportement, il est nécessaire de voir l'évolution de la chimie de la molécule de DHCA à chaque pH (il faut noter que le pH discuté ici est le pH de la réaction de greffage).

Sachant que le PIE des TiONts est de 3,3 et est inférieur au pKa de dissociation du groupement carboxyle du DHCA ($pK_{a1} = 4,4$), le pH de mise en contact de 2,0 est celui qui potentiellement doit conduire au maximum d'interaction entre des TiONts nus chargés positivement et la molécule de DHCA majoritairement neutre ou légèrement chargée négativement. Une légère augmentation du PIE est observée pour le nanohybride TiONts-DHCA_pH2 (de 3,3 à 3,8) et le potentiel zêta augmente, en valeur absolue, d'une dizaine de mV.

A un pH de mise en contact de 6,5, la molécule de DHCA est chargée négativement, tout comme les TiONts nus, ce qui réduit les interactions possibles. Cependant, une partie du DHCA se greffe malgré tout (voir résultats des ATG Figure 61 et IR Figure 62) et cela contribue à augmenter la charge négative dans la double couche électrique (couche de stern et couche diffuse) à la surface des TiONts, induisant ainsi une augmentation du potentiel zêta (en valeur absolue) [241].

Dans le cas du greffage du DHCA à pH 10,0, le PIE reste presque le même alors que le potentiel zêta augmente légèrement pour l'échantillon TiONts-DHCA_pH10. En effet, à ce pH, les TiONts sont totalement déprotonés et chargés négativement donc l'adsorption de la molécule de charge négative n'a pas d'effet sur la charge globale des TiONts dans ce cas [241]. La constance au niveau du PIE peut être expliquée du fait des valeurs proches du PIE des TiONts et du pKa de dissociation du DHCA.

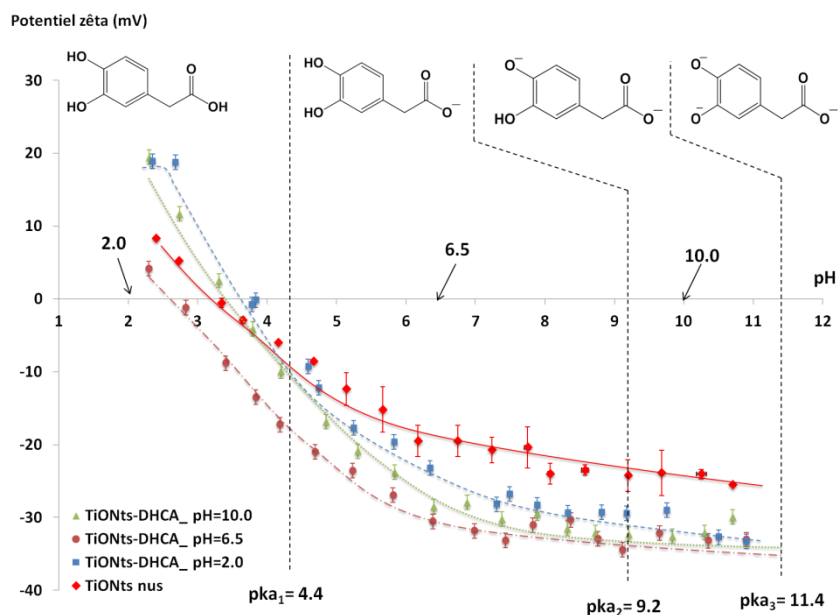


Figure 60 : Evolution des courbes du potentiel zêta, en fonction du pH, des nanotubes nus et modifiés par le DHCA à pH=2,0, 6,5 et 10, T=25°C et pendant 48 h. Mesures dans NaCl 10⁻²M.

Le taux de greffage de la molécule DHCA est déterminé par des analyses thermogravimétriques ATG en utilisant la formule suivante :

$$\text{Estimation du taux de greffage} = \frac{(\Delta m/m) \times N_A}{M \times S \times 10^{18}} \quad (\text{molécule/nm}^2 \text{ de TiONts}) \quad \text{Formule (2)}$$

Où : Δm : la perte de masse en (%) par rapport à la perte de masse des TiONts nus et calculée entre 50°C et 800°C

N_A : le nombre d'Avogadro 6.022×10^{23}

M : la masse molaire de la matière organique dégradée au cours du traitement thermique

$S \times 10^{18}$: la surface spécifique des TiONts (ou nanohybrides) exprimée en (nm²/g).

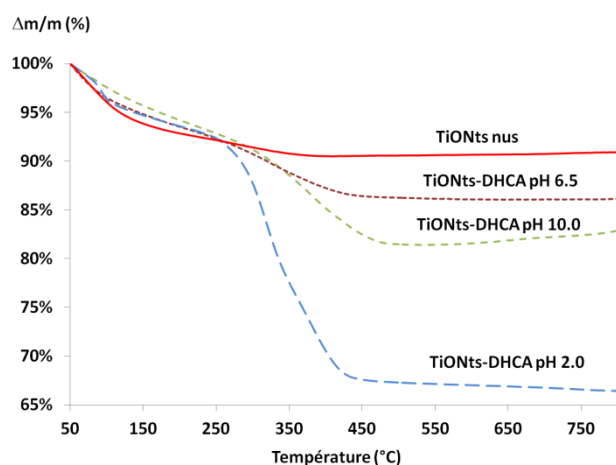


Figure 61 : Courbes ATG des nanohybrides TiONts-DHCA synthétisés à différents pH 2,0, 6,5 et 10,0 (T=25°C et t=48 h). Analyses sous un débit d'air de 25 mL/min et à une rampe de température de 5°C/min.

La différence entre la perte de masse des nanohybrides et celle des TiONts nus (Figure 61) permet d'estimer approximativement la quantité de DHCA greffée à chaque pH (Tableau

20). Les résultats montrent que le taux de greffage le plus élevé est atteint à pH 2,0 avec une valeur de 3,9 DHCA/nm². En revanche, des taux de greffage faibles sont obtenus à des pH plus élevés (6,5 et 10,0). Cela peut être expliqué par le fait qu'à un pH > 4,4, le DHCA est majoritairement chargé négativement (Figure 60) ce qui crée une répulsion électrostatique avec les TiONts qui sont également chargés négativement dans ce même domaine (pH > 4,4).

Les spectres IR des nanohybrides synthétisés à chaque pH sont donnés Figure 62. L'analyse des spectres montre que les bandes caractéristiques du DHCA apparaissent clairement dans l'échantillon synthétisé à pH 2,0 alors qu'elles sont absentes dans les deux autres échantillons. Cette différence est due à un rapport signal DHCA/TiONts plus élevé dans cet échantillon. La Figure 62b présente les spectres IR entre 1000 et 1850 cm⁻¹ du DHCA pur et des TiONts-DHCA synthétisés à pH 2,0. Les attributions des bandes sont données dans le Tableau 21, en se basant sur la littérature [242, 243].

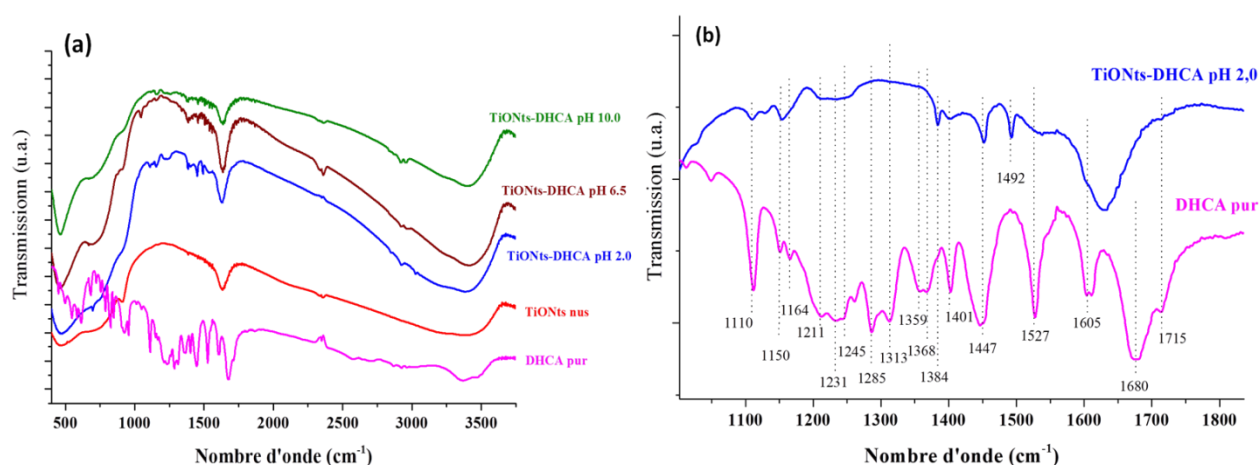


Figure 62 : Spectres IR des (a) nanohybrides greffés par le DHCA à différents pH en comparaison avec le spectre des TiONts nus et celui du DHCA pur ; (b) TiONts-DHCA préparés à pH 2,0 et DHCA pur entre 1000 et 1850 cm⁻¹.

Les spectres montrent un décalage de certaines bandes de vibration du DHCA accrochés aux TiONts vers les nombres d'onde les plus faibles ainsi qu'une disparition d'autres bandes (Tableau 21). Les mêmes changements ont été également observés par D. Hojo *et al.* [242] et A. Sahraneshin *et al.* [243] dans leurs études sur le greffage du DHCA sur un support de silice et des nanoparticules d'oxyde d'hafnium respectivement. Ce changement illustre la modification de l'environnement chimique de certaines liaisons après greffage [243]. Les principales variations du spectre concernent essentiellement les bandes de vibration des groupements catéchols C-OH : le décalage de la bande 1164 cm⁻¹ vers les faibles nombres d'onde conduit à son chevauchement avec la bande située à 1150 cm⁻¹ pour n'en former qu'une seule. Le même phénomène est aussi observé avec les bandes de vibration situées entre 1211 et 1245 cm⁻¹. La disparition de certaines bandes relatives à des vibrations du groupement catéchol, telles que 1285 cm⁻¹ (νC-OH), 1359 cm⁻¹ (δ OH) et 3364 cm⁻¹ (ν OH), illustre l'engagement de ce groupement pour établir des liaisons chimiques à la surface des TiONts. Par ailleurs, l'apparition d'une bande vers 1492 cm⁻¹ est également observée. Cette bande a été observée dans l'étude de A. Sahraneshin *et al.* et a été attribuée à une interaction entre le catéchol et la surface de l'oxyde [243].

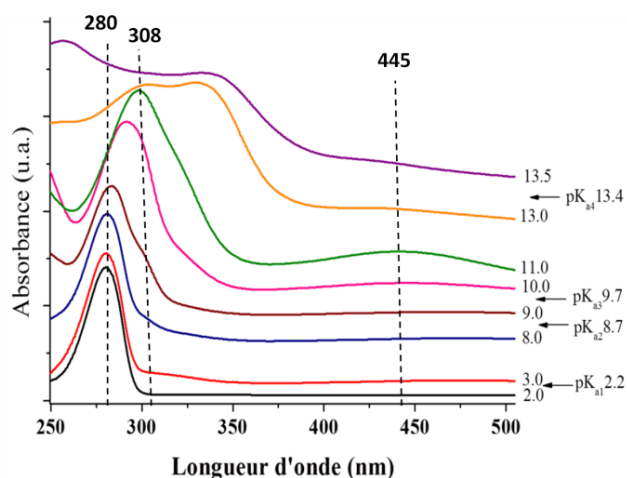
Tableau 21 : Positions des bandes IR et leurs attributions pour le DHCA pur et les nanohybrides TiONts-DHCA préparés à pH 2,0.

Positions des bandes (cm ⁻¹)		Attributions
DHCA	TiONts-DHCA_pH2	
1110	1110	δ C- H du cycle
1603-1527-1447	1605-1527-1447	ν C-C/ ν C=C
1285	-	ν C-OH (catéchol)
-	1494	-
1150-1164	1164 et 1150 devient une seule bande	ν C-OH catéchol
1359	-	δ OH (catéchol)
1211-1231	1211-1231 (une seule bande large et faible)	ν C-OH (COOH)
1680-1715	Chevauche avec la bande 1630	ν C=O (COOH)
3364-3480	-	ν O-H dans COOH et catéchol

III.3.1.2. Etude préliminaire de l'effet du pH sur la stabilité et l'état d'oxydation de la L-DOPA

Contrairement aux résultats obtenus pour la molécule de DHCA, l'effet du pH sur le greffage de la L-DOPA est beaucoup plus important à cause de la forte sensibilité de cette molécule à la variation du pH. Cette sensibilité rend l'interprétation des résultats plus difficile.

Afin de mieux comprendre la chimie de la L-DOPA, l'évolution de son spectre UV-visible en fonction du pH a été analysée dans l'intervalle de pH 2-13,5 (Figure 63). Le changement de l'allure du spectre après chaque pKa illustre une déprotonation de la L-DOPA [165] et sa transformation en d'autres molécules. Ce changement devient plus important à partir de pH 11 via l'apparition d'une nouvelle bande d'absorbance dans le domaine du visible vers 445 nm (Figure 63). Dans des travaux précédents de l'équipe BH2N, l'effet du pH sur la L-DOPA a également été discuté par G. Thomas qui l'avait greffée sur un autre type d'oxyde (des nanoparticules d'oxyde de fer) [25].

**Figure 63 : Evolution du spectre UV-visible de la L-DOPA en fonction du pH dans l'intervalle de pH 2-13,5.**

Le changement au niveau du spectre UV-visible de la L-DOPA à pH=11,0 (Figure 63) par un décalage de la bande d'absorbance de 280 nm à 308 nm et l'apparition d'une deuxième bande vers 445 nm illustre la formation de la dopachrome qui témoigne de l'oxydation de la L-DOPA (Figure 64) [244, 245].

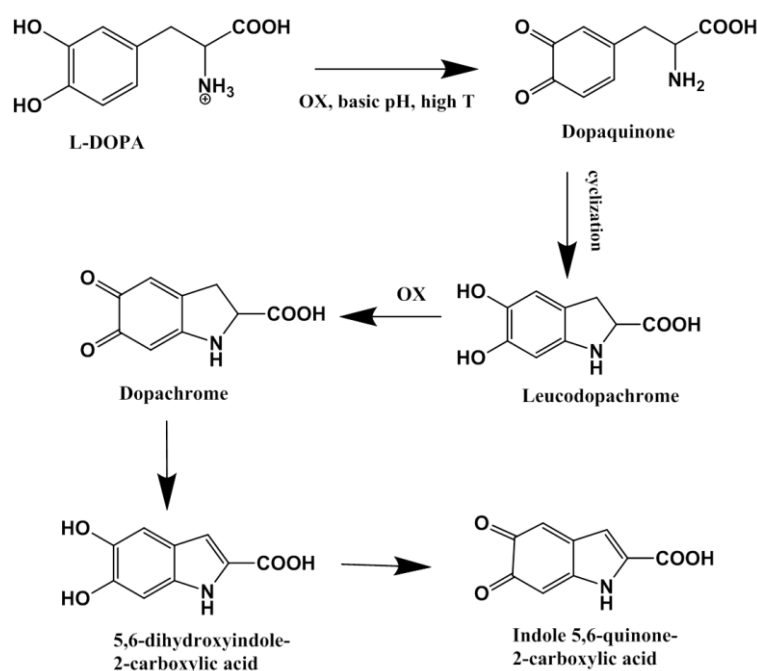


Figure 64 : Schéma des étapes d'oxydation de la L-DOPA (inspiré des travaux de G. Robinson *et al.* [244]).

Le dopaquinone est instable et se transforme immédiatement en leucodopachrome entre pH 3 et 10. La leucodopachrome se transforme en dopachrome à pH 11 (absorbances à 308 et 445 nm). Il faut noter que le spectre UV-visible de la L-DOPA change encore après pH 11 et témoigne de la poursuite de l'oxydation de la L-DOPA, sous l'effet du pH et/ou en fonction du temps, pour former l'acide indole 5,6-quinone-2-carboxylique (Figure 64) [244].

III.3.1.3. Effet du pH sur l'efficacité de greffage de la L-DOPA

Une étude de l'effet du pH, similaire de celle effectuée pour le DHCA, est réalisée pour le greffage de la L-DOPA. Sachant que cette dernière présente quatre acidités ($pK_{a1}=2,3$, $pK_{a2}=8,7$, $pK_{a3}=9,7$, $pK_{a4}=13,4$ Tableau 19), l'effet du pH est étudié sur quatre points de pH différents (2, 4, 6 et 10) à température ambiante (25°C) pendant 48 h à l'abri de la lumière. Les points de pH sont choisis d'une façon à couvrir le plus large intervalle de pH afin d'avoir le maximum d'informations sur le comportement de la L-DOPA et de façon à éviter son oxydation ($pH < 10$). Les valeurs choisies le sont, en outre, en se basant sur les choix de pH rencontrés dans

la littérature [167, 246]). La Figure 65 et le Tableau 22 résument les caractéristiques des nanohybrides obtenus après chaque greffage.

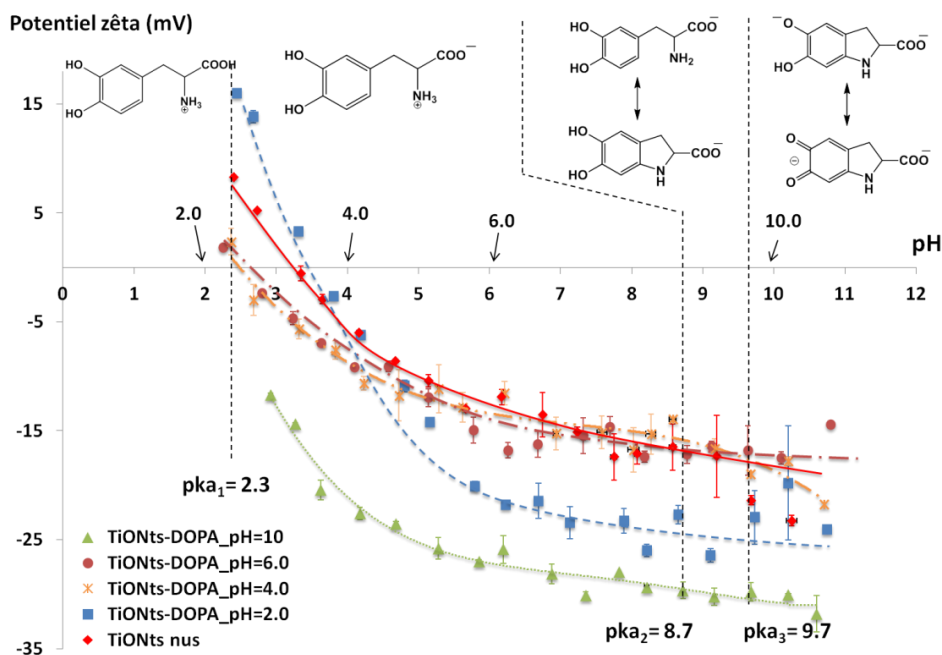


Figure 65 : Courbes du potentiel zêta des TiONts-DOPA synthétisés à différents pH. Mesures effectuées dans NaCl 10^{-2} M.

Après avoir étudié l'oxydation de la L-DOPA en fonction du pH, essayons maintenant d'interpréter les résultats du Tableau 22. A pH 2, la L-DOPA est chargée positivement, comme les TiONts nus. Pour cette raison le PIE des TiONts ne change presque pas. En revanche, le potentiel zêta des TiONts-DOPA augmente d'environ 10 mV, en valeur absolue, en raison de la dissociation du groupement COOH ($\text{pH} > \text{PIE}$) et des NH_3^+ à la surface des nanotubes ($\text{pH} < \text{PIE}$).

Pour des valeurs de pH proches de 4 et 6, la charge globale de la L-DOPA doit être neutre (forme zwitterionique de la L-DOPA, Figure 65) ce qui explique la non modification du potentiel zêta, par rapport aux TiONts nus.

A pH 10, la L-DOPA est doublement chargée négativement engendrant ainsi une diminution du PIE et du potentiel zêta des nanohybrides.

Tableau 22: Caractéristiques des nanohybrides TiONts-DOPA en fonctions du pH de mise en contact (greffage en molécule/nm², PIE et potentiel zêta).

Echantillon	$\Delta m/m$ (%)	L-DOPA/nm ²	PIE	Zêta à pH $\approx$ 7,4 (mV)
TiONts-nus	-	-	3,3	-14,0
TiONts-DOPA_pH2	1,9	0,25	3,4	-24,5
TiONts-DOPA_pH4	0,4	0,06	2,7	-12,7
TiONts-DOPA_pH6	2,6	0,33	2,5	-14,2
TiONts-DOPA_pH10	9,0	1,10	<2	-30,0

Avoir un taux de greffage important à un pH élevé est surprenant à cause de la répulsion électrostatique entre les catécholates et la surface des TiONts qui sont tous les deux chargés négativement à pH 10. Par contre, H. Gulley-Stahl *et al.* ont indiqué dans leur étude que ce résultat est commun pour plusieurs types de catéchols dont l'adsorption à la surface des oxydes métalliques augmente à des pH > 9 [170]. Ceci a été expliqué par un effet complexant très important de ces catécholates malgré les forces répulsives [247]. La différence au niveau du taux de greffage qui diminue avec le pH pour le DHCA et augmente dans le cas de la L-DOPA suggère un mécanisme d'adsorption différent de ces deux catéchols à la surface des TiONts, à des pH élevés.

La comparaison entre les stabilités colloïdales des nanohybrides élaborés à différents pH prouve que la stabilité des TiONts en suspension est améliorée après le greffage. Une meilleure stabilité est atteinte pour le greffage à pH. Cela est justifié par la présence d'une plus grande quantité de L-DOPA à la surface. En fait, la charge négative de la L-DOPA sous sa forme oxydée (dopachrome) crée des forces répulsives entre les TiONts en suspension.

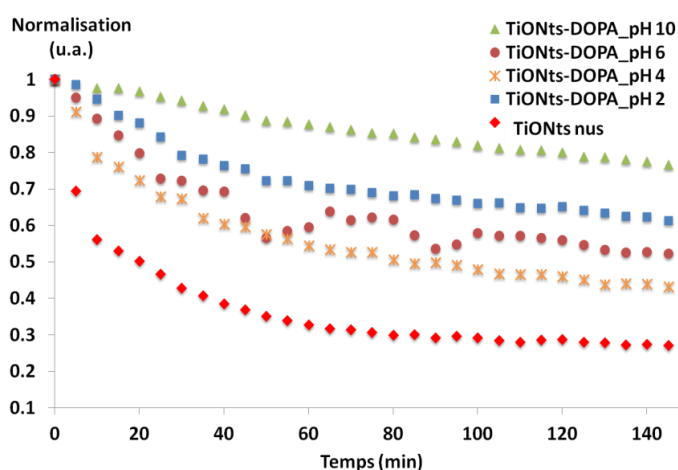


Figure 66 : Comparaison de la stabilité des nanohybrides élaborés à des différents pH dans PBS 0,1 M (pH=7,4).

III.3.1.4. L'effet oxydant des nanotubes sur la L-DOPA

Le greffage de la L-DOPA aux différents pH montre une différence au niveau de la couleur du complexe TiONts-DOPA formé (la couleur devient plus foncée à des pH élevés, Figure 67). La comparaison des spectres UV-visible des filtrats de lavage des suspensions TiONts-DOPA, après 48 h de réaction aux pH 2, 4, 6 et 10, (Figure 67a), avec ceux de la L-DOPA pure à pH 2, 6, 9 et 11 (Figure 67b) montre des similarités entre les spectres mais avec un décalage de pH. En effet, le spectre de la L-DOPA après réaction avec les TiONts à pH 4 est le même que celui de la L-DOPA seule (sans TiONts) à pH 6. La même chose est observée pour le pH de réaction 6 (spectre similaire à celui de la LDOPA seule à pH 9) et pour le pH de mise en contact 10 (spectre similaire à la LDOPA à pH 11). Par contre, à pH 2, le spectre est le même dans les deux cas. Ce résultat montre que la présence des TiONts en contact avec la L-DOPA déplace son pH de déprotonation et d'oxydation vers des valeurs de pH plus faibles, à partir de pH 4. Ce même phénomène a été observé par A. Lebedev *et al.*[248] mais en présence de métaux alcalino-terreux et a été interprété comme une déprotonation supplémentaire

impliquée dans la formation du complexe métal-catécholate. Ainsi, à $\text{pH} \geq 4$ l'oxydation de la L-DOPA est déplacée vers les pH les plus faibles. A pH 2, ce catéchol conserve sa structure de départ, ce qui a aussi été mentionné dans l'étude de G. M. Robinson *et al.* [244].

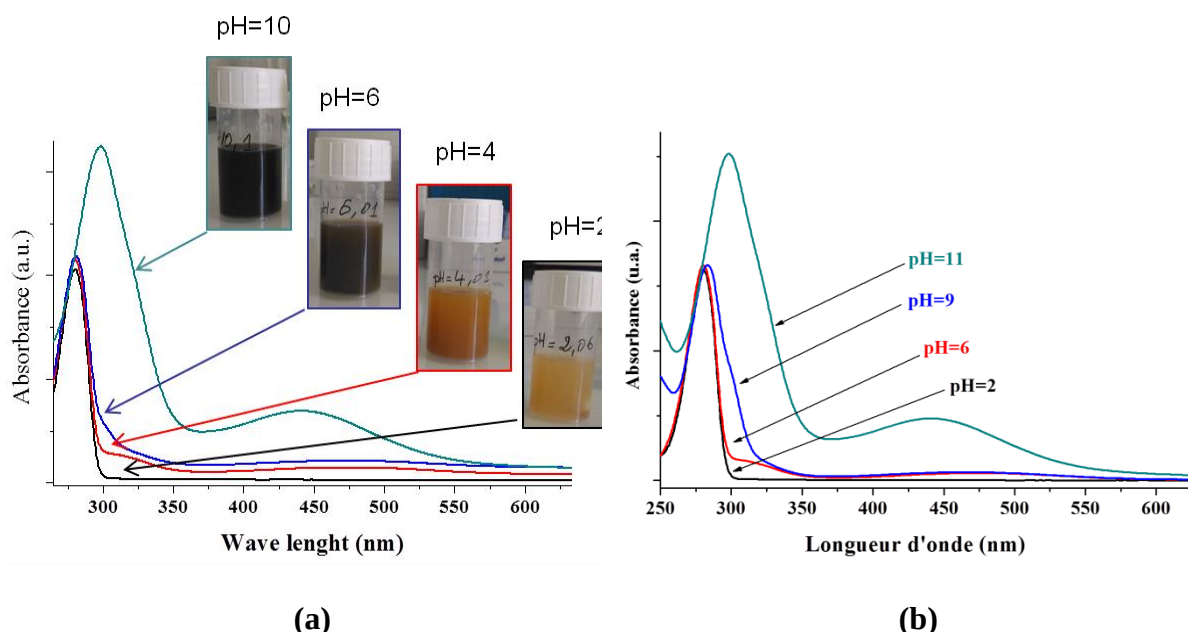


Figure 67 : Spectres UV-visible (a) des filtrats récupérés au moment du lavage des nanohybrides TiONts-DOPA après 48 h de réaction à pH=2, 4, 6 et 10 avec des photos des suspensions obtenues (b) de la L-DOPA pure à pH 2 ; 6 ; 9 et 11.

III.3.1.5. Etude de l'oxydation de la L-DOPA par XPS

Les analyses élémentaires par XPS des deux nanohybrides élaborés à pH 2 et 10 sont données Tableau 23. Les pourcentages élémentaires de l'azote et du carbone sont plus élevés dans l'échantillon TiONts-DOPA_pH10 par rapport à ceux de l'échantillon TiONts-DOPA_pH2. Ce résultat implique la présence d'une quantité plus importante de matière organique à la surface des TiONts à pH élevé, en accord avec les analyses ATG.

Le rapport C/Ti dans l'échantillon TiONts-DOPA_pH10 est presque 4,6 fois plus élevé que celui calculé pour l'échantillon TiONts-DOPA_pH2 ce qui implique une quantité de L-DOPA 4,6 fois plus importante dans les TiONts-DOPA_pH10 que dans les TiONts-DOPA_pH2. Ce résultat est en bon accord avec celui obtenu par ATG qui montre un rapport similaire des taux de greffage des deux échantillons (4,6 versus 4,4) (Tableau 22).

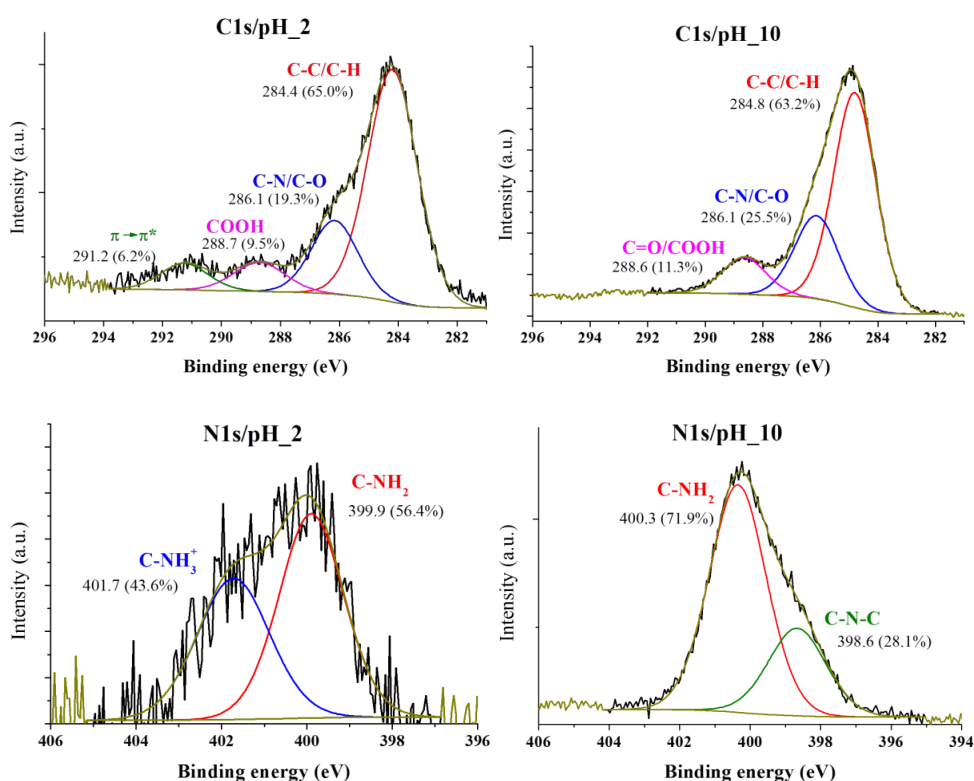
La présence d'un pourcentage de sodium élevé dans l'échantillon TiONts-DOPA_pH10 (5,8%) est due à l'ajout de la soude pour ajuster le pH. Son absence dans l'échantillon TiONts-DOPA_pH2 (0%) peut être expliquée par un échange Na^+/H^+ qui se produit dans la structure des TiONts en milieu acide (voir paragraphe lavage acide II.8.2).

Tableau 23 : Analyses élémentaires par XPS des TiONts-DOPA synthétisés à pH 2 et pH 10.

Elément	C1s	O1s	NaKLL	Ti2p	Cl2p	N1s	C/Ti	N/Ti
TiONts nus	3,2	66,5	2,2	27,5	0,6	-	0,1	-
TiONts-DOPA_pH2	14,1	61,6	-	23,0	-	1.3	0,6	0,06
TiONts-DOPA_pH10	36,6	39,0	5,8	13,1	-	5.5	2,8	0,4

La désomation des spectres XPS C1s et N1s (Figure 68) permet de mettre en évidence des différences au niveau des liaisons chimiques présentes dans les deux échantillons TiONts-DOPA_pH2 et TiONts-DOPA_pH10. L'analyse des spectres C1s montre que le pourcentage des liaisons C-N/C-O (dans les liaisons C-OH et C-NH₂) et des liaisons C=O (dans C=O et/ou COOH) augmente à pH 10. Ce résultat est attendu puisque l'oxydation de la L-DOPA induit une cyclisation qui lie un carbone supplémentaire à azote, donc le nombre des liaisons C-N/C-O augmente et le nombre des liaisons C=O augmente également (voir Figure 64). Par ailleurs, la disparition de la composante relative à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ dans le spectre C1s de l'échantillon synthétisé à pH 10 prouve la disparition de la conjugaison des liaisons π dans le cycle aromatique, suite à la cyclisation comme il est schématisé Figure 64 pour le composé dopachrome.

La différence observée dans le spectre N1s entre ces deux échantillons est en bon accord avec les constatations précédentes. En effet, pour l'échantillon TiONts-DOPA_pH10, on note l'apparition d'une nouvelle composante à 398,6 eV. Cette composante peut être attribuée à la liaison C-N-C qui se forme après la cyclisation, lors de l'oxydation de la L-DOPA. Ce résultat montre l'engagement d'un grand nombre d'atomes d'azote dans la cyclisation (28%).

**Figure 68 : Désomation des spectres XPS C1s et N1s des nanohybrides TiONts-DOPA_pH2 et TiONts-DOPA_pH10.**

Malgré la meilleure stabilité colloïdale des nanohybrides obtenus à un pH élevé (pH=10), le pH de réaction choisi pour le reste de ce chapitre est le pH 2. En fait, comme il est mentionné dans l'introduction, le but de la préfonctionnalisation des TiONts est certes d'améliorer leur stabilité colloïdale mais aussi d'apporter de nouveaux groupements fonctionnels de surface pour ultérieurement greffer une molécule d'intérêt. Cela n'est pas possible à pH élevé dans le cas de la LDOPA, car le groupement amine n'est alors plus disponible à la surface. Afin de garder cette fonctionnalité utile, il a été prouvé à travers ce paragraphe que le pH faible (pH 2) est le pH qui garde la molécule L-DOPA intacte à la surface des TiONts. Il reste maintenant à optimiser le rendement de greffage dans ces conditions de pH.

III.3.2. Effet du temps de réaction sur le rendement de greffage des catéchols

Le temps de mise en contact des catéchols avec les oxydes inorganiques, souvent utilisé dans la littérature, est de 30 min [170, 171, 249] ou de quelques heures (3 h) [250]. Les premiers essais présentés ont été réalisés pour 48 h de réaction pour les deux catéchols. Voyons maintenant si l'emploi de ce temps est justifié. Pour cet effet, le greffage de la L-DOPA et du DHCA sont réalisés à plusieurs temps de réaction (2, 4, 6, 15, 24 et 48 h), à pH=2 et température ambiante (25°C). La stabilité des nanohybrides obtenus, les courbes ATG et le taux de greffage sont évalués pour tous ces échantillons et les résultats sont présentés Figure 69 et Tableau 24.

Il est clair qu'il y a une relation entre le taux de greffage et la stabilité colloïdale des nanohybrides synthétisés. En effet, pour un temps de réaction entre 2 et 6 h, dans le cas du greffage du DHCA et entre 2 et 15 h, dans le cas de la L-DOPA, la variation entre les taux de greffage est minime et les résultats de stabilité dans le PBS sont très proches et moins bonne que pour le reste des nanohybrides greffés dans les autres conditions. (Figure 69). Au bout de 24 h, il y a une augmentation importante du taux de greffage accompagnée d'une meilleure stabilité de la suspension des nanohybrides. Après 24 h, le greffage de DHCA reste presque constant alors que celui de la L-DOPA rediminue, tout en conservant une bonne stabilité en suspension dans les deux cas. Ce résultat suggère une désorption possible de la L-DOPA après un long temps de réaction.

Tableau 24 : Evolution du taux de greffage du DHCA et de la L-DOPA sur les TiONts, calculés par ATG, en fonction du temps de la réaction, à pH 2 et température ambiante (25°C).

Temps de réaction (h)	DHCA		L-DOPA	
	molécule/nm ²	µmol/g	molécule/nm ²	µmol/g
2	0,28	111,0	0,23	91,4
4	0,23	88,8	0,28	111,7
6	0,25	99,9	0,19	76,1
15	0,41	159,9	0,21	81,2
24	0,56	222,0	0,36	142,1
48	0,59	233,1	0,17	66,0

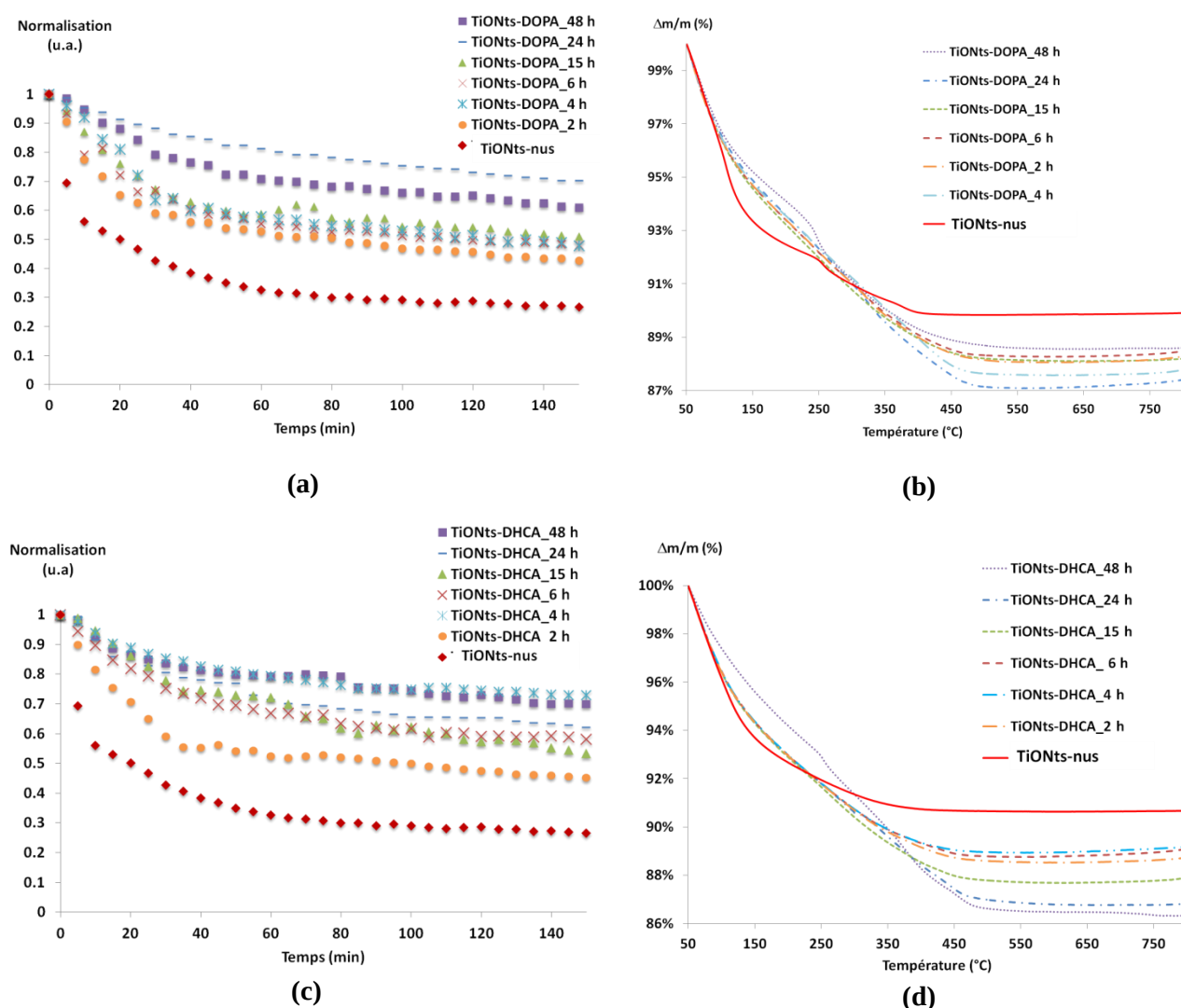


Figure 69 : Stabilité des nanohybrides (a) TiONts-DHCA et (c) TiONts-DOPA synthétisés à pH 2 pendant 2, 4, 6, 15, 24 et 48 h ; analyses effectuées dans le PBS 0,1 M (pH=7,4). Courbes ATG des nanohybrides (b) TiONts-DHCA et (d) TiONts-DOPA synthétisés à pH 2 pendant 2, 4, 6, 15, 24 et 48 h. Analyses effectuées sous un débit d'air de 25 mL/min et à une rampe de température de 5°C/min.

On peut conclure à ce stade, d'après les résultats obtenus, que le temps optimal de greffage du DHCA est de 48 h et celui de la L-DOPA est de 24 h. Afin de confirmer ce résultat et mieux comprendre la cinétique d'adsorption des catéchols en fonction du temps, un suivi de l'adsorption du DHCA et de la L-DOPA au cours de la réaction est effectué.

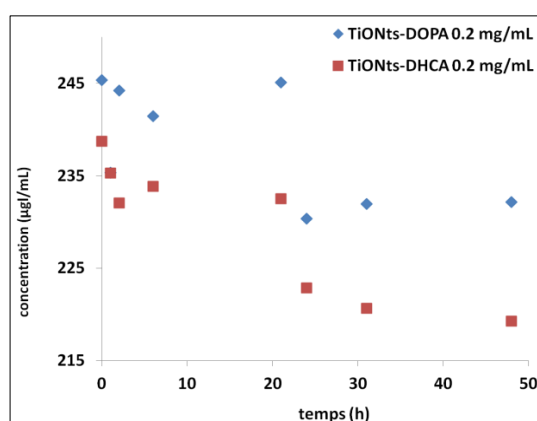
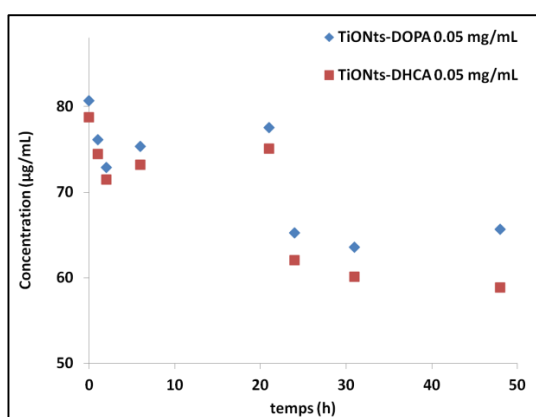
III.3.3. Suivi de la cinétique d'adsorption et quantification des catéchols à la surface des TiONts

III.3.3.1. Suivi de la cinétique d'adsorption des catéchols à la surface des TiONts

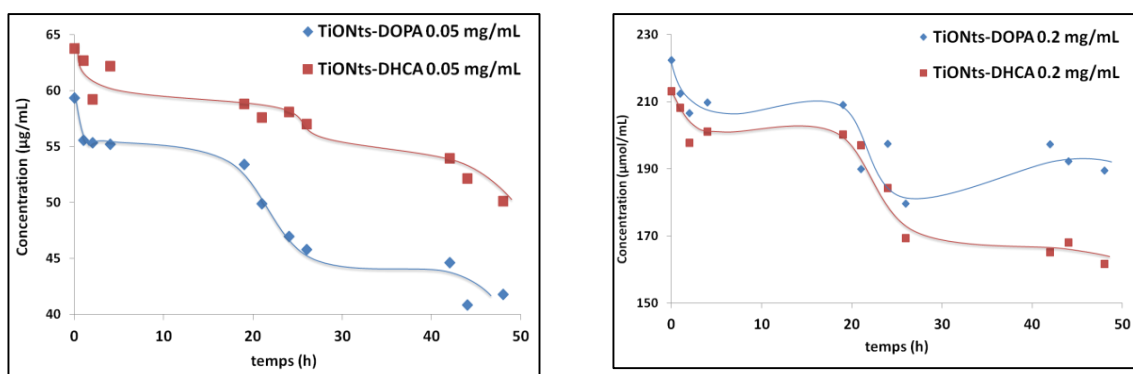
Les catéchols sont des molécules dont le noyau benzénique absorbe dans le domaine de l'UV [251]. Cette propriété est utilisée pour quantifier les catéchols en solution, par des mesures de l'absorbance à 280 nm. Pour suivre la cinétique d'adsorption des catéchols, des mesures

régulières de la concentration de chaque molécule en suspension doivent avoir lieu. Pour ce faire, une courbe d'étalonnage reliant absorbance et concentration est tracée pour chaque catéchol (annexe 4). Le suivi de la cinétique d'adsorption est réalisé par le suivi de l'évolution de la concentration de DHCA et de L-DOPA, en solution, par rapport à la concentration initiale. Les concentrations initiales des catéchols sont aussi déterminées grâce aux courbes d'étalonnage.

Dans un premier temps, une première série d'expérience est réalisée à pH 2 et durant 48 h de réaction pour deux concentrations initiales différentes en catéchols : 0,05 mg/mL et 0,2 mg/mL. Les concentrations sont choisies dans le domaine de linéarité de la méthode de mesure (entre 1 et 300 $\mu\text{g/mL}$ pour le DHCA et la L-DOPA) afin d'éviter les dilutions et garantir le maximum de précision. La concentration initiale correspond à la concentration des catéchols en solution, juste avant l'ajout de la poudre de TiONts (50 mg pour chaque concentration pour un volume total de solution de 100 mL). Les mesures de l'absorbance en fonction du temps sont réalisées pour environ 2 mL de solution, filtrée sur un filtre seringue (0,1 μm). Les concentrations sont déterminées grâce à la courbe d'étalonnage. Chaque prélèvement correspond à un point dans la Figure 70. L'observation des résultats montre une diminution importante des concentrations des catéchols en solution entre 0 et 2 heures de réaction. Entre 2 et 21 h, les concentrations en DHCA et L-DOPA en solution sont presque constantes. Ensuite, on observe une diminution brusque et importante des concentrations des catéchols en solution. Entre 24 et 48 h, une diminution faible de la concentration de DHCA semble avoir lieu contre une faible réaugmentation de la concentration en L-DOPA.



