



**HAL**  
open science

# Nanoparticules de réseaux de coordination à visée théranostique

Lucile Fetiveau

► **To cite this version:**

Lucile Fetiveau. Nanoparticules de réseaux de coordination à visée théranostique. Chimie de coordination. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS298 . tel-01892054

**HAL Id: tel-01892054**

**<https://theses.hal.science/tel-01892054>**

Submitted on 10 Oct 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.

# Nanoparticules de réseaux de coordination à visée théranostique

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°571 Sciences chimiques : molécules, matériaux,  
instrumentation, biosystèmes (2MIB)  
Spécialité de doctorat : Chimie

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 01 Octobre 2018, par

**Lucile Fétiveau**

Composition du Jury :

<b>François Lux</b> Maitre de Conférence, Université de Lyon1 (– ILM)	Rapporteur
<b>Sylvie Bégin-Colin</b> Professeur, Université de Strasbourg (– IPCMS)	Rapporteur
<b>Stéphane Mornet</b> Chargé de recherche, Université de Bordeaux (– ICMCB)	Examineur
<b>Hynd Remita</b> Directrice de recherche, Université Paris-Sud /Paris Saclay (– LCP)	Président
<b>Laure Catala</b> Professeur, Université Paris-Sud /Paris Saclay (-ICMMO)	Directeur de thèse





*« Tout obstacle renforce la détermination. Celui qui s'est fixé un but n'en change pas. »*

Léonard de Vinci

A mon papy,  
A ma famille.





## REMERCIEMENTS

Ces trois années de travail et tout mon parcours scolaire s'achèvent, aujourd'hui, par ces remerciements. Je tiens à remercier toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à ce travail.

Je voudrais remercier les quatre membres de mon jury : François Lux et Sylvie Bégin-Colin, qui ont accepté d'être rapporteur, puis Stéphane Mornet et Hynd Rémita qui ont également jugé ce travail. L'ensemble de vos remarques et la discussion constructive que nous avons eu lors de ma soutenance m'ont beaucoup appris. Je vous remercie pour votre investissement et vos encouragements.

Je souhaiterais également remercier Laure Catala, ma directrice de thèse, pour tout ce que tu as pu m'apporter pendant ces presque quatre ans où nous avons travaillé ensemble. Tu as toujours eu confiance en mon travail et été disponible pour discuter. Je te remercie également pour tes encouragements et ton soutien constant. J'ai eu la chance d'être très bien encadrée et de travailler sur un sujet passionnant. J'ai toujours apprécié nos échanges qui ont été au-delà des simples échanges professionnels.

Ce travail n'aurait pas été possible sans la contribution de nombreux collaborateurs. Tout d'abord, je remercie sincèrement Sophie Laurent pour m'avoir accueillie à l'université de Mons. Cette expérience m'a permis d'être formée en relaxométrie. Mes plus sincères remerciements à Florence Gazeau et Jeanne Volatron de l'Université Paris Diderot. Je remercie Jeanne pour le temps que tu as pu me consacrer et pour tes réponses aux nombreuses questions que j'ai pu avoir. Au cours de ce travail, une forte collaboration a été établie avec l'ISMO. Tout d'abord, avec Ruxandra Gref et son équipe qui nous ont donné accès à de nouveaux polymères. Je dois également beaucoup à l'équipe de Sandrine Lacombe et Erika Porcel. Merci Erika pour tout le temps que tu m'as consacré et notamment pour l'aide que tu m'as apportée pour la rédaction de ce manuscrit. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler à vos côtés. Je remercie également, au sein de l'ICMMO, François Brisset et Diana Dragoe pour les mesures EDS et XPS, respectivement.

Il me tient à cœur de consacrer un paragraphe aux personnels de l'IUT d'Orsay. Dans le cadre de ce travail, je remercie Philippe Méjanelle pour son accueil. J'ai toujours passé des moments agréables lors de mes campagnes ICP. D'un point de vue plus personnel, mon année d'étude à l'IUT m'a apporté énormément. J'y ai rencontré des personnes exceptionnelles avec qui j'espère conserver des liens d'amitié (et plus parfois). Je me dois donc de remercier Mr. Fouque qui m'a accepté dans sa formation, il y a maintenant 7 ans.

Mes sincères remerciements à l'ensemble du LCI. J'y suis arrivée en tant que stagiaire de M2 où j'ai été formée par Gabriella Paul. Je te remercie de m'avoir tout appris, j'ai beaucoup aimé travailler à tes côtés. Je n'oublie pas Linh avec qui j'ai partagé le labo pendant 3 ans et parfois également les galères de manips. Je remercie également l'ensemble de thésards que j'ai croisé pendant ces trois ans. J'ai une pensée particulière pour mes collègues de bureau, Cyril et Vincent, qui m'ont toujours encouragés et sus être positif avec moi surtout dans les derniers moments.

Et bien sûr, Ibrahim, nous avons partagé un bureau mais aujourd'hui, je te considère comme un ami qui est toujours de bons conseils. Merci d'être venu à ma soutenance, j'en ai été très touchée. Merci à Olga, nos repas du midi (à 11H45) vont me manquer mais ce fut le point de départ d'une belle amitié. Je suis contente d'avoir pu apprendre à davantage te connaître au cours de l'année écoulée et j'espère bien maintenir ce lien au-delà du labo. Merci également à Marie, j'ai bien tenu compte de tous tes conseils après ta propre soutenance. Je te remercie pour ta gentillesse et ta bonne humeur constante. Les moments partagés avec toi sont toujours très agréables.

Au cours de ces trois ans, j'ai pu partager mon expérience avec trois stagiaires. Adrien, tu as été la première personne que j'ai encadrée, j'espère ne pas t'avoir trop traumatisé (je ne pense pas vu que tu as choisi de faire une thèse). J'ai vraiment apprécié travailler avec toi. Je retiendrais de ton stage des moments inoubliables où nous avons bien rigolé mais également tout le travail que tu as pu fournir en si peu de temps. Je remercie également Julie, nous avons beaucoup échangé toutes les deux et je te souhaite de trouver ta voie par la suite. Merci également à Youven, je te souhaite bonne chance pour la thèse que tu as choisi qui j'espère t'apportera beaucoup.

Merci à tous mes amis qui ont été présent soit en venant à ma soutenance soit par des mails ou des messages. Vos encouragements et votre soutien m'ont énormément touché. Je voudrais particulièrement remercier Stéphanie qui est venue de Nantes spécialement pour ma soutenance. Je ne te remercierai jamais assez pour ça.

Je dois cette réussite à ma famille. Tout d'abord à mes parents qui nous ont toujours poussés, avec ma sœur, pour que l'on exploite nos capacités. Merci papa, de m'avoir toujours encouragé dans mes études et d'avoir eu les mots pour que je persévère dans les moments de doute. J'ai toujours eu en tête une phrase que tu as dû dire quand nous étions petites « Tu t'es engagée donc tu vas jusqu'au bout », ce qui m'a permis de toujours m'accrocher. Merci maman de m'avoir encouragée et de m'avoir poussée. J'en viendrais presque à te remercier pour les nombreuses dictées que tu m'as fait faire !! L'apprentissage du produit en croix dès que j'ai su compter m'a conduit à un diplôme de docteur, ce qui est aussi ta réussite. Merci pour tous les sacrifices que tu as faits pour que j'en arrive là aujourd'hui. Une pensée pour ma sœur qui a survécu entourée de scientifique, merci. Un grand merci également à Christian pour sa présence toujours discrète. Mes plus sincères remerciements à la famille de Damien (Bruno et Véronique, André et Henriette ainsi que Léo et Agate). Merci pour l'aide que vous nous avez apporté le jour J. Je tenais à particulièrement vous remercier pour tout votre soutien et surtout votre gentillesse. Vous m'avez toujours accueilli à bras ouverts et vous êtes d'une générosité rare. Je ne peux pas ne pas remercier celui qui partage ma vie. Damien, tu as été obligé de tout supporter (crises de nerfs, crises de larmes, celles de joie étaient plus rare). Merci d'avoir cru en moi et d'être là, même dans les jours les plus difficiles. Et enfin, je terminerai en remerciant mes grands-parents. Vous avez voulu nous transmettre l'amour de la terre, bien que nous ayons pris une voie différente. J'ai retenu de tous ces moments passés à vos côtés l'importance du travail et du travail bien fait. J'espère vous avoir rendu fier. Papy, tu es parti juste avant que je finisse mais je sais que tu as été et que tu seras toujours à mes côtés. Je dédie ce manuscrit à mes parents et grands-parents.



# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>.....</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>3</b>
<b>I. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) .....</b>	<b>3</b>
<b>I.1 Principe de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) .....</b>	<b>3</b>
<b>I.2 Théorie de la relaxivité .....</b>	<b>6</b>
I.2.1 La relaxivité .....	6
I.2.2 La théorie de Solomon, Bloembergen et Morgan .....	7
I.2.3 Mécanisme par sphère interne .....	8
I.2.4 Mécanisme de la seconde sphère et de la sphère externe .....	9
I.2.5 Paramètres influençant la relaxivité .....	10
<b>I.3 Les agents de contraste.....</b>	<b>13</b>
I.3.1 Les agents de contraste commerciaux .....	13
I.3.2 Stratégies pour améliorer la relaxivité des complexes moléculaires .....	15
I.3.3 Les agents macromoléculaires .....	20
I.3.4 Nano-objets contenant des ions paramagnétiques .....	24
<b>II. Le bleu de Prusse et ses analogues .....</b>	<b>33</b>
<b>II.1 Structure et propriétés du bleu de Prusse et de ses analogues .....</b>	<b>33</b>
II.1.1 Le bleu de Prusse.....	33
II.1.2 Les analogues de bleu de Prusse .....	34
<b>II.2 Vers les agents de contraste.....</b>	<b>35</b>
II.2.1 Intérêt de ces réseaux de coordination .....	35
II.2.2 Réseaux à ponts cyanures à base de Gd <sup>III</sup> .....	36
II.2.3 Analogues de bleu de Prusse dopés avec du Mn <sup>II</sup> .....	41
<b>III. Vers des objets théranostiques .....</b>	<b>43</b>
<b>III.1 L'hyperthermie photoassistée.....</b>	<b>43</b>
III.1.1 Principe .....	43
III.1.2 Nanoagents thérapeutique pour l'hyperthermie .....	44
III.1.3 Le bleu de Prusse et ses analogues comme agent théranostique pour l'IRM et l'hyperthermie photoassistée (PTT) .....	46
<b>III.2 De la radiothérapie à l'hadronthérapie.....</b>	<b>51</b>
III.2.1 Principe .....	51
III.2.2 Des nanoparticules comme radio-amplificateurs.....	52
<b>IV. Des analogues de bleu de Prusse aux cyanosols .....</b>	<b>54</b>
<b>IV.1 Les cyanogels.....</b>	<b>54</b>
<b>IV.2 Les cyanosols.....</b>	<b>57</b>

<b>V. Objectifs de la thèse.....</b>	<b>58</b>
<b>CHAPITRE II : NANOPARTICULES DE BLEU DE PRUSSE CONTENANT DES IONS PARAMAGNETIQUES Gd<sup>III</sup> OU Mn<sup>II</sup> COMBINANT PERFORMANCES EN IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE ET EN HYPERTHERMIE PHOTOASSISTEE.....</b>	
<b>I. Introduction.....</b>	<b>68</b>
<b>II. Les nanoparticules K<sub>4y-3</sub>Gd<sup>III</sup><sub>x</sub>In<sup>III</sup><sub>1-x</sub>[Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>]<sub>y</sub>.....</b>	<b>69</b>
<b>II.1 Synthèse des particules .....</b>	<b>69</b>
II.1.1 Synthèse en solution aqueuse .....	69
II.1.2 Fonctionnalisation par le dextran .....	70
<b>II.2 Caractérisations structurales et évaluation des tailles.....</b>	<b>71</b>
II.2.1 Diffusion dynamique de la lumière (DLS) .....	71
II.2.2 Diffraction des rayons X sur poudre (DRX).....	73
II.2.3 Microscopie électronique en transmission (MET) .....	74
<b>II.3 Caractérisation chimique des composés .....</b>	<b>76</b>
II.3.1 Spectroscopie Infra-rouge (IR) .....	77
II.3.2 Analyse élémentaire (AE) et ICP-OES .....	78
<b>II.4 Conclusion.....</b>	<b>78</b>
<b>III. Les nanoparticules K<sub>4y-3</sub>Gd<sup>III</sup><sub>x</sub>Fe<sup>III</sup><sub>1-x</sub>[Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>]<sub>y</sub> et K<sub>4y+x-3</sub>Mn<sup>II</sup><sub>x</sub>Fe<sup>III</sup><sub>1-x</sub>[Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>]<sub>y</sub>.....</b>	<b>78</b>
<b>III.1 Synthèse des nanoparticules.....</b>	<b>79</b>
<b>III.2 Caractérisation des nanoparticules K<sub>4y+x-3</sub>Mn<sup>II</sup><sub>x</sub>Fe<sup>III</sup><sub>1-x</sub>[Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>]<sub>y</sub>.....</b>	<b>79</b>
III.2.1 Caractérisations structurales et de taille .....	79
III.2.2 Caractérisation chimique .....	83
<b>III.3 Caractérisation des nanoparticules K<sub>4y-3</sub>Gd<sup>III</sup><sub>x</sub>Fe<sup>III</sup><sub>1-x</sub>[Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>]<sub>y</sub>.....</b>	<b>84</b>
III.3.1 Caractérisations structurales et de taille .....	84
III.3.2 Caractérisation chimique des particules.....	86
<b>III.4 Discussion .....</b>	<b>88</b>
<b>IV. Mesures de relaxivité et images de contraste.....</b>	<b>88</b>
<b>IV.1 Relaxivité longitudinale .....</b>	<b>88</b>
IV.1.1 Nanoparticules K <sub>4y+x-3</sub> Mn <sup>II</sup> <sub>x</sub> Fe <sup>III</sup> <sub>1-x</sub> [Fe <sup>II</sup> (CN) <sub>6</sub> ] <sub>y</sub> .....	88
IV.1.2 Nanoparticules K <sub>4y-3</sub> Gd <sup>III</sup> <sub>x</sub> In <sup>III</sup> <sub>1-x</sub> [Fe <sup>II</sup> (CN) <sub>6</sub> ] x=0,05 et 0,1.....	90
IV.1.3 Nanoparticules K <sub>4y-3</sub> Gd <sup>III</sup> <sub>x</sub> Fe <sup>III</sup> <sub>1-x</sub> [Fe <sup>II</sup> (CN) <sub>6</sub> ] x=0,05 et 0,1 .....	91
<b>IV.2 Profils de dispersion .....</b>	<b>92</b>
IV.2.1 Nanoparticules K <sub>4y+x-3</sub> Mn <sup>II</sup> <sub>x</sub> Fe <sup>III</sup> <sub>1-x</sub> [Fe <sup>II</sup> (CN) <sub>6</sub> ] <sub>y</sub> .....	93
IV.2.2 Systèmes composés de Gd <sup>III</sup> .....	94
<b>IV.3 Particules enrobées de PVP.....</b>	<b>95</b>
<b>IV.4 Effet du cœur paramagnétique .....</b>	<b>97</b>
<b>IV.5 Images de contraste .....</b>	<b>98</b>
<b>IV.6 Conclusion.....</b>	<b>98</b>

<b>V.</b>	<b><i>Toxicité des particules Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe et Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe</i></b>	<b>99</b>
<b>V.1</b>	<b>Relargage du Gd<sup>III</sup></b>	<b>99</b>
V.1.1	Dosage au xylénol orange	99
V.1.2	Mesures par ICP-OES	101
<b>V.2</b>	<b>Viabilité cellulaire</b>	<b>101</b>
<b>VI.</b>	<b><i>Hyperthermie photoassistée</i></b>	<b>102</b>
<b>VI.1</b>	<b>Caractérisation optique des particules</b>	<b>102</b>
<b>VI.2</b>	<b>Echauffement en solution aqueuse</b>	<b>104</b>
VI.2.1	Paramètres de mesure	104
VI.2.2	Hyperthermie photoassistée	105
VI.2.3	Images de contraste	107
<b>VI.3</b>	<b>Conclusion</b>	<b>107</b>
<b>VII.</b>	<b><i>Conclusion et perspectives</i></b>	<b>108</b>
<b>CHAPITRE III : ETUDE DE LA STABILITE DES PARTICULES <math>K_{0,6}Gd^{III}_{0,05}Fe^{III}_{0,95}[Fe^{II}(CN)_6]_{0,9}</math> DANS LES MILIEUX D'EXPERIENCES IN VITRO ET IN VIVO</b>		<b>112</b>
<b>I.</b>	<b><i>Introduction</i></b>	<b>112</b>
<b>II.</b>	<b><i>Dégradation des bleus de Prusse</i></b>	<b>112</b>
<b>II.1</b>	<b>Milieux de culture cellulaire</b>	<b>114</b>
<b>II.2</b>	<b>Stabilité dans l'ALF</b>	<b>115</b>
<b>II.3</b>	<b>Stabilité dans le SVF</b>	<b>118</b>
<b>II.4</b>	<b>Influence de la taille sur la stabilité</b>	<b>121</b>
II.4.1	Comparaison des différentes particules	121
II.4.2	Caractérisation du devenir des particules	122
<b>II.5</b>	<b>Discussion</b>	<b>125</b>
<b>III.</b>	<b><i>Coquille de <math>K_kCu^{II}[Fe^{II}(CN)_6]</math></i></b>	<b>126</b>
<b>III.1</b>	<b>Stabilité du réseau Cu<sup>II</sup>Fe</b>	<b>127</b>
III.1.1	Synthèse et caractérisation des particules de Cu <sup>II</sup> Fe	127
III.1.2	Suivi de la stabilité par spectroscopie UV-visible	128
<b>III.2</b>	<b>Croissance de la coquille Cu<sup>II</sup>Fe</b>	<b>128</b>
III.2.1	Synthèse en une étape et caractérisation des particules	128
III.2.2	Stabilité dans l'ALF et le SVF	130
<b>III.3</b>	<b>Discussion</b>	<b>131</b>
<b>IV.</b>	<b><i>Croissance d'une coquille de silice</i></b>	<b>131</b>
<b>IV.1</b>	<b>Synthèse de la silice</b>	<b>131</b>
<b>IV.2</b>	<b>Caractérisations des systèmes</b>	<b>132</b>
IV.2.1	Nanoparticules BdP@PVP@SiO <sub>2</sub> -0,2	132
IV.2.2	Nanoparticules BdP@PVP@SiO <sub>2</sub> -2 et BdP@PVP@SiO <sub>2</sub> -20	135

<b>IV.3</b>	<b>Stabilité dans les milieux physiologiques .....</b>	<b>137</b>
IV.3.1	Dans l'ALF.....	137
IV.3.2	Dans le SVF.....	137
<b>IV.4</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>139</b>
<b>V.</b>	<b><i>Fonctionnalisation de surface des NPs .....</i></b>	<b>139</b>
<b>V.1</b>	<b>Synthèse des particules .....</b>	<b>139</b>
V.1.1	Calcul de la quantité de Fe <sup>III</sup> de surface .....	139
V.1.2	Description de la synthèse .....	139
<b>V.2</b>	<b>Caractérisation des particules .....</b>	<b>140</b>
V.2.1	Caractérisations de taille et structurale .....	140
V.2.2	Caractérisation chimique .....	142
<b>V.3</b>	<b>Stabilité dans les milieux cellulaire et sanguins.....</b>	<b>143</b>
V.3.1	Dans l'ALF .....	143
V.3.2	Dans le SVF .....	144
<b>V.4</b>	<b>Hyperthermie photoassistée .....</b>	<b>146</b>
<b>V.5</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>147</b>
<b>VI.</b>	<b><i>Systèmes à base de cyclodextrine .....</i></b>	<b>148</b>
<b>VI.1</b>	<b>Synthèse et caractérisation des particules .....</b>	<b>149</b>
VI.1.1	Particules avec citrate et poly-CD .....	149
VI.1.2	Enrobage avec cyclodextrine citrate.....	151
<b>VI.2</b>	<b>Stabilité dans les milieux.....</b>	<b>152</b>
VI.2.1	Dans l'ALF.....	152
VI.2.2	Dans le SVF.....	154
<b>VI.3</b>	<b>Relargage du Gd<sup>III</sup> .....</b>	<b>155</b>
<b>VI.4</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>156</b>
<b>VII.</b>	<b><i>Mesures de relaxivité.....</i></b>	<b>156</b>
<b>VII.1</b>	<b>Systèmes enrobés par du dextran .....</b>	<b>156</b>
<b>VII.2</b>	<b>Systèmes enrobés par de la poly-cyclodextrine.....</b>	<b>158</b>
<b>VII.3</b>	<b>Comparaison des différentes particules.....</b>	<b>158</b>
<b>VIII.</b>	<b><i>Conclusion .....</i></b>	<b>160</b>
<b>CHAPITRE IV : STABILISATION EN MILIEU AQUEUX DE CYANOSOLS CONTENANT DES IONS</b>		
<b>LOURDS DE TYPE Pt<sup>II</sup>, Pd<sup>II</sup> OU Au<sup>I</sup>.....</b>		
<b>I. Introduction.....</b>		<b>164</b>
<b>II. Synthèses et caractérisations de cyanosols à base de Pt<sup>II</sup> ou Pd<sup>II</sup> et Fe<sup>II</sup> ou Fe<sup>III</sup>.....</b>		<b>165</b>
<b>II.1</b>	<b>Synthèse des particules .....</b>	<b>165</b>
II.1.1	Particules contenant du Pt <sup>II</sup> .....	165
II.1.2	Particules contenant du Pd <sup>II</sup> .....	166



<b>II.2</b>	<b>Système à base de Pt<sup>II</sup> et Fe<sup>II</sup> .....</b>	<b>166</b>
II.2.1	Suivi de la réaction in situ .....	166
II.2.2	Caractérisation de tailles et de structure .....	168
II.2.3	Caractérisation chimique .....	171
<b>II.3</b>	<b>Système à base de Pt<sup>II</sup> et Fe<sup>III</sup> .....</b>	<b>173</b>
II.3.1	Suivi in situ de la réaction .....	173
II.3.2	Caractérisation de taille et de structure .....	174
II.3.3	Caractérisation chimique par spectroscopie IR.....	175
<b>II.4</b>	<b>Cyanosols à base de Pd<sup>II</sup> .....</b>	<b>177</b>
II.4.1	Caractérisation de taille et structurale.....	177
II.4.2	Caractérisation chimique .....	178
<b>II.5</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>180</b>
<b>III.</b>	<b>Les cyanosols comme radio-amplificateurs ? .....</b>	<b>181</b>
<b>III.1</b>	<b>Caractérisation des particules enrobées de dextran .....</b>	<b>182</b>
III.1.1	Détermination de la taille .....	182
III.1.2	Composition chimique .....	183
<b>III.2</b>	<b>Irradiation de plasmides en présence de particules.....</b>	<b>185</b>
III.2.1	Principe .....	186
III.2.2	Irradiations.....	186
<b>III.3</b>	<b>Expériences <i>in cellulo</i>.....</b>	<b>188</b>
III.3.1	Expériences de toxicité .....	188
III.3.2	Irradiations des cellules HeLa en présence de cyanosols .....	189
<b>III.4</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>190</b>
<b>IV.</b>	<b>Cyanosols composés de Pt<sup>II</sup> et d' Au<sup>I</sup>.....</b>	<b>192</b>
<b>IV.1</b>	<b>Synthèse des particules .....</b>	<b>192</b>
<b>IV.2</b>	<b>Caractérisations de taille et structurale .....</b>	<b>193</b>
IV.2.1	Diffusion dynamique de la lumière.....	193
IV.2.2	Microscopie électronique en transmission.....	194
IV.2.3	Diffraction des rayons X sur poudre .....	195
<b>IV.3</b>	<b>Caractérisation chimique .....</b>	<b>197</b>
IV.3.1	Spectroscopie IR .....	197
IV.3.2	Analyse élémentaire et EDS.....	198
<b>IV.4</b>	<b>Réduction chimique.....</b>	<b>199</b>
IV.4.1	Caractérisation de taille et chimique .....	199
IV.4.2	Propriétés optiques .....	200
<b>IV.5</b>	<b>Bilan.....</b>	<b>201</b>
<b>V.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>202</b>
	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>207</b>
	<b>ANNEXES .....</b>	<b>211</b>



## TABLE DES ABREVIATIONS

Å : Angstrom	MHz : Méga hertz
ABP : Analogue du bleu de Prusse	Min : Minute
AE : Analyse élémentaire	MMCT : Metal-metal charge transfer
ALF: Artificial lysosomal fluid	MTT : Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
BdP : Bleu de Prusse	Nm: Nanomètre
CD : Cyclodextrine	NMRD : Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion
CFC : Cubique à faces centrées	NPs : Nanoparticules
CTA : Céthyltriméthyle ammonium	NTc : Nanotubes de carbone
DLS: Diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering en anglais)	PBS : Tampon phosphate salin ( phosphate buffered saline en anglais)
DOX : Doxorubicine	PEG : Polyéthylène glycol
DRX : Diffraction des rayons X	PTT : Hyperthermie photoassistée (PhotoThermal Therapy en anglaise)
EDS : Analyse dispersive en énergie	PVP : Polyvinylpyrrolidone
EPR : Enhanced permeability and retention	RMN : Résonance magnétique nucléaire
Eq : Equivalent	ROS : Espèce réactive de l'oxygène
FNS : Fibrose néphrogénique systémique	SVF : Sérum de veau fœtal
Gy : Grey	T <sub>Amb</sub> : Température ambiante
HAS : Albumine	TE : Tris-EDTA
ICP-OES : Inductively coupled plasma-Optical emission spectrometry	TEOS : TétraEthylOrthoSilicate
IR : infra-rouge	TEP : Tomographie à émission de positon
IRM : Imagerie par résonance magnétique	UV : Ultra-violet
IV : Intra-Veineuse	XPS : Spectrométrie photoélectronique X
LMCT : Ligand-metal charge transfer	ζ : Zéta (potentiel)
M : Molaire	
MEB : Microscopie électronique à balayage	
MET : Microscopie électronique en transmission	



## INTRODUCTION

Les nanoparticules sont des objets dont au moins l'une des dimensions est inférieure à une centaine de nanomètres. Bien que leur existence ait été intuitée depuis longtemps, le développement de techniques (Microscope à effet tunnel, Microscope électronique en transmission) permettant d'observer ces objets, dont la taille est inférieure à la longueur d'onde de la lumière visible, fût le déclencheur d'un intérêt croissant de la communauté scientifique pour les nanotechnologies. A l'échelle nanométrique, les propriétés physiques et chimiques sont différentes de celles déjà connues à l'échelle moléculaire ou macroscopique, donnant lieu à un champ d'exploration immense. Le contrôle de la taille, de la structure et de la composition chimique est un enjeu majeur pour l'exploitation de ces technologies. Les nanoparticules se sont avérées être intéressantes pour de nombreux domaines.

Dans le domaine médical, les nanoparticules permettent de combiner au sein d'un seul objet des fonctions aussi bien de diagnostic que de thérapie (dit de théranostic). Dans le but d'améliorer le confort des patients, la médecine du futur consistera à pouvoir suivre l'évolution des maladies, en particulier le cancer, tout en les traitant. Les nano-objets peuvent être modulés à souhait pour en faire des plateformes multimodales (IRM, TEP scan, tomographie) et pouvant associer plusieurs types de thérapies (chimiothérapie, radiothérapie, photothérapie). Ce défi pourra être relevé à travers de nombreuses années de recherche sur des systèmes très différents permettant d'acquérir de nombreuses connaissances. Des premiers résultats ont permis l'émergence de systèmes prometteurs. Actuellement, en France, deux études sur ce type d'objet ont conduit à des essais cliniques et à la création de start-up. La première, NHTherAguix®, a mis au point des nanoparticules (NPs) à base de silice et de gadolinium pour l'IRM et la radiothérapie. La seconde, Nanobiotix®, a développé des objets à base d'hafnium permettant d'augmenter les effets de la radiothérapie. Ces deux exemples sont encourageants pour poursuivre l'élaboration de nanoparticules pour la médecine de demain. De nombreux types de NPs intéressent la recherche (métalliques, poreuses, oxydes, réseaux de coordination, autoassemblages, etc).

Depuis plusieurs années, au laboratoire, un intérêt particulier est porté aux bleus de Prusse (BdP) et leurs analogues (ABP). L'étude de leurs propriétés magnétiques à l'échelle nanométrique a permis d'envisager leur utilisation pour des applications en tant qu'agents de contraste pour l'IRM. Ces réseaux présentent plusieurs avantages pour ce type d'application : grande proportion d'atomes en surface, rigidité de l'édifice liée à la tridimensionnalité de la structure, microporosité et grande versatilité chimique notamment. Le travail débuté au laboratoire depuis plus de 10 ans a permis de montrer que des analogues de BdP contenant du  $Mn^{II}$  et de  $In^{III}$  pouvait être de bons agents de contraste  $T_1$  pour l'IRM. Dans la littérature, l'intérêt pour les BdP et les ABP pour la nano-médecine s'est accru ces cinq dernières années démontrant leurs capacités à être des plateformes théranostiques. Une voie de synthèse simple, rapide et sans surfactant a été développée au laboratoire, conduisant à des nanoparticules de taille inférieure à 10 nm. La taille est un point important lorsque des objets à visée médicale sont mis au point car elle va conditionner la voie d'injection, la vitesse de déplacement dans la circulation sanguine ainsi que la voie d'élimination des nanoparticules. Afin d'obtenir des particules injectables à l'Homme, de nombreuses barrières doivent être franchies (comportements dans les milieux comme le sérum physiologique, le sérum sanguin, vis-à-vis des changements de pH, interaction avec les protéines, accumulation dans la zone visée, etc). Ces problématiques, en amont des études *in vivo*, seront au cœur de ce travail.



# CHAPITRE I : BIBLIOGRAPHIE

## I. L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est une technique d'imagerie médicale non invasive et non-radiative. Elle permet d'obtenir des images tridimensionnelles et en coupe avec une précision anatomique de l'ordre du millimètre. Comme le montre le tableau I-1, l'IRM dispose d'une importante résolution spatiale mais est limitée par sa sensibilité, qui est son principal désavantage. Cependant, cette technique reste l'une des mieux tolérées par les patients.

Modality	Spatial resolution	Dept	Temporal resolution	Sensitivity (mol/L)
PET	1-2 mm	No limit	10 s-min	$10^{-11}$ - $10^{-12}$
SPECT	0.5-1 mm	No limit	min	$10^{-10}$ - $10^{-11}$
MRI	25-100 $\mu$ m	No limit	min-h	$10^{-3}$ - $10^{-5}$
CT	50-200 $\mu$ m	No limit	min	$10^{-2}$ - $10^{-4}$
Ultrasound	50-500 $\mu$ m	mm-cm	s-min	$10^{-3}$ - $10^{-4}$

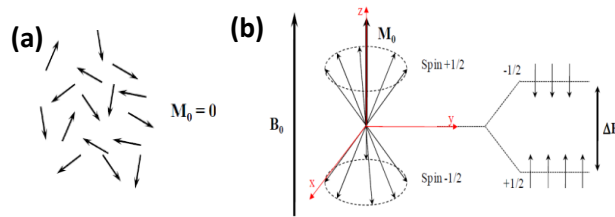
**Tableau I-1.** Résumé des différences entre les techniques d'imagerie ; PET : Tomographie à émission de positons, MRI : Imagerie par résonance magnétique, CT : Tomodensitométrie, SPECT : Tomographie d'émission monophotonique <sup>1</sup>

Elle est basée sur le principe de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Ce sont les protons de l'eau contenue dans l'organisme, qui, lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique extérieur et à une excitation électromagnétique, vont être à l'origine du contraste. En pratique clinique, des agents de contraste sont utilisés pour augmenter l'intensité du signal et la qualité des images. Ces agents peuvent également permettre de diminuer le temps d'acquisition. Ceci représente 30% des examens pratiqués.

### I.1 Principe de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

En 1938, le phénomène de résonance magnétique nucléaire a été mis en évidence par Rabi. Mais les mécanismes de la RMN ont été décrit par Bloch et Purcell quelques années plus tard. Le magnétisme mesuré en IRM n'est détectable que pour les noyaux possédant un nombre impair de protons. C'est le cas de l'atome d'hydrogène ( $^1\text{H}$ ) qui se retrouve dans l'organisme au niveau de l'eau, des liquides organiques et des graisses. Un résumé concis du principe de la RMN est décrit ci-dessous, afin de mieux comprendre l'IRM.

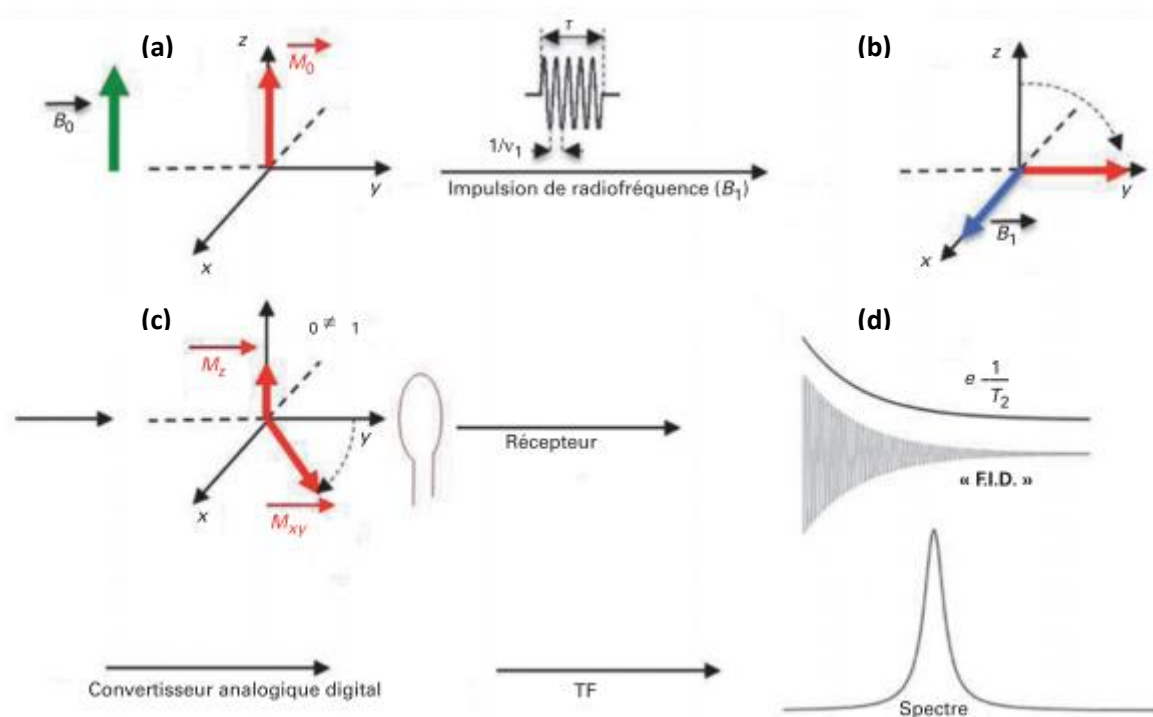
En l'absence de champ magnétique, chaque proton a une orientation différente conduisant à un moment magnétique propre. La somme totale de ces moments correspond à l'aimantation  $M_0$ , qui est nulle (*Fig.I-1(a)*). Lorsqu'un champ magnétique  $B_0$  est appliqué selon l'axe Oz, les moments magnétiques s'alignent selon ce champ et précessent autour de celui-ci à la fréquence de Larmor selon deux orientations (parallèle et antiparallèle) (*Fig.I-1(b)*). Les deux états de spin ont des énergies différentes ce qui donne lieu à une aimantation faible  $M_0$ .



**Figure I-1. (a)** Moments magnétiques nucléaires des noyaux d'atomes d'hydrogène sans orientation privilégiée donnant une aimantation résultante  $M_0$  nulle ; **(b)** Moments magnétiques nucléaires alignés avec le champ magnétique  $B_0$  selon l'axe Oz

Une impulsion radiofréquence  $B_1$  perpendiculaire à  $B_0$  est appliquée. Les spins basculent alors dans le plan xy, permettant la mesure d'une aimantation  $M$  dans ce plan. Ainsi, selon l'axe Oz, l'aimantation sera nulle.

Après arrêt de l'impulsion  $B_1$ , le système tend à retourner à son état d'équilibre en décrivant un mouvement hélicoïdal. La composante longitudinale de l'aimantation selon l'axe Oz va alors augmenter et la composante transversale dans le plan xy va décroître jusqu'à s'annuler. Cette décroissance se traduit par une onde électromagnétique qui, grâce à une transformée de Fourier, donnera un spectre.



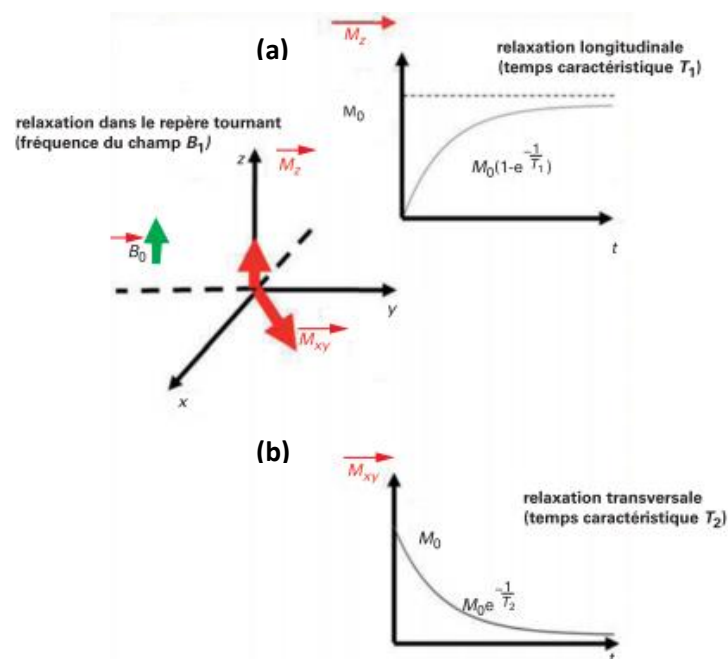
**Figure I-2. (a)** Moments magnétiques nucléaires alignés avec le champ magnétique  $B_0$  selon l'axe Oz ; **(b)** Application de  $B_1$ , Basculement de l'aimantation  $M_0$  selon le plan xy ; **(c)** Retour à l'état d'équilibre de l'aimantation  $M$  ; **(d)** Transformation du signal pour obtenir un spectre<sup>2</sup>

La relaxation de l'aimantation  $M$  est généralement décrite selon deux composantes : la composante longitudinale ( $M_z$ ) et la composante transversale ( $M_{xy}$ ). Celles-ci peuvent être considérées séparément. Le temps de relaxation de chacune des composantes,  $T_1$  et  $T_2$  respectivement, correspond au temps nécessaire pour que chacune des composantes du spin nucléaire retourne à son état d'équilibre.



La relaxation longitudinale suit une loi de croissance exponentielle correspondant au retour à l'équilibre de l'aimantation selon l'axe Oz (Fig. I-3.(a)). Cette augmentation s'explique par la désexcitation des moments magnétiques nucléaires individuels qui cherchent à repeupler l'état fondamental. Ce repeuplement s'accompagne d'une émission d'énergie non radiative. Au contraire, la relaxation transversale suit une loi exponentielle décroissante décrivant la perte d'aimantation selon le plan xy (Fig. I-3.(b)).

Le temps de relaxation longitudinale  $T_1$  est défini comme le temps nécessaire pour que les spins nucléaires selon la composante longitudinale de l'aimantation  $M_z$  soit égale à 63% de l'aimantation  $M_0$ . Le temps de relaxation transversale  $T_2$  est défini comme le temps nécessaire pour que les spins nucléaires selon la composante transversale de l'aimantation  $M_{xy}$  soit égale à 37% de l'aimantation  $M_0$ . Expérimentalement, ce sont ces temps de relaxation qui sont mesurés et qui vont être influencés par plusieurs paramètres tels que l'environnement du proton, la température ou encore la viscosité.

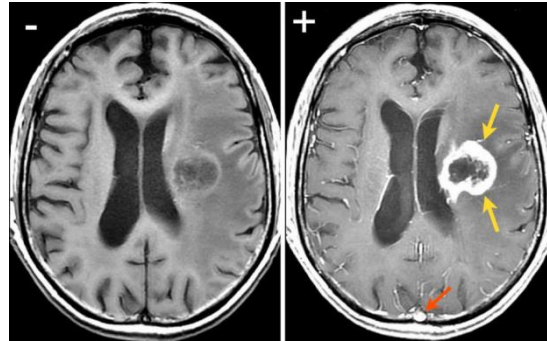


**Figure I-3. (a)** Loi de croissance exponentielle de la relaxation longitudinale; **(b)** Loi de décroissance exponentielle de la relaxation transversale <sup>2</sup>

Pour obtenir une image, il est nécessaire de créer un codage de l'espace. En IRM, ce codage s'effectue en donnant une valeur différente au champ magnétique statique en chaque point de l'espace. Pour y parvenir, un gradient de champ peut être appliqué selon l'axe choisi. Ainsi en appliquant trois gradients, l'espace peut être encodé en trois dimensions. La position d'un proton dans l'espace pourra être déterminée grâce à une fréquence de résonance caractéristique de sa position. En choisissant une bande de fréquence, grâce à une impulsion radiofréquence sélective, une tranche de l'espace pourra être sélectionnée. L'application d'une double transformée de Fourier sur la tranche sélectionnée conduira à l'obtention d'une image.

L'IRM est une technique d'imagerie médicale dotée d'une excellente résolution spatiale, mais qui n'est pas assez sensible dans certaines zones telle que le tractus gastro-intestinal ou le cerveau.

Les modifications hydriques liées à la présence de lésions ne sont pas suffisantes pour la détection de certaines pathologies. Pour augmenter le signal et accroître le contraste, un temps d'acquisition long est alors nécessaire. L'utilisation d'un agent de contraste est une autre façon d'améliorer efficacement le signal IRM. Ces agents de contrastes sont des espèces magnétiques susceptibles d'engendrer un champ local qui peut interagir avec le moment nucléaire tout en accélérant les relaxations longitudinales et transversales. Les tissus lésés possédant une teneur en eau plus élevée, un agent de contraste permet une meilleure détection et une diminution du temps d'acquisition.



**Figure I-4.** Clichés IRM du cerveau enregistrés sans agent de contraste (-) et avec agent de contraste (+). La flèche rouge représente un vaisseau sanguin normal alors que les flèches jaunes montrent la présence d'une tumeur

## 1.2 Théorie de la relaxivité

### 1.2.1 La relaxivité

Les agents de contraste peuvent être de deux types selon qu'ils affectent la composante longitudinale, agent  $T_1$ , ou la composante transversale, agent  $T_2$ . L'efficacité d'un agent de contraste s'évalue à travers une grandeur appelée relaxivité, notée  $r_i$  (où  $i=1$  ou  $2$ ). La relaxivité est liée au temps de relaxation mesuré,  $T_{i(obs)}$ , selon la formule suivante<sup>34</sup> :

$$\left(\frac{1}{T_i}\right)_{obs} = \left(\frac{1}{T_i}\right)_{dia} + r_i [M^{n+}] \quad (1)$$

Avec  $T_{i(dia)}$  le temps de relaxation des spins nucléaires avant l'ajout de l'agent de contraste et  $[M^{n+}]$  la concentration en ions paramagnétiques dans le milieu suite à l'ajout de l'agent de contraste.

D'après l'équation (1), la relaxivité est inversement proportionnelle au temps de relaxation du moment magnétique nucléaire du proton de l'eau mesuré. L'agent de contraste va donc accélérer la relaxation du spin conduisant à une augmentation de la relaxivité et donc du contraste. Les agents de contraste  $T_1$  (ou positifs) diminueront le temps de relaxation longitudinale et conduiront à un contraste blanc et plus brillant. Ce sont des entités paramagnétiques comme des complexes de gadolinium. Au contraire, les agents  $T_2$  (ou négatifs) diminueront le temps de relaxation transversal et auront un contraste noir, rendant le diagnostic plus compliqué. Les agents  $T_2$  sont des objets superparamagnétiques (oxyde de fer). Plus la relaxivité sera élevée, plus l'agent de contraste sera efficace. Cependant, la valeur de relaxivité dépend de nombreux paramètres intrinsèques à la structure de l'agent mais aussi des mécanismes mis en jeu lors de la relaxation nucléaire du proton de l'eau.

### 1.2.2 La théorie de Solomon, Bloembergen et Morgan

Dans les années 60, Solomon, Bloembergen et Morgan, ont décrit une théorie générale concernant la relaxation nucléaire en présence d'une substance paramagnétique à proximité des protons de l'eau<sup>5,6</sup>. Selon cette théorie, ces entités paramagnétiques induisent une augmentation de la relaxivité longitudinale et transversale,  $R_1$  et  $R_2$ , en diminuant les temps de relaxation des moments magnétiques nucléaires des protons de l'eau,  $T_1$  et  $T_2$ . Cette diminution des temps de relaxation longitudinale et transversale s'explique par des interactions de type dipôle-dipôle entre les spins nucléaires des protons de l'eau et le champ magnétique local fluctuant engendré par les moments magnétiques des électrons non appariés de l'espèce paramagnétique. Ce champ magnétique local créé au voisinage du centre métallique décroît rapidement avec la distance métal-proton de l'eau.

Cette relaxation paramagnétique des spins nucléaires des protons de l'eau en présence d'un composé paramagnétique met en jeu trois mécanismes : la relaxation par sphère interne (SI), par sphère externe (SE) et la relaxation de la seconde sphère (SS). Ces trois mécanismes dépendent de l'interaction dipolaire métal-proton et donc de la distance entre le centre métallique et les molécules d'eau, comme montré sur la figure I-5.

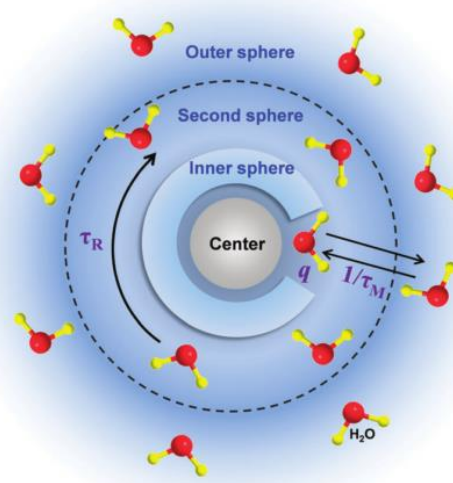


Figure I-5. Mécanismes de sphère interne, sphère secondaire et sphère externe mis en jeu dans la relaxation paramagnétique<sup>7</sup>

Dans la première sphère de coordination du métal se trouvent les molécules d'eau liées par liaison de coordination au métal. Celles-ci sont en échange avec les molécules du solvant et sont à l'origine du phénomène de relaxation par sphère interne (SI). La seconde sphère de coordination est constituée de molécules d'eau en échange rapide avec le solvant. Ces molécules sont liées par des liaisons hydrogènes aux molécules de la première sphère de coordination ou aux atomes électronégatifs du chélatant du centre métallique. Ce sont ces molécules d'eau qui sont à l'origine la relaxation par la seconde sphère de coordination (SS). La relaxation par sphère externe (SE) est caractérisée par la diffusion des molécules d'eau à proximité du complexe.

Ainsi, la relaxivité paramagnétique totale correspond à la somme de ces trois effets.

### 1.2.3 Mécanisme par sphère interne

Le mécanisme de relaxation mettant en jeu la sphère interne résulte d'un échange chimique entre les protons des molécules d'eau coordonnées au métal et les molécules d'eau du solvant. Les relaxations longitudinales et transversales s'expriment alors comme ci-dessous<sup>4</sup> :

$$\frac{1}{T_1^{IS}} = \frac{qP_m}{T_{1m} + \tau_m} \quad (2)$$

$$\frac{1}{T_2^{IS}} = \frac{qP_m T_{2m}^{-2} + \tau_m^{-1} T_{2m}^{-1} + \Delta\omega_m^2}{\tau_m (\tau_m^{-1} + T_{2m}^{-1})^2 + \Delta\omega_m^2} \quad (3)$$

Avec  $P_m$  la fraction molaire de molécules d'eau coordonnées ;  $q$  le nombre de molécules d'eau coordonnée par ion métallique ;  $T_{1m}$  et  $T_{2m}$  les temps de relaxation longitudinale et transversale des protons de l'eau coordonnées (en l'absence d'échange) ;  $\tau_m$  ( $k_{ex}^{-1}$ ) le temps de résidence de l'eau coordonnée ;  $\Delta\omega_m$  la différence de déplacement chimique entre l'eau coordonnée et l'eau dans le solvant.

Les expressions de  $T_{1m}$  et  $T_{2m}$  décrites par Solomon, Bloembergen et Morgan dépendent de deux mécanismes :

- Mécanisme scalaire ou contact (SC) : interaction entre la densité électronique et la densité nucléaire du noyau
- Mécanisme dipôle-dipôle (DD) : interaction électron/proton en dehors du noyau.

$$\frac{1}{T_{im}} = \frac{1}{T_i^{DD}} + \frac{1}{T_i^{SC}} \quad i = 1,2 \quad (4)$$

La contribution dipolaire est fonction de l'orientation du moment nucléaire relativement au moment électronique, et est modulée par tous les phénomènes qui peuvent modifier cette orientation : temps de relaxation électronique, temps de rotation de l'édifice, échange de la molécule d'eau coordonnée à l'espèce paramagnétique et le solvant. La contribution scalaire est soumise aux mêmes influences, excepté la rotation de l'édifice.

$$\frac{1}{T_{1M}} = \frac{2}{15} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \gamma_H^2 \gamma_S^2 \hbar^2 S(S+1) \frac{1}{r^6} \left[ \frac{7\tau_{c2}}{1 + (\omega_s \tau_{c2})^2} + \frac{3\tau_{c1}}{1 + (\omega_H \tau_{c1})^2} \right] \quad (5)$$

$$\frac{1}{T_{2M}} = \frac{1}{15} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \gamma_H^2 \gamma_S^2 \hbar^2 S(S+1) \frac{1}{r^6} \left[ 4\tau_{c1} + \frac{13\tau_{c2}}{1 + (\omega_s \tau_{c2})^2} + \frac{3\tau_{c1}}{1 + (\omega_H \tau_{c1})^2} \right] \quad (6)$$

Avec  $\mu_0$  la perméabilité du vide ;  $\gamma_H$  et  $\gamma_S$  le rapport gyromagnétique du proton et de l'électron, respectivement ;  $\hbar$  la constante de Planck ;  $S$  le spin électronique du cation paramagnétique ;  $r$  la distance entre les protons des molécules d'eau dans la première sphère de coordination du métal et les électrons non appariés du métal ;

$\omega_H$  et  $\omega_S$  respectivement les fréquences de précession de Larmor du proton et de l'électron et  $\tau_{ci}$  ( $i = 1$  ou  $2$ ) correspond au temps de corrélation global caractérisant la relaxation dipolaire tel que :

$$\frac{1}{\tau_{ci}} = \frac{1}{\tau_{si}} + \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{\tau_r} \quad i = 1,2 \quad (7)$$

Avec  $\tau_R$  le temps de corrélation rotationnel du complexe hydraté,  $\tau_M$  le temps de résidence des molécules d'eau coordonnées au métal et  $T_{ie}$  ( $i = 1$  ou  $2$ ) le temps de relaxation (longitudinale ou transversale) des spins électroniques du cation paramagnétique.

Les paramètres influençant la relaxivité vont varier en fonction du champ appliqué. Dans le cadre d'une application en IRM, les principaux paramètres gouvernant la relaxivité sont : le nombre de molécules d'eau dans la sphère de coordination du métal ( $q$ ), le temps de relaxation des spins électroniques ( $\tau_{si}$ ), le temps de corrélation rotationnel du complexe ( $\tau_r$ ) et le temps d'échange des molécules d'eau dans la sphère de coordination du métal ( $\tau_M$ ). La relaxivité sera limitée par le plus court de ces trois temps. En général, le temps de corrélation rotationnel est le plus court et est à l'origine des faibles valeurs de relaxivités des agents de contraste clinique  $T_1$ .

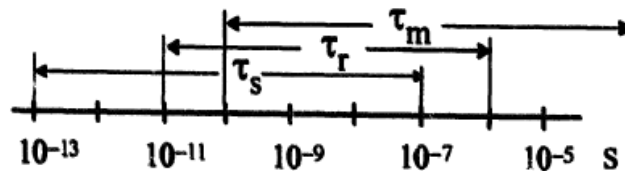


Figure I-6. Valeurs caractéristique des temps de relaxation électronique, de corrélation rotationnel et d'échange de molécules d'eau<sup>8</sup>

#### 1.2.4 Mécanisme de la seconde sphère et de la sphère externe

Le mécanisme de la seconde sphère de coordination peut également être décrit par les équations de Solomon, Bloembergen et Morgan. Cette contribution concerne les molécules d'eau qui ne sont pas directement coordonnées au cation paramagnétique et qui s'organisent dans la seconde sphère de coordination. La relaxation de la sphère externe a été décrite par Freed comme étant une interaction dipolaire à longue distance entre le spin électronique du centre paramagnétique et le spin nucléaire des protons de l'eau contenus dans le solvant. Le temps de corrélation translationnel ( $\tau_D$ ) caractérise ce mécanisme et s'exprime selon l'équation (9) :

$$\tau_D = \frac{d^2}{D_H + D_S} = \frac{d^2}{D} \quad (8)$$

Avec  $d$ , la distance d'approche du proton de la molécule d'eau et des électrons non appariés du métal ;  $D_H$ ,  $D_S$  et  $D$ , les coefficients de diffusion de l'eau, du centre paramagnétique et du milieu, respectivement.

La contribution de la sphère externe est indépendante de la taille de l'édifice contrairement à la contribution de la sphère interne. Ainsi, lorsque les objets sont de grandes tailles, la participation de la sphère externe à la relaxivité est négligeable devant celle de la sphère interne.

## 1.2.5 Paramètres influençant la relaxivité

### 1.2.5.1 Le nombre d'hydratation ( $q$ )

D'après l'équation (2), la relaxivité est directement proportionnelle au nombre de molécules d'eau coordonnées au métal.

Plus la valeur de  $q$  est élevée, meilleure sera l'efficacité de l'agent de contraste. Le degré d'hydratation d'un complexe de  $Gd^{III}$  dépend de la denticité du ligand chélate. En modifiant la denticité du ligand, il est envisageable d'augmenter le nombre de molécules d'eau coordonnées et donc d'améliorer la relaxivité.

Une diminution de la denticité du ligand chélatant peut s'accompagner d'une perte de la stabilité thermodynamique et/ou cinétique du complexe. Dans ce cas, il pourrait y avoir des ions  $Gd^{3+}$  libres conduisant à une augmentation de la toxicité. De plus, dans un milieu biologique, les deux molécules d'eau coordonnées au métal pourraient être remplacées par des anions endogènes tel que le carbonate, le citrate, etc. ... Il y aurait alors une perte des propriétés de relaxivité du complexe, puisqu'il n'y aurait plus de molécules d'eau directement coordonnées au métal. Jusqu'à présent, la stabilité *in vivo* des complexes de  $Gd^{III}$  contenant plus d'une molécule d'eau dans leur sphère de coordination reste problématique pour des applications cliniques.

### 1.2.5.2 La distance métal-proton ( $r$ )

Ce paramètre présente une grande influence sur la relaxivité. En effet, d'après les équations (5) et (6), une faible diminution de  $r$  peut entraîner une nette augmentation de la relaxivité. Des calculs théoriques ont montré qu'une diminution de 0,1 Å de la distance métal-proton conduirait à une augmentation de 20% de la relaxivité.

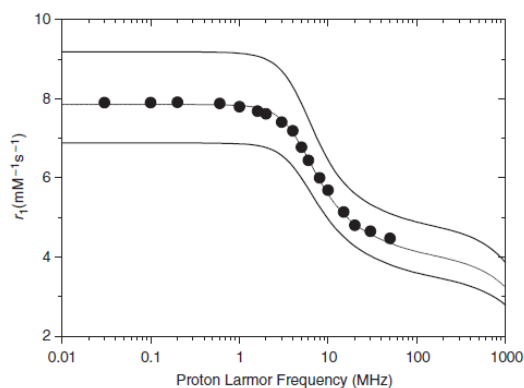


Figure I-7. Profil NMRD ( $^1H$ ) du  $[GdDTPA(H_2O)]_2$  ( $r=0,31nm$ ) et courbes simulées pour  $r=0,295nm$  (courbe inférieure) et pour  $r=0,325 nm$  (courbe supérieure)<sup>9</sup>

Bien que difficile à estimer, il a été montré que la distance métal-proton se situe toujours autour de  $0,31 \pm 0,01$  nm. Certaines études visent à optimiser ce paramètre en jouant sur la nature et l'encombrement du ligand polydente mais c'est un élément difficile à contrôler.

#### 1.2.5.3 Le temps d'échange des molécules d'eau ( $\tau_M$ )

La vitesse d'échange des molécules d'eau de la sphère interne avec celles du solvant est définie comme l'inverse du temps de résidence de la molécule d'eau dans la première sphère de coordination. Plus la vitesse d'échange est rapide, plus le temps de résidence est court et meilleure sera la relaxivité.

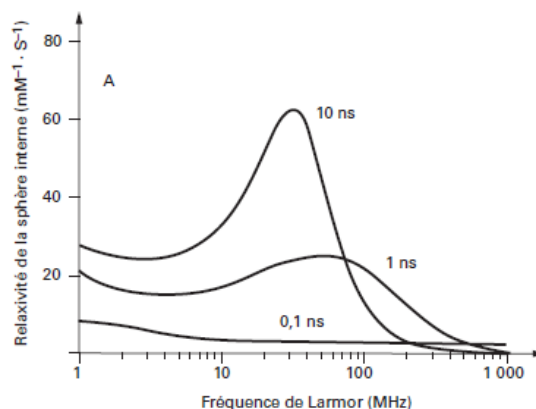
Cet échange rapide est un paramètre essentiel puisqu'il permet de propager le phénomène de relaxation nucléaire vers les molécules d'eau du solvant. L'échange doit être rapide pour qu'un maximum de molécules soit affecté. Cependant, un échange trop rapide peut avoir un effet négatif car le contact entre le spin nucléaire du proton et le spin électronique du métal est trop court, conduisant à une diminution de la relaxivité.

Le temps de résidence de la molécule d'eau dans la sphère pour une efficacité optimale se situe entre 10 et 100 nanosecondes. Swift et Connick ont montré que la vitesse d'échange des molécules d'eau pouvait être déduite de la mesure de la vitesse de relaxation transversale de  $^{17}\text{O}$  sur des solutions diluées à base d'ions paramagnétiques<sup>4</sup>. Ce paramètre a été étudié sur une large gamme de complexes de  $\text{Gd}^{\text{III}}$ . La masse moléculaire des composés va jouer un rôle dans l'influence de  $\tau_M$  sur la relaxivité. Pour des complexes de faible masse moléculaire, une valeur de  $\tau_M$  inférieure à 500 ns n'est pas limitante pour la relaxivité dans la gamme de champ magnétique utilisée en IRM. En revanche, pour des complexes de forte masse moléculaire,  $\tau_M$  doit être inférieure à 40 ns pour conserver la propagation de la relaxation nucléaire des protons de l'eau<sup>4</sup>.

#### 1.2.5.4 Le temps de corrélation rotationnel ( $\tau_R$ )

La théorie de la relaxation nucléaire prévoit que plus  $\tau_R$  est élevé meilleure sera la relaxivité. Ce paramètre est l'un des plus simple à optimiser puisqu'il suffit d'augmenter la masse moléculaire de l'objet afin de ralentir la précession de l'objet sur lui-même et donc d'allonger  $\tau_R$ .

La variation de la relaxivité longitudinale  $r_1$  calculée (contribution dipolaire) en fonction de la fréquence de Larmor, en considérant différentes valeurs de  $\tau_R$  et en utilisant des valeurs caractéristiques des complexes polyaminocarboxylates de  $\text{Gd}^{\text{III}}$  pour les autres paramètres (*Fig.1-8*), montre qu'en diminuant la mobilité de l'édifice, il est possible d'atteindre des valeurs élevées avec les champs utilisés en IRM. En effet, le temps de rotation n'est plus le temps de corrélation dominant dans l'équation (7) lorsqu'il devient supérieur aux autres temps de corrélation (électronique et/ou échange). Naturellement, il existe une limite supérieure, au-delà de laquelle l'allongement de ce temps n'a plus d'effet. Ainsi, avec les paramètres choisis dans cette simulation, une augmentation de  $\tau_R$  au-delà de 10 ns n'influe plus sur la relaxivité car  $T_{1e}$  et/ou  $\tau_M$  deviennent les éléments limitants.



**Figure I-8 :** Relaxivité  $r_1$  de la sphère interne calculée en fonction de la fréquence de Larmor pour différentes valeurs de  $\tau_r$ , selon la théorie SBM (contribution dipolaire uniquement)<sup>2</sup>

Le temps de corrélation rotationnel peut être estimé par la relation de Debye-Stokes, en considérant un édifice sphérique de rayon  $a$  (m), de masse molaire  $M$  ( $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) et de densité  $d$  ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) évoluant dans un milieu de viscosité  $\eta$  ( $\text{kg}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$ ).

$$\tau_r = \frac{4\pi a^3 \eta}{3kT} = \frac{\eta M}{d N_a kT} \quad (9)$$

Ainsi, une modification de la viscosité du milieu et de la taille de l'édifice conduit à une variation de ce temps. La viscosité n'est pas un paramètre contrôlable mais il faut malgré tout en tenir compte pour des applications *in vivo*.

$\tau_r$  peut être déterminé par mesure de la relaxation longitudinale de  $^{17}\text{O}$  dans les molécules d'eau.

De nombreuses recherches menées autour des agents de contraste cherchent à augmenter la taille des objets contenant l'ion paramagnétique. Pour cela, plusieurs stratégies sont possibles :

- Modification du ligand chélatant pour atteindre des masses molaires plus importantes
- Incorporation des complexes dans des édifices macromoléculaires tels que des polymères, des protéines, des polysaccharides, des liposomes, des micelles, des nanoparticules, etc...
- Insertion d'ions paramagnétiques dans des structures nanométriques

Différents travaux utilisant ces méthodes seront décrits par la suite.

Il est également important de préciser que le temps de relaxation électronique peut avoir une influence sur la relaxivité. Il peut être limitant c'est pourquoi l'intérêt s'est porté sur le  $\text{Mn}^{\text{II}}$  et le  $\text{Gd}^{\text{III}}$ . Cependant, aux champs magnétiques utilisés en IRM, celui-ci devient généralement négligeable.



### I.3 Les agents de contraste

Dans cette partie, nous étudierons de manière non exhaustive les agents de contraste actuellement développés. Dans un premier temps, nous allons nous intéresser aux agents de contraste cliniques.

#### I.3.1 Les agents de contraste commerciaux

##### I.3.1.1 Agents $T_1$

Les agents de contraste utilisés actuellement pour des analyses IRM sont dans 95% des cas des complexes moléculaires de  $Gd^{III}$ . Il est un élément de choix grâce à un spin électronique élevé ( $S=7/2$ ) et une relaxation électronique lente ( $10^{-8}$ - $10^{-9}$ s)<sup>8</sup>. Actuellement, moins d'une dizaine de complexe ont été approuvés et mis sur le marché (Tableau I.2.). Sous sa forme libre, l'ion  $Gd^{3+}$  est toxique : à pH physiologique, il forme des hydroxydes ( $[Gd(OH)_3]$ ) insoluble qui se déposent sur les os et certains organes. Il peut aussi interagir avec les protéines du sérum en se liant aux groupes donneurs de celles-ci et peut également se substituer au  $Ca^{2+}$  (leurs rayons ioniques sont très proches) ce qui bloque la transmission neuromusculaire. L'utilisation de ligand organique permet d'immobiliser l'ion métallique et de former des complexes stables thermodynamiquement et inertes cinétiquement. Il existe deux types de ligands qui se différencient par leurs structures : les ligands polyaminocarboxylates macrocyclique (DOTA) et les ligands polyaminocarboxylates linéaire (DTPA).

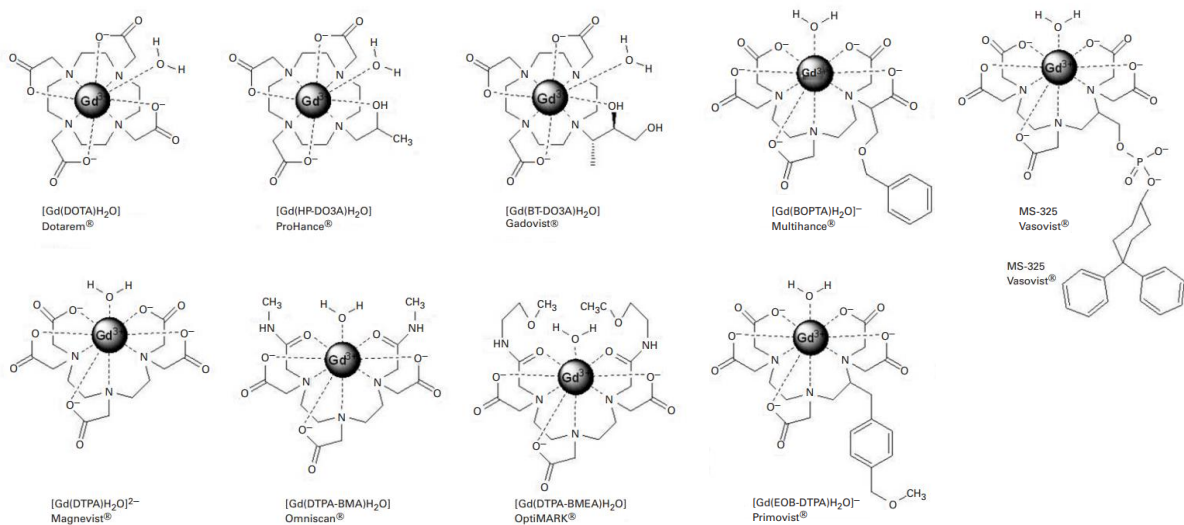


Figure I-9. Agents de contraste commerciaux basés sur des complexes de  $Gd^{III,2}$

La plupart des complexes de  $Gd^{III}$  sont non spécifiques et diffusent rapidement dans le milieu extracellulaire. Les doses à injecter sont alors très importantes ( $0,2 \text{ mL.kg}^{-1}$  d'une solution commerciale à  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ). Deux types de complexes ont été mis au point en modifiant soit la lipophilie du ligand soit les groupements fonctionnels, les rendant ainsi capable de se lier à l'albumine. Le tableau I.2 regroupe les caractéristiques des agents de contraste commerciaux de  $Gd^{III}$ .

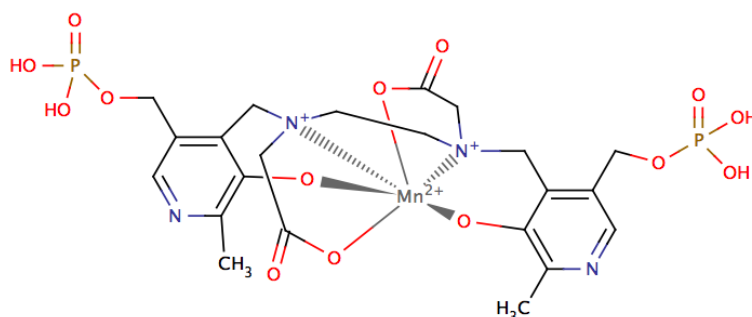
Nom	Laboratoire	Formule chimique	Biodistribution	Relaxivité $r_1$ (L · mmol <sup>-1</sup> · s <sup>-1</sup> )
Dotarem®	Guerbet	[Gd(DOTA)H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	Extracellulaire	4,2
Prohance®	Bracco	[Gd(HP-DO3A)H <sub>2</sub> O]		4,4
Gadovist®	BayerSchering	[Gd(BT-DO3A)H <sub>2</sub> O]		5,3
Magnevist®	BayerSchering	[Gd(DTPA)H <sub>2</sub> O] <sup>2-</sup>		4,3
Omniscan®	Amersham	[Gd(DTPA-BMA)H <sub>2</sub> O]		4,6
OptiMARK®	Mallinckrodt	[Gd(DTPA-BMEA)H <sub>2</sub> O]	Hépatobiliaire/ extracellulaire	5,6
Multihance®	Bracco	[Gd(BOPTA)H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>		6,7
Primovist®	BayerSchering	[Gd(EOB-DTPA)H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	Hépatobiliaire	7,3
Vasovist®	EPIX/Schering	MS-325	Vasculaire	19

**Tableau I.2.** Principaux agents de contraste T<sub>1</sub> commerciaux et leur relaxivité à 20 MHz<sup>2</sup>

Certains des complexes présentés ci-dessus ont été déclarés par l'OMS comme à risque pour des personnes souffrant d'insuffisance rénale. En effet, depuis 2006, il a été montré que ces patients pouvaient développer des fibroses néphrogéniques systémiques (FNS). Ainsi, de nombreux patients ayant reçu du Gd-DTPA ont développé des FNS conduisant à l'arrêt de sa commercialisation en 2018. Au contraire, le Dotarem® présente peu de risque (un seul cas a été reporté) permettant une large utilisation lors des examens IRM<sup>10</sup>.

En 1989, Rocklage et al. ont décrit la synthèse d'un complexe de Mn<sup>II</sup> avec un ligand hexadentate dérivé de l'EDTA. Le manganèse ayant un spin S=5/2 et une relaxation électronique relativement lente, c'est un élément de choix pour des applications en tant qu'agent de contraste T<sub>1</sub>. Ce complexe, Mn<sup>II</sup>DPDP, a été approuvé par la FDA et est aujourd'hui le seul agent de contraste à base de Mn<sup>II</sup> à avoir été utilisé en clinique. Cet agent est administré par voie intraveineuse et est utilisé pour l'imagerie du foie.

Bien qu'aucune molécule d'eau ne soit coordonnée au métal (Fig.I-10), cet agent augmente considérablement l'intensité du signal et sa relaxivité longitudinale est de 2,8 mM.s<sup>-1</sup> à 20 MHz et 40°C<sup>11</sup>.



**Figure I.10.** Structure chimique du Mn-DPDP (Teslascan®)

D'un point de vue général, les performances des agents de contraste ont une marge de progression très importante car la théorie prévoit d'atteindre des valeurs de relaxivité de 100 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>. Tous les agents présentés dans le tableau I.2 ont une seule molécule d'eau dans leur sphère de coordination et sont en coordinance 9. La vitesse d'échange des molécules d'eau est faible et pourrait être améliorée en modifiant la structure du ligand (encombrement stérique). De la même manière, ces objets ont un faible poids moléculaire et leur relaxivité est donc limitée par le temps de corrélation rotationnel.

### I.3.1.2 Agents T<sub>2</sub>

Les agents de contraste T<sub>2</sub> sont principalement des nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Elles sont particulièrement intéressantes pour une application IRM. Ces particules possèdent une susceptibilité magnétique supérieure aux agents paramagnétiques et un nombre plus important d'atomes paramagnétiques favorisant leur efficacité. Ce type d'agent de contraste peut être classé selon leur taille :

- SPIO (Super Paramagnetic Iron Oxyde) : particules de taille comprise entre 60 et 250 nm. Pour des particules dont le diamètre serait supérieur à 150 nm, la voie d'administration sera préférentiellement orale,
- USPIO (Ultrasmall Super Paramagnetic Iron Oxyde) : particules de taille comprise entre 20 et 50 nm,
- MPIO (Micro-sized Iron Oxyde Particles) : particules de taille supérieure à 300 nm.

Ces particules doivent être enrobées afin d'être administrées aux patients. Sans enrobage, ces objets sont instables en milieu biologique et ont tendance à s'agréger. Le dextran est l'enrobage privilégié des agents commerciaux actuels : c'est un polymère biocompatible constitué de groupements polysaccharides. La fonctionnalisation de surface est un paramètre variable.

En effet, d'autres enrobages pourraient être utilisés de type acide citrique, acide aminé ou encore PVP, PEG, pour davantage améliorer la sensibilité du signal. Le tableau I-3 décrit les agents T<sub>2</sub> commerciaux avec leurs valeurs de relaxivité. Seul le Lumirem® est utilisé, actuellement, en clinique. La biodistribution de ces agents est dépendante de leur taille, leur fonctionnalisation et leur mode d'administration. Ce dernier élément est explicité dans le tableau ci-dessous.

Nom commercial	Laboratoire	Diamètre hydrodynamique (nm)	Type de particules	Biodistribution	Relaxivité r <sub>2</sub> (L·mmol <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> )
Lumirem®	Guerbet	300	SPIO	Gastro-intestinale	3,8
Endorem®	Guerbet	80-150	SPIO	Foie	107
Resovist®	Schering	62	SPIO	Foie	197
Sinerem®	Guerbet	20-40	USPIO	Ganglions lymphatiques	53,1

Tableau I-3. Agents de contraste commerciaux à base d'oxyde de fer<sup>2</sup>

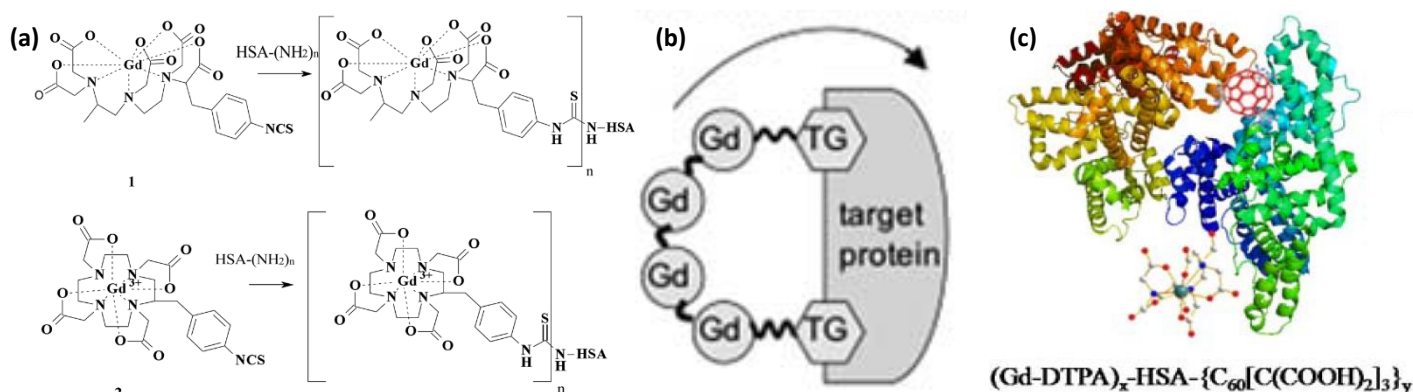
Pour surmonter les limitations des agents de contraste actuels, mais aussi répondre aux exigences de la théorie, de nombreuses stratégies ont été développées. Quelques exemples de systèmes seront présentés ci-dessous. Nous nous concentrerons sur les études concernant les agents T<sub>1</sub>.

### ***1.3.2 Stratégies pour améliorer la relaxivité des complexes moléculaires***

#### ***1.3.2.1 A base de Gd<sup>III</sup>***

L'ion gadolinium III est un élément de choix pour des applications en IRM. Pour améliorer les performances des agents cliniques, différentes stratégies peuvent être envisagées. Tout d'abord, une fonctionnalisation par des dérivés de polymères naturels tels que les protéines garantissant une biodégradabilité mais aussi une biocompatibilité des agents de contraste. L'albumine (HSA) est souvent utilisée car elle présente une affinité particulière pour les tumeurs<sup>12</sup>.

Elle est très abondante dans le corps humain et est une protéine amphiphile. Nwe et al. ont fonctionnalisé avec de l'albumine le Gd-DTPA et le Gd-DOTAREM (Fig.1.11.(a))<sup>13</sup>. Les auteurs ont testé deux voies de synthèses (pré ou post métallation) ; les valeurs de relaxivité sont nettement améliorées par rapport aux complexes seuls montrant l'effet positif de l'albumine quelle que soit la méthode de synthèse envisagée (Tableau I.4). Des tests *in vivo* montrent une élimination plus rapide de ces objets uniquement au niveau de la veine jugulaire. Ces systèmes ont un long temps de rétention dans l'organisme permettant un suivi à des temps long. Cependant, la flexibilité de la chaîne reliant le chélate de Gd<sup>III</sup> à l'albumine entraîne un important degré de rotation autour du Gd<sup>III</sup> limitant ainsi la relaxivité.



**Figure I-11.** (a) Schémas de synthèse 1-Gd-DTPA, 2-Gd-DOTAREM<sup>13</sup> ; (b) Représentation schématique de l'accrochage multi-site du tétramère de Gd<sup>III</sup> conjugué à une protéine cible<sup>14</sup> ; (c) Représentation 3D de la structure (Gd-DTPA)<sub>x</sub>-HSA- $\{C_{60}[C(COOH)_2]_3\}_y$ .

Pour pallier à ce problème, Zhang et al. avaient proposé d'associer des tétramères de Gd<sup>III</sup> à la protéine via deux points d'ancrage (Fig.1-11.(b)) et ainsi rigidifier d'avantage la structure. Une augmentation de 30% de la relaxivité a été obtenue par ce procédé ( $r_1 > 20 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ).

L'association du Gd-DTPA et de l'albumine (Gd-DTPA/HSA) avec un carboxylfullène  $C_{60}$  a été étudiée par Zhen et al.<sup>15</sup>. À 20MHz et 300K, ce système présente une relaxivité améliorée dans l'eau (Tableau I.4). Ceci s'explique par la synergie entre le HSA et le  $C_{60}$ .

	$r_1 \text{ (mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	Fréquence (MHz)	Fonctionnalisation	Référence
<b>Gd-DTPA</b>	4	20		13
<b>HSA-1B4Mpost</b>	8,8	20	HSA	13
<b>HSA-1B4Mpré</b>	9,7	20	HSA	13
<b>HSA-DOTA</b>	10,4	20	HSA	13
<b>MS-325</b>	23,9	20	HSA+ 2 accroches	14
<b>Gd-DTPA/HSA/<math>C_{60}</math></b>	86	20	HSA+ $C_{60}$	15

**Tableau I-4.** Valeurs de relaxivité des complexes de Gd<sup>III</sup> associés à l'albumine

D'autres adduits moléculaires ont été développés en greffant des dérivés d'acides aminés permettant ainsi de cibler des récepteurs de tumeurs spécifiques comme l'hépatocarcinome<sup>16</sup>. L'utilisation de polysaccharide tel que le dextran ou le chitosan a été vivement explorée. En effet, le dextran peut se lier covalamment au ligand DTPA. La présence de polymère permet une augmentation du temps de corrélation rotationnel et donc de la relaxivité mais un taux d'enrobage maximum existe à partir duquel l'effet inverse est observé<sup>17</sup>.

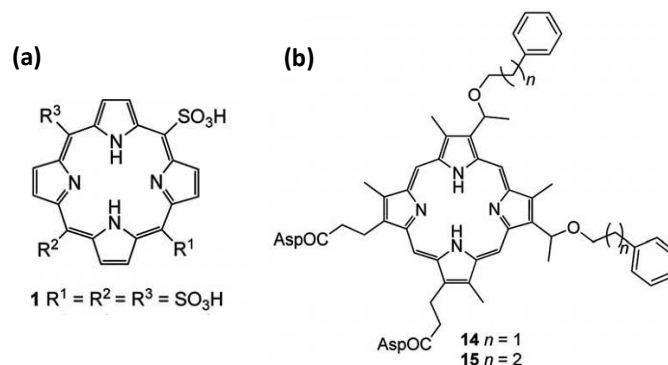
Les auteurs n'explicitent pas le phénomène mais il est envisageable qu'une « couche » trop importante de dextran bloque l'échange des molécules d'eau et que le gadolinium se retrouve alors enfoui. Le dextran peut aussi être un élément permettant le relargage de principe actif<sup>18</sup>. De la même manière, le chitosan est un polysaccharide non toxique, biocompatible et biodégradable. La présence de groupement  $-NH_2$  et  $-OH$  donne lieu à de nombreux sites d'accroche et les groupements amino sont une clé pour des agents de contraste pH dépendants<sup>12</sup>.

Les agents de contraste dit « intelligents » permettent de visualiser *in vivo* de façon non invasive des paramètres physico-chimiques tel que le pH, l'activité enzymatique, la concentration des ions. En 2002, Leade et al. ont développé un agent de contraste dont la performance en IRM dépend de la présence ou non d'ions  $Ca^{2+}$ . Composé de deux complexes dérivés du Gd-DOTA liés par un ligand DOPTA capable de capter le calcium<sup>19</sup>, ce composé présente une relaxivité de  $5,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (500 MHz, 298K). Le changement de conformation du complexe lorsqu'il est lié au  $Ca^{2+}$  serait à l'origine de l'augmentation de la relaxivité. En effet, ce phénomène entraînerait une diminution du temps de relaxation longitudinale des protons de l'eau. A la suite de cette étude, de nouveaux agents activés par des ions métalliques ont été développés : auto-assemblage de chélates autour d'un ion  $Fe^{3+}$ ,<sup>20</sup> complexe s'activant en présence d'ions  $Cu^{2+}$ ,<sup>21</sup>.

#### 1.3.2.2 Agents de contraste à base de $Mn^{II}$

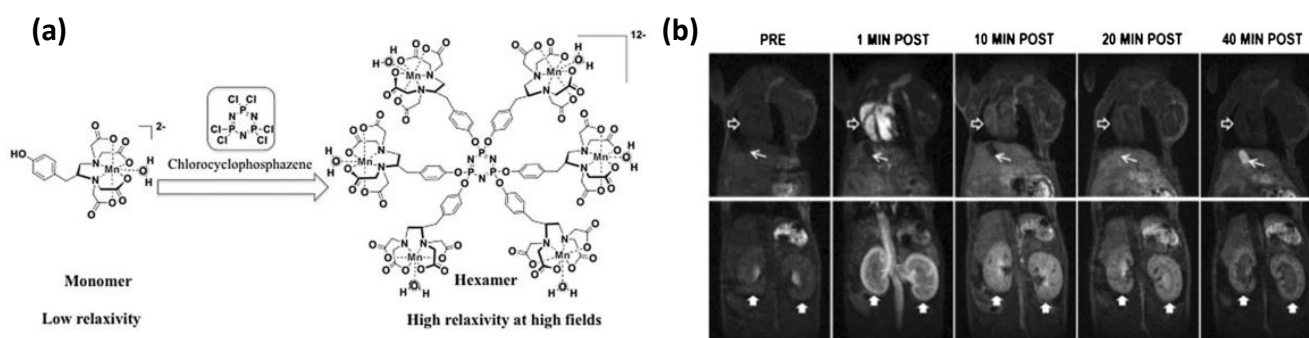
Tout comme le  $Gd^{III}$ , le  $Mn^{II}$  a un long temps de relaxation électronique, un spin élevé ( $S=5/2$ ), des molécules d'eau labiles. Il joue un rôle important dans les processus biologiques, notamment comme co-facteur dans les réactions enzymatiques. Ainsi, sa taille, proche du  $Ca^{2+}$ , devient un avantage car il peut utiliser les canaux calciques pour pénétrer dans les cellules<sup>22</sup>. Cependant, un excès d'ions  $Mn^{II}$  libre peut causer des lésions importantes au niveau du cerveau. La coordinence du  $Mn^{II}$  est de 6, ce qui rend difficile la mise au point d'un complexe de  $Mn^{II}$  stable avec une ou plusieurs molécules d'eau coordonnées. Malgré un intérêt moindre pour les chélates de  $Mn^{II}$ , quelques équipes se sont intéressées à ces objets.