Série 1 : Temps de mesures à t = 0 ; 1 ; 2 ; 6 ; 21 ; 24 ; 31 et 48 h



Série 2 : Temps de mesures à $t = 0 ; 1 ; 2 ; 4 ; 19 ; 21 ; 24 ; 26 ; 42 ; 46$ et 48 h

Figure 70 : Suivi de l'adsorption des catéchols à la surface des TiONts à pH 2, par des mesures de leurs concentrations en solution en fonction du temps et à deux concentrations (0,05 mg/mL et 0,2 mg/mL).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans le paragraphe (III.3.2) où le taux de greffage déterminé par ATG de L-DOPA reste constant jusqu'à 15 h puis augmente brusquement pour 24h et 48h (même chose dès 15h pour le DHCA). Ce phénomène n'a jamais été rapporté dans la littérature. Dans le but de vérifier la reproductibilité de ce comportement, une deuxième série d'expériences est réalisée en conservant toutes les conditions expérimentales (concentrations initiales de catéchols 0,05 et 0,2 mg/mL).

Les résultats de la deuxième série (Figure 70-série 2) sont conformes aux résultats de la première. En effet, la même évolution des concentrations des catéchols en solution, en fonction du temps, est observée, avec notamment une diminution brusque vers 21 h. Une légère réaugmentation de la concentration en L-DOPA est noté pour la concentration 0,2 mg/mL. Cependant, le détachement possible d'une petite quantité de L-DOPA de la surface des TiONts après 26-30 h de réaction met en évidence une différence dans son mécanisme d'adsorption par rapport au DHCA. A pH 2, la L-DOPA porte une charge positive due à la présence d'un groupement amine dans sa structure alors que la molécule de DHCA est neutre. Le groupement amine donne à la L-DOPA, selon N. Lee *et al.*[167], un point d'attachement supplémentaire par physisorption à la surface des TiONts. Il est donc possible qu'une partie de cette molécule s'attache à la surface des TiONts par physisorption. Sachant que ce type de liaison est réversible, une désorption est donc probable. Par conséquent, un temps de réaction de 48 h est gardé pour le greffage de DHCA et un temps de 24 h est adopté pour le greffage de la L-DOPA.

III.3.3.2. Vérification de la durabilité du greffage des catéchols à la surface des TiONts

Afin de vérifier la durabilité du greffage dans les conditions physiologiques et confirmer l'hypothèse de la désorption de la L-DOPA, des nanohybrides TiONts-DHCA et TiONts-DOPA sont mis, séparément, dans une solution à 0,15 M de NaCl à un pH=7,4 et température 37°C. Les concentrations des catéchols libérés en solution sont ensuite mesurées en fonction du temps par UV-visible grâce aux courbes d'étalonnage (Annexe 4). Notons que les limites de quantification de ces dernières sont de 1,4 µg/mL pour le DHCA et 3,7 µg/mL pour la L-DOPA.

Les résultats montrent, Figure 71, qu'il y a désorption d'une très faible quantité de DHCA, qui reste constante en fonction du temps. Cependant, pour la L-DOPA, la quantité libérée est certes faible aussi mais elle augmente en fonction du temps, ce qui illustre, une fois de plus sa désorption de la surface des TiONts dans ces conditions.

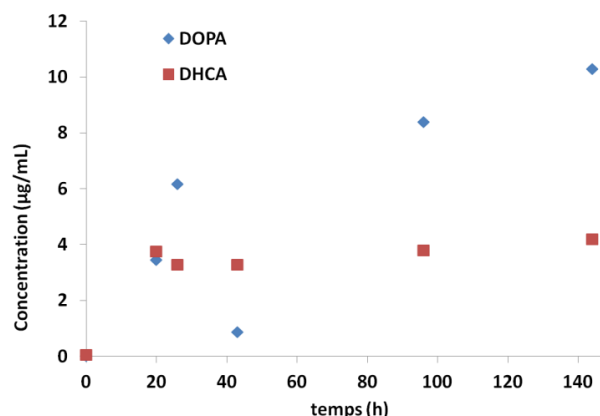


Figure 71 : Concentrations de DHCA et L-DOPA libérées des TiONts-DHCA et TiONts-DOPA en solution en fonction du temps et dans des conditions physiologiques simulées ([NaCl]=0,15 M, T=37°C, pH=7,4).

Il est clair d'après ce qui précède que le DHCA et la L-DOPA se comportent différemment vis-à-vis des TiONts. Le complexe que forme le DHCA avec les TiONts est plus stable en fonction du temps. La sensibilité de la L-DOPA avec le pH et la possibilité d'une physisorption à la surface des TiONts lui attribue un taux de greffage qui, dans la majorité des cas, est plus faible que celui atteint pour le DHCA.

III.3.3.3. Quantification des catéchols à la surface des TiONts par UV-visible

L'utilisation de l'analyse thermogravimétrique pour la quantification des molécules présente toujours des limites car il est difficile de savoir si la matière perdue au moment de la décomposition thermique correspond à la molécule greffée ou bien à une autre molécule. Ce problème devient plus gênant lors de la réalisation de greffages successifs ou lorsqu'il existe plusieurs molécules dans le système qui peuvent s'adsorber à la surface des TiONts. Dans ce cas, la quantification par ATG n'est pas sélective de la molécule greffée. Pour éviter ce problème, la stratégie de l'équipe BH2N est d'utiliser plusieurs techniques et de les combiner pour caractériser les produits obtenus. Ainsi, récemment, ATG et XPS ont été utilisées conjointement pour quantifier deux types de molécules à la surface de SPIONs [252]. L'XPS reste cependant une technique analytique assez lourde et onéreuse. D'où le choix fait ici de tenter d'utiliser la spectroscopie UV-visible pour cette étude.

Comme cela a déjà été dit, les catéchols sont des molécules dont le noyau benzénique absorbe dans le domaine de l'UV. Cette propriété est maintenant utilisée pour quantifier les catéchols greffés sur les TiONts par des mesures d'absorbance à $\lambda_{\text{max}}=280$ nm. Le principe de cette méthode consiste à déterminer la concentration des catéchols avant la mise en contact avec les TiONts ($t=0$, concentrations initiales) et à la fin de la réaction, après la mise en contact ($t=24$ ou 48 h, juste avant l'étape du lavage, concentrations finales). Les mesures de l'absorbance, à la fin de la réaction, sont faites après une filtration du volume prélevé à travers un filtre seringue,

afin de séparer les TiONts de la solution à mesurer. La différence entre les concentrations mesurées est relative à la quantité greffée de catéchols à la surface des TiONts.

La quantification par UV-visible est effectuée pour les deux séries d'expériences réalisées dans la partie précédente. Négligeant au début l'importance de la méthode de lavage utilisée, les nanohybrides synthétisés dans la série 1 sont lavés par ultrafiltration alors que ceux issus de la série 2 sont lavés par des cycles de centrifugation/redispersion aux ultrasons dans l'eau déionisée (six cycles à 15000 tr/min chacun, environ 24500 g). Les résultats des taux de greffage calculés par UV-visible sont comparés avec ceux estimés par ATG (après lavage et séchage de la poudre par lyophilisation) et présentés par les diagrammes de la Figure 72.

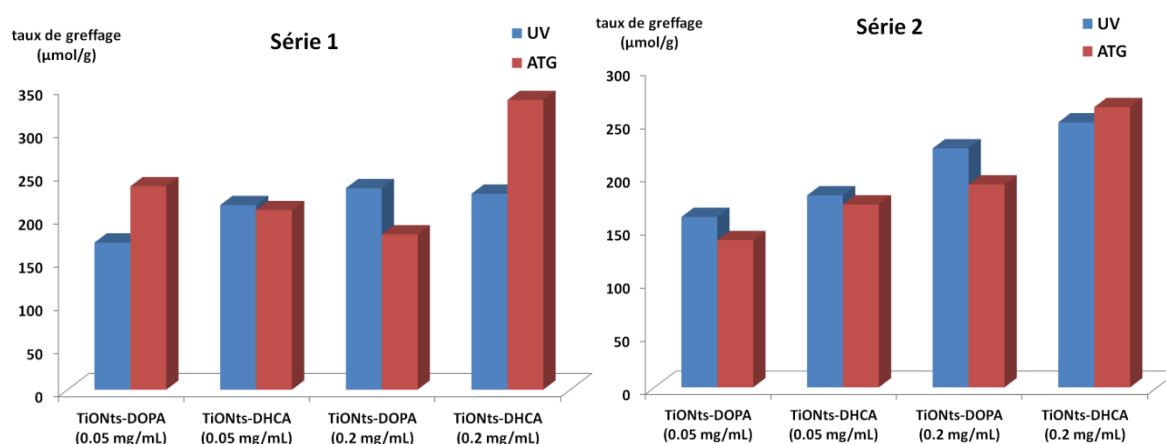


Figure 72: Comparaison entre les taux de greffage déterminés par UV-visible et par ATG pour deux séries d'expériences différentes. Pour la série 1 les nanohybrides ont été lavés par ultrafiltration alors que pour la série 2 ils ont été lavés par des cycles de centrifugation/redispersion.

Les résultats obtenus montrent des résultats différents en fonction de la méthode de lavage utilisée. En fait, le taux de greffage déterminé par UV-visible est beaucoup plus proche de celui estimé par ATG dans le cas du lavage par cycles de centrifugation/redispersion (série 2). Pour la série 1, les résultats fluctuent, parfois l'ATG semble surestimer la quantité greffée, parfois la sous-estimer. Une explication possible peut provenir de la différence de lavage dans chaque expérience. En effet, la centrifugation montre plus d'efficacité car elle permet d'évacuer la totalité des catéchols n'ayant pas réagi, peut-être même une partie de ceux physisorbés, sous l'effet de la grande vitesse de centrifugation appliquée (15 000 tr/min, environ 24500 g) ce qui ne semble pas le cas pour l'ultrafiltration.

On peut enfin conclure sur la fiabilité des deux méthodes analytiques mises en œuvre pour quantifier les catéchols greffés à la surface des TiONts : par ATG ou par spectroscopie UV-visible.

III.3.4. Greffage des catéchols dans des conditions optimisées

Les paramètres expérimentaux étant fixés, les expériences sont reproduites dans les conditions optimales c'est-à-dire à pH=2, t=48 h pour le DHCA et t=24 h pour la L-DOPA. La

Figure 73 témoigne du changement de couleur de la suspension du blanc pour les TiONts non greffés au brun/orange après greffage avec une couleur plus foncée pour la L-DOPA. Ce changement de couleur est attribué, dans la littérature, à la formation de complexes par transfert de charge entre les OH des catéchols et le Ti de surface des TiONts [240].

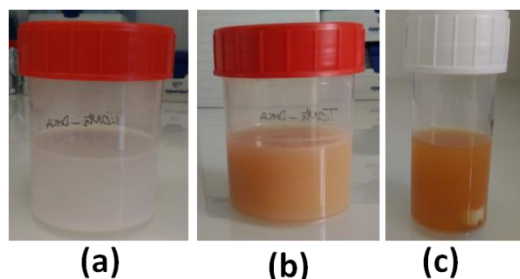


Figure 73: Photos des suspensions de (a) TiONts non greffés (b) TiONts-DHCA (pH=2, t=48 h) (c) TiONts-DOPA (pH=2, t=24 h).

La détermination du taux de greffage par ATG du DHCA et de la L-DOPA sur différents échantillons (3 échantillons chacun) montre un taux de greffage plus important pour le DHCA (Tableau 25). Cela a été justifié dans les paragraphes précédents par une affinité plus importante du DHCA avec les TiONts, en comparaison à la L-DOPA, à pH faible (pH=2). Par conséquent, une surface spécifique plus faible est obtenue pour le nanohybride TiONts-DHCA. Plus le nombre de molécules greffées en surface des TiONts est important, moins est aisé, par exemple, l'accès des molécules d'azote aux cavités internes des TiONts.

Tableau 25 : Caractéristiques des nanohybrides TiONts-DHCA et TiONts-DOPA synthétisés dans les conditions optimales en comparaison avec celles des TiONts nus. Moyenne de trois synthèses indépendantes.

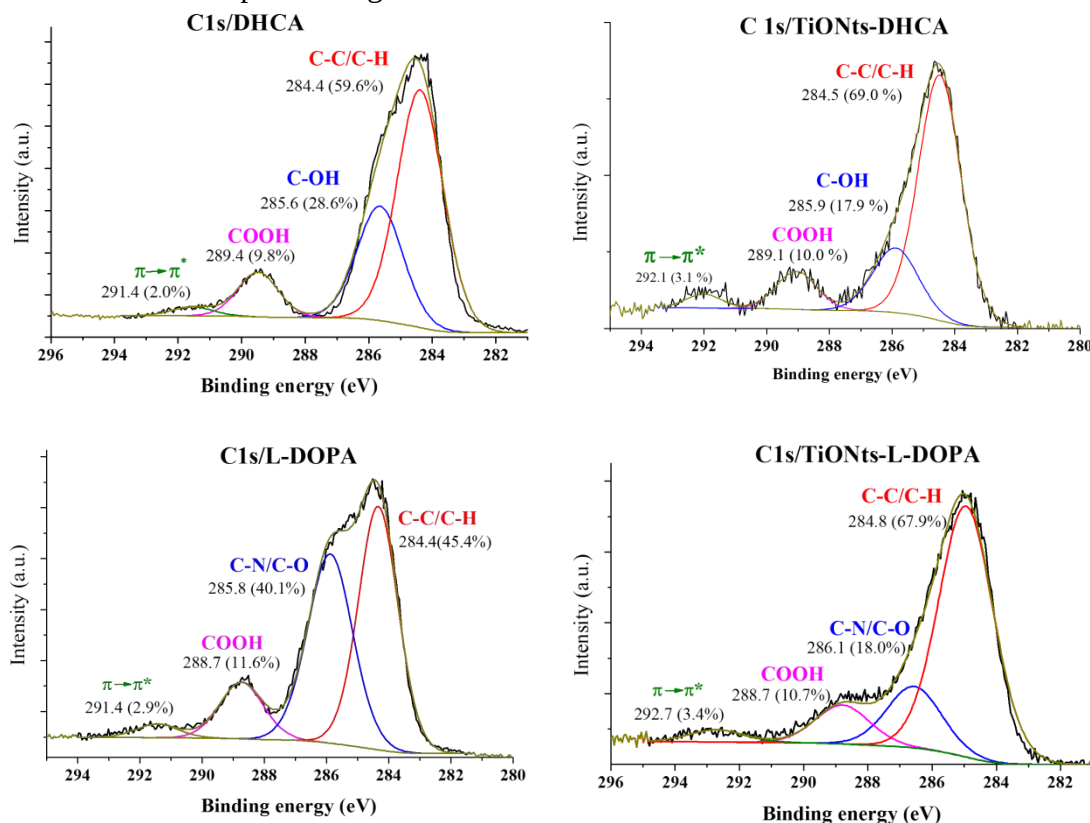
Caractéristiques	Perte de masse $\Delta m/m$ (%) entre 50 et 800°C par rapport aux TiONts nus	Masse molaire de la molécule dégradée (g/mol)	Taux de greffage		Surface spécifique (m ² /g)
			Molécule/nm ²	$\mu\text{mol/g}$ TiONts	
TiONts nus	-	18	(6,7 $\pm$ 1,7) OH	2700 $\pm$ 500	238 $\pm$ 2
TiONts-DHCA	7,4 $\pm$ 1,6	180	(1,05 $\pm$ 0,2) DHCA	412 $\pm$ 88	191 $\pm$ 1
TiONts-DOPA	6,0 $\pm$ 1,5	197	(0,8 $\pm$ 0,2) L-DOPA	303 $\pm$ 74	205 $\pm$ 3

Les analyses élémentaires par XPS des deux nanohybrides illustrent la présence de la matière organique à la surface des TiONts avec un pourcentage plus important de carbone pour les TiONts-DHCA (Tableau 26). La diminution du pourcentage d'oxygène dans les échantillons TiONts-DHCA et TiONts-DOPA est due à la présence des catéchols qui présente un pourcentage plus faible en oxygène que les TiONts. La diminution du pourcentage atomique du titane dans les nanohybrides, après le greffage des catéchols, est due au fait qu'il est de plus en plus masqué par la présence d'une couche organique à la surface, alors même que la profondeur d'analyse de cette technique (XPS) est de l'ordre de 5 nm.

Tableau 26 : Comparaison entre les analyses élémentaires des TiONts nus et modifiés par le DHCA et la L-DOPA et les catéchols seuls.

Elément	C1s	O1s	NaKLL	Ti2p	Cl2p	N1s	C/Ti
TiONts nus	5,6	62,7	5,1	26,2	0,4	-	0,2
TiONts-DHCA	29,9	50,8	0,8	18,5	-	-	1,6
DHCA pur	69,8	30,2	-	-	-	-	
TiONts-DOPA	25,7	52,9	0	18,0	-	3,4	1,4
L-DOPA pure	64,4	28,5	-	-	-	7,1	

La désomation du spectre du carbone C1s de l'échantillon TiONts-DHCA, en comparaison avec le DHCA seul, montre la présence de toutes les liaisons présentes dans ce dernier (Figure 74). La diminution du pourcentage de la contribution C-OH peut être expliquée par l'engagement des groupements catéchols lors de la complexation à la surface des TiONts, par contre la conservation du pourcentage de la contribution de COOH prouve que ce dernier reste libre à la surface. Egalement, une diminution de la contribution C-N/C-O (des liaisons C-NH₂ et C-OH respectivement) dans le spectre C1s du nanohybride TiONts-DOPA est observée avec une constance du pourcentage de la contribution COOH.

**Figure 74 : Désomation des spectres XPS C1s des nanohybrides TiONts-DHCA et TiONts-DOPA en comparaison avec les spectres des molécules DHCA et L-DOPA pures.**

Les observations au MET des nanohybrides TiONts-DHCA (Figure 75a-c) et TiONts-DOPA (Figure 75d-f) montrent la conservation de la morphologie des TiONts après greffage. Une dispersion améliorée est obtenue pour les deux nanohybrides par rapport aux TiONts nus (Figure 59). On peut également noter, d'après les images METHR (Figure 75-c,f),

la présence de la matière organique à la surface des TiONts par la rugosité de leur surface après le greffage, par rapport à l'aspect des TiONts nus (Figure 5).

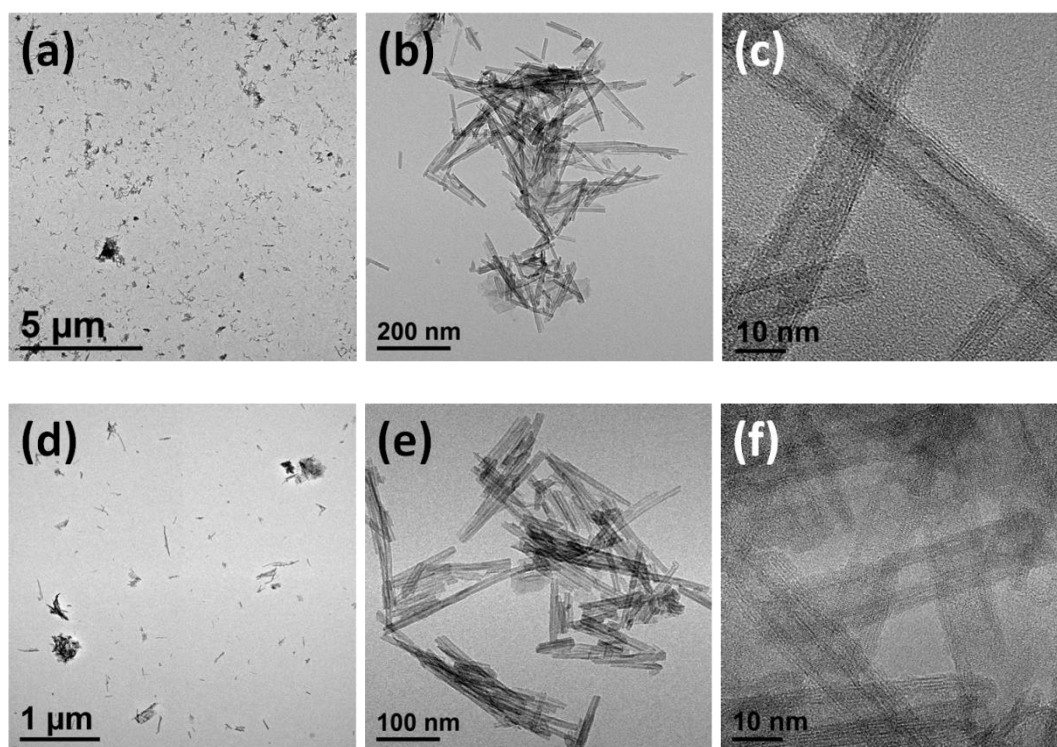


Figure 75 : Clichés MET de TiONts-DHCA et des TiONts-DOPA synthétisés dans des conditions optimisées (pH=2,0, t=48 et 24h respectivement).

III.4. Etude du greffage de l'acide citrique (AC) à la surface des TiONts en fonction du pH

Le troisième ligand étudié dans cette partie est l'acide citrique de formule $C_6H_8O_7$. C'est un stabilisant qui a été utilisé dans la synthèse de plusieurs nanomatériaux. La modification de surface des TiONts par l'acide citrique garnit leur surface par des groupements carboxyles qui peuvent interagir avec d'autres molécules et peuvent améliorer la stabilité des nanoparticules en suspension, en raison de la charge négative des groupements COO^- selon le pH.

Dans le but d'optimiser le greffage de l'acide citrique et d'assurer une bonne stabilité colloïdale des TiONts en suspension, l'effet du pH sur la complexation est étudié. Pour ce faire, quatre pH sont évalués : 3,0 ; 4,0 ; 5,6 et 7,8 pour un rapport molaire AC/OH(TiONts) égal à 2, une mise en contact à température ambiante et un temps de réaction de 24 h. Les quatre pH sont choisis pour encadrer les trois pKa de l'acide citrique qui sont : $pK_{a1}=3,13$; $pK_{a2}=4,75$ et $pK_{a3}= 6,40$ (Figure 76).

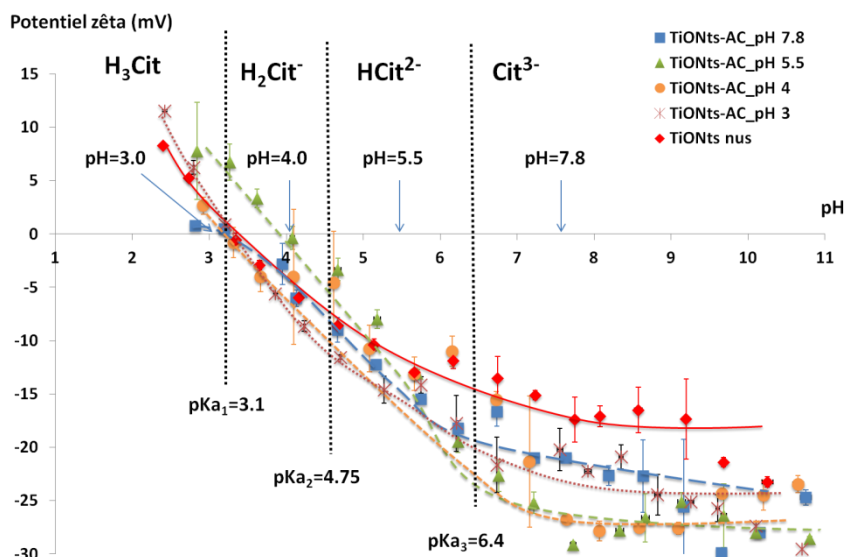


Figure 76 : Evolution du potentiel zêta des nanohybrides TiONts-AC synthétisés pour différents pH de réaction (T=25°C, t= 24h). Mesures dans NaCl 10⁻² M.

Les mesures du potentiel zêta des nanohybrides synthétisés ne montrent pas une grande variation du PIE par rapport aux TiONts nus (Tableau 27). Ce résultat peut être expliqué par le fait que dans chacun des cas étudiés, il n'y a pas une différence de charge entre les TiONts et l'acide citrique. En effet, à pH 3, l'AC et les TiONts sont tous les deux proches de leur pKa₁ et PIE respectivement. A partir du pH 4, ils sont tous les deux chargés négativement.

L'augmentation, en valeur absolue, du potentiel zêta, observée à partir de pH 6 pour les quatre nanohybrides (TiONts-AC) par rapport aux TiONts nus, prouve l'augmentation de la charge négative de surface apportée par l'AC [177]. Cette augmentation est légèrement plus importante dans les échantillons TiONts-AC_pH4 et TiONts-AC_pH5,5 (Figure 76).

Tableau 27: Points isoélectriques (PIE) des TiONts-AC et taux de greffage de l'AC en fonction du pH de la réaction (T=25°C, t=24h).

Echantillon	Point isoélectrique	Taux de greffage de l'acide citrique	
		AC/nm ²	μmol/g TiONts
TiONts nus	3,3	-	-
TiONts-AC_pH=3,0	3,1	0,43	169
TiONts-AC_pH=4,0	3,1	0,44	171
TiONts-AC_pH=5,5	3,8	0,28	111
TiONts-AC_pH=7,8	3,5	0,05	21

Les courbes ATG des nanohybrides TiONts-AC montrent une augmentation de la perte de masse et par conséquent une augmentation du taux de greffage avec la diminution du pH de la réaction. Les résultats de fonctionnalisation à pH 3 et 4 sont très proches et conduisent aux meilleurs taux de greffage (0,43 et 0,44 AC/nm²) (Tableau 27). Cela peut être expliqué par le fait qu'ils sont les plus proches du PIE des TiONts. Dans cette zone de pH, les deux espèces (AC et TiONts nus) ne sont pas ou peu chargées négativement, les interactions entre les deux entités sont donc favorisées en comparaison avec les pH plus élevés, pour lesquels les deux

entités deviennent toutes deux fortement chargées négativement. Un taux similaire d'environ 0,3 AC/nm² a été obtenu par G. Thomas *et al.* pour un greffage sur des nanoparticules d'oxyde de fer [25] dans des conditions plus dures de synthèse (milieu basique : 0,33 M de NaOH et T=150°C). La diminution du taux de greffage avec l'augmentation du pH est un résultat qui a également été rapportée par I. Mudunkotuwa *et al.* pour un greffage de l'AC sur des nanoparticules de TiO₂ [177].

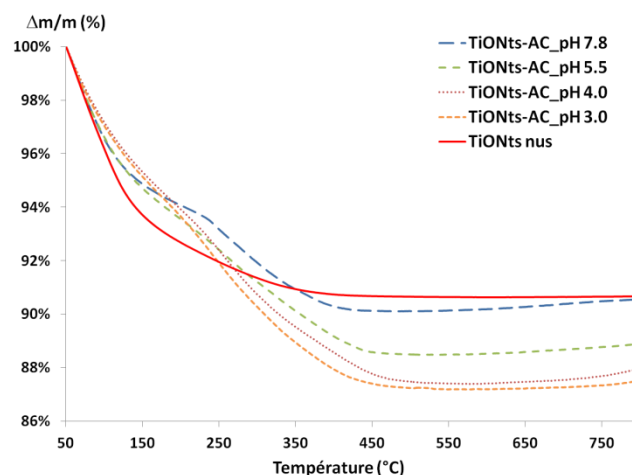


Figure 77 : Courbes ATG des TiONts nus et des nanohybrides TiONts-AC synthétisés à différents pH (T=25°C et t=24h). Analyses sous un débit d'air de 25 mL/min et à une rampe de température de 5°C/min.

La présence de l'acide citrique à la surface des TiONts est prouvée par des analyses élémentaires par XPS (Tableau 28) et par la désomation des spectres C1s et O1s (Figure 78). Les spectres C1s témoignent de la présence du groupement carboxyle dans les deux échantillons analysés (pH 4,0 et 5,5) avec un pourcentage plus important pour l'échantillon TiONts-AC_pH4, en accord avec les résultats ATG (Tableau 27). Ce résultat explique la différence de stabilité en suspension entre ces échantillons (Figure 79). En effet, les TiONts qui ont le plus grand nombre de groupement carboxyles, dans ce cas l'échantillon TiONts-AC_pH4, sont plus stables en suspension au pH physiologique (répulsions électrostatiques, Figure 79).

Tableau 28 : Analyses élémentaires par XPS des nanohybrides TiONts-AC synthétisés à pH 4,0, 5,5 (T=25°C et t= 24h).

Elément	C1s	O1s	NaKLL	Ti2p	Cl2p	C/Ti
TiONts nus	5,6	62,7	5,1	26,2	0,4	0,2
TiONts-AC_pH 4,0	15,9	60,0	1,2	22,9	-	0,7
TiONts-AC_pH 5,5	10,0	64,0	1,4	24,6	-	0,4
AC pur	47,5	52,5	-	-	-	

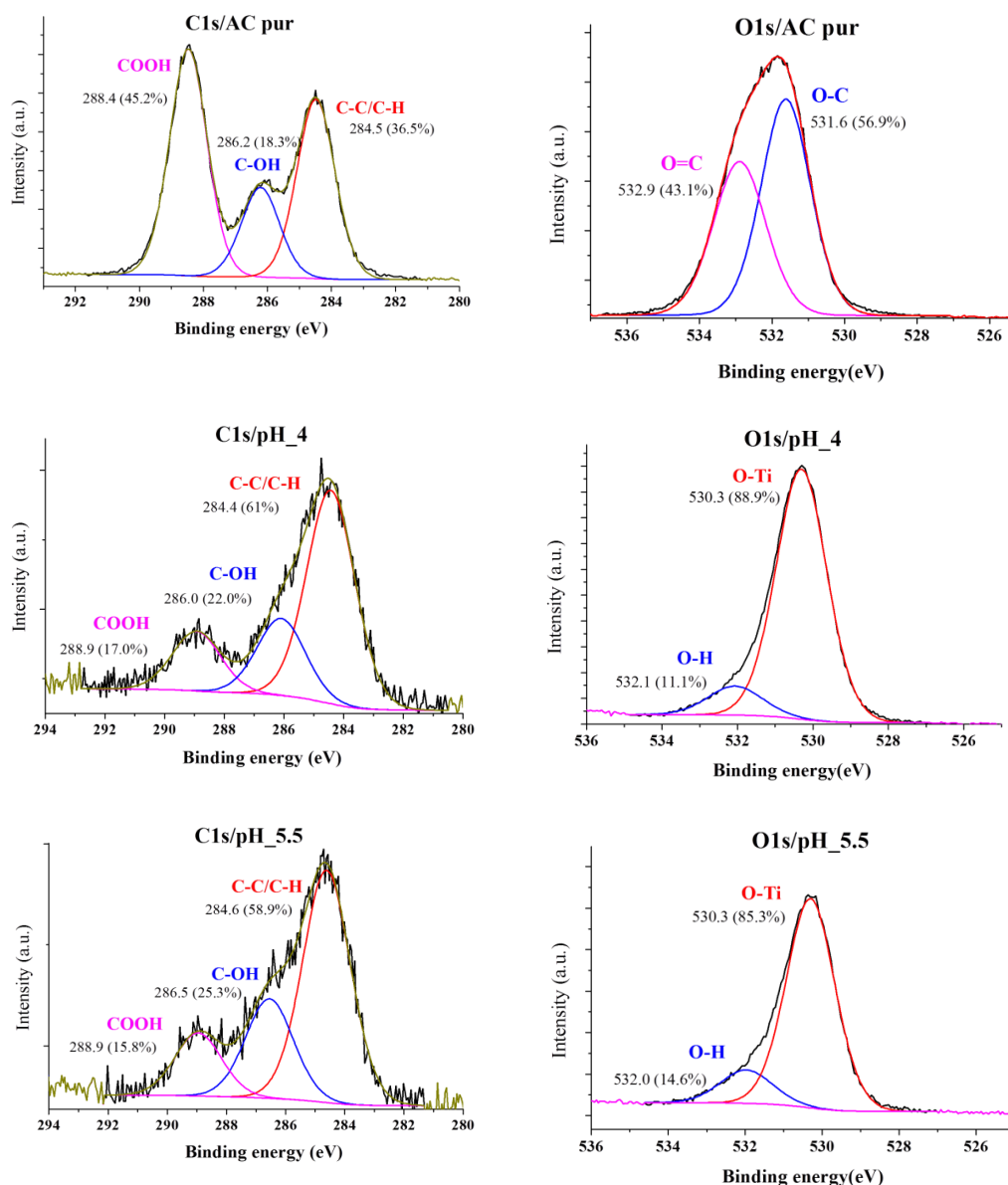


Figure 78: Désommission des spectres XPS C1s et O1s de l'AC pur et des nanohybrides TiONts-AC synthétisés à pH 4,0 et 5,5 (T=25°C, t=24h).

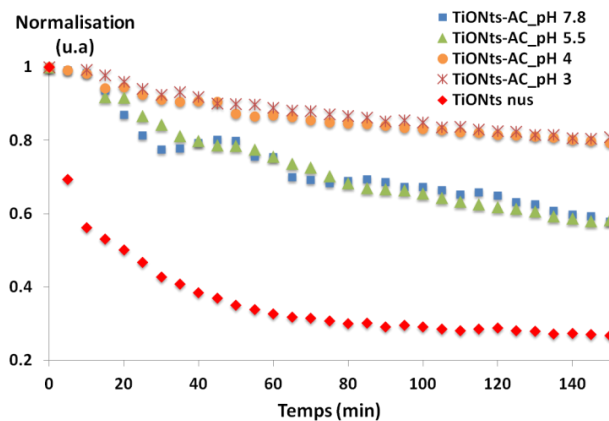


Figure 79 : Suivi de la stabilité des TiONts non greffés en suspension et des nanohybrides TiONts-AC, en fonction du temps et dans le PBS 0,1 M (pH=7,4).

Pour conclure, nous pouvons remarquer que l'affinité des TiONts avec les groupements carboxyles de l'AC est plus faible que celle vis-à-vis les catéchols. En effet, un taux de 171 $\mu\text{mol/g}$ TiONts a été obtenu pour l'AC alors qu'environ 400 et 300 $\mu\text{mol/g}$ TiONts ont été obtenus pour le DHCA et la L-DOPA. Ce résultat est en bon accord avec ce qui a été rapporté dans la littérature pour d'autres matériaux inorganiques [174]. Par contre, une excellente stabilité colloïdale au pH physiologique est observée, pour le nanohybride TiONts-AC, en dépit d'un assez faible taux de greffage. Ce résultat est dû au nombre important de charges négatives portées par cette molécule (-3 à pH=7,4). Ces charges engendrent des répulsions électrostatiques à la surface des TiONts permettant ainsi de réduire leur agglomération.

III.5. Préfonctionnalisation des TiONts avec des organosilanes

Le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) est un alkylsilane qui a été largement utilisé comme intermédiaire de greffage car il dispose de groupements silanols qui forment des liaisons avec les surfaces minérales hydrophiles, il possède également un groupement amine réactif capable d'interagir avec d'autres composés [253]. Le 3-chloropropyltriéthoxysilane (CPTES) est aussi un alkylsilane qui dispose du chlore au lieu de l'amine comme groupement intermédiaire pour l'accrochage de la molécule d'intérêt. Dans cette partie, la préfonctionnalisation des TiONts par ces deux molécules est présentée. Le même protocole expérimental a été utilisé pour les deux molécules.

III.5.1. Procédure expérimentale du greffage des organosilanes à la surface des TiONts

Comme ils ne sont pas suffisamment réactifs pour être spontanément associés aux groupements hydroxyles de la surface des TiONts sans hydrolyse préalable, le greffage des alkylsilanes nécessite un environnement partiellement aqueux comme condition nécessaire [253] (voir le mécanisme de greffage de l'APTES dans le paragraphe I.5.2.2). En effet, plusieurs protocoles expérimentaux dans différents milieux ont été réalisés. Les milieux organiques (toluène et acétone) ont abouti à la formation de nanohybrides très agglomérés et qui ne sont pas stables en milieu aqueux (résultats non présentés). Ainsi, le protocole expérimental retenu pour le greffage de l'APTES et du CPTES est le suivant : les TiONts sont mis dans 47,5 mL d'éthanol absolu. Après 15 min dans le bain à ultrasons, une quantité d'APTES (ou de CPTES) est ajoutée en excès par rapport aux TiONts avec un rapport molaire APTES(CPTES)/(OH)TiONts égal à 2. Un volume de 2,5 mL d'eau ultrapure dont le pH est ajusté à 4 est ajouté goutte à goutte à la suspension (réajuster le pH à 4) qui reste sous agitation magnétique pendant 24 h (Figure 80). Le produit final obtenu est ensuite lavé six fois par ultrafiltration, à travers une membrane de cellulose régénérée de 30 kDa. La poudre est enfin séchée par lyophilisation et les échantillons sont nommés TiONts-APTES et TiONts-CPTES.

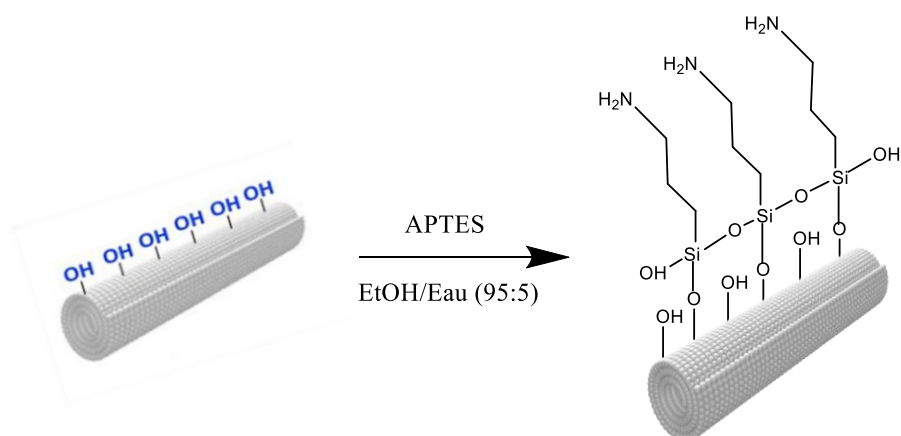


Figure 80 : Représentation schématique du greffage de l'APTES sur les TiONts (pour le CPTES un chlore remplace le groupe NH_2).

III.5.2. Analyse des nanotubes fonctionnalisés par l'APTES et le CPTES

III.5.2.1. Confirmation du greffage des organosilanes à la surface des TiONts

Les mesures du potentiel zêta des nanohybrides synthétisés, dans un milieu 10^{-2} NaCl, prouvent que les deux silanes ont deux effets différents sur la chimie de surface des TiONts (Figure 81). En effet, l'APTES, ayant un groupement amine à caractère basique, porte une charge positive à la surface des TiONts à des pH faibles et alcalins ($\text{pH} < 8,0$: PIE du nanohybride TiONts-APTES). Cette charge positive, qui est due à la protonation des groupements $-\text{NH}_2$, augmente le PIE des TiONts de 3,3 à 8,0 pour le nanohybride TiONts-APTES. Par ailleurs, la courbe du potentiel zêta des TiONts-CPTES présente la même allure que celle des TiONts nus, avec une légère diminution du potentiel zêta et du PIE (de 3,3 pour les TiONts nus à 2,9 pour les TiONts-CPTES). En fait, sachant que la présence de la chaîne chloropropyl ne doit pas influencer la chimie de surface du nanohybride, comme il a été rapporté par T. Jesionowski *et al.* [254], cette variation du potentiel zêta peut être due à la présence des hydroxyles des silanols à la surface des TiONts.

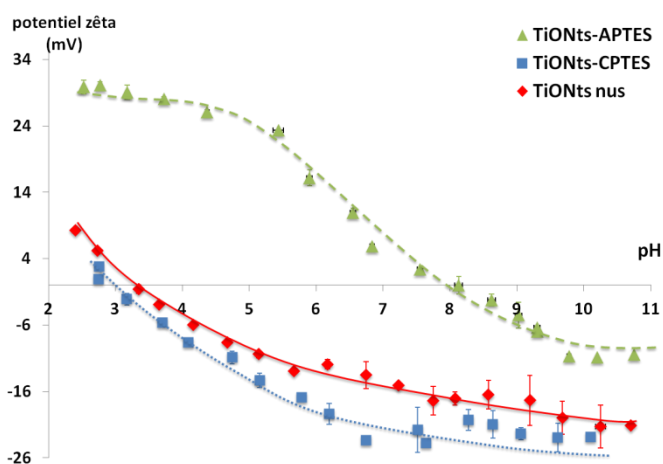


Figure 81 : Courbes du potentiel zêta en fonction du pH des TiONts non greffés et des deux nanohybrides TiONts-APTES et TiONts-CPTES ($\text{NaCl } 10^{-2}$ M).

La détermination du taux de greffage par ATG, à partir de la formule 2 (III.3.1.1), montre un taux de greffage plus important pour le nanohybride TiONts-APTES (Tableau 29). Cette différence peut être expliquée par une possibilité de condensation entre les APTES pour former plusieurs couches ou s'adsorber par leur groupements amines à la surface des TiONts.

Tableau 29 : Caractéristiques des nanohybrides TiONts-APTES et TiONts-CPTES (valeurs moyennes pour n échantillons, n=3).

Caractéristiques	PIE	Perte de masse $\Delta m/m(\%)$ par rapport aux TiONts nus (50-800°C)	Masse molaire de la molécule dégradée (g/mol)	Taux de greffage	
				Molécule/nm ²	$\mu\text{mol/g}$ TiONts
TiONts nus	$3,3 \pm 0,2$	-	18	$6,7 \pm 1,7$	2700 ± 500
TiONts-APTES	$8,0 \pm 0,3$	$7,4 \pm 2,3$	58	$3,1 \pm 1,3$	525 ± 200
TiONts-CPTES	$2,9 \pm 0,3$	$5,6 \pm 0,8$	77	$1,8 \pm 0,3$	360 ± 54

La comparaison entre les courbes ATG/DTG des deux nanohybrides, montre que les pertes de masse pour l'échantillon TiONts-APTES commencent à des températures plus élevées ($T > 250^\circ\text{C}$) en comparaison avec l'échantillon TiONts-CPTES ($T > 150^\circ\text{C}$), sans tenir compte de la perte de masse avant 150°C qui ne peut être que de l'eau physisorbée. Cela pourrait être dû à la quantité de matière organique dans l'échantillon TiONts-APTES qui retarderait le dégagement de l'eau qui se trouve piégée dans les TiONts (Figure 82).

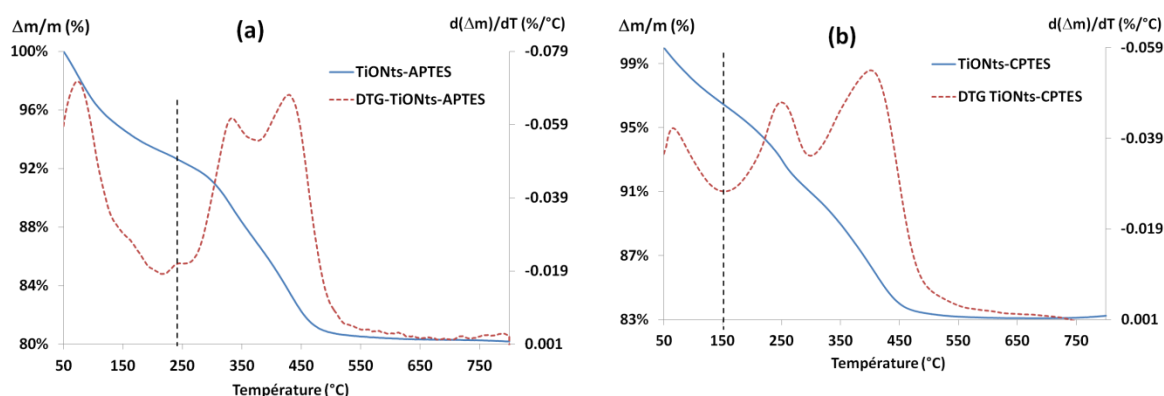


Figure 82 : Courbes ATG/DTG des nanohybrides (a) TiONts-APTES et (b), analyse sous air, 25 mL/min, rampe 5°C/min .

L'analyse par spectroscopie IR des nanohybrides obtenus ne permet pas d'avoir un signal clair de l'organosilane greffé à cause de la forte absorbance des TiONts nus. Afin d'améliorer la sensibilité des analyses, les mesures sont réalisées en utilisant les TiONts nus comme échantillon de référence pour l'analyse. Cette méthode permet d'extraire l'absorbance des TiONts de celle des nanohybrides tout en augmentant la sensibilité du signal de la molécule greffée.

Le spectre de l'échantillon TiONts-APTES (Figure 83a) montre la présence des bandes caractéristiques de l'APTES. En fait, la bande de vibration vers 880 cm^{-1} et la large bande vers $975\text{--}1120\text{ cm}^{-1}$ (centrée à 1045 cm^{-1}) sont attribuées aux modes de vibrations de déformation des Si-OH et d'élongation de la liaison Si-O-Si respectivement [255, 256]. La présence de cette

dernière montre la condensation entre les molécules d'APTES comme il est schématisé à la Figure 80. Les bandes situées à 1222, 1590 et 3418 cm^{-1} sont relatives aux vibrations du groupement amine primaire : élongation de la liaison C-N, déformation et élongation de la liaison N-H respectivement [162, 253]. La présence de la chaîne carbonée est mise en évidence par la présence des bandes situées à 2917 et 2950 cm^{-1} qui sont attribuées aux vibrations d'élongations des CH_2 .

Le spectre IR du nanohybride TiONts-CPTES montre des bandes de vibration des silanols, dans les mêmes positions que celles de l'échantillon TiONts-APTES (Figure 83b). On note bien évidemment l'absence des bandes de vibration de l'amine dans cet échantillon qui sont remplacées par la bande de vibration d'élongation de la liaison C-Cl vers 800 cm^{-1} . Le spectre des TiONts-CPTES met en évidence, clairement, la présence de la bande de vibration de la liaison Ti-O-Si vers 950 cm^{-1} [162, 253] confirmant ainsi la formation d'une liaison chimique covalente entre cet organosilane et les TiONts.