Une classe particulière de complexes a émergé dans ce domaine : les Mn-porphyrine. De très nombreux ligands porphyriniques ont été étudiés, un des premiers étant le TPPS<sub>4</sub><sup>23</sup>. Sa structure est présentée sur la figure I-12.(a). La relaxivité obtenue pour ce complexe est de  $10,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (20MHz, 37°C). Ce résultat prometteur a ouvert le champ à de nombreux ligands porphyrine. Plus récemment, Takehara et al. ont mis au point un ligand amphiphile HOP-9P (Fig.I-12 (b)). Ces complexes ont fait l'objet d'étude de biodistribution (accumulation dans la tumeur et élimination rapide dans les autres tissus) et une augmentation du contraste est observée après 24h<sup>24</sup>. Cependant, aucune étude de toxicité n'a été publiée sur ces objets.



**Figure I-12.** Structure de ligands porphyrine (a) TPPS<sub>4</sub>; (b) HOP-9P<sup>22</sup>

La complexation du Mn<sup>II</sup> par une large série de ligands chélatants linéaires ou cycliques (dérivant de l'EDTA ou du DTPA) a été explorée par plusieurs équipes de recherche. Bien que la complexation par le DTPA soit suffisamment forte pour prévenir l'accumulation des ions dans les tissus, la relaxivité reste faible ( $r_1 = 1,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  à 11,7T et 298K) par rapport au Gd-DTPA. En effet, l'absence de molécule d'eau dans la première sphère de coordination du Mn<sup>II</sup> limite la relaxivité. En 2014, l'équipe de Caravan a mis au point un hexamère de manganèse (*Fig.I.13(a)*) présentant une relaxivité proche du Gd-DTPA à 1,5 T mais des performances supérieures à haut champ ( $r_1 = 6,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  pour l'hexamère et  $r_1 = 3,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  pour le Gd-DTPA à 4,7T)<sup>25</sup>. Les études *in vivo* menées sur ces objets ont montré une élimination rapide par les reins mais également par la voie hépatobiliaire (*Fig.I.13(b)*).



**Figure I-13.** (a) Structure du monomère et de l'hexamère de Mn<sup>II</sup>; (b) IRM *in vivo*, suivi cinétique du signal dans les reins (flèches larges pleines), dans la vésicule biliaire (flèche large vide) et dans le cœur (flèches fines)<sup>25</sup>

En 2005, Liu et al. ont mis au point deux complexes de Mn<sup>II</sup> avec des stœchiométries différentes (1 :1 et 2,5 :1) avec le ligand DTPA-BpABA. Le complexe avec la plus haute stœchiométrie peut accepter plus d'une molécule d'eau par ion Mn<sup>II</sup> et présente une relaxivité de  $16,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Au contraire, le deuxième complexe (coordination de 7) ne peut pas accepter de molécules d'eau mais présente une relaxivité de  $5,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , qui est supérieure au Gd-DTPA ( $4,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )<sup>26</sup>. Ce résultat pourrait s'expliquer par la présence de nombreuses molécules d'eau dans la sphère externe du complexe, des liaisons hydrogène efficaces entre l'azote de l'amide, l'oxygène du carboxyle et les molécules d'eau. La même explication peut être donnée pour les résultats obtenus par Zhang et al. en 2006<sup>27</sup>. Les auteurs ont associé le DTPA à l'Isoniazid®, un antituberculeux puissant. La relaxivité de ce complexe est de  $6,9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .

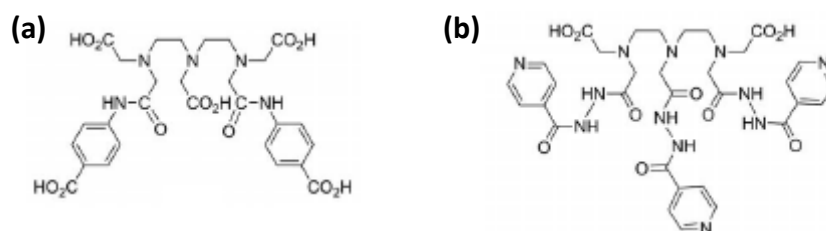


Figure I-14. Structure des ligands dérivés du DTPA (a) DTPA-BpABA ; (b) Isoniazid<sup>22</sup>

Plus récemment, Gale et al. ont synthétisé un complexe de Mn<sup>II</sup> dont la structure est représentée ci-dessous<sup>28</sup>. Il présente la caractéristique d'être très stable à pH=7,4, mais a une relaxivité proche des agents de contraste commerciaux. Les auteurs ont donc modifié le complexe en combinant 4 chélates de Mn<sup>II</sup> avec un peptide spécifique (FBP) (Fig.I-15.(b)). La relaxivité de cette entité a été mesurée dans différents milieux : dans un milieu tampon (pH=7,4),  $r_1=8,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ; dans une solution de fibrinogène humain,  $r_1=13,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Le complexe étudié doit l'augmentation de sa relaxivité à la taille de l'objet. L'amélioration de la relaxivité dans la solution de fibrinogène est liée au fait que la protéine ne se lie pas. Les mesures effectuées (Fig.I-15.(c)) suggèrent que le complexe pourrait interagir avec l'albumine. Des études de toxicité et des études *in vivo* permettraient de confirmer le potentiel prometteur de cette nouvelle entité.

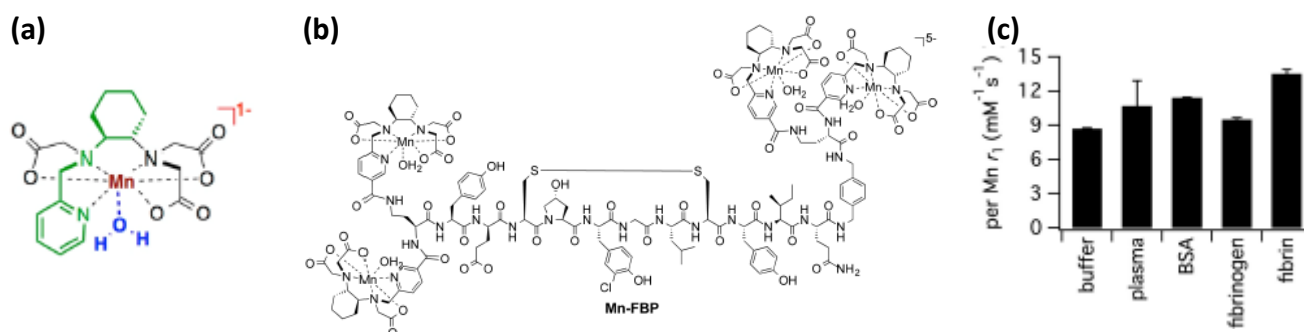
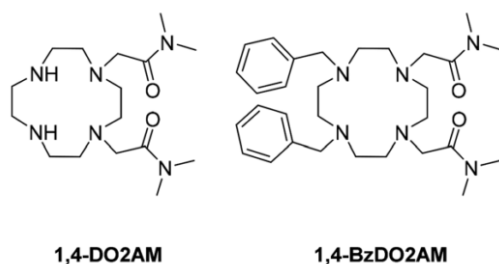


Figure I-15. Structures des complexes (a) [Mn(PyC<sub>3</sub>A)(H<sub>2</sub>O)]<sup>-</sup>; (b) Mn-FBP; (c) Mesures de relaxivités par Mn<sup>II</sup> en fonction des milieux d'étude<sup>28</sup>

En 2017, des complexes de manganèse ont été développés avec des ligands dérivés du DOTA (Fig.I-16.) contenant des groupements hydrophobes permettant une affinité avec l'albumine. La stabilité des complexes ainsi que les interactions complexe-HSA ont été montrées dans cette étude. Les auteurs montrent également une augmentation significative de la relaxivité lorsqu'il y a interaction entre le complexe et l'albumine. En effet, les relaxivités sont de 3,8 et 3,5 mM<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup> (à 25°C et 20 MHz) pour les complexes [Mn(1,4-BzDO2AM)]<sup>2+</sup> et [Mn(1,4-DO2AMBz)]<sup>2+</sup> respectivement. En présence d'albumine, ces valeurs augmentent significativement :  $r_1=18,5$  et  $27,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  pour [Mn(1,4-BzDO2AM)]<sup>2+</sup> et [Mn(1,4-DO2AMBz)]<sup>2+</sup> respectivement<sup>29</sup>. Cette augmentation s'explique par une diminution de la vitesse de rotation de l'édifice.



**Figure I-16.** Structures des chélates utilisés pour former les complexes  $[\text{Mn}(1,4\text{-BzDO2AM})]^{2+}$  et  $[\text{Mn}(1,4\text{-DO2AMBz})]^{2+}$  <sup>29</sup>

Ces résultats semblent prometteurs mais d'après l'étude, la charge positive des chélates est un problème pour faire des tests *in vivo*. Un développement autour de la chimie de ces complexes serait donc nécessaire.

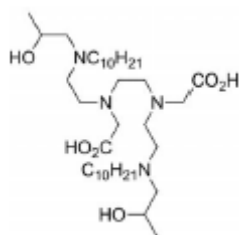
### 1.3.3 Les agents macromoléculaires

#### 1.3.3.1 Encapsulation par des structures lipophiles

L'encapsulation par des structures lipophiles telle que les micelles ou les liposomes permet une augmentation de la taille des systèmes afin d'améliorer la relaxivité. Un second avantage est le piégeage des ions paramagnétiques, empêchant le relargage d'ions libres et donc la toxicité des agents de contraste.

Un exemple de tels systèmes a été étudié par Unger et al.. En effet, un complexe de  $\text{Mn}^{\text{II}}$  avec un ligand EDTA-DDP a été inséré dans un liposome bicouche<sup>30</sup>. L'étude a consisté à synthétiser plusieurs systèmes avec différentes tailles et mesurer leurs relaxivités longitudinales. La meilleure relaxivité est obtenue pour le plus petit système (30 nm,  $r_1 = 37,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  à 0,5T).

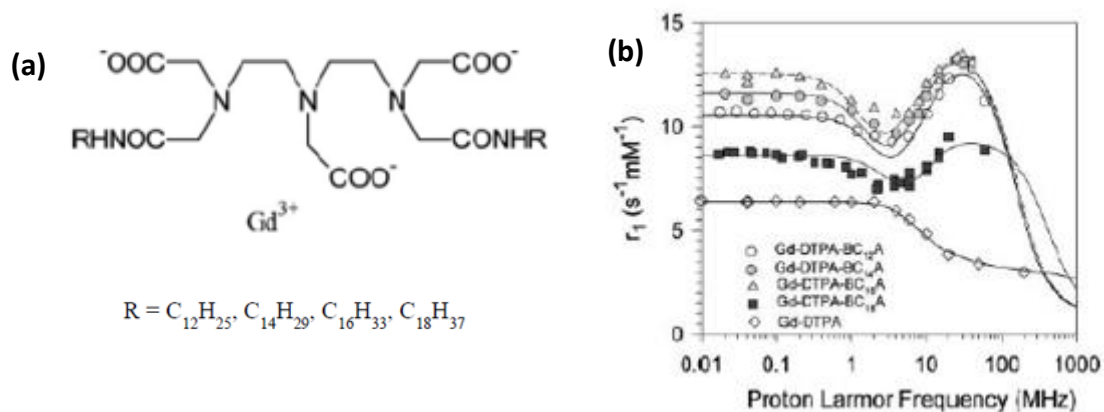
Des images *in vivo* montrent une augmentation spécifique du contraste dans les zones hépatiques plus importantes pour des chélates piégés dans les liposomes que pour les ions libres piégés.



**Figure I-17.** Ligand EDTA-DDP <sup>22</sup>

Les micelles paramagnétiques sont des dérivés lipophiles du Gd-DTPA encapsulés dans des micelles. La longueur de la chaîne aliphatique R influence les valeurs de relaxivité comme montré sur la figure I-18 <sup>31,32</sup>.





**Figure I-18. (a)** Dérivés lipophiles bis(amide) du Gd-DTPA avec différentes longueurs de chaînes  $R^{32}$  et **(b)** Profils à 310K de ces différents dérivés lipophiles comparés à celui du Gd-DTPA<sup>31</sup>

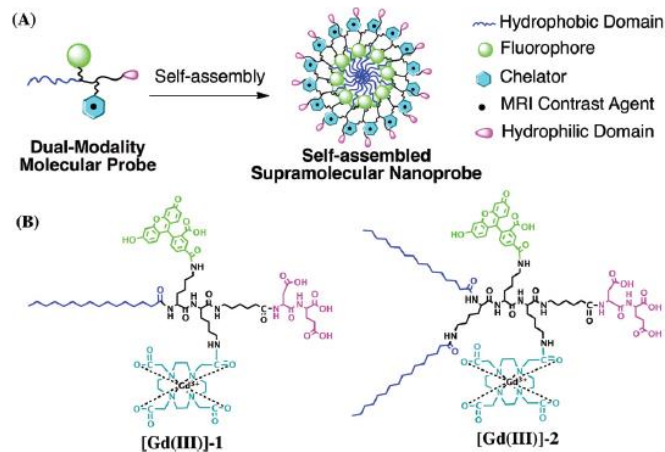
Ces objets présentent un diamètre hydrodynamique de 20 nm et une meilleure relaxivité que le Gd-DTPA. En effet, la taille plus importante du système provoque une précession plus lente. La chaîne carbonée plus longue entraîne une précession locale autour du  $Gd^{III}$  ; ainsi la meilleure relaxivité est obtenue pour le dérivé lipophile à douze carbones (*Fig. I-18 (b)*).

Concernant les autres dérivés, la relaxivité à 20 MHz se situe aux alentours de  $13 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , valeur trois fois supérieure à celles du Gd-DTPA. Les lipides constituant les micelles ou les liposomes empêchent la bonne diffusion des molécules d'eau de l'intérieur vers l'extérieur de la cavité. Ces objets peuvent à la fois contenir des complexes paramagnétiques pour l'IRM et délivrer des médicaments. Cependant, le devenir des systèmes dans l'organisme n'est pas élucidé.

### I.3.3.2 Auto-assemblage avec des peptides amphiphiles

En 2005, Stupp et al. ont mis en avant des systèmes pouvant être utilisés comme agent de contraste et contenant des auto-assemblages de chélates de  $Gd^{III}$  et de peptides amphiphiles<sup>33</sup>. En faisant varier la forme et la nature de l'auto-assemblage, il est alors possible de créer des plateformes variées pour l'imagerie médicale mais aussi pour la thérapie. Très récemment (en 2015), l'équipe de Cui a mis au point un auto-assemblage bimodal contenant du Gd-DTPA (IRM) et un fluorophore, le 5-FAM<sup>34</sup>.

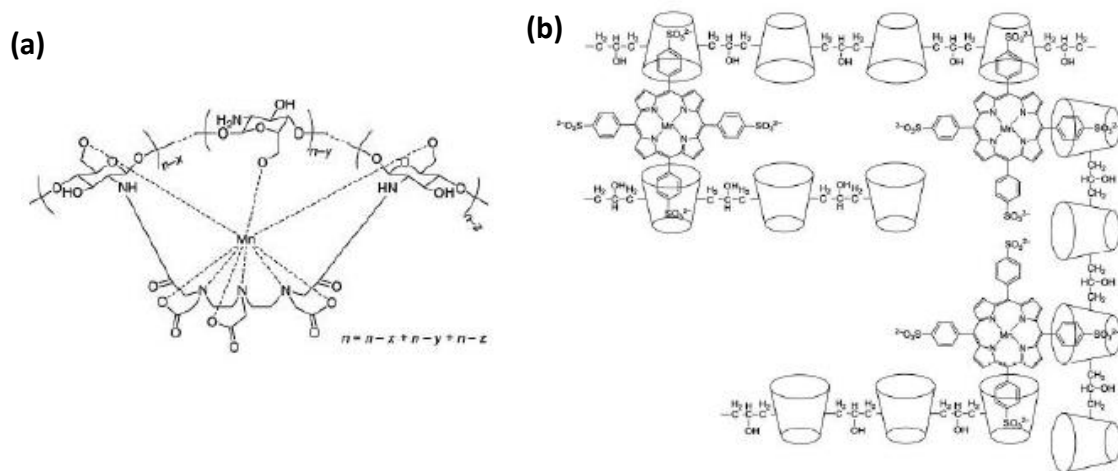
Avant auto-assemblage, les relaxivités sont de  $4,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  pour un système avec une chaîne carbonée terminale et de  $4,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  pour un système avec deux chaînes carbonées terminales. Ces valeurs sont proches de celles du Gd-DTPA. Après auto-assemblage, les relaxivités sont nettement améliorées :  $7,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  pour un système avec une chaîne carbonée terminale et  $14,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  pour un système avec deux chaînes carbonées terminales. Ces auto-assemblages ont fait uniquement l'objet d'études *in vitro*, qui supposent un potentiel à vérifier par des tests *in vivo*.



**Figure I-19** (a) Schéma de l'auto-assemblage contenant un fluorophore et un complexe de Gd<sup>III</sup> ; (b) Structures chimiques des deux types de sonde utilisées<sup>34</sup>

### I.3.3.3 Complexes macromoléculaires de Mn<sup>II</sup>

Des complexes moléculaires de Mn<sup>II</sup> ont été décrits dans la littérature. Huang et al. ont couplé le MnDTPA à des monomères de chitosan via une liaison amide (Fig. I-20 (a))<sup>35</sup>. Ces macromolécules ont une relaxivité supérieure au Gd-DTPA et sont très stables dans l'eau, sans relargage de Mn<sup>II</sup>. Aime et al. ont mis au point un système encapsulant un complexe de Mn<sup>II</sup>-porphyrine (MnTPPS<sup>4-</sup>) dans une matrice de poly-β-cyclodextrine (Fig. I-20 (b)). Ces objets ont une relaxivité en solution aqueuse (r<sub>1</sub> = 40,8 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> à 20 MHz et 25°C)<sup>9</sup> quatre fois supérieure à celle du MnTPPS<sup>4-</sup> libre.



**Figure I-20.** Structures chimiques des complexes (a) MnDTPA-(chitosan)<sub>n</sub><sup>35</sup> ; (b) MnTPPS<sup>4-</sup> encapsulé dans une matrice de poly-β-cyclodextrine<sup>9</sup>

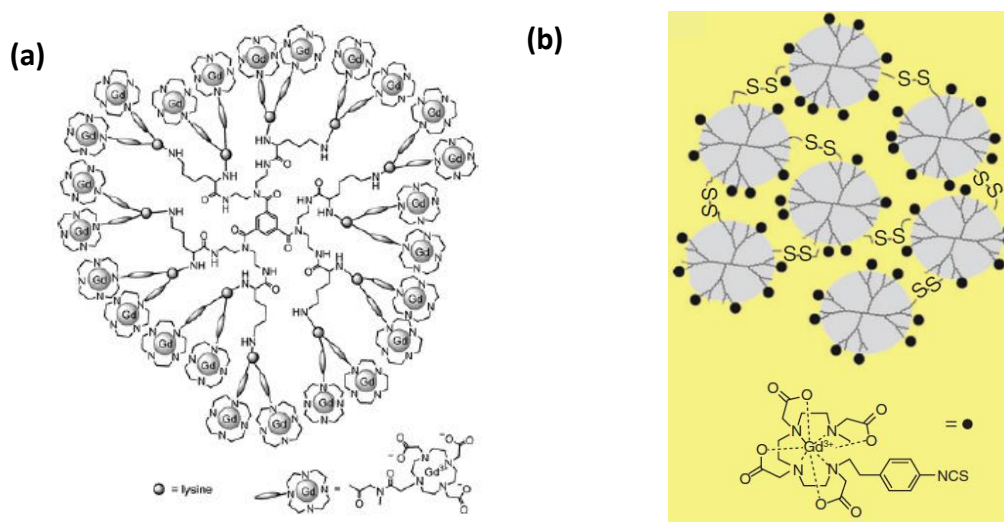
### I.3.3.4 Association chélate de Gd<sup>III</sup>-dendrimère

Des polymères cascades ou dendrimères, largement utilisés pour des applications biomédicales, ont été explorés en tant que plateforme pour le greffage d'agents de contraste. Ces structures ont été choisies car elles présentent de nombreux avantages : une faible polydispersité, une taille et une forme bien définies, une non toxicité et une surface facilement fonctionnalisable.

Les polyamidoamines (PAMAM) et les polypropylèneimine (PPI) sont les dendrimères les plus étudiés car ils sont solubles dans l'eau et présentent des groupements amines terminaux en surface.

Le nombre de groupement amine augmente rapidement avec la génération du dendrimère (8 amines sur un dendrimère de première génération G1, 16 sur G2, 32 sur G3 et ainsi de suite)<sup>36</sup>.

Parmi les travaux reportés dans la littérature, le Gadomer-17 (ou Gd-DTPA-24-Cascade-polymer) a été à l'origine de plusieurs études. Sa structure se compose d'un cœur d'acide trimésique sur lequel sont greffés des dendrons de L-lysine. Elle lui permet d'accueillir jusqu'à 24 complexes de gadolinium (*Fig. I-21(a)*) justifiant la valeur de relaxivité de  $17,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,<sup>37</sup>.



**Figure I-21.** (a) Structure simplifiée du Gadomer-17<sup>37</sup> ; (b) Schéma du PAMAM (G3)-[Gd-C-DTPA]<sup>-1</sup> avec des ponts disulfures<sup>38,33</sup>

La taille des dendrimères en fait des objets non biodégradables et difficilement éliminables par l'organisme. Ye et al. ont récemment reporté la synthèse d'agents de contraste dendritiques à différentes générations biodégradables (Gx/MOP-DTPA ; x=0 ; 1 ; 2 et 3), formés d'un cœur de  $\beta$ -cyclodextrine<sup>39</sup>. La taille de ces objets est dépendante du degré de polymérisation et est comprise entre 2,8 et 8,6 nm. La relaxivité mesurée est de l'ordre de  $11,7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . En général, les valeurs de relaxivité des dendrimères conjugués varient entre  $15 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et  $40 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  par ion  $\text{Gd}^{3+}$ , selon le type de chélate greffé et la génération du dendrimère. Ces valeurs sont nettement plus élevées que celles obtenues pour les polymères linéaires<sup>40</sup>.

Une approche plus originale a été proposée par Tsourkas et al. : elle consiste à préparer le complexe moléculaire de Gd ( $[\text{Gd-C-DTPA}]^{-1}$ ) puis à intégrer celui-ci dans un dendrimère de troisième génération, de type PAMAM<sup>38</sup>. Les dendrimères sont liés entre eux par des ponts disulfures (*Fig. I-21 (b)*) et forment des nanoclusters qui seront dissociés dans l'organisme, permettant ainsi une meilleure élimination.

Ces clusters de 59, 91 et 142 nm présentent des relaxivités par ion  $\text{Gd}^{3+}$  de 11,7, 18,4 et  $22,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  respectivement. Ces valeurs sont nettement améliorées par rapport au dendrimère avec le chélate de  $\text{Gd}^{\text{III}}$  mais sans pont disulfure ( $r_1 = 10,9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ).

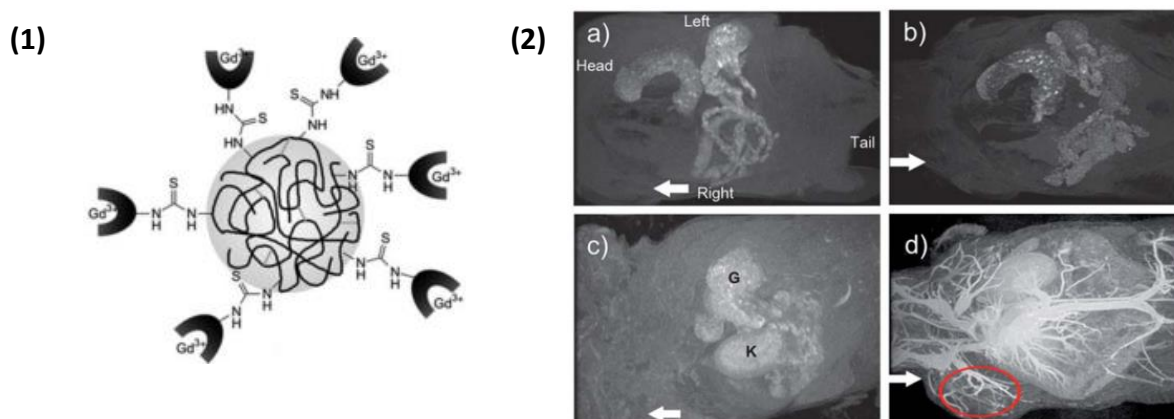
### 1.3.4 Nano-objets contenant des ions paramagnétiques

Les nano-objets ont été particulièrement étudiés ces dernières années pour des applications en tant qu'agents de contraste, et plus largement pour des applications médicales. Ces objets peuvent être de différents types : nanogels, nano MOF (Metal Organic Framework) et nanoparticules notamment. Nous évoquerons ci-dessous quelques exemples d'études menées dans ce cadre.

#### 1.3.4.1 Nanogels

Les nanogels sont des hydrogels, des composites hybrides organique-inorganiques à l'échelle nanométrique. Ce sont des réseaux polymériques contenant de nombreuses molécules d'eau, qui sont facilement modulables chimiquement et physiquement par contrôle du taux de réticulation. Ils sont également biocompatibles. La nature hydrophile des nanogels permet l'accès à des stimuli biochimique. L'intérêt pour ces structures s'est particulièrement accru dernièrement en vue d'applications pour l'imagerie médicale<sup>41</sup>.

En 2013, Soleimani et al. ont mis au point des nanogels de 10 nm (diamètre hydrodynamique), dont la structure est présentée en figure I-22. Ils sont composés de complexes de  $Gd^{III}$  incorporés à un réseau de polymères (Poly(éthylène glycol) méthyle éther méthacrylate, N-(2-aminoéthyl) méthacrylamide hypochlorite et éthylène glycol diméthacrylate comme agent de réticulation)<sup>42</sup>. Une relaxivité de  $17,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  est mesurée à 20 MHz et  $37^\circ\text{C}$ . Les auteurs montrent que la valeur de  $\tau_R$  a été optimisée par rapport à un agent clinique ( $\tau_R=2,7 \text{ ns}$  pour le nanogel,  $\tau_R=60 \text{ ps}$  pour le Gd-DTPA). Des tests *in vivo* complètent l'étude, permettant de mettre en avant l'affinité du composé pour la vascularisation au niveau des tumeurs. Cette étude, malgré de nombreux résultats, ne présente aucune évaluation de la toxicité, ni aucune donnée concernant la présence de gadolinium libre pouvant être à l'origine de complications.

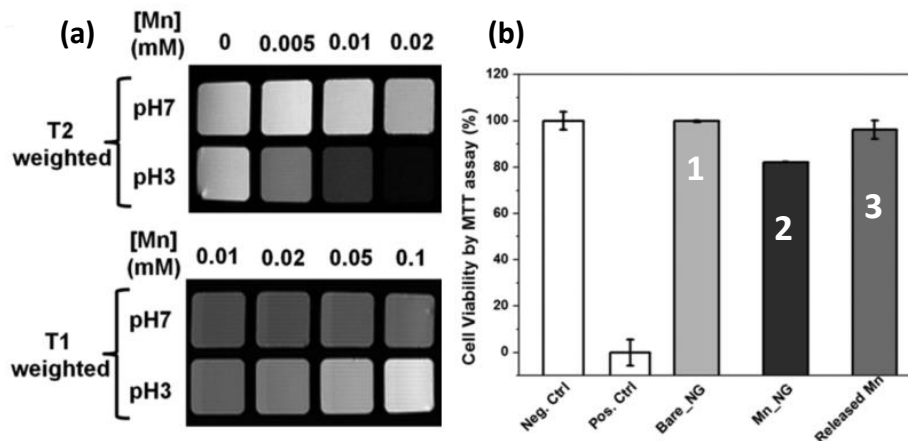


**Figure I-22.** (1) Structure du nanogel développé par Soleimani et al. ; (2) Images IRM in vivo a) après injection du Gd-DTPA, b) après injection du nanogel ; c) 20 min après l'injection de Gd-DTPA, d) 20 min après l'injection du nanogel. La flèche notifie la tumeur, les injections ont été faites à  $[Gd^{3+}] = 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ <sup>42</sup>

Un système de la littérature présente des performances en relaxivité supérieur avec  $r_1=72,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Il est composé de complexes  $[Gd-DOTA]^-$  entouré d'un réseau polymérique (chitosan, acide hyaluronique)<sup>43</sup>. La taille importante de ces objets (entre 230 et 280 nm) peut expliquer ces valeurs de relaxivité particulièrement élevées. D'autres nanogels à base de  $Gd^{III}$  ont été développés, généralement en incorporant des ions  $Gd^{3+}$  au cœur du réseau de polymère.

Ces objets ont principalement des tailles supérieures à 50 nm pour des performances inférieures au système présenté ci-dessus<sup>41,44</sup>. Le piégeage des Gd<sup>III</sup> peut être une solution pour empêcher leur relargage et donc limiter la toxicité.

Peu d'études ont été menées sur des systèmes à base de Mn<sup>II</sup>. Récemment, Caro et al. ont mis au point un nanogel à base de manganèse activable par le pH<sup>45</sup>. Le nanogel est synthétisé à partir de 4-vinylpyridine et de di-vinylbenzène. L'incorporation du métal à pH acide donne lieu à une augmentation de la taille des objets ( $d_H = 218$  nm). Les ions Mn<sup>2+</sup> sont chélatés aux entités pyridines du nanogel mais un relargage du Mn<sup>II</sup> est constaté à pH < 4, de l'ordre de 19% après une semaine. Ces objets ont la particularité de présenter une relaxivité longitudinale  $r_1 = 10,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  à pH < 4 à 1,5 T avec un rapport  $r_2/r_1 = 1,8$  mais une relaxivité nettement diminuée à pH = 7 ( $r_1 = 0,32 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Les mesures de relaxivité effectuées à haut champ (9,4T) montrent une inversion des performances, avec des valeurs de relaxivités transversales significatives ( $r_2 = 306,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $r_2/r_1 = 21$  à pH < 4) en faisant, ainsi, de potentiel agents de contraste T<sub>2</sub>. Les propriétés d'agents de contraste de ce système peuvent être modulées en fonction du champ appliqué et du pH. Des tests de cytotoxicité permettent d'évaluer la viabilité cellulaire à 80% après 24h d'incubation.



**Figure I-23. (a)** Images pondérées en T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub> *in vitro* à différentes concentrations en Mn<sup>II</sup> à 9,4 T ; **(b)** Viabilité cellulaire : 1- Réseau polymérique, 2- Nanogel dopé au Mn<sup>2+</sup>, 3- Relargage de Mn<sup>2+</sup> ([Nanogel]=0,6 mg/mL, [Mn]=0,1 mM)<sup>45</sup>

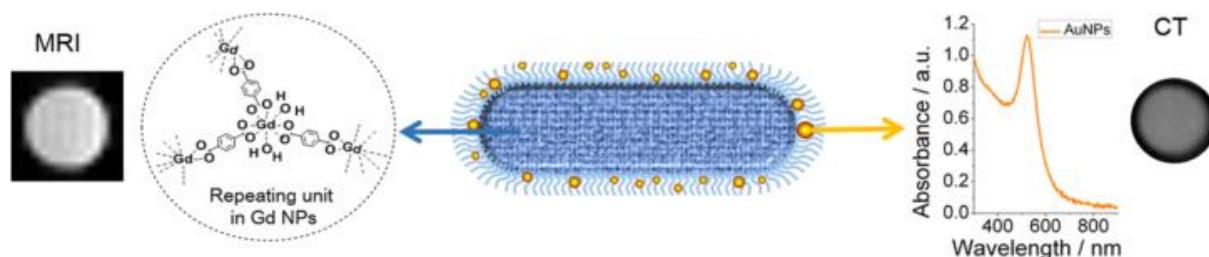
Cependant, cette étude n'a pas été complétée par des tests *in vivo* qui permettraient d'évaluer notamment la biodistribution des nanogels.

#### 1.3.4.2 Nano-MOF

Les MOF (Metal Organic Frameworks) sont des polymères de coordination ayant une structure cristalline poreuse. Ces matériaux sont constitués par des clusters de métaux de coordination liés par des molécules organiques rigides.

Ces molécules jouent un rôle important dans le contrôle de la taille des pores qui peuvent accueillir un principe actif. De nombreuses études montrent des applications en tant qu'agent de contraste, mais également pour la chimio thérapie par le transport et le relargage de principe actif. Nous nous intéresserons uniquement aux performances pour l'IRM.

Parmi ces études, une équipe a mis point deux MOF de type  $Gd^{III}(BDC)_{1,5}(H_2O)_2$  (avec BDC=1,4-benzenedi-carboxylate) ayant des morphologies différentes : bâtonnets (100 nm de long et 40 nm de large) et plaques (100 nm)<sup>46</sup>. Les valeurs de relaxivités  $r_1$  sont de  $35,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et de  $13 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  pour les bâtonnets et les plaques respectivement. Les auteurs justifient l'écart de relaxivité par une évolution du ratio volume/surface en fonction de la morphologie et une répartition plus importante des ions  $Gd^{3+}$  en surface pour les nano-bâtonnets. Des nano-MOF originaux ont été développés par Tian et al.. Ils comportent des ions  $Gd^{3+}$  mais également des nanoparticules d'or liées par l'acide polyacrylique (PAA)<sup>47</sup>. Ainsi, ces objets bimodaux peuvent être actifs comme agents de contraste en IRM et en tomographie.



**Figure I-24.** Schéma du MOF de  $Gd^{III}$  dont la surface est greffée de groupements PAA permettant la formation de nanoparticules d'or<sup>47</sup>

Les mesures de relaxivité montrent des performances similaires entre le MOF-Gd et le MOF Gd-PAA-Au ( $r_1=4,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et  $r_1=4,9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  respectivement). La modification de la surface n'entraîne donc pas de perturbation dans le processus de relaxivité. Aucune étude dans les milieux biologiques *ou in vitro* n'a été reportée pour ces objets.

Les exemples de nano-MOF au  $Mn^{II}$  sont plus rares. Taylor et al. ont étudiés un système à base de  $Mn^{II}$  ayant une relaxivité d'environ  $5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Les valeurs de relaxivité s'expliquent par la présence d'une coquille de silice qui va limiter l'échange des molécules d'eau conduisant à une diminution de la relaxivité. Cependant, la silice permet de stabiliser les objets et de faciliter la fonctionnalisation de la surface notamment par un fluorophore (rhodamine B) et un peptide de ciblage cellulaire [c(RGDfk)]. Le peptide de ciblage permet une affinité particulière de ces nano-MOF pour les vaisseaux sanguins développés autour des cellules cancéreuses. Des tests *in vivo* montrent une amélioration du signal en IRM et une augmentation du contraste dans le foie, les reins et les artères. Ainsi, le ciblage remplit bien son rôle et les objets semblent être éliminés rapidement par la voie rénale, ce qui est étonnant au vu de la taille des objets (50-100 nm)<sup>48</sup>.

Bien que très étudiés pour des applications biomédicale, de nombreux points sont encore inconnus pour les nano-MOF<sup>49</sup>. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer la biodistribution, la stabilité à long terme, l'accumulation dans certains tissus comme le foie et les propriétés de circulation dans le sang.

Des objets sous formes de nanoparticules, généralement de taille inférieure au MOF, ont également été beaucoup étudiés. L'essentiel de la recherche concernant les nanoparticules (NPs) s'est concentré sur les oxydes de fer. Ceux-ci ont l'avantage de présenter une relaxivité transversale ( $r_2$ ) élevée et une toxicité inexistante. Cependant, ces agents  $T_2$  ont l'inconvénient d'avoir un contraste négatif, c'est-à-dire un signal noir, qui peut être confondu avec d'autres processus physiologiques. De plus, le fond des images peut être distordu à cause des artefacts liés à la susceptibilité magnétique des oxydes. C'est pourquoi la communauté scientifique s'est tournée vers des NPs présentant un contraste en  $T_1$ .

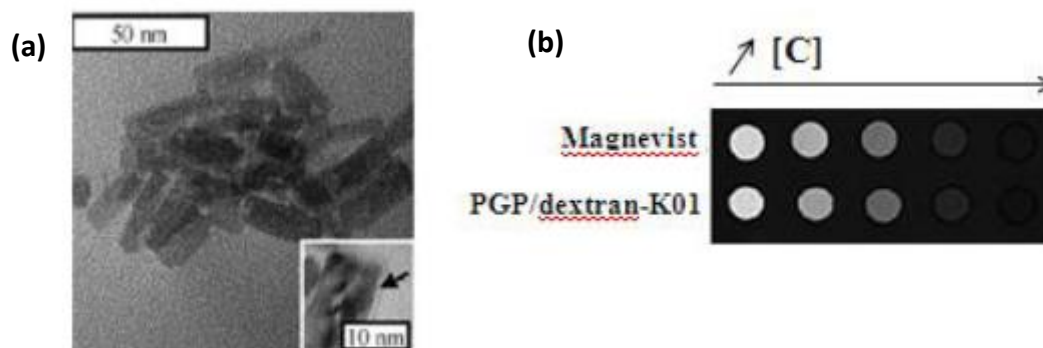


### I.3.4.3 Nanoparticules de Gd<sup>III</sup>

Des complexes de Gd<sup>III</sup> ont été greffés à la surface de nanoparticules d'or pour combiner les propriétés en tomographie de l'or aux propriétés d'imagerie IRM du Gd<sup>III</sup>. Ces objets ont une taille inférieure à 10 nm et contiennent à leur surface une centaine de complexe de Gd<sup>III</sup>. Les valeurs de relaxivité ne dépassent pas, en général, 20 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>. La configuration de ces objets entraîne une précession locale des complexes de Gd<sup>III</sup> à l'origine des valeurs de relaxivités<sup>50,51</sup>.

Une solution envisagée par Moriggi et al. est de créer un lien rigide entre un chélate de Gd<sup>III</sup> et des nanoparticules d'or grâce à une fonction thiol. Les objets ont une taille de 4,8 nm et une relaxivité de 60 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> par ion Gd<sup>3+</sup> à 60 MHz<sup>52</sup>. Toujours dans l'objectif de réduire la mobilité des complexes de Gd<sup>III</sup>, des nanoparticules incorporant directement au sein de leur structure des ions paramagnétiques ont été mises au point. Ainsi, la précession solidaire d'un objet paramagnétique de taille suffisamment importante, et donc ayant un temps  $\tau_R$  assez long, pourrait être une bonne stratégie pour la synthèse d'agents de contraste pour l'IRM, ou encore pour la synthèse de nanoparticules multimodales et/ou à visée thérapeutique.

Les phosphates Gd<sup>III</sup>PO<sub>4</sub><sup>53</sup>, les fluorures Gd<sup>III</sup>F<sub>3</sub><sup>54</sup> ou encore les nanoparticules d'oxydes de Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>55</sup>, sont des NPs inorganiques ne présentant aucune molécules d'eau coordonnées au Gd<sup>III</sup>. Cependant, des molécules d'eau se trouvent en surface des objets. Des nanoparticules de Gd<sup>III</sup>PO<sub>4</sub> de 23 nm de diamètre ont été synthétisées par voie hydrothermale. L'enrobage des particules par du dextran permet d'assurer leur redispersion dans l'eau<sup>53</sup>. Ces phosphates ont une relaxivité de 13,9 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> et le rapport  $r_2/r_1$  égal à 1,1 (à 0,47T) montre qu'ils présentent un contraste en T<sub>1</sub>.

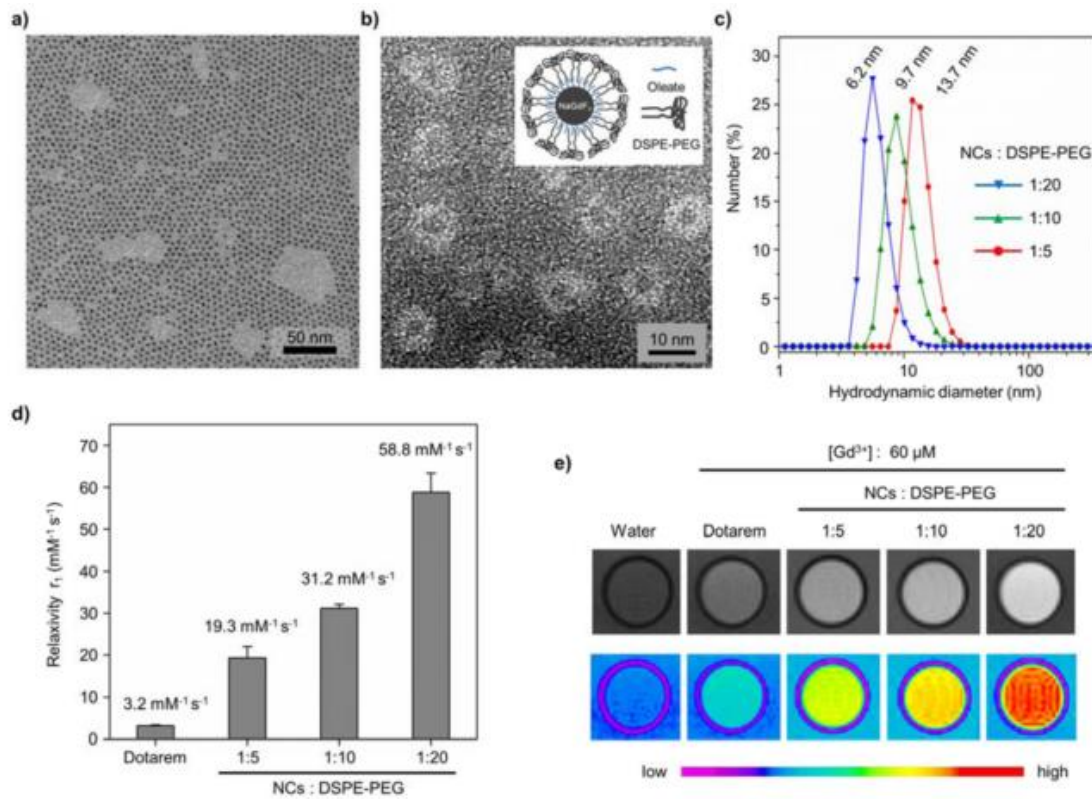


**Figure I-25. (a)** Images MET des nanoparticules de GdPO<sub>4</sub> enrobées de dextran **(b)** Images de contraste pondérées en T<sub>1</sub> : Magnevist®(5,0 ; 1,0 ; 0,5 ; 0,1 et 0,01 mM en Gd<sup>III</sup>) ; PGP/dextran-K01 (2,2 ; 1,1 ; 0,5 ; 0,2 et 0,04 mM en Gd<sup>III</sup>)<sup>53</sup>

Le contraste pondéré en T<sub>1</sub> est amélioré avec l'augmentation de la concentration en Gd<sup>III</sup>. Quelle que soit la quantité d'ions paramagnétiques, le contraste est meilleur que l'agent clinique.