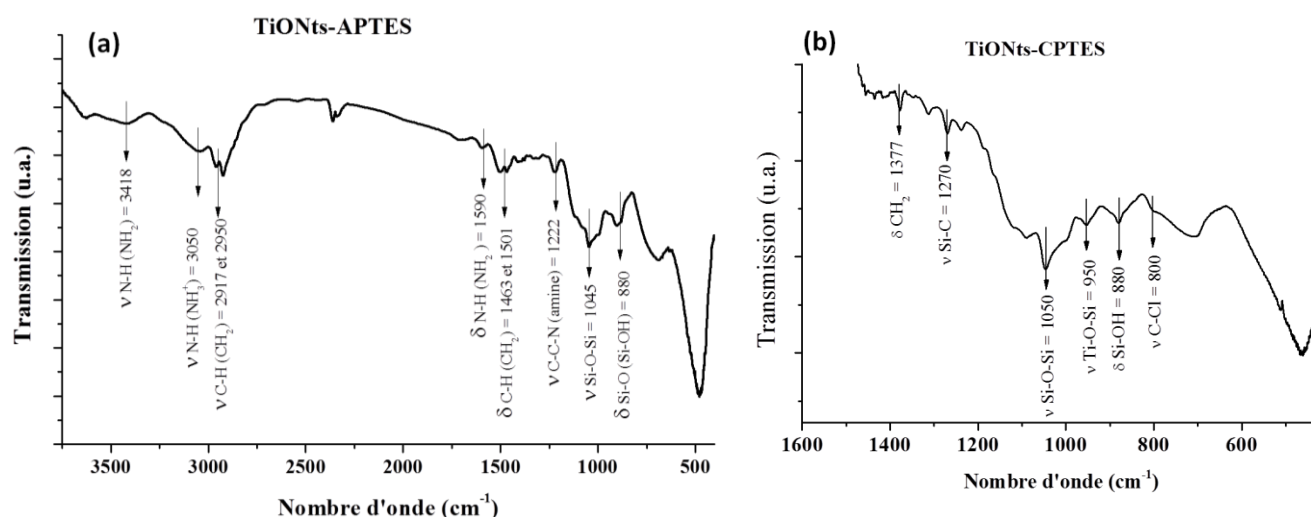


Figure 83 : Spectre IR des nanohybrides (a) TiONts-APTES et (b) TiONts-CPTES. Pastilles KBr. Le spectre de référence soustrait est celui des TiONts nus.

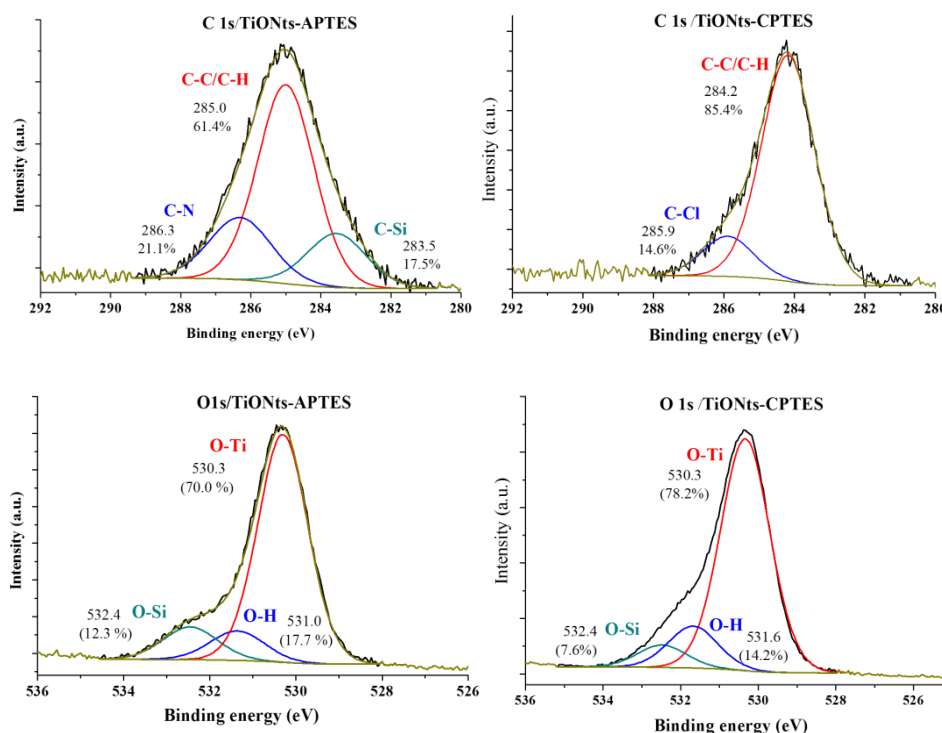
La présence de la matière organique à la surface des TiONts, après leur modification de surface par les organosilanes, est illustrée par des analyses élémentaires par XPS à travers l'augmentation des pourcentages de carbone, de silicium et d'azote(APTES)/chlore(CPTES) (Tableau 30). Une présence plus abondante de l'organosilane est illustrée par un pourcentage plus important de celui-ci dans le nanohybride TiONts-APTES, ce qui confirme le résultat précédemment obtenu par ATG.

Tableau 30 : Analyse chimique élémentaire par XPS des TiONts-APTES et des TiONts-CPTES (pourcentage atomique, %).

Eléments	C1s	O1s	NaKLL	Ti2p	N1s	Si2p	Cl2p	C/Ti
TiONts nus	5,6	62,7	5,1	26,6	-	-	0,6	-
TiONts-APTES	17,6	54,6	-	18,8	4,2	4,8	-	0,9
TiONts-CPTES	15,4	58,9	0,9	18,0	-	3,8	3,0	0,85

Le spectre C1s de l'échantillon TiONts-APTES prouve la présence de trois types de contributions qui sont attribuées comme suit : C-Si, C-C/C-H et C-N. L'énergie de la liaison C-N (dans C-NH₂) est décalée vers les plus grandes valeurs (286,3 eV) par rapport à la liaison C-C/C-H de la chaîne carbonée (285,0 eV), prise comme référence. Ce décalage s'explique par une électronégativité plus élevée de l'atome d'azote par rapport au carbone. En contrepartie, l'énergie de liaison de la contribution C-Si est décalée vers une plus faible énergie de liaison (283,5 eV) par rapport aux liaisons C-C/C-H [257]. Un pic à une énergie de liaison similaire (283,3 eV) a également été observé, par K. Boukerma *et al.*, pour la liaison C-Fe [258]. Par ailleurs, les pourcentages des deux contributions C-Si (17,5%) et C-N (21,1%) sont proches. Ce résultat est logique d'après la formule théorique de l'APTES greffé (un N pour un Si) (Figure 80). Cependant, ces valeurs sont inférieures aux pourcentages théoriques (33,3%), ce qui peut être expliqué par la présence d'une contamination au carbone dans cet échantillon. Le greffage de l'APTES est également prouvé par l'apparition d'une nouvelle contribution (O-Si) dans le pic de l'oxygène, décalée vers les valeurs d'énergie de liaison élevées (532,3eV) par rapport à la contribution de référence (O-Ti, 530,3 eV). Ce décalage s'explique par une électronégativité plus importante du silicium par rapport au titane. D'autre part, deux contributions sont présentes dans le pic N1s (399,7 eV et 401,6 eV) qui sont relatives aux groupements amines protonés et non protonés respectivement [259].

Dans le spectre C1s du nanohybride TiONts-CPTES, la contribution C-Cl apparaît clairement à une énergie de liaison élevée (285,9 eV) justifié par la forte électronégativité du Cl. Le pourcentage de la contribution O-Si dans le spectre de l'oxygène est plus faible que celle dans les TiONts-APTES (7,6%) ; ceci à cause d'un taux de greffage plus faible dans le cas du CPTES. Finalement, le spectre Cl2p ne présente qu'une seule contribution.



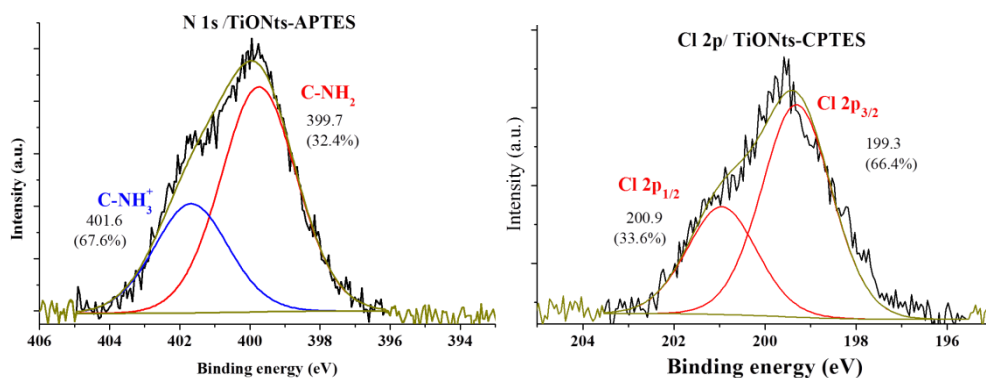


Figure 84: Spectres XPS C1s, O1s, N1s (APTES) et Cl2p (CPTES) des nanohybrides TiONts-APTES et TiONts-CPTES.

III.5.2.2. Etude de l'état de dispersion des nanohybrides élaborés

Les résultats de la stabilité obtenus par les mesures UV-visible montrent une meilleure stabilité dans le temps, pour le système TiONts-CPTES. En effet, durant les 40 premières minutes, les deux nanohybrides présentent le même comportement et maintiennent une bonne stabilité en suspension (Figure 85). En revanche, après 40 minutes, le nanohybride TiONts-CPTES garde une stabilité constante avec environ 70 % des nanohybrides en suspension, alors que l'échantillon TiONts-APTES décante rapidement pour rejoindre la stabilité des TiONts nus après 2h30. Cette différence peut provenir du milieu qui est riche en tampon phosphate. Les phosphates sont chargés négativement et peuvent s'adsorber à la surface des TiONts-APTES qui présentent une surface chargée positivement à ce pH (7,4) en raison des groupements amines. Par interaction électrostatique avec ces phosphates une agglomération des TiONts-APTES est observée. Cette interaction ne peut pas avoir lieu avec le nanohybride TiONts-CPTES vu sa nature chimique (Figure 81).

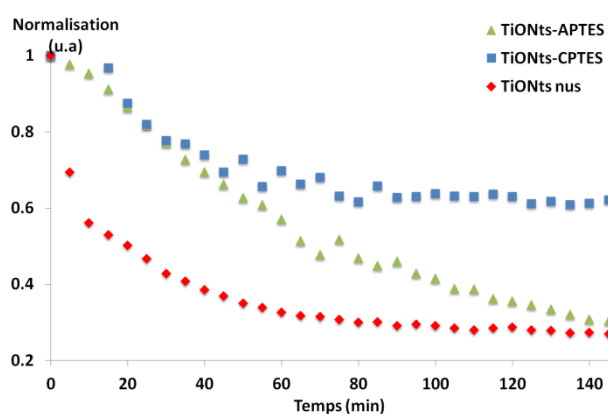


Figure 85: Suivi de la stabilité des nanohybrides TiONts-APTES et TiONts-CPTES en fonction du temps en comparaison avec les TiONts-nus (PBS 0,1 M, pH=7,4).

Les images MET des deux nanohybrides montrent une assez bonne dispersion des TiONts modifiés par les organosilanes avec la conservation de la même morphologie tubulaire (Figure

86). Le greffage de l'APTES, Figure 86 est visible par la présence d'une couche (entourée en jaune) à la surface des TiONts.

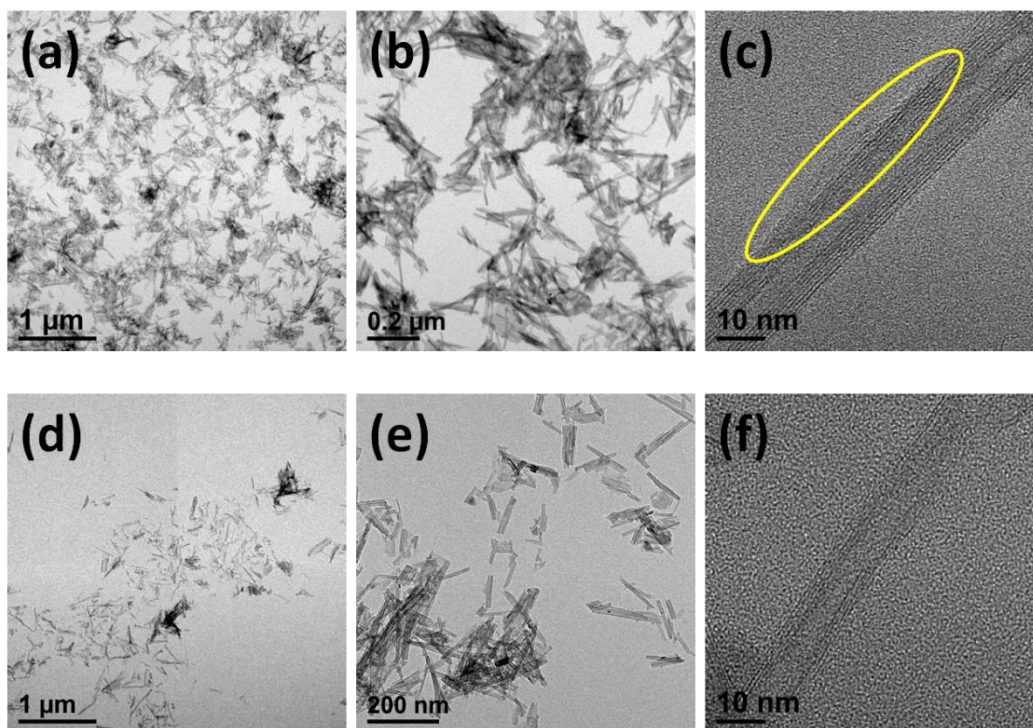


Figure 86 : Clichés MET des nanohybrides (a-c) TiONts-APTES et (d-f) TiONts-CPTES dans l'eau.

III.6. Résultats majeurs et conclusions

Dans ce chapitre, la fonctionnalisation des TiONts par deux catéchols (DHCA et L-DOPA) a été évaluée. L'effet du pH et du temps de la réaction a été étudié pour la première fois sur ce type de matériaux. Il a été établi qu'un pH faible de 2,0 est le plus adéquat pour avoir un meilleur greffage et une stabilité colloïdale accrue pour le DHCA. En revanche, un pH élevé de 10 a abouti à de meilleurs taux de greffage pour la L-DOPA. Cependant, une étude de l'effet du pH sur l'état d'oxydation de la L-DOPA a montré qu'à pH élevé, une oxydation de cette molécule conduit à la formation de dopachrome qui ne présente pas la même structure chimique que la L-DOPA. Il a également été montré que l'oxydation de la L-DOPA s'accroît en présence des TiONts. Pour cette raison, un pH faible (pH=2,0) a également été choisi pour le greffage de la L-DOPA, ceci afin de conserver la fonction amine libre. Le comportement différent des deux molécules vis-à-vis des TiONts a été expliqué par un mécanisme de greffage différent pour chacune des molécules.

L'étude de l'effet du temps de la réaction sur le taux de greffage prouve que l'adsorption des catéchols sur les TiONts augmente en fonction du temps : jusqu'à 48 h pour le DHCA et 24 h pour la L-DOPA, avec un détachement possible de cette dernière après 26-30 h de réaction. Le suivi de la cinétique d'adsorption des deux catéchols en fonction du temps montre que leur mécanisme d'adsorption se produit en deux étapes : une première adsorption qui se fait immédiatement lors de la mise en contact avec les TiONts (entre 0 et 2 h de réaction) et une

deuxième qui se produit après 21h environ et cela pour les deux concentrations étudiées (0,05 mg/mL et 0,2 mg/mL). C'est la première fois que ce phénomène est mis en évidence.

Une méthode spectroscopique par UV-visible a été employée, afin de quantifier les catéchols greffés sur les TiONts ; cette méthode a été comparée avec la méthode gravimétrique, habituellement utilisée dans l'équipe d'accueil. Des résultats proches ont été obtenus lors de l'utilisation de la centrifugation comme technique de purification, ce qui a permis de conclure sur la fiabilité de la méthode thermogravimétrique dans ce cas, pour le calcul du taux de greffage. Les conditions optimisées de fonctionnalisation ont conduit à un taux de $(1,05 \pm 0,2)$ DHCA/nm² et $(0,8 \pm 0,2)$ L-DOPA/nm² de nanotubes. La stabilité colloïdale des nanotubes a été améliorée dans les deux cas.

Le greffage de l'acide citrique a quant à lui amélioré la stabilité colloïdale des TiONts au pH physiologique en raison de sa charge négative, en dépit de son taux de greffage faible ($0,44$ AC/nm²), en comparaison avec les catéchols. Par ailleurs, une dépendance du taux de greffage en fonction du pH a été observée. En effet, le taux de greffage de l'AC diminue avec l'augmentation du pH de 3,0 à 7,8.

La préfonctionnalisation de la surface des TiONts par deux organosilanes, l'APTES et le CPTES, a abouti à l'élaboration de deux nanohybrides dont la chimie de surface dépend de la nature de la molécule greffée (groupement amine pour l'APTES et groupement chlore pour le CPTES). Par ailleurs, un taux de greffage globalement plus important pour l'APTES ($(3,1 \pm 1,3)$ APTES/nm²) que pour le CPTES ($(1,8 \pm 0,3)$ CPTES/nm²) a été obtenu. La nature covalente des liaisons avec les TiONts a été prouvée par XPS et IR (dans le cas du CPTES). Par contre, une meilleure stabilité colloïdale en fonction du temps a été observée pour le nanohybride TiONts-CPTES, un résultat qui a été attribué à des interactions possibles des nanohybrides TiONts-APTES avec le milieu d'étude (PBS).

Chapitre IV.
VERS L'ELABORATION D'UN NOUVEAU
NANOVECTEUR A BASE DE TiONts...
GREFFAGE D'UN PHENOL
STILBENIQUE ET AMELIORATION DE LA
BIOCOMPATIBILITE DES TiONts PAR LE
CHITOSAN

IV.1. Introduction : contexte et objectifs

Une fois préfonctionnalisés, les TiONts deviennent prêts à porter la molécule d'intérêt, à savoir ici le 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-*trans*-stilbène, un phénol stilbénique, structuellement proche du *trans*-resvératrol (TR), qui a prouvé son efficacité dans plusieurs applications [35] (paragraphe I.5.4.2). Cependant, son utilisation reste limitée à cause de sa faible solubilité et son prompt métabolisme dans l'organisme (paragraphe I.5.4). Afin de pallier ces problèmes, la vectorisation vers les cellules cibles ou l'injection intratumorale, grâce au greffage de cette molécule sur les TiONts, sont des solutions à envisager. A notre connaissance, le greffage d'un phénol stilbénique, ici le 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-*trans*-stilbène, appelé HAPtS dans ce manuscrit, sur un matériau inorganique, est une première. Il est donc primordial d'adopter une méthode adéquate pour la fonctionnalisation des TiONts par le phénol stilbénique et pour optimiser la quantité greffée. Ainsi, le premier objectif de ce chapitre est de trouver une méthode de greffage adéquate de ce dérivé stilbénique sur les TiONts. Le 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-*trans*-stilbène (HAPtS) a été synthétisé par voie chimique à l'ICMUB (Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne), dans l'équipe du Dr. Dominique Vervandier-Fasseur, en ajoutant à la molécule un espaceur présentant un groupement fonctionnel terminal permettant le greffage sur divers substrats, dont les TiONts. Des essais de greffage sur des SPIONs ont également été menés en parallèle de cette étude.

Le deuxième objectif de ce chapitre est l'amélioration de la biocompatibilité des TiONts. La biocompatibilité est un critère de base dans l'élaboration d'un nanovecteur car elle lui permet de franchir les barrières biologiques et d'échapper au système immunitaire. C'est pour cette raison que la modification de la surface du nanovecteur par un polymère de biocompatibilité est considérée comme une étape primordiale et indispensable (paragraphe I.5.3). Afin de conférer une très bonne biocompatibilité aux TiONts, une modification de leur surface par une macromolécule naturelle, dans notre cas le chitosan, s'avère une étape incontournable. Le choix du chitosan (CT) est basé sur ses propriétés intéressantes et sur sa large utilisation dans le domaine médical (voir paragraphe I.5.3.2). L'objectif est aussi de remplacer le polyéthylène glycol (PEG), le polymère le plus utilisé pour améliorer la furtivité et la biocompatibilité des nanoparticules, alors même que plusieurs études récentes ont prouvé ses limites (voir paragraphe I.5.3.2). Ainsi, une méthode adéquate de greffage du chitosan doit être mise en place. Enfin, l'efficacité de cette macromolécule doit être évaluée. Cette partie fait l'objet d'un deuxième article scientifique publié dans le journal Dalton Transactions, intitulé : Synthesis and characterization of chitosan-coated titanate nanotubes: towards a new safe nanocarriers (<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/dt/c7dt03029k/unauth#!divAbstract>).

IV.2. Présentation de la molécule HAPtS, un phénol stilbénique

Avant de parler de la modification de la surface des TiONts par le 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-*trans*-stilbène (HAPtS), il faut préciser qu'il s'agit d'une molécule synthétique qui a été adaptée pour cette fin. Cette adaptation consiste en l'ajout d'un espaceur, qui est une chaîne organique, avec une terminaison amine susceptible d'interagir avec

les groupements fonctionnels de surface des TiONts préfonctionnalisés et présentés au troisième chapitre.

IV.2.1. Contexte et synthèse du phénol stilbénique HAPtS

La synthèse du phénol stilbénique a été effectuée dans le cadre du projet de fin d'études (INSAT) de Rihab Hajji au sein de l'ICMUB (Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne). Durant ce stage, Rihab a été chargée de synthétiser un phénol stilbénique en lui ajoutant une chaîne organique portant un groupement fonctionnel réactif ici une amine, tout en conservant le groupement hydroxyle en position 4' dans la molécule, conformément à la Figure 87, car le groupement hydroxyle à cette position est responsable de l'activité antioxydante des analogues du *trans*-resvératrol [260]. L'amine permet le greffage de ce composé sur les TiONts et/ou les SPIONs synthétisés au sein de l'équipe BH2N de l'ICB (Figure 91).

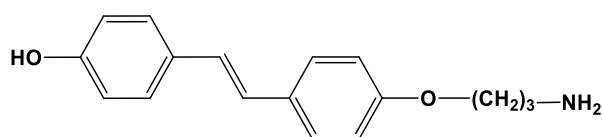


Figure 87 : Formule semi-développée du dérivé stilbénique synthétisé, le 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-*trans*-stilbène.

La synthèse de ce composé stilbénique est réalisée selon la réaction de Wittig [261]. Le schéma réactionnel de la synthèse est donné Figure 88.

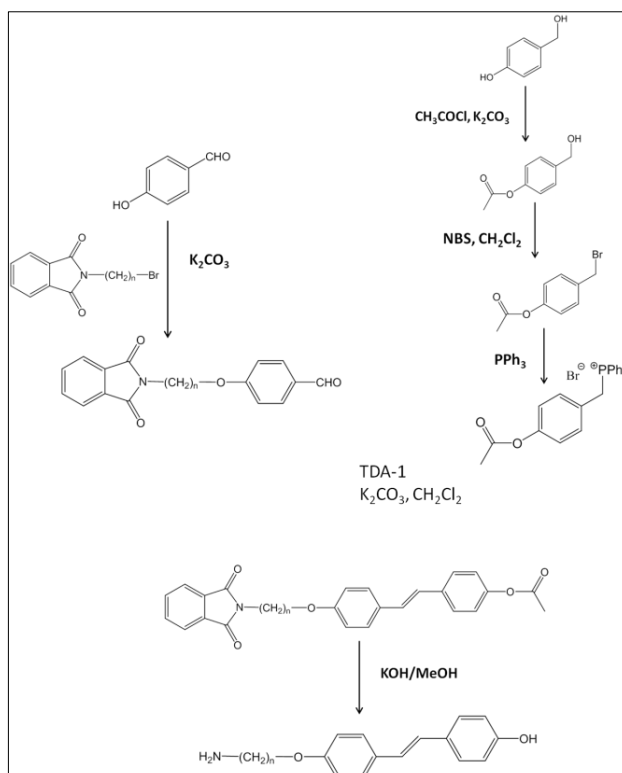


Figure 88 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de la synthèse organique du 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-*trans*-stilbène (HAPtS).

IV.2.2. Etude de la conformité de la molécule synthétisée par rapport à la formule chimique espérée

Il est important, avant de passer à l'étape suivante, de caractériser la molécule d'intérêt à l'issue de la synthèse. En plus de l'analyse par RMN qui a été effectuée à l'ICMUB (Annexe 5) et qui montre la présence de tous les signaux caractéristiques des protons de la molécule, d'autres techniques de caractérisations sont également utilisées à l'ICB afin de vérifier la conformité de la molécule synthétisée (Figure 87). Ces caractérisations serviront en outre de références pour prouver ensuite la réussite du greffage sur les TiONts.

La Figure 89 présente les spectres IR et UV-Visible de la molécule à l'issue de la synthèse. Le spectre IR prouve la présence de la majorité des bandes caractéristiques du dérivé stilbénique synthétisé : les bandes de vibrations par élongation des groupements NH_2 et OH sont situées à 3417 et 3260 cm^{-1} respectivement et celles des groupements CH_2 ($\nu\text{ CH}_2$) sont à 2960 et 2875 cm^{-1} . La présence des liaisons $\nu\text{ C-O}$, $\nu\text{ C-O-C}$ et $\nu\text{ C-N}$ est illustrée par une large bande intense à 1250 cm^{-1} ainsi que par deux bandes moins intenses et plus fines qui se trouvent vers 1030 et 1070 cm^{-1} . Les bandes de vibrations des doubles liaisons $\text{C}=\text{C}$ intra et inter noyaux aromatiques sont situées respectivement à 1560 cm^{-1} (bande large et intense) et 1600 cm^{-1} (bande fine). La vibration par déformation de la liaison C-H des noyaux aromatiques ($\delta\text{ C-H}$) apparaît à 830 cm^{-1} . La majorité de ces bandes relatives au 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-*trans*-stilbène ici synthétisé et communes avec le *trans*-resvératrol (TR) sont conformes aux travaux de la littérature [262].

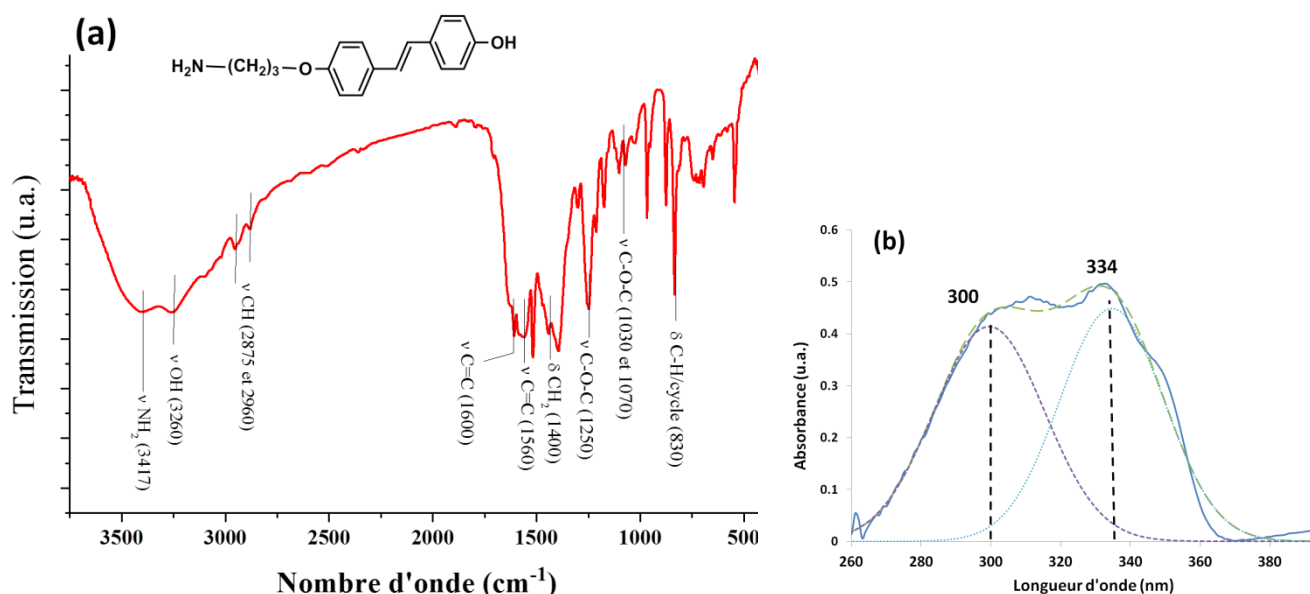


Figure 89 : Caractérisation du 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-*trans*-stilbène (HAPtS) (a) spectre IR (pastille KBr) (b) spectre UV-Visible (dans le DMSO).

Le spectre UV-Visible est obtenu après dissolution du HAPtS dans le DMSO (Figure 89b). Ce spectre montre la présence d'une bande large avec deux contributions centrées respectivement à 300 et 334 nm et qui sont caractéristiques d'un analogue du *trans*-resvératrol avec la présence éventuelle d'une troisième contribution due à des impuretés (vers 350 nm). La deuxième position (334 nm) indique la déprotonation de l'hydroxyle du HAPtS selon l'étude

de J. Manuel *et al.* [260], ce qui est logique dans notre cas puisque la synthèse et l'extraction de la molécule sont effectuées dans un milieu basique (KOH/MeOH) (Figure 88).

L'analyse chimique par XPS montre quant à elle une similarité entre les pourcentages élémentaires expérimentaux et ceux théoriques pour le dérivé stilbénique synthétisé (Tableau 31). La présence du potassium peut être justifiée par l'utilisation de la potasse dans les réactions de la synthèse (Figure 88). La silice est présente ici comme impureté et provient de l'étape de purification qui se fait par chromatographie sur couche mince.

Tableau 31 : Comparaison entre les pourcentages élémentaires expérimentaux obtenus par XPS et ceux théoriques du 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-*trans*-stilbène (HAPtS).

Elément	C1s	O1s	N1s	Si2p	K2s	Ca2p	N/C
Pourcentage expérimental (%)	78,2	15,6	3,2	1,5	0,9	0,6	0,04
Pourcentage théorique (%)	85,0	10,0	5,0	-	-	-	0,06

La désomation du spectre C1s montre la présence d'une composante C=O qui peut être attribuée aux groupements carbonyles qui peuvent être présents dans un sous-produit utilisé dans l'étape qui précède l'étape finale de synthèse en l'occurrence avant l'étape de déprotection de l'hydroxyle. Cette molécule peut représenter un produit minoritaire dans l'échantillon (Figure 88). Par ailleurs, le rapport expérimental de la composante C-O/C-N (20,5%) par rapport à la composante C-C/C-H (69,8%) est d'environ 30%. Or, d'après la formule chimique, ce rapport vaut $(23,5/76)=30,9\%$ (Figure 90), ce qui prouve la conformité de la proportionnalité entre ces types de liaisons. Le pic de l'oxygène montre quant à lui deux composantes qui indiquent la présence de deux types d'oxygène dans le composé, avec des pourcentages de 56,7 % et de 43,3 % (le pourcentage théorique entre les liaisons C-O-C et C-O-H est de 50%), ce qui est relativement conforme avec la formule du dérivé recherché. Ce petit écart, peut être la conséquence de la présence du sous-produit de synthèse déjà évoqué plus haut (HAPtS protégé) pour lequel le pourcentage théorique de la liaison C-O-C est plus important que celui du HAPtS pur. Par ailleurs, une seule composante est présente dans le pic de l'azote à 400,1 eV ce qui suggère la présence d'un seul type d'azote, ici les fonctions amines C-NH₂ (Figure 90). Les fonctions C-NH₃⁺, souvent observées ne sont pas présentes, en raison du pH élevé de synthèse, tel que déjà indiqué [25].

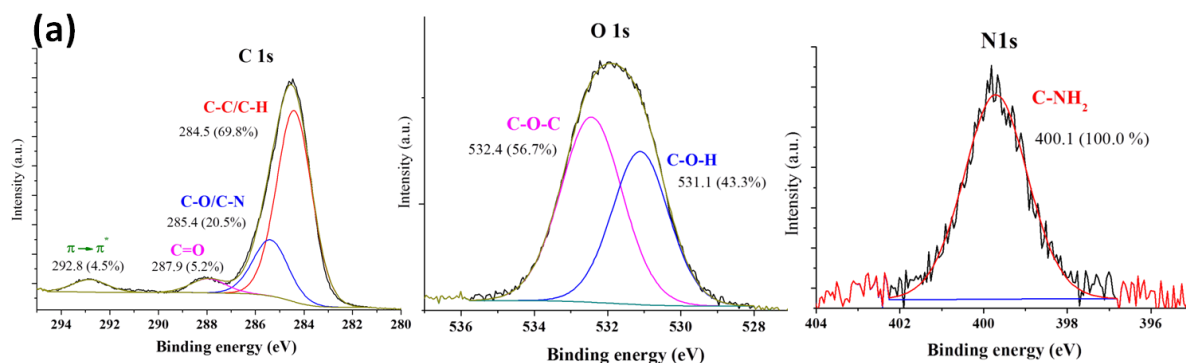


Figure 90 : Désomation des spectres XPS C1s, O1s et N1s du 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-*trans*-stilbène (HAPtS).

En conclusion, les techniques d'analyse spectroscopiques (IR, UV-Vis et XPS) prouvent que la molécule synthétisée correspond à la formule chimique recherchée qui représente le produit majoritaire de l'échantillon. Passons maintenant à la deuxième étape qui consiste à greffer cette molécule à la surface des TiONts préfonctionnalisés. Notons que le produit minoritaire devrait être éliminé lors des étapes de lavage du nanohybride puisqu'il ne devrait pas se greffer à la surface des nanotubes.

IV.3. Modification de surface des TiONts par le phénol stilbénique 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-*trans*-stilbène (HAPtS)

L'objectif de ce paragraphe est de réussir le greffage du phénol stilbénique sur des TiONts préfonctionnalisés et d'optimiser la quantité greffée (Figure 91). Le greffage utilise deux types de TiONts préfonctionnalisés qui ont été développés dans le chapitre III : les TiONts modifiés par un catéchol (TiONts-DHCA) et les TiONts modifiés par un organosilane (TiONts-CPTES).

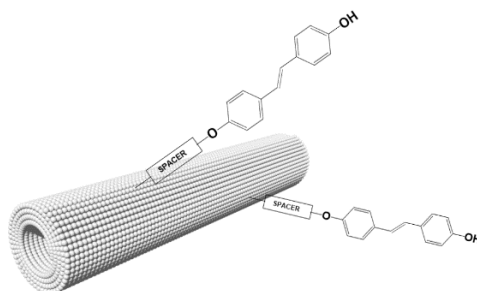


Figure 91 : Schéma représentant l'accrochage du composé stilbénique sur les TiONts.

IV.3.1. Greffage du phénol stilbénique sur des TiONts préfonctionnalisés par le DHCA : TiONts-DHCA-HAPtS

Dans un premier temps, l'objectif est de faire réagir la fonction amine du HAPtS avec la fonction acide carboxylique libre du DHCA, préalablement greffé sur les TiONts, à travers la formation d'une fonction amide entre les deux molécules.

Comme il est connu, la formation d'une liaison amide entre une amine et un acide carboxylique n'est pas une réaction spontanée et nécessite une activation préalable du groupement carboxyle par un agent de couplage. Parmi les agents de couplage les plus utilisés il y a le couple EDC/NHS [263-265] ou le PyBOP [266] qui seront employés et comparés dans cette étude.

IV.3.1.1. Activation du groupement COOH du DHCA par le couple EDC/NHS

La synthèse des TiONts préfonctionnalisés par le DHCA (TiONts-DHCA) est réalisée selon les conditions expérimentales du chapitre III (paragraphe III.3.4). Concernant le greffage du HAPtS, il est effectué en deux étapes : une étape d'activation de l'acide carboxylique du

DHCA pour former un ester (Figure 92-1) et une deuxième étape de formation de l'amide (Figure 92-2).

Pour la première étape : 35,0 mg de TiONts-DHCA (480 μmol DHCA/g TiONts, $S_{\text{BET}}=(191\pm1)$ m^2/g) et 5 mL de DMSO sont introduits dans un tube de Schlenk mis sous flux d'azote et soumis à une agitation magnétique. Ensuite, 115,09 mg de NHS (soit 0,1 M) et 77,6 mg d'EDC (soit 0,2 M) sont ajoutés dans 5 mL de DMSO et la suspension est maintenue sous agitation magnétique pendant 1h30 à 25°C. Pour rappel, le DMSO, solvant polaire organique, est choisi plutôt que l'eau en raison de la mauvaise dissolution du phénol stilbénique en phase aqueuse. La suspension est lavée plusieurs fois par le DMSO et filtrée sur Büchner en utilisant une membrane en nylon de 40 kDa. Les nanotubes activés sont réintroduits dans 5 mL du même solvant (tube de Schlenk). Il faut noter ici que l'expérience montre que le lavage après l'étape d'activation donne un meilleur résultat par rapport une réaction à une seule étape avec un seul lavage à la fin de la deuxième étape (résultats non présentés).

Pour la deuxième étape, 9,0 mg de HAPtS (quantité 2 fois en excès en rapport molaire, $\text{NH}_2(\text{HAPtS})/\text{COOH}(\text{DHCA}) = 2$) sont ajoutés à la suspension de TiONts-DHCA ; la suspension est maintenue sous flux d'azote et agitation magnétique pendant 15 h, à 25°C. Finalement, le lavage de la poudre récupérée est effectué sur Büchner plusieurs fois au DMSO puis à l'eau ultrapure (UP).

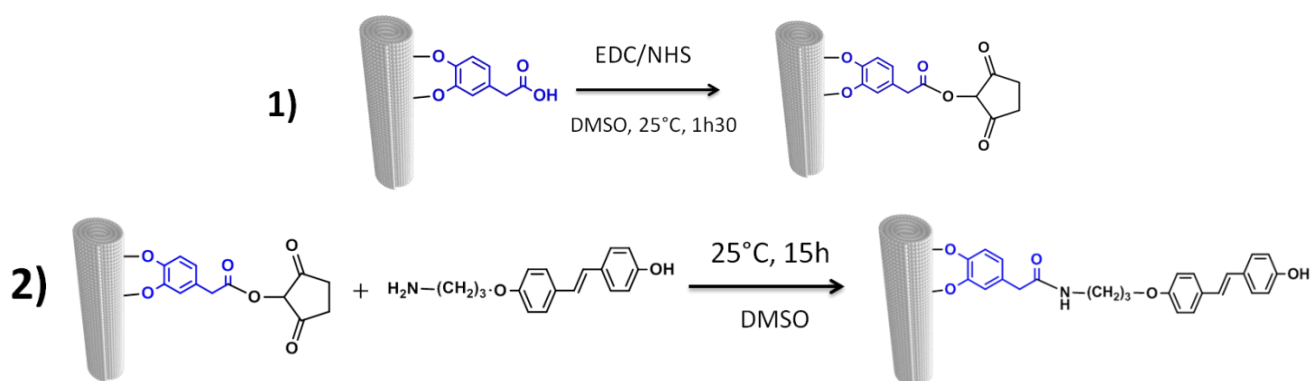


Figure 92 : Schéma de synthèse des TiONts-DHCA-HAPtS (1) étape d'activation du COOH du DHCA par le couple EDC/NHS et formation d'un ester (2) étape de greffage du HAPtS par couplage peptidique.

IV.3.1.2. Activation du groupement COOH du DHCA par le PyBOP

La deuxième voie d'activation du groupement carboxyle utilise le PyBOP (hexafluorophosphate de benzotriazololyoxy-tris [pyrrolidino]–phosphonium) comme agent de couplage (Figure 93). C'est un analogue du BOP avec deux groupements méthylamines remplacés par la pyrrolidine, pour des raisons de sécurité car l'utilisation du BOP génère un produit toxique (triamide hexaméthylphosphorique (HMPA)) [266].

Pour la fonctionnalisation : 35,8 mg des TiONts-DHCA (même lot que celui utilisé pour l'activation avec le couple EDC/NHS) et 14,5 mg du PyBOP (soit deux fois en excès par rapport au DHCA, en rapport molaire) sont mis sous agitation, sous flux d'azote, pendant 30 minutes. Ensuite, 32,3 μL de DIEA (N,N-diisopropyléthylamine, une base organique) et 9,2 mg de HAPtS, dissouts dans 2 mL de DMSO, sont ajoutés. Le rôle de la base est de déprotoner les

COOH du DHCA, étape nécessaire dans la réaction. La suspension est laissée sous agitation magnétique pendant 15 h à 25°C. Le lavage est réalisé par filtration sur Büchner plusieurs fois avec du DMSO puis de l'eau UP.

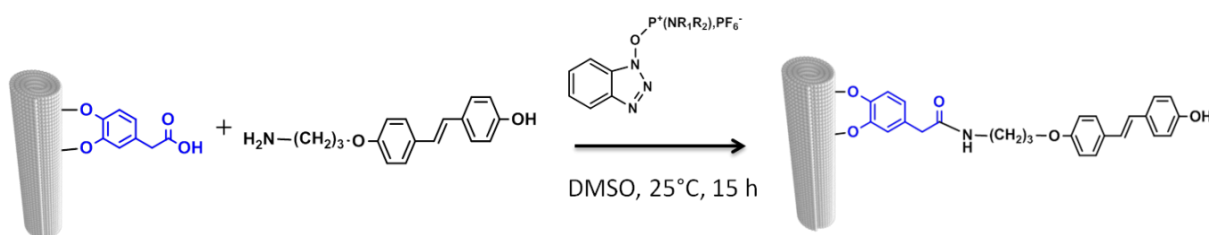


Figure 93 : Schéma de synthèse des TiONts-DHCA-HAPts en utilisant le PyBOP pour le couplage.

IV.3.1.3. Discussion des résultats obtenus par les deux méthodes de couplage

Les courbes ATG des échantillons synthétisés par les deux méthodes de couplage EDC/NHS et PyBOP, présentent la même évolution de la perte de masse avec la température (Figure 94a). Par contre, les courbes DTG des deux nanohybrides TiONts-DHCA-HAPts (PyBOP) et TiONts-DHCA-HAPts (EDC/NHS) montrent une différence, par la présence d'un pic supplémentaire, qui ne peut être attribuée qu'au greffage de la molécule HAPts (Figure 95). La décomposition de ces courbes (DTG) permet d'identifier les intervalles de chaque perte de masse ainsi que la contribution de chacune (%) à la perte de masse totale, permettant ainsi d'estimer le pourcentage de perte induit par chaque composé. Il faut noter que la perte de masse provenant de la décomposition de la molécule HAPts greffée sur les nanotubes semble se produire, dans les deux échantillons, à la même température (environ 335°C). Cette estimation permet donc de calculer le taux de greffage du HAPts dans les deux échantillons (formule (2) paragraphe III.3.1.1, Tableau 32). Le calcul de la perte de masse relative à la molécule HAPts se fait alors comme suit :

$$(\Delta m/m)_{\text{HAPts}} = \% \text{ de la contribution de HAPts (335}^\circ\text{C)} \times (\Delta m/m)_{\text{totale}} (\%)$$

$(\Delta m/m)_{\text{totale}}$ ici est la perte de masse totale entre les températures de 200°C et 500°C.

Tableau 32 : Points isoélectriques et taux de greffage du DHCA et du HAPts calculés par ATG.

Echantillon	PIE	Intervalle de la température de perte (°C)	Masse moléculaire dégradée (g/mol)	$\Delta m/m$ (%)	Taux de greffage en molécule/nm ²
TiONts nus	3,3	200-430	18	2,35	6,7 OH
TiONts-DHCA	4,1	300-500	180	8,7	1,2 DHCA
TiONts-DHCA-HAPts (PyBOP)	3,9	250-420	269	4,4	0,5 HAPts
TiONts-DHCA-HAPts (EDC/NHS)	4,3	280-400	269	3,8	0,4 HAPts

Les pertes de masse calculées à partir des courbes ATG/DTG (Figure 95) ne reflètent pas la différence de perte de masse faible observée en comparant les deux courbes ATG des nanohybrides TiONts-DHCA-HAPtS (PyBOP) et TiONts-DHCA-HAPtS (EDC/NHS) avec celle des TiONts-DHCA (Figure 94a). Ce résultat peut être expliqué par un détachement possible d'une partie du DHCA lors de la réaction de greffage du HAPtS.

Conformément aux analyses thermogravimétriques qui montrent des pertes de masse proches pour les deux méthodes de couplage (EDC/NHS et PyBOP), les mesures du potentiel zêta illustrent la même évolution du potentiel en fonction du pH. La diminution du potentiel zêta, en valeur absolue, est due au greffage du HAPtS qui masque la charge de surface des TiONts-DHCA (Figure 94b). Cet effet sur le potentiel zêta est similaire à celui du PEG dans l'étude de A. Loiseau *et al.* [17]. Pourtant le phénol peut devenir phénolate mais pour des $\text{pH} > 8,8$ (valeur de pK_a donnée dans la littérature pour le phénol en position 4' [260]) ce qui explique probablement la légère augmentation du potentiel zêta, en valeur absolue, à partir de $\text{pH} 8$ (Figure 94).

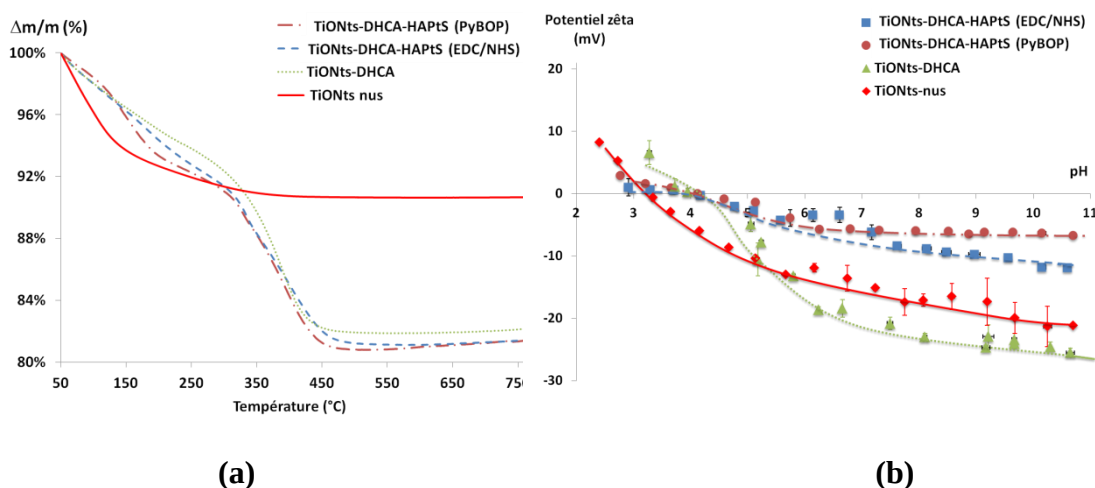


Figure 94 : Comparaison entre les deux méthodes de couplage (a) courbes ATG (sous air, 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 50 à 800 $^{\circ}\text{C}$) (b) courbes du potentiel zêta en fonction du pH (NaCl 10^{-2} M) des TiONts-DHCA-HAPtS préparés en utilisant le couple EDC/NHS ou le PyBOP.

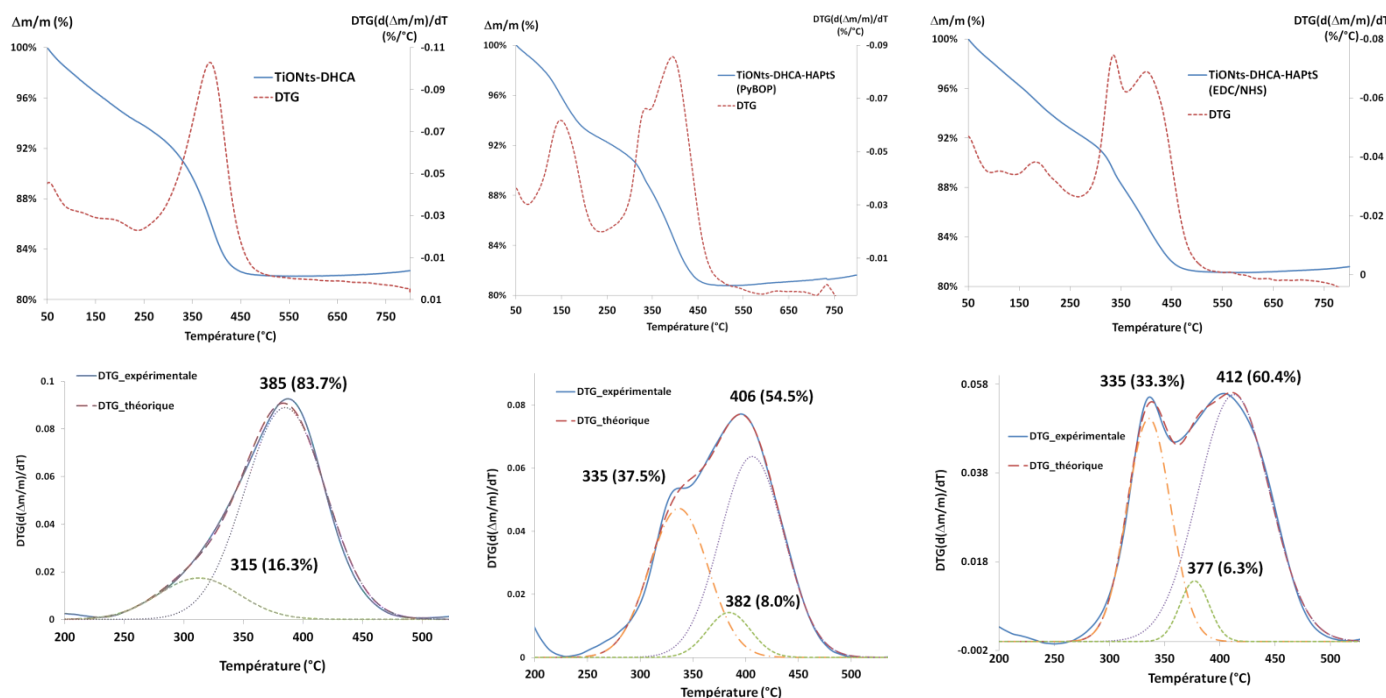


Figure 95 : Courbes ATG/DTG des nanohybrides TiONts-DHCA, TiONts-DHCA-HAPtS (PyBOP) et TiONts-DHCA-HAPtS (EDC/NHS). En bas de chaque courbe, décomposition des courbes DTG avec localisation des pics de perte (°C) et le pourcentage de contribution de chaque pic (%) à la perte totale, entre 200 et 520°C (effectué avec le logiciel Fityk).

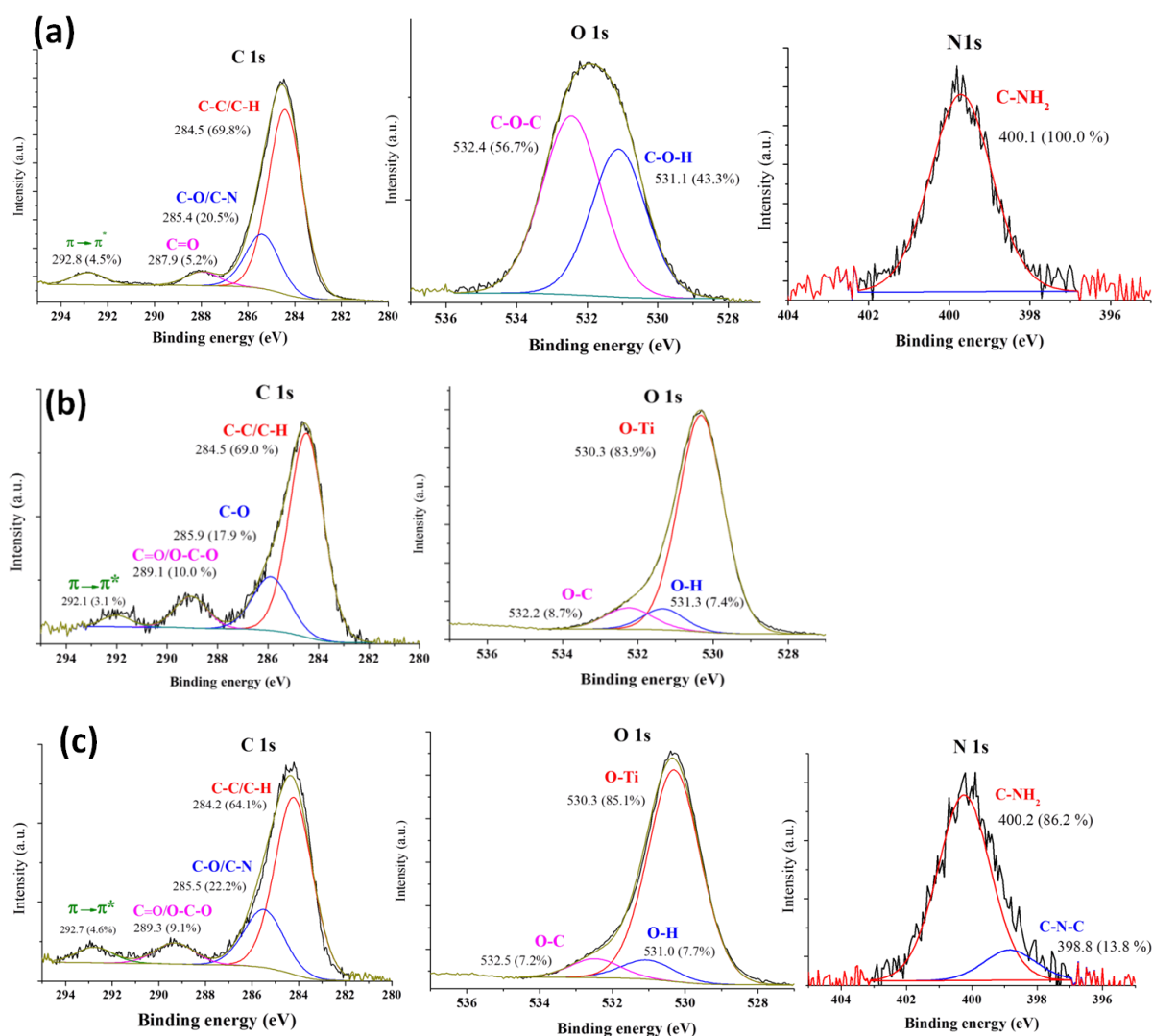
L'analyse chimique élémentaire réalisée par XPS montre la présence de l'azote qui provient de la molécule de HAPtS (Tableau 33). Cependant, il n'y a pas de variation significative au niveau du pourcentage de carbone, ce qui suggère, là encore, un possible détachement du DHCA dans les conditions de greffage (dans le DMSO). Ce résultat confirme l'hypothèse présentée dans le paragraphe précédent (analyses ATG) concernant le détachement de la molécule du DHCA au cours du greffage du HAPtS. Ce phénomène plaiderait pour un accrochage faible du DHCA en surface (liaisons de nature électrostatique plutôt que covalente).

Tableau 33 : Analyse chimique élémentaire par XPS des TiONts selon le type de greffage et la méthode de couplage (%).

Elément	C1s	O1s	Ti2p	Cl2p	NaKLL	N1s	F1s	C/Ti
TiONts nus	3,2	66,5	27,5	0,6	2,2	-	-	0,1
TiONts-DHCA	25,3	52,1	21,8	-	0,8	-	-	1,1
TiONts-DHCA-HAPtS (PyBOP)	26,9	51,2	19,7	-	-	1,7	0,5	1,3
TiONts-DHCA-HAPtS (EDC/NHS)	23,8	52,3	21,8	-	-	1,4	0,7	1,1

L'analyse du pic C1s (Figure 96) montre la présence des mêmes composantes dans le nanohybride TiONts-DHCA-HAPtS que pour le HAPtS seul. Il faut noter dans ce cas que l'interprétation des résultats XPS est difficile car le nanohybride TiONts-DHCA présente les mêmes contributions que la molécule HAPtS, en raison de la similitude des liaisons chimiques des deux molécules, avec par exemple la présence d'un noyau aromatique dans les deux composés (DHCA et HAPtS). Ainsi, l'observation des variations devient difficile, surtout avec

le détachement du DHCA. Pour cette raison, il paraît plus raisonnable de focaliser notre attention sur les types de liaisons représentatives du greffage du HAPtS. Par exemple, une augmentation dans les pourcentages des liaisons C-O/C-N est observée dans les deux nanohybrides (22,2% (méthode PyBOP) et 22,6% (méthode de EDC/NHS)) par rapport aux TiONts-DHCA (17,6%) et à la molécule de HAPtS (20,5%). Cela peut être une preuve de la liaison entre le HAPtS et le DHCA qui devrait augmenter cette contribution lors de la formation de l'amide, d'où l'augmentation du nombre des liaisons C-N. Cette liaison est confirmée par l'apparition d'une nouvelle contribution dans le pic de l'azote vers les énergies de liaison plus faibles, à 398,8 eV dans le cas de l'activation par le PyBOP et 399,0 eV dans le cas de l'activation par le couple EDC/NHS. Dans ce dernier cas, on note également la présence de la contribution C-NH₃⁺ vers 401,6 eV qui peut provenir de la protonation de l'amine lors des étapes de lavage.



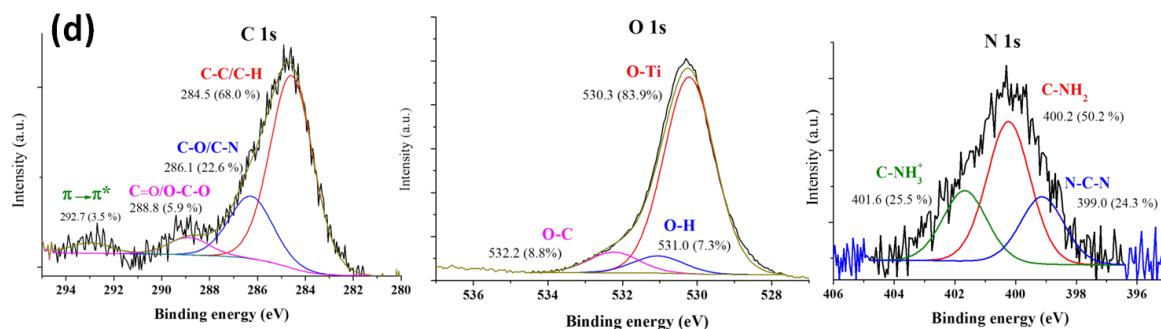


Figure 96 : Désomation des spectres XPS C1s, O1s et N1s (a) du HAPtS seul, (b) des TiONts-DHCA (c) des TiONts-DHCA-HAPtS (PyBOP), (d) des TiONts-DHCA-HAPtS (EDC/NHS).

On peut conclure qu'il n'y a pas de différence visible entre les résultats obtenus par les deux méthodes de greffage utilisant les deux agents de couplage EDC/NHS ou PyBOP. Un taux de fonctionnalisation proche est observé dans les deux cas (0,5 HAPtS/nm²), pouvant cependant être faussé par un décrochage simultané du DHCA durant l'étape de fonctionnalisation par le HAPtS. Pour tenter de contourner cette difficulté, une décomposition des courbes DTG a été effectuée afin d'estimer les quantités de chaque molécule. Les analyses XPS ont quant à elles prouvé la formation de l'amide. Cependant, en raison de l'instabilité de l'édifice (décochage du DHCA), une troisième voie de synthèse a été éprouvée en changeant le ligand à la surface des TiONts par un ligand *a priori* plus robuste de la famille des organosilanes le CPTES (liaison covalente prouvée par IR, paragraphe III.5.2.1).

IV.3.2. Greffage du HAPtS sur des TiONts préfonctionnalisés par un organosilane : synthèse des TiONts-CPTES-HAPtS

IV.3.2.1. Principe et protocole de la synthèse des TiONts-CPTES-HAPtS

L'alternative retenue pour utiliser un organosilane est l'utilisation du CPTES car il réagit avec les amines sans l'obligation de passer par une étape d'activation. Il s'agit d'une réaction de substitution nucléophile (SN) entre le chlore du CPTES et l'amine du HAPtS, pour former une liaison C-N [267] (Figure 97).

Pour une masse de 12,35 mg de TiONts-CPTES ($S_{\text{BET}} = (181 \pm 2) \text{ m}^2/\text{g}$) (voir paragraphe III.5.1 du chapitre III pour leur synthèse), contenant 11 μmol de CPTES, 22 μmol de HAPtS sont ajoutés (l'équivalent de 6 mg, deux fois en excès par rapport au CPTES) dans 5 mL de DMSO en présence de 100 μL de DIEA (base organique pour piéger le HCl formé durant la synthèse et l'empêcher de réagir avec les amines du HAPtS). La suspension est maintenue sous agitation magnétique et sous azote pendant 24 h afin de favoriser la substitution. La poudre est enfin lavée par filtration sur Büchner (membrane en nylon, 40 kDa) trois fois avec le DMSO et quatre fois avec l'eau UP et l'efficacité du lavage est contrôlée en mesurant le pH du filtrat.

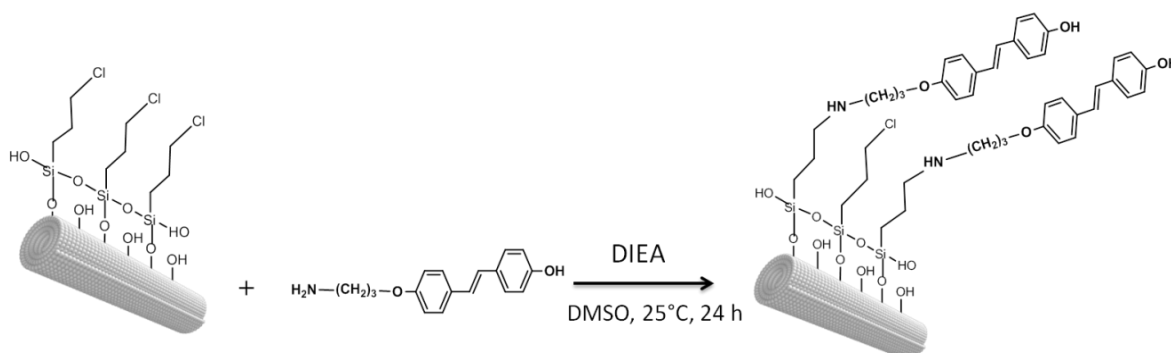


Figure 97 : Schéma de synthèse des TiONts-CPTES-HAPtS par condensation.

IV.3.2.2. Mise en évidence du greffage du HAPtS à la surface des TiONts-CPTES

De la même façon que dans le paragraphe précédent, la perte de masse engendrée par la dégradation du HAPtS est déterminée par une décomposition des courbes DTG des nanohybrides TiONts-CPTES et TiONts-CPTES-HAPtS (Figure 98). L'analyse des courbes DTG montre que le pic de dégradation de la molécule HAPtS se situerait toujours à la même température de dégradation que pour les deux nanohybrides synthétisés dans le paragraphe précédent (pic de décomposition à 336°C au lieu de 335°C). Cela prouve qu'il s'agit de la même molécule mais qui se dégrade sur un intervalle de température plus important cette fois-ci. Cette contribution est estimée à 50,1% de la perte de masse totale entre 200 et 500°C. Ainsi, le taux de greffage déterminé pour cette molécule augmente à 0,9 HAPtS/nm² (72,5 mg HAPtS /g TiONts) (Tableau 34), un taux de greffage presque le double de celui obtenu précédemment. Ce taux est également supérieur à celui du docétaxel (DTX) greffé à la surface des TiONts-APTES dans le cadre de la thèse d'Alexis Loiseau (0,2 DTX/nm²) [17]. Il faut noter que la perte de masse calculée par cette méthode (décomposition des courbes DTG) reste supérieure à celle donnée par la comparaison directe des courbes ATG des deux nanohybrides TiONts-CPTES et TiONts-CPTES-HAPtS (Figure 99). Bien que le détachement partiel du CPTES ne puisse être également exclu, il faut noter que, durant la réaction de condensation (CPTES-HAPtS), une molécule relativement lourde, le HCl, est perdue. Cela veut dire que la comparaison directe entre les courbes ATG, dans ce cas, doit prendre en compte cette perte de masse supplémentaire car le chlore fait presque la moitié de la masse moléculaire dégradée du CPTES.

Tableau 34 : Détail du calcul du taux de greffage pour les TiONts-CPTES et TiONts-CPTES-HAPtS.

Echantillon	Intervalle de perte	Perte de masse $\Delta m/m(\%)$ entre 150 et 500°C	Masse moléculaire dégradée (g/mol)	molécule/nm ²	$\mu\text{mol/g}$	mg/g TiONts
TiONts-nus	200-430	2,35	18	6,7 OH	2600	-
TiONts-CPTES	150-530	5,5	77,7	1,8 CPTES	360	55
TiONts-CPTES-HAPtS	200-450	7,2	269	0,9 HAPtS	269,5	72,5

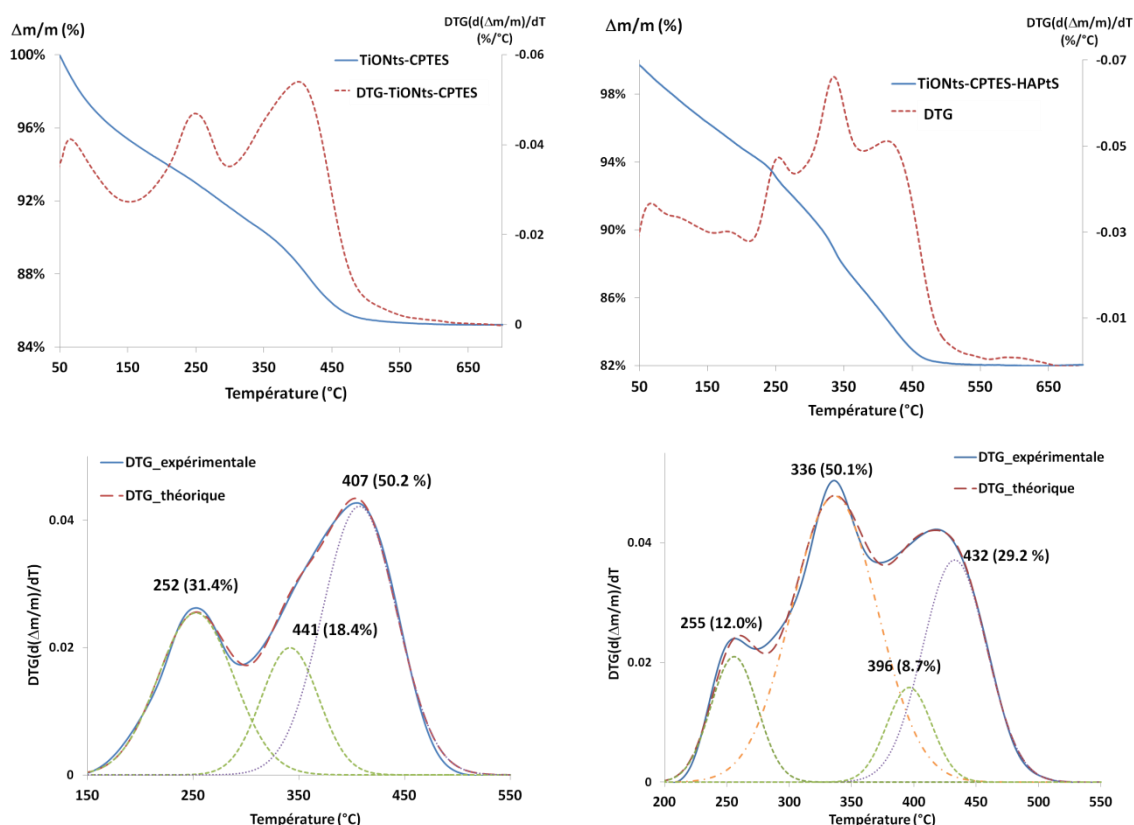


Figure 98 : Courbes ATG/DTG des nanohybrides TiONts-CPTES-HAPtS et TiONts-CPTES-HAPtS. En bas de chaque courbe, décomposition des courbes DTG avec localisation des pics de perte (°C) et le pourcentage de contribution de chaque pic (%) à la perte totale, entre 150 et 550°C (avec le logiciel Fityk) (sous air, 5°C/min).

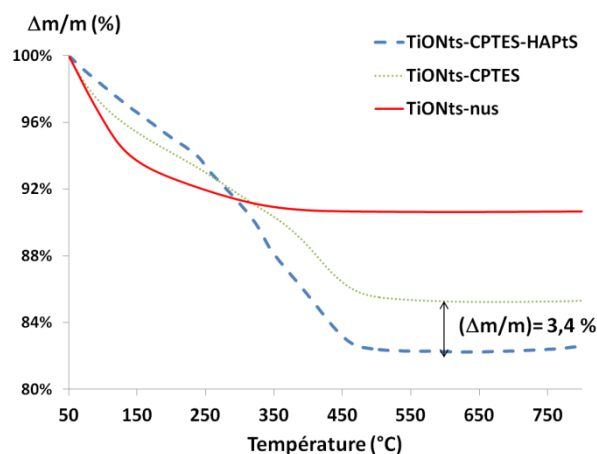


Figure 99 : Comparaison entre les courbes ATG des TiONts nus, TiONts-CPTES et TiONts-CPTES-HAPtS (sous air, 5°C/min).

Le potentiel zêta des TiONts-CPTES modifiés par le HAPtS (TiONts-CPTES-HAPtS) diminue d'environ 15 mV, en valeur absolue, au pH physiologique (Figure 100). Cet effet, aussi observé dans la première méthode de greffage sur les TiONts-DHCA, est la conséquence de l'accrochage d'une molécule organique neutre, dans la gamme de pH étudié, sur les TiONts qui est aussi la raison pour laquelle le PIE ne change pas après le greffage du HAPtS. Cette

molécule masque alors un grand nombre des hydroxyles qui sont responsables de la charge de surface des TiONts-CPTES, la quantité d'hydroxyles restante étant supérieure à la quantité de CPTES (voir Tableau 34). La légère augmentation, en valeur absolue, du potentiel zêta après pH 8 peut être due à la dissociation du groupement phénol en phénolate étant donné que son pKa est à environ 8,8. Ces mesures illustrent la présence de la molécule HAPtS à la surface des nanohybrides.

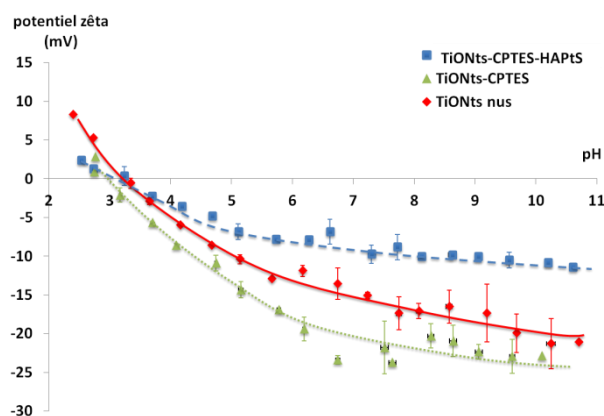


Figure 100 : Effet du greffage du HAPtS sur la charge de surface des TiONts-CPTES (NaCl 10^{-2} M).

L'efficacité du greffage par la voie mettant en œuvre le CPTES est également prouvée par l'analyse chimique élémentaire de surface XPS (Tableau 35, Figure 101). En effet, l'augmentation du pourcentage du carbone témoigne de l'abondance de la matière organique à la surface des TiONts. La diminution du pourcentage du chlore par rapport à celui du silicium prouve l'élimination de ce dernier au cours de la réaction de condensation. En considérant l'évolution des rapports Cl/Ti et Si/Ti pour les deux échantillons TiONts-CPTES et TiONts-CPTES-HAPtS (Tableau 35), on constate que seulement 30% de Cl (0,05/0,17) reste après le greffage du HAPtS. Par ailleurs, le pourcentage d'azote est plus important en comparaison avec la méthode précédente. Or, l'azote est notre indicateur d'efficacité de greffage car le HAPtS est la seule source d'azote dans la réaction. Notons également que le pourcentage de Ti diminue (12,9% pour les TiONts-CPTES-HAPtS vs. 26,6% pour les TiONts nus), ce qui prouve que la couche organique en surface augmente, l'XPS étant une technique d'analyse de surface (de l'ordre de 5 nm sondés). Cette augmentation est également témoignée par l'augmentation du rapport C/Ti à chaque étape de greffage. Cela prouve la présence de la molécule HAPtS et confirme les résultats obtenus par ATG.

Tableau 35 : Evolution de l'analyse élémentaire par XPS en fonction des étape de greffage du HAPtS (en pourcentage atomique, %).

Elément	C1s	O1s	Ti2p	Si2p	Cl2p	NaKLL	N1s	Ca2p	Si/Ti	Cl/Ti	C/Ti
TiONts nus	5,6	62,7	26,6	-	0,6	5,1	-	-	-	0,02	0,2
TiONts-CPTES	15,4	58,9	18,0	3,8	3,0	0,9	-	-	0,21	0,17	0,85
TiONts-CPTES-HAPtS	38,5	41,6	12,9	2,0	0,7	0,6	3,0	0,7	0,19	0,05	3,0

La désomation des spectres XPS illustre le greffage de l'analogue stilbénique par l'évolution du spectre C1s entre les TiONts-CPTES et les TiONts-CPTES-HAPtS. Contrairement au DHCA qui présente presque les mêmes liaisons que le HAPtS, l'évolution des spectres est ici plus nette et plus concluante quant à la présence du HAPtS. En fait, toutes les composantes du pic C1s, caractéristiques du HAPtS, apparaissent dans le nanohybride TiONts-CPTES-HAPtS et avec des proportions proches de celles de la molécule seule (Figure 101). Le pic de l'oxygène met en évidence la liaison C-O du HAPtS avec un pourcentage de 9,8%. En outre, l'apparition d'une deuxième composante vers 389,6 eV, avec un pourcentage de 28%, dans le spectre de l'azote N1s prouve la liaison covalente, entre l'amine du HAPtS et la chaîne alkyle du CPTES qui confirme la formation de la liaison C-N-C après réaction (Figure 101).

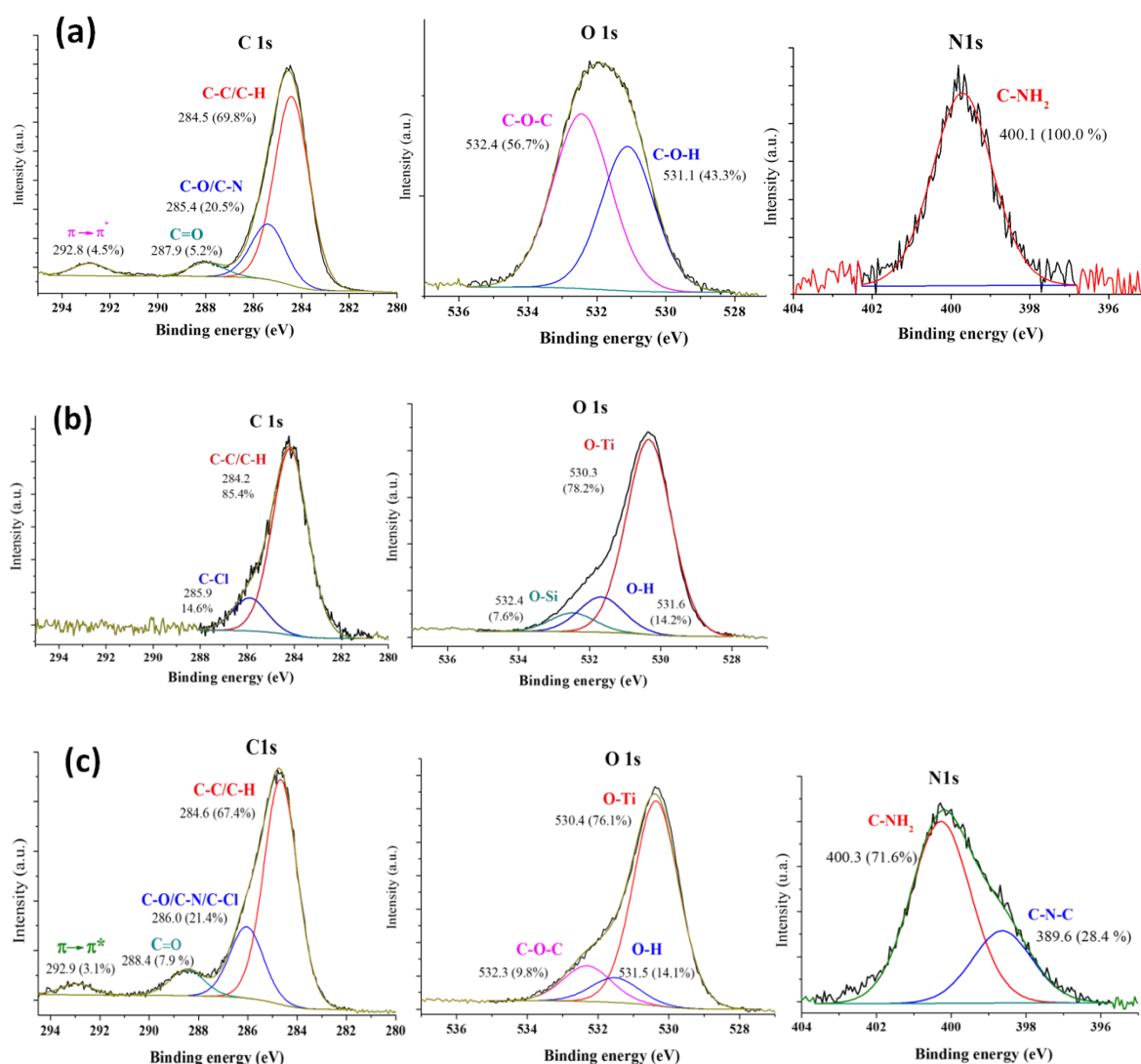


Figure 101 : Désomation des spectres XPS C1s, O1s et N1s de (a) la molécule HAPtS seule, (b) des TiONts-CPTES (c) des TiONts-CPTES,-HAPtS.

Le spectre IR du nanohybride TiONts-CPTES-HAPtS, enregistré en utilisant les TiONts nus comme référence à soustraire, permet de repérer les bandes du HAPtS dans l'échantillon d'une façon plus claire (Figure 102), confirmant ainsi son accrochage sur les nanotubes. Les

bandes de vibration des cycles aromatiques (δ C-H) se trouvent vers 960, 875 et 830 cm^{-1} , les bandes de vibrations des doubles liaisons (ν C=C) sont à 1560 et 1600 cm^{-1} et les vibrations des liaisons (ν C-O) et (ν C-N) sont vers 1250 et 1209 cm^{-1} .

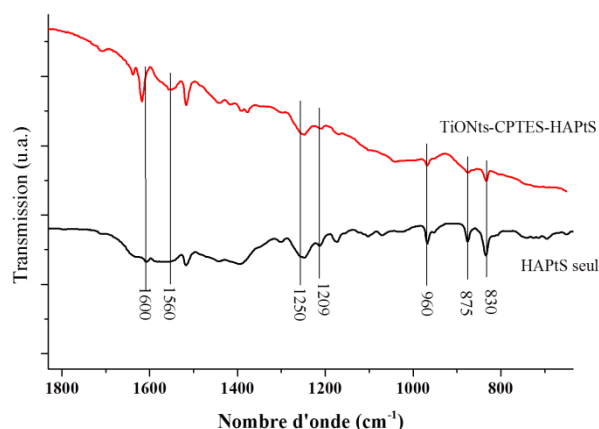


Figure 102 : Comparaison entre les spectres IR du HAPtS seul (référence : KBr) et des TiONts-CPTES-HAPtS (référence : KBr+TiONts nus).

Le suivi de la stabilité colloïdale des nanohybrides après greffage du HAPtS montre une perte de la stabilité par rapport au nanohybride TiONts-CPTES. Ce comportement peut être dû à la faible solubilité de la molécule HAPtS dans l'eau. Cependant, sa stabilité reste toujours supérieure à celle des TiONts nus.

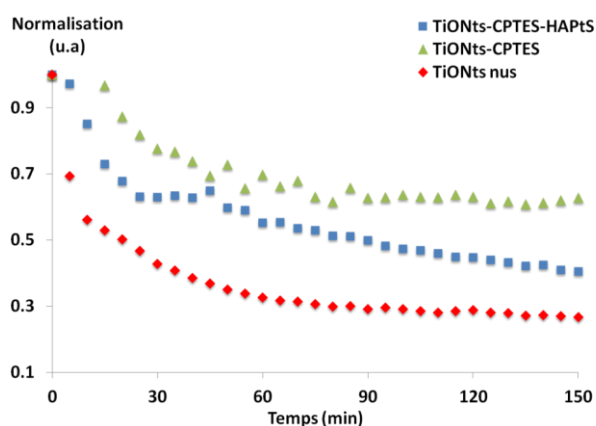


Figure 103 : Stabilité des suspensions de TiONts nus, TiONts-CPTES et TiONts-CPTES-HAPtS en fonction du temps (PBS 0,1 M, pH=7,4).

En conclusion, on peut dire que la modification de surface des TiONts par le phénol stilbénique HAPtS est plus efficace par la méthode de condensation par substitution nucléophile du chlore du CPTES par l'amine du HAPtS, que par la méthode de formation d'amide par activation, soit avec l'EDC/NHS ou avec le PyBOP, dans nos conditions de synthèse (ici en partant de TiONts-DHCA, dans le DMSO). La formation de la nouvelle liaison C-N est mise en évidence dans le spectre XPS de l'azote de tous les nanohybrides synthétisés mais la

présence résiduelle de la contribution C-NH₂ n'élimine pas la possibilité d'adsorption de la molécule HAPtS sur les TiONts par une autre voie (dans la cavité interne, physisorbée ...).

La différence d'efficacité de greffage du phénol stilbénique sur les TiONts avec les deux méthodes de greffage testées (voie DHCA et voie CPTES) peut avoir plusieurs explications : en tout premier lieu, elle peut provenir de la robustesse de la préfonctionnalisation. En effet, malgré l'étude réalisée au chapitre III qui prouve la durabilité du greffage des catéchols et surtout du DHCA dans le milieu aqueux (paragraphe III.3.3.2), son détachement au cours de la réaction de greffage du HAPtS dans le DMSO est très probable. Cela montre l'importance de l'effet du solvant dans la réaction. Au final, il apparaît ici que la liaison Ti-O-Si dans les TiONts-CPTES est plus forte que la liaison Ti-O-C dans les TiONts-DHCA. La deuxième explication peut être liée à la différence de disposition des groupements fonctionnels à la surface des TiONts préfonctionnalisés, c'est-à-dire à l'accessibilité de la molécule de HAPtS aux fonctions réactives de surface des TiONts. En effet, la probabilité que les catéchols se trouvent dans les cavités internes des TiONts est plus élevée que dans le cas du CPTES car les organosilanes se condensent entre eux durant le greffage (formation de la liaison Si-O-Si, observée par IR, voir paragraphe III.5.2.1, chapitre III) ce qui rend plus improbable l'imprégnation des cavités des tubes. Il n'est par ailleurs pas exclu également que le DHCA se soit greffé à la surface des TiONts avec une conformation rendant moins accessible la fonction acide carboxylique.

IV.4. Amélioration de la biocompatibilité des TiONts : greffage du chitosan par deux approches différentes

La modification de surface des TiONts par le chitosan est réalisée par deux méthodes différentes : par liaison covalente (approche étape par étape) et par interactions électrostatiques (approche en une seule étape). Dans ce paragraphe, chaque approche est étudiée à part et une comparaison entre les deux voies est présentée à la fin.

IV.4.1. Présentation du chitosan (CT) utilisé dans cette étude

Le chitosan utilisé ici est le chitosan oligosaccharide lactate de chez Sigma Aldrich de formule linéaire (C₁₂H₂₄N₂O₉)_n et de poids moléculaire moyen Mn=5000 g/mol (Figure 104). Il est choisi avec ces caractéristiques parce qu'il s'agit d'une formule soluble du chitosan.

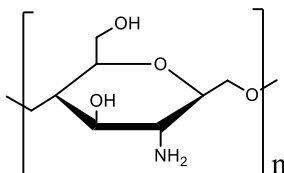


Figure 104 : Formule chimique du chitosan.

Chaque unité de ce polymère présente trois fonctions différentes : deux groupements hydroxyles (primaire et secondaire), un groupement amine primaire et deux groupements éthers

(intra et inter cycle). Les groupements amines se protonent en milieu acide et donnent une charge positive au chitosan dans une large gamme de pH (Figure 105).

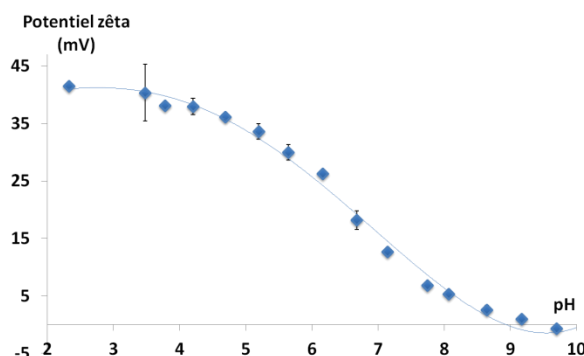


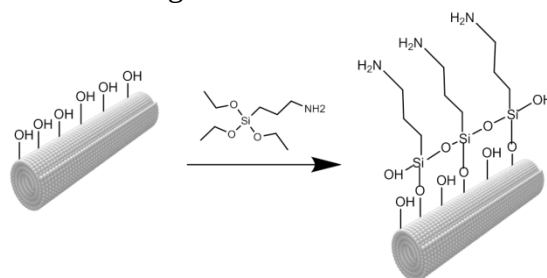
Figure 105 : Courbe du potentiel zêta du chitosan en fonction du pH ($\text{NaCl } 10^{-2} \text{ M}$).

IV.4.2. Première approche : greffage du chitosan à la surface des TiONts par liaisons covalentes (étape par étape)

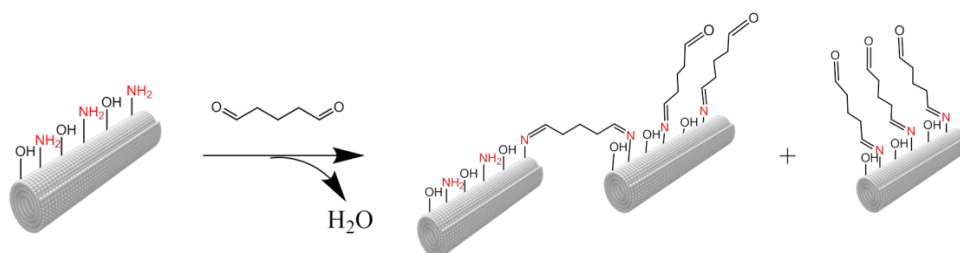
IV.4.2.1. Principe et protocole de la méthode de greffage

Dans cette approche, l'accrochage du chitosan (CT) aux TiONts se fait par liaison covalente et est réalisée en trois étapes : la première étape est la préfonctionnalisation des TiONts par un groupement silane à terminaison amine (APTES) selon le protocole décrit au paragraphe III.5.1 du chapitre III (le même lot est utilisé ici). Etant donné que le chitosan dispose aussi d'un groupement amine primaire, un ligand intermédiaire entre les amines des deux molécules doit être utilisé, dans la deuxième étape du greffage : le glutaraldéhyde. Ce dernier ayant deux groupements aldéhydes, le premier réagit avec les amines de l'APTES et le deuxième réagit avec les amines du chitosan, dans la troisième étape, formant à chaque fois une liaison imine (Figure 106). Pour simplifier, l'APTES est présentée seulement par son groupement amine dans l'étape 2 et 3 de la Figure 106.

Etape 1 : TiONts- APTES



Etape 2 : TiONts- APTES-Glu



**Etape 3 :
TiONts-
APTES-
Glu-CT**

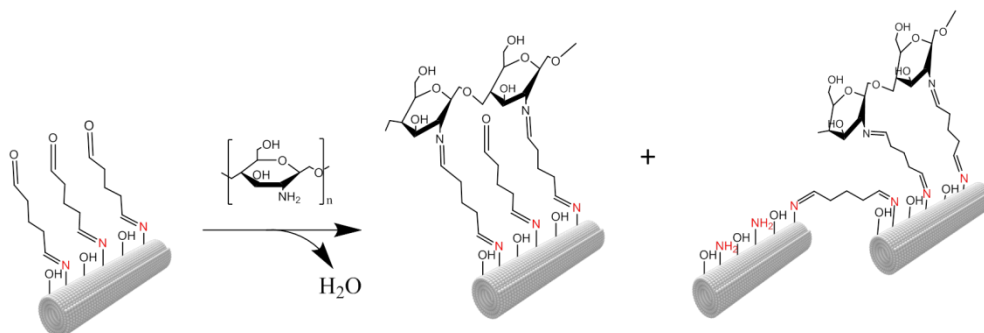


Figure 106 : Représentation schématique des trois étapes de greffage du chitosan aux TiONts par une liaison covalente.

Le protocole expérimental des étapes 2 et 3 est le suivant : une masse de TiONts-APTES est introduite dans un mélange éthanol/glutaraldéhyde à 4% (v/v). La réaction est maintenue sous agitation magnétique à 360 rpm pendant 24 h. La poudre est ensuite lavée six fois par ultrafiltration avec de l'eau déionisée puis UP (membrane de 100 kDa, cellulose régénérée CR) jusqu'à ce que la conductivité du filtrat soit aux alentours de 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ($\sigma_{\text{eau ultrapure}} \approx 6 \mu\text{S}/\text{cm}$). Pour la troisième étape de greffage, une partie de la suspension de nanohybride TiONts-APTES-Glu, récupérée de la deuxième étape, est ajoutée à une solution de CT dont la quantité est dans le rapport $\text{Glu}(\text{C}=\text{O}) : \text{CT}(\text{NH}_2) = 1 : 2$. Le pH de la solution est ajusté à 5 (par ajout de HCl 0,1 M) et la suspension est laissée sous agitation magnétique à 360 rpm pendant 24 h à température ambiante (25°C). La poudre est enfin lavée par ultrafiltration mais cette fois avec une membrane de 300 kDa afin d'évacuer le polymère en excès, jusqu'à ce que la conductivité du filtrat soit aux alentours de 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

IV.4.2.2. Mise en évidence du greffage du chitosan sur les TiONts-APTES

Les mesures du potentiel zêta et du point isoélectrique (PIE) nous renseignent sur la variation de la charge de surface des TiONts avec la chimie de la molécule greffée à chaque étape de la synthèse (Figure 107 et Tableau 36).

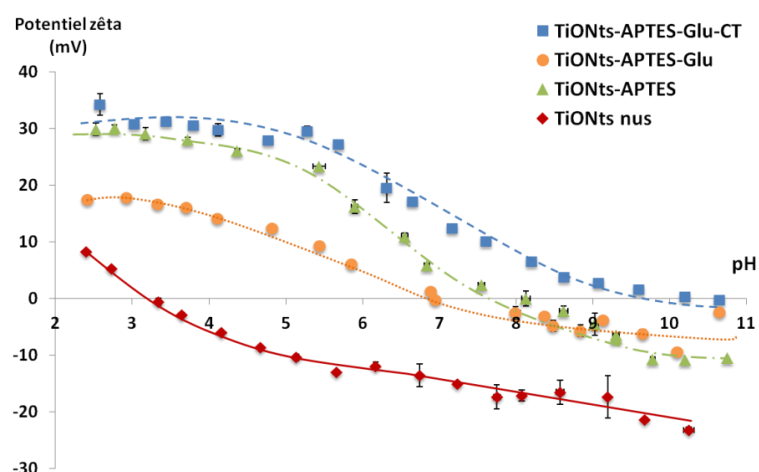


Figure 107 : Evolution du potentiel zêta des TiONts nus et greffés après chaque étape de la synthèse des TiONts-APTES-Glu-CT ($\text{NaCl } 10^{-2}\text{M}$).