En 2016, une étude portant sur des NPs de NaGdF<sub>4</sub> encapsulées dans des micelles de DSPE-PEG (polyéthylène glycol modifié) montre des valeurs de relaxivité particulièrement importantes ( $r_1 \approx 80$  mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>)<sup>56</sup>. Ces objets ont un diamètre hydrodynamique inférieur à 15 nm. La taille des particules est dépendante des ratios NaGdF<sub>4</sub>/DSPE-PEG (Fig.I-26.c). Or, la taille des objets a une influence sur les performances : les relaxivités sont améliorées pour des tailles plus petites. Les objets optimaux sont obtenus pour une quantité plus importante de DSPE-PEG, s'expliquant par un meilleur échange des molécules d'eau à travers la micelle.

Pour démontrer leur hypothèse, les auteurs ont synthétisé un échantillon avec un ratio NPs/DSPE-PEG = 1/40, une taille de 4,2 nm et une relaxivité longitudinale de  $80 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Le rapport  $r_2/r_1$  est petit (1,5) montrant que ce sont de bons agents de contraste  $T_1$ .

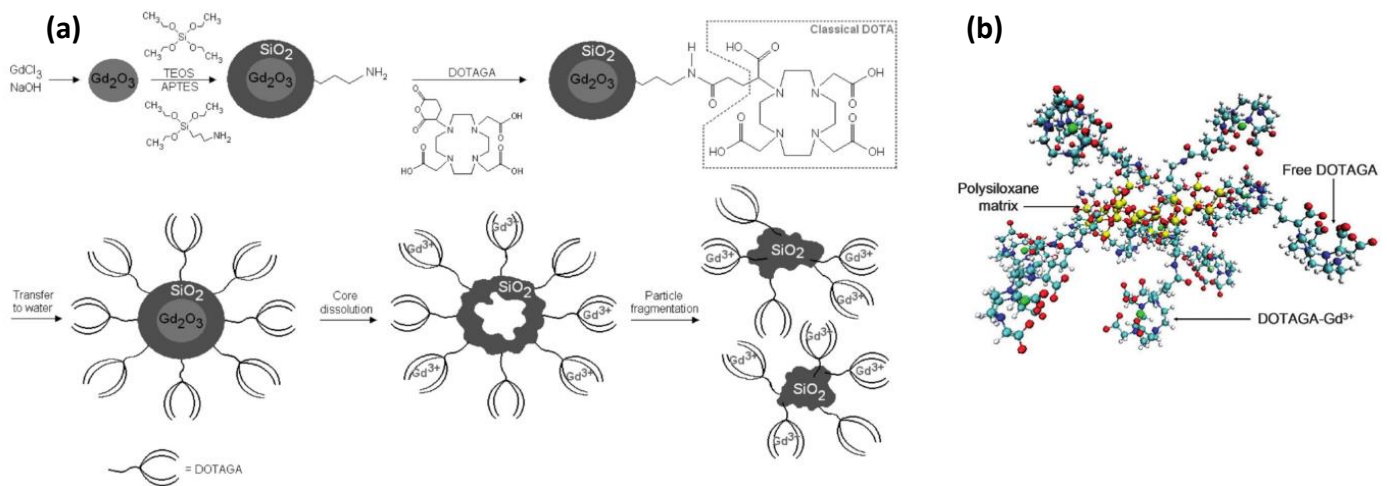


**Figure I-26.** (a) Image MET des nanoparticules de  $\text{NaGdF}_4$ ; (b) Image MET des NPs de  $\text{NaGdF}_4$  confinées dans les micelles de DSPE-PEG; (c) Diamètres hydrodynamiques des NPs mesurés par DLS; (d) Mesure de relaxivité  $r_1$  à 1,4T du DOTAREM, de différentes NPs avec des ratio NPs/DSPE-PEG différents; (e) Images pondérées en  $T_1$  du DOTAREM, et de différentes NPs avec des ratio NPs/DSPE-PEG différents,  $[\text{Gd}^{3+}] = 60 \mu\text{M}$

Les tests de viabilité cellulaire sur les lignées HeLa et RAW264.7 montrent l'absence de cytotoxicité. Les auteurs évoquent la poursuite de leurs recherches par des tests *in vivo*. Pour mettre au point des objets théranostiques, l'équipe d'O. Tillement a synthétisé des nanoparticules de taille inférieure à 5 nm pouvant être utilisées comme agent de contraste  $T_1$  en IRM et comme radioamplificateur<sup>57</sup>. Ces particules sont appelés AguiX®. Nous développerons d'avantage l'aspect radiothérapie dans la partie II.2. Ces nanoparticules constituées d'un cœur de silice avec des chélates de  $\text{Gd}^{\text{III}}$  (DOTAGA) sont obtenues par un procédé original (Fig.I-27) qui passe par une étape de dissolution d'un cœur de  $\text{Gd}_2\text{O}_3$  et une fragmentation de la coquille de silice. Les auteurs évoquent une diminution de la taille des particules avec l'augmentation du taux de DOTAGA greffé. En effet, à faible concentration en DOTAGA, les objets ont tendance à s'agglomérer à cause de la faible hydrophilie des particules.

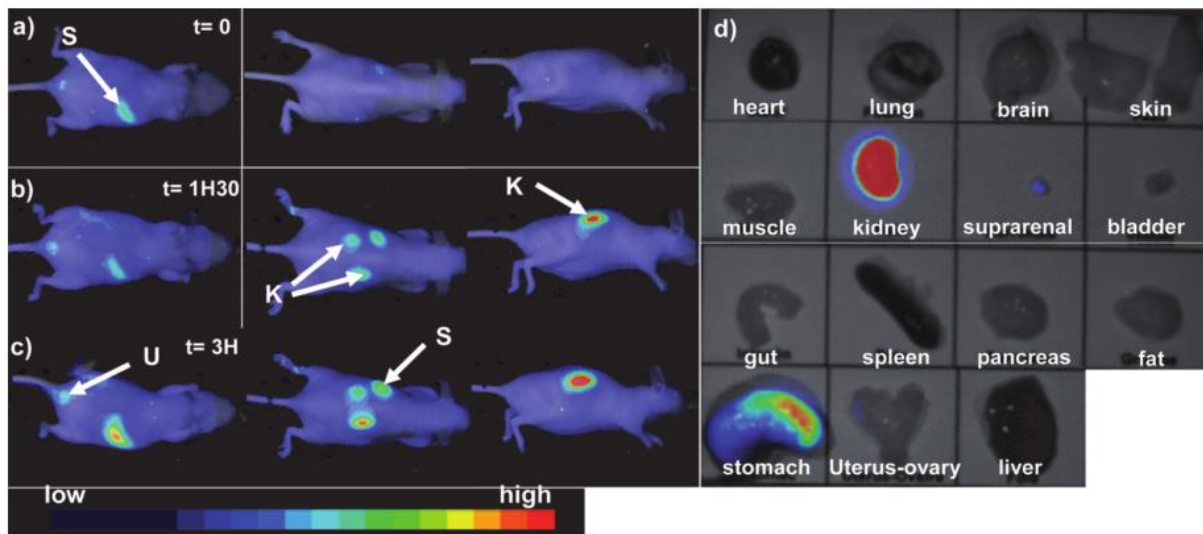
Les objets finaux ont des diamètres hydrodynamiques de 3 nm permettant une circulation rapide dans le sang et une élimination par les reins.





**Figure I-27.** (a) Etapes détaillées de la synthèse des nanoparticules d'AguiX®; (b) Représentation des nanoparticules d'AguiX (Si jaune, O rouge, C bleu clair, N bleu, Gd vert, H blanc)<sup>57</sup>

Comme le montre la figure I-27, il y a environ 30% des cycles DOTA qui sont libres, ce qui permet d'envisager une multimodalité de ces objets<sup>58</sup>. La relaxivité longitudinale de cette nano-plateforme est de  $11,9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  à 60 MHz. Grâce à la présence de cystéine<sup>55</sup>, la biodistribution a pu être suivie *in vivo* par fluorescence, montrant une accumulation rapide dans les reins puis dans la vessie. Ces résultats ont été confirmés par un suivi IRM *in vivo*.



**Figure I-28.** Images de fluorescence d'une souris « swiss nude » (a) avant ; (b) 90 min ; (c) 3h après injection à  $[\text{Gd}^{3+}] = 10\text{mM}$  (S= estomac, K=reins, U= urine) (d) Images de fluorescence des organes après dissection des souris injectées. La fluorescence détectée dans l'estomac est liée à l'alimentation des souris<sup>58</sup>

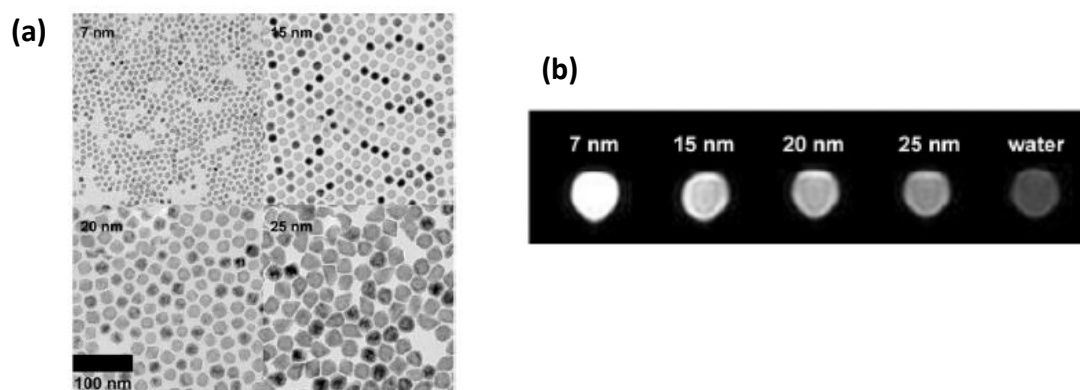
Les particules d'AguiX® ont fait l'objet de nombreuses publications montrant leur non-toxicité, leur biocompatibilité, leur performance en radiothérapie, etc.<sup>55,59,60</sup> mais aussi de brevets. L'ensemble de ces études ont conduit à la création de la start-up NHTherAguiX®. Les nanoparticules d'AguiX® sont, actuellement en phase clinique II pour l'étude de métastase cérébrale et viennent d'être autorisées à être testées en phase I pour le cancer du col de l'utérus.

Ces nano-plateformes représentent un des rares exemples de nanoparticules à l'essai au niveau clinique. Ceci montre l'intérêt de la communauté médicale pour les nanoobjets.

Un autre type de nanoparticules a émergé consistant à utiliser une matrice de silice mésoporeuse. Un premier exemple est le travail de Lin et al. qui met en avant un système composé de chélates de  $Gd^{III}$  sur une nanosphère de silice poreuse. La relaxivité longitudinale de ces objets est de  $28,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et la relaxivité transversale est de  $65,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,<sup>61</sup>. Ces valeurs de relaxivité élevées en font des systèmes prometteurs en tant qu'agents de contraste  $T_1$  mais aussi  $T_2$ , selon ce que l'on cherche à observer. Gérion et al. ont mis au point des particules constituées d'un cœur de quantum dots (CdSe/ZnS) ou d'or sur lequel un film de silice ( $SiO_2$ ) est greffé. Des chélates de Gd-DOTA sont ensuite liés de manière covalente à l'ensemble. La présence des complexes de  $Gd^{III}$  n'interfère pas avec les propriétés de fluorescence du cœur. Les valeurs de relaxivité dépendent du nombre d'ions  $Gd^{3+}$  greffés à la surface. Pour une particule de 8 nm, la relaxivité longitudinale par  $Gd^{III}$  est de  $23 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .<sup>62</sup> Ce type de particules, par la présence de quantum dots ou d'or permet de suivre le devenir des particules par des techniques optique (fluorescence). Les auteurs soulignent l'importance d'optimiser leur objet pour voir leur performance en *in vivo*.

#### 1.3.4.4 Nanoparticules de $Mn^{II}$

Na et al. ont été les premiers à s'intéresser aux nanoparticules d'oxyde de manganèse  $MnO$  comme agent de contraste  $T_1$ .<sup>63</sup> Cet objet est antiferromagnétique et n'a donc pas de susceptibilité magnétique. Les particules ont été synthétisées par décomposition thermique puis encapsulées dans une coquille de (PEG)-phospholipidique. Ces particules ont une taille comprise entre 7 et 25 nm et des images de contraste à 7T des particules en solution aqueuse ont été effectuées (Fig. I-29).



**Figure I-29.** (a) Images MET des particules  $MnO$  en solution aqueuse de 7, 15, 20 et 25 nm ; (b) Images de contraste pondérées en  $T_1$  à 7T des NPs de  $MnO$ <sup>63</sup>

L'effet des particules sur la relaxivité est directement lié au nombre d'ions  $Mn^{2+}$  à la surface. Des images de contraste *in vivo* ont été effectuées, montrant clairement la structure anatomique du cerveau. La présence des particules de  $MnO$  dans le cerveau a été prouvée grâce à des images de MET. Des premiers tests de toxicité vraiment encourageants ont permis à ce travail préliminaire de faire émerger ces systèmes prometteurs. En 2010, une équipe de recherche a réussi à mettre au point des NPs de  $MnO$  par une méthode « one-pot »<sup>64</sup>. Les particules sont enrobées par un surfactant hydrosoluble et la relaxivité longitudinale mesurée à 1,5 T est de  $7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . De plus, ces particules ont l'avantage d'avoir un contraste dans tous les organes contrairement aux particules de Na et al. qui présentaient un contraste uniquement dans le foie et la rate.

Ces objets peuvent être fonctionnalisés afin d'en faire des agents multimodaux. Il est par exemple possible de combiner imagerie IRM et imagerie optique<sup>65</sup>. Huang et al. ont mis au point des particules de MnO entourées d'albumine et fonctionnalisées par du <sup>64</sup>Cu-DOTA. Ces objets ont une relaxivité 5 fois plus importante que les objets développés par Nu et al. et une activité en tomographie par émission de positon (TEP) non négligeable. Les auteurs suggèrent que leur importante valeur de relaxivité est due à la présence de l'albumine qui permet une diffusion optimale des molécules d'eau.

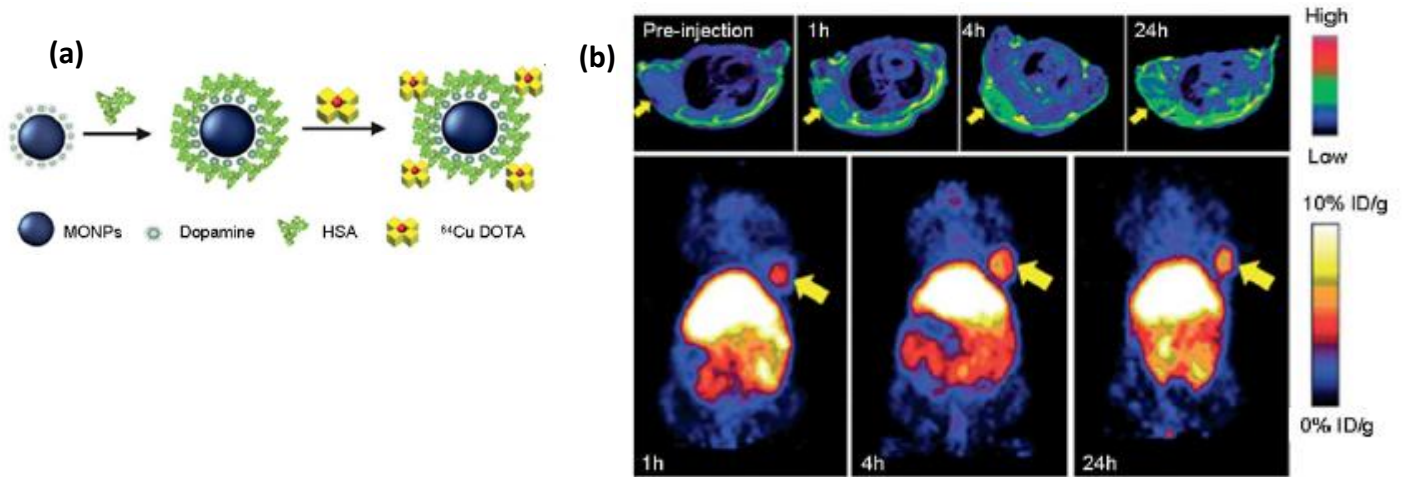


Figure I-30. (a) Formation des nanoparticules de MnO@HSA-<sup>64</sup>Cu-DOTA; (b) Images de contraste pondérées en T<sub>1</sub> (haut) et images TEP (bas), 0, 1, 4 et 24h après l'injection des particules dans des cellules tumorales U87MG de souris<sup>66</sup>

Il est important de préciser que certaines recherches ont été menées sur le Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>22</sup>. Afin d'augmenter encore la relaxivité, des chercheurs ont joué avec la structure du MnO en synthétisant des particules creuses afin de maximiser les interactions entre les ions Mn<sup>2+</sup> de surface et les molécules d'eau<sup>67</sup>. Ainsi le traitement thermique (300°C) de nanoparticules de MnO en présence d'oxyde de trioctylphosphine permet l'obtention de ces particules creuses de MnO (Fig. I-31).

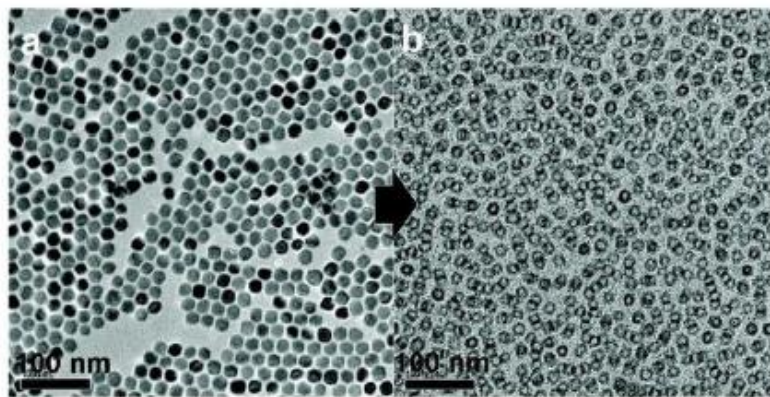
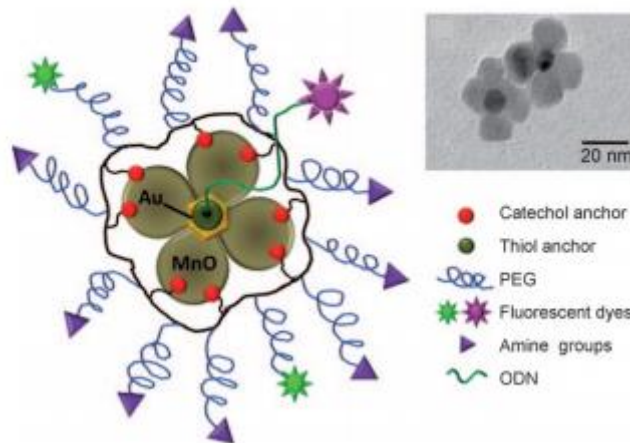


Figure I-31. Images MET (a) avant et (b) après traitement thermique des particules de MnO<sup>67</sup>

L'accès des molécules d'eau aux ions paramagnétiques est facilité par les nanoparticules creuses. Ainsi, la relaxivité est améliorée de 0,35 à 1,15 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> pour des objets de 20 nm de diamètre. Des essais d'encapsulation de particules de MnO dans une coquille de silice, MnO@SiO<sub>2</sub>, suivi d'un traitement thermique à 60°C en présence d'éthylacétate et d'hydroxyde de sodium ont donné lieu à des systèmes creux, H-MnO@mSiO<sub>2</sub><sup>68</sup>.

La couche de silice a le désavantage d'empêcher une bonne diffusion des molécules d'eau d'où des valeurs de relaxivité faible ( $0,99 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  à  $11,7 \text{ T}$ ).

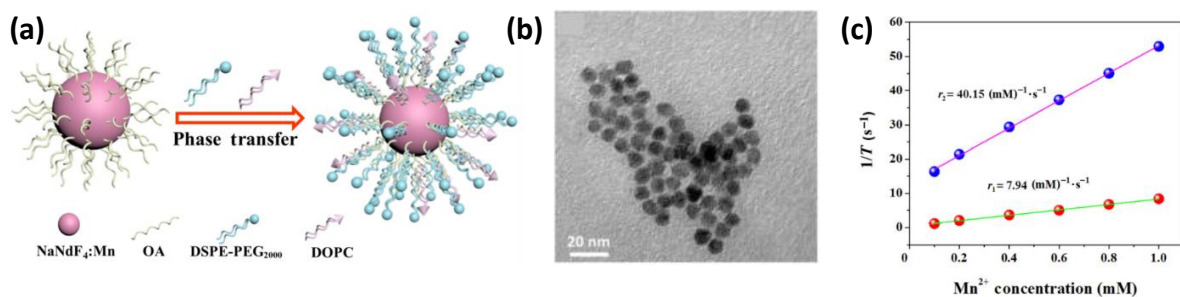
Une autre stratégie envisagée pour augmenter les performances de ces particules est la combinaison de celles-ci avec une autre espèce métallique. Un système bimodal avec des nanobâtonnets d'or (détection optique) et des NPs de MnO (IRM) a été mis au point par Schladt<sup>69</sup>. Il est aussi possible de fonctionnaliser la surface de ces objets afin de leur conférer des propriétés thérapeutiques.



**Figure I-32.** Particule Au@MnO fonctionnalisée afin de cibler certains récepteurs tumoraux ; Image MET des NPs<sup>69</sup>

Shapiro et Koretsky ont étudié des particules d'oxyde et de carbonate de  $\text{Mn}^{\text{II}}$  afin d'expliquer le contraste  $T_1$ <sup>70</sup>. Selon les auteurs, le contraste brillant serait dû à une libération lente des  $\text{Mn}^{\text{II}}$  après dissolution de la particule en présence des endosomes (pH acide). Des expériences ont montré le relargage d'ion libre  $\text{Mn}^{2+}$  en milieu acide. Ce mécanisme serait le même que celui trouvé dans le complexe commercial Mn-DPDP.

D'autres types de nanoparticules dopées au  $\text{Mn}^{\text{II}}$  ont été étudiés. Par exemple, en 2018, Wang et al. ont publié l'étude de nanocristaux de  $\text{NaNdF}_4$  dopés au  $\text{Mn}^{2+}$  comme sonde pour l'imagerie de fluorescence et l'IRM.



**Figure I-33.** (a) Représentation schématique des NPs  $\text{NaNdF}_4:\text{Mn}$  avec PEG ; (b) Image MET de  $\text{NaNdF}_4:\text{Mn}$  en solution aqueuse ; (c) Relaxivités  $r_1$  et  $r_2$  d'une solution aqueuse de  $\text{NaNdF}_4:\text{Mn}$  à  $11,7 \text{ T}$ <sup>71</sup>

Les particules sont synthétisées par décomposition thermique à haute température de précurseurs dans des solvants organiques. La surface des particules est modifiée par un phospholipide de type PEG permettant de travailler en phase aqueuse.

Leur diamètre hydrodynamique est de 14 nm en DLS pour une taille en microscopie de 4,5 nm. La relaxivité longitudinale est de 7,9 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> à 11,7 T, ces performances sont nettement améliorées par rapport aux agents cliniques et aux particules d'oxyde de manganèse creuses<sup>71</sup>. La présence de PEG permet d'améliorer l'échange des molécules d'eau. Des tests *in vitro* montrent la non toxicité de ces particules et des premiers tests *in vivo* confirment leur efficacité en tant qu'agent de contraste T<sub>1</sub>. Cependant, aucune étude de biodistribution n'est décrite. Au vu du diamètre hydrodynamique, une élimination par les reins ne peut être garantie.

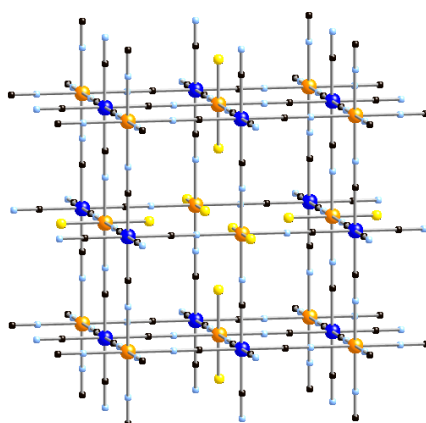
Dans le cas du Mn<sup>II</sup> comme du Gd<sup>III</sup>, des systèmes basés sur des polymères de coordination comme les bleus de Prusse ont été développés, ceux-ci seront explicités dans la partie suivante.

## II. Le bleu de Prusse et ses analogues

### II.1 Structure et propriétés du bleu de Prusse et de ses analogues

#### II.1.1 Le bleu de Prusse

Le bleu de Prusse (BdP), considéré comme le premier composé de coordination, est un pigment de couleur bleue caractéristique. Il a été découvert à Berlin au début du XVIII<sup>ème</sup> siècle. Il est obtenu par coprécipitation d'une solution aqueuse de chlorure de fer (III) et d'une solution d'hexacyanoferrate (II) de potassium. Sa formule générale est Fe<sup>III</sup><sub>4</sub>[Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>]<sub>3</sub>.15H<sub>2</sub>O ou K<sub>4x</sub>Fe<sup>III</sup>[Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>]<sub>(3+x)</sub>, dans sa forme soluble. Sa structure cristallographique a été élucidée bien plus tard par Buser et al.<sup>72</sup>. Ce composé de coordination cristallise dans un réseau tridimensionnel cubique à face centré (groupe d'espace Fm3m) et de paramètre de maille a= 10,17Å. Les atomes de fer (ferreux et ferrique) sont liés par des ponts cyanures. Pour que l'électroneutralité soit assurée dans le réseau, une stœchiométrie [4:3] s'impose d'où la présence de lacunes non ordonnées en ferrocyanure (*Fig. I-34*). La distance élevée entre les ions, imposée par les ponts cyanure, crée une porosité dans le réseau pouvant accueillir un certain nombre de molécules d'eau zéolitiques ou des ions alcalins.



**Figure I-34.** Représentation de la structure cristallographique du bleu de Prusse ; Fe<sup>III</sup> (orange), Fe<sup>II</sup> (bleu foncé), C (noir), N (bleu clair), O (jaune). (H et H<sub>2</sub>O ne sont pas représentés)

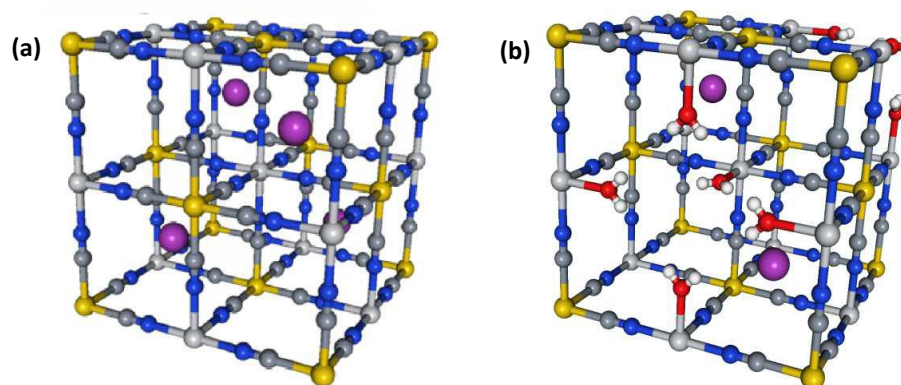
Le caractère  $\sigma$ -donneur/ $\pi$ -accepteur du côté carbone et  $\sigma$ -donneur/faiblement  $\pi$ -donneur du côté azote du ligand *ciano*, impose respectivement une configuration bas spin et haut spin des ions Fe<sup>II</sup>( $t_{2g}$ )<sup>6</sup>( $e_g$ )<sup>0</sup> et Fe<sup>III</sup>( $t_{2g}$ )<sup>3</sup>( $e_g$ )<sup>2</sup>. La couleur bleue caractéristique de ce pigment est due à une large et intense bande d'intervallence à 700 nm ( $\epsilon > 5000$  L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> par rapport au Fe<sup>III</sup>)<sup>73</sup>.



L'origine de cette bande, interprétée par M.R. Robin, correspond à la transition de l'état fondamental  $\{Fe^{II}[(t_{2g})^6]Fe^{III}[(t_{2g})^3(e_g)^2]\}$  vers l'état excité  $\{Fe^{III}[(t_{2g})^5]Fe^{II}[(t_{2g})^4(e_g)^2]\}$ <sup>74,75</sup>. La valence des ions est donc légèrement délocalisée, ce qui place ce composé parmi les complexes à valence mixte de classe II. Malgré la distance importante de 10.17Å entre les ions  $Fe^{III}$ , il existe un ordre ferromagnétique en dessous d'une température de Curie de 5.6 K. Cette faible interaction d'échange est liée au mélange des états excités et fondamentaux  $\{Fe^{III}[(t_{2g})^5]Fe^{II}[(t_{2g})^4(e_g)^2]\}$  et  $\{Fe^{II}[(t_{2g})^6]Fe^{III}[(t_{2g})^3(e_g)^2]\}$ <sup>76</sup>.

### II.1.2 Les analogues de bleu de Prusse

Il est possible de substituer les ions  $Fe^{2+}$  et les ions  $Fe^{3+}$  par d'autres ions di- et trivalents de la première série des métaux de transition ( $Ni^{II}$ ,  $Co^{II/III}$ ,  $Mn^{II}$ ,  $Cr^{II/III}$ , etc. ...). Ceci a permis de mettre au point une nouvelle famille de composé diversifiée : les analogues de bleu de Prusse (ABP). La formule générale de ces composés est  $A_xM_4^{II/III}[M'^{III/II}(CN)_6]_{(8+x)/3}\square_{(4-x)/3}.nH_2O$  où A est un cation alcalin et  $\square$  représente les lacunes intrinsèques en hexacyanométallates. Le taux de lacune et la structure du composé sont fonction de la quantité et de la nature des alcalins insérés.



**Figure I-35.** Structures des analogues de bleu de Prusse  $A_xM_4^{II/III}[M'^{III/II}(CN)_6]_{(8+x)/3}\square_{(4-x)/3}.nH_2O$  : **(a)** pour  $x=4$  et **(b)** pour  $x<4$  ; M' (jaune), M (gris clair), C (gris foncé), N (bleu) et cation alcalin (violet). Les molécules d'eau coordonnées sont représentées en rouge et blanc

Pour  $x=4$ , la structure est un réseau cubique à faces centrées non lacunaire avec une alternance des ions M et M' reliés via des ponts cyanures. Les cations alcalins se trouvent dans les sites tétraédriques de la structure (Fig. I-35.(a)).

Concernant les stœchiométries  $x<4$ , la structure est lacunaire en hexacyanométallate c'est-à-dire en entité  $[M'(CN)_6]$ . Ainsi, les ions M complètent leurs sphères de coordination par des molécules d'eau (Fig. I-35.(b)). En se limitant à la première série des métaux de transition, il existe déjà un grand nombre de couples M/M' possibles et de multiples composés  $A_xM^{II}[M'^{III}(CN)_6]_y.nH_2O$  sont envisageables. L'ion hexacyanométallate est en configuration bas spin tandis que l'ion métallique coordonné aux atomes d'azote des ligands cyano et d'oxygène des molécules d'eau est en configuration haut spin (sauf dans le cas du  $Co^{III}$ ).

Tous ces composés ont de nombreuses propriétés (commutation photo-induite, magnétisme, électrochromisme, etc....) permettant d'envisager des applications très variées<sup>77</sup>.

## II.2 Vers les agents de contraste

### II.2.1 Intérêt de ces réseaux de coordination

L'objectif des travaux amorcés au laboratoire, il y a plusieurs années, est de synthétiser des agents de contraste pour l'IRM et de les optimiser afin d'en faire des objets multimodaux et thérapeutiques. Les réseaux d'analogues de bleu de Prusse présentent plusieurs avantages pour devenir d'excellents agents de contraste de type T<sub>1</sub> pour l'IRM<sup>77</sup> :

- Ces réseaux ont une structure tridimensionnelle et une taille nanométrique donnant lieu à une précession solidaire de l'objet (mobilité du réseau). Ainsi, le temps de corrélation  $\tau_R$  est plus long ;
- La proportion d'atomes en surface est plus importante pour ce type de structure que pour des particules d'oxyde ou de métal pur. Cela s'explique par la faible densité métallique du réseau. Pour une même taille de particule, 60% des atomes sont en surface pour une nanoparticule de bleu de Prusse contre seulement 30% des atomes pour une particule de métal ou d'oxyde pur. Dans l'hypothèse d'une activité exclusive des ions de surface, il est alors possible de limiter la quantité de métaux enfouis dans les couches internes qui ne participe que de manière négligeable à la relaxivité ;
- Le fait d'utiliser un réseau tridimensionnel permet au cation paramagnétique d'avoir dans sa sphère de coordination plus d'une molécule d'eau, sans perturber la stabilité du réseau, tout en améliorant les performances en relaxivité ;
- La microporosité de ces réseaux permet d'envisager une contribution non nulle des atomes localisés ailleurs qu'en surface, même si l'activité des ions de surface reste prédominante ;
- Enfin les analogues du bleu de Prusse offrent une grande versatilité permettant ainsi de varier la composition chimique. De plus, l'enrobage des nanoparticules peut aussi être modulé pour optimiser les propriétés de relaxivité en associant d'autres fonctionnalités d'imagerie et/ou de thérapie au sein du même nano-objet.

En 2010, Shokouhimehr et al. ont étudié les propriétés du bleu de Prusse en tant qu'agent de contraste T<sub>1</sub>. La synthèse des NPs se fait en présence d'acide citrique pour éviter toute agrégation et contrôler la taille des particules. L'acide citrique se lie de manière covalente à la surface du réseau, ce qui peut être problématique pour toute fonctionnalisation éventuelle de celle-ci (Fig. I-36(b)). Les objets font une taille d'environ 13 nm et sont très stables, particulièrement en milieu acide.

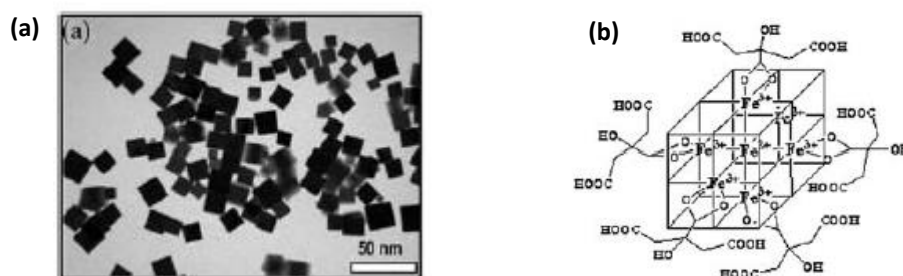


Figure I-36. (a) Image MET des particules de BdP ; (b) Structure du BdP entouré de citrate<sup>78</sup>

La relaxivité de ces objets reste plus faible que le Gd-DTPA ( $r_1=0,20 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  à  $1,5\text{T}$ )<sup>78</sup>. Malgré un spin de 5/2 pour les ions  $\text{Fe}^{3+}$  haut spin, ces faibles valeurs peuvent s'expliquer par le temps de relaxation électronique du  $\text{Fe}^{\text{III}}$  qui est de  $10^{-9}$ - $10^{-11}$ s. Pour comparaison, les temps de relaxation électronique du  $\text{Mn}^{\text{II}}$  et du  $\text{Gd}^{\text{III}}$  sont  $10^{-8}$  et  $10^{-9}$ s respectivement <sup>8</sup>.

Cependant, ces particules présentent un avantage non-négligeable : leur toxicité est très faible voire inexistante (Fig. I-37(a)). Leur efficacité en tant qu'agent de contraste a été testée sur des cellules HeLa, et semble prometteuse (Fig. I-37(b)).

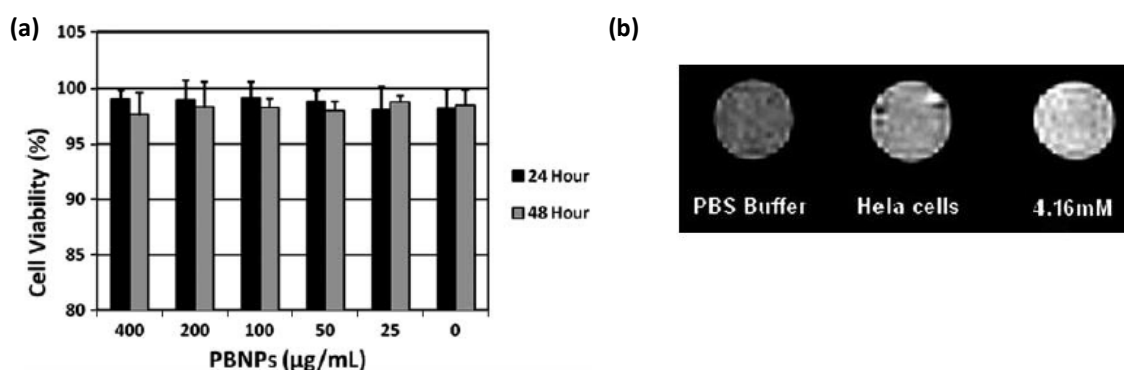


Figure I-37. (a) Viabilité cellulaire de cellules HeLa en présence de BdP; (b) Image de contraste d'un blanc avec PBS, des cellules HeLa non traitées et des cellules HeLa en présence de BdP<sup>78</sup>

Cette étude suggère que le dopage des réseaux bleu de Prusse par un ion paramagnétique peut être une stratégie pour améliorer la relaxivité. De plus, l'évolution de la médecine vers une médecine personnalisée conduit à combiner diagnostic et thérapie. Le bleu de Prusse peut aussi présenter un intérêt en tant qu'agent thérapeutique. Il est, en effet, utilisé, sous le nom de Radiogardase®, comme médicament dans la décontamination au  $^{137}\text{Cs}$  ou au Tl. Une équipe de recherche a travaillé sur une structure nanoporeuse de BdP permettant d'insérer un principe actif, le cisplatine, dans ces pores<sup>79</sup>. La nanostructure seule n'est pas toxique pour les cellules mais la présence de cisplatine va permettre (par une réaction avec l'ADN) de tuer les cellules tumorales.

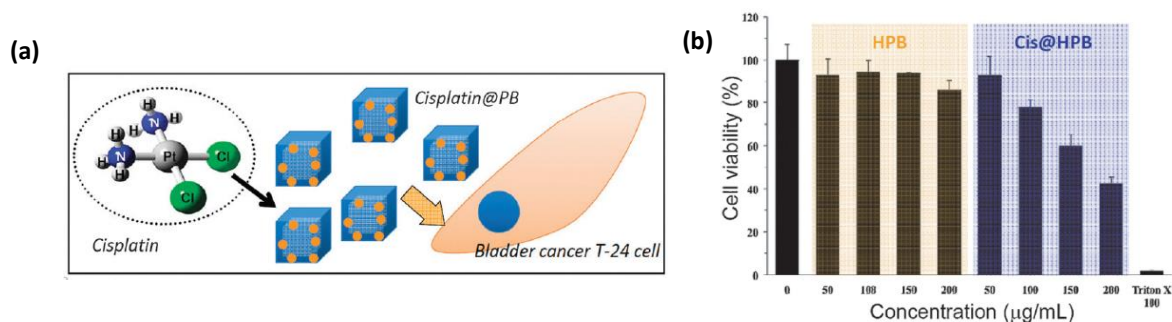


Figure I-38. (a) Schéma des particules de BdP nanoporeuses contenant du cisplatine ; (b) Viabilité cellulaire de T24 déterminée par MTT avec et sans cisplatine dans les particules de BdP<sup>79</sup>.

## II.2.2 Réseaux à ponts cyanures à base de $\text{Gd}^{\text{III}}$

L'équipe a mené des travaux utilisant des nanoparticules à base de  $\text{Gd}^{\text{III}}$  pour l'IRM dès 2006, mais les études n'ont donné lieu à des résultats satisfaisants que récemment.



Le problème rencontré initialement était le caractère fortement oxophile du  $Gd^{III}$ , qui entraîne une forte solubilité des réseaux  $Gd^{III}Fe^{II}$  dans l'eau.

La structure des réseaux de lanthanides n'est pas cubique à face centrées comme le montre la figure I-39. La maille des réseaux  $KGd(H_2O)_2[Fe(CN)_6]$  (abrégé  $Gd^{III}Fe$ ) est orthorhombique. Les ions  $Gd^{3+}$  se trouvent dans un environnement prisme trigonal formé par 4 atomes d'azote des cyanures, et des molécules d'eau complètent la sphère de coordination. L'ion  $Fe^{2+}$  se trouve dans un octaèdre formé par les groupements CN.

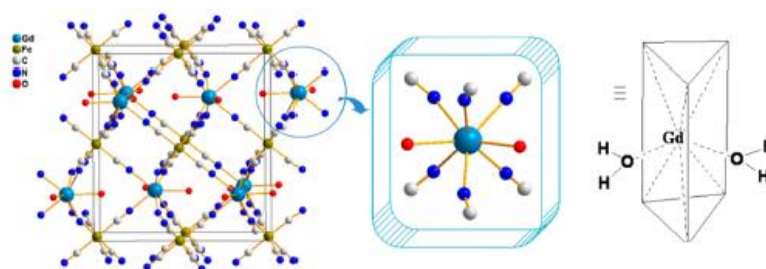


Figure I-39. Représentation schématique de la structure  $Gd^{III}Fe$  (Gd, Fe, C, N, O)<sup>80</sup>

Toutefois, des résultats très encourageants ont été obtenus par l'équipe de Larionova et Guari, dès 2007, en confinant la croissance de ce réseau dans une matrice chitosan. Des nanoparticules de 10 nm sont obtenues. Une valeur de relaxivité d'environ  $20 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  à 60 MHz est mesurée, mais la solubilisation des composites se fait en milieu acide ( $\text{pH}=4-5$ )<sup>81</sup>, ce qui reste un point délicat. Le relargage éventuel n'est pas évoqué.

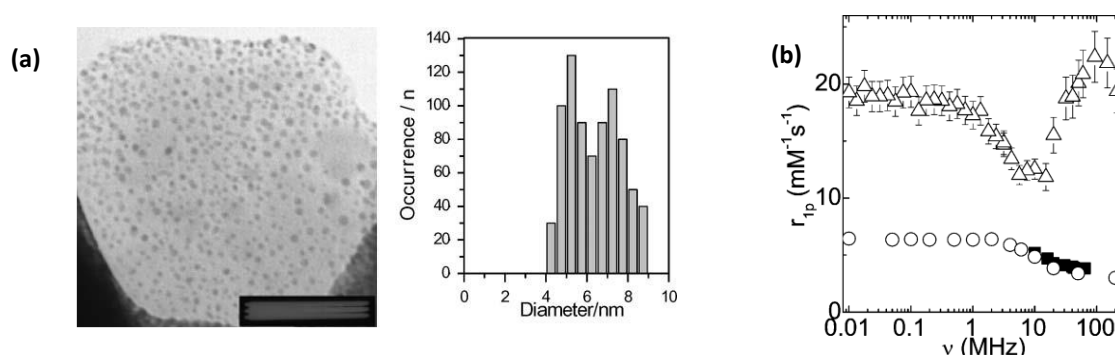
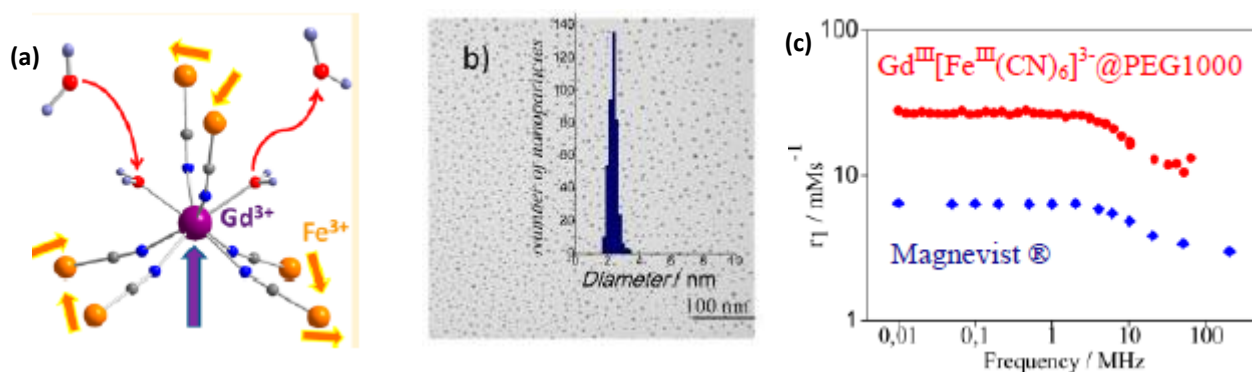


Figure I-40. (a) Image MET et distribution en taille des particules obtenues par Guari et al. ; (b) Mesure de relaxivité en fonction de la fréquence ( $\Delta$  particules de Gd ;  $\bullet$  Omniscan<sup>®</sup> ;  $\circ$  Gd-DTPA)<sup>81</sup>

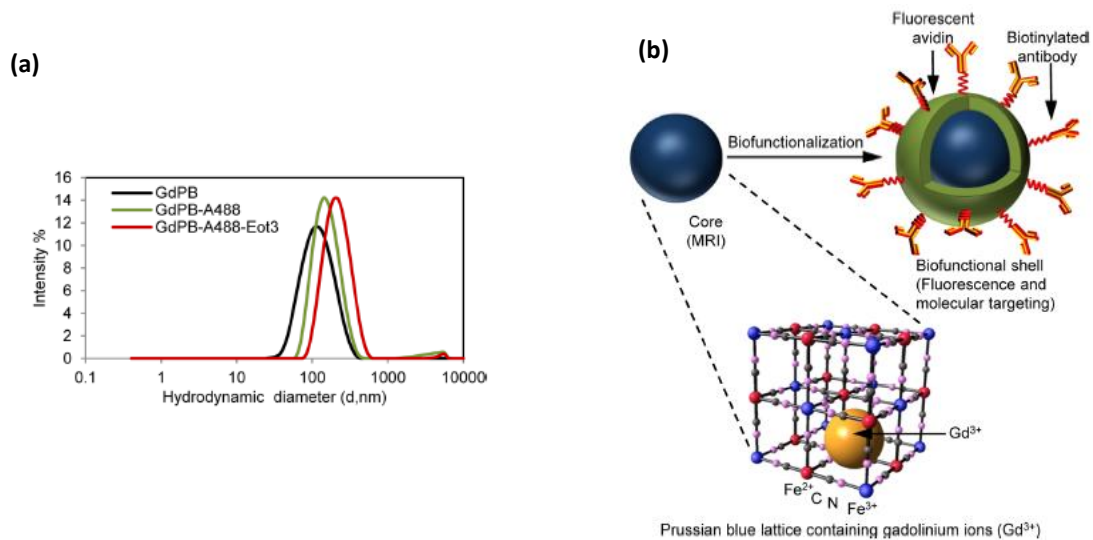
La même équipe s'est intéressée, en 2013, à l'influence de la nature de l'enrobage et a étudié l'effet sur la relaxivité de la présence d'un autre centre paramagnétique à proximité de l'ion  $Gd^{3+}$ . Des nanoparticules de formule  $Gd^{III}[M^{II/III}(CN)_6]$  avec  $M=Fe$  ou  $Co$  ont été synthétisées avec une taille comprise entre 2,1 et 3,4 nm quelle que soit la composition. La relaxivité optimale a été obtenue pour les nanoparticules  $Gd^{III}[Fe^{III}(CN)_6]^{3-}@PEG1000$ . La relaxivité longitudinale, mesurée à 300 K et 4,7 T, est de  $13,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .<sup>82</sup> Cette valeur est intéressante mais reste inférieure aux particules enrobées de dextran et redispersibles à  $\text{pH}=4$ .



**Figure I-41.** (a) Représentation schématique de l'environnement du  $Gd^{III}$  ; (b) Image MET et distribution de taille des nanoparticules  $Gd^{III}[Fe^{III}(CN)_6]^{3-}@PEG1000$ ; (c) Profils enregistrés à 298K des particules  $Gd^{III}[Fe^{III}(CN)_6]^{3-}@PEG1000$  et du Magnevist<sup>®</sup>.<sup>82</sup>

Les auteurs montrent que l'échange des molécules d'eau peut être influencé par la nature et la situation des ligands en surface de la NPs. De plus, la proximité d'un ion paramagnétique coordonné au  $Gd^{III}$  via les ligands cyanure comme le  $Fe^{III}$  ( $S=5/2$ ) a une influence positive sur la relaxivité. En effet, la relaxivité des particules de formule  $Gd^{III}[Co^{II}(CN)_6]^{3-}@PEG1000$  de même taille mais présentant un centre diamagnétique est 2,5 fois inférieure. Cette équipe a continué de développer des systèmes de type  $Gd^{III}[Fe^{III}(CN)_6]^{3-}$  en modifiant l'enrobage. Ainsi, en 2015, elle a mis au point des nanoparticules  $Gd^{III}[Fe^{III}(CN)_6]^{3-}$  enrobées par du D-mannitol ayant la particularité d'être soluble dans l'eau<sup>83</sup>. Ces objets de 3,4 nm, d'après des mesures en MET, ont une relaxivité longitudinale de  $11,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et un rapport  $r_2/r_1$  proche de 1<sup>84</sup>. Hormis des valeurs de relaxivité intéressantes, ces NPs ont montré, par des tests *in vivo*, des contrastes nettement améliorés, par rapport aux agents commerciaux, à des doses faibles en ions  $Gd^{3+}$  ( $0,003 \text{ mmol/kg}$ ) et un temps de rétention important dans le système sanguin. Des dosages par ICP-MS ont montré que 0,3% du  $Gd^{III}$  se retrouvait dans les urines après quelques heures et 19,5% dans les selles après quelques jours. Après 16h, 50% du  $Gd^{III}$  a été éliminé avec une accumulation importante dans le foie. Des études devront être menées afin de savoir comment est éliminée l'autre partie du  $Gd^{III}$  contenue dans l'organisme.

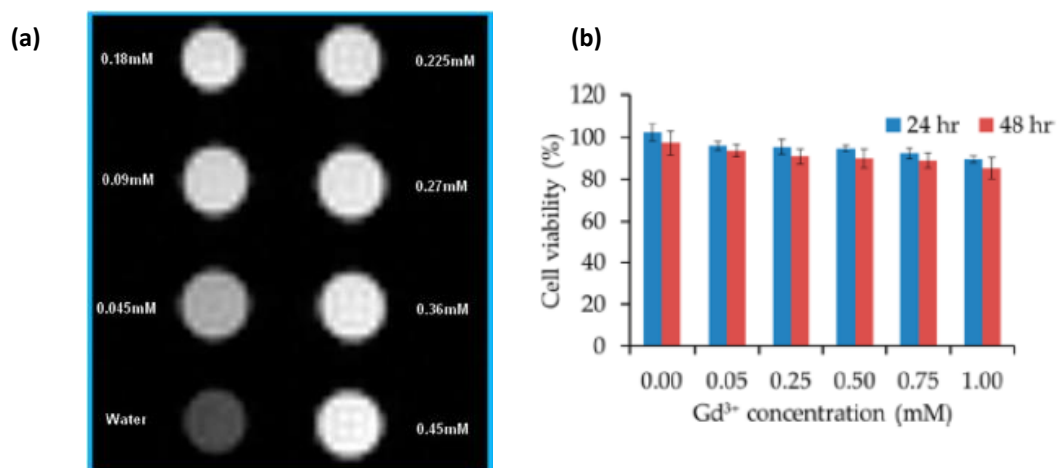
En 2013, Dumont et al. ont mis au point des nanoparticules de type cœur-coquille avec un cœur de bleu de Prusse contenant du  $Gd^{III}$  et une coquille biofonctionnalisée avec des fluorophores. Les cœurs de BdP dopés ont une taille de 33 nm en MET et les particules fonctionnalisées ont un diamètre supérieur à 100 nm<sup>85</sup>. Ces objets ont des relaxivités particulièrement élevées ( $38,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  à 3T), bien supérieures au bleu de Prusse seul ou au Gd-DTPA. Les auteurs suggèrent que le  $Gd^{III}$  s'insère dans les sites interstitiels de la structure CFC du BdP (Fig. I-42 (b)). Le diamètre hydrodynamique important explique les valeurs de relaxivité.



**Figure I-42.** (a) Evolution de la taille des particules en DLS (Dynamic light scattering) en fonction des enrobages; (b) Représentation schématique des particules et de leurs fonctionnalisations. La composition des particules déterminée expérimentalement est  $K_{0,53}Gd_{0,89}Fe^{III}_4[Fe^{II}(CN)_6]_{3,8}.1,2 H_2O$ <sup>85</sup>

La cytotoxicité des objets non fonctionnalisés a été évaluée sur la lignée cellulaire OE-21. Aucune toxicité ni aucun relargage des ions  $Gd^{3+}$  n'ont été reportés.

Perera et al. ont également obtenu des valeurs de relaxivité importantes ( $r_1=35 \text{ mM}^{-1}.s^{-1}$  à 60 MHz) pour des particules de  $Gd^{III}[Fe^{II}(CN)_6]$  de 25 nm, stabilisées par du citrate et du polyvinylpyrrolidone (PVP)<sup>80</sup>. Les contrastes pondérés en  $T_1$  sont bons à faible concentration et leurs intensités augmentent avec la concentration en  $Gd^{III}$  (Fig. I-43 (a)). De plus, des tests MTT ont été menés sur des cellules HeLa montrant plus de 90% de cellules viables 48h après l'injection des nanoparticules à 1 mM en ions  $Gd^{3+}$  (Fig. I-43(b)).

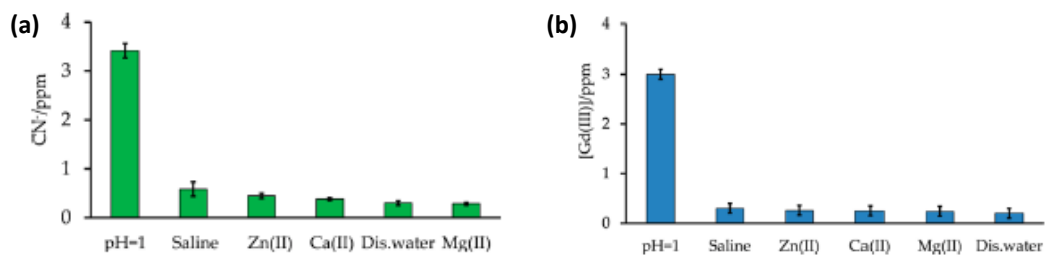


**Figure I-43.** (a) Images de contraste pondérées en  $T_1$ ; (b) Viabilité cellulaire en fonction de la concentration en  $Gd^{III}$ <sup>80</sup>

Les valeurs de relaxivité sont étonnantes compte tenu de la taille des NPs. En effet, le temps de corrélation rotationnel est augmenté mais beaucoup d'ions  $Gd^{3+}$  sont alors enfouis et ne peuvent pas participer efficacement à l'exaltation de la relaxivité.

Une des explications pourrait être l'agrégation partielle des particules lors de la redispersion conduisant à des temps de corrélation rotationnel très élevés. Aucune mesure du diamètre hydrodynamique des particules par DLS n'est reportée dans l'article.

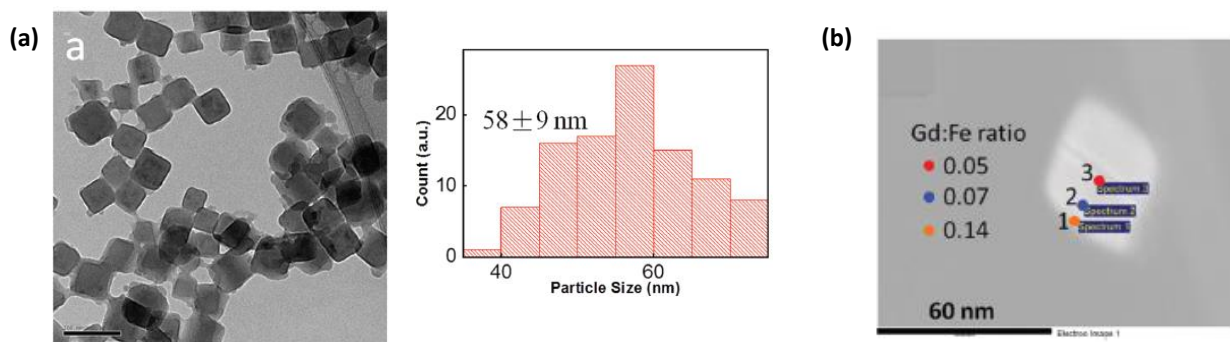
Le relargage de groupements CN<sup>-</sup> libres ainsi que d'ions Gd<sup>3+</sup> a également été analysé par ICP dans différentes conditions (*Fig. I-44*). Ils sont très faibles, inférieurs à 1 ppm et même dans des conditions très acides (pH=1), ils restent inférieurs à 4 ppm. Ces résultats laissent supposer une stabilité cinétique et thermodynamique de ces NPs en milieu physiologique.



**Figure I-44.** Relargage (a) des CN<sup>-</sup> ; (b) des ions Gd<sup>3+</sup> libres dans différentes conditions<sup>80</sup>

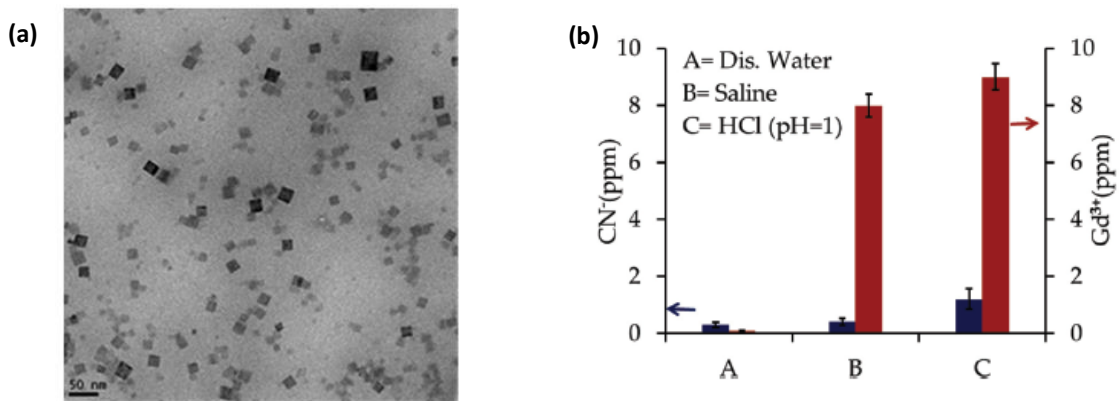
Très récemment, Li et al. ont publié l'étude de nanoparticules de bleu de Prusse contenant un gradient de concentration en Gd<sup>III</sup> dont l'unité formulaire est K<sub>0,3</sub>Gd<sub>0,2</sub>Fe<sup>III</sup>[Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>].4,9H<sub>2</sub>O. Tout comme l'équipe de Dumont, ils proposent une insertion des Gd<sup>III</sup> dans les sites interstitiels de la maille du BdP. Le diamètre hydrodynamique des objets n'est pas communiqué. Les particules de 58 nm, d'après des observations MET, ont une relaxivité de 12,4 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>.<sup>86</sup>

Cette valeur bien plus faible que les objets décrits précédemment s'explique par un enfouissement des Gd<sup>III</sup> comme le montre les analyses EDS effectuées (*Fig. I-45.(b)*) afin de montrer la présence du gradient de concentration.



**Figure I-45.** (a) Image MET et distribution en taille des particules ; (b) Image MET et détermination par EDS des ratios Gd/Fe<sup>86</sup>

Ces systèmes peuvent présenter des propriétés intéressantes en tant qu'agent théranostique, celles-ci seront explicitées dans la partie III. L'équipe de Perera a étudié, en 2016, des nanoparticules de formule K<sub>0,94</sub>Gd<sub>0,02</sub>Fe[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>87</sup> enrobées par le polyéthylène glycol (PEG). Ces particules d'une taille de 24 nm (MET) ont une relaxivité de 16,4 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> à 60 MHz. Ce résultat est cohérent avec les systèmes étudiés par Larionova, la relaxivité est plus faible due à l'enfouissement des Gd<sup>III</sup>. Le relargage des ions libre CN<sup>-</sup> et Gd<sup>3+</sup> a également été étudié par ICP. Celui-ci est négligeable dans l'eau distillée et reste inférieur à 10 ppm pour les Gd<sup>III</sup> y compris à pH=1 (*Fig. I-46 (b)*).



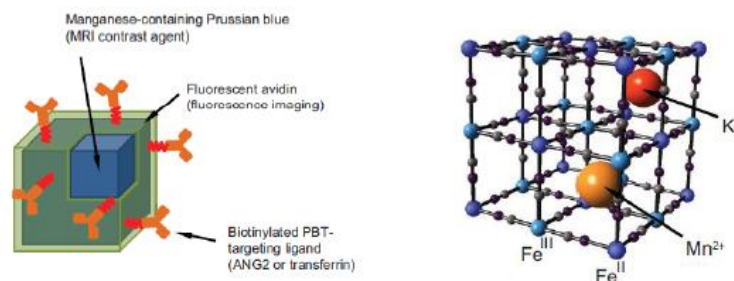
**Figure I-46.** (a) Image MET des particules  $K_{0,94}Gd_{0,02}Fe[Fe(CN)_6]$  ; (b) Relargage des  $CN^-$  (bleu) et des ions  $Gd^{3+}$  (rouge) libres dans différentes conditions<sup>87</sup>

La toxicité des objets a été évaluée sur des cellules HT-29. Après 12h et 24h d’incubation, aucune toxicité n’a été observée. Plus de 96% des cellules sont viables après 24 h d’incubation avec des particules à une concentration de 0,5 mM en  $Fe^{III}$ . Ces résultats ont permis aux auteurs de faire une étude IRM *in vivo*. Environ 5 min après l’administration par voie orale de la suspension de nanoparticules, une augmentation du contraste est observée au niveau de l’estomac de la souris. En absence d’étude de biodistribution et de cinétique d’élimination des particules par l’organisme, il est difficile de conclure quant à la qualité des essais *in vivo*.

### II.2.3 Analogues de bleu de Prusse dopés avec du $Mn^{II}$

Les analogues de bleu de Prusse contenant des ions  $Mn^{2+}$  ont été beaucoup moins étudiés pour les applications en tant qu’agents de contraste.

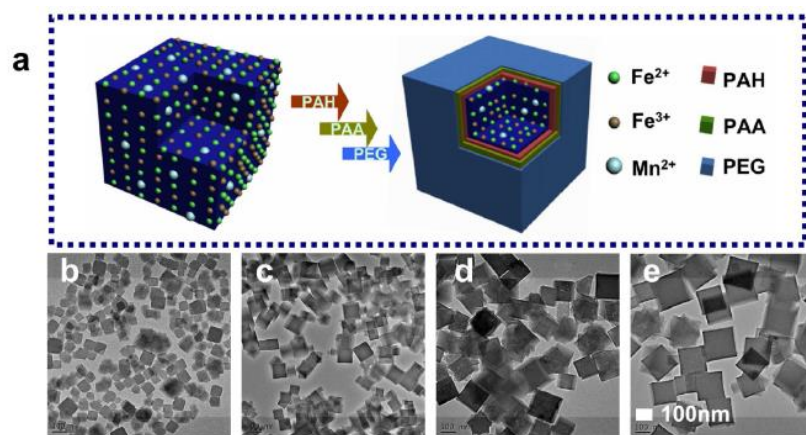
Une étude de Dumont et al. porte sur la synthèse de nanoparticules d’analogue de bleu de Prusse à base de  $Mn^{II}$  comme agent de contraste  $T_1$ . Ces particules de formule  $K_{0,6}Mn_{0,7}Fe^{III}_4[Fe^{II}(CN)_6]_{3,5} \cdot 3H_2O$  ont une taille d’environ 30 nm. Ces particules sont fonctionnalisées par des fluorophores (Alexa Fluor) à base d’avidine sur lesquels sont greffés des groupements permettant de cibler les tumeurs cérébrales. Les auteurs supposent l’insertion des ions  $Mn^{2+}$  dans les sites interstitiels (Fig. I-47) ce qui ne nous paraît pas vraisemblable car des enchaînements  $Mn^{2+}-NC-Fe^{2+}$  sont probablement formés. Ces nanoparticules présentent une relaxivité de  $15,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  avec un diamètre hydrodynamique de l’objet final de 240 nm et permettent la visualisation de tumeur par microscopie de fluorescence<sup>88</sup>.



**Figure I-47.** Représentation schématique des particules supposée par les auteurs<sup>88</sup>

En 2014, Paul et al. ont étudié, au laboratoire, des analogues de bleu de Prusse substituant les ions  $\text{Fe}^{3+}$  par des ions  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{In}^{3+}$  en proportion variable et enrobés par le dextran. Ces particules présentent une relaxivité optimale pour un dopage de 33% en Mn ( $r_1 = 10 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  à 60MHz et 37°C) et ont une taille d'environ 4nm<sup>89</sup>. Ces valeurs de relaxivité s'expliquent par une localisation des  $\text{Mn}^{II}$  en surface des particules. Lorsque la quantité de  $\text{Mn}^{II}$  est plus importante, une plus grande proportion d'atomes se trouve enfouie, expliquant la diminution de la relaxivité. La toxicité des cellules a été évaluée sur des cellules HEK293, aucune toxicité n'a été mesurée. De plus, les particules sont rapidement internalisées par les cellules et ne pénètrent pas dans leurs noyaux. Cette approche a pour avantage de maximiser l'efficacité par ion  $\text{Mn}^{2+}$ , en les localisant en surface des particules et ainsi de minimiser la toxicité potentielle des objets.

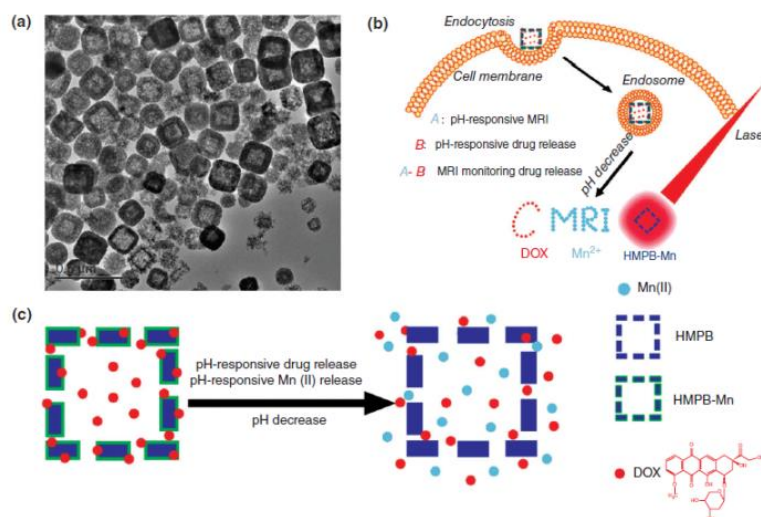
En 2015, une nouvelle étude a été publiée traitant de nanocubes de bleu de Prusse contenant des proportions variables de  $\text{Mn}^{II}$ . Les objets sont synthétisés en présence de citrate et ont une taille comprise entre 60 et 160 nm<sup>90</sup>. La relaxivité longitudinale de ces objets est comprise entre 5,8 et 7,6  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  avec l'optimum pour 25% de Mn. Les cubes sont fonctionnalisés, par différents polymères comme montré sur la figure I-48, afin de favoriser leur biocompatibilité et leur stabilité physiologique. Ces composés présentent un intérêt pour des applications multimodales et thérapeutiques.



**Figure I-48.** (a) Schéma des nanocubes ; Images MET des objets (b) Mn 0% ; (c) Mn 5% ; (d) Mn 15% ; (e) Mn 25%<sup>90</sup>

En 2016, Cai et al. ont synthétisé des nanoparticules de bleu de Prusse mésoporeuses contenant des ions  $\text{Mn}^{2+}$  (HMPB-Mn). Ces structures peuvent également contenir un principe actif : la doxorubicine (DOX)<sup>91</sup>.





**Figure I-49.** (a) Image de MET des particules de HMPB-Mn ; (b) Schéma des particules HMPB-Mn contenant la doxorubicine rentrant par endocytose dans les cellules ; (c) Schéma de la libération de la doxorubicine et du  $Mn^{2+}$  sous l'effet du  $pH^{33}$ .

Les ions  $Mn^{2+}$  et la doxorubicine sont libérés sous l'effet du pH. En effet, le milieu tumoral est plus acide que le milieu cellulaire sain. Ainsi, la relaxivité longitudinale augmente avec le pH : à  $pH=7,4$ ,  $r_1=3 \text{ mM}^{-1} \cdot s^{-1}$  et à  $pH=5$ ,  $r_1=7,43 \text{ mM}^{-1} \cdot s^{-1}$ . Les auteurs justifient cette augmentation de la relaxivité par une proportion plus importante d'ions  $Mn^{2+}$  libres. La corrélation entre l'intensité du signal IRM et la libération du principe actif en font des plateformes théranostiques intéressantes.

Nombre de ces études sur les ABP portent sur l'élaboration de plateformes théranostiques permettant de combiner les performances en tant qu'agents de contraste pour l'IRM ou pour d'autres techniques de diagnostic et de nouvelles formes de thérapie. Nous allons développer ces aspects dans la suite de ce chapitre.

### III. Vers des objets théranostiques

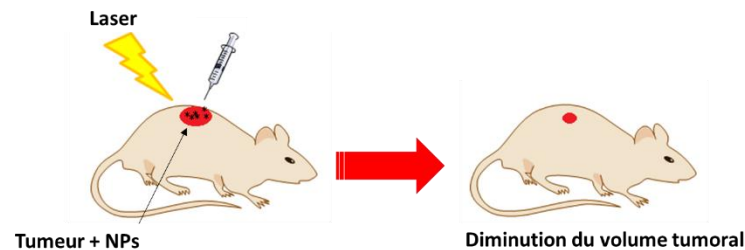
La médecine du futur se veut être une médecine personnalisée. Pour arriver à cet objectif, il faut être capable de diagnostiquer et de soigner sur une échelle de temps restreinte. C'est pour répondre à cette problématique qu'une nouvelle discipline a émergé : la théranostique. Il est aujourd'hui possible de combiner au sein d'un même objet plusieurs techniques de diagnostic (multimodalité) et plusieurs formes de thérapie. Nous nous intéresserons aux objets permettant de combiner l'IRM et d'autres formes de thérapie comme l'hyperthermie photoassistée et la radiothérapie.

#### III.1 L'hyperthermie photoassistée

##### III.1.1 Principe

L'hyperthermie photoassistée ou photothermie (photothermal therapy, PTT en anglais) consiste à entraîner la mort cellulaire par élévation de la température grâce à un rayonnement laser. Les longueurs d'onde d'absorption sont comprises entre 650 et 900nm, dans le visible et le proche infrarouge. Les radiations absorbées sont rapidement converties en chaleur (quelques picosecondes). Ceci entraîne une dénaturation des protéines et de la membrane cellulaire<sup>92</sup>. Les tissus tumoraux ont une résistance moins importante à la chaleur, que les tissus sains, lorsqu'ils sont exposés à des températures comprises entre 42 et 47°C pendant quelques minutes<sup>93</sup>.

Ainsi, l'effet sur les cellules saines est limité. L'hyperthermie peut permettre d'amplifier l'effet d'autres types de thérapie comme la chimiothérapie. La diffusion de la zone d'échauffement dépend de plusieurs paramètres comme la longueur d'onde, le tissu visé et la perfusion sanguine : celle-ci peut s'étendre de 2 à 10 mm. La profondeur de pénétration dans les tissus, atteinte par cette technique (0,2 à 8 mm), peut être un avantage pour traiter les cellules cancéreuses de manière locale. L'utilisation de nanoparticules permet d'augmenter l'absorption du rayonnement laser et d'améliorer la diffusion de l'échauffement.



**Figure I-50.** Schéma de principe de l'hyperthermie photoassistée.

L'attrait pour cette nouvelle forme de thérapie s'est accru ces dernières années car cette technique est simple à mettre en place, non invasive, présente peu de risque et est contrôlable à distance. Ainsi, de nombreux agents ont été développés pour la PTT. Ceux-ci sont souvent à l'échelle nanométrique. Ils doivent présenter une forte absorption dans l'UV ou le proche IR, avoir une bonne photo-stabilité et être efficace en conversion photothermique. Nous présenterons de manière non exhaustive quelques systèmes ayant ces propriétés.

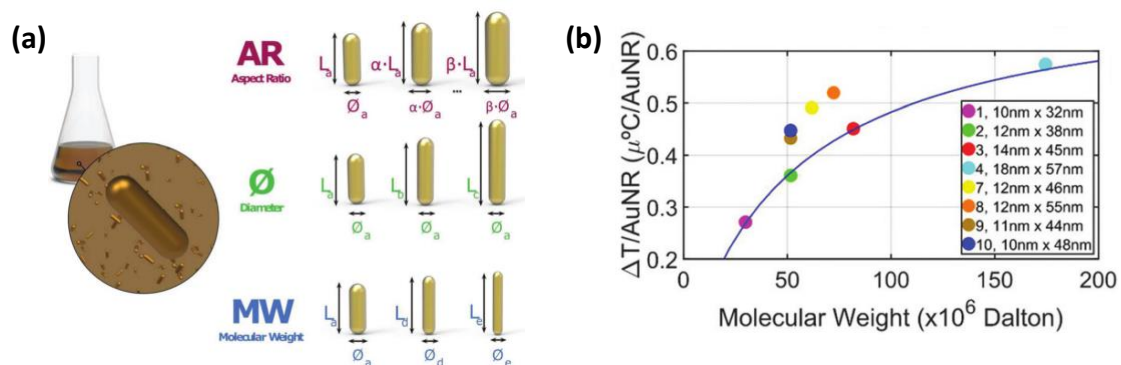
### **III.1.2 Nanoagents thérapeutique pour l'hyperthermie**

De nombreux types d'agents thérapeutiques ont été étudiés pour des applications en hyperthermie. Nous pouvons citer notamment les nanoparticules d'or, les sulfures de cuivre, les composés carbonés (nanotubes de carbone, graphène, fullerène), les oxydes de tungstène etc.<sup>94</sup>. Quelques exemples d'études sont présentés ci-dessous.

Les nanoparticules d'or ont été parmi les premiers objets à être étudiés pour des applications en PTT. En effet, en 2003, Pissuwan et al. ont rapporté que la bande plasmon des NPs, se situant plutôt dans le visible peut être décalée vers le proche IR en fonction de la taille et la forme des objets et pouvait être utile en thérapie<sup>95</sup>. Ils ont mis au point des particules de silice recouverte d'une coquille d'Or d'une trentaine de nm. Par la suite, la coquille est fonctionnalisée par des groupements PEG permettant une meilleure circulation<sup>96</sup>. Ces particules d'environ 130 nm ont été injectées chez des souris avec des tumeurs de type carcinome du colon.

Les tumeurs sont irradiées avec un laser à 808 nm, une puissance de  $4 \text{ W.cm}^{-2}$  pendant 3 minutes. Une diminution du volume tumorale est observée. Cependant, la taille de ces édifices ( $> 100\text{nm}$ ) est problématique pour envisager des injections par voie intra-veineuse et la question de la voie d'élimination se pose. Depuis ces premiers systèmes, de nombreuses études autour de l'or ont été menées. Une étude récente<sup>97</sup> montre l'importance de la morphologie de nanobâtonnets sur la bande plasmon et donc sur les performances d'échauffement. Les auteurs ont synthétisé des nanobâtonnets d'Or et jouent sur trois paramètres : la longueur, le diamètre et la masse moléculaire.

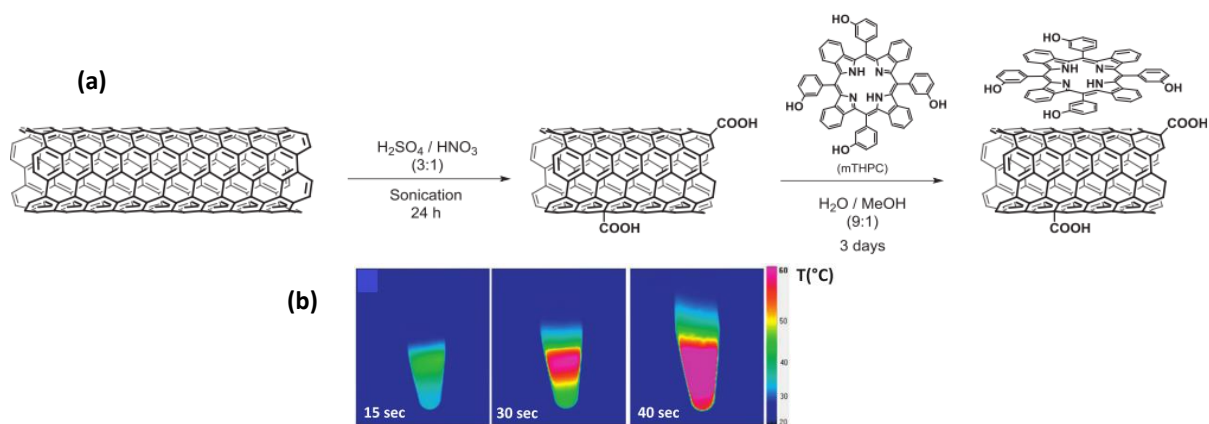




**Figure I-51. (a)** Représentation des trois groupes de NPs analysées (en rouge, ratio L/D constant ; en vert, diamètre constant ; en bleu, masse molaire constante); **(b)** Maximum d'augmentation de la température par nanoparticules en fonction de la masse molaire.<sup>97</sup>

Cette étude montre que le volume mais également la forme des particules influence les performances d'échauffement. Il est important de connaître ces paramètres pour pouvoir faire des tests *in vivo*. Ainsi, les auteurs ont déterminé que des nanobâtonnets de diamètre de 10 nm avec une bande plasmon autour de 800 nm ont des performances optimales. Les nanobâtonnets d'or peuvent aussi être utilisés pour de l'imagerie photoacoustique<sup>98,99</sup>.

Les nanotubes de carbone ont également été étudiés en vue de cette application. L'équipe de Florence Gazeau a travaillé sur des systèmes combinant des nanotubes de carbone multi parois (MWNCT) et un photosensibilisateur commercial le mTHPC (m-tetrahydroxyphenylchlorin). La figure I-52.(b) montre un échauffement important sous l'effet d'un rayonnement laser de 808 nm après un temps court.



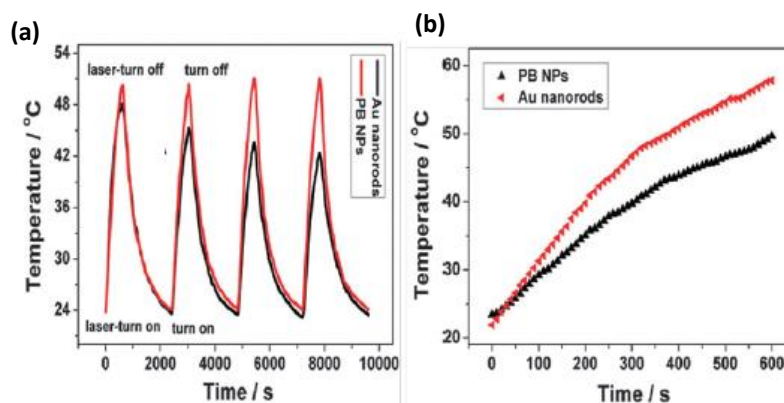
**Figure I-52. (a)** Schéma de synthèse du complexe mTHPC/MWCNT ; **(b)** Profil en température du complexe mTHPC/MWCNT à 100  $\mu g/mL$  enregistré à 15, 30 et 40 secondes<sup>100</sup>.

Les auteurs ont combiné les techniques de PTT et de PDT (photodynamic therapy) permettant d'entraîner la mort cellulaire par apoptose sur l'ensemble des cellules. Des tests de viabilité cellulaire et l'étude des mécanismes d'apoptose ont également été menés, montrant tout le potentiel de ces objets en thérapie. De nombreuses autres études ont été menées afin de combiner l'hyperthermie photoassistée avec des techniques d'imagerie<sup>94</sup>.

Nous allons particulièrement nous intéresser aux systèmes contenant des BdP ou ABP pour l'hyperthermie photoassistée.

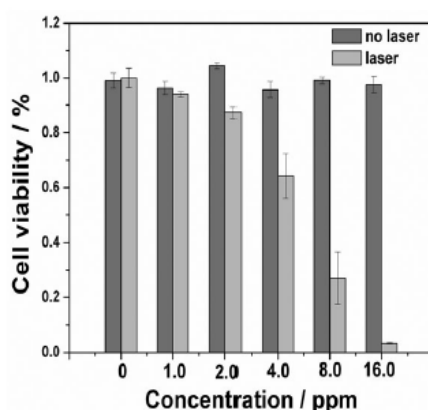
### III.1.3 Le bleu de Prusse et ses analogues comme agent théranostique pour l'IRM et l'hyperthermie photoassistée (PTT)

Le bleu de Prusse a la particularité d'absorber fortement dans le proche infrarouge en raison d'un transfert de charge entre le Fe<sup>II</sup> et le Fe<sup>III</sup> à travers le pont cyanure. En 2012, Fu et al. sont les premiers à étudier les capacités des bleus de Prusse en hyperthermie photoassistée<sup>101</sup>. Une irradiation avec un laser à 808 nm permet de passer la barrière des 43°C, ce qui permet de tuer les cellules cancéreuses. Les auteurs comparent les performances des BdP avec les nanobâtonnets d'or qui sont couramment utilisés pour ces applications, pour une masse comparable de nanomatériaux.



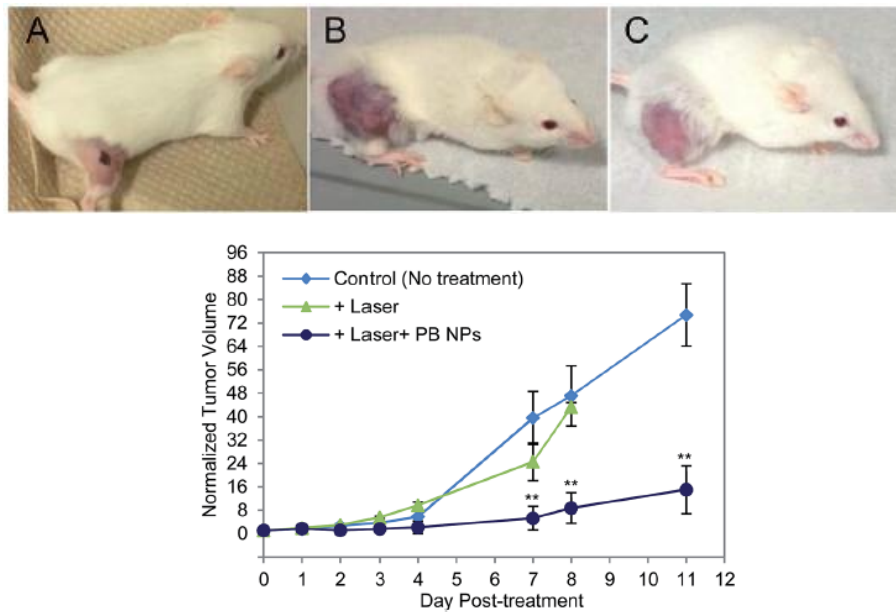
**Figure I-53.** Variation de température de : (a) Nanoparticules de BdP et des nanobâtonnets d'or sous irradiation pendant 4 cycles pour une concentration de 50 ppm en BdP et 16 ppm en Au ; (b) Dispersion en solution aqueuse des particules et des bâtonnets d'or sous irradiation continue pendant 10 min (808 nm, 2W) pour une concentration de 50 ppm en BdP et 16 ppm en Au<sup>101</sup>

Ces premiers résultats encourageants ont mené les auteurs à effectuer des mesures de photothermie *in vitro*. Les expériences sont effectuées sur des cellules HeLa incubées avec les particules pendant 4h. Elles sont ensuite irradiées avec le laser pendant 10 minutes puis un test MTT permet de déterminer la viabilité cellulaire (Fig.I-54). Une diminution du nombre de cellules vivantes est observée avec l'augmentation de la concentration en NPs.