L'augmentation du PIE après le greffage de l'APTES de 3,3 à 8,1 est due à la présence de groupements amines à la surface (paragraphe III.5.2.1). Après la deuxième étape, le glutaraldéhyde diminue le potentiel- ζ du nanohybride TiONts-APTES-Glu d'environ 10 mV (Figure 107) et déplace son PIE de 8,1 à 6,9 (Tableau 36). Ce résultat s'explique par le fait que le glutaraldéhyde, en tant que molécule organique non chargée, masque une partie de la charge positive des TiONts-APTES puisque la fonction exposée à la surface et qui remplace certaines amines, est l'aldéhyde. Le greffage du CT, lors de la dernière étape, réaugmente en valeur absolue le potentiel- ζ et le PIE à 10,4. Cette augmentation est due à la protonation des groupements amines du CT, non engagées dans une liaison covalente avec les TiONts-APTES-Glu (Figure 106).

Tableau 36 : Caractéristiques des nanohybrides TiONts-APTES-Glu-CT obtenus après chaque étape de greffage (PIE et taux de greffage).

Échantillon	PIE	Perte de masse ($\Delta m/m$) (%)	Masse molaire de la molécule dégradée (g.mol^{-1})	Taux de greffage (molécule/nm ²)*	Surface spécifique S_{BET} (m ² /g)
TiONts nus	3,3	2,35	18	6,7 OH	238±3
TiONts-APTES	8,1	10,0	58	4,4 APTES	193±1
TiONts-APTES- Glu	6,9	6,1	100	1,8 Glu	163±3
TiONts-APTES- Glu-CT	10,4	7,1	5000	0,05 CT	-

*valeur calculée avec la surface spécifique et qui prend donc en compte les molécules qui peuvent être piégées dans les cavités des TiONts.

Pour la détermination du taux de greffage par la méthode thermogravimétrique à l'étape n, on utilise à chaque fois la surface spécifique du nanohybride synthétisé à l'étape (n-1). La diminution de la surface spécifique après le greffage de l'APTES et du glutaraldéhyde (Tableau 36) s'explique par la diminution de l'accès de la molécule sonde (ici N₂) aux cavités des TiONts. En fait, considérant la taille du diamètre intérieur des TiONts (environ 4 nm), les molécules organiques peuvent être greffées à l'intérieur des cavités ou à la surface des TiONts. Les rendements de greffage de l'APTES et du glutaraldéhyde sont d'environ 50% (4,4/9,2) et (1,8/4,4) respectivement (formule (2) dans le paragraphe III.3.1.1). Cependant, le taux de greffage du CT obtenu est relativement faible (0,05 CT/nm²) en comparaison avec celui obtenu pour le greffage du PEG₂₀₀₀ dans l'étude de A.L. Papa *et al.* (1,3 PEG/nm²) [18] ; néanmoins, il est similaire à celui trouvé par A. Loiseau *et al.* pour le greffage du PEG₃₀₀₀ (0,05 PEG/nm²) [17]. Les taux de greffage plus faibles obtenus peuvent provenir d'un encombrement stérique plus important dans le cas de ces molécules à fort poids moléculaire.

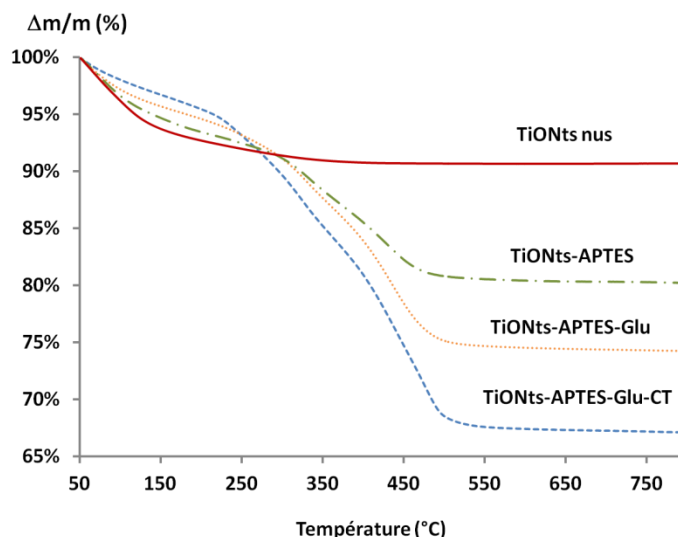


Figure 108 : Courbes ATG des nanohybrides après chaque étape de greffage des TiONts-APTES-Glu-CT, sous air (25 mL/min) avec une rampe de 5°C/min.

IV.4.2.3. Confirmation du greffage du CT à la surface des TiONts-APTES-Glu-CT : Etude par spectroscopies IR et XPS

Malgré l'importance de l'analyse thermogravimétrique, elle reste insuffisante pour prouver directement la présence de la molécule souhaitée, en particulier dans le cas d'un greffage par étapes. Afin de confirmer l'établissement des liaisons chimiques et identifier les molécules greffées, des analyses d'IR et XPS sont réalisées.

Les spectres IR des nanohybrides obtenus aux trois étapes de greffage sont présentés (Figure 109). Le greffage de l'APTES a été mis en évidence au paragraphe III.5.2.1. La Figure 109 illustre l'accrochage du glutaraldéhyde à travers la présence de ses bandes de vibrations caractéristiques dont les plus importantes sont celles du groupement carbonyle C=O qui se trouvent à 1722 cm^{-1} ($\nu\text{ C=O}$) et à 1377 cm^{-1} ($\delta\text{ H-C=O}$). La présence de ces bandes montre l'existence d'un grand nombre de groupements C=O qui restent libres à la surface des TiONts. Les modes de vibrations de déformation et d'élongation de la chaîne aliphatique du glutaraldéhyde ($-\text{CH}_2-$) sont également observées à 1460 cm^{-1} et 2922 cm^{-1} respectivement.

La formation de la fonction imine entre les amines du CT et les aldéhydes libres du glutaraldéhyde est mise en évidence par l'apparition d'une bande de vibration ($\nu\text{ C=N}$) à 1628 cm^{-1} dans l'échantillon TiONts-APTES-Glu-CT (Figure 109) [268]. On note également la présence des bandes caractéristiques du CT dans cet échantillon : les bandes de vibration situées à 1030 et 1070 cm^{-1} sont attribuées respectivement aux vibrations d'élongation des hydroxyles primaires C-OH et de la liaison C-O-C dans le cycle [269]. La bande à 1152 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation de la liaison C-O-C entre les cycles [270]. Les bandes de vibrations de déformation et d'élongation des liaisons C-H et CH_2 se trouvent, respectivement, à 1375 et 1415 cm^{-1} ($\delta\text{ C-H}$) et à $2876\text{-}2957\text{ cm}^{-1}$ ($\nu\text{ C-H}$) [271]. TiONts.

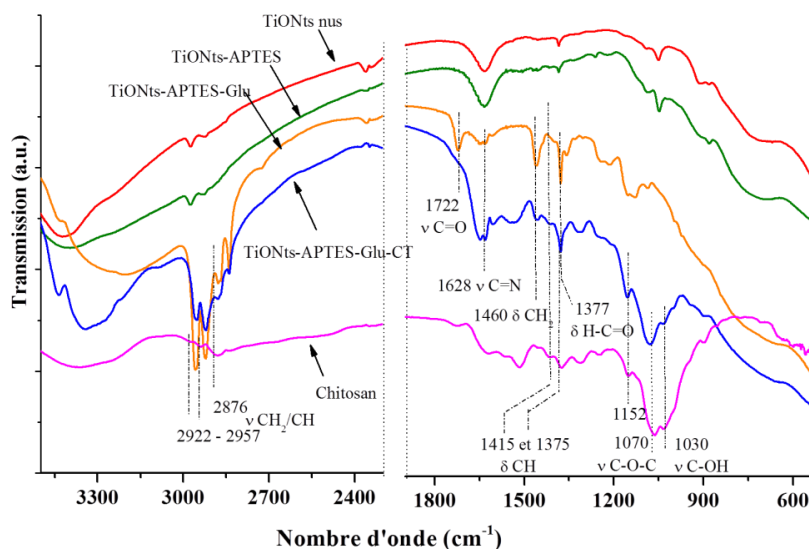


Figure 109 : Spectres IR du CT seul, des TiONts nus, des TiONts-APTES, des TiONts-APTES-Glu et des TiONts-APTES-Glu-CT.

Le Tableau 37 présente les résultats de l'analyse élémentaire par XPS (en pourcentage atomique) des nanohybrides synthétisés aux trois étapes de greffage du CT ainsi que pour le CT seul. Ce tableau montre une évolution cohérente de la composition chimique de surface des TiONts en fonction des modifications de surface effectuées. En effet, l'augmentation progressive du pourcentage de carbone prouve la présence de la matière organique d'une façon de plus en plus abondante à la surface des TiONts. D'autre part, l'apparition de nouveaux éléments tels que l'azote et le silicium annonce la variation de la chimie de surface selon la nature de la molécule greffée.

Tableau 37: Analyse élémentaire par XPS du CT seul, des TiONts nus et greffés (en pourcentage atomique, %) aux différentes étapes de l'élaboration des TiONts-APTES-Glu-CT et des TiONts-CT obtenus par adsorption.

Échantillon \ Élément	C1s	O1s	N1s	Ti2p	NaKLL	Si2p	Cl2p
TiONts nus	5,6	62,7	-	26,6	5,1	-	0,6
TiONts-APTES	17,6	54,6	4,2	18,8	0	4,8	0
TiONts-APTES-Glu	23,0	54,3	1,7	19,2	0	1,8	0
TiONts-APTES-Glu-CT	38,6	41,7	4,1	14,1	0	1,5	0
CT seul	54,0	33,0	7,0	0	2,8	0	3,1
TiONts-CT	32,9	46,9	4,2	13,2	2,8	0	0

Les pourcentages atomiques du titane, de l'oxygène et du silicium diminuent au fur et à mesure des greffages et s'accroissent après le greffage du CT. Cette diminution est due à la présence de deux couches organiques épaisses (glutaraldéhyde et CT) alors que la profondeur d'analyse en XPS est de l'ordre de 5 nm. Cependant, une évolution irrégulière de l'azote a été notée, en fait, il diminue de plus de la moitié (le rapport N/Ti passe de 0,22 (TiONts-APTES) à 0,09 (TiONts-APTES-Glu)) après la deuxième étape (greffage du glutaraldéhyde sur les TiONts-APTES) et réaugmente après la troisième étape (N/Ti passe de 0,09 à 0,29 pour les

TiONts-APTES-Glu-CT). Ces résultats peuvent être dus au fait que le glutaraldéhyde masque une partie de la molécule de silane et, par conséquent, les atomes d'azote à la surface. Cette explication est aussi valable pour expliquer la diminution du pourcentage de silicium de 4,8% à 1,8% pour presque le même pourcentage de titane (Tableau 37). L'augmentation du pourcentage de l'azote après la troisième étape est due au greffage du CT.

Afin de mieux comprendre la nature des liaisons chimiques présentes suite à chaque réaction, une désomation des spectres XPS est menée pour les niveaux C1s, O1s et N1s (Figure 110). Les résultats montrent un changement dans les composantes des spectres après chaque greffage et témoignent de l'apparition de nouvelles liaisons. L'interprétation des spectres de TiONts-APTES est donnée au paragraphe III.5.2.1.

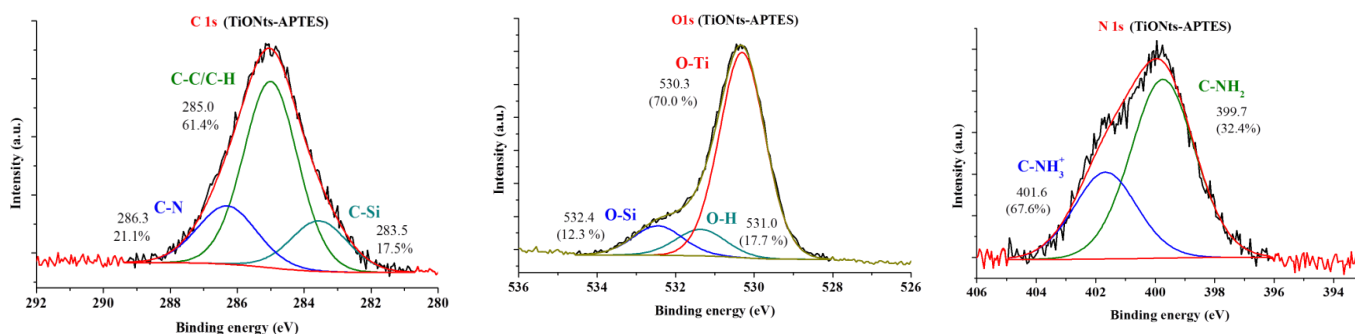
La Figure 110 prouve la présence de l'aldéhyde dans l'échantillon TiONts-APTES-Glu par l'apparition d'une nouvelle composante du carbone, déplacée vers les plus grandes énergies de liaison (287,8 eV) et attribuée à la fonction carbonyle. Les pourcentages expérimentaux des diverses liaisons du carbone sont très proches des pourcentages théoriques (voir Tableau 38).

Enfin, le greffage du CT est mis en évidence par l'augmentation simultanée des composantes du spectre C1s, relatives aux liaisons C-O/C-N et O-C-O/C=O des TiONts-APTES-Glu-CT, dont les pourcentages expérimentaux s'accordent avec les pourcentages théoriques calculés (Tableau 38). Néanmoins, le pourcentage de la contribution C-C/C-H est plus important dans les TiONts-APTES-Glu-CT que dans le CT seul, parce qu'il y a la chaîne carbonée de l'APTES et du glutaraldéhyde en plus du CT.

Tableau 38: Comparaison entre les pourcentages expérimentaux et théoriques des liaisons du carbone dans les nanohybrides aux différentes étapes de la synthèse des TiONts-APTES-Glu-CT.

Echantillon	C-C/C-H		C-O/C-N		C-Si		C=O/O-C-O	
	Exp*	Théo [§]	Exp	Théo	Exp	Théo	Exp	Théo
TiONts-APTES	61,4	33,4	21,1	33,3	17,5	33,3	-	-
TiONts-APTES-Glu	59,5	50,0	22,3	25,0	12,2	12,5	6,0	12,5
TiONts-APTES-Glu-CT	38,0	34,5	49,9	23,6	-	-	12,1	9,2
CT pur	18,0	16,6	65,1	66,7	-	-	16,9	16,7

*Valeurs expérimentales obtenues à partir de la désomation des spectres XPS, [§] valeurs théoriques calculées à partir des formules chimiques de la molécule ou de la chaîne des molécules greffées.



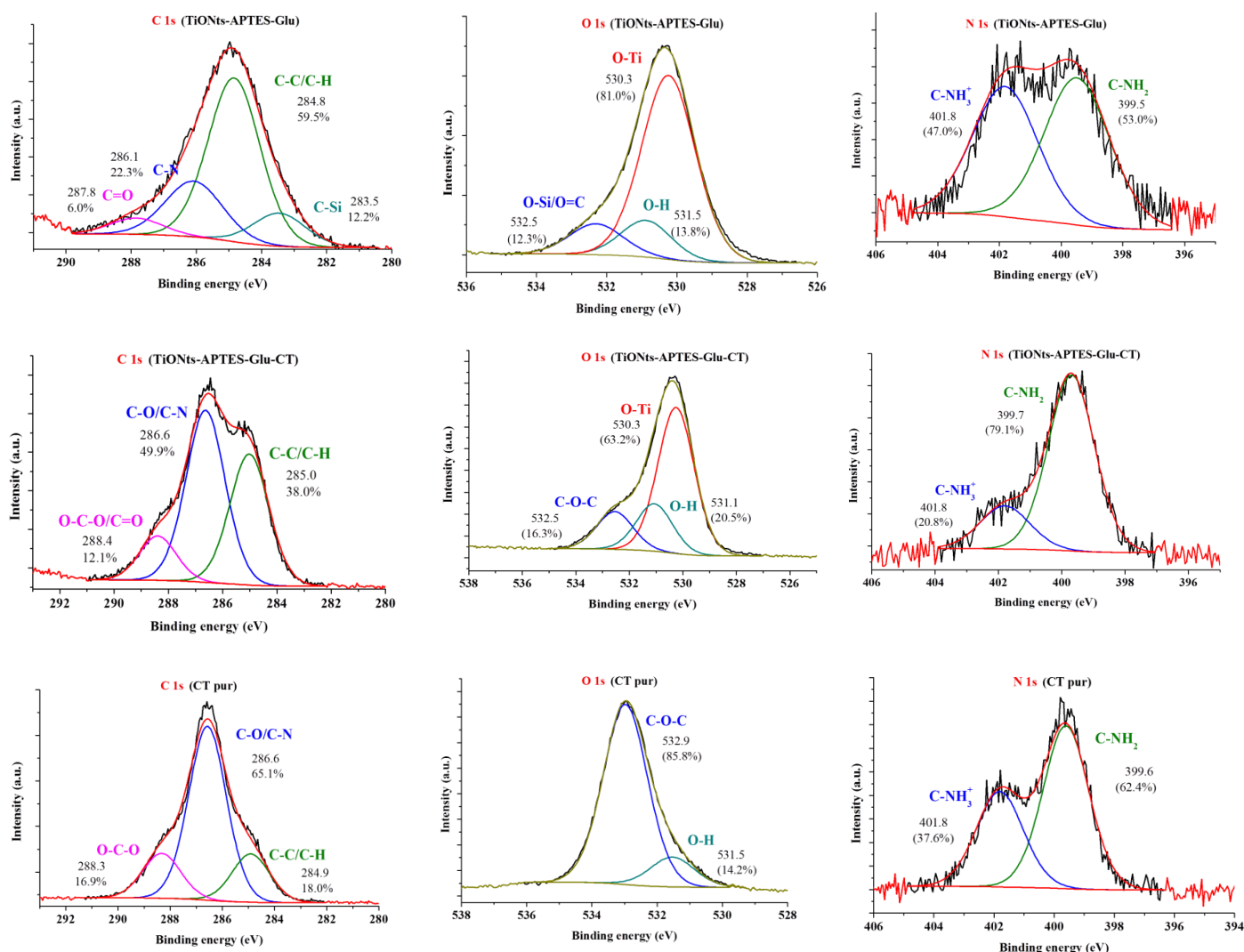


Figure 110: Désommission des spectres XPS C1s, O1s et N1s du CT pur et des nanohybrides obtenus aux différentes étapes de la synthèse des TiONts-APTES-Glu-CT.

IV.4.3. Seconde approche du greffage du chitosan à la surface des TiONts : liaisons par interactions électrostatiques (une seule étape)

IV.4.3.1. Principe de la méthode et protocole expérimental

Le chitosan est un polyélectrolyte qui possède plusieurs amines primaires dans sa chaîne polymère (un groupement amine/unité de répétition). La protonation de ces fonctions amines primaires garnit le chitosan de charges positives pour une large gamme de pH (Figure 105). En contrepartie, les TiONts, ayant plusieurs groupements hydroxyles, se chargent négativement à partir d'un pH faible (PIE=3,3). Ces charges opposées créent une certaine affinité entre les deux composés à travers des interactions électrostatiques et/ou des liaisons hydrogènes permettant ainsi l'adsorption du CT à la surface des TiONts. Ce type d'interaction est très connu et a également été utilisé pour le greffage de la polyéthylène imine (PEI) sur les TiONts dans les travaux de thèse de A.L. Papa en 2009 [149] et a abouti à la synthèse de nanohybrides stables.

Contrairement au greffage par liaison covalente qui se limite à un seul site d'accrochage, les sites d'adsorption par interactions électrostatiques TiONts/CT sont multiples. Ainsi, la

seconde approche de greffage du CT se base sur les interactions électrostatiques entre les amines du CT et les hydroxyles des TiONts (Figure 111).

Le greffage par liaisons électrostatiques présente un certain nombre d'avantages comme sa facilité de mise en œuvre et sa convenance aux systèmes d'administration des médicaments grâce aux faibles énergies de liaison mises en œuvre. En effet, les liaisons établies par interactions électrostatiques peuvent être facilement dissociées permettant ainsi une libération contrôlée de la molécule d'intérêt dans les cellules cibles, ce, dans certaines conditions (le changement de pH par exemple...) [39]. D'autre part, les liaisons électrostatiques ne changent pas la chimie de la molécule greffée, comme il en est pour les liaisons covalentes, gardant ainsi les propriétés physico-chimiques de la molécule d'origine et son activité biologique intactes. Néanmoins, la possibilité du détachement non contrôlé ou prématuré de la molécule adsorbée reste probable avec ce type de liaisons et représente l'inconvénient majeur de cette approche.

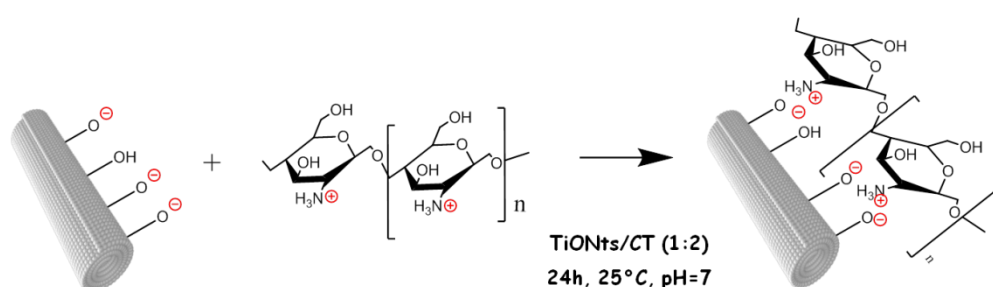


Figure 111 : Représentation schématique de l'adsorption du CT sur un nanotube par interactions électrostatiques.

Étant donné que les interactions se produisent entre les amines du CT et les hydroxyles des TiONts, le calcul des quantités mises en contact est basé sur ces deux groupements. Les TiONts sont mis en contact avec le CT dans le rapport molaire TiONts(-OH):CT(-NH₂) de 1:2. Le pH est ajusté à 7,0. Pour cette valeur le chitosan est chargé positivement (voir Figure 105) et les TiONts nus sont chargés négativement (voir Figure 105). Les valeurs de pH et de ratio molaires ont été optimisées par des essais préliminaires présentés en annexe 6. La suspension est maintenue à température ambiante (25°C) sous une agitation magnétique pendant 24 h. La suspension est lavée plusieurs fois avec de l'eau déionisée par ultrafiltration (membrane 300 kDa de cellulose régénérée). Le nanohybride synthétisé est nommé TiONts-CT.

IV.4.3.2. Confirmation de l'adsorption du chitosan par les techniques d'analyse de surface

Les mesures du potentiel zêta en fonction du pH du nanohybride TiONts-CT montre un changement radical au niveau de la charge de surface des TiONts et une augmentation de son PIE de 3,3 à 10,2 après l'adsorption du CT (Figure 112). Cette valeur est très proche de celle obtenue dans la première approche pour l'échantillon TiONts-APTES-Glu-CT (PIE=10,4). L'adsorption du CT augmente le potentiel zêta jusqu'à plus de +30 mV (pour l'intervalle de pH entre 2,5 et 5,5) et améliore la stabilité colloïdale des TiONts. La courbe relative aux TiONts-CT suit la même évolution que celle du CT seul mais avec des valeurs plus faibles du potentiel zêta à cause de la présence des hydroxyles des TiONts (Figure 112).

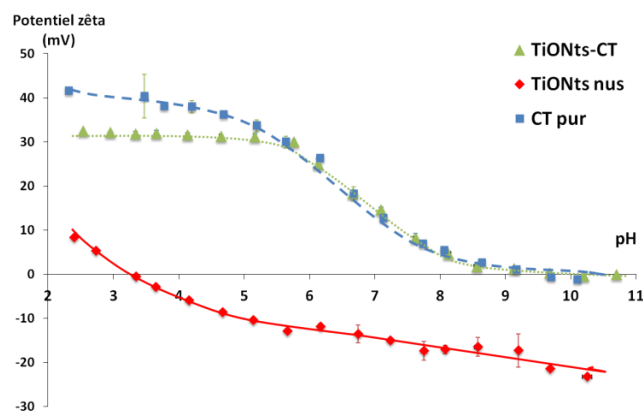


Figure 112: Evolution des courbes des mesures du potentiel zêta en fonction du pH des TiONts nus et greffés avec du CT adsorbé (10^{-2} NaCl).

L'adsorption du CT à la surface des TiONts est également prouvée par spectroscopie IR (Figure 113) : les bandes de vibration à 1029 et 1070 cm^{-1} sont attribuées respectivement aux vibrations d'élongation des hydroxyles primaires ($\nu\text{ C-OH}$) et de la liaison ($\nu\text{ C-O-C}$) dans le cycle [269]. La bande à 1152 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation de la liaison $\nu\text{ C-O-C}$ entre les cycles [270]. Les bandes de vibrations de déformation et d'élongation des liaisons C-H et CH_2 se trouvent, respectivement, à 1375 et 1426 cm^{-1} ($\delta\text{ C-H}$) et à 2876 - 2953 cm^{-1} ($\nu\text{ C-H}$) [271]. Le déplacement de la bande de vibration des groupements hydroxyles des TiONts vers les nombres d'onde plus faibles (de 3422 cm^{-1} pour les TiONts nus à 3293 cm^{-1} dans TiONts-CT) peut être expliqué par la présence des groupements amines et également par la formation des liaisons hydrogènes entre les OH des nanotubes et les OH et NH_2 du CT. Cette liaison renforce l'interaction entre le CT et les TiONts.

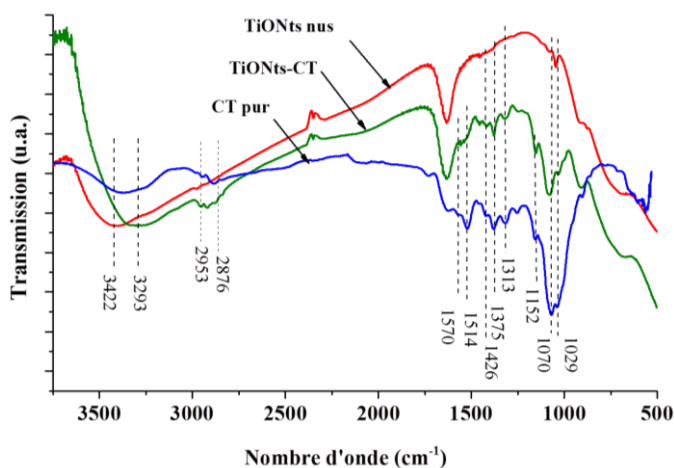


Figure 113 : Comparaison entre les spectres IR des TiONts nus, des TiONts-CT et du CT pur.

L'analyse élémentaire par XPS des TiONts-CT (Tableau 37) montre la présence de l'azote et d'un pourcentage important en carbone. Par ailleurs, le rapport élémentaire C/N dans le nanohybride TiONts-CT (7,8) est similaire à celui dans le CT pur (7,7). La désomation des spectres XPS C1s (Figure 114) révèle la présence de trois composantes C-C/C-H, C-O/C-N et O-C-O avec des pourcentages très proches de ceux du CT pur (Figure 110). Une nouvelle composante, attribuée à la liaison C-O-C du CT, apparaît dans le spectre de l'O1s des TiONts

modifiés. L'augmentation du pourcentage de la contribution O-H de 8,3% pour les TiONts nus jusqu'à 16,5% dans les TiONts-CT s'explique par la présence des groupements hydroxyles organiques (du CT) en plus des OH inorganiques des TiONts.

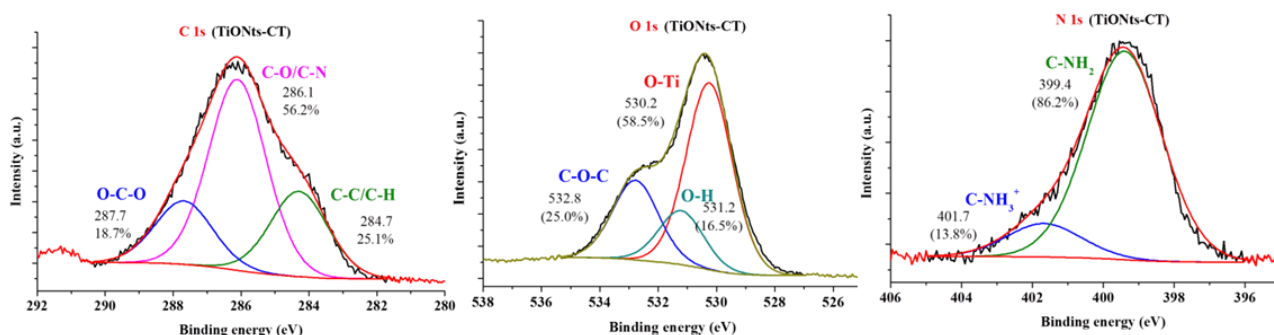


Figure 114 : Désomation des spectres XPS C1s, O1s et N1s des TiONts-CT.

IV.4.4. Comparaison entre les deux approches de greffage du chitosan

IV.4.4.1. Différence au niveau de la décomposition de la matière organique en température : Etude par ATG couplée à la spectrométrie de masse (ATG-SM)

Dans les deux parties précédentes, deux approches différentes de greffage ont été adoptées pour modifier la surface des TiONts par le chitosan. Dans ce paragraphe, l'influence du mode de greffage sur la décomposition thermique de la matière organique est discutée. Pour ce faire, une analyse thermogravimétrique couplée à la spectrométrie de masse (TGA-SM) est réalisée afin de suivre l'évolution du dégagement des gaz lors du processus de décomposition, en fonction de la température. Les analyses TG sont ainsi effectuées sous flux d'hélium (Figure 115) et non pas sous air car l'hélium n'interfère pas avec les gaz dégagés pendant le traitement thermique ce qui facilite l'interprétation des résultats. L'analyse sous hélium décale les températures des pertes de masse vers de plus hautes valeurs car la combustion est ralentie en absence d'oxygène (cas de toutes les autres analyses TG de ce manuscrit). Les courbes ATG des trois échantillons sous air sont données en annexe 7.

Les courbes ATG/DTG de TiONts-CT présentent la même allure que celles du CT seul (Figure 115). Ces courbes montrent deux principales pertes de masse, sans tenir compte de la perte avant 180°C qui est relative à l'eau physisorbée. Néanmoins, un comportement différent de la décomposition des deux nanohybrides est observé. En effet, la vitesse de perte de masse entre 180°C et 400°C est rapide et la perte importante : 50% et 12,5% respectivement pour le CT pur et les TiONts-CT (Tableau 39). Par contre, la vitesse de perte de masse au-dessus de 400°C est beaucoup plus lente que la précédente et étalée sur un large intervalle de température (de 400 à 750°C). Des phénomènes très différents sont observés dans le cas du nanohybride TiONts-APTES-Glu-CT où les deux pertes de masse sont décalées vers les températures plus élevées et où la perte de masse la plus importante se produit au-delà de 440°C, avec un pourcentage de 18% (Tableau 39). Ce résultat s'explique par le fait que le chitosan greffé par liaisons covalentes est fortement lié à la surface des TiONts donc sa décomposition nécessite plus d'énergie contrairement au chitosan adsorbé électrostatiquement à la surface des TiONts

par des liaisons faibles. La même perte de masse entre les deux nanohybrides est malgré tout observée, seule la nature des liaisons change ici (Tableau 36).

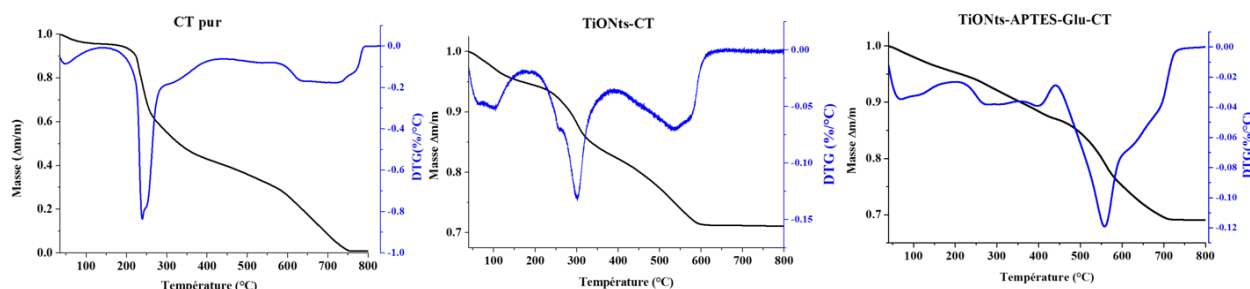


Figure 115 : Courbes ATG du CT pur, des TiONts-CT et des TiONts-APTES-Glu-CT (analyses sous hélium, rampe de température : 5°C/min).

Des analyses des gaz dégagés pendant la décomposition sont menées par ATG-SM afin de mieux comprendre la différence entre les échantillons et identifier les différents pics des pertes de masse dans chaque intervalle de température (Figure 116 et Tableau 39). Le dégagement d'un composé, représenté par un rapport masse/charge (m/z), se traduit par une variation du courant ionique (A) en fonction du temps. Ainsi, chaque composé dégagé pendant la décomposition thermique de l'échantillon est représenté par un pic. Seules les espèces ayant une variation importante du rapport signal/bruit sont prises en compte, les autres sont négligées. En raison de l'étalement de certains pics sur un large intervalle de température (temps), il a été décidé de raisonner sur leurs sommets pour simplifier l'interprétation.

Tableau 39: Principales pertes de masse, taux de greffage et principaux gaz dégagés pendant le traitement thermique et déterminés à partir des analyses ATG-SM du CT pur et des nanohybrides (TiONts-CT et TiONts-APTES-Glu-CT).

Echantillon	1 ^{ère} perte	2 ^{ème} perte	3 ^{ème} perte	Taux de greffage (molécule/nm ²)
TiONts nus	-	-	-	6,7 OH
CT pur	25-180°C (5,8%) H ₂ O	150-420°C (50%) H ₂ O-O ₂ -CO/N ₂	>420°C (44,2%) CO ₂	-
TiONts-CT	25-180°C (5,2%) H ₂ O	180-400°C (12,4%) H ₂ O-O ₂ -CO/N ₂	>400°C (11,2%) CO/N ₂ -CO ₂ -O ₂	0,15 CT
TiONts-PTES-Glu-CT	25-190°C (4,5%) H ₂ O	190-440°C (8,5%) H ₂ O- CO/N ₂	>440°C (18,2%) H ₂ O-CO/N ₂ -CO ₂ -O ₂	0,05 CT

Un dégagement de quatre principales espèces (m/z 18, 28, 32 et 44) est observé pour les trois échantillons analysés (Figure 115). La première espèce libérée correspond à la vapeur d'eau (m/z 18), elle se dégage à une température faible pour le CT seul (environ 230°C) par rapport aux nanohybrides (315°C pour les TiONts-CT et vers 410°C pour TiONts-APTES-Glu-CT). Ce résultat est dû au fait que l'eau libérée des TiONts-CT et des TiONts-APTES-Glu-CT ne provient pas de l'humidité ou de la combustion de la matière organique seulement mais aussi du phénomène de déshydroxylation des OH de structure des

TiONts. Ce phénomène se produit tard pour les deux nanohybrides à cause de la présence de la matière organique à la surface et à l'intérieur des tubes, ce qui empêche la libération des molécules à basses températures. Ici nous voyons que plus il y a de matière organique à la surface, plus le dégagement de l'eau est retardé (315°C pour les TiONts-CT et 410°C pour TiONts-APTES-Glu-CT).

La plus grande variation du courant ionique est observée pour l'espèce m/z 28 qui peut être attribué au dégagement de CO et/ou de N₂. Dans nos conditions (absence d'oxygène et présence de composés azotés), les deux dégagements sont possibles. Ce pic est étendu sur un plus large intervalle de temps (température) dans le cas de l'échantillon TiONts-APTES-Glu-CT. Ceci peut être expliqué par l'abondance des liaisons C-C/C-H (analyse XPS, Tableau 38) et de l'azote (deux sources : APTES et CT) qui sont réparties sur trois couches organiques et mettent en jeu des liaisons covalentes dans le cas des TiONts-APTES-Glu-CT. Le même résultat est obtenu avec le dégagement de l'espèce m/z 44 qui est attribuée au dioxyde de carbone (CO₂) : la quantité de CO₂ émise augmente et le phénomène s'étend plus haut en température pour les TiONts-APTES-Glu-CT. La libération de ce gaz vient à la fin, après le dégagement du dioxygène (O₂, m/z 32), ce qui suggère une auto-combustion induite par l'O₂ dégagé puisque l'émission du CO₂ augmente en présence d'air [272].

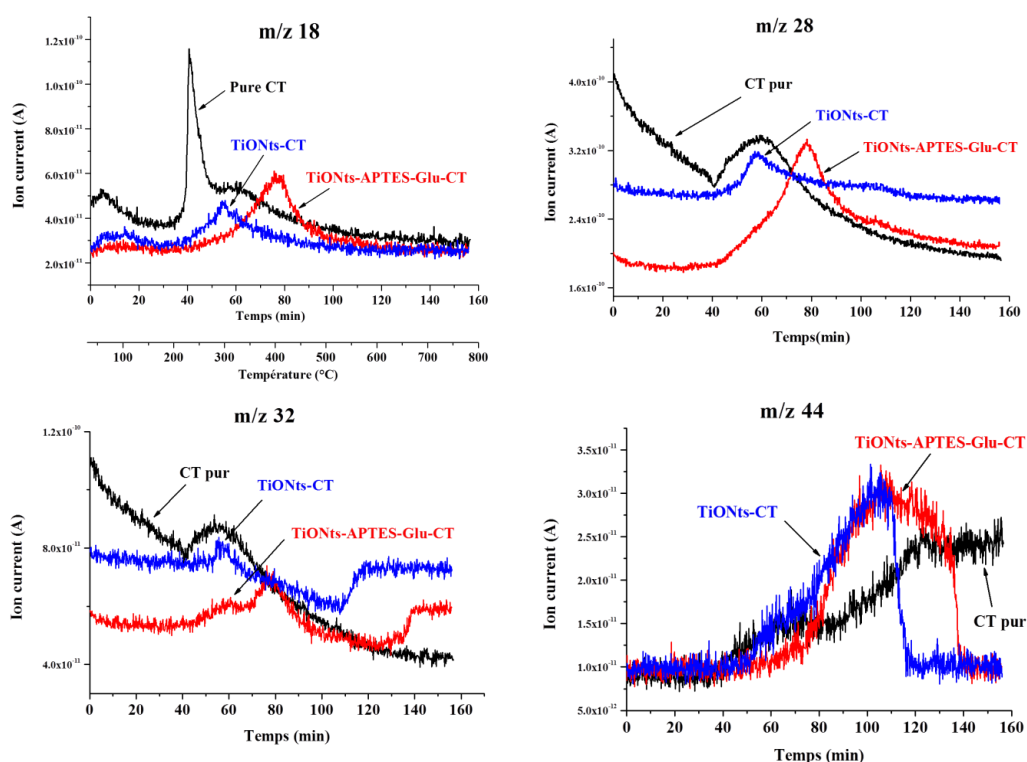


Figure 116 : Evolution du courant ionique des quatre principales espèces dégagées (m/z 18, 28, 32 et 44) lors de l'analyse thermogravimétrique du CT pur, des TiONts-CT et des TiONts-APTES-Glu-CT en fonction du temps et sous flux d'hélium.

En conclusion, la différence entre les courbes ATG des trois échantillons est étroitement liée à la vitesse de dégagement des gaz pendant le processus de décomposition thermique, elle-même liée à la force des liaisons entre le chitosan et les TiONts. La formation de liaisons covalentes durant le greffage retarde la décomposition et décale le dégagement des gaz vers des

températures plus élevées pour le nanohybride TiONts-APTES-Glu-CT. Par ailleurs, la présence de la matière organique à la surface, ou piégée dans les cavités des TiONts, retarde le phénomène de déshydroxylation pour les deux approches de greffage et confère aux TiONts plus de stabilité thermique.

IV.4.4.2. Comparaison de la stabilité colloïdale des TiONts modifiés par le chitosan et issus des deux approches, dans différents milieux

Le premier objectif du greffage du chitosan est l'amélioration de la biocompatibilité des TiONts pour que ces derniers ne soient pas rejetés par le système immunitaire, tout en garantissant une bonne stabilité colloïdale dans les milieux biologiques. Contrairement aux études de stabilités réalisées dans les paragraphes précédents dans le PBS, la stabilité des suspensions des TiONts nus et greffés selon les deux approches a été évaluée dans des milieux tentant de simuler les milieux biologiques. Cette étude a été réalisée, sous ma direction, par Fanny Bouvet dans le cadre de son stage d'été du niveau L2.

Le suivi de la stabilité est effectué par des mesures de l'absorbance de la suspension des TiONts nus ou des nanohybrides en fonction du temps pendant 2h30. Les mesures sont normalisées par rapport à la première mesure ($t=0$) pour faciliter la comparaison et homogénéiser l'échelle. A part le PBS, le milieu habituellement utilisé par notre équipe pour mesurer la stabilité colloïdale des suspensions, deux milieux biologiques sont choisis :

- le MEM (Minimum Essential Medium), c'est un milieu qui ne contient pas de protéines, il est très utilisé pour les tests *in vitro*,
- le sérum physiologique (sérum ϕ), milieu isotonique très utilisé en médecine, il ne contient pas de protéines non plus.

A ces deux milieux ont été ajoutées différentes protéines (40 g/L d'albumine ou 10% en Sérum de Veau Fœtal (SVF)). Le SVF contient toutes les protéines du veau fœtal, alors que l'albumine est la protéine principale dans le corps humain. Concernant le SVF, 10% volume à volume ont été choisis car c'est le pourcentage utilisé lors des tests de cytotoxicité. La concentration en protéines totale chez l'Homme varie quant à elle de 60 à 80 g/L. Dans cet intervalle, l'Homme a une concentration de 34 à 46 g/L d'albumine avec une moyenne de 40 g/L. C'est pourquoi certains essais ont été réalisés à 40 g/L d'albumine. L'objectif est bien ici de tenter de se rapprocher des conditions des essais *in vitro* mais également *in vivo*.

La composition des milieux est donnée dans le Tableau 40.

Tableau 40 : Compositions des milieux utilisés pour les études de stabilité colloïdales des suspensions de nanohybrides nanotubes/chitosan et conditions de ces mesures (pH et température).

Milieu	PBS	MEM	Sérum physiologique (ϕ)
Composition du milieu	0,1 M Tampon phosphate	12 acides aminés, 8 vitamines, mélange de sels inorganiques (6 sels à 0,153 M), D-Glucose	NaCl (0,154 M)
Conditions des mesures	pH=7,4 T=25°C	pH=7,4 T=37°C	pH=7,4 T=37°C

Une partie des résultats de ces études de stabilité des nanohybrides est résumée Figure 117. Cette figure montre que la stabilité colloïdale des TiONts dans le PBS s'améliore après chaque étape de greffage par liaison covalente de telle façon qu'elle atteint un maximum de stabilité pour la dernière étape avec le greffage du CT. La nature hydrophile du chitosan est à la base de l'augmentation de la stabilité colloïdale des nanotubes pour les deux types de fonctionnalisation. L'approche de greffage étape après étape aboutit à un nanohybride très stable dans le PBS, alors que celui obtenu par adsorption du chitosan en une étape est moins stable. Cette différence peut être due à une désorption partielle du CT dans le PBS ou bien à la nature de ce milieu où il y a majoritairement des anions. La bonne stabilité de la suspension de TiONts-APTES-Glu-CT est justifiée par l'absence d'interactions entre les nanotubes après greffage grâce aux trois couches de matière organiques à leur surface qui agissent comme stabilisants stériques (Figure 117).

Le changement de milieu, modifie le comportement des nanohybrides en suspension (Figure 117). En effet, dans le MEM, les TiONts nus gardent la même évolution de la stabilité en fonction du temps et ce, même en modifiant les protéines en solution ; par contre, la stabilité colloïdale des TiONts modifiés par le CT est fortement dépendante de la présence de ces protéines. Ainsi, le nanohybride TiONts-APTES-Glu-CT garde à peu près sa stabilité dans le milieu MEM (10% FVS) alors qu'il la perd complètement en présence de 40 g/L d'albumine. Cependant, la stabilité du nanohybride TiONts-CT est la même dans les deux cas et moins bonne que dans le PBS. La première conclusion à tirer de cette constatation est que la stabilité colloïdale des nanohybrides est très dépendante, aussi bien de la composition chimique du milieu, que de la chimie de surface des nanoparticules qui peuvent y interagir. La deuxième conclusion est que les TiONts fonctionnalisés par liaison covalente sont stables quand il n'y a pas beaucoup de protéines dans le milieu, en particulier l'albumine. Cela n'est pas observé avec les TiONts-CT qui gardent la même évolution de la stabilité en fonction du temps ; cela peut être attribué à la présence d'une quantité importante de CT à la surface des TiONts dans ce cas (0,15 CT/nm², Tableau 39 vs. 0,05 CT/nm² par la voie de greffage covalente).

Quant à l'évolution de la stabilité dans le sérum physiologique, les résultats montrent une meilleure stabilité pour les TiONts nus en présence d'albumine et le résultat inverse avec 10% de SVF. Un comportement similaire est observé pour les deux nanohybrides dans ce milieu. On peut donc déduire, d'après les résultats obtenus et en considérant la composition des milieux testés (Tableau 40) que l'élément perturbateur de la stabilité du nanohybride TiONts-APTES-Glu-CT peut être les acides aminés qui peuvent, avec leurs fonctions amines libres, réagir avec les groupements aldéhydes libres restant à la surface des TiONts. Cette interaction ne peut pas se produire avec le TiONts-CT ce qui explique la non dépendance de leur stabilité colloïdale avec ce milieu et les protéines qui y sont ajoutées. Notons l'augmentation de la stabilité colloïdale, avec le temps, des TiONts nus dans le sérum physiologique en présence d'albumine. Cette dernière doit d'adsorber à leur surface et ainsi les stabiliser.