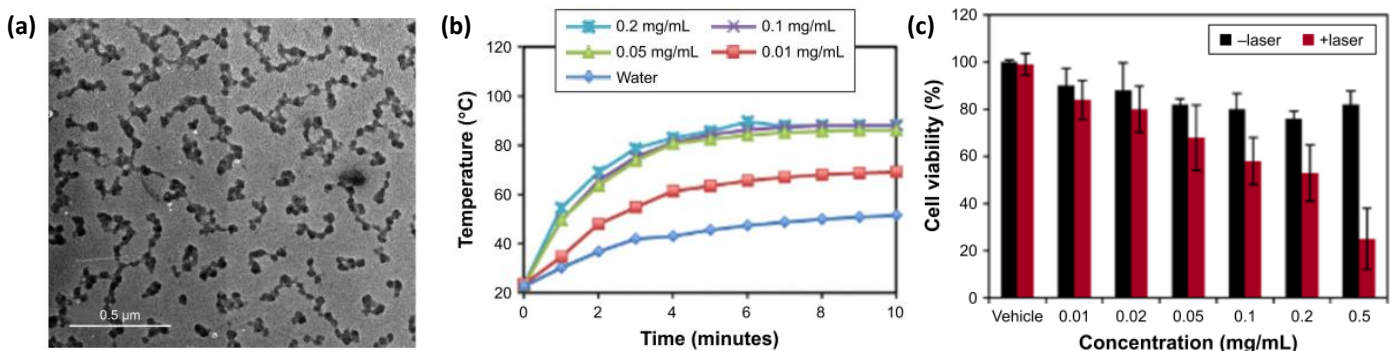
**Figure I-54.** Viabilité cellulaire des cellules HeLa avec différentes concentrations en bleu de Prusse (0, 1, 2, 4, 8, 16 ppm) avec et sans irradiation laser (808 nm, 10 min)<sup>101</sup>

A la suite de cette étude, Hoffman et al. ont mené des tests *in vivo* sur des souris ayant un neuroblaste<sup>102</sup>. Ces expériences montrent que l'irradiation en présence de NPs est plus efficace que l'irradiation seule. La tumeur évolue beaucoup moins rapidement comme le montre la figure I-55.



**Figure I-55.** Evolution du volume tumoral sans traitement (C), sous irradiation laser (B) et en présence de NPs et d'irradiation laser (A)<sup>102</sup>

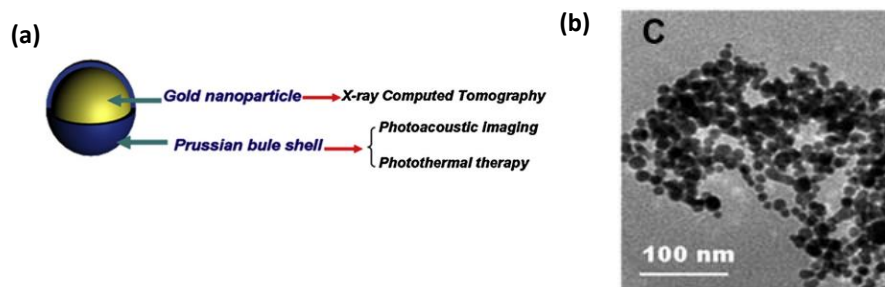
En 2014, Fu et al. ont utilisé une coquille de bleu de Prusse pour conférer un aspect thérapeutique à leur cœur d'oxyde de fer. Ces particules ont des performances très intéressantes en tant qu'agent de contraste T<sub>2</sub> pour l'IRM et en PTT<sup>103</sup>. Des systèmes de même type ont récemment été étudiés<sup>104</sup>. La coquille de bleu de Prusse est dopée par du Gd<sup>III</sup> pour obtenir des agents de contraste T<sub>1</sub> performant. Ces objets d'environ 150 nm ont une relaxivité de 5,5 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> (3T) et sont très stables sous l'effet du laser. Les auteurs montrent qu'une faible concentration en NPs (0,01 mg/mL) est suffisante pour atteindre des températures supérieures à 60°C.



**Figure I-56.** (a) Image MET des particules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Gd-PB ; (b) Profils en température à différentes concentrations en NPs irradiés avec un laser à 808 nm, à une puissance de 1.875 W/cm<sup>2</sup> pendant 10 min ; (c) Viabilité cellulaire des NPs avec et sans irradiation sur des cellules Neuro2a<sup>104</sup>

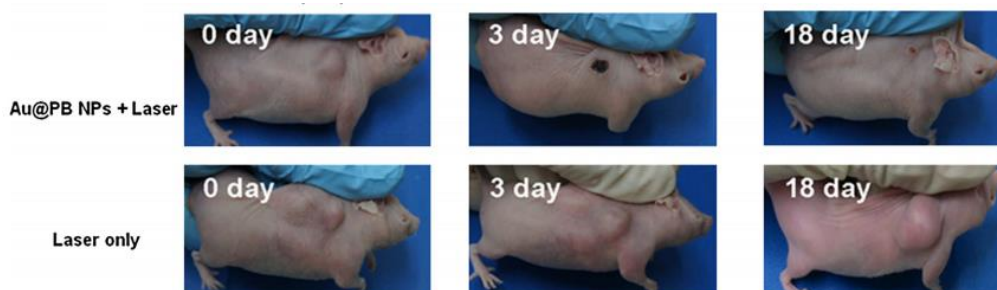
Le cœur d'oxyde de fer, grâce à ses propriétés magnétiques permet de « diriger » les particules dans la tumeur à travers un champ magnétique externe. L'application de ce champ combinée aux propriétés de photothérapie permet de ralentir significativement la croissance de tumeurs de type neuroblastome chez la souris. Cependant, le devenir des particules dans l'organisme des souris n'a pas été étudié. Un autre système cœur-coquille basé sur les oxydes de type  $\text{BdP@MnO}^{105}$  a été mis au point pour combiner au sein d'un même objet : IRM ( $T_1$  et  $T_2$ ), PTT et imagerie photoacoustique.

En 2014, deux autres études<sup>106,107</sup> ont été publiées démontrant l'intérêt mais aussi les performances des bleus de Prusse en tant qu'agent théranostique. Parmi ces études, un système cœur-coquille (Au-PB) d'environ 18 nm présente des propriétés en tant qu'agent de contraste pour la photoacoustique et la tomodensitométrie mais aussi en tant qu'agent thérapeutique en photothérapie<sup>107</sup>.



**Figure I-57.** (a) Représentation schématique des NPs Au@PB; (b) Image MET des NPS Au@PB avec une taille de 17,8 nm<sup>107</sup>

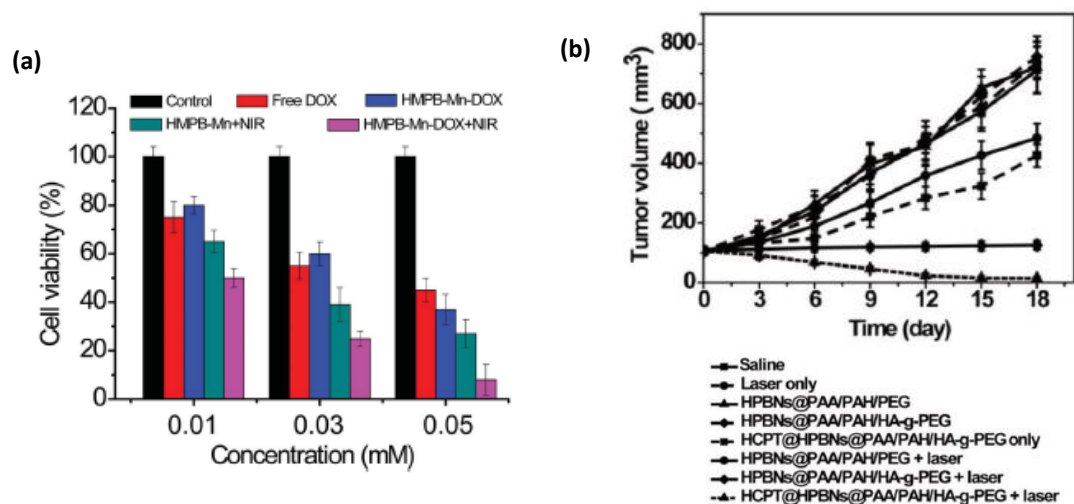
Ces objets sont non toxiques pour les cellules et les auteurs observent, *in vivo*, une élimination totale de la tumeur en 6 jours (Fig. I-58). Ces résultats montrent que les bleus de Prusse sont des objets pouvant être modulés afin de conférer les propriétés de diagnostic ou de thérapie souhaitées.



**Figure I-58.** Photographies des évolutions de tumeurs sur des souris traitées soit avec un laser, soit avec les NPs Au@PB+laser<sup>107</sup>

De nouveaux designs de nanoparticules de BdP ont émergé récemment, associant notamment le BdP avec la silice donnant une porosité aux particules. Cette porosité permet de piéger des principes actifs (doxorubicine) qui seront libérés dans les tumeurs. Ainsi, deux thérapies sont combinées dans un même objet : la photothermie liée à la présence du BdP et la chimiothérapie par relargage d'un anti-tumoral<sup>108</sup>. Les bleus de Prusse modifiés afin d'obtenir des structures mésoporeuses ont fait l'objet de quelques études récentes<sup>91,109</sup>. Il est possible de moduler la surface de ces objets en la fonctionnalisant par de l'acide hyaluronique<sup>109</sup>, de la silice<sup>77</sup> et des polymères biocompatibles (particules HCPT@HPBNS@PAA/PAH/HA-g-PEG) ou encore par des entités  $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$  (particules HMPB-Mn-DOX)<sup>91</sup>. Le premier permet d'accrocher un anti-tumoral (HCPT) et de cibler les cellules cancéreuses grâce à une affinité pour un récepteur spécifique (CD44).

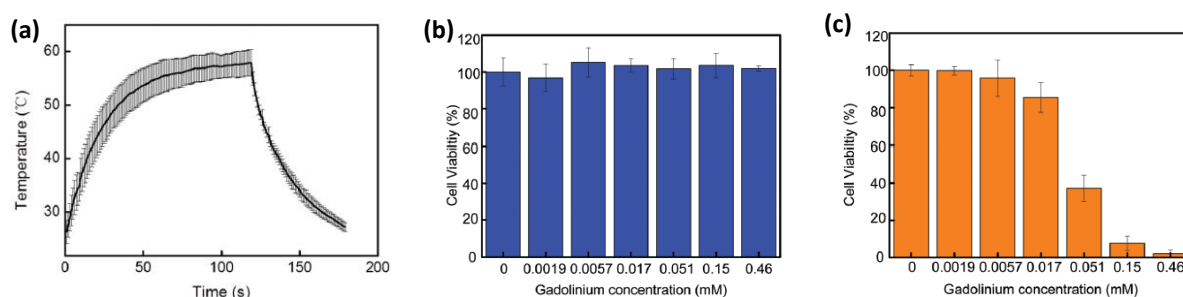
Le second permet, sous l'effet du pH, de libérer la doxorubicine (principe actif DOX) et les ions  $Mn^{2+}$  actif en IRM. Ces deux systèmes, grâce à la présence du bleu de Prusse, présentent un effet d'échauffement local sous l'effet d'un laser. Cependant, Cai et al. ont testé l'efficacité de leurs objets uniquement *in vitro* (Fig. I-59.(a)) : ceux-ci sont prometteurs et l'effet est renforcé en présence de doxorubicine. Les nanoparticules contenant de l'acide hyaluronique ont fait l'objet d'une étude *in vivo* montrant une diminution du volume tumoral sous l'effet combiné du laser et de l'anti tumoral (Fig. I-59.(b)).



**Figure I-59. (a)** Viabilité cellulaire des cellules tumorales 4T1 en présence des particules HMPB-Mn-DOX<sup>91</sup> ; **(b)** Evolution du volume tumoral chez une souris en présence ou non des particules HCPT@HPBNS@PAA/PAH/HA-g-PEG<sup>109</sup>

L'équipe de R. Talham a mis au point un analogue de bleu de Prusse contenant un gradient de concentration en  $Gd^{III}$  (Fig. I-45)<sup>86</sup>. Ces objets d'environ 60 nm sont irradiés pendant 2 minutes donnant lieu à un échauffement dépassant 55°C. Des expériences *in vitro* ont été menées sur des cellules humaines de leucémie.

Le procédé décrit par les auteurs n'est pas commun puisque les cellules sont irradiées en présence des particules avant d'être incubées pendant 36h. Les résultats du test MTS de viabilité cellulaire sont présentés sur la figure I-60.



**Figure I-60. (a)** Profil en température des particules Gd-BdP sous irradiation (808nm, 2 min, 2,5 W.cm<sup>-2</sup>) ; Viabilité cellulaire en présence des particules **(b)** sans irradiation ; **(c)** avec irradiation laser<sup>86</sup>



Les NPs ne présentent pas de cytotoxicité (*Fig.I-60.(b)*). Les expériences d'irradiation des cellules en présence des particules se font avant incubation des NPs dans les cellules pendant 10 min. La viabilité cellulaire est alors mesurée en fonction de la concentration en  $Gd^{III}$  montrant que la mort cellulaire est entraînée pour des concentrations supérieures à 0,017 mM. Or le phénomène de mort par échauffement est bien dépendant de la quantité en bleu de Prusse et non celle en  $Gd^{III}$ . Des expériences *in vivo* pourraient permettre de lever les doutes sur l'efficacité de ces systèmes.

Il a été publié récemment une étude sur des systèmes  $Mn^{II}Fe^{III}[Fe^{II}(CN)_6]$ , décrits dans la partie II.2.3<sup>90</sup>. Ces nanocubes ont la particularité d'être actif en IRM mais aussi en photoacoustique. La présence d'entité  $Fe^{II}-CN-Fe^{III}$  leur permet aussi d'être efficace en PTT. Les auteurs ont étudié une gamme de dopage en  $Mn^{II}$  allant de 0 à 25%. Les analyses UV-visible (*Fig.I-61.(a)*) montrent la bande d'absorption dans le proche infra-rouge caractéristique des bleus de Prusse, qui est légèrement décalée vers les hautes fréquences en présence de  $Mn^{II}$ . D'après cette étude présentant un certain nombre de lacunes, le composé dopé à 15% en  $Mn^{II}$  ayant une taille d'environ 100 nm est le plus performant sans aucune explication des auteurs ; ceci est confirmé par les expériences de photothermie. Les études de viabilité cellulaire montrent une absence de toxicité cellulaire et une efficacité en photothermie dépendante de la puissance du laser et observable même pour les faibles concentrations.

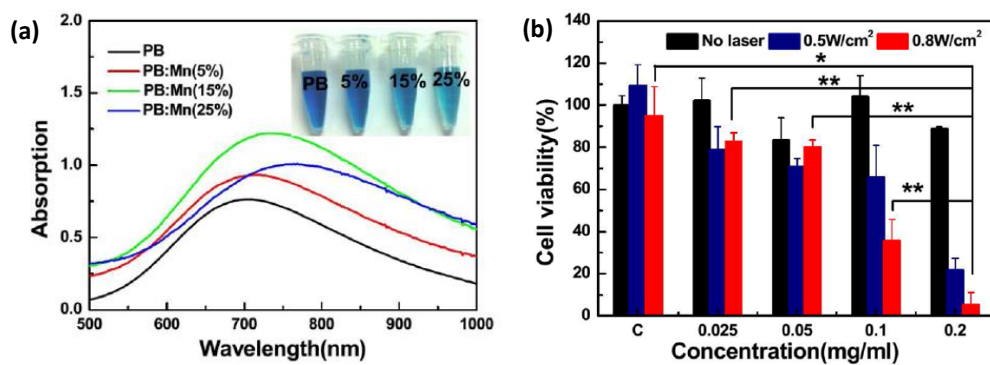


Figure I-61.(a) Spectres UV-visible des solutions colloïdales de bleu de Prusse (PB) avec différents dopages en  $Mn^{II}$  ; (b) Viabilité cellulaire des PB:Mn(15%) avec et sans irradiation laser (808nm, 5 min)<sup>90</sup>

Des tests *in vivo* sur souris ont confirmé le potentiel de ces particules pour l'ablation de tumeur par PTT (*Fig.I-62*).

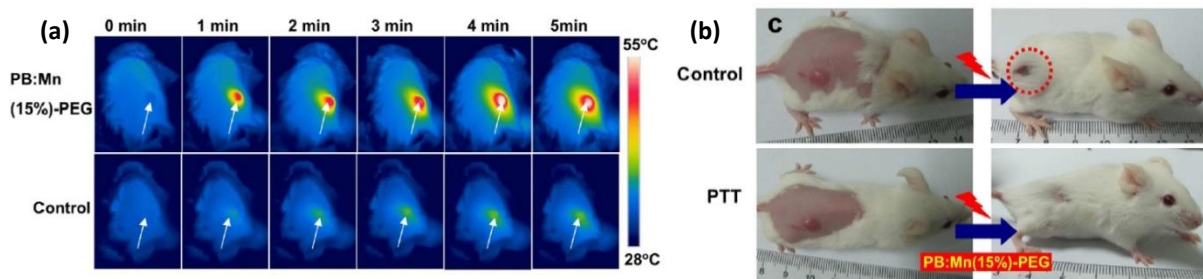


Figure I-62. PTT *in vivo* des particules PB:Mn (15%), (a) Images de caméra thermique pendant l'irradiation des souris (808 nm, 5min, 0,8 W.cm<sup>-2</sup>) ; (b) Photos de souris du groupe de contrôle et du groupe des traitées à t=0 et t=18 jours après l'irradiation<sup>90</sup>

Toutes ces études montrent, d'abord, l'intérêt de la communauté scientifique pour les objets multimodaux et pour la théranostique. Elles démontrent, par ailleurs, les performances du bleu de Prusse et de ses analogues dans ces domaines. En effet, le bleu de Prusse et ses analogues ont également été étudiés pour des applications en tomographie par émission de positon (TEP) par dopage au Gallium<sup>110</sup> ou en tomographie par émission monophotonique (SPECT) par dopage au Thallium<sup>111</sup>. Ce sont des composés très prometteurs pour la médecine du futur.

## III.2 De la radiothérapie à l'hadronthérapie

### III.2.1 Principe

Aujourd'hui, 50 à 60% des cancers sont traités par radiothérapie seule ou associée à d'autres méthodes. Elle consiste à détruire les tissus tumoraux par l'utilisation d'un rayonnement ionisant. La qualité du rayonnement (énergie et nature) ainsi que la sensibilité au rayonnement du tissu visé sont les principaux paramètres qui vont influencer sur la destruction des cellules. La principale limitation de cette technique est son manque de sélectivité car les tissus sains environnants sont également irradiés et peuvent donc être endommagés. Afin de pallier en partie à ce phénomène, des radio-amplificateurs sont utilisés. Leur but est de s'accumuler dans les tissus tumoraux afin d'y augmenter l'effet du rayonnement. Ainsi, la dose nécessaire à éradiquer la tumeur sera diminuée ce qui permet d'épargner les zones saines environnantes. Les nanoparticules composées d'éléments lourds peuvent être utilisées en tant que radio-amplificateur. Il a été montré qu'elles sont internalisées par les cellules cancéreuses et qu'elle se trouve dans leur cytoplasme (sans entrer dans le noyau)<sup>112</sup>. Après activation par le rayonnement primaire, elles peuvent induire autour d'elles une émission d'électrons secondaires et de photons de fluorescence ainsi qu'une capture électronique. Ceci entraîne la production d'espèces radicalaires (ROS (Reactive Oxygen Species), notamment) autour de la nanoparticule qui peuvent être à l'origine de dégâts nanométriques dans le cytoplasme des cellules cancéreuses<sup>99</sup>.

La radiothérapie utilise généralement des rayons X ou des électrons de l'ordre du MeV. L'hadronthérapie est une forme de radiothérapie qui utilise un faisceau de particules très énergétiques (protons ou ions carbonés).

Les propriétés physiques de ces particules permettent des irradiations plus précises. Le faisceau ionisant pénètre dans les tissus avec peu de diffusion latérale et dépose un maximum d'énergie dans un volume précis (pic de Bragg). L'inconvénient majeur de ce type de thérapie est l'installation lourde qu'elle nécessite c'est-à-dire un synchrotron ou un cyclotron pour accélérer les ions. La protonthérapie (rayonnement H<sup>+</sup>, environ 50000 patients) est plus répandue que la carbonothérapie (rayonnement C<sup>6+</sup>, environ 6000 patients). Cependant, ce second rayonnement est plus efficace et grâce à ses propriétés radiobiologiques, permet une efficacité trois fois supérieure à celle des rayons X. Actuellement, il est utilisé dans des cas spécifiques de tumeurs radio-résistantes ou non opérables ou trop proches d'organes vitaux. Cette thérapie est particulièrement développée en Allemagne et au Japon mais certains centres se développent également en France (ouverture de Cyclhad pour la protonthérapie à Caen).

Afin d'accroître les performances de la radiothérapie conventionnelle et de l'hadronthérapie, des radio-amplificateurs à l'échelle nanométrique ont été étudiés.

### III.2.2 Des nanoparticules comme radio-amplificateurs.

De nouveaux agents thérapeutiques agissant en tant que radio-amplificateurs sont développés ; ceux-ci augmentent la dose efficace grâce à leur haut numéro atomique<sup>113</sup>. En 2004, l'équipe de Hainfeld a montré pour la première fois que des nanoparticules d'or pouvaient amplifier l'effet des rayons X dans les tumeurs. Cette première étude utilise un rayonnement de basse énergie (keV) par rapport à la radiothérapie conventionnelle. La différence d'énergie peut engendrer des changements des phénomènes physique mis en jeu. L'or, grâce à un numéro atomique élevé ( $Z=79$ ) et une forte densité ( $d=19,3$ ), possède une section d'absorption du rayonnement X importante<sup>99,114,115</sup>. Ces nanoparticules de petit diamètre (1,9 nm) ont été injectées par voie intraveineuse (IV) à des souris atteintes de carcinome. Après irradiation par des rayons X, la survie des souris a été nettement améliorée. Un an après le traitement, 86% des souris ont survécu contre 20% pour les souris traitées par radiothérapie sans NPs. Cette première étude a ouvert la porte à beaucoup d'autres<sup>60,113</sup>. Des modélisations tenant compte des phénomènes physique mais aussi biologique mis en jeu ont également montré que les particules d'or de très petite taille permettaient d'améliorer davantage l'effet de la radiothérapie<sup>99</sup>. Les NPs d'Au permettent d'augmenter la dose de façon très localisée, à l'échelle nanométrique. Ce phénomène est d'autant plus important que le diamètre des particules est petit.

Le gadolinium peut également être un élément de choix pour la radiothérapie, de par son numéro atomique élevé ( $Z=64$ ). Un des composés le plus étudiés en tant que radio-amplificateur et agent de contraste est le motexafin gadolinium (MGd)<sup>116</sup>, une porphyrine liée à un macrocycle (*Fig.I-64*). Le MGd est un radio-amplificateur sélectif détectable par IRM. Il est rapidement éliminé du sang et des tissus sains, mais il s'accumule dans les tissus tumoraux du cerveau. Ce complexe peut également interagir avec des processus biochimiques<sup>60</sup>. Ce composé fait l'objet d'un essai clinique pour ces propriétés de radio-amplification.

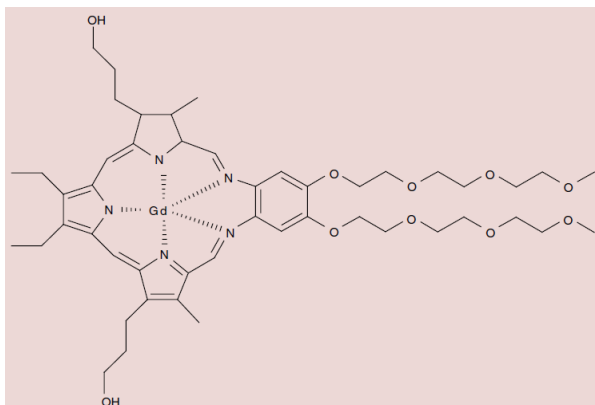


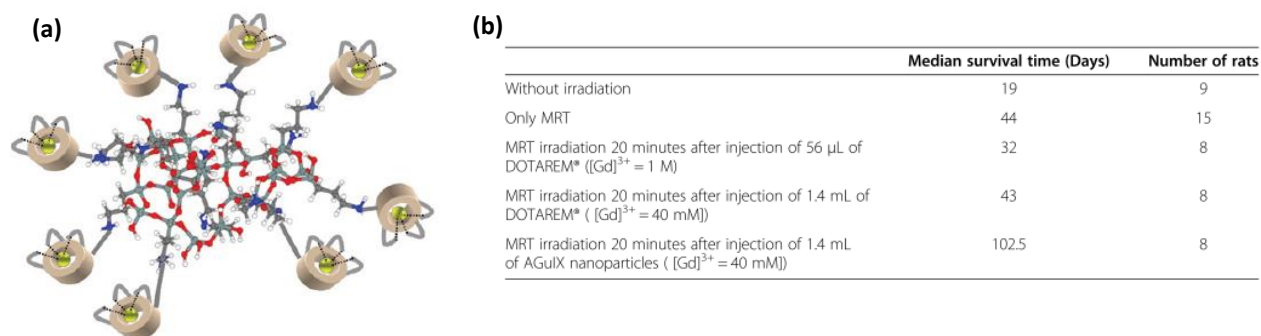
Figure I-63. Structure du MGd<sup>113</sup>

Des systèmes basés sur le Gd-DTPA ou encore sur des nanoparticules de chitosan contenant du gadolinium ont aussi été étudiés comme agent théranostique en IRM et radiothérapie<sup>60</sup>.

L'équipe d'O. Tillement a proposé un nouveau type de particule appelé AGuIX® basé sur un cœur de polysiloxane entouré de dérivé du Gd-DOTA lié de manière covalente à une matrice inorganique (Paragraphe I.3.4). Pour rappel, ces particules ont une taille inférieure à 5 nm.



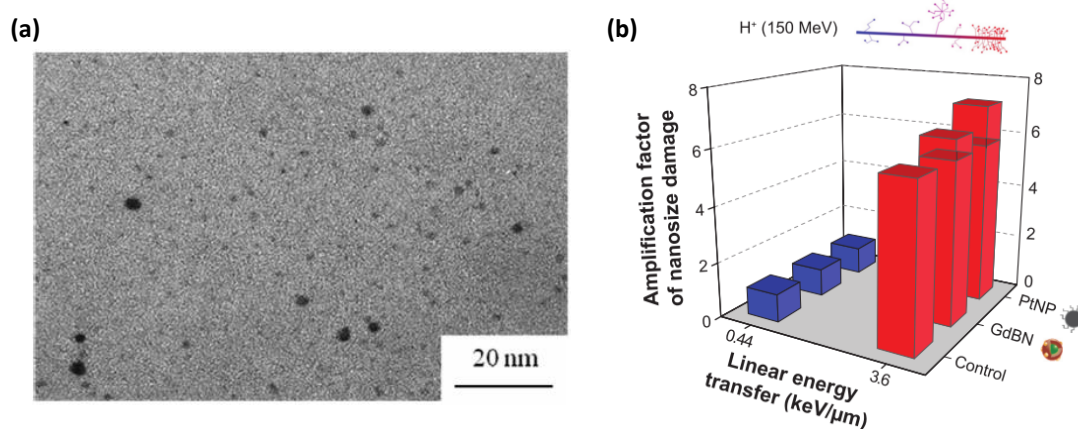
Cette faible taille est indispensable pour une élimination rénale plus facile et pour l'accumulation dans les tumeurs via l'effet EPR (Enhanced permeability and retention). Celui-ci consiste en une accumulation préférentielle des particules de plus petites tailles dans les tumeurs causée par une vascularisation plus importante des tissus malades. Ces particules présentent l'avantage de passer dans les poumons puis dans la circulation sanguine avant d'être éliminées par les reins. Leur performance en tant que radio-amplificateur a été démontrée<sup>117</sup>, ceci en fait un des premiers exemples de nanoparticules actuellement en essai clinique (phase II).



**Figure I-64.** (a) Représentation schématique du AGuIX<sup>60</sup>; (b) Temps de survie moyen de rats atteints de gliosarcome en fonction de différents traitements<sup>117</sup>

Ces particules ont fait l'objet d'une étude en hadronthérapie<sup>118</sup>. Une analyse quantitative sur les biomolécules montre que la présence de particules augmente de 45% les dommages dans le cas du faisceau d'He<sup>2+</sup> et de 73% avec un faisceau C<sup>6+</sup>.

L'équipe de S. Lacombe (ISMO, Université Paris-Sud) est très active dans ce domaine et travaille particulièrement sur le développement de nanoparticules à base de Pt (Z=78) comme amplificateur en hadronthérapie<sup>119</sup>. Ces nanoparticules, développées par l'équipe de H. Remita (LCP, Université Paris-Sud), sont obtenues par voie radiolytique et mesurent 3 nm d'après la microscopie électronique en transmission (*Fig. I-65. (a)*). La présence de platine lors d'une irradiation par un faisceau médical d'ions C<sup>6+</sup> augmente les dommages complexes aux biomolécules, ceci de façon plus significative quand le platine est sous forme de NPs métalliques que sous forme de sels<sup>119</sup>. Ces dommages complexes causés par les nanoobjets pourraient être létaux pour les cellules.



**Figure I-65.** (a) Image MET des particules de Pt obtenues par radiolyse<sup>119</sup>; (b) Facteur d'amplification des dommages complexes provoqués par les NPs à base de Gd ou de Pt en fonction de l'énergie d'entrée (0,44 keV) ou de sortie au niveau du pic de Bragg (3,6 keV)<sup>120</sup>

Les particules de Gd<sup>III</sup> développées par l'équipe d'O. Tillement ont également été étudiées par l'équipe de S. Lacombe comparativement aux NPs de Pt. La combinaison de ces deux types de NPs avec un faisceau de proton montre les mêmes conclusions que celles observées précédemment<sup>121</sup>. Dans cette étude, il est également montré le rôle prédominant des ROS, particulièrement du radical hydroxyle (<sup>•</sup>OH) dans la mort cellulaire générée par une irradiation. Les auteurs démontrent que le phénomène est plus important dans la région du pic de Bragg que dans la région d'entrée du faisceau (*Fig. I-65.(b)*). Ceci montre une nouvelle fois l'utilité des nanoparticules pour ce type d'application. Cependant, aucune étude *in vivo* des phénomènes engendrés par ces NPs de Pt n'a été menée.

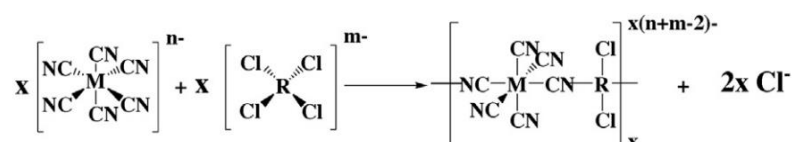
La radiothérapie est en pleine évolution grâce à l'utilisation de nanoparticules et au développement de nouvelles techniques d'irradiation. Les BdP et les ABP n'ont pas été étudiés pour des applications en radiothérapie. Malgré la grande versatilité chimique de ces réseaux, il est difficile de stabiliser des systèmes à base de métaux lourds comme le platine ou le palladium par les voies développées au laboratoire. Ceux-ci étant important pour des applications en radiothérapie, un autre type de polymère de coordination à pont cyanure a été envisagé.

## IV. Des analogues de bleu de Prusse aux cyanosols

### IV.1 Les cyanogels

Les cyanogels sont des polymères de coordination amorphes obtenus par réaction entre un chlorométallate ([MCl<sub>4</sub>]<sup>n-</sup>) et un cyanométallate ([M'(CN)<sub>6</sub>]<sup>n'-</sup>) en solution aqueuse. Les métaux M et M' sont liés par des ponts cyanures à l'origine du nom de cette classe de composés.

Dans un premier temps, un sol se forme, constitué de nanoparticules chargées négativement, puis, selon les conditions de concentration et de stœchiométrie, un gel sera obtenu.



**Figure I-66.** Réaction entre cyanométallate et un chlorométallate conduisant à la formation d'un polymère à pont cyanure<sup>122</sup>

Peu d'études portant sur ces systèmes ont été reportées dans la littérature. Depuis les années 1990, l'équipe de Bocarsly s'est particulièrement intéressée aux cyanogels. Un des premiers cyanogels étudié est obtenu par mélange du ferricyanure avec du chloropalladate dans une stœchiométrie 2:1<sup>123</sup>. Ce ratio 2:1 semble, d'après les auteurs, le meilleur compromis cinétique pour l'obtention d'un gel<sup>123</sup>. Dans cette première étude, il est suggéré que les ligands chloro sont substitués en cis par rapport au centre métallique comme le montre la figure I-67.

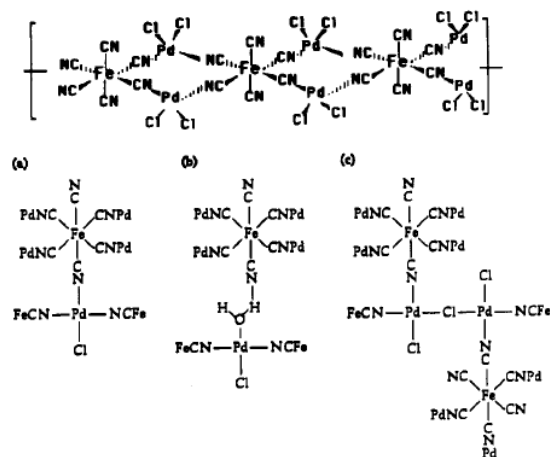


Figure I-67. Représentations schématiques des enchaînements du cyanogel Pd:Fe (2 :1) proposées par les auteurs<sup>123</sup>

Cependant, aucune argumentation ni justification n'est proposée. De plus, les études qui seront publiées, par la suite, par cette équipe supposent une substitution en trans des ligands chloro ce qui est incohérent. Un exemple est la structure proposée pour le cyanogel  $[\text{Fe}^{\text{II}}-\text{Pt}^{\text{IV}}-\text{Fe}^{\text{II}}][\text{PdCl}_4]^{2-}$  (Fig. I-68) qui est un système intéressant, obtenu par réaction d'un complexe trinucéaire  $[\text{Fe}^{\text{II}}-\text{Pt}^{\text{IV}}-\text{Fe}^{\text{II}}]$  et de  $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ , pour ces propriétés photochimiques. Sa dégradation, sous irradiation, conduit à une structure de type bleu de Prusse<sup>124</sup>.

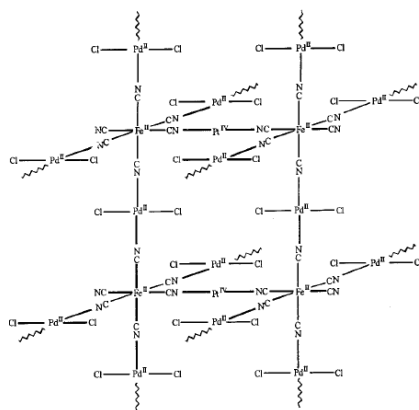


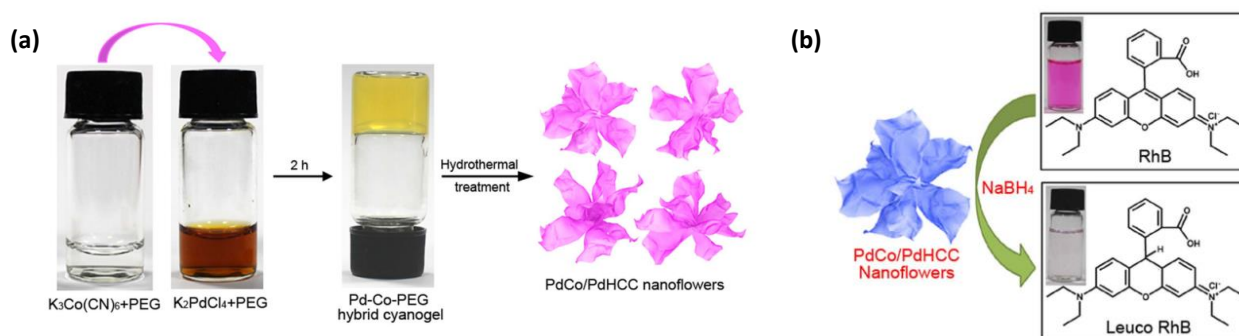
Figure I-68. Structure du cyanogel  $[\text{Fe}^{\text{II}}-\text{Pt}^{\text{IV}}-\text{Fe}^{\text{II}}]-[\text{PdCl}_4]^{2-}$  de stœchiométrie 1:4<sup>124</sup>

Un intérêt particulier a été porté au système Pd:Co (2:1). En effet, il a été montré que ce cyanogel pouvait être utilisé comme précurseur pour obtenir des céramiques<sup>125</sup>. Les caractéristiques thermodynamiques et cinétique d'adsorption et de désorption du  $\text{CO}_2$  dans ce matériau ont aussi été étudiées<sup>126</sup>. Par la suite, l'équipe de Bocarsly s'est intéressée à une large gamme de métaux tel que le platine, le cobalt, le ruthénium, le nickel, le chrome, l'osmium. Ces gels ont été caractérisés avec différentes stœchiométries de 1:1 à 5 :1 avec un intérêt particulier pour la stœchiométrie 2:1<sup>125,127</sup>.

Ces matériaux ont également été étudiés après réduction par voie thermique pour aboutir à des alliages métalliques intéressants en catalyse. Les auteurs se sont intéressés à de nombreuses combinaisons : PtNi, PdNi, RuCo, PtRu, IrCo, PtFe, PdFe et ont cherché à faire varier la stœchiométrie. Cette étude a permis d'obtenir des alliages dans des temps plus ou moins raisonnables selon les compositions. La réduction par voie microonde permet l'obtention d'un alliage après une irradiation de 3 min du gel Pd:Fe (2:1) alors qu'un chauffage d'une heure est nécessaire par voie thermique<sup>128</sup>.

Plus récemment, les cyanogels Pd:Co et Pt:Co ont montré leurs capacités à s'autoréduire à haute température (240°C)<sup>129</sup>. Les auteurs ont montré que sous l'effet de la température (environ 200°C), un pont cyanure par unité de gel est perdu, entraînant une réduction du Co<sup>3+</sup> en Co<sup>2+</sup>. Ceci entraîne, également, un réarrangement de la structure qui conduit alors à deux sous unités, CoPd(CN)<sub>4</sub> et Pd(CN)<sub>2</sub>, combinées au sein d'un même réseau. Un second palier de chauffage entraîne la décomposition des deux sous unités pour former un alliage métallique Pd-Co. Le même mécanisme est décrit pour le cyanogel PtCo, laissant ainsi penser à une voie de décomposition thermique générale à partir de cyanogel pour obtenir des alliages métalliques. Depuis ces premières publications, les cyanogels ont été étudiés pour des applications diverses comme la catalyse<sup>122,130</sup> ou le stockage<sup>131,132</sup>.

Une étude originale décrit la synthèse de nano-fleurs de cyanogel à base de Pd et de Co<sup>133</sup>. Cette architecture est obtenue après un traitement hydrothermal et grâce à la présence de PEG au moment de la synthèse du gel. En effet, le PEG est connu pour être un agent de direction permettant d'ordonner des structures. Ces objets ont une taille de 300nm et présentent une cristallinité de type CFC comme les analogues de bleu de Prusse. En absence de PEG, les structures obtenues sont plus petites (environ 70nm).



**Figure I-69. (a)** Schéma de la formation des nano-fleurs de PdCo/Pd-hexacyanocobaltate (PdHCC) ; **(b)** Réduction de la rhodamine B (RhB) par NaBH<sub>4</sub> en présence de PdCo/PdHCC<sup>133</sup>

Les nano-fleurs ont été mises au point pour catalyser la réduction de la rhodamine B par NaBH<sub>4</sub>. Grâce à cette structure atypique, le ratio surface/volume est élevé, permettant une meilleure accessibilité aux sites catalytique et une voie de transport plus efficace. De plus, il est montré que les nano-fleurs sont stables dans les conditions de l'hydrogénation durant au moins 5 cycles.

En 2014, Liu et son équipe ont mis au point un système à base de cyanogel Sn-Fe pour une application en tant que biocapteur basé sur l'immobilisation d'enzyme<sup>134</sup>. L'enzyme choisie pour cette étude est la glucose oxydase, GOx. L'interface est composée d'une électrode d'or avec des nanotubes de carbone multi-parois (MWCNT) répartis uniformément sur la surface. Les nanotubes ont pour rôle d'assurer un bon contact électrique entre l'électrode et le reste de la structure. La seconde étape consiste à électrodéposer une couche de bleu de Prusse afin de pouvoir quantifier la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Enfin le cyanosol Sn-Fe est synthétisé in situ en présence de l'enzyme GOx.

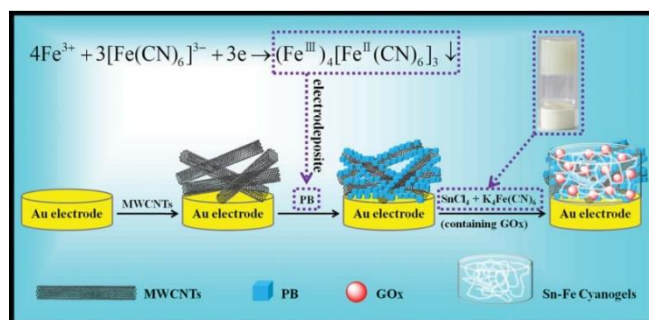


Figure I-70. Représentation schématique de la préparation de l'interface cyanogel-GOx-BdP-MWCNT/Au<sup>134</sup>

La plateforme obtenue montre une bonne conductivité et une activité catalytique stable pour la réduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ceci s'explique par la présence du bleu de Prusse. De plus, le biocapteur montre une bonne sensibilité (1,68 μA.mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-2</sup>) et une faible limite de détection (0,1 μM). Les auteurs suggèrent que cette interface pourrait être utilisée comme biocapteur pour d'autres enzymes. Cet article est le seul qui traite, à l'heure actuelle, d'une application des cyanogels dans le domaine biologique.

Les cyanogels sont obtenus par un procédé de type sol-gel. Ceci signifie qu'un état intermédiaire est constitué par des particules en suspension qui seront appelées cyanosols.

## IV.2 Les cyanosols

Le sol est un état intermédiaire qui conduit cinétiquement à la formation d'un gel. Cet état peut être stabilisé afin d'obtenir des particules en suspension. Une seule publication, de l'équipe de Bocarsly, fait état de ce type d'objet<sup>135</sup>. Les auteurs ont étudié différentes compositions : Pd/Co, Pd/Ru et Pd/Fe. Les particules sont piégées juste après réaction avec un contre ion (CTA<sup>+</sup>) selon la même approche que celle employée dans l'équipe sur les ABP<sup>136</sup>. Elles sont en réalité agrégées en solution et le temps auquel est ajouté le contre ion contrôle la taille de ces agrégats. Les auteurs montrent par une étude en spectroscopie IR que l'environnement chimique du cyanosol est identique à celui du cyanogel. La composition chimique des composés étudiée par ICP montre un bon accord avec les quantités initialement introduites. Cependant aucun dosage des Cl ni aucune caractérisation structurale n'ont été menés.

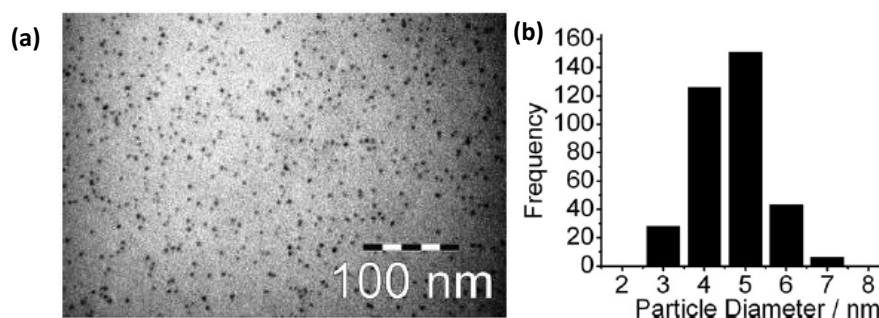


Figure I-71. (a) Image MET du composé Pd:Co (2:1) piégé avec du CTA<sup>+</sup>; (b) Distribution en taille des particules observées sur l'image MET<sup>135</sup>

Les nanoparticules sont également réduites en alliages par chauffage montrant qu'elles peuvent avoir les mêmes propriétés que les cyanogels. Cet article porte sur l'étude des nanoparticules piégées à différents stades de la réaction mais pas sur la stabilité des objets à l'état de sol.

Il serait donc intéressant de travailler sur la stabilisation des nanoparticules en solution par réaction d'un chlorométallate et d'un cyanométallate, en l'absence de tout agent stabilisant pour utiliser ces nanomatériaux dans différentes applications.

## V. Objectifs de la thèse

Ce travail de thèse porte sur l'étude de nouveaux systèmes de type polymère de coordination à pont cyanure en vue d'applications médicales. Dans un premier temps, nous nous sommes particulièrement intéressés au bleu de Prusse et à ses analogues. Comme le démontre l'étude bibliographique, ce sont des systèmes versatiles qui présentent de nombreux avantages pour développer des objets multimodaux et théranostiques. Ces systèmes ont déjà fait l'objet de nombreuses études, mais nous présentons une nouvelle approche originale pour obtenir des objets de petite tailles (<10 nm) qui peuvent être éliminés par voie rénale et une localisation des ions paramagnétiques majoritairement en surface.

Dans le second chapitre, nous nous intéresserons à la synthèse et à la caractérisation de NPs d'ABP dopés par du Gd<sup>III</sup>. Deux types de cœurs seront étudiés : In<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup> et Fe<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup>. Les performances en tant qu'agent de contraste T<sub>1</sub> seront étudiées pour deux dopages différents en Gd<sup>III</sup>.

La présence d'un cœur BdP nous permet d'envisager des applications en hyperthermie photoassistée. Cet aspect sera également traité.

En vue d'anticiper les problèmes pouvant survenir lors des injections *in vivo*, nous avons employé une démarche en amont et étudié la stabilité de nos objets dans des milieux proches de l'*in vivo* comme le sérum de vœu fœtal (SVF) et un milieu artificiel mimant ce qui se passe au niveau des lysosomes (ALF : artificial lysosomal fluid). Nous avons observé une dégradation de nos objets dans ces milieux. Afin d'y remédier, nous avons envisagé plusieurs stratégies qui seront développées dans le troisième chapitre. Ces stratégies sont :

- Protection de la surface par des stabilisants (citrate, polymères, dendrimère)
- Mise au point de systèmes cœur-coquille avec une coquille de type Cu<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>
- Croissance d'une coquille de silice.

Les différentes problématiques rencontrées au cours de ce chapitre permettront, à terme, d'élaborer un objet optimal en trouvant un compromis entre performances et stabilité.

Le chapitre IV portera sur l'élaboration de nouveaux polymères de coordination à pont cyanure stabilisés en milieu aqueux. Ces cyanosols seront synthétisés et caractérisés en vue d'application en radiothérapie et/ou en hadronthérapie. Ces études sont pionnières pour ce type de nanoparticules et ont mis en évidence des effets inattendus. Nous cherchons à obtenir différentes combinaisons de cyanosols contenant des ions lourds comme le platine, le palladium ou l'or. En plus des applications médicales, ces objets peuvent être intéressants pour catalyser la croissance de nanotubes de carbone par exemple.

## Bibliographie

1. Shokrollahi, H. Contrast agents for MRI. *Mater. Sci. Eng. C* **33**, 4485–4497 (2013).
2. Morfin, J.-F. & Beloeil, J.-C. Agents de contraste pour l'IRM. *Tech. l'ingénieur* (2014).
3. Helm, L. Relaxivity in paramagnetic systems: Theory and mechanisms. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **49**, 45–64 (2006).
4. Tóth, É., Helm, L. & Merbach, A. E. Relaxivity of MRI Contrast Agents. *Top. Curr. Chem.* **221**, 61–101 (2002).
5. Solomon, I. & Bloembergen, N. Nuclear Magnetic Interactions in the HF Molecule. *J. Chem. Phys.* **25**, 261–266 (1956).
6. Bloembergen, N. & Morgan, L. O. Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. Effects of Electron Spin Relaxation. *J. Chem. Phys.* **34**, 842–850 (1961).
7. Ni, D., Bu, W., Ehlerding, E. B., Cai, W. & Shi, J. Engineering of inorganic nanoparticles as magnetic resonance imaging contrast agents. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 7438–7468 (2017).
8. Bertini, C. L. et S. A. Relaxation. *Coord. Chem. Rev.* **150**, 77–110 (1996).
9. Aime, S., Botta, M., Gianolio, E. & Terreno, E. Ap(O<sub>2</sub>)-Responsive MRI Contrast Agent Based on the Redox Switch of Manganese(II/III) - Porphyrin Complexes. *Angew. Chemie Int. Ed.* **39**, 747–750 (2000).
10. Tyler J. Fraum, MD,1 Daniel R. Ludwig, MD,1 Mustafa R. Bashir, MD,2, 3 and & Kathryn J. Fowler, M. Gadolinium-Based Contrast Agents: A Comprehensive Risk Assessment. *J. MAGN. Reson. IMAGING* (2017).
11. Aime, S. et al. High sensitivity lanthanide(III) based probes for MR-medical imaging. *Coord. Chem. Rev.* **250**, 1562–1579 (2006).
12. Zhang, L. et al. The evolution of gadolinium based contrast agents: from single-modality to multi-modality. *Nanoscale* **8**, 10491–10510 (2016).
13. Nwe, K., Milenic, D., Bryant, L. H., Regino, C. A. S. & Brechbiel, M. W. Preparation, characterization and in vivo assessment of Gd-albumin and Gd-dendrimer conjugates as intravascular contrast-enhancing agents for MRI. *J. Inorg. Biochem.* **105**, 722–727 (2011).
14. Zhang, Z. et al. Multilocus binding increases the relaxivity of protein-bound MRI contrast agents. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **44**, 6766–6769 (2005).
15. Zhen, M. et al. Maximizing the relaxivity of Gd-complex by synergistic effect of HSA and carboxylfullerene. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **4**, 3724–3729 (2012).
16. Park, J.-A. et al. Gd-DOTA Conjugate of RGD as a Potential Tumor-Targeting MRI Contrast Agent. *ChemBioChem* **9**, 2811–2813 (2008).
17. Yan, G.-P. et al. Dextran gadolinium complexes as contrast agents for magnetic resonance imaging to sentinel lymph nodes. *Pharm. Res.* **27**, 1884–1892 (2010).
18. Hifumi, H. et al. Dextran Coated Gadolinium Phosphate Nanoparticles for Magnetic Resonance Tumor Imaging. (2009). doi:10.1039/b902134e

19. Li, W., Parigi, G., Fragai, M., Luchinat, C. & Meade, T. J. Mechanistic Studies of a Calcium-Dependent MRI Contrast Agent. *Inorg. Chem.* **41**, 4018–4024 (2002).
20. Paris, J. *et al.* Auto-Assembling of Ditopic Macrocyclic Lanthanide Chelates with Transition-Metal Ions. Rigid Multimetallic High Relaxivity Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Inorg. Chem.* **45**, 5092–5102 (2006).
21. Que, E. L. & Chang\*, C. J. A Smart Magnetic Resonance Contrast Agent for Selective Copper Sensing. (2006). doi:10.1021/JA065264L
22. Kueny-Stotz, M., Garofalo, A. & Felder-Flesch, D. Manganese-enhanced MRI contrast agents: From small chelates to nanosized hybrids. *Eur. J. Inorg. Chem.* 1987–2005 (2012). doi:10.1002/ejic.201101163
23. Chen, C.-W., Cohen, J. S., Myers, C. E. & Sohn, M. Paramagnetic metalloporphyrins as potential contrast agents in NMR imaging. **168**, (1984).
24. Nasu, H. *et al.* Tumor enhancement using Mn-metalloporphyrin in mice: Magnetic resonance imaging and histopathologic correlation. *J. Magn. Reson. Imaging* **20**, 294–299 (2004).
25. Zhu, J., Gale, E. M., Atanasova, I., Rietz, T. A. & Caravan, P. Hexameric Mn(II) dendrimer as MRI contrast agent. *Chemistry* **20**, 14507–14513 (2014).
26. Liu, Y. C. *et al.* Structural characterization and relaxivity study of a new paramagnetic Mn(II) complex of DTPA-BpABA. *Chinese J. Chem.* **23**, 1012–1016 (2005).
27. Zhang, D.-W., Yang, Z.-Y., Zhang, S.-P. & Yang, R.-D. Synthesis, Characterization and Relaxation Properties of Four Non-ion Transition Metal Manganese(II), Cobalt(II), Nickel(II) and Copper (II) Complexes with Derivatives from Diethylene Triamine Pentaacetic Acid and Isoniazid. *Transit. Met. Chem.* **31**, 333–336 (2006).
28. Gale, E. M., Atanasova, I. P., Blasi, F., Ay, I. & Caravan, P. A Manganese Alternative to Gadolinium for MRI Contrast. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 15548–15557 (2015).
29. Forgács, A. *et al.* Optimising the relaxivities of Mn 2+ complexes by targeting human serum albumin (HSA). *Dalt. Trans.* **46**, (2017).
30. UNGER EVAN MD; FRITZ, THOMAS MSC; SHEN, DE KANG PhD; WU, G. Manganese-Based Liposomes Comparative Approaches : Investigative Radiology. *Invest. Radiol.* **28**, 933–938 (1993).
31. Kimpe, K. *et al.* Potential MRI Contrast Agents Based on Micellar Incorporation of Amphiphilic Bis(alkylamide) Derivatives of [(Gd-DTPA)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2-</sup>. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, 3021–3027 (2003).
32. Anelli, P. L. *et al.* Mixed micelles containing lipophilic gadolinium complexes as MRA contrast agents. *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.* **12**, 114–120 (2001).
33. Mao, X., Xu, J. & Cui, H. Functional nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **8**, 814–841 (2016).
34. Liu, S. *et al.* Design and assembly of supramolecular dual-modality nanoprobes. *Nanoscale* **7**, 9642–9466 (2015).
35. Huang, Y., Zhang, X., Zhang, Q., Dai, X. & Wu, J. Evaluation of diethylenetriaminepentaacetic acid–manganese(II) complexes modified by narrow molecular weight distribution of chitosan



- oligosaccharides as potential magnetic resonance imaging contrast agents. *Magn. Reson. Imaging* **29**, 554–560 (2011).
36. Haag, R. Dendrimers and Hyperbranched Polymers as High-Loading Supports for Organic Synthesis. *Chemistry (Easton)*. **7**, 327–335 (2001).
  37. Misselwitz, B., Schmitt-Willich, H., Ebert, W., Frenzel, T. & Weinmann, H. J. Pharmacokinetics of Gadomer-17, a new dendritic magnetic resonance contrast agent. *MAGMA* **12**, 128–34 (2001).
  38. Huang, C.-H., Nwe, K., Al Zaki, A., Brechbiel, M. W. & Tsourkas, A. Biodegradable polydisulfide dendrimer nanoclusters as MRI contrast agents. *ACS Nano* **6**, 9416–24 (2012).
  39. Ye, M. *et al.* Facile synthesis and in vivo evaluation of biodegradable dendritic MRI contrast agents. *J. Mater. Chem.* **22**, 14369 (2012).
  40. Botta, M. & Tei, L. Relaxivity enhancement in macromolecular and nanosized Gd III-based MRI contrast agents. *Eur. J. Inorg. Chem.* 1945–1960 (2012). doi:10.1002/ejic.201101305
  41. Ekkelenkamp, A. E., Rachè Elzes, M., J Engbersen, J. F. & J Paulusse, J. M. Responsive crosslinked polymer nanogels for imaging and therapeutics delivery. *J. Mater. Chem. B* **210**, 210–235 (2018).
  42. Soleimani, A. *et al.* Polymer cross-linking: a nanogel approach to enhancing the relaxivity of MRI contrast agents. doi:10.1039/c2tb00352j
  43. Courant, T. *et al.* Hydrogels incorporating GdDOTA: Towards highly efficient dual T<sub>1</sub>/T<sub>2</sub> MRI contrast agents. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **51**, 9119–9122 (2012).
  44. Molina, M. *et al.* Stimuli-responsive nanogel composites and their application in nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 6161–6186 (2015).
  45. Caro, C., García-Martín, M. L. & Pernia Leal, M. Manganese-Based Nanogels as pH Switches for Magnetic Resonance Imaging. doi:10.1021/acs.biomac.7b00224
  46. Rieter, W. J., Taylor, K. M. L., An, H., Lin, W. & Lin, W. Nanoscale metal-organic frameworks as potential multimodal contrast enhancing agents. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 9024–9025 (2006).
  47. Tian, C., Zhu, L., Lin, F. & Boyes, S. G. Poly(acrylic acid) Bridged Gadolinium Metal–Organic Framework– Gold Nanoparticle Composites as Contrast Agents for Computed Tomography and Magnetic Resonance Bimodal Imaging. doi:10.1021/acsami.5b03998
  48. Taylor, K. M. L., Rieter, W. J. & Lin, W. Manganese-Based Nanoscale Metal-Organic Frameworks for Magnetic Resonance Imaging. doi:10.1021/ja803777x
  49. Chowdhury, M. A. Metal-Organic-Frameworks as Contrast Agents in Magnetic Resonance Imaging. *ChemBioEng Rev.* **4**, 225–239 (2017).
  50. Yang, H., Santra, S., Walter, G. A. & Holloway, P. H. GdIII-Functionalized Fluorescent Quantum Dots as Multimodal Imaging Probes. *Adv. Mater.* **18**, 2890–2894 (2006).
  51. Alric, C. *et al.* Gadolinium Chelate Coated Gold Nanoparticles As Contrast Agents for Both X-ray Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 5908–5915 (2008).
  52. Moriggi, L. *et al.* Gold Nanoparticles Functionalized with Gadolinium Chelates as High-

- Relaxivity MRI Contrast Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 10828–10829 (2009).
53. Hifumi, H., Yamaoka, S., Tanimoto, A., Citterio, D. & Suzuki, K. Gadolinium-Based Hybrid Nanoparticles as a Positive MR Contrast Agent. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 15090–15091 (2006).
  54. Evanics, F., Diamente, P. R., van Veggel, F. C. J. M., Stanisiz, G. J. & Prosser, R. S. Water-Soluble GdF<sub>3</sub> and GdF<sub>3</sub>/LaF<sub>3</sub> Nanoparticles Physical Characterization and NMR Relaxation Properties. *Chem. Mater.* **18**, 2499–2505 (2006).
  55. Bridot, J. L. *et al.* Hybrid gadolinium oxide nanoparticles: Multimodal contrast agents for in vivo imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 5076–5084 (2007).
  56. Johnson, N. J. J., He, S., Nguyen Huu, V. A. & Almutairi, A. Compact Micellization: A Strategy for Ultrahigh T1 Magnetic Resonance Contrast with Gadolinium-Based Nanocrystals. *ACS Nano* **10**, 8299–8307 (2016).
  57. Mignot, A. *et al.* A top-down synthesis route to ultrasmall multifunctional Gd-based silica nanoparticles for theranostic applications. *Chem. - A Eur. J.* **19**, 6122–6136 (2013).
  58. Lux, F. *et al.* Ultrasmall rigid particles as multimodal probes for medical applications. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**, 12299–12303 (2011).
  59. Sancey, L. *et al.* Long-term in Vivo clearance of gadolinium-based AGuIX nanoparticles and their biocompatibility after systemic injection. *ACS Nano* (2015). doi:10.1021/acsnano.5b00552
  60. Sancey, L. *et al.* The use of theranostic gadolinium-based nanoprobe to improve radiotherapy efficacy. *Br. J. Radiol.* **87**, 1–15 (2014).
  61. Kathryn M. L. Taylor, † *et al.* Mesoporous Silica Nanospheres as Highly Efficient MRI Contrast Agents. (2008). doi:10.1021/JA710193C
  62. Gerion, D. *et al.* Paramagnetic Silica-Coated Nanocrystals as an Advanced MRI Contrast Agent Paramagnetic Silica-Coated Nanocrystals as an Advanced MRI Contrast Agent. *J. Phys. Chem.* 12542–12551 (2007). doi:10.1021/jp074072p
  63. Na, H. Bin *et al.* Development of a T1 contrast agent for magnetic resonance imaging using MnO nanoparticles. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **46**, 5397–5401 (2007).
  64. Baek, M. J. *et al.* Water-Soluble MnO Nanocolloid for a Molecular T1 MR Imaging: A Facile One-Pot Synthesis, In vivo T1 MR Images, and Account for Relaxivities. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2**, 2949–2955 (2010).
  65. Shukoor, M. I. *et al.* Pathogen-Mimicking MnO Nanoparticles for Selective Activation of the TLR9 Pathway and Imaging of Cancer Cells. *Adv. Funct. Mater.* **19**, 3717–3725 (2009).
  66. Huang, J. *et al.* HSA coated MnO nanoparticles with prominent MRI contrast for tumor imaging. *Chem. Commun.* **46**, 6684–6686 (2010).
  67. An, K. *et al.* Synthesis of uniform hollow oxide nanoparticles through nanoscale acid etching. *Nano Lett.* **8**, 4252–4258 (2008).
  68. Kim, T. *et al.* Mesoporous silica-coated hollow manganese oxide nanoparticles as positive T1 contrast agents for labeling and MRI tracking of adipose-derived mesenchymal stem cells. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 2955–2961 (2011).

69. Schladt, T. D. *et al.* Au@MnO nanoflowers: Hybrid nanocomposites for selective dual functionalization and imaging. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **49**, 3976–3980 (2010).
70. Erik M. Shapiro and Alan P. Koretsky. Convertible Manganese Contrast for Molecular and Cellular MRI. *Magn. Reson. Med.* **60**, 265–269 (2008).
71. Wang, X. *et al.* Single ultrasmall Mn 2+ -doped NaNdF 4 nanocrystals as multimodal nanoprobe for magnetic resonance and second near-infrared fluorescence imaging  
KEYWORDS. doi:10.1007/s12274-017-1727-8
72. Buser, H. J., Schwarzenbach, D., Petter, W. & Ludi, A. The crystal structure of Prussian Blue: Fe<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sub>3</sub>.xH<sub>2</sub>O. *Inorg. Chem.* **16**, 2704–2710 (1977).
73. Itaya, K. & Uchida, I. Nature of intervalence charge-transfer bands in Prussian blues. *Inorg. Chem.* **25**, 389–392 (1986).
74. Robin, M. B. & Day, P. Mixed Valence Chemistry-A Survey and Classification. *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.* **10**, 247–422 (1968).
75. Robin, B. Y. M. B. & Ronm, R. The Color and Electronic Configurations of Prussian Blue. *Inorg. Chem.* **1**, 337–342 (1962).
76. Mayoh, B. B., Day, P. & Road, S. P. Charge Transfer in Mixed-valence Solids. Part V I I P Contribution of Valence Delocalisation to the Ferromagnetism of Prussian Blue. *J. Chem. Soc. Trans.* 1483 (1976).
77. Catala, L. & Mallah, T. Nanoparticles of Prussian blue analogs and related coordination polymers: From information storage to biomedical applications. *Coord. Chem. Rev.* **346**, 32–61 (2017).
78. Shokouhimehr, M. *et al.* Dual purpose Prussian blue nanoparticles for cellular imaging and drug delivery : a new generation of T 1 -weighted MRI contrast and small molecule delivery agents. *J. Mater. Chem.* **20**, 5251–5259 (2010).
79. Lian, H.-Y., Hu, M., Liu, C.-H., Yamauchi, Y. & Wu, K. C.-W. Highly biocompatible, hollow coordination polymer nanoparticles as cisplatin carriers for efficient intracellular drug delivery. *Chem. Commun.* **48**, 5151 (2012).
80. Perera, V. S. *et al.* Biocompatible Nanoparticles of KGd(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]-H<sub>2</sub>O with Extremely High T<sub>1</sub>-Weighted Relaxivity Owing to Two Water Molecules Directly Bound to the Gd(III) Center. *Langmuir* **30**, 12018–12026 (2014).
81. Guari, Y. *et al.* Cyano-bridged coordination polymer nanoparticles with high nuclear relaxivity: toward new contrast agents for MRI. *Dalton Trans.* 3658–3660 (2008). doi:10.1039/b808221a
82. Perrier, M. *et al.* Investigation on NMR relaxivity of nano-sized cyano-bridged coordination polymers. *Inorg. Chem.* **52**, 13402–13414 (2013).
83. Kenouche, S. *et al.* In vivo quantitative NMR imaging of fruit tissues during growth using Spoiled Gradient Echo sequence. *Magn. Reson. Imaging* **32**, 1418–1427 (2014).
84. Perrier, M. *et al.* Investigation of cyano-bridged coordination nanoparticles Gd 3+ / [Fe(CN) 6 ] 3- / d -mannitol as T 1 -weighted MRI contrast agents. *Nanoscale* **7**, 11899–11903 (2015).
85. Dumont, M. F. *et al.* Biofunctionalized gadolinium-containing Prussian blue nanoparticles as multimodal molecular imaging agents. *Bioconjug. Chem.* **25**, 129–137 (2014).

86. Li, Y., Li, C. H. & Talham, D. R. One-step synthesis of gradient gadolinium ironhexacyanoferrate nanoparticles: a new particle design easily combining MRI contrast and photothermal therapy. *Nanoscale* **7**, 5209–16 (2015).
87. Perera, V. S., Chen, G., Cai, Q. & Huang, S. D. Nanoparticles of gadolinium-incorporated Prussian blue with PEG coating as an effective oral MRI contrast agent for gastrointestinal tract imaging. *Analyst* **141**, 2016–2022 (2016).
88. Dumont, M. F., Yadavilli, S., Sze, R. W., Nazarian, J. & Fernandes, R. Manganese-containing Prussian blue nanoparticles for imaging of pediatric brain tumors. *Int J Nanomedicine* **9**, 2581–2595 (2014).
89. Paul, G. *et al.* Mn(II)-containing coordination nanoparticles as highly efficient T1 contrast agents for magnetic resonance imaging. *Chem. Commun. (Camb)*. **50**, 6740–3 (2014).
90. Zhu, W. *et al.* Mn<sup>2+</sup>-Doped Prussian Blue Nanocubes for Bimodal Imaging and Photothermal Therapy with Enhanced Performance. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 11575–11582 (2015).
91. Cai, X. *et al.* A Prussian Blue-Based Core-Shell Hollow-Structured Mesoporous Nanoparticle as a Smart Theranostic Agent with Ultrahigh pH-Responsive Longitudinal Relaxivity. *Adv. Mater.* **27**, 6382–6389 (2015).
92. Huang, X., El-Sayed, I. H., Qian, W. & El-Sayed, M. A. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. doi:10.1021/ja057254a
93. Svaasand, L. O., Gomer, C. J. & Morinelli, E. On the Physical Rationale of Laser Induced Hyperthermia. *Lasers Med. Sci.* **5**, 121 (1990).
94. Chen, Q. *et al.* Recent advances in different modal imaging-guided photothermal therapy. *Biomaterials* **106**, 144–166 (2016).
95. Pissuwan, D., Valenzuela, S. M. & Cortie, M. B. Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles. doi:10.1016/j.tibtech.2005.12.004
96. Patrick, D. *et al.* Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. doi:10.1016/j.canlet.2004.02.004
97. Morales-Dalmau, J., Vilches, C., De Miguel, I., Sanz, V. & Quidant, R. Optimum morphology of gold nanorods for light- induced hyperthermia. (2018). doi:10.1039/c7nr06825e
98. Narges Elahia, Mehdi Kamalia & Mohammad Hadi Baghersad. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta* **184**, 537–556 (2018).
99. Laurent, G., Sanchez, G. J., Bazzi, R., Perriat, P. & Tillement, O. Nanoparticules d'or multifonctionnelles pour l'imagerie et la thérapie.
100. Marangon, I. *et al.* Synergic mechanisms of photothermal and photodynamic therapies mediated by photosensitizer/carbon nanotube complexes. *Carbon N. Y.* **97**, 110–123 (2016).
101. Fu, G., Liu, W., Feng, S. & Yue, X. Prussian blue nanoparticles operate as a new generation of photothermal ablation agents for cancer therapy. *Chem. Commun.* **48**, 11567 (2012).
102. Hoffman, H., Chakrabarti, L. & Dumont, M. Prussian blue nanoparticles for laser-induced photothermal therapy of tumors. *RSC Adv.* 29729–29734 (2014). doi:10.1039/C4RA05209A
103. Fu, G. *et al.* Magnetic Prussian blue nanoparticles for targeted photothermal therapy under

- magnetic resonance imaging guidance. *Bioconjug. Chem.* **25**, 1655–63 (2014).
104. Shradha S Kale<sup>1, 2</sup> *et al.* Composite iron oxide–Prussian blue nanoparticles for magnetically guided T1 -weighted magnetic resonance imaging and photothermal therapy of tumors. *Int. J. Nanomedicine* **12**, 6413–6424 (2017).
  105. Peng, J. *et al.* ‘one-for-All’-Type, Biodegradable Prussian Blue/Manganese Dioxide Hybrid Nanocrystal for Trimodal Imaging-Guided Photothermal Therapy and Oxygen Regulation of Breast Cancer. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 13875–13886 (2017).
  106. Li, Z. *et al.* Glypican-3 antibody functionalized Prussian blue nanoparticles for targeted MR imaging and photothermal therapy of hepatocellular carcinoma. *J. Mater. Chem. B* **2**, 3686–3696 (2014).
  107. Jing, L. *et al.* Prussian blue coated gold nanoparticles for simultaneous photoacoustic/CT bimodal imaging and photothermal ablation of cancer. *Biomaterials* **35**, 5814–5821 (2014).
  108. Su, Y. Y. *et al.* A Multifunctional PB@mSiO<sub>2</sub>-PEG/DOX Nanoplatform for Combined Photothermal-Chemotherapy of Tumor. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 17038–17046 (2016).
  109. Jing, L. *et al.* Hyaluronic Acid Modified Hollow Prussian Blue Nanoparticles Loading 10-hydroxycamptothecin for Targeting Thermochemotherapy of Cancer. *Theranostics* **6**, 40–53 (2016).
  110. Kandanaipitiye, M. S. *et al.* Incorporation of Gallium-68 into the Crystal Structure of Prussian Blue to Form K<sub>68</sub>GaxFe<sub>1-x</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] Nanoparticles: Toward a Novel Bimodal PET/MRI Imaging Agent. *Dalt. Trans.* **45**, 9174 (2016).
  111. Perrier, M. *et al.* <sup>201</sup>Tl<sup>+</sup>-labelled Prussian blue nanoparticles as contrast agents for SPECT scintigraphy. *Nanoscale* **6**, 13425–13429 (2014).
  112. Lacombe, S., Porcel, E. & Scifoni, E. Particle therapy and nanomedicine: state of art and research perspectives. *Cancer Nanotechnol.* (2017). doi:10.1186/s12645-017-0029-x
  113. Lux, F. *et al.* Gadolinium-based nanoparticles for theranostic MRI-radiosensitization. *Nanomedicine* **10**, 1801–1815 (2015).
  114. Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N. & Smilowitz, H. M. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys. Med. Biol. Phys. Med. Biol* **49**, 309–315 (2004).
  115. Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N., Focella, T. M. & Smilowitz, H. M. Gold nanoparticles: A new X-ray contrast agent. *Br. J. Radiol.* **79**, 248–253 (2006).
  116. Young, S. W. *et al.* Gadolinium(III) texaphyrin: a tumor selective radiation sensitizer that is detectable by MRI. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 6610–6615 (1996).
  117. Le Duc, G. *et al.* Advantages of gadolinium based ultrasmall nanoparticles vs molecular gadolinium chelates for radiotherapy guided by MRI for glioma treatment. 1–14 (2014). doi:10.1186/s12645-014-0004-8
  118. Porcel, E. *et al.* Gadolinium-based nanoparticles to improve the hadrontherapy performances. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **10**, 1601–1608 (2014).
  119. Porcel, E. *et al.* Platinum nanoparticles: a promising material for future cancer therapy? *Nanotechnology* **21**, 085103 (2010).

120. Schlathölter, T. *et al.* Improving proton therapy by metal-containing nanoparticles: Nanoscale insights. *Int. J. Nanomedicine* **11**, 1549–1556 (2016).
121. Thomas Schlathölter *et al.* Improving proton therapy by metal-containing nanoparticles: nanoscale insights. *Int. J. Nanomedicine* **11**, 1549–1556 (2016).
122. Zhang, H. *et al.* Cyanogel-derived N-doped C nanosheets immobilizing Pd-P nanoparticles: One-pot synthesis and enhanced hydrogenation catalytic performance. *Appl. Surf. Sci.* **396**, 812–820 (2017).
123. Pfennig, B. W., Bocarsly, A. B. & Prud'homme, R. K. Synthesis of a Novel Hydrogel Based on a Coordinate Covalent Polymer Network. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 2661–2665 (1993).
124. Watson, D. F., Willson, J. L. & Bocarsly, A. B. Photochemical image generation in a cyanogel system synthesized from tetrachloropalladate(II) and the trimetallic mixed-valence complex [(NC)<sub>5</sub>Fe<sup>II</sup>-CN-Pt<sup>IV</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>-NC-Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>5</sub>]<sub>4</sub>-. Consideration of photochemical and dark mechanistic pathways of Prussian bl. *Inorg. Chem.* **41**, 2408–2416 (2002).
125. Sharp, S. L., Bocarsly, A. B. & Scherer, G. W. Bulk Properties of a Cyanogel Network: Toward an Understanding of the Elastic, Mechanical, and Physical Processes Associated with Sol-Gel Processing of Cyanide-Bridged Gel Systems. *Chem. Mater.* **10**, 825–832 (1998).
126. Deshpande, R. S., Sharp-goldman, S. L. & Bocarsly, A. B. Thermodynamics and Kinetics of CO<sub>2</sub> Adsorption on Dehydrated Palladium / Cobalt-Based Cyanogels : A Highly Selective , Fully Reversible System for CO<sub>2</sub> Storage. *Adsorpt. J. Int. Adsorpt. Soc.* 7694–7698 (2002).
127. Mar ija Heibel, Gireesh Kumar , Car rie Wyse, Peter Bukovec, and A. B. B. Use of Sol-Gel Chemistry for Preparation of Cyanogels as Ceramic ans Alloy Precursors. *Chem. Mater.* **4756**, 1504–1511 (1996).
128. Vondrova, M., Burgess, C. M. & Bocarsly, A. B. Cyanogel coordination polymers as precursors to transition metal alloys and intermetallics - From traditional heating to microwave processing. *Chem. Mater.* **19**, 2203–2212 (2007).
129. Vondrova, M., Mcqueen, T. M., Burgess, C. M., Ho, D. M. & Bocarsly, A. B. Autoreduction of Pd - Co and Pt - Co Cyanogels : Exploration of Cyanometalate Coordination Chemistry at Elevated Temperatures. *J. Am. Chem. Soc.* 5563–5572 (2008).
130. Liu, H. *et al.* Trimetallic PtRhNi alloy nanoassemblies as highly active electrocatalyst for ethanol electrooxidation. doi:10.1007/s12274-017-1545-z
131. Wu, P. *et al.* Cyanogel-Enabled Homogeneous Sb–Ni–C Ternary Framework Electrodes for Enhanced Sodium Storage. *ACS Nano* **12**, 759–767 (2018).
132. Chen, X. *et al.* Hydrogel-Derived Nanoporous Sn–In–Ni Ternary Alloy Network for High-Performance Lithium-Storage. *Electrochim. Acta* **210**, 530–538 (2016).
133. Liu, Z.-Y. *et al.* PdCo/Pd-Hexacyanocobaltate Hybrid Nanoflowers: Cyanogel- Bridged One-Pot Synthesis and Their Enhanced Catalytic Performance. *Nat. Publ. Gr.* (2016). doi:10.1038/srep32402
134. Liu, H. *et al.* Sn-Fe cyanogels noncovalently grafted to carbon nanotubes in a versatile biointerface design: an efficient matrix and a facile platform for glucose oxidase immobilization. *J. Mater. Chem. B* **2**, 4615–4624 (2014).

135. Burgess, C. M., Yao, N. & Bocarsly, A. B. Stabilizing cyanosols: amorphous cyanide bridged transition metal polymer nanoparticles. *J. Mater. Chem.* **19**, 8846 (2009).
136. Brnzei, D. *et al.* Spontaneous stabilization and isolation of dispersible bimetallic coordination nanoparticles of  $Cs_x Ni[Cr(CN)_6]_y$ . *J. Mater. Chem.* **16**, 2593–2599 (2006).

## CHAPITRE II : NANOPARTICULES DE BLEU DE PRUSSE CONTENANT DES IONS PARAMAGNETIQUES Gd<sup>III</sup> OU Mn<sup>II</sup> COMBINANT PERFORMANCES EN IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE ET EN HYPERTHERMIE PHOTOASSISTEE

Ce chapitre est consacré à l'étude de nanoparticules de réseau de coordination en vue d'en faire des plateformes théranostiques. L'utilisation du bleu de Prusse et de ses analogues est la stratégie développée depuis plusieurs années au sein de l'équipe. En effet, ces réseaux permettent l'utilisation d'éléments actifs en tant qu'agent de contraste T<sub>1</sub>, comme les ions Mn<sup>2+</sup> (S=5/2) ou les ions Gd<sup>3+</sup> (S=7/2). Les caractéristiques optiques (transition dans le visible) du cœur bleu de Prusse permettent d'envisager des applications en hyperthermie photoassistée. Ce travail a donc consisté à mettre au point des nanoparticules de bleu de Prusse (Fe<sup>III</sup>-NC-Fe<sup>II</sup>) ou d'analogue de bleu de Prusse (In<sup>III</sup>-NC-Fe<sup>II</sup>) contenant du Gd<sup>III</sup> ou du Mn<sup>II</sup>. Le but est d'obtenir des objets ayant des performances nettement améliorées en tant qu'agents de contraste T<sub>1</sub> par rapport aux complexes commerciaux de Gd<sup>III</sup>. Pour cela, trois types de nanoparticules seront étudiés en termes de structure, de taille et de composition chimique. L'influence de ces différents paramètres sur la relaxivité sera discutée. Les performances en hyperthermie photoassistée seront exposées et discutées pour les nanoparticules composées d'un cœur bleu de Prusse.

### I. Introduction

Les nanoparticules de bleu de Prusse et ces analogues ont fait l'objet de beaucoup d'intérêt pour des applications en tant qu'agents de contraste T<sub>1</sub>. Le Fe<sup>III</sup> est haut spin dans le réseau (configuration électronique (t<sub>2g</sub>)<sup>3</sup> (e<sub>g</sub>)<sup>2</sup>), il est paramagnétique et a un spin de 5/2. Malgré le spin élevé du Fe<sup>III</sup>, celui-ci ne permet pas d'atteindre des valeurs de relaxivités intéressantes car la relaxation électronique limite les performances de ce système<sup>1</sup>. Afin de valoriser l'utilisation d'un réseau polymérique à pont cyanure, l'équipe s'est concentrée sur le développement des nanoparticules de type, Mn<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>.nH<sub>2</sub>O et Gd<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>.nH<sub>2</sub>O. Le caractère oxophile et la forte labilité des ions Mn<sup>2+</sup> et Gd<sup>3+</sup> empêchent la croissance de particules de tailles homogènes. Pour pallier à ce problème le Fe<sup>III</sup> peut être substitué, soit totalement par une combinaison entre In<sup>III</sup> et Mn<sup>II</sup> ou Gd<sup>III</sup>, soit en partie par les ions paramagnétiques Mn<sup>2+</sup> ou Gd<sup>3+</sup>. Grâce à la forte insolubilité des réseaux In<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup> et Fe<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup>, des nanoparticules de taille et de composition contrôlées peuvent être obtenues. Le Gd<sup>III</sup> a fait l'objet de nombreuses études pour des applications en tant qu'agents de contraste T<sub>1</sub> dans des complexes (cf. Chapitre I). En effet, il présente un haut spin et un temps de relaxation électronique nettement plus long que le Fe<sup>III</sup>. Un des problèmes rencontrés par ces systèmes est la toxicité engendrée par la présence de Gd<sup>III</sup> libre qui peut conduire à des fibroses néphrogéniques systémiques. Ainsi, plusieurs agents de contraste commerciaux ont été retirés de la vente. La recherche s'est alors davantage intéressée au Mn<sup>II</sup>. Bien que le manganèse soit un composé indispensable à l'Homme pour survivre, lorsqu'il est ingéré en trop grande quantité, il peut traverser la barrière hématoencéphalique et créer une toxicité neurologique. Malgré son spin inférieur, il peut présenter des performances intéressantes grâce à une relaxation électronique lente comparé au Gd<sup>III</sup>. Au cours de la thèse de Gabriella Paul, des nanoparticules de formules K<sub>4y-3+x</sub>Mn<sup>II</sup><sub>x</sub>In<sup>III</sup><sub>1-x</sub>[Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>]<sub>y</sub> (x compris entre 0,05 et 0,40) ont été développées. Il a été montré que la taille des particules était dépendante du taux de manganèse. L'objet optimal est obtenu pour 33% de Mn<sup>II</sup> avec une taille de 5 nm et une relaxivité longitudinale de 10 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> à 60MHz (Fig.II-1).



En effet, l'augmentation du taux de Mn<sup>II</sup> conduit à une augmentation de la taille des particules et également à une diminution de la relaxivité. Ceci s'explique par un enfouissement progressif des ions Mn<sup>2+</sup>, les ions de surface contribuant majoritairement à la relaxivité.

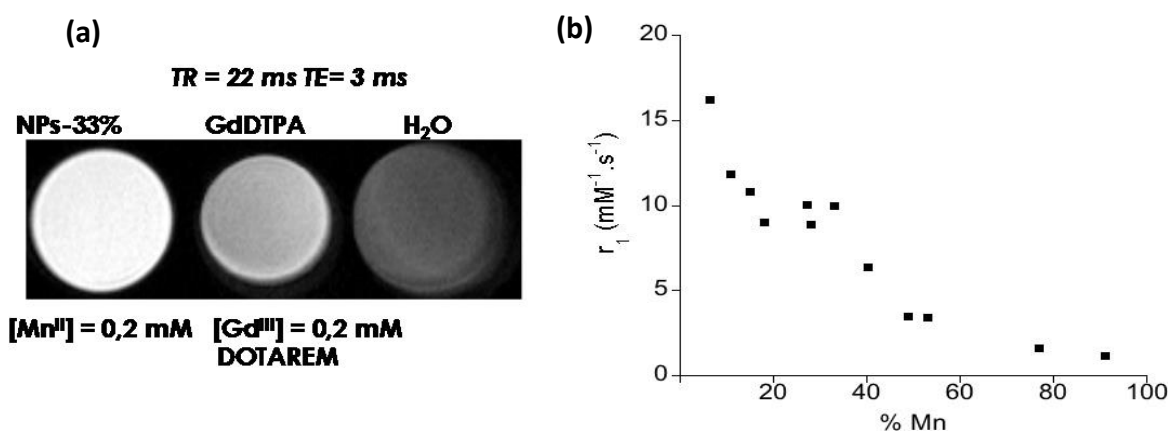


Figure II-1. (a) Image de contraste de K<sub>0,93</sub>Mn<sup>II</sup><sub>0,33</sub>In<sup>III</sup><sub>0,67</sub>[Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>]<sub>0,9</sub> à 300MHz ; (b) Evolution de la relaxivité longitudinale  $r_1$  en fonction du taux de manganèse<sup>11</sup>.