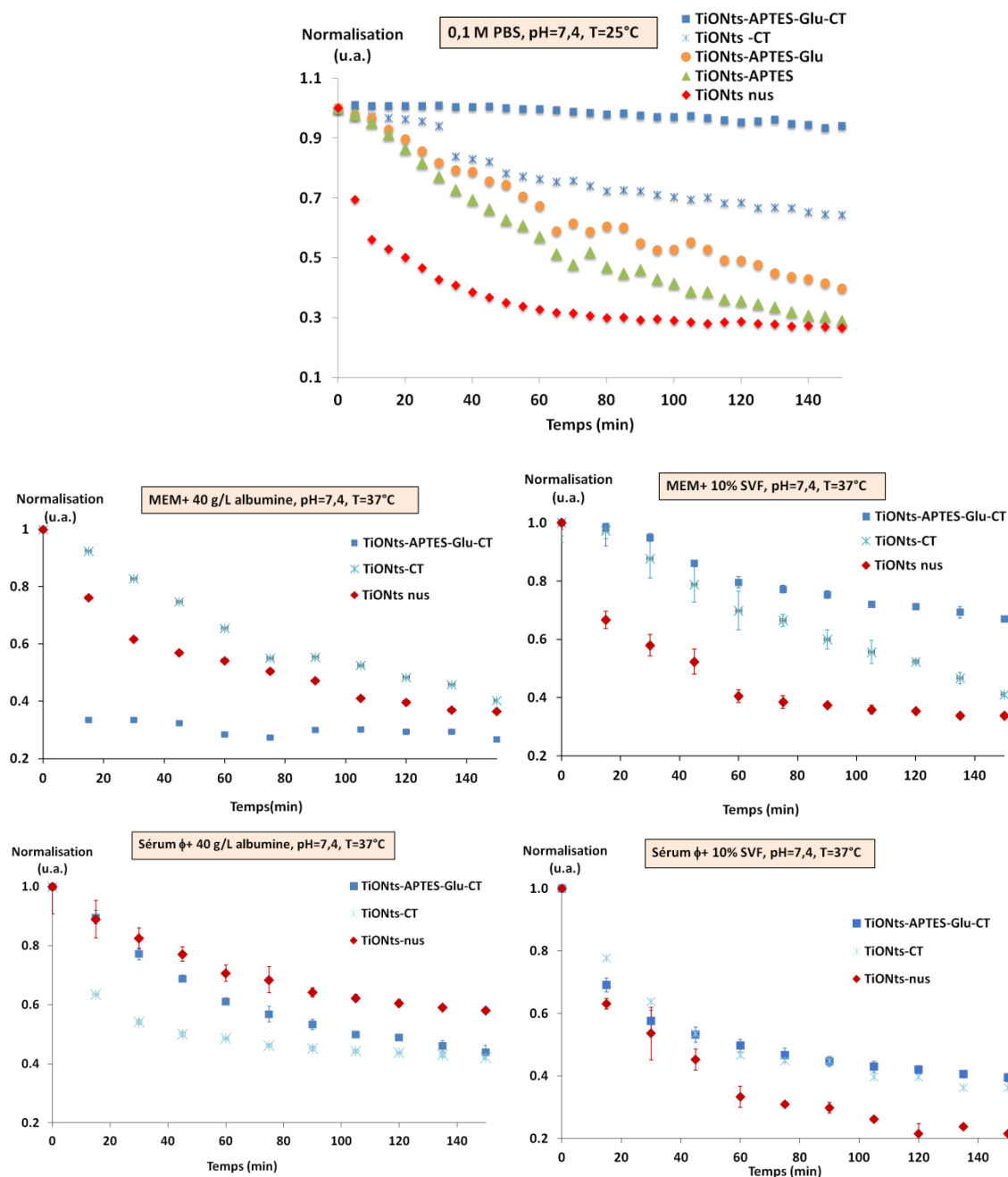


Figure 117 : Etude de la stabilité colloïdale des suspensions de TiONts nus et des deux nanohybrides synthétisés par les deux approches de greffage TiONts-CT et TiONts-APTES-Glu-CT dans différents milieux à la concentration 100µg nanohybrides/mL (n=3).

L'observation au MET des TiONts modifiés par le chitosan dans l'eau prouve une amélioration de leur état de dispersion (Figure 118). De petits agglomérats de TiONts, plus aérés et dispersés, sont observés pour les deux nanohybrides, pour une même concentration et préparation de la grille d'observation. Les Figure 118b,d montrent la conservation de la morphologie tubulaire des nanotubes ; une couche de matière organique est observée à leur surface (insert Figure 29d), ce qui est assez rare *via* cette technique d'analyse.

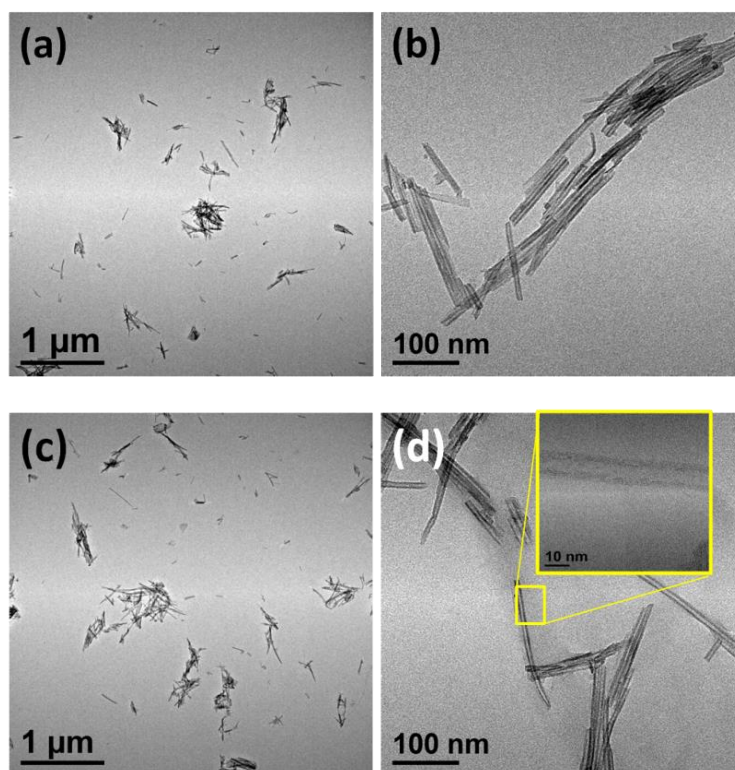


Figure 118 : Clichés MET de l'état de dispersion des TiONts modifiés par le chitosan, dans l'eau (a,b) TiONts-APTES-Glu-CT (c,b) TiONts-CT.

IV.5. Validation de la biocompatibilité des nanohybrides par des tests d'évaluation de la toxicité *in vitro* et *in vivo*

La tolérance des nanohybrides par les systèmes biologiques est mesurée par différents tests de toxicité. Les tests *in vitro* sont réalisés, au sein du laboratoire NUTox INSERM UMR1231 (AgroSup Dijon) par le Dr. Isabelle Séverin et par Annette Luce (doctorante en 1^{ère} année). Deux tests sont réalisés: le test du rouge neutre et la mesure de la cinétique de production des ARN totaux. Les nanohybrides évalués sont les TiONts-APTES-Glu-CT et les TiONts-CT.

Le test d'évaluation de la toxicité *in vivo* (test sur embryons de poisson zèbre), est effectué pour le nanohybride TiONts-CT seulement. Ce test est réalisé au sein du Zebrafishlab (INSERM U866) à Dijon par l'équipe du Prof. Johanna Chluba.

IV.5.1. Tests de cytotoxicité

Les cellules utilisées pour les tests *in vitro* sont des cellules de la lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire humain HepG2, Cette lignée cellulaire est un modèle approprié pour étudier la toxicité des nanoparticules. Elle présente l'avantage de mimer les processus d'activation et de détoxification qui ont lieu *in vivo* chez l'Homme et d'exprimer la plupart des protéines plasmatiques caractéristiques des cellules hépatiques saines [273], lieu où les nanoparticules ont souvent tendance à s'accumuler. L'activité cytotoxique est comparée à un

indicateur de cytotoxicité qui a largement diminué le taux de viabilité cellulaire, appelé témoin positif. 24 h avant l'exposition aux nanotubes, les cellules HepG2 sontensemencées dans des plaques à 96 puits (Figure 119) (Dutscher, France) dans 200 μ L de milieu de culture à une concentration finale en cellules de l'ordre de 5.10^4 cellules/puits.

IV.5.1.1. Test du rouge neutre

La cytotoxicité dans ce test est exprimée par la diminution de la fixation du rouge neutre, un colorant cationique qui est utilisé pour différencier les cellules vivantes des cellules mortes. En effet, les cellules vivantes intègrent ce colorant dans leurs lysosomes, alors que les cellules mortes ne l'intègrent pas. Plus une cellule est proche de la mort cellulaire, plus sa capacité à intégrer le rouge neutre diminue. Après la mise en contact des nanohybrides et des cellules (24 h), la quantité du rouge neutre fixée par les cellules vivantes est mesurée par spectrophotométrie à 540 nm (Figure 119). L'absorbance mesurée est proportionnelle aux nombres de cellules vivantes et exprimée en pourcentage par rapport à un témoin négatif (T^-) (Figure 120). Le témoin négatif ici est des cellules qui ne sont pas mises en contact avec des nanoparticules mais avec le milieu uniquement (MEM seulement) et le témoin positif (T^+) est réalisé avec le dodécylsulfate de sodium (SDS) à 3% (MEM+3% SDS, cytotoxique).

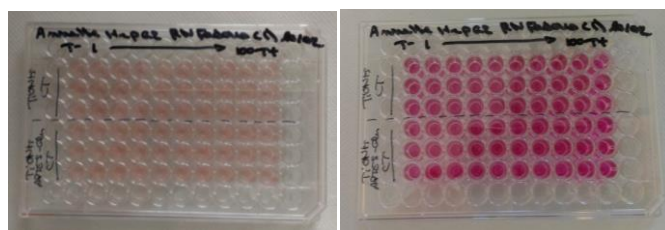


Figure 119 : Photos des deux plaques 96 puits de cellules HepG2 + nanohybrides (a) avant (b) après ajout du rouge neutre.

Les résultats donnés par ce test ne sont pas concluants car les pourcentages de viabilité cellulaire sont supérieurs à 100% pour toutes les concentrations de nanohybrides (TiONts-CT et TiONts-APTES-Glu-CT). Ces résultats montrent la surestimation de la quantité de rouge neutre fixée, ainsi le colorant n'est pas seulement fixé par les cellules mais aussi par les nanohybrides. En effet, tout d'abord il est important de rappeler que les TiONts n'absorbent pas à 540 nm (thèse A.L. Papa [149]) ; ensuite, le rouge neutre, qui est en fait le chlorure de 3-amino-7-diméthylamino-2-méthylphénazine présente un pK_a proche de 7,4. Ainsi, au pH de ces essais, l'amine de ce composé est en partie sous sa forme acide NH_3^+ et peut conduire à une adsorption du rouge neutre sur les TiONts, qui sont certes globalement chargés positivement (dans l'eau, $NaCl\ 10^{-2}\ M$ Figure 112), mais présentent aussi localement des charges négatives provenant des hydroxyles résiduels. Surtout, les charges de surface dans le milieu de culture n'ont pu être déterminées et le potentiel de surface des tubes a pu changer, des interactions électrostatiques entre les nanohybrides et le rouge neutre ne peuvent donc être exclues. Dans le cas des TiONts-APTES-Glu-CT, un effet dose est observé : plus la concentration en nanohybrides augmente, plus la quantité de rouge neutre est adsorbée, c'est assez logique et conforte notre hypothèse. Dans le cas des TiONts-CT, cet effet dose est observé jusqu'à la concentration de 12,5 μ g/mL, au-delà l'absorbance mesure diminue (Figure 31). Ce pourrait être le signe d'une certaine toxicité. Cependant, deux phénomènes ayant lieu simultanément, il

est inopportun de conclure grâce à ce test, faussé par des interactions avec les nanohybrides évalués. Afin de pallier ce problème, un autre test non colorimétrique de cytotoxicité est effectué : le test de mesure de la cinétique de production des ARN totaux.

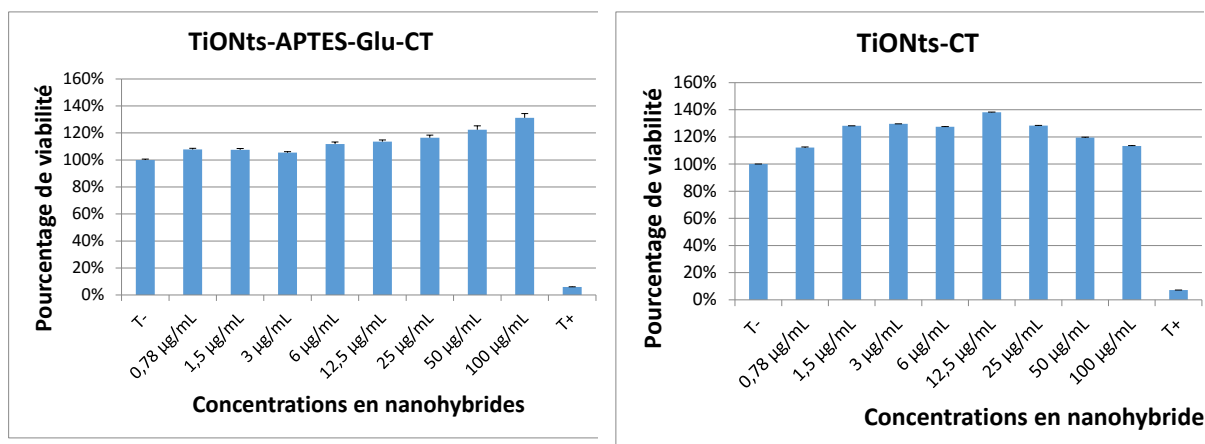


Figure 120 : Pourcentage de viabilité cellulaire en fonction de la concentration des nanohybrides mis en contact avec les cellules HepG2 dans le MEM (n=3) : TiONts-APTES-Glu-CT et TiONts-CT. T- : cellules dans le milieu, T+ : SDS.

IV.5.1.2. Test de mesure de la cinétique de production des ARN totaux pour l'évaluation de la cytotoxicité des nanohybrides

La viabilité cellulaire dans ce test est exprimée par la production des ARN totaux par les cellules, en comparaison avec un témoin négatif (T-) de viabilité à 100%, ici les cellules dans leur milieu de culture (Figure 121). La détermination de la cinétique de production des ARN s'effectue par la mesure de la vitesse d'incorporation de l'uridine tritiée par les cellules et utilisée dans la synthèse des ARN. Ensuite, les mesures de la radioactivité des ARN synthétisés toutes les 5 min, sur un temps total de 30 minutes, permettent de tracer la courbe de l'incorporation de l'uridine en fonction du temps. Ce test a été adapté aux cellules HepG2 pour la première fois par I. Valentin *et al.* [274]. La diminution significative de la vitesse de synthèse des ARN totaux est considérée comme un indicateur de cytotoxicité. Ce test est privilégié par rapport aux tests colorimétriques (MTT, Alamar Blue et rouge neutre) en raison de sa robustesse et de sa sensibilité [275]. Le protocole expérimental détaillé est donné en annexe 8.

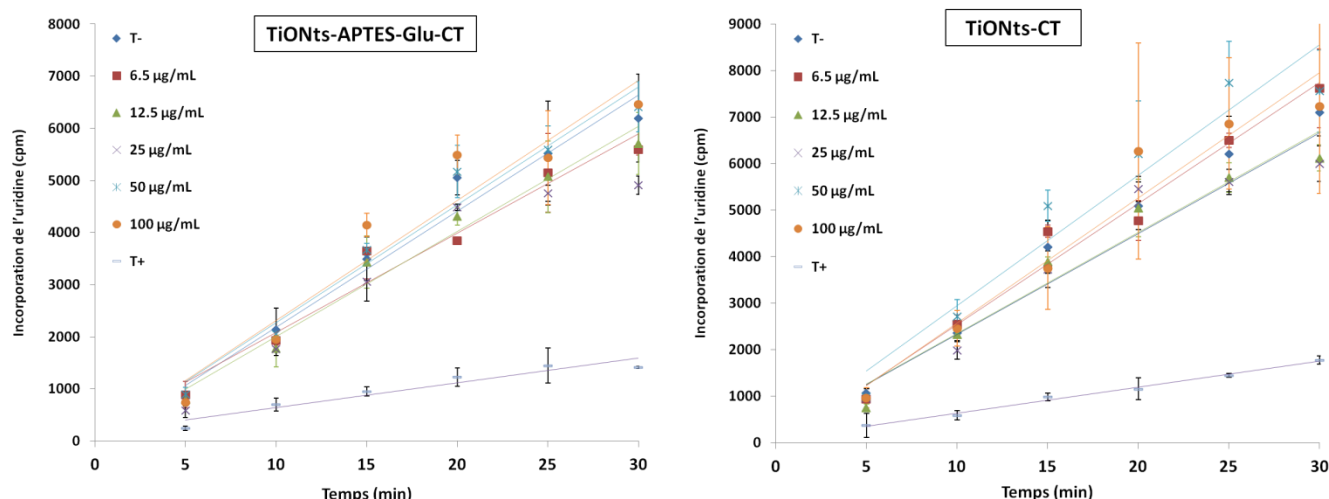


Figure 121: Cinétique d'incorporation de l'uridine tritiée dans les cellules HepG2 en fonction du temps sur une gamme de concentrations en nanohybrides allant de 6,5 à 100 µg/mL en comparaison avec le T⁻ (MEM sans nanohybrides, non cytotoxique) et T⁺ (MEM + K₂Cr₂O₇, cytotoxique) (n=3).

Les courbes de vitesse d'incorporation de l'uridine tritiée peuvent également être traduites sous forme d'histogrammes afin de mieux comparer l'évolution de la cytotoxicité en fonction de la concentration en nanohybrides (Figure 122).

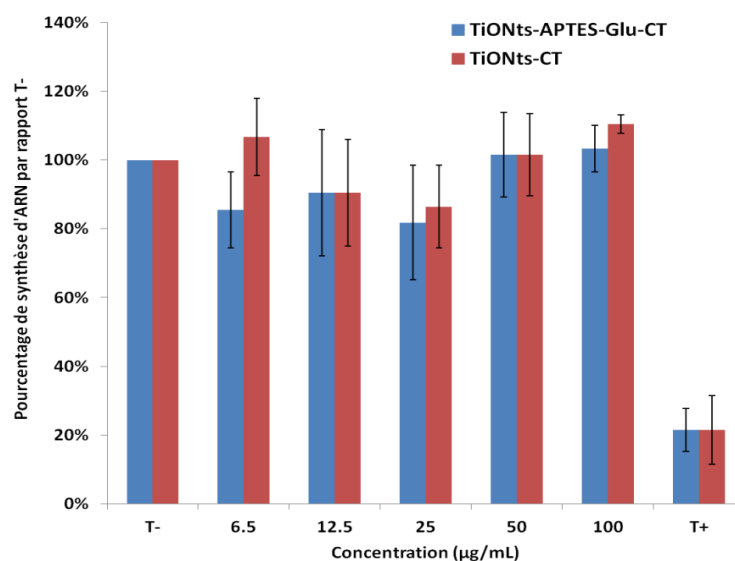


Figure 122 : Histogramme présentant les pourcentages de viabilité cellulaire en fonction des concentrations en nanohybrides en comparaison avec le T⁻ (MEM sans nanohybrides, non cytotoxique) et T⁺ (MEM + K₂Cr₂O₇, cytotoxique).

L'analyse des résultats de ce test prouve la non toxicité des nanohybrides synthétisés par les deux approches, TiONts-APTES-Glu-CT et TiONts-CT, sur toute la gamme de concentration étudiée allant de 6,25 à 100 µg/mL, prouvant ainsi l'absence d'effet dose pour ces nanohybrides. Un résultat similaire avait été obtenu dans le cadre de la thèse de Jérémy Paris avec le même test pour des nanohybrides TiONts-APTES [275].

IV.5.2. Tolérance des TiONts-CT *in vivo* : tests sur des embryons de poisson zèbre

L'évaluation de la toxicité sur le modèle des embryons de poisson zèbre est une méthode très récente et intéressante pour le « screening » des nanoparticules *in vivo*. Ce test permet d'analyser la toxicité dans un système beaucoup plus complexe que des cellules cultivées. C'est un test « invasif » et moins coûteux que des études de biocompatibilité à grande échelle chez des souris ou des rats [276]. Les embryons de poisson zèbre sont transparents et se développent en dehors de la mère ce qui permet de suivre et comprendre facilement le mécanisme cellulaire en utilisant un simple microscope optique.

Les concentrations en nanohybride étudiées sont 1, 10, 50,75 et 100 µg/mL. Ces trois dernières concentrations sont très supérieures à la quantité habituellement injectée *in vivo*. Le nombre de répétition est de trois (n=3) et 60 embryons sont utilisés dans chaque répétition (180 animaux donc au total). La survie, l'éclosion et le développement des poissons zèbre sont suivis pendant 96 h. Il faut que la survie des poissons zèbre soit proche de 100%, l'éclosion supérieure à 90% (entre 24 et 48h) et les malformations des larves proches de 0 % pour conclure sur la non-toxicité des nanohybrides. Le contrôle négatif est l'eau (non cytotoxique) et le contrôle positif est l'eau avec de la 3,4-dichloroaniline à 4 mg/mL.

La survie et l'éclosion des poissons zèbre ne sont pas affectées par la présence des nanohybrides pour toute la gamme de concentration étudiée de 1 à 100µg/mL (Figure 123). Aucune létalité ou changement morphologique n'est observé même pour les concentrations les plus élevées. Cela confirme la non toxicité des TiONts modifiés par le chitosan.

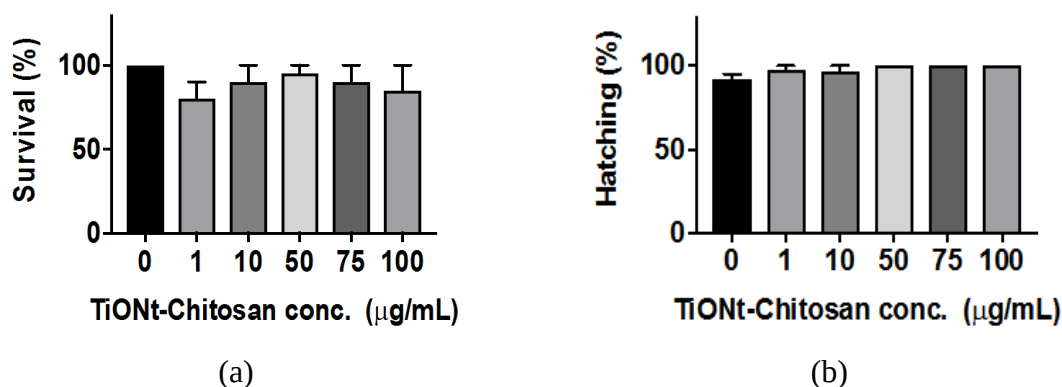


Figure 123 : Pourcentage de (a) survie des embryons et (b) d'éclosion des œufs de poisson zèbre en fonction de la concentration en TiONts-CT.

En conclusion, tous les tests *in vitro* et *in vivo*, réalisés sur les TiONts modifiés par le chitosan, confirment la non toxicité de ces derniers et leur biocompatibilité avec les systèmes biologiques sur une large gamme de concentrations.

IV.6. Résultats majeurs et conclusions

L'élaboration d'un nanovecteur est une tâche très complexe. Dans ce chapitre, deux études principales et originales ont été menées. La première concerne le greffage d'un phénol

stilbénique, le 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-*trans*-stilbène. Cette molécule a été retenue car il s'agit d'un analogue du *trans*-resvératrol à fort pouvoir antioxydant/anticancérogène. La seconde étude présente quant à elle l'amélioration de la biocompatibilité des TiONts par le chitosan.

Le 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-*trans*-stilbène (HAPtS) a été synthétisé au sein d'un laboratoire partenaire (l'ICMUB) afin d'ajouter à cet analogue du *trans*-resvératrol une fonction amine pour son greffage sur les TiONts. La première étape a alors consisté en la caractérisation de la molécule synthétisée par trois techniques spectroscopiques (IR, UV-Vis et XPS) afin de vérifier sa conformité avec la molécule recherchée mais surtout afin d'avoir des spectres de références pour ensuite pouvoir attester de la présence de la molécule au sein du nanohybride final et prouver les liens covalents avec les TiONts.

Le greffage d'un phénol-stilbénique, le HAPtS, sur des nanoparticules, ici les TiONts, est une première. Dans un premier temps, des TiONts préfonctionnalisés avec un catéchol disposant d'une fonction acide carboxylique (le DHCA) sont utilisés. Un greffage peptidique est alors réalisé entre la fonction acide carboxylique des TiONts-DHCA et l'amine du HAPtS. Deux méthodes ont été testées utilisant deux agents de couplage différents le couple EDC/NHS et le PyBOP. Un taux de fonctionnalisation proche est observé dans les deux cas (0,4/0,5 HAPtS/nm²), pouvant cependant être faussé par un décrochage simultané du DHCA durant l'étape de fonctionnalisation par le HAPtS. Pour tenter de contourner cette difficulté, une décomposition des courbes DTG a été effectuée afin d'estimer les quantités de chaque molécule. Les analyses XPS ont quant à elles prouvé la formation de l'amide.

En raison de l'instabilité de l'édifice TiONts-DHCA-HAPtS (décrochage du DHCA), une troisième voie de synthèse a été éprouvée en changeant le ligand à la surface des TiONts par un ligand *a priori* plus robuste de la famille des organosilanes le CPTES. Cette méthode qui repose sur une substitution nucléophile (SN) a conduit à un résultat avec un taux de greffage d'environ 0,9 HAPtS/nm² (72,5 mg HAPtS/g TiONts).

La deuxième originalité de ce chapitre est l'étude du greffage du chitosan sur les TiONts, un polymère de biocompatibilité. Les TiONts ont été fonctionnalisés selon deux méthodes : le greffage du chitosan par liaison covalente (première approche) et l'adsorption du chitosan, à la surface des TiONts, par interactions électrostatiques (seconde approche). Le taux de greffage obtenu par la première approche est plus faible (0,05 CT/nm²) que celui obtenu pour la seconde (0,15 CT/nm²).

Une comparaison entre les deux méthodes de greffage a été réalisée par une analyse ATG couplée à la spectrométrie de masse (ATG-SM) et a montré comment la décomposition thermique des deux nanohybrides diffère selon la force des liaisons établies à la surface des nanotubes. Une décomposition retardée a été observée pour les nanohybrides modifiés par greffage et non pas juste par mise en contact, prouvant que des liaisons covalentes ont bien été

obtenues dans le premier cas, par rapport aux liaisons faibles, de nature électrostatique, obtenues dans le second cas.

La stabilité colloïdale des deux nanohybrides a été ensuite comparée dans différents milieux pour tenter de simuler les conditions biologiques réelles. Ces essais montrent que la stabilité des nanohybrides dépend fortement de la composition du milieu, en particulier de la présence de protéines, ainsi que de la chimie de surface des nanohybrides. Les TiONts modifiés par liaison covalentes sont les plus affectés par ce changement.

Finalement, des tests de toxicité (*in vivo* et *in vitro*) ont été réalisés dans le but d'évaluer la biocompatibilité des nanohybrides préparés. Un test *in vitro* très sensible a été utilisé, permettant en plus d'éviter les erreurs de mesures produites par la présence des nanohybrides lors de tests colorimétriques, il s'agit du test de cinétique de production des ARN totaux. Ce test original a prouvé la non cytotoxicité des nanohybrides même à fortes doses ($100\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$). Un test *in vivo* a été effectué sur des embryons de poisson zèbre et a également confirmé l'absence d'effet indésirable des TiONts-CT sur une large gamme de concentrations (de 1 à $100\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$).

**CONCLUSIONS
ET
PERSPECTIVES**

L'objectif de ce travail était d'optimiser la synthèse des nanotubes de titanate (TiONts) par voie hydrothermale en mode statique et dynamique et de modifier leur surface afin d'élaborer un nanovecteur à base de TiONts. Ce nanovecteur doit être capable de fixer et d'administrer une molécule thérapeutique qui est dans notre cas un phénol stilbénique synthétique, le 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-*trans*-stilbène (HAPtS), une molécule structurellement proche du *trans*-resvératrol.

L'obtention des TiONts par traitement hydrothermal est un sujet qui a été largement étudié dans la littérature en raison de la diversité des paramètres expérimentaux qui entrent en question et qui peuvent, par une variation infime, influencer leur synthèse. Dans cette étude, deux méthodes de synthèse hydrothermale ont été adoptées : le mode statique et le mode dynamique. L'optimisation des conditions expérimentales en mode statique, pour un précurseur TiO₂ rutile de taille de grains d'environ 245 nm et dans un autoclave de capacité 20 mL, a abouti aux résultats suivants :

- Pour un temps fixe de 24 h et une concentration en NaOH de 10 M, aucune des températures essayées (120°C, 150°C et 200°C) n'a permis de synthétiser des TiONts. En contre partie, un phénomène de transformation du TiO₂ rutile en anatase, au lieu de la formation des TiONts, a été illustré par des images METHR et des mesures SAD pour les températures de 150 et 200°C.
- L'optimisation du temps de traitement hydrothermal et l'étude de la variation de la concentration de la base, à une température fixe de 150°C, a permis de déterminer un temps optimal de 96 h et une concentration en NaOH de 10 M.

Pour la première fois, l'effet du changement de la taille de l'autoclave sur la synthèse des TiONts a été discuté dans cette étude. En effet, le changement de la capacité de l'autoclave de 20 mL à 1 L, en gardant tous les paramètres expérimentaux classiques fixes (type de précurseur TiO₂, température, temps, concentration en base, mode de lavage), a conduit à la synthèse des nanorubans au lieu des nanotubes. Ce résultat a été justifié par l'augmentation de la surface de contact entre la solution et les particules de précurseur (du fait d'avoir couché ce réacteur, en raison de ses dimensions, dans le four). Ainsi, un temps de synthèse de 48 h s'est avéré suffisant pour synthétiser des TiONts dans ces conditions (T=150°C, t=48 h, [NaOH]=10 M, capacité autoclave = 1 L) avec un rendement près de 100% et des dimensions de nanotubes telles que $\varnothing_{\text{ext}} \approx 10$ nm, $\varnothing_{\text{int}} \approx 4$ nm et une distance intercouches de 7,8 Å.

La deuxième méthode de synthèse, réalisée en mode dynamique et qui fait l'originalité de cette partie "synthèse des TiONts", est l'objet d'une publication scientifique publiée dans Journal of Alloys and Compounds en 2017. Ce mode de synthèse a mis en œuvre le même précurseur rutile, que celui utilisé pour la méthode statique et a été assuré par un réacteur hydrothermal qui fournit une agitation mécanique forte par balancement. Sachant que ce type d'agitation a été, pour la première fois, utilisé pour la synthèse des nanotubes, il a fallu optimiser les paramètres de synthèse par ce mode, y compris le temps d'agitation par heure de traitement. Les principaux résultats obtenus sont les suivants :

- L'étude de la variation du temps d'agitation de 0 à 20 min/h a conduit à conclure qu'une agitation longue (> 10 min/h), pendant un temps de réaction relativement long (16 h), favorise la formation des nanorubans. Le mécanisme de formation de ces derniers a été expliqué par deux voies possibles : soit par rassemblement et compaction des nanotubes sous l'effet de conditions « dures » de synthèse, soit par une croissance excessive et non contrôlée des nanofeuillets de titanate.
- La structure cristalline des TiONts synthétisés en mode statique (synthèse de référence) et en mode dynamique, pour des temps d'agitation entre 0 et 20 min/h a été discutée, en se basant sur plusieurs techniques de caractérisations (DRX, Raman et XPS). Les résultats ont montré que la structure orthorhombique de formule $\text{H}_2\text{Ti}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ est la plus proche de celle des nanotubes obtenus dans nos conditions de synthèse. Il a également été montré que le changement morphologique des TiONts en nanorubans, sous l'effet de l'agitation, est accompagné par un changement structural (de la phase orthorhombique à la phase monoclinique de formule $\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$) ainsi qu'un changement au niveau des propriétés physico-chimiques. En effet, il a été prouvé, par XPS et ATG, que le nombre d'hydroxyles de structure croît avec l'augmentation du temps d'agitation/h.
- L'application d'une agitation mécanique en continu, à une température élevée (180°C) pendant des temps de traitement hydrothermal de 30 min, 1 h et 2 h a un effet inattendu. En effet, il a été constaté que la synthèse des TiONts commence dès les 30 premières minutes de réaction et atteint un rendement optimal au bout de 2 heures seulement (au lieu de 48 h en mode statique). Les nombreuses caractérisations structurales, spectroscopiques et morphologiques (DRX, Raman, UV-visible du solide et MET) ont conclu quant à la pureté des échantillons synthétisés. Ce résultat a été expliqué par une accélération de la cinétique de dissolution du précurseur, induite par l'agitation et la température. Dans ce cas, l'effet de l'agitation se manifeste par l'augmentation de l'homogénéité de la solution et le renouvellement constant de la couche autour des particules de TiO_2 .
- Le mécanisme de formation des TiONts a été discuté en se basant sur des images MET. Trois étapes principales ont été discernées : la première étape est la dissolution du précurseur, la deuxième étape est le développement des nanofeuillets de titanate sous plusieurs formes et la troisième étape est la formation des nanotubes par enroulement des feuillettes.
- L'importance du lavage eau/acide est également un des points importants discutés dans ce manuscrit. Il a été montré, images MET à l'appui, que le lavage par l'eau est une étape cruciale dans la formation des TiONts et l'obtention de leur morphologie finale en multicouche, contrairement à ce qui est prétendu dans de nombreuses études. Par contre, le rôle du lavage acide est d'améliorer l'efficacité du lavage et d'accélérer l'échange ionique Na^+/H^+ et par conséquent d'améliorer le rendement de la synthèse des TiONts.

Dans le but d'élaborer un nanovecteur capable de transporter la molécule d'intérêt, une préfonctionnalisation des TiONts par différents ligands, permettant de fournir de nouvelles fonctionnalités à la surface des TiONts, était l'objectif de la deuxième partie de ce manuscrit. Pour cet effet, trois types de ligands ont été étudiés : deux catéchols (DHCA et L-DOPA), l'acide citrique (AC) et deux organosilanes (APTES et CPTES). Le choix des ligands est basé

sur leur affinité avec la surface des TiONts, leur non cytotoxicité vu l'application visée ainsi que leurs groupements fonctionnels qui permettent d'interagir avec d'autres molécules.

L'effet du pH et du temps de réaction sur l'efficacité de greffage des catéchols a été étudié pour la première fois sur ce type de matériaux. Il a été prouvé que des conditions de pH faible (pH=2,0) et un temps de mise en contact avec les TiONts de 48 h pour le DHCA et de 24 h pour la L-DOPA sont nécessaires pour conserver la structure des molécules et avoir un taux de greffage optimal, d'environ 1,0 DHCA/nm² et 0,8 L-DOPA/nm² de TiONts. Ainsi, une bonne dispersion et stabilité colloïdale des nanohybrides est établie et illustrée par des mesures UV-visible en fonction du temps. Il a été montré que dans ces conditions de greffage, le DHCA présente plus d'affinité et de durabilité d'accrochage à la surface des TiONts, en comparaison avec la L-DOPA qui peut être désorbée de la surface des TiONts en fonction du temps.

Un suivi de la cinétique d'adsorption des deux catéchols a été réalisé et a conduit à constater que l'adsorption de ces deux catéchols se produit essentiellement en deux temps : au début (0-2 h) et au bout d'une vingtaine d'heures de réaction. Lors de ces deux étapes, une diminution significative de la concentration des catéchols en solution se produit indiquant deux sauts d'adsorption à la surface des TiONts. Par ailleurs, l'utilisation de l'UV-visible pour quantifier les catéchols adsorbés à la surface des TiONts et la comparaison de cette quantification avec la méthode thermogravimétrique est également une première dans cette étude. Les deux techniques donnent des résultats concordants.

Les résultats du greffage de l'acide citrique (AC) ont montré une efficacité de couplage qui dépend du pH de la réaction (le taux de greffage diminue lorsque le pH augmente) et un taux de greffage moins important par rapport aux catéchols (0,44 AC/nm²). Par contre, une meilleure stabilité colloïdale des nanohybrides TiONts-AC en suspension a été obtenue en comparaison avec les deux molécules précédentes.

La dernière approche a été consacrée aux deux organosilane APTES et CPTES. Le greffage de chacune de ces deux molécules a un effet différent sur le comportement et la chimie de surface des nanohybrides synthétisés. Cette différence provient de la chimie de ces deux molécules (l'APTES présente un groupement amine et le CPTES un groupement chlore). Un taux de greffage globalement plus important pour l'APTES (environ 3,1 APTES/nm²) par rapport au CPTES (environ 1,8 CPTES/nm²) a été obtenu. La preuve de greffage de ces molécules a été assurée par plusieurs techniques : spectroscopies IR, XPS, UV-Visible, ATG, mesures du potentiel zêta. Une meilleure stabilité colloïdale en fonction du temps a été observée pour le nanohybride TiONts-CPTES, un résultat qui a été attribué à des interactions possibles des nanohybrides TiONts-APTES avec le milieu d'étude (PBS).

Après l'étape de préfonctionnalisation, les TiONts ont été fonctionnalisés, pour la première fois, par la molécule d'intérêt qui est un phénol stilbénique, le 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-*trans*-stilbène (HAPtS), dérivé du *trans*-resvératrol qui présente des propriétés anti-oxydantes et anticancérogène. Après la caractérisation de cette molécule synthétique par différentes techniques spectroscopiques afin de vérifier sa conformité à la structure recherchée et afin d'obtenir des analyses témoins pour prouver les greffages

ultérieurs, le HAPtS a été greffé à la surface de deux types de nanohybrides : les TiONts préfonctionnalisés par un catéchol (TiONts-DHCA) et par un organosilane (TiONts-CPTES).

Dans un premier temps, un greffage peptidique a été réalisé entre la fonction acide carboxylique du nanohybride TiONts-DHCA et l'amine du HAPtS. Pour ce faire, deux méthodes de couplages ont été testées par deux agents de couplage différents : le couple EDC/NHS et le PyBOP. Les taux de greffage du HAPtS, pour les deux méthodes de couplage, sont calculés par une décomposition des courbes DTG pour tenter de contourner le problème de décrochage simultané de DHCA. Ainsi, la quantité de HAPtS a été estimée à 0,4 et 0,5 HAPtS/nm² respectivement pour les agents EDC/NHS et PyBOP.

Suite aux résultats des premiers essais, une deuxième méthode de greffage a été proposée mettant en œuvre le nanohybride TiONts-CPTES. Cette méthode, qui repose sur une substitution nucléophile (SN), a conduit à un résultat amélioré avec un taux de greffage d'environ 0,9 HAPtS/nm² (72,5 mg de HAPtS/g TiONts). Le greffage a également été confirmé par XPS et IR et la nature covalente de la liaison entre les TiONts-CPTES et le HAPtS a été prouvée.

L'élaboration d'un nanovecteur nécessite l'amélioration de sa biocompatibilité afin de le rendre capable d'échapper au système immunitaire et ne pas induire de toxicité. La méthode proposée dans ce manuscrit pour rendre les TiONts compatibles avec l'organisme est de modifier leur surface avec le chitosan (CT). Ce polymère naturel a été greffé pour la première fois sur les TiONts. Cette étude fait l'objet d'une publication acceptée (avec corrections) à Dalton Transactions. Deux approches de greffages du CT à la surface des TiONts ont été étudiées : la première approche est réalisée étape par étape et est basée sur un greffage par liaisons covalentes où deux molécules intermédiaires sont utilisées (APTES et glutaraldéhyde). La deuxième approche se fait en une seule étape et utilise des interactions électrostatiques qui peuvent se créer entre les TiONts chargés négativement et le chitosan chargé positivement. Le taux de greffage obtenu par la première méthode est plus faible (0,05 CT/nm²) que celui obtenu pour la seconde (0,15 CT/nm²).

Les différences entre les deux méthodes de greffage ont été étudiées par une analyse ATG couplée à la spectrométrie de masse (ATG-SM) qui a confirmé la différence entre les forces des liaisons établies dans chaque approche, à travers le suivi de la décomposition thermique de la matière organique présente à la surface des TiONts, en fonction du temps. Les résultats ont montré une décomposition retardée pour les nanohybrides modifiés par greffage étape par étape, prouvant ainsi la formation des liaisons covalentes dans ce cas, par rapport aux liaisons faibles, de nature électrostatique, établies dans le second cas.

Une étude de la stabilité colloïdale des deux nanohybrides (TiONts/CT), issus des deux approches de greffage, a été ensuite menée afin de comparer leurs comportements dans différents milieux. Les conditions des expériences dans ces milieux sont ajustées de façon à simuler les conditions biologiques. Il a été conclu, d'après les résultats obtenus, que la stabilité en suspension des nanohybrides dépend de la composition du milieu, en particulier de la

présence de protéines, aussi bien que de la chimie de surface des TiONts modifiés. Les nanohybrides issus du greffage covalent sont les plus affectés par ce type de changement.

Enfin, des tests de toxicité (*in vitro* et *in vivo*) ont été réalisés pour évaluer la biocompatibilité des nanohybrides TiONts/CT synthétisés. Pour ce faire, un test *in vitro* très sensible, le test de cinétique de production des ARN totaux, a été réalisé afin d'éviter de surcroît les erreurs de mesures produites par la présence des nanohybrides lors de tests colorimétriques. Ce test original a prouvé la non cytotoxicité des nanohybrides, même à fortes doses ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Par ailleurs, un test *in vivo* a également été effectué sur des embryons de poisson zèbre. Ce test a confirmé l'absence de tout effet indésirable des nanohybrides TiONts-CT, pour une large gamme de concentrations (de 1 à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), sur l'éclosion et la survie des embryons.

Perspectives

Malgré les résultats intéressants obtenus par la synthèse en mode dynamique, ce qui a été rapporté dans ce manuscrit à propos du rôle de l'agitation et de son intervention dans le mécanisme de formation des TiONts, ainsi que dans l'accélération de la dissolution du précurseur, demande plus d'investigations. Afin de mieux comprendre ce phénomène, il faudrait réaliser des synthèses à intervalles de temps plus courts (typiquement au bout de 15 min, 30 min, 1 h, 1h30 et 2 h) et suivre la cinétique de dissolution du précurseur TiO_2 par quantification : soit par affinement de Rietveld du précurseur ou par des mesures de la concentration des ions Ti^{4+} en solution, par analyse chimique ICP.

Afin de confirmer le rôle du lavage dans la formation des TiONts, il faudrait refaire des observations microscopiques, directement après le traitement hydrothermal, en gardant l'échantillon loin de tout contact possible avec l'eau au cours de la manipulation.

Evaluer la toxicité *in vitro* des nanotubes préfonctionnalisés par les catéchols, les citrates et le CPTES, par des tests de cytotoxicité comme il a été réalisé pour les nanohybrides TiONts-chitosan est une étape nécessaire.

Pour la suite de ce travail, il faut optimiser la synthèse de la molécule 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-*trans*-stilbène (HAPtS), afin de se rapprocher encore plus de la structure théorique recherchée, certaines impuretés étant présentes dans le premier lot dont nous disposons (présence probable de l'orthophthalate de potassium). Il est également nécessaire de chercher d'autres techniques de caractérisation qui permettent de quantifier la molécule HAPtS greffée à la surface des TiONts (méthode chimique ou spectroscopique de

dosage) afin d'être pleinement sûrs des quantités greffées, point important avant d'envisager les essais biologiques.

Suite aux résultats obtenus quant au greffage du HAPtS sur les nanohybrides TiONts-DHCA, il faudra étudier la durabilité du greffage du DHCA dans le DMSO, comme il a été réalisé dans le milieu aqueux, afin d'évaluer la possibilité de détachement de cette molécule dans ce milieu, hypothèse formulée dans ce manuscrit sans certitude.

Enfin, évaluer le pouvoir antioxydant des nanohybrides TiONts-CPTES-HAPtS et le comparer avec la molécule HAPtS seule par des tests biologiques spécifiques est une étape nécessaire et programmée prochainement, en collaboration avec le laboratoire Bio-Peroxi (Prof. Gérard Lizard).

Combiner le greffage du chitosan avec celui du HAPtS, à la surface des TiONts, en utilisant la diversité des points d'attachement qui existent dans ce polymère, est bien entendu l'étape suivante de ce projet. Il est intéressant de noter que le couple chitosan/resvératrol est très connu dans la littérature à travers l'encapsulation de ce dernier dans des vésicules de chitosan [212, 277, 278]. Cette considération est très importante car le chitosan doit être capable de protéger la molécule HAPtS et contribuer à la conduire vers les cellules cibles.

Le chitosan est considéré comme un très bon complexant des métaux lourds, en particulier du cuivre, par ses groupements amines [188]. Cette propriété est très intéressante car elle offre la possibilité aux nanohybrides synthétisés de complexer un radioisotope, qui servira alors comme agent de contraste pour l'imagerie, ici TEP (cas du ^{64}Cu), sans être obligé de passer par une étape de greffage supplémentaire d'un agent chélatant. Ainsi, la biodistribution des TiONts-CT et/ou des TiONts-HAPtS-CT pourra être évaluée une fois injectés *in vivo* (par voie intraveineuse ou intratumorale selon l'application visée), dans un modèle animal tel que des souris.

ANNEXES

Annexe 1. Tableau récapitulatif des techniques expérimentales avec les spécificités et les conditions de préparation des échantillons

Techniques	Appareils	Caractéristiques
Synthèse TiONts statique (Tunisie)	Réacteur confection locale	- V = 20 mL/1 L - statique - T_{max} = 230°C - P_{max} ≈ 23 bar
Synthèse TiONts dynamique (Tunisie)	Réacteur Prolabo	- V = 250mL - Agitation mécanique par balancement (≈2,33 Hz) - T_{max} = 230°C - P_{max} ≈ 23 bar
Synthèse TiONts (ICB)	Réacteur commercial Anton Parr, modèle : 4567	- V = 250 mL - Agitation par tige à palettes tournantes - T_{max} = 350°C - P_{max} = 200 bar
DRX	PANalytical X'pert-Pro	- Cu (Kα) = λ 1,5406 Å - 3-70° (pas = 0,017°) - comptage (13,06 s/pas)
BET	Micromeritics Tristar II	- MOLECULE SONDE : N₂ - DESORPTION : 100°C PENDANT 24 H - P = 0,05 MBAR (POUDRE) - MASSE ECHANTILLON : 50 – 70 MG
IR-TF	BRUKER EQUINOX 55	- 1 MG DE POUDRE SONT MELANGES AVEC 199 MG DE KBR - RÉOLUTION : 2 CM⁻¹ - GAMME : 4000 À 400 CM⁻¹
Zétamétrie	MALVERN ZETASIZER ZSP	- INDICE DE REFRACTION (TiO₂) : 2,61 - 4 MG D'ECHANTILLON DISPERSE DANS 10 mL - GAMME DE PH : 2 - 11 - MILIEU SALIN : (NaCl 10⁻²M) - TITRATION : 0,1M DE HCL, 0,1M OU 0,01M DE NaOH - LOGICIEL : ZETASIZER SOFTWARE (7.11) - AGITATION MAGNETIQUE PENDANT MESURE ET TRAITEMENT AU BAIN UTRASON 10 MIN AVANT MESURE
ATG	TGA Discovery – TA instrument	- Débit : air reconstitué à 25 mL.min⁻¹ - Rampe : 5°C.min⁻¹ - Gamme de température : 50 à 800°C - Masse échantillon : 1 mg
XPS	PHI 5000 Versaprobe	- EKα (Al) = 1486,6 eV - Diamètre du spot : 200 μm - Logiciel : Casa XPS et Multipak - Calibration sur le pic Ti2p (458,8 eV) - Dépôt de poudre sur une feuille d'indium

UV-visible (solution)	Shimadzu UV - 2550	- Cuvette en quartz (mesure absorbance) - Gamme : 200 – 800 nm (pas = 1 nm) - Logiciel : UV-Probe 2.34 - échantillon suspension ou solution
UV-visible (solide)	Shimadzu UV - 2550	- Sphère d'intégration (mesure réflectance) - Gamme : 200 – 600 nm (pas = 1 nm) - Logiciel : UV-Probe 2.34 - échantillon : solide
MET	JEOL JEM – 2100F	- Résolution : 0,19 nm - 200 kV - Concentration échantillon : 0,8 mg/mL⁻¹ (eau/alcool) - traitement ultrason 10 min avant dépôt - Dépôt de 100 µL sur la grille MET
Raman	InVia Renichaw	- Laser : 532 nm (poudre) - Enregistrement : 1s x 100
RMN ¹ H	Bruker Avance III Nanobay	- 300 MHz - 22°C - Solvant CDCl₃ - Scans : 16

Annexe 2. Les méthodes de lavages et de séchage

- (a) **Lavage par décantation** : Ce lavage a été utilisé dans la partie synthèse hydrothermale (chapitre II). Le lavage dans ce cas repose sur l'instabilité des nanotubes en suspension qui décantent rapidement après chaque lavage.
- (b) **Lavage par dialyse** : Ce type a été utilisé après la synthèse hydrothermale des TiONts nus synthétisés à l'ICB (chapitre II). Il est basé sur le phénomène d'osmose dont les molécules (ou ions) migrent du milieu le plus concentré vers le milieu le moins concentré à travers une membrane semi-perméable. Les TiONts sont introduits à l'intérieur d'une membrane de cellulose régénérée (12 kDa) ce qui permet un échange ionique (Na⁺, OH⁻) entre la solution au tour de la membrane et la suspension des TiONts à l'intérieur. L'inconvénient majeur de cette méthode est sa lenteur (plusieurs jours).
- (c) **Lavage par ultrafiltration** : Ce mode de lavage présente l'avantage de garder la poudre en suspension tout le long du lavage et évite ainsi son agglomération. Il est le mode de purification le plus utilisé pour la purification des nanohybrides (chapitre III et IV). Le principe consiste à soumettre la suspension sous un flux d'azote qui exerce une pression et fait passer le liquide de la solution à travers une membrane semi-perméable (membrane de différentes tailles de pores, à adapter selon la taille des nanomatériaux utilisés). Les nanoparticules ou les molécules de poids moléculaire supérieurs à la taille des pores de la membrane de filtration sont piégés et celles ayant une taille plus faible passent dans le filtrat. Le filtrat est ainsi récupéré dans un récipient d'une façon continue tout au long du lavage. Une fois le niveau de l'eau baisse, on peut commencer un nouveau cycle de lavage.
- (d) **Lavage par centrifugation** : Il permet une séparation solide-liquide à chaque lavage. L'inconvénient de ce lavage est la possibilité de la perte de la matière.

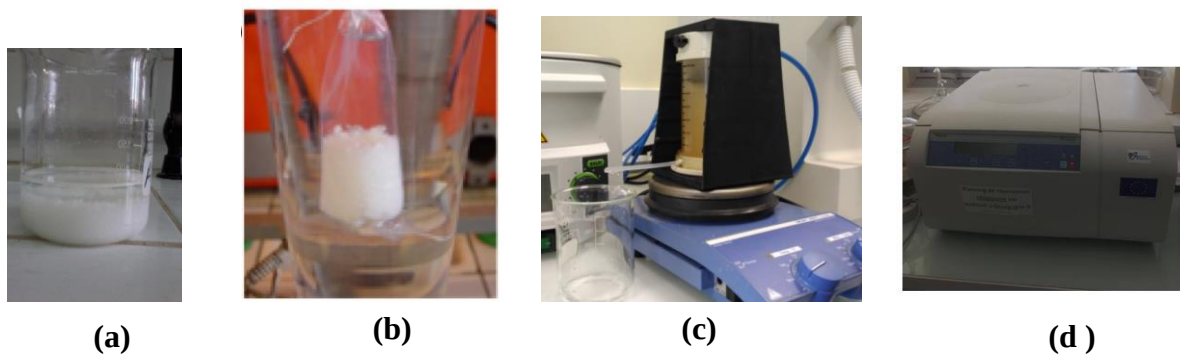
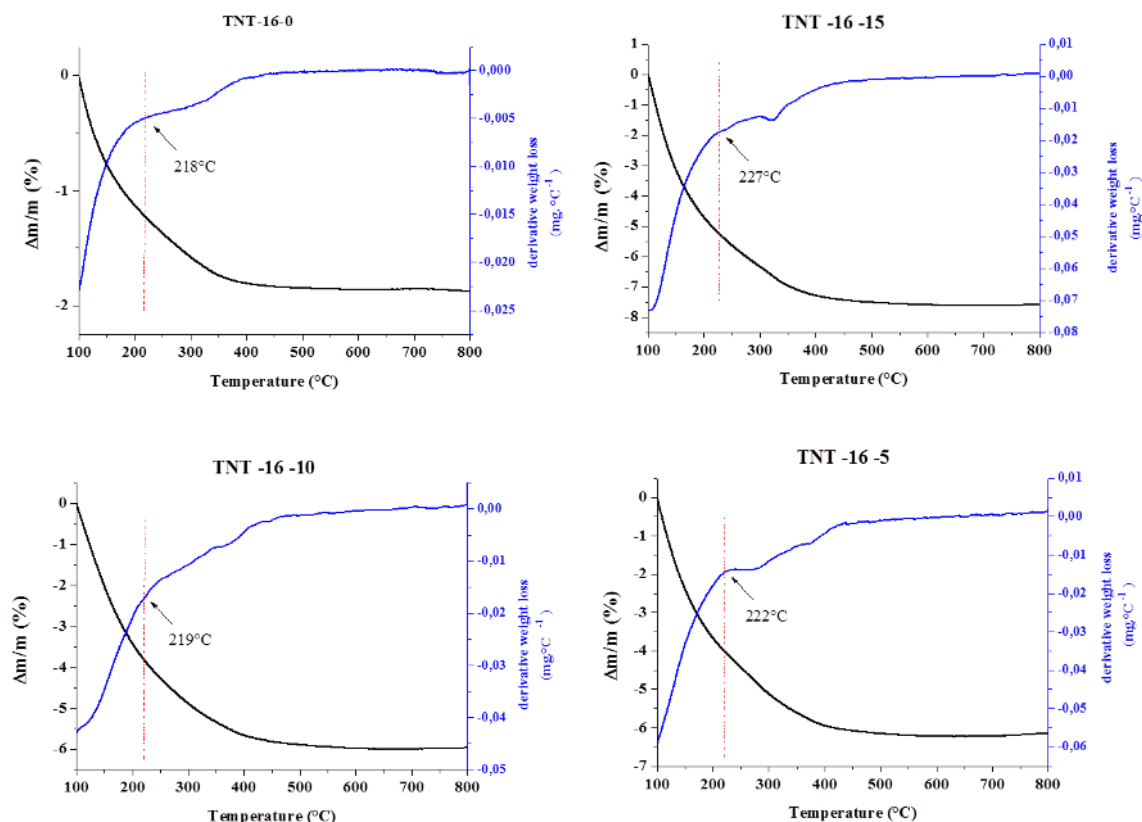


Figure A2 : Les différentes méthodes de purifications utilisées durant la thèse

Annexe 3 : Courbes ATG/DTG des TiONts synthétisés à des différents temps d'agitation par heure.

Les courbes ATG/DTG des TiONts synthétisés en mode dynamique à 150°C, 16 h, [NaOH]=10 M et à différents temps d'agitation par heure (0, 5, 10, 15, 20 min/h). Ces courbes donnent les températures de début de la deuxième perte de masse pour chaque échantillon et montrent un décalage de cette température dans l'échantillon TNT-16-20 par rapport aux autres.



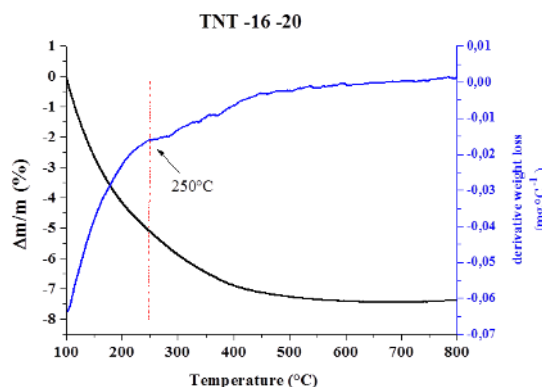
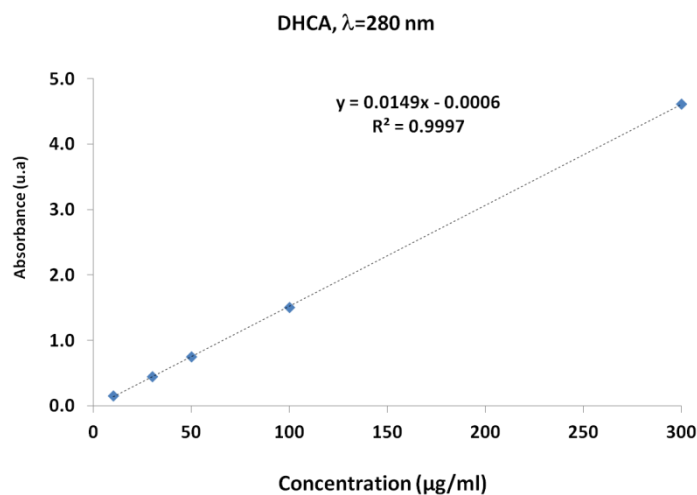


Figure A3 : Courbes ATG/DTG des échantillons des TiONts synthétisés à différents temps d'agitation par heure (0, 5, 10, 15 et 20 min/h).

Annexe 4 : Courbes d'étalonnage du DHCA et de la L-DOPA

La détermination des concentrations des catéchols (DHCA et L-DOPA) en solution, soit pour le suivi de la cinétique d'adsorption ou bien pour la quantification (chapitre III) a été réalisée grâce à des courbes d'étalonnage des deux molécules. Ces courbes sont réalisées dans les conditions des réactions de greffage c'est-à-dire à pH=2. Les mesures sont effectuées à $\lambda_{\text{max}}=280$ nm. Les concentrations sont préparées dans le domaine de linéarité de la méthode dont la limite est 300 $\mu\text{g/mL}$ pour les deux molécules.



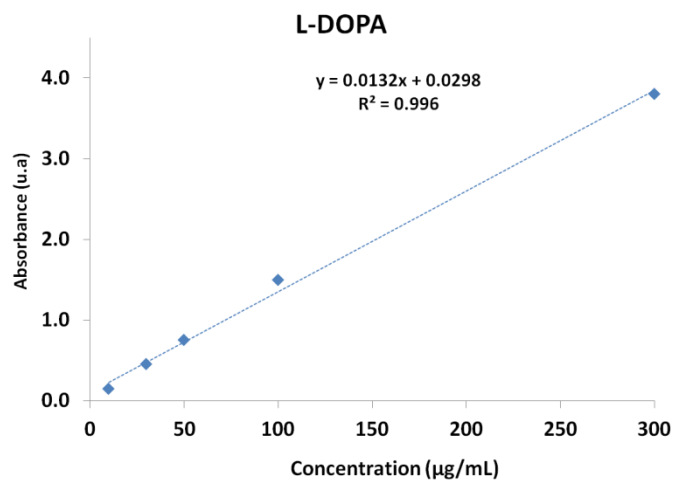


Figure A4 : Courbes d'étalonnage du DHCA et de la L-DOPA à $\lambda_{\max}=280$ nm (trois répétitions et six concentrations).

La limite de détection de chaque courbe est 0,4 µg/mL et 1,1 µg/mL pour DHCA et L-DOPA respectivement. La limite de quantification est 1,4 µg/mL et 3,7 µg/mL pour DHCA et la L-DOPA respectivement.

Annexe 5 : Spectre RMN ^1H de la molécules 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-trans-stilbène (HAPtS)

Les déplacements chimiques des protons de la molécule HAPtS dans le spectre RMN ^1H (**Figur**) sont attribués :

- 2,5-3,33 ppm, DMSO
- 1,3-1,44 ppm, quintuplet, 2H, C_3 ;
- 2,74 - 2,79 ppm, triplet, 2H, C_2 ;
- 3,35-3,44 ppm, triplet, 2H, C_4 ;
- 6,06-6,23, 2 doublet, 2H, $\text{C}_{9,10}$;
- 6,52-6,79 ppm, multiplet, 8H, $\text{C}_{5,6,7,8, \text{C}_{11,12,13,14}}$;
- 6,93-7,04 ppm, triplet, 2H, N ;
- 8,05-8,62 ppm, singulet, 1H, C_{15}

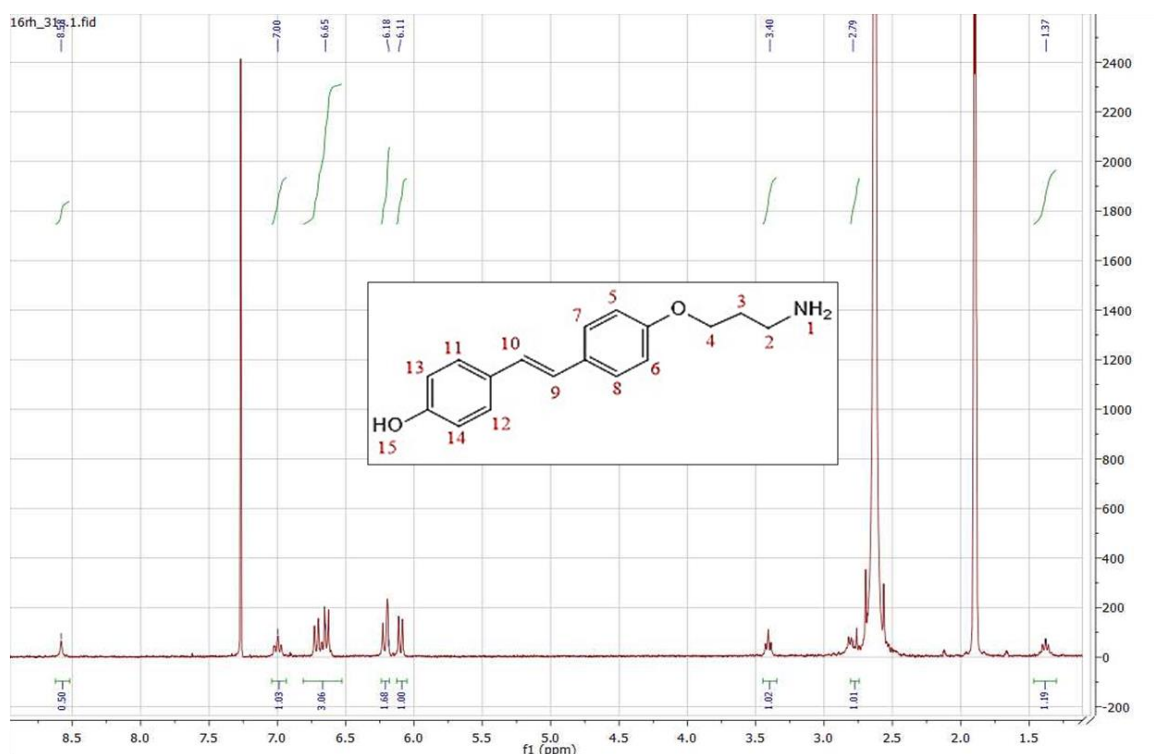


Figure A5: Spectre RMN ¹H de la molécule 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-*trans*-stilbène (HAPtS), RMN ¹H (300MHz, CDCl₃).

Annexe 6. Optimisation du rapport molaire TiONts/CT et du pH d'adsorption du chitosan (CT) sur les TiONts

Afin d'optimiser le pH de la réaction et la quantité du chitosan (CT) qui assure le plus d'interaction avec les TiONts, deux expériences ont été réalisées. Durant la première expérience (1), le rapport molaire TiONts(-OH)/CT(NH₂) a été fixé à 1 : 2 et le pH de la réaction a été varié (pH=3, 5 et 7). Pour la deuxième expérience, le rapport molaire a été varié : (1 : 0,5) ; (1 : 1) et (1 : 2), pour un pH fixe à 7. Le temps de la réaction dans ces deux cas est 24 h. Le pH a été choisi dans l'intervalle de pH où le chitosan est chargé positivement et les TiONts sont relativement chargés négativement.

Tableau A6 : Expériences d'optimisation du pH et du rapport molaire TiONts/CT à un temps 24 h.

Expérience (1)		Expérience (2)	
pH	Rapport molaire TiONts/CT	pH	Rapport molaire TiONts/CT
3	1 : 2	7	1 : 2
5	1 : 2	7	1 : 1
7	1 : 2	7	1 : 0.5

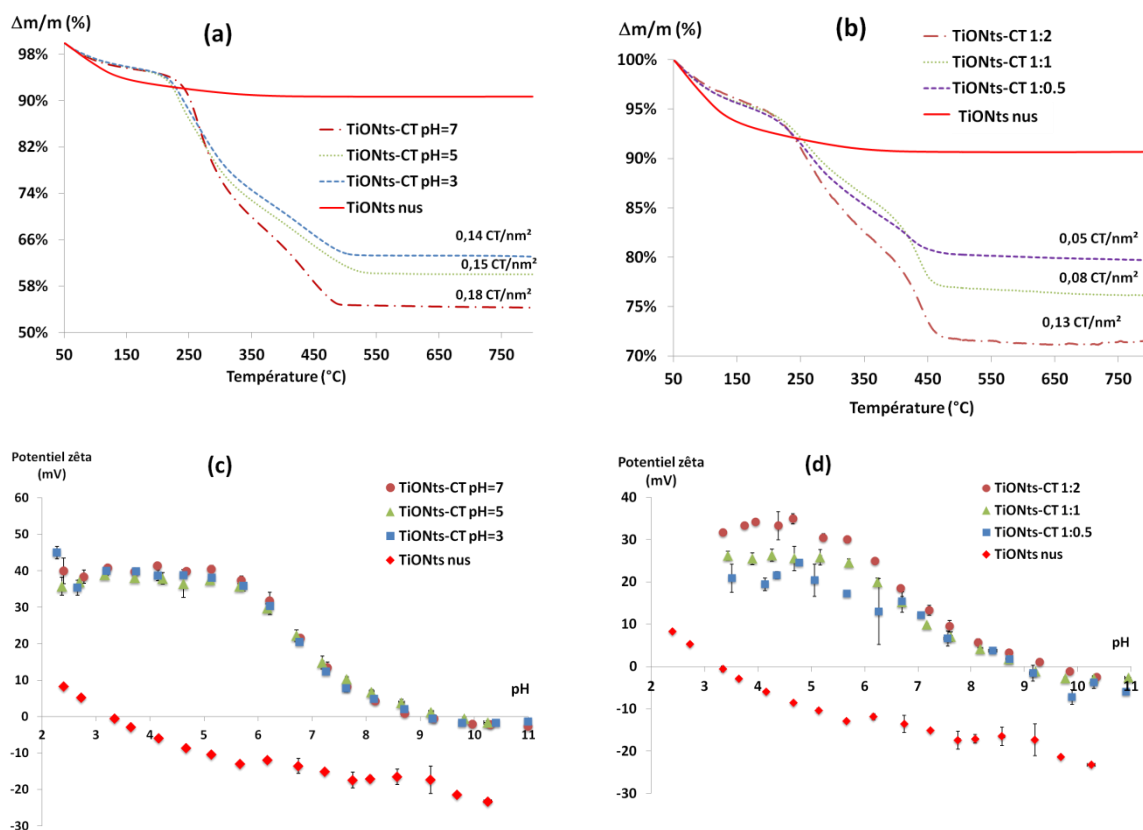


Figure A6 : Courbes ATG et mesures du potentiel zêta de TiONts nus en comparaison avec les nanohybrides TiONts-CT synthétisés durant (a,c) l'expérience (1) (b,d) l'expérience (2).

L'évolution des courbes ATG montre une augmentation dans le taux de greffage du CT avec le pH (avec un meilleur résultat à pH 7) ainsi qu'avec l'augmentation de la quantité du CT dans le milieu (**Figure a,b**). Cependant, le changement du pH n'a pas d'effet sur l'évolution du potentiel zêta. Ce dernier augmente avec le rapport molaire pour atteindre son maximum dans le cas du nanohybride TiONts-CT (1 : 2) (**Figure c,d**). Ces résultats montrent que l'interaction entre les TiONts et le CT dépend, ici, de l'état de charge des TiONts dont le maximum d'adsorption se fait à un pH où les TiONts sont chargés négativement (pH=7). Egalement, la présence d'une quantité importante de CT dans le système augmente la probabilité de contact TiONts/CT et par conséquent l'adsorption. Ainsi, on peut déduire d'après ces constatations que les conditions optimales de greffage sont : un pH=7 et un rapport TiONts/CT (1 : 2).

Annexe 7. Courbes ATG/DTG du CT seul et des nanohybrides TiONts-CT et TiONts-APTES-Glu-CT

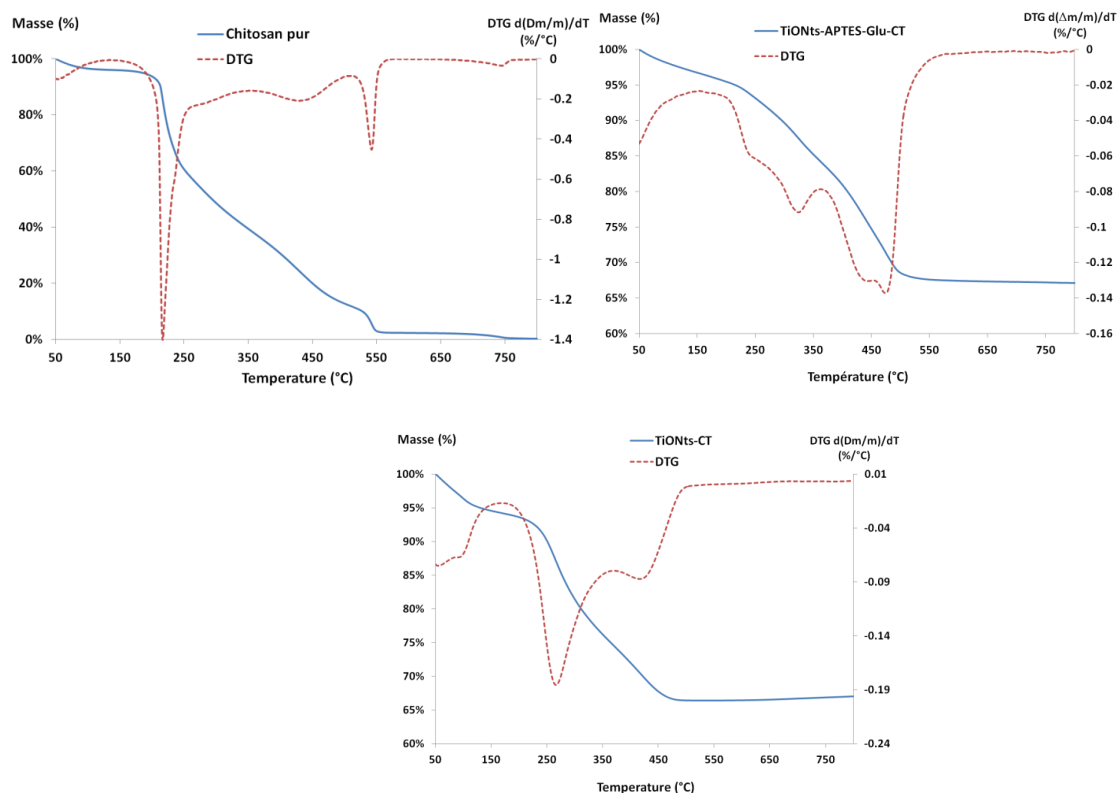


Figure A7: Courbes ATG/DTG du chitosan pur, du TiONts-APTES-Glu-CT et TiONts-CT sous flux d'air, rampe 5°C/min.

Annexe 8 : Test de cytotoxicité par mesure de la cinétique de production des ARN totaux

Ce test a été réalisé sur des cellules HepG2 qui sont développées dans une culture monocouche dans le MEM avec 1% de glutamine stable, 1% d'acides aminés non essentiels (PAA) et 10% (v/v) de SVF, dans une atmosphère humidifiée à 37°C et contenant 5% de CO₂. Une culture continue de ces cellules est maintenue par des flacons de sous-culture tous les 7 jours de l'ordre de 2.10⁶ cellules/75 cm². Après leur lavage avec une solution saline tampon phosphate stérile (PBS), les cellules sont détachées par trypsination (0,05% de trypsine/EDTA, Gibco). 24 h avant l'exposition, les cellules HepG2 sontensemencées dans des plaques à 96 puits (Figure 119) (Dutscher, France) dans 200 µL de milieu de culture complet à une concentration finale en cellules de l'ordre de 5.10⁴ cellules/puits.

Le protocole expérimental est le suivant :

La veille des mesures : Incubation des cellules pendant 24 h à 37°C 5% CO₂ :

- Témoin positif T⁺ : dichromate de potassium K₂Cr₂O₇ (cytotoxique), concentration finale au contact des cellules : 2,5mg/L
- Témoin négatif T⁻ : cellules dans leur milieu de culture MEM sans nanohybrides

- Cellules + nanohybrides à différentes concentrations (6,5 ; 12,5 ; 25 ; 50 et 100 µg/mL)

Le jour des mesures :

- Les microplaques sont placées sur un agitateur de plaque chauffante à 37°C
- Une solution d'uridine tritiée (diluer la solution mère au 1000^e dans du MEM seul) est préparée
- La microplaque est vidée puis 30µL d'uridine tritiée sont déposés dans chaque puits (0,3µCi/puits) et laisser agiter à 37°C
- Procéder ensuite à la cinétique d'incorporation d'uridine (5, 10, 15, 20, 25 et 30 min) en arrêtant l'incorporation par l'ajout de 30µL/puits de SDS 3%
- A la fin de la cinétique, la plaque est laissée sous agitation pendant 5 min avant de récupérer les cellules afin de les placer en sandwich dans le TCA (acide trichloroacétique) à 20% (2x100µL) sur une autre microplaque à filtre
- Après 10 min de traitement dans le TCA à 20%, le résidu est filtré par aspiration
- Une étape de lavage avec de l'éthanol absolu (3x200µL) est réalisée
- La plaque est récupérée puis la laisser séchée à 56°C toute la nuit
- Une feuille plastifiée noire autocollante (Perkin Elmer) est collée sous la plaque pour éviter que l'écoulement du liquide à scintillation. En suite 30µL de liquide à scintillation, Microscint, sont incorporés/puits puis une feuille plastifiée transparente autocollante (Perkin Elmer) est placée au-dessus de la plaque pour ne pas contaminer le lecteur de plaque. Enfin, lire la plaque grâce au compteur de microplaque (résultats obtenus en cpm).

VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE

Publications

Dispersion of titanate nanotubes for nanomedicine: comparison of PEI and PEG nanohybrids , *A.-L. Papa, J. Boudon, V. Bellat, A. Loiseau, H. Bisht, F. Sallem, R. Chassagnon, V. Bérard and N. Millot*. Dalton Trans., **44**, 739-746 (2015).

Effect of mechanical stirring and temperature on dynamic hydrothermal synthesis of titanate nanotubes. *F. Sallem, R. Chassagnon, A. Megriche, M. El Maaoui and N. Millot*, Journal of Alloys and Compounds **722** (2017) 785-796.

Efficient quantification by X-ray photoelectron spectroscopy and thermogravimetric analyses of the one-pot grafting of two molecules on the surface of iron oxide nanoparticles, *L.*

Maurizi, *F. Sallem, J. Boudon, O. Heintz, H. Bisht, F. Bouyer and N. Millot*, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, sous presse (2018).

Synthesis and characterization of chitosan-coated titanate nanotubes: towards a new safe nanocarrier. *F. Sallem, J. Boudon, O. Heintz, I. Séverin, A. Megriche and N. Millot*. Dalton Trans. **46** (2017), 15386 – 15398.

Communications orales (présentées par la personne dont le nom est souligné)

Elaboration of nanohybrid based on titanate nanotubes for biomedical applications: new nanovectors of resveratrol derivative, *F. Sallem, R. Haji, A. Luce, J. Boudon, D. Fasseur-Vervandier, A. Megriche, M. El Maaoui and N. Millot*., The international nanotech and nanoscience conference and exhibition-**Nanotech Paris 2017, 28-30 Juin 2017**, Paris, France.

Synthesis, characterizations and functionalization of titanate nanotubes for biomedical applications, *F. Sallem, R. Haji, J. Boudon, A. Luce, D. Fasseur-Vervandier, A. Megriche, M. El Maaoui and N. Millot*, **JED 2017, 25-26 mai 2017**, Dijon, France.

Elaboration of nanohybrid materials based on titanate nanotubes for biomedical applications, *F. Sallem, J. Boudon, R. Haji, D. Fasseur-Vervandier, A. Megriche, M. El Maaoui and N. Millot*, 8th international Congress Nanotechnology in Medicine and Biology congress-**BioNanoMed, 20-22 mars 2017**, Krems, Autriche.

Communications par affiches (présentées par la personne dont le nom est souligné)

The effect of SPIONs and unmodified and modified titanate nanotubes on zebrafish embryonic development and toxicology, *F. Sallem, Y. Saibi, N. Yousfi, T. Lopez, N. Millot and J. Chluba*, 10th European ZebraFish Meeting, 3 -7 Juillet 2017, Budapest (Hongrie).

Functionalization of titanate nanotube for biomedical applications, *F. Sallem, A. Loiseau, A. Megriche, M. El Maaoui and N. Millot*, **EMRS SPRING MEETING 2016, 02-06 mai 2016**, Lille, France.

Functionalization of titanate nanotube for biomedical applications, *F. Sallem, A. Loiseau, A. Megriche, M. El Maaoui and N. Millot*, **JED 2016, 19-20 mai 2016**, Dijon, France.

Short time synthesis of titanate nanotubes by hydrothermal treatment, *F. Sallem, A. Loiseau, A. Megriche, M. El Maaoui and N. Millot*, 7^{èmes} **journées de chimie de l'état solide**, la société chimique de Tunisie, **21-23 décembre 2015**, Zerkis, Tunisie.

Encadrement

Deux groupes d'élèves ingénieurs TPE (Travaux Personnels Encadrés) et deux stages d'été (3^{ème} année école d'ingénieur et 2^{ème} année de Licence

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. D. Vollath, *Nanomaterials: An Introduction to Synthesis, Properties and Applications*. 2013: Wiley.
2. Y. Gogotsi, *Nanomaterials Handbook*. 2006: CRC Press.
3. M. Arruebo, *et al.*, *Magnetic nanoparticles for drug delivery*. Nano today, 2007. **2**(3): p. 22-32.
4. M.R. Mozafari, *Nanomaterials and Nanosystems for Biomedical Applications*. 2007: Springer Netherlands.
5. A. Tan, *et al.*, *Review of titania nanotubes: fabrication and cellular response*. Ceramics International, 2012. **38**(6): p. 4421-4435.
6. X. Liu, P.K. Chu, and C. Ding, *Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications*. Materials Science and Engineering: R: Reports, 2004. **47**(3): p. 49-121.
7. M. Kulkarni, *et al.*, *Titanium nanostructures for biomedical applications*. Nanotechnology, 2015. **26**(6): p. 062002.
8. T. Kasuga, *et al.*, *Formation of titanium oxide nanotube*. Langmuir, 1998. **14**(12): p. 3160-3163.
9. W. Liu, *et al.*, *Adsorption of Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} and Cr^{3+} onto titanate nanotubes: Competition and effect of inorganic ions*. Science of the Total Environment, 2013. **456**: p. 171-180.
10. P. Sheng, *et al.*, *Synthesis and photocatalytic application of ternary Cu–Zn–S nanoparticle-sensitized TiO_2 nanotube arrays*. Chemical engineering journal, 2012. **210**: p. 425-431.
11. Y. Jun, *et al.*, *Functionalized titania nanotube composite membranes for high temperature proton exchange membrane fuel cells*. International Journal of Hydrogen Energy, 2011. **36**(10): p. 6073-6081.
12. H.-K. Seo, *et al.*, *A study on the structure/phase transformation of titanate nanotubes synthesized at various hydrothermal temperatures*. Solar Energy Materials and Solar Cells, 2008. **92**(11): p. 1533-1539.
13. A.A. Al-Hajjaj, *et al.*, *Sorption of hydrogen onto titanate nanotubes decorated with a nanostructured $Cd_3[Fe(CN)_6]_2$ Prussian Blue analogue*. International Journal of Hydrogen Energy, 2012. **37**(1): p. 318-326.
14. J.L. T. T. Tran, T. H. Feng, J. Cai, L. Yuan, N. Wang and Q. Cai, *Molecularly imprinted polymer modified TiO_2 nanotube arrays for photoelectrochemical determination of Perfluorooctane sulfonate (PFOS)*. sensors and actuators B: chemical, 2014. **190**: p. 745-751.
15. L.S. Sundar and M.K. Singh, *Convective heat transfer and friction factor correlations of nanofluid in a tube and with inserts: A review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2013. **20**: p. 23-35.
16. A.-L. Papa, *et al.*, *Titanate nanotubes: towards a novel and safer nanovector for cardiomyocytes*. Nanotoxicology, 2012. **7**(6): p. 1131-1142.
17. A. Loiseau, *et al.*, *Taxane-Grafted Metal-Oxide Nanoparticles as a New Theranostic Tool against Cancer: The Promising Example of Docetaxel-Functionalized Titanate Nanotubes on Prostate Tumors*. Adv Healthc Mater, 2017.

18. A.-L. Papa, *et al.*, *Dispersion of titanate nanotubes for nanomedicine: comparison of PEI and PEG nanohybrids*. Dalton Transactions, 2015. **44**(2): p. 739-746.
19. A.-L. Papa, *et al.*, *Synthesis of titanate nanotubes directly coated with USPIO in hydrothermal conditions: a new detectable nanocarrier*. The Journal of Physical Chemistry C, 2011. **115**(39): p. 19012-19017.
20. J. Paris, *et al.*, *Phthalocyanine–titanate nanotubes: a promising nanocarrier detectable by optical imaging in the so-called imaging window*. RSC Advances, 2015. **5**(9): p. 6315-6322.
21. V. Bellat, *et al.*, *A multi-step mechanism and integrity of titanate nanoribbons*. Dalton Transactions, 2015. **44**(3): p. 1150-1160.
22. N. Millot, D. Vandroux, and V. Bellat, *Titanate nanostructure for regenerating and engineering tissue*, 2014, Google Patents.
23. L. Maurizi, *et al.*, *Influence of surface charge and polymer coating on internalization and biodistribution of polyethylene glycol-modified iron oxide nanoparticles*. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2015. **11**(1): p. 126-136.
24. G. Thomas, *et al.*, *One-step continuous synthesis of functionalized magnetite nanoflowers*. Nanotechnology, 2016. **27**(13): p. 135604.
25. G. Thomas, *et al.*, *Functionalized Fe₃O₄ nanoparticles: influence of ligand addition sequence and pH during their continuous hydrothermal synthesis*. RSC Advances, 2015. **5**(96): p. 78614-78624.
26. J. Boudon, *et al.*, *Magneto-optical nanomaterials: a SPIO–phthalocyanine scaffold built step-by-step towards bimodal imaging*. Chemical Communications, 2013. **49**(67): p. 7394-7396.
27. A. Assifaoui, *et al.*, *Silica-coated calcium pectinate beads for colonic drug delivery*. Acta biomaterialia, 2013. **9**(4): p. 6218-6225.
28. C.S.S.R. Kumar, *Nanomaterials for Cancer Therapy*. 2006: Wiley.
29. I. Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur, *Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis*. Advanced drug delivery reviews, 2002. **54**(5): p. 631-651.
30. L.-M. Hung, *et al.*, *Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes*. Cardiovascular research, 2000. **47**(3): p. 549-555.
31. J.A. Baur and D.A. Sinclair, *Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence*. Nature reviews Drug discovery, 2006. **5**(6): p. 493-506.
32. J. Xiao, *et al.*, *Protective effects of resveratrol on TNF α -induced endothelial cytotoxicity in baboon femoral arterial endothelial cells*. Journal of diabetes research, 2013. **2013**.
33. B.B. Aggarwal, *et al.*, *Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies*. Anticancer research, 2004. **24**(5A): p. 2783-2840.
34. L. Pirola and S. Fröjdö, *Resveratrol: One molecule, many targets*. IUBMB Life, 2008. **60**(5): p. 323-332.
35. M. Chalal, *et al.*, *Inhibition of cancer derived cell lines proliferation by synthesized hydroxylated stilbenes and new ferrocenyl-stilbene analogs. Comparison with resveratrol*. Molecules, 2014. **19**(6): p. 7850-7868.

-
36. M. Chalal, *et al.*, *Antimicrobial activity of resveratrol analogues*. *Molecules*, 2014. **19**(6): p. 7679-7688.
 37. Z. Lu, *et al.*, *Complexation of resveratrol with cyclodextrins: solubility and antioxidant activity*. *Food chemistry*, 2009. **113**(1): p. 17-20.
 38. R.L. Frozza, *et al.*, *Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats*. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2010. **6**(6): p. 694-703.
 39. V.K. Varadan, L. Chen, and J. Xie, *Nanomedicine: design and applications of magnetic nanomaterials, nanosensors and nanosystems*. 2008: John Wiley & Sons.
 40. D.V. Bavykin and F.C. Walsh, *Titanate and titania nanotubes: synthesis, properties and applications*. 2010: Royal Society of Chemistry.
 41. U.D.o. Health and H. Services, *Current Intelligence Bulletin 63: Occupational Exposure to Titanium Dioxide*, 2011, Cincinnati, OH: Centers for Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health.
 42. *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 2009–2010, 90th ed.* *Journal of the American Chemical Society*, 2009. **131**(35): p. 12862-12862.
 43. N.T. Dioxide, *State of the Science Literature Review: Nano Titanium Dioxide Environmental Matters*.
 44. J. Muscat, V. Swamy, and N.M. Harrison, *First-principles calculations of the phase stability of TiO₂*. *Physical Review B*, 2002. **65**(22): p. 224112.
 45. D.A. Hanaor and C.C. Sorrell, *Review of the anatase to rutile phase transformation*. *Journal of Materials science*, 2011. **46**(4): p. 855-874.
 46. A. Beltran, L. Gracia, and J. Andres, *Density functional theory study of the brookite surfaces and phase transitions between natural titania polymorphs*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006. **110**(46): p. 23417-23423.
 47. C. Pighini, *Synthèses de nanocristaux de TiO₂ anatase à distribution de taille contrôlée. Influence de la taille des cristallites sur le spectre Raman et étude des propriétés de surface*, 2006, Université de Bourgogne.
 48. A. Navrotsky, *Energetic clues to pathways to biomineralization: Precursors, clusters, and nanoparticles*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(33): p. 12096-12101.
 49. H.C. Zeng, *Preparation and integration of nanostructured titanium dioxide*. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 2011. **1**(1): p. 11-17.
 50. B.L.R. D.Jargot, S. Malard, S. Robert, P. Serre, A. Simmonnard, M. Reynier et O.Witschger, *Dioxyde de titane-Fiche toxicologique (FT 291)- INRS*, in *INRS2013*.
 51. S. Ananth, *et al.*, *Direct synthesis of natural dye mixed titanium dioxide nano particles by sol-gel method for dye sensitized solar cell applications*. *Optik-International Journal for Light and Electron Optics*, 2014. **125**(1): p. 495-498.
 52. M.A. Arenas, *et al.*, *Doped TiO₂ anodic layers of enhanced antibacterial properties*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013. **105**: p. 106-112.
 53. N. MILLOT, *Rôle des interfaces sur les propriétés des nanomatériaux*. *Habilitation à diriger des recherches/Université de Bourgogne*, 2005.

-
54. P. Hoyer, *Formation of a titanium dioxide nanotube array*. Langmuir, 1996. **12**(6): p. 1411-1413.
 55. M. Lai and D.J. Riley, *Templated electrosynthesis of nanomaterials and porous structures*. Journal of colloid and interface science, 2008. **323**(2): p. 203-212.
 56. G. Cao and D. Liu, *Template-based synthesis of nanorod, nanowire, and nanotube arrays*. Advances in colloid and interface science, 2008. **136**(1): p. 45-64.
 57. S. Liu, *et al.*, *Synthesis of single-crystalline TiO₂ nanotubes*. Chemistry of materials, 2002. **14**(3): p. 1391-1397.
 58. F. Keller, M. Hunter, and D. Robinson, *Structural features of oxide coatings on aluminum*. Journal of the Electrochemical Society, 1953. **100**(9): p. 411-419.
 59. H. Masuda and K. Fukuda, *Ordered metal nanohole arrays made by a two-step replication of honeycomb structures of anodic alumina*. science, 1995. **268**(5216): p. 1466.
 60. M. Assefpour-Dezfuly, C. Vlachos, and E. Andrews, *Oxide morphology and adhesive bonding on titanium surfaces*. Journal of materials science, 1984. **19**(11): p. 3626-3639.
 61. V. Zwillling, *et al.*, *Structure and physicochemistry of anodic oxide films on titanium and TA6V alloy*. Surface and Interface Analysis, 1999. **27**(7): p. 629-637.
 62. D. Gong, *et al.*, *Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation*. Journal of Materials Research, 2001. **16**(12): p. 3331-3334.
 63. D. Regonini, *et al.*, *A review of growth mechanism, structure and crystallinity of anodized TiO₂ nanotubes*. Materials Science and Engineering: R: Reports, 2013. **74**(12): p. 377-406.
 64. Z. Lockman, *et al.*, *Influence of anodisation voltage on the dimension of titania nanotubes*. Journal of Alloys and Compounds, 2010. **503**(2): p. 359-364.
 65. J.M. Macák, H. Tsuchiya, and P. Schmuki, *High-aspect-ratio TiO₂ nanotubes by anodization of titanium*. Angewandte Chemie International Edition, 2005. **44**(14): p. 2100-2102.
 66. B. Baruwati, D.K. Kumar, and S.V. Manorama, *Hydrothermal synthesis of highly crystalline ZnO nanoparticles: A competitive sensor for LPG and EtOH*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2006. **119**(2): p. 676-682.
 67. I. Krad, *Synthèse par voie hydrothermale et détermination des propriétés diélectriques du système (1-x)KNbO_{3-x}K_{0.5}Bi_{0.5}TiO₃*, in *Faculté des sciences de Tunis 2015*, Université de Tunis El Manar.
 68. R. Ma, *et al.*, *Structural features of titanate nanotubes/nanobelts revealed by Raman, X-ray absorption fine structure and electron diffraction characterizations*. The Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(13): p. 6210-6214.
 69. D.V. Bavykin, *et al.*, *Application of magic-angle spinning NMR to examine the nature of protons in titanate nanotubes*. Chemistry of Materials, 2010. **22**(8): p. 2458-2465.
 70. H.-H. Ou and S.-L. Lo, *Review of titania nanotubes synthesized via the hydrothermal treatment: Fabrication, modification, and application*. Separation and Purification Technology, 2007. **58**(1): p. 179-191.

-
71. C.L. Wong, Y.N. Tan, and A.R. Mohamed, *A review on the formation of titania nanotube photocatalysts by hydrothermal treatment*. Journal of Environmental Management, 2011. **92**(7): p. 1669-1680.
 72. N. Liu, et al., *A review on TiO₂-based nanotubes synthesized via hydrothermal method: formation mechanism, structure modification, and photocatalytic applications*. Catalysis Today, 2014. **225**: p. 34-51.
 73. M. Hernández-Alonso, et al., *Revisiting the hydrothermal synthesis of titanate nanotubes: new insights on the key factors affecting the morphology*. Nanoscale, 2011. **3**(5): p. 2233-2240.
 74. A.-L. Papa, et al., *Effect of reaction parameters on composition and morphology of titanate nanomaterials*. The Journal of Physical Chemistry C, 2009. **113**(29): p. 12682-12689.
 75. D. Wang, et al., *Synthesis and characterization of anatase TiO₂ nanotubes with uniform diameter from titanium powder*. Materials Letters, 2008. **62**(12): p. 1819-1822.
 76. Z.-Y. Yuan and B.-L. Su, *Titanium oxide nanotubes, nanofibers and nanowires*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2004. **241**(1): p. 173-183.
 77. T. Gao, H. Fjellvåg, and P. Norby, *Crystal structures of titanate nanotubes: a Raman scattering study*. Inorganic chemistry, 2009. **48**(4): p. 1423-1432.
 78. M.J. Li, Z.Y. Chi, and Y.C. Wu, *Morphology, chemical composition and phase transformation of hydrothermal derived sodium titanate*. Journal of the American Ceramic Society, 2012. **95**(10): p. 3297-3304.
 79. E. Morgado, et al., *A study on the structure and thermal stability of titanate nanotubes as a function of sodium content*. Solid State Sciences, 2006. **8**(8): p. 888-900.
 80. E. Morgado, et al., *Characterization of nanostructured titanates obtained by alkali treatment of TiO₂-anatases with distinct crystal sizes*. Chemistry of materials, 2007. **19**(4): p. 665-676.
 81. S.K. Pradhan, et al., *Atomic-scale structure of nanosized titania and titanate: particles, wires, and tubes*. Chemistry of Materials, 2007. **19**(25): p. 6180-6186.
 82. P. Dong, et al., *A study on the H₂Ti₃O₇ sheet-like products during the formation process of titanate nanotubes*. Journal of The Electrochemical Society, 2011. **158**(9): p. K183-K186.
 83. Á. Kukovecz, et al., *Oriented crystal growth model explains the formation of titania nanotubes*. The Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(38): p. 17781-17783.
 84. A. Gajović, et al., *High temperature Raman spectroscopy of titanate nanotubes*. Journal of molecular structure, 2009. **924**: p. 183-191.
 85. M. Wei, et al., *Formation of nanotubes TiO₂ from layered titanate particles by a soft chemical process*. Solid State Communications, 2005. **133**(8): p. 493-497.
 86. Y. Ma, et al., *Sonication-hydrothermal combination technique for the synthesis of titanate nanotubes from commercially available precursors*. Materials Research Bulletin, 2006. **41**(2): p. 237-243.

-
87. A. Nakahira, T. Kubo, and C. Numako, *Formation mechanism of TiO₂-derived titanate nanotubes prepared by the hydrothermal process*. Inorganic chemistry, 2010. **49**(13): p. 5845-5852.
 88. R. Camposeco, *et al.*, *Effect of the Ti/Na molar ratio on the acidity and the structure of TiO₂ nanostructures: Nanotubes, nanofibers and nanowires*. Materials Characterization, 2014. **90**: p. 113-120.
 89. J. Huang, *et al.*, *Tailoring of low-dimensional titanate nanostructures*. The Journal of Physical Chemistry C, 2010. **114**(35): p. 14748-14754.
 90. T. Brunatova, *et al.*, *Study of titanate nanotubes by X-ray and electron diffraction and electron microscopy*. Materials Characterization, 2014. **87**: p. 166-171.
 91. H. Kochkar, *et al.*, *Optimization of the alkaline hydrothermal route to titanate nanotubes by a doehlert matrix experience design*. The Journal of Physical Chemistry C, 2009. **113**(5): p. 1672-1679.
 92. F. Alvarez-Ramirez and Y. Ruiz-Morales, *Ab initio molecular dynamics calculations of the phase transformation mechanism for the formation of TiO₂ titanate-type nanosheets from anatase*. Chemistry of materials, 2007. **19**(12): p. 2947-2959.
 93. B. Yao, *et al.*, *Formation mechanism of TiO₂ nanotubes*. Applied physics letters, 2003. **82**(2): p. 281-283.
 94. D.L. Morgan, *et al.*, *Alkaline hydrothermal kinetics in titanate nanostructure formation*. Journal of Materials Science, 2011. **46**(2): p. 548-557.
 95. J. Yu and H. Yu, *Facile synthesis and characterization of novel nanocomposites of titanate nanotubes and rutile nanocrystals*. Materials chemistry and physics, 2006. **100**(2): p. 507-512.
 96. D.L. Morgan, *et al.*, *Implications of precursor chemistry on the alkaline hydrothermal synthesis of titania/titanate nanostructures*. The Journal of Physical Chemistry C, 2009. **114**(1): p. 101-110.
 97. Q. Chen, *et al.*, *Trititanate nanotubes made via a single alkali treatment*. Advanced materials, 2002. **14**(17): p. 1208-1211.
 98. S. Sreekantan and L.C. Wei, *Study on the formation and photocatalytic activity of titanate nanotubes synthesized via hydrothermal method*. Journal of Alloys and Compounds, 2010. **490**(1): p. 436-442.
 99. D.-S. Seo, J.-K. Lee, and H. Kim, *Preparation of nanotube-shaped TiO₂ powder*. Journal of Crystal Growth, 2001. **229**(1): p. 428-432.
 100. S. Kim, *et al.*, *Effects of hydrothermal temperature and acid concentration on the transition from titanate to titania*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2012. **18**(3): p. 1141-1148.
 101. J. Yan, *et al.*, *Alcohol induced liquid-phase synthesis of rutile titania nanotubes*. Materials Science and Engineering: B, 2010. **172**(2): p. 114-120.
 102. H. Zhang, *et al.*, *A new ion exchange behavior of protonated titanate nanotubes after deprotonation and the study on their morphology and optical properties*. Applied Surface Science, 2012. **259**: p. 610-615.

103. A. Turki, *et al.*, *Effect of Na content and thermal treatment of titanate nanotubes on the photocatalytic degradation of formic acid*. Applied Catalysis B: Environmental, 2013. **138**: p. 401-415.
104. C.-C. Tsai and H. Teng, *Regulation of the physical characteristics of titania nanotube aggregates synthesized from hydrothermal treatment*. Chemistry of Materials, 2004. **16**(22): p. 4352-4358.
105. Y. Lan, *et al.*, *Titanate nanotubes and nanorods prepared from rutile powder*. Advanced Functional Materials, 2005. **15**(8): p. 1310-1318.
106. A. Thorne, *et al.*, *Formation, structure, and stability of titanate nanotubes and their proton conductivity*. The Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(12): p. 5439-5444.
107. C.-K. Lee, *et al.*, *Effects of sodium content and calcination temperature on the morphology, structure and photocatalytic activity of nanotubular titanates*. Journal of colloid and interface science, 2007. **316**(2): p. 562-569.
108. B.C. Viana, *et al.*, *Alkali metal intercalated titanate nanotubes: A vibrational spectroscopy study*. Vibrational Spectroscopy, 2011. **55**(2): p. 183-187.
109. Y. Zhu, *et al.*, *Sonochemical synthesis of titania whiskers and nanotubes*. Chemical communications, 2001(24): p. 2616-2617.
110. I. Kustiningsih, S. Slamet, and W.W. Purwanto, *Synthesis of TiO₂ nanotubes by using combination of sonication and hydrothermal treatment and their photocatalytic activity for hydrogen evolution*. REAKTOR, 2015. **15**(3): p. 204-211.
111. Y.-P. Peng, *et al.*, *Microwave-assisted hydrothermal synthesis of N-doped titanate nanotubes for visible-light-responsive photocatalysis*. Journal of hazardous materials, 2010. **183**(1): p. 754-758.
112. Y.-C. Chen, S.-L. Lo, and J. Kuo, *Pb (II) adsorption capacity and behavior of titanate nanotubes made by microwave hydrothermal method*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2010. **361**(1): p. 126-131.
113. D.C. Manfroï, *et al.*, *Titanate nanotubes produced from microwave-assisted hydrothermal synthesis: Photocatalytic and structural properties*. Ceramics International, 2014. **40**(9): p. 14483-14491.
114. Y. Tang, *et al.*, *Mechanical force-driven growth of elongated bending TiO₂- based nanotubular materials for ultrafast rechargeable lithium ion batteries*. Advanced Materials, 2014. **26**(35): p. 6111-6118.
115. B. Santara and P. Giri, *Impact of reaction temperature, stirring and cosolvent on the solvothermal synthesis of anatase TiO₂ and TiO₂/titanate hybrid nanostructures: elucidating the growth mechanism*. Materials Chemistry and Physics, 2013. **137**(3): p. 928-936.
116. T.H.T. Vu, *et al.*, *Synthesis of titanium dioxide nanotubes via one-step dynamic hydrothermal process*. Journal of Materials Science, 2014. **49**(16): p. 5617-5625.
117. E. Horváth, *et al.*, *Hydrothermal conversion of self-assembled titanate nanotubes into nanowires in a revolving autoclave*. Chemistry of materials, 2007. **19**(4): p. 927-931.
118. X.F. Li, *et al.*, *Synthesis and characterization of titanate nanotubes and nanowires in a revolving autoclave*. Advanced Materials Research, 2011. **194**: p. 497-502.

119. L. Torrente-Murciano, A.A. Lapkin, and D. Chadwick, *Synthesis of high aspect ratio titanate nanotubes*. Journal of Materials Chemistry, 2010. **20**(31): p. 6484-6489.
120. S. Zhang, *et al.*, *Formation mechanism of $H_2Ti_3O_7$ nanotubes*. Physical Review Letters, 2003. **91**(25): p. 256103.
121. D.V. Bavykin, J.M. Friedrich, and F.C. Walsh, *Protonated titanates and TiO_2 nanostructured materials: synthesis, properties, and applications*. Advanced Materials, 2006. **18**(21): p. 2807-2824.
122. S. Song, *et al.*, *Visible light-driven iodine-doped titanium dioxide nanotubes prepared by hydrothermal process and post-calcination*. Applied Catalysis A: General, 2010. **378**(2): p. 169-174.
123. I. Aouadi, *et al.*, *Titanate nanotubes as ethanol decomposition catalysts: Effect of coupling photocatalysis with non-thermal plasma*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2017. **346**(Supplement C): p. 485-492.
124. S. Kim, *et al.*, *Enhancement of photocatalytic activity of titania–titanate nanotubes by surface modification*. Applied Catalysis B: Environmental, 2012. **123**: p. 391-397.
125. J. Li, Z. Tang, and Z. Zhang, *H-titanate nanotube: a novel lithium intercalation host with large capacity and high rate capability*. Electrochemistry Communications, 2005. **7**(1): p. 62-67.
126. Y. Ohsaki, *et al.*, *Dye-sensitized TiO_2 nanotube solar cells: fabrication and electronic characterization*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2005. **7**(24): p. 4157-4163.
127. Y. Hao, *et al.*, *Effect of nanotube diameters on bioactivity of a multifunctional titanium alloy*. Applied Surface Science, 2013. **268**: p. 44-51.
128. M.T. Mohammed, Z.A. Khan, and A.N. Siddiquee, *Surface modifications of titanium materials for developing corrosion behavior in human body environment: a review*. Procedia Materials Science, 2014. **6**: p. 1610-1618.
129. M. Yada, *et al.*, *Plate, wire, mesh, microsphere, and microtube composed of sodium titanate nanotubes on a titanium metal template*. Langmuir, 2007. **23**(5): p. 2815-2823.
130. R.M. Wightman, L.J. May, and A.C. Michael, *Detection of dopamine dynamics in the brain*. Analytical Chemistry, 1988. **60**(13): p. 769A-793A.
131. Y. Wang, *et al.*, *Detection of dopamine based on tyrosinase- Fe_3O_4 nanoparticles-chitosan nanocomposite biosensor*. Am J Biomed Sci, 2010. **2**(3): p. 209-16.
132. L. Niu, *et al.*, *Titanate nanotubes: preparation, characterization, and application in the detection of dopamine*. Journal of Materials Science, 2008. **43**(5): p. 1510-1514.
133. A. Liu, *et al.*, *Biosensing Properties of Titanate Nanotube Films: Selective Detection of Dopamine in the Presence of Ascorbate and Uric Acid*. Advanced Functional Materials, 2006. **16**(3): p. 371-376.
134. S. Davis, *Biomedical applications of nanotechnology—implications for drug targeting and gene therapy*. Trends in biotechnology, 1997. **15**(6): p. 217-224.
135. H.-C. Huang, *et al.*, *Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy*. Journal of Controlled Release, 2011. **155**(3): p. 344-357.
136. M. Ferrari, *Cancer nanotechnology: opportunities and challenges*. Nature Reviews Cancer, 2005. **5**(3): p. 161-171.

137. G. Bao, S. Mitragotri, and S. Tong, *Multifunctional nanoparticles for drug delivery and molecular imaging*. Annual review of biomedical engineering, 2013. **15**: p. 253-282.
138. A.s.o.t.U.S.N.I.o. Health. *ClinicalTrials.gov*. [cited 2017 21/08/2017]; Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=nanoparticles&cntry1=EU%3AFR&state1=&recrs=#wrapper>.
139. M. Liong, *et al.*, *Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery*. ACS nano, 2008. **2**(5): p. 889-896.
140. C. Charnay, *et al.*, *Inclusion of ibuprofen in mesoporous templated silica: drug loading and release property*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004. **57**(3): p. 533-540.
141. I.I. Slowing, *et al.*, *Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers*. Advanced drug delivery reviews, 2008. **60**(11): p. 1278-1288.
142. A. Uchida, *et al.*, *Slow release of anticancer drugs from porous calcium hydroxyapatite ceramic*. Journal of orthopaedic research, 1992. **10**(3): p. 440-445.
143. C.V. Uglea, *et al.*, *Drug delivery systems based on inorganic materials: I. Synthesis and characterization of a zeolite-cyclophosphamide system*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 1995. **6**(7): p. 633-637.
144. X. Huang, *et al.*, *Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(6): p. 2115-2120.
145. F. Sonvico, *et al.*, *Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments*. Bioconjugate chemistry, 2005. **16**(5): p. 1181-1188.
146. S. Mornet, *et al.*, *Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy*. Journal of Materials Chemistry, 2004. **14**(14): p. 2161-2175.
147. N. Kohler, *et al.*, *Methotrexate-immobilized poly (ethylene glycol) magnetic nanoparticles for MR imaging and drug delivery*. Small, 2006. **2**(6): p. 785-792.
148. Z. Medarova, *et al.*, *In vivo imaging of siRNA delivery and silencing in tumors*. Nature medicine, 2007. **13**(3): p. 372.
149. A.L. Papa, *Synthèse et caractérisations de nanotubes d'oxydes de titane. Fonctionnalisations en vue de leur application comme nouveaux nanovecteurs biologiques : cas de la transfection d'ADN dans les cardiomyocytes*, in *Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne* 2009, Université de Bourgogne.
150. C. Mirjolet, *et al.*, *The radiosensitization effect of titanate nanotubes as a new tool in radiation therapy for glioblastoma: a proof-of-concept*. Radiotherapy and Oncology, 2013. **108**(1): p. 136-142.
151. T. Baati, *et al.*, *Biocompatible titanate nanotubes with high loading capacity of genistein: cytotoxicity study and anti-migratory effect on U87-MG cancer cell lines*. RSC Advances, 2016. **6**(103): p. 101688-101696.
152. Z. Shi, *et al.*, *Preparation of poly (ϵ -caprolactone) grafted titanate nanotubes*. Polymer, 2007. **48**(26): p. 7516-7522.

-
153. T.T.T. Nguyen, *Poly (oxyde d'éthylène) s fonctionnels à extrémité acide phosphonique et à fonctionnalité réversible pour la stabilisation de nanoparticules magnétiques*, 2013, Le Mans.
154. I. Brnardić, *et al.*, *Sol-gel functionalization of sodium TiO₂ nanotubes and nanoribbons with aminosilane molecules*. *Ceramics International*, 2013. **39**(8): p. 9459-9464.
155. S. Mornet, J. Portier, and E. Duguet, *A method for synthesis and functionalization of ultrasmall superparamagnetic covalent carriers based on maghemite and dextran*. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 2005. **293**(1): p. 127-134.
156. C.C. Berry, *Possible exploitation of magnetic nanoparticle-cell interaction for biomedical applications*. *Journal of Materials Chemistry*, 2005. **15**(5): p. 543-547.
157. A. López-Cruz, *et al.*, *Water dispersible iron oxide nanoparticles coated with covalently linked chitosan*. *Journal of Materials Chemistry*, 2009. **19**(37): p. 6870-6876.
158. Y. Gao, Y. Zhou, and D. Yan, *Preparation of polystyrene-grafted titanate nanotubes by in situ atom transfer radical polymerization*. *Science in China Series B: Chemistry*, 2009. **52**(3): p. 344-350.
159. T. Materne, F. de Buyl, and G.L. Witucki, *Organosilane technology in coating applications: review and perspectives*. Dow Corning Corporation., AGP11933, Form No, 2012.
160. S. Kango, *et al.*, *Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic-inorganic nanocomposites—A review*. *Progress in Polymer Science*, 2013. **38**(8): p. 1232-1261.
161. M. Sabzi, *et al.*, *Surface modification of TiO₂ nano-particles with silane coupling agent and investigation of its effect on the properties of polyurethane composite coating*. *Progress in Organic Coatings*, 2009. **65**(2): p. 222-228.
162. P.I. Pontón, *et al.*, *The effects of the chemical composition of titanate nanotubes and solvent type on 3-aminopropyltriethoxysilane grafting efficiency*. *Applied Surface Science*, 2014. **301**: p. 315-322.
163. Y. Liu, *et al.*, *Kinetics of (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES) Silanization of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*. *Langmuir*, 2013. **29**(49): p. 15275-15282.
164. M.D. Shultz, *et al.*, *Reactive nature of dopamine as a surface functionalization agent in iron oxide nanoparticles*. *Journal of the American Chemical Society*, 2007. **129**(9): p. 2482-2487.
165. A. Caudron, *Étude par spectroscopies moléculaires de la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique: compétition avec les substances humiques*, 2004, Université des Sciences et Technologie de Lille-Lille I.
166. M. Guvendiren, *et al.*, *Adhesion of DOPA-functionalized model membranes to hard and soft surfaces*. *The Journal of adhesion*, 2009. **85**(9): p. 631-645.
167. N. Lee, *et al.*, *Speciation of l-DOPA on nanorutile as a function of pH and surface coverage using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)*. *Langmuir*, 2012. **28**(50): p. 17322-17330.
168. L.-M. Sun and F. Meunier, *Adsorption. Aspects théoriques*. *Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés*, 2003. **2**(J2730): p. J2730. 1-J2730. 16.

169. P.A. O'Day, *Molecular environmental geochemistry*. Reviews of Geophysics, 1999. **37**(2): p. 249-274.
170. H. Gulley-Stahl, et al., *Surface complexation of catechol to metal oxides: an ATR-FTIR, adsorption, and dissolution study*. Environmental science & technology, 2010. **44**(11): p. 4116-4121.
171. P.Z. Araujo, P.J. Morando, and M.A. Blesa, *Interaction of catechol and gallic acid with titanium dioxide in aqueous suspensions. 1. Equilibrium studies*. Langmuir, 2005. **21**(8): p. 3470-3474.
172. P.A. Connor, K.D. Dobson, and A.J. McQuillan, *New sol-gel attenuated total reflection infrared spectroscopic method for analysis of adsorption at metal oxide surfaces in aqueous solutions. Chelation of TiO₂, ZrO₂, and Al₂O₃ surfaces by catechol, 8-quinolinol, and acetylacetone*. Langmuir, 1995. **11**(11): p. 4193-4195.
173. D. Vasudevan and A.T. Stone, *Adsorption of catechols, 2-aminophenols, and 1, 2-phenylenediamines at the metal (hydr) oxide/water interface: effect of ring substituents on the adsorption onto TiO₂*. Environmental science & technology, 1996. **30**(5): p. 1604-1613.
174. W.M. Chirdon, W.J. O'Brien, and R.E. Robertson, *Adsorption of catechol and comparative solutes on hydroxyapatite*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2003. **66**(2): p. 532-538.
175. I.A. Mudunkotuwa, et al., *Dissolution of ZnO nanoparticles at circumneutral pH: a study of size effects in the presence and absence of citric acid*. Langmuir, 2011. **28**(1): p. 396-403.
176. D.-W. Kim and S.-G. Oh, *Agglomeration behavior of chromia nanoparticles prepared by amorphous complex method using chelating effect of citric acid*. Materials letters, 2005. **59**(8): p. 976-980.
177. I.A. Mudunkotuwa and V.H. Grassian, *Citric acid adsorption on TiO₂ 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, 2010. **132**(42): p. 14986-14994.
178. E. Moretti and F. Felippone, *Acide citrique par fermentation*. Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés, 1996. **6**: p. J6062. 1-J6062. 6.
179. A.J. Van Dillen, et al., *Synthesis of supported catalysts by impregnation and drying using aqueous chelated metal complexes*. Journal of Catalysis, 2003. **216**(1): p. 257-264.
180. A. Hultgren, et al., *Optimization of yield in magnetic cell separations using nickel nanowires of different lengths*. Biotechnology progress, 2005. **21**(2): p. 509-515.
181. G. Pasut and F.M. Veronese, *State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research*. Journal of Controlled Release, 2012. **161**(2): p. 461-472.
182. M. Barz, et al., *Overcoming the PEG-addiction: well-defined alternatives to PEG, from structure–property relationships to better defined therapeutics*. Polymer Chemistry, 2011. **2**(9): p. 1900-1918.
183. V. Mourya and N.N. Inamdar, *Chitosan-modifications and applications: opportunities galore*. Reactive and Functional polymers, 2008. **68**(6): p. 1013-1051.

184. M. Dash, *et al.*, *Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications*. Progress in polymer science, 2011. **36**(8): p. 981-1014.
185. C. Shi, *et al.*, *Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine*. Journal of Surgical research, 2006. **133**(2): p. 185-192.
186. T. Jiang, *et al.*, *Chitosan-Based Biopharmaceutical Scaffolds in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics, 2012: p. 393-427.
187. S.K. Shukla, *et al.*, *Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review*. International journal of biological macromolecules, 2013. **59**: p. 46-58.
188. A. Varma, S. Deshpande, and J. Kennedy, *Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review*. Carbohydrate Polymers, 2004. **55**(1): p. 77-93.
189. L. Zhao, *et al.*, *Antibacterial coatings on titanium implants*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2009. **91**(1): p. 470-480.
190. F. Eleonore, *The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles*. Int J Nanomedicine, 2012. **7**(1): p. 5577-91.
191. A. Bernkop-Schnürch and S. Dünnhaupt, *Chitosan-based drug delivery systems*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2012. **81**(3): p. 463-469.
192. T. Jiang, L. Nair, and C. Laurencen, *Chitosan composites for tissue engineering: bone tissue engineering scaffolds*. Asian Chitin J, 2006. **2**: p. 1-10.
193. K.S. Bhise, *et al.*, *Effect of drying methods on swelling, erosion and drug release from chitosan–naproxen sodium complexes*. AAPS PharmSciTech, 2008. **9**(1): p. 1-12.
194. X. Zhang, *et al.*, *PEG-grafted chitosan nanoparticles as an injectable carrier for sustained protein release*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2008. **19**(12): p. 3525-3533.
195. F.M. Kievit, *et al.*, *PEI–PEG–chitosan-copolymer-coated iron oxide nanoparticles for safe gene delivery: synthesis, complexation, and transfection*. Advanced functional materials, 2009. **19**(14): p. 2244-2251.
196. E. Wenzel and V. Somoza, *Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol*. Molecular nutrition & food research, 2005. **49**(5): p. 472-481.
197. E. Siemann and L. Creasy, *Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 1992. **43**(1): p. 49-52.
198. E. Frankel, *et al.*, *Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine*. The Lancet, 1993. **341**(8843): p. 454-457.
199. P. Jeandet, *et al.*, *Resveratrol content of wines of different ages: relationship with fungal disease pressure in the vineyard*. American Journal of Enology and Viticulture, 1995. **46**(1): p. 1-4.
200. L.A. Stivala, *et al.*, *Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(25): p. 22586-22594.
201. M. Holmes-McNary and A.S. Baldwin, *Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I κ B kinase*. Cancer Research, 2000. **60**(13): p. 3477-3483.

-
202. M. Athar, *et al.*, *Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention*. Toxicology and applied pharmacology, 2007. **224**(3): p. 274-283.
203. G. Kuhnle, *et al.*, *Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide*. Biochemical and biophysical research communications, 2000. **272**(1): p. 212-217.
204. A. Bertelli, *et al.*, *Kinetics of trans-and cis-resveratrol (3, 4', 5-trihydroxystilbene) after red wine oral administration in rats*. International journal of clinical pharmacology research, 1996. **16**(4-5): p. 77-81.
205. G. Davidov-Pardo and D.J. McClements, *Resveratrol encapsulation: Designing delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues*. Trends in Food Science & Technology, 2014. **38**(2): p. 88-103.
206. G. Spigno, *et al.*, *Nanoencapsulation systems to improve solubility and antioxidant efficiency of a grape marc extract into hazelnut paste*. Journal of Food Engineering, 2013. **114**(2): p. 207-214.
207. C.-W. Lee, *et al.*, *Resveratrol nanoparticle system improves dissolution properties and enhances the hepatoprotective effect of resveratrol through antioxidant and anti-inflammatory pathways*. Journal of agricultural and food chemistry, 2012. **60**(18): p. 4662-4671.
208. B.D. Isailović, *et al.*, *Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2013. **19**: p. 181-189.
209. J. Blond, M. Denis, and J. Bezar, *Antioxidant action of resveratrol in lipid peroxidation*. Sciences des Aliments (France), 1995.
210. D. Pando, *et al.*, *Preparation and characterization of niosomes containing resveratrol*. Journal of Food Engineering, 2013. **117**(2): p. 227-234.
211. D. Pando, *et al.*, *Nanodesign of olein vesicles for the topical delivery of the antioxidant resveratrol*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2013. **65**(8): p. 1158-1167.
212. H. Peng, *et al.*, *Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol*. Food Chemistry, 2010. **121**(1): p. 23-28.
213. S. Kim, *et al.*, *Preparation and physicochemical characterization of trans-resveratrol nanoparticles by temperature-controlled antisolvent precipitation*. Journal of Food Engineering, 2012. **108**(1): p. 37-42.
214. I. Krad, *et al.*, *Preparation and characterization of $K_{0.5}Bi_{0.5}TiO_3$ particles synthesized by a stirring hydrothermal method*. Ceramics International, 2016. **42**(3): p. 3751-3756.
215. H. Naceur, A. Megriche, and M. El Maaoui, *Structural distortion and dielectric properties of $Sr_{1-x}(Na_{0.5}Bi_{0.5})_xBi_2Nb_2O_9$ ($x=0.0, 0.2, 0.5, 0.8$ and 1.0)*. Journal of Alloys and Compounds, 2013. **546**: p. 145-150.
216. B. Poudel, *et al.*, *Formation of crystallized titania nanotubes and their transformation into nanowires*. Nanotechnology, 2005. **16**(9): p. 1935.
217. X. Li, W. Liu, and J. Ni, *Short-cut synthesis of tri-titanate nanotubes using nano-anatase: Mechanism and application as an excellent adsorbent*. Microporous and Mesoporous Materials, 2015. **213**: p. 40-47.
218. R. Ma, Y. Bando, and T. Sasaki, *Nanotubes of lepidocrocite titanates*. Chemical Physics Letters, 2003. **380**(5): p. 577-582.

219. B.C. Viana, *et al.*, *Structural, morphological and vibrational properties of titanate nanotubes and nanoribbons*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2009. **20**(1): p. 167-175.
220. S. Mozia, *et al.*, *Physico-chemical properties and possible photocatalytic applications of titanate nanotubes synthesized via hydrothermal method*. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 2010. **71**(3): p. 263-272.
221. Y.V. Kolen'ko, *et al.*, *Hydrothermal synthesis and characterization of nanorods of various titanates and titanium dioxide*. The Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(9): p. 4030-4038.
222. M.H. Razali, *et al.*, *Morphological and structural studies of titanate and titania nanostructured materials obtained after heat treatments of hydrothermally produced layered titanate*. Journal of Nanomaterials, 2012. **2012**: p. 18.
223. T. Belin, *et al.*, *Structural variations as a function of surface adsorption in nanostructured particles*. The Journal of Physical Chemistry B, 2004. **108**(17): p. 5333-5340.
224. P. Perriat, *et al.*, *XPS and EELS investigations of chemical homogeneity in nanometer scaled Ti-ferrites obtained by soft chemistry*. Solid State Ionics, 1999. **117**(1): p. 175-184.
225. T. Sham and M. Lazarus, *X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) studies of clean and hydrated TiO₂ (rutile) surfaces*. Chemical Physics Letters, 1979. **68**(2-3): p. 426-432.
226. J. Schmidt and W. Vogelsberger, *Aqueous long-term solubility of titania nanoparticles and titanium (IV) hydrolysis in a sodium chloride system studied by adsorptive stripping voltammetry*. Journal of solution chemistry, 2009. **38**(10): p. 1267-1282.
227. K.G. Knauss, *et al.*, *Ti (IV) hydrolysis constants derived from rutile solubility measurements made from 100 to 300 C*. Applied Geochemistry, 2001. **16**(9): p. 1115-1128.
228. E. Bright and D.W. Readey, *Dissolution kinetics of TiO₂ in HF-HCl solutions*. Journal of the American Ceramic Society, 1987. **70**(12): p. 900-906.
229. I.A. Santos-López, B.E. Handy, and R. García-de-León, *Titanate nanotubes as support of solid base catalyst*. Thermochimica Acta, 2013. **567**: p. 85-92.
230. D.V. Bavykin, *et al.*, *The effect of hydrothermal conditions on the mesoporous structure of TiO₂ nanotubes*. Journal of Materials Chemistry, 2004. **14**(22): p. 3370-3377.
231. J. Yang, *et al.*, *Study on composition, structure and formation process of nanotube Na₂Ti₂O₄(OH)₂*. Dalton Transactions, 2003(20): p. 3898-3901.
232. X. Sun and Y. Li, *Synthesis and characterization of ion-exchangeable titanate nanotubes*. Chemistry—A European Journal, 2003. **9**(10): p. 2229-2238.
233. I. Degen and G. Newman, *Raman spectra of inorganic ions*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy, 1993. **49**(5-6): p. 859-887.
234. G. Socrates, *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*. 2004: John Wiley & Sons.
235. Y. Zhang, N. Kohler, and M. Zhang, *Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake*. Biomaterials, 2002. **23**(7): p. 1553-1561.

-
236. T. Togashi, *et al.*, Continuous hydrothermal synthesis of 3, 4-dihydroxyhydrocinnamic acid-modified magnetite nanoparticles with stealth-functionality against immunological response. *Journal of Materials Chemistry*, 2012. **22**(18): p. 9041-9045.
237. M. Hashiba, *et al.*, The zeta-potential measurement for concentrated aqueous suspension by improved electrophoretic mass transport apparatus — application to Al₂O₃, ZrO₃ and SiC suspensions. *Journal of Materials Science*, 1988. **23**(8): p. 2893-2896.
238. S.R. Rao, *Electrical Characteristics of Interfaces. Electrical Double Layer and Zeta Potential*, in *Surface Chemistry of Froth Flotation: Volume 1: Fundamentals*. 2004, Springer US: Boston, MA. p. 209-255.
239. S.J. Hurst, *et al.*, Utilizing chemical Raman enhancement: a route for metal oxide support-based biodetection. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2010. **115**(3): p. 620-630.
240. T. Rajh, *et al.*, Surface restructuring of nanoparticles: an efficient route for ligand–metal oxide crosstalk. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002. **106**(41): p. 10543-10552.
241. S.R. Rao, *Surface Chemistry of Froth Flotation: Volume 1: Fundamentals*. 2013: Springer Science & Business Media.
242. D. Hojo, *et al.*, Fabrication of Two-Dimensional Structures of Metal Oxide Nanocrystals Using Si Substrate Modified with 3, 4-Dihydroxyhydrocinnamic Acid. *Chemistry of Materials*, 2010. **22**(5): p. 1862-1869.
243. A. Sahraneshin, *et al.*, Surfactant-assisted hydrothermal synthesis of water-dispersible hafnium oxide nanoparticles in highly alkaline media. *Crystal Growth & Design*, 2012. **12**(11): p. 5219-5226.
244. G. M. Robinson and M. R. Smyth, Simultaneous Determination of Products and Intermediates of L-Dopa Oxidation Using Capillary Electrophoresis With Diode-array Detection. *Analyst*, 1997. **122**(8): p. 797-802.
245. P. Aroca, *et al.*, A new spectrophotometric assay for dopachrome tautomerase. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1990. **21**(1): p. 35-46.
246. S. Bahri, *et al.*, Adsorption and Surface Complexation Study of L-DOPA on Rutile (α -TiO₂) in NaCl Solutions. *Environmental Science & Technology*, 2011. **45**(9): p. 3959-3966.
247. D. Vasudevan and A.T. Stone, Adsorption of 4-Nitrocatechol, 4-Nitro-2-Aminophenol, and 4-Nitro-1,2-Phenylenediamine at the Metal (Hydr)Oxide/Water Interface: Effect of Metal (Hydr)Oxide Properties. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1998. **202**(1): p. 1-19.
248. A.V. Lebedev, *et al.*, Effect of group II metal cations on catecholate oxidation. *ChemPhysChem*, 2007. **8**(12): p. 1863-1869.
249. M.J. McWhirter, *et al.*, Siderophore-mediated covalent bonding to metal (oxide) surfaces during biofilm initiation by *pseudomonas aeruginosa* bacteria. *Langmuir*, 2003. **19**(9): p. 3575-3577.
250. J. Araña, *et al.*, The effect of acetic acid on the photocatalytic degradation of catechol and resorcinol. *Applied Catalysis A: General*, 2006. **299**(Supplement C): p. 274-284.

-
251. M. Andjelković, *et al.*, *Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups*. Food Chemistry, 2006. **98**(1): p. 23-31.
252. F.S. L. Maurizi, J. Boudon, O. Heintz, H. Bisht, F. Bouyer and N. Millot *Efficient quantification by X-ray photoelectron spectroscopy and thermogravimetric analyses of the one-pot grafting of two molecules on the surface of iron oxide nanoparticles*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2017.
253. E.P. Plueddemann, *Adhesion through silane coupling agents*. The Journal of Adhesion, 1970. **2**(3): p. 184-201.
254. T. Jesionowski, F. Ciesielczyk, and A. Krysztafkiewicz, *Influence of selected alkoxysilanes on dispersive properties and surface chemistry of spherical silica precipitated in emulsion media*. Materials Chemistry and Physics, 2010. **119**(1): p. 65-74.
255. H. Ishida and J.L. Koenig, *Fourier transform infrared spectroscopic study of the structure of silane coupling agent on E-glass fiber*. Journal of Colloid and Interface Science, 1978. **64**(3): p. 565-576.
256. M. Yamaura, *et al.*, *Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2004. **279**(2): p. 210-217.
257. S. Contarini, *et al.*, *XPS study on the dispersion of carbon additives in silicon carbide powders*. Applied surface science, 1991. **51**(3-4): p. 177-183.
258. K. Boukerma, *et al.*, *X-ray Photoelectron Spectroscopy Evidence for the Covalent Bond between an Iron Surface and Aryl Groups Attached by the Electrochemical Reduction of Diazonium Salts*. Langmuir, 2003. **19**(15): p. 6333-6335.
259. O. Seitz, *et al.*, *Preparation and characterisation of gold nanoparticle assemblies on silanised glass plates*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2003. **218**(1): p. 225-239.
260. J.M. López-Nicolás and F. García-Carmona, *Aggregation state and p K a values of (E)-resveratrol as determined by fluorescence spectroscopy and UV– visible absorption*. Journal of agricultural and food chemistry, 2008. **56**(17): p. 7600-7605.
261. G.R. Pettit, *et al.*, *Antineoplastic Agents*. 465. *Structural Modification of Resveratrol: Sodium Resverastatin Phosphate 1*. Journal of medicinal chemistry, 2002. **45**(12): p. 2534-2542.
262. Z. Zhou, *et al.*, *Resveratrol cocrystals with enhanced solubility and tabletability*. International journal of pharmaceutics, 2016. **509**(1): p. 391-399.
263. M.J. Fischer, *Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach*. Surface plasmon resonance: methods and protocols, 2010: p. 55-73.
264. S. Sam, *et al.*, *Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces*. Langmuir, 2009. **26**(2): p. 809-814.
265. H.B. Na, *et al.*, *Multidentate catechol-based polyethylene glycol oligomers provide enhanced stability and biocompatibility to iron oxide nanoparticles*. ACS nano, 2011. **6**(1): p. 389-399.
266. J. Coste, D. Le-Nguyen, and B. Castro, *PyBOP®: a new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product*. Tetrahedron Letters, 1990. **31**(2): p. 205-208.

-
267. E. Fernandez-Garcia, *et al.*, *Peptide-functionalized zirconia and new zirconia/titanium bioceramics for dental applications*. Journal of dentistry, 2015. **43**(9): p. 1162-1174.
268. L. Marin, B. Simionescu, and M. Barboiu, *Imino-chitosan biodynamers*. Chemical Communications, 2012. **48**(70): p. 8778-8780.
269. S.-C. Chen, *et al.*, *A novel pH-sensitive hydrogel composed of N, O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery*. Journal of Controlled Release, 2004. **96**(2): p. 285-300.
270. M.R. Kasaai, *A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy*. Carbohydrate Polymers, 2008. **71**(4): p. 497-508.
271. J. Kumirska, *et al.*, *Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan*. Marine drugs, 2010. **8**(5): p. 1567-1636.
272. S. Lüftl, V.-M. Archodoulaki, and S. Seidler, *Thermal-oxidative induced degradation behaviour of polyoxymethylene (POM) copolymer detected by TGA/MS*. Polymer degradation and stability, 2006. **91**(3): p. 464-471.
273. A. Jondeau, *et al.*, *Evaluation of the sensitivity of three sublethal cytotoxicity assays in human HepG2 cell line using water contaminants*. Toxicology, 2006. **226**(2): p. 218-228.
274. I. Valentin, *et al.*, *Uridine uptake inhibition as a cytotoxicity test for a human hepatoma cell line (HepG2 cells): comparison with the neutral red assay*. Toxicology, 2001. **158**(3): p. 127-139.
275. J. Paris, *Iron oxides nanoparticles and titanate nanotubes dedicated to multimodal imaging and anticancer therapy*, 2013, Université de Bourgogne.
276. L.Y. Rizzo, *et al.*, *In Vivo Nanotoxicity Testing using the Zebrafish Embryo Assay*. Journal of materials chemistry. B, Materials for biology and medicine, 2013. **1**: p. 10.1039/C3TB20528B.
277. L. Bu, *et al.*, *Trans-resveratrol loaded chitosan nanoparticles modified with biotin and avidin to target hepatic carcinoma*. International journal of pharmaceutics, 2013. **452**(1): p. 355-362.
278. V. Sanna, *et al.*, *Effect of chitosan concentration on PLGA microcapsules for controlled release and stability of resveratrol*. International Journal of Biological Macromolecules, 2015. **72**(Supplement C): p. 531-536.

Titre : Synthèses optimisées et caractérisations avancées de nanotubes de titanate et de leurs fonctionnalisations : vers l'élaboration de nanovecteurs de molécules thérapeutiques

Résumé : L'objectif de cette thèse est d'élaborer des nanohybrides à base des nanotubes de titanate (TiONts) dans le but de les utiliser comme nanovecteurs d'une molécule thérapeutique : un phénol stilbénique, le 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-*trans*-stilbène (HAPts), structurellement proche du *trans*-resvératrol.

Les TiONts sont synthétisés par traitement hydrothermal à partir du dioxyde de titane sous sa forme rutile. Deux méthodes de synthèse hydrothermale (statique et dynamique) ont été étudiées. La deuxième méthode est originale car elle utilise un réacteur conduisant à une agitation mécanique forte par balancement où le temps d'agitation par heure de traitement peut-être contrôlé. Une étude paramétrique a été menée pour évaluer l'impact de la durée de traitement, de la température et du temps d'agitation appliqué par heure sur la morphologie des structures obtenues. Il a été montré que l'agitation par balancement, appliquée durant la synthèse, a un effet accélérateur sur la cinétique de formation des TiONts en mode dynamique. Par optimisation des paramètres de synthèse, il a été possible de réduire la durée de la synthèse des TiONts à 2h seulement, au lieu de 48 h en méthode statique. Des discussions sur la structure cristalline, le mécanisme de formation des TiONts et leur transformation en nanorubans ont également été développées en se basant sur différentes techniques de caractérisations (DRX, MET, ATG, XPS, spectroscopies UV-visible, IR et Raman). La morphologie spéciale des TiONts, en spirale (diamètre externe de 10 nm, diamètre interne de 4 nm avec une longueur moyenne d'environ 190 nm) et multicouches (3 à 5 couches) leur confère une surface spécifique élevée (> 200 m²/g).

Différentes préfonctionnalisations des TiONts par des ligands organiques biocompatibles ont été effectuées pour améliorer la stabilité des TiONts en suspension et greffer à leur surface des groupements fonctionnels réactifs. Les ligands étudiées sont : deux catéchols, le DHCA et la L-DOPA, l'acide citrique et deux organosilanes, l'APTES et le CPTES. Les paramètres optimaux de greffage ont été déterminés et la présence de liens covalents entre ces ligands et les TiONts ont été établis, principalement par XPS et IR.

Après préfonctionnalisation avec le CPTES, le greffage du phénol stilbénique (HAPts) a été un succès. Cette molécule a été accrochée à la surface des TiONts-CPTES par une réaction de condensation entre le HAPts et le CPTES par substitution nucléophile et a conduit à un taux de greffage d'environ 72,5 mg/g de TiONts.

Enfin, l'une des originalités de ce travail a consisté à améliorer la biocompatibilité des TiONts, à travers la modification de leur surface par un polymère naturel, le chitosan (CT). Ce dernier a été greffé à la surface des nanotubes par deux méthodes différentes *via* des liaisons covalentes (greffage étape par étape mettant en œuvre de l'APTES puis du glutaraldehyde) ou *via* des interactions électrostatiques (adsorption). Après comparaison entre les deux approches, les premiers tests d'évaluation de la toxicité, *in vitro* (test de cinétique de synthèse des ARN et test du rouge neutre) et *in vivo* (embryons de poisson zèbre), ont été réalisés et les résultats ont confirmé la biocompatibilité des nanohybrides synthétisés avec les systèmes biologiques. Une étude de la stabilité colloïdale des TiONts-CT dans différents milieux mimant des milieux biologiques a également été menée.

Mots clés : Nanotubes de titanate, synthèse hydrothermale dynamique, nanovecteurs, nanohybrides, stabilité colloïdale, fonctionnalisation, greffage, ligands organiques, catéchols, organosilanes, phénol stilbénique, chitosan, biocompatibilité.

Title: Optimized syntheses and advanced characterizations of titanate nanotubes and their functionalization : towards the development of nanovectors of therapeutic molecules

Abstract: The aim of this PhD thesis is to develop new nanohybrids based on titanate nanotubes (TiONts) in order to use them as nanocarrier of a therapeutic molecule: a stilbene phenol, 4'-hydroxy-4-(3-aminopropoxy)-*trans*-stilbene (HAPts), which is a transresveratrol derivative.

TiONts are synthesized by a hydrothermal treatment from a precursor of rutile titanium dioxide. Two methods of hydrothermal synthesis have been studied (the static and dynamic ones): the second approach uses an original hydrothermal device which provides a vigorous mechanical stirring during the hydrothermal process with controllable stirring time per hour. A parametric study was carried out to evaluate the effect of reaction time, temperature and stirring time during the hydrothermal treatment on the morphology of the obtained products. It has been proved that the mechanical stirring has a great accelerating effect on the kinetics of the TiONts formation during the dynamic hydrothermal synthesis. After optimization of the experimental parameters of the dynamic hydrothermal treatment, it was possible to reduce the time of TiONts synthesis to only 2 hours, instead of 48 hours obtained by the static method. Discussions about the crystal structure of TiONts, about their formation mechanism and their transformation into nanoribbons have been also developed based on different characterization techniques (XRD, TEM, TGA, XPS, UV-visible, IR and Raman spectroscopies). Their special hollow morphology (10 nm in outer diameter, inner diameter of 4 nm, average length of about 190 nm) and multilayered structure (3 to 5 layers) impart them a high specific surface area (>200 m²/g).

Different prefunctionalizations of TiONts by biocompatible organic ligands have been carried out to improve their colloidal stability and to graft reactive functional groups on their surface. The studied ligands are: two catechols (DHCA and L-DOPA), citric acid and two organosilanes (APTES and CPTES). Optimal grafting parameters were determined and the presence of covalent bonds between these ligands and TiONts was highlighted especially by XPS and IR.

After prefunctionalization with CPTES, the stilbenic phenol (HAPts) was successfully grafted onto TiONts-CPTES surface using a condensation reaction between HAPts and CPTES through nucleophilic substitution. The resulting grafting rate was of about 72.5 mg/g of TiONts.

Finally, one of the originalities of this work was the improvement of TiONts biocompatibility by surface modification with a natural polymer, chitosan (CT). The latter was grafted by two different approaches *via* covalent bonds (step by step grafting using APTES then glutaraldehyde as two intermediate molecules) or *via* electrostatic interactions (adsorption). After comparing the two elaborated nanohybrids, obtained by the two grafting approaches, the first cytotoxicity assessment tests were carried out, *in vitro* (RNA synthesis test and neutral red test) and *in vivo* (zebrafish test), and the obtained results confirmed the biocompatibility of these nanohybrids towards biological systems. A colloidal stability study of TiONts-CT in various mimicked biological media was also carried out.

Keywords: Titanate nanotubes, dynamic hydrothermal synthesis, nanocarriers, nanohybrids, colloidal stability, functionalization, grafting, organic ligands, catechols, organosilanes, stilbenic phenol, chitosan, biocompatibility.