L'utilisation d'un réseau de type bleu de Prusse permet des performances nettement supérieures aux agents cliniques ( $r_1 \approx 4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). La microporosité du réseau ainsi que la proportion importante d'atomes en surface fait des réseaux de type bleu de Prusse des candidats prometteurs en tant qu'agents de contraste. De plus, lors de la synthèse, des lacunes en hexacyanoferrate sont créées permettant d'augmenter la porosité du réseau et de favoriser l'accès des molécules d'eau aux ions paramagnétiques. L'étude sur les systèmes au manganèse a également montré que peu de Mn<sup>II</sup> libre se trouvait relargué même à très basse concentration. Ces résultats prometteurs ont conduit à la synthèse de particules proches contenant comme ions paramagnétiques le Gd<sup>III</sup>. Les particules K<sub>4y-3</sub>Gd<sup>III</sup><sub>x</sub>In<sup>III</sup><sub>1-x</sub>[Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>]<sub>y</sub>, constituées d'un cœur diamagnétique, ont été étudiées chimiquement pour optimiser leurs propriétés en relaxivité.

Au cours de ce travail, de nombreuses études concernant les nanoparticules de bleus de Prusse pour des applications médicales ont été publiées<sup>2,3,4</sup>. Ces objets ont montré des performances intéressantes en hyperthermie photoassistée (Cf. Chapitre I). Des nanoparticules de type K<sub>4y-3+x</sub>M<sup>II/III</sup><sub>x</sub>Fe<sup>III</sup><sub>1-x</sub>[Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>]<sub>y</sub> où M=Gd<sup>III</sup> ou Mn<sup>II</sup> ont déjà fait l'objet de plusieurs publications<sup>5,6,7,8</sup>. Ces composés ont, de manière générale, des tailles supérieures à 15 nm. Nous avons mis au point des nanoparticules de taille inférieure à 10 nm. L'étude des performances en relaxivité et en hyperthermie photoassistée est l'objet de ce travail, après une caractérisation fine des nanoparticules.

## II. Les nanoparticules K<sub>4y-3</sub>Gd<sup>III</sup><sub>x</sub>In<sup>III</sup><sub>1-x</sub>[Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>]<sub>y</sub>

### II.1 Synthèse des particules

#### II.1.1 Synthèse en solution aqueuse

Depuis plusieurs années, l'équipe travaille à l'élaboration de particules d'analogues du bleu de Prusse (ABP) par stabilisation électrostatique dans l'eau<sup>9</sup>. Par ajout rapide de précurseurs sous forte agitation et grâce à un excès en hexacyanométallate, des particules chargées négativement sont obtenues.

Grâce à une étape de nucléation rapide, favorisée pour des métaux M peu labiles et dont les liaisons M-NC-M' sont assez fortes, l'obtention de germes stables en solution se fait sur une période courte. Ainsi, la nucléation puis la croissance des germes sont découplées. Une synthèse à faible concentration et à basse température produit des objets de faible dimension. Dans le cas des analogues de bleu de Prusse à base de Mn<sup>II</sup> ou de Gd<sup>III</sup>, l'obtention de particules stables et homogènes en taille par cette voie n'a pas été concluante. Ceci peut s'expliquer par une formation des germes de manière locale conduisant à une nucléation non homogène due à la forte labilité des ions Mn<sup>2+</sup> et Gd<sup>3+</sup>. Un mécanisme d'échange associatif ainsi qu'une constante de formation du réseau faible peuvent également justifier les problèmes rencontrés. Pour pallier à ceux-ci, un pourcentage variable d'In<sup>III</sup> en présence de Mn<sup>II</sup> a été ajouté à des solutions de ferrocyanure. Au cours de la thèse de G. Paul, des particules d'analogues de bleu de Prusse contenant trois ions métalliques (In<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>) ont été synthétisées avec des taux variables en Mn<sup>II</sup> et en In<sup>III</sup>. Ces objets de tailles contrôlées ont montré des valeurs de relaxivité particulièrement élevées et une grande stabilité dans le temps<sup>10,11</sup>. Afin de poursuivre le travail effectué sur les particules à base de Mn<sup>II</sup>, la même stratégie a été appliquée en remplaçant le Mn<sup>II</sup> par du Gd<sup>III</sup>. Une série de nanoparticules K<sub>4-y-3</sub>Gd<sup>III</sup><sub>x</sub>In<sup>III</sup><sub>1-x</sub>[Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>] (0,05<x<1) désignées par Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe[5], [10], [15], [20], [25], [50], [75], [100] a été synthétisée dans le but d'étudier leurs propriétés structurales, chimiques, de tailles et leurs influences sur la relaxivité.

En ajoutant rapidement, dans une solution aqueuse d'hexacyanoferrate de potassium à 0,5mM, une solution aqueuse contenant les sels métalliques, GdCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O et InCl<sub>3</sub>.xH<sub>2</sub>O, en proportions variables, telles que [Gd<sup>3+</sup>+In<sup>3+</sup>] = 0,5mM, des particules sont obtenues sans utilisation de surfactant. L'ajout s'effectue à 2°C. Cette température est maintenue pendant 30 minutes après ajout, puis le mélange est laissé à température ambiante, une nouvelle fois pendant 30 minutes. Les détails du protocole de synthèse sont explicités dans l'annexe 1. L'application dans le domaine médical nécessite un enrobage des particules pour leur permettre de circuler plus longtemps dans l'organisme, mais également pour leur permettre d'être internalisées plus facilement par les cellules. L'enrobage peut aussi permettre de diminuer la toxicité. La voie de synthèse développée par l'équipe permet une étape de fonctionnalisation après la formation des particules, ce qui est un avantage notable pour étudier l'effet de celui-ci sans modification de la nature et de la taille du cœur.

### **II.1.2 Fonctionnalisation par le dextran**

Le choix de l'enrobage des particules ne doit pas être négligé. D'un point de vue chimique, il doit avoir une affinité suffisante pour les particules, permettant ainsi la récupération d'une quantité optimale de particules enrobées sans en augmenter la taille. Pour être en adéquation avec les applications visées, il doit être biocompatible et hydrophile, pour permettre un accès facilité des molécules d'eau aux ions paramagnétiques. Par exemple, la fonctionnalisation de particules par une couche de silice limite l'échange des molécules d'eau et entraîne donc une diminution de la relaxivité. Ceci a été montré sur des particules creuses de MnO<sup>12</sup>. Notre choix s'est porté sur le dextran. Ce polymère biocompatible est soluble dans l'eau. Sa structure est présentée sur la figure II-2.

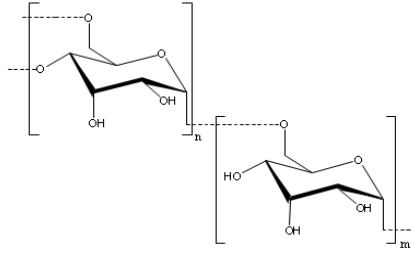


Figure II-2. Structure du dextran

Les groupements hydroxyles du dextran interagissent avec les ponts cyanure du réseau bleu de Prusse via des liaisons hydrogène. Le polymère n'interagissant pas directement avec les cations métalliques, il n'y a pas de modifications du nombre de molécules d'eau coordonnées ce qui est favorable à une relaxivité élevée.

Le dextran est ajouté après synthèse des nanoparticules en solution. Il a été montré, précédemment que 25 équivalents de monomère par rapport à la quantité de  $Gd^{III}$  et  $In^{III}$  était la quantité optimale pour maximiser les performances en relaxivité<sup>10</sup>. Les particules sont ensuite précipitées dans l'acétone et centrifugées afin de récupérer une poudre. Celle-ci peut ensuite être redispersée dans l'eau pour obtenir des solutions de concentrations choisies. Ces solutions pourront être analysées en relaxométrie. Les échantillons sont caractérisés par spectroscopie infrarouge (IR), Diffraction des Rayons X (DRX), Analyses Élémentaires (AE, ICP-OES et EDS), Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS) et Microscopie Electronique en Transmission (MET). L'ensemble de ses analyses permet de connaître chimiquement nos échantillons. Les techniques d'analyse utilisées sont décrites dans l'annexe 3. Les composés ayant un taux de  $Gd^{III}$  supérieur à 20% ont été synthétisés et caractérisés dans le travail de thèse de G. Paul.

## II.2 Caractérisations structurales et évaluation des tailles

### II.2.1 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière permet de connaître le diamètre hydrodynamique des particules en solution. A terme, cette information est indispensable pour envisager une voie d'élimination des particules de l'organisme. Ces mesures sont effectuées à 20°C. Les mesures montrent une évolution des diamètres en fonction du taux de gadolinium (Fig.II-3). En effet, plus il y a de  $Gd^{III}$  plus le diamètre hydrodynamique augmente.

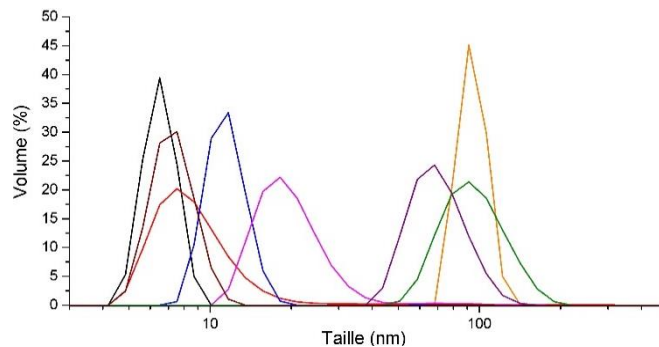


Figure II-3. Distributions de taille en volume des particules  $Gd^{III}In^{III}Fe[5]$ , [10], [15], [20], [25], [50], [75], [100] obtenues par DLS en solution colloïdale

En présence d'In<sup>III</sup>, les nanoparticules ont un diamètre inférieur à 10 nm pour des taux en Gd<sup>III</sup> compris entre 5 et 15%. Lorsque la proportion de Gd<sup>III</sup> est plus importante, les diamètres hydrodynamiques augmentent jusqu'à une taille de 90 nm. En absence d'In<sup>III</sup>, les particules ont un diamètre hydrodynamique de l'ordre de 90 nm, démontrant ainsi l'intérêt du réseau insoluble d'In<sup>III</sup>Fe. Il est donc indispensable d'avoir un cœur plus insoluble, que le Gd<sup>III</sup>Fe, pour contrôler la croissance et synthétiser des particules ayant un diamètre hydrodynamique inférieur ou égale à 10 nm.

	[5]	[10]	[15]	[20]	[25]	[50]	[75]	[100]
Taille (nm)	5	5-6	5-10	10-12	20	65	90	90

Tableau II-1. Diamètres hydrodynamiques des nanoparticules Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe [5], [10], [15], [20], [25], [50], [75], [100] obtenues par DLS en solution aqueuse

Les diamètres hydrodynamiques des particules après enrobage au dextran et redispersion dans l'eau montrent très peu d'évolution. La légère augmentation s'explique par la présence des chaînes de dextran. Ci-dessous sont présentées les distributions de taille en volume des redispersions pour les particules contenant 5 et 10% en Gd<sup>III</sup>. Ces résultats attestent de la bonne stabilité des particules en solution.

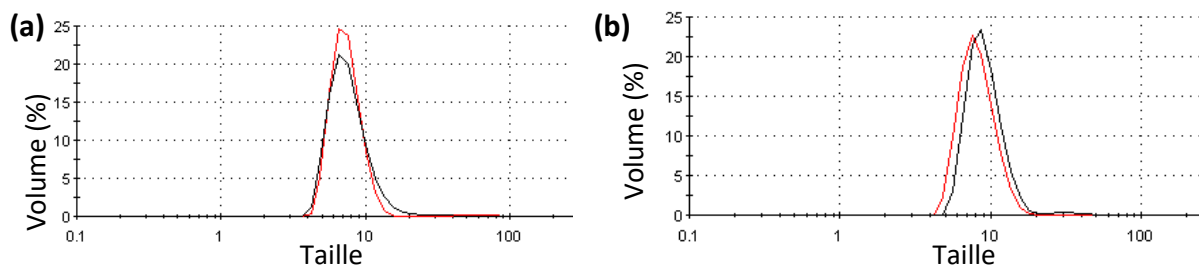
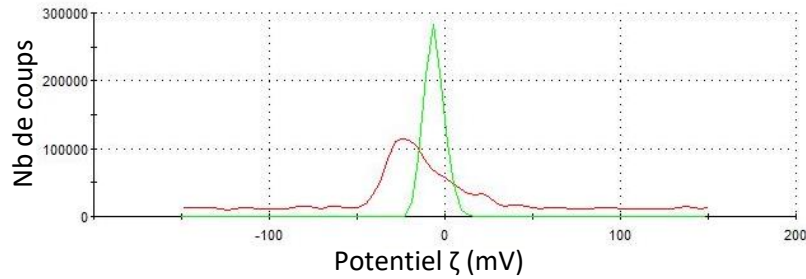


Figure II-4. Distributions de taille en volume des particules en fin de synthèse (rouge) et après redispersions dans l'eau (noir) (a) Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe [5] ; (b) Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe [10]

Les diamètres sont inférieurs à 8 nm même en présence de dextran. Ceci permet d'envisager une élimination des particules par voie rénale pour des taux en gadolinium inférieur à 20%. Le diamètre hydrodynamique des particules doit être dans l'idéal inférieur à 6 nm, pour espérer une élimination par les reins. Cependant, un diamètre hydrodynamique compris entre 6 et 8 nm peut permettre une élimination majoritaire par cette voie. Au-delà de ces tailles et de manière générale, seules des études de biodistribution peuvent permettre de répondre à la question de la voie d'élimination<sup>13,14</sup>.

La mesure du potentiel zéta ( $\zeta$ ) permet de rendre compte de la charge de surface des particules. En solution, les particules sont chargées négativement (environ -20 mV), ce qui permet de les stabiliser par effet électrostatique. Lorsque les particules sont enrobées par le dextran, un abaissement de la charge (-9 mV) est constaté. Cette observation montre que le polymère se trouve bien autour des particules. Les particules conservent néanmoins une charge légèrement négative (Fig. II-5).



**Figure II-5.** Potentiel  $\zeta$  des particules  $Gd^{III}In^{III}Fe$  [5] en fin de synthèse (en rouge) et après enrobage au dextran et redispersion dans l'eau (vert)

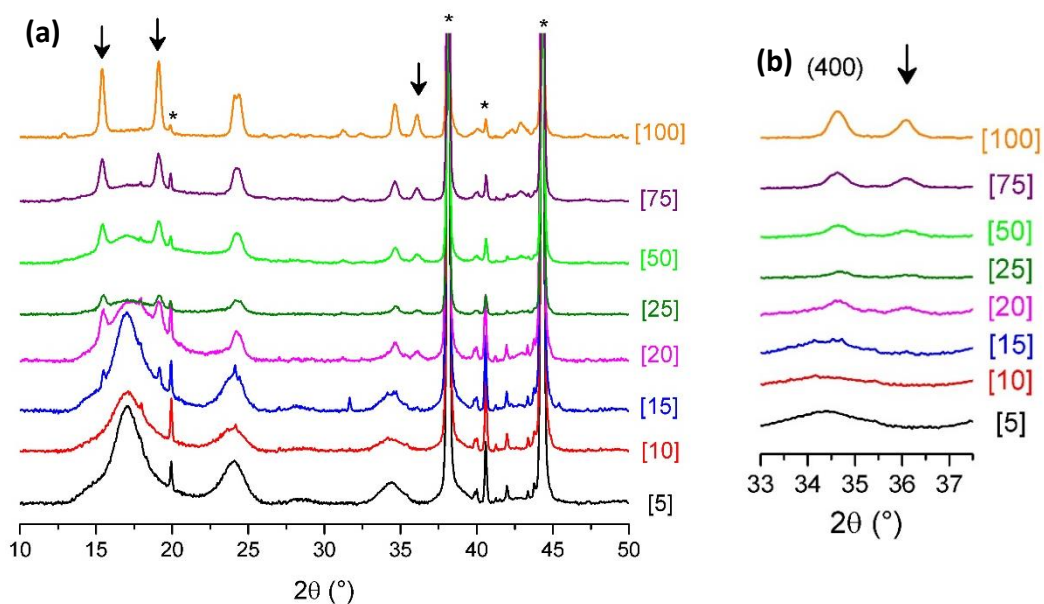
La diffusion dynamique de la lumière nous permet d'obtenir une première estimation de la taille de nos objets. Néanmoins, à cause du faible nombre de coups détecté, les valeurs obtenues restent indicatives. De plus, cette méthode mesure le diamètre hydrodynamique tenant alors compte de la couche de solvatation ce qui conduit à une surestimation de la taille. Ces informations doivent être combinées à celles obtenue par d'autres techniques (DRX et MET).

### II.2.2 Diffraction des rayons X sur poudre (DRX)

Alors que le réseau  $In^{III}_4[Fe^{II}(CN)_6]_3$  (nommé  $In^{III}Fe$ ) cristallise dans un réseau cubique à face centrée, le réseau  $KGd^{III}(H_2O)_2[Fe^{II}(CN)_6]$  (abrégé  $Gd^{III}Fe$ ) est orthorhombique<sup>15</sup>. Le  $Gd^{III}$  se trouve dans un prisme trigonal formé par les cyanures et deux molécules d'eau complètent la sphère de coordination. La structure du réseau est explicitée dans la figure I-39 du chapitre I.

Une épitaxie entre ces deux réseaux est donc impossible. Nous supposons que la structure des particules  $Gd^{III}In^{III}Fe$  peut se représenter par un cœur  $In^{III}Fe$  autour duquel se trouve des entités  $Gd^{III}Fe$  en surface, ou une coquille polycristalline.

Les diffractogrammes ont été enregistrés pour des particules  $Gd^{III}In^{III}Fe$ [5] à [100]. Pour des taux en  $Gd^{III}$  allant de 5 à 25%, les entités  $Gd^{III}Fe$  forment des sous-couches moléculaires.



**Figure II-6.** (a) Diffractogrammes des composés  $Gd^{III}In^{III}Fe$  avec différents taux de  $Gd^{III}$ ; (b) Pic de Bragg (400) de la structure CFC dans la zone  $33-37^\circ$  (\*porte objet;  $\rightarrow$  structure  $Gd^{III}Fe^{II}$ )

La présence des pics de diffraction plus fins de la structure  $Gd^{III}Fe$  pour les échantillons dont le pourcentage de  $Gd^{III}$  est supérieur à 20% tend à prouver la démixtion des deux phases et sont incompatibles avec la formation d'une coquille fine. Des observations MET (*Fig.II-7*) sur un échantillon à 25% en  $Gd^{III}$  ont confirmé la démixtion. En effet, des particules de plus grandes tailles de  $Gd^{III}Fe$  ont été observées. Bien qu'aucune particule de grande taille n'ait été observée pour les particules à 15%, nous avons préféré écarter ce composé en raison du diffractogramme qui ne permet pas de trancher quant à la présence de deux phases. La suite de l'étude sera donc focalisée sur les composés  $Gd^{III}In^{III}Fe$  [5] et [10]. Pour ces composés, seuls les pics de la structure CFC du cœur  $In^{III}Fe$  sont présents sur les diffractogrammes. Les entités  $Gd^{III}Fe$  sont donc réparties de manière hétérogène à la surface du cœur. Par la formule de Scherrer et la loi de Bragg (Annexe 6), les diamètres des domaines cristallins et les paramètres de maille sont déduits pour ces deux composés. Les résultats sont regroupés dans le tableau II-2.

Echantillon	Paramètre de maille (Å)	Domaine cristallin (nm)
[5]	10,44±0,03	5,0±0,2
[10]	10,45±0,03	5,1±0,2

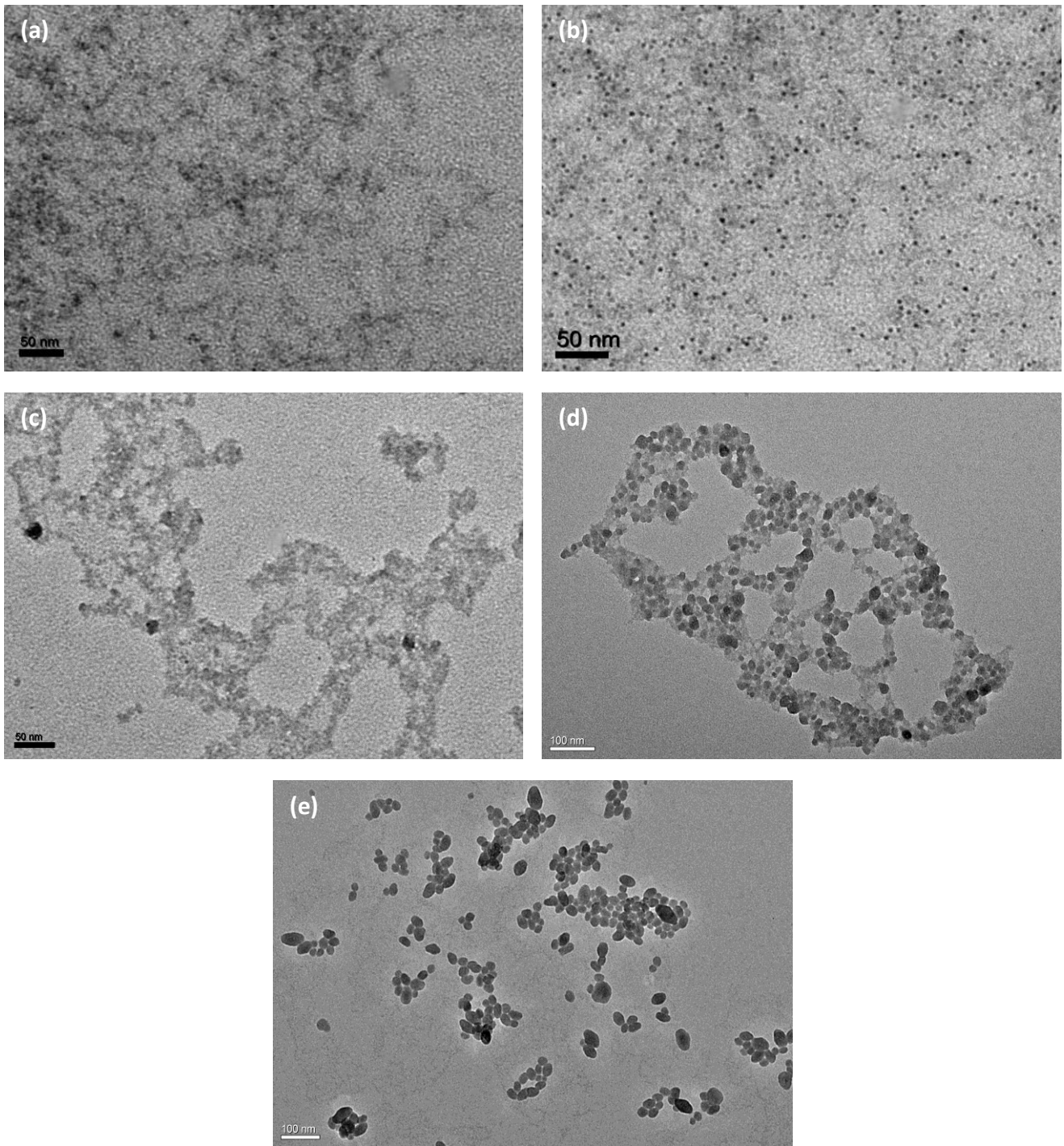
**Tableau II-2.** Paramètres de maille et tailles des domaines cristallins déduits de la DRX sur poudre pour les échantillons  $Gd^{III}In^{III}Fe$  [5] et [10]

La taille des domaines cristallins peut être ici assimilée aux diamètres des particules. En accord avec les mesures de DLS, les tailles des particules n'évoluent pas pour les deux compositions et sont de l'ordre de 5 nm. De plus, les paramètres de mailles sont proche de celui du réseau  $In^{III}Fe$  qui est de 10,45 Å, ce qui est cohérent. Ces résultats vont dans le sens d'une structure avec un cœur cristallin d'analogie de bleu de Prusse,  $In^{III}Fe$  et des entités de  $Gd^{III}Fe$  situées en surface, indétectables par DRX.

### **II.2.3 Microscopie électronique en transmission (MET)**

Des redispersions de particules enrobées de dextran sont observées par microscopie électronique en transmission. La figure II-7 montre les micrographies des échantillons  $Gd^{III}In^{III}Fe$  [5], [10], [25], [50] et [100]. Due à une faible densité métallique et à la présence du dextran, peu de contraste est observé, rendant l'estimation des tailles des particules difficiles et avec une faible précision. Cependant, les contrastes des composés  $Gd^{III}In^{III}Fe$  [50] et [100] sont nettement plus marqués. A 25% en  $Gd^{III}$ , deux types de population sont présentes, se distinguant par leur taille. Les plus petites et moins contrastées sont probablement composées d' $In^{III}Fe$ . A l'inverse, les plus grandes et contrastées sont sûrement des particules de  $Gd^{III}Fe$ . Ceci confirme une nouvelle fois la démixtion de phase qui se retrouve sur les diffractogrammes de ces objets. Bien que des particules de plus grande taille ne sont pas observées pour 20% et 15% en  $Gd^{III}$ , ces composés ont été mis de côté car les analyses DRX vont plutôt dans le sens d'une démixtion. Les micrographies des particules sans  $In^{III}$  sont une preuve de plus de l'importance de sa présence. Ces images montrent des particules d'une vingtaine de nanomètre supposant une agrégation en solution. En effet, la DLS indique un diamètre de l'ordre de 90 nm. L'ensemble de ces arguments justifie que notre intérêt se soit porté sur les composés dopés à 5% et 10% en  $Gd^{III}$ .





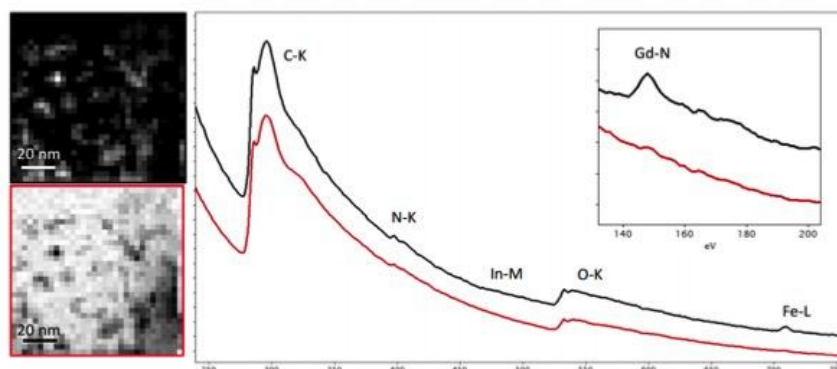
**Figure II-7.** Micrographies des particules après redispersion dans l'eau de Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe (a) [5] ; (b) [10] ; (c) [25] ; (d) [50] ; (e) [100]

Malgré la difficulté pour estimer les tailles, celles-ci sont regroupées dans le tableau II-3. D'après les images MET, les particules Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe [5] et [10] sont de petite taille et bien individualisées, en accord avec la DLS.

Echantillon	Taille (nm)
[5]	3,9±1,0
[10]	3,5±0,6

**Tableau II-3.** Tailles des particules Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe [5], [10] déterminées par les observations MET

Pour confirmer l'absence de démixtion des objets dopés à 5% et 10% en Gd<sup>III</sup>, des analyses par STEM-EELS ont été réalisées.



**Figure II-8.** Images de MET en champ sombre et analyse chimique réalisée par spectromicroscopie du composé Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe [5] enrobé de dextran

Lors de ces analyses, les images sont réalisées en champ sombre, les particules apparaissent alors avec un contraste clair. Les particules étant très peu contrastées et contenant du polymère, il est très difficile d'extraire une taille de particule à partir de ces images. L'analyse chimique montre une colocalisation des atomes In, Gd et Fe au sein d'une même particule. Ces analyses STEM-EELS démontrent qu'il n'y pas de démixtion de phase pour ces compositions.

Il nous est indispensable de connaître la taille des objets que nous avons synthétisé. A plus long terme, celle-ci va conditionner le mode d'injection des particules *in vivo*, mais également la voie d'élimination. Le tableau II-4 résume les tailles obtenues. Grâce aux recoupements des données obtenues par trois techniques d'analyses différentes, nous pouvons conclure que nous avons des particules d'environ 4 nm, dont la taille est identique pour les deux compositions étudiées. La présence de dextran autour des nanoparticules conduit à une légère augmentation du diamètre hydrodynamique, mais non significative.

	DLS (nm)	DRX (nm)	MET (nm)
[5]	5	5,0±0,2	3,9±1,0
[10]	6	5,1±0,2	3,5±0,6

**Tableau II-4.** Tailles des particules Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe [5], [10] enrobées de dextran déterminées par DLS, DRX et MET

Ces données nous permettent également de prévoir une structure constituée d'un cœur In<sup>III</sup>Fe entouré en surface d'une sous-couche de Gd<sup>III</sup>Fe.

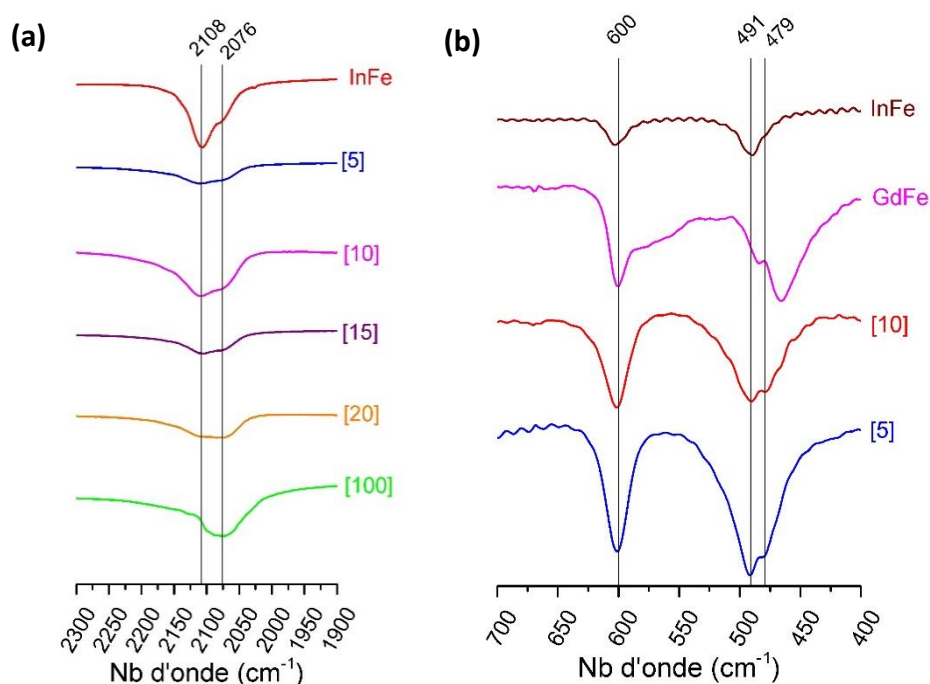
### II.3 Caractérisation chimique des composés

L'étude chimique des objets Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe [5] et [10] a pour but de connaître la composition chimique de ceux-ci. Pour cela, des analyses de spectroscopie infra-rouge, des analyses élémentaires et d'ICP-OES (Inductively coupled plasma – Optical emission spectrometry) ont été menées. Ces trois techniques sont détaillées dans les annexes 3 et 4.



### II.3.1 Spectroscopie Infra-rouge (IR)

Cette méthode nous permet de confirmer la présence de liaison  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CN-Gd}^{\text{III}}$  et  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CN-In}^{\text{III}}$  à travers la bande de vibration asymétrique des cyanures pontants. Sur la figure II-9, les spectres IR des  $\text{Gd}^{\text{III}}\text{In}^{\text{III}}\text{Fe}$  [5], [10], [15], [20], [100] et du réseau  $\text{In}^{\text{III}}\text{Fe}$  sont comparés. Un déplacement de la bande des cyanures pontants est observé en fonction du taux de  $\text{Gd}^{\text{III}}$  et d' $\text{In}^{\text{III}}$  dans les composés. Cette évolution varie entre  $2060\text{ cm}^{-1}$  et  $2110\text{ cm}^{-1}$ . La bande de vibration du réseau  $\text{Gd}^{\text{III}}\text{Fe}$  se trouve vers  $2076\text{ cm}^{-1}$  et la bande de vibration du réseau  $\text{In}^{\text{III}}\text{Fe}$  vers  $2108\text{ cm}^{-1}$ . Les déplacements observés sur les spectres sont ainsi cohérents. Pour les plus bas taux de  $\text{Gd}^{\text{III}}$ , la présence des deux enchaînements  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CN-Gd}^{\text{III}}$  et  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CN-In}^{\text{III}}$  se traduit par un dédoublement de la bande de vibration.



**Figure II-9.** Spectres IR compris (a) entre  $2300\text{-}1900\text{ cm}^{-1}$  des particules de  $\text{Gd}^{\text{III}}\text{In}^{\text{III}}\text{Fe}$  [5], [10], [15], [100] et du réseau  $\text{In}^{\text{III}}\text{Fe}$  ; (b) entre  $700\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  des particules de  $\text{Gd}^{\text{III}}\text{In}^{\text{III}}\text{Fe}$  [5], [10] du réseau  $\text{In}^{\text{III}}\text{Fe}$  et du réseau  $\text{Gd}^{\text{III}}\text{Fe}$

Plusieurs études ont suggéré l'insertion des ions  $\text{Gd}^{3+}$  dans les sites interstitiels de la structure ABP<sup>5,6</sup>. Les spectres infra-rouges effectués à basse fréquence (*Fig.II-9.(b)*) permettent de mettre en avant les vibrations du réseau  $\text{In}^{\text{III}}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$  ( $491\text{ cm}^{-1}$ ), du réseau  $\text{Gd}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$  ( $479\text{ cm}^{-1}$ ) et du réseau BdP ( $600\text{ cm}^{-1}$ ). Ces spectres montrent bien la présence de liaisons  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-C(N-Gd}^{\text{III}})$  dans les particules. La bande est légèrement décalée par rapport au réseau  $\text{Gd}^{\text{III}}\text{Fe}$  lié à un environnement différent des  $\text{Gd}^{\text{III}}$  dans nos objets. Ce décalage peut être dû à une différence de cristallinité entre les deux réseaux. De plus, la faible proportion de paires  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CN-Gd}^{\text{III}}$  peut expliquer la faible intensité des bandes. Les bandes caractéristiques décrites ci-dessus démontrent qu'il y a bien présence des liaisons  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CN-Gd}^{\text{III}}$  et  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CN-In}^{\text{III}}$ . Cet argument est en désaccord avec la présence du  $\text{Gd}^{\text{III}}$  dans les sites interstitiels et va dans le sens d'une structure composée d'un cœur d'ABP et d'entités  $\text{Gd}^{\text{III}}\text{Fe}$  en surface.

### II.3.2 Analyse élémentaire (AE) et ICP-OES

Les analyses élémentaires nous permettent, en dosant la quantité de C, H et N, de connaître le nombre de chaînes dextran autour des particules ainsi que le nombre de molécules d'eau. Par ICP-OES, nous déterminons la quantité exacte de métal qui compose les objets.

Les mesures ICP sont décrites dans l'annexe 4. En combinant les résultats de ces analyses chimiques, les unités formulaires des particules peuvent être déterminées (Tableau II-5). Nous avons besoin de connaître de manière fiable le taux de Gd<sup>III</sup> dans nos particules pour mener des expériences en relaxométrie.

Taux de Gd <sup>III</sup>	Unité formulaire
[5]	$K_{0,40}Gd^{III}_{0,05}In^{III}_{0,95}[Fe^{II}(CN)_6]_{0,85},(Dextran)_{33},(H_2O)_{38}$
[10]	$K_{0,32}Gd^{III}_{0,09}In^{III}_{0,91}[Fe^{II}(CN)_6]_{0,83},(Dextran)_{30},(H_2O)_{38}$

Tableau II-5. Unité formulaire des particules Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe déterminée par ICP

Les taux de Gd<sup>III</sup> déterminés correspondent aux taux initialement introduits en solution. La quantité de dextran entourant les particules ainsi que le nombre de molécules d'eau est proche pour les deux échantillons.

## II.4 Conclusion

Pour conclure, il est possible de contrôler la croissance d'un réseau d'ABP contenant des ions Gd<sup>3+</sup>. En effet, grâce à un réseau insoluble d'In<sup>III</sup>Fe, des nanoparticules de tailles inférieures à 10 nm sont synthétisées. Cependant, le réseau Gd<sup>III</sup>Fe ne cristallisant pas dans un réseau CFC, l'épitaxie des deux réseaux n'est pas possible. Afin d'éviter la présence de deux phases dans nos composés, nous nous sommes particulièrement intéressés aux particules dopées à 5% et 10% en Gd<sup>III</sup>. Ces objets ont une taille d'environ 4 nm et sont parfaitement redispersables dans l'eau grâce à la présence du dextran. Les compositions chimiques des nanoparticules sont cohérentes par rapport aux quantités engagées dans la synthèse. Les analyses DRX et la spectroscopie IR montrent que les particules sont constituées d'un cœur cristallin d'In<sup>III</sup>Fe et d'entités Gd<sup>III</sup>Fe peu cristallines réparties de manière éparse sur la surface. La localisation préférentielle des ions Gd<sup>3+</sup> en surface est une information prometteuse pour les mesures de relaxivité. Celles-ci seront explicitées dans la partie IV de ce chapitre.

## III. Les nanoparticules $K_{4y-3}Gd^{III}_xFe^{III}_{1-x}[Fe^{II}(CN)_6]_y$ et $K_{4y+x-3}Mn^{II}_xFe^{III}_{1-x}[Fe^{II}(CN)_6]_y$

La forte absorption des bleus de Prusse dans le proche infra-rouge est la conséquence d'un transfert d'électron à travers le pont cyanure entre les ions Fe<sup>2+</sup> et les ions Fe<sup>3+</sup> (cf. Chap.I). Ainsi, en combinant au sein d'un même objet des ions paramagnétiques, Mn<sup>II</sup> ou Gd<sup>III</sup>, et le bleu de Prusse, des objets théranostiques peuvent être mis au point.

### III.1 Synthèse des nanoparticules

Basée sur le même principe que la synthèse des particules de  $Gd^{III}In^{III}Fe$ , la synthèse des particules de  $K_{4y-3}Gd^{III}_xFe^{III}_{1-x}[Fe^{II}(CN)_6]_y$  (abrégées  $Gd^{III}Fe^{III}Fe$ ) et des particules de  $K_{4y+x-3}Mn^{II}_xFe^{III}_{1-x}[Fe^{II}(CN)_6]_y$  (abrégées  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$ ) se passe dans l'eau, sans utilisation de surfactant. Une solution contenant les sels  $GdCl_3 \cdot 6H_2O$  ou  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  et  $Fe^{III}(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$  est ajouté rapidement et sous vive agitation dans une solution de ferrocyanure de potassium. Les expériences sont menées à basse température ( $2^\circ C$ ) et à faible concentration (0,5 mM). La forte insolubilité des réseaux  $Fe^{III}Fe$  permet de contrôler la taille et d'obtenir des objets de faible dimension.

Le réseau  $Mn^{II}Fe$  cristallise dans un réseau CFC, une épitaxie des deux réseaux,  $Mn^{II}Fe$  et  $Fe^{III}Fe$ , est alors possible sans risque de démixtion. Il est ainsi possible d'explorer des taux de  $Mn^{II}$  plus variés. Au contraire, comme montré dans la partie II.2.2, il n'y a pas épitaxie des réseaux  $Gd^{III}Fe$  et  $Fe^{III}Fe$ , limitant le dopage de  $Gd^{III}$  à deux taux : 5% et 10%.

Au cours des thèses de Y. Prado et G. Paul, les nanoparticules de  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$  [25], [50], [75], [80] ont été synthétisées et étudiées en relaxivité. Les performances en relaxivité se sont avérées être moins bonnes que pour les systèmes avec un cœur  $In^{III}Fe$ . Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes focalisées sur des taux de 5% et 10% en  $Mn^{II}$ .

Par la suite, les particules sont enrobées par du dextran. La procédure est détaillée dans l'annexe 1.

### III.2 Caractérisation des nanoparticules $K_{4y+x-3}Mn^{II}_xFe^{III}_{1-x}[Fe^{II}(CN)_6]_y$

#### III.2.1 Caractérisations structurales et de taille

##### III.2.1.1 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière effectuée sur les solutions colloïdales de  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$  [5], [10], [25], [50], [75] et [80] montre une augmentation de la taille en fonction du taux de  $Mn^{II}$ . La couleur des solutions semble problématique pour les mesures DLS (corrélogrammes de qualité médiocre), ces mesures sont donc des valeurs estimées. La figure II-10 représente les distributions en volume des diamètres hydrodynamiques des particules.

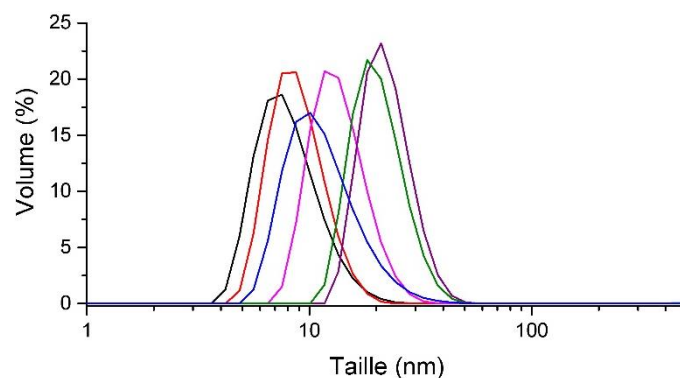


Figure II-10. Distribution en volume des tailles des particules  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$  [5], [10], [25], [50], [75],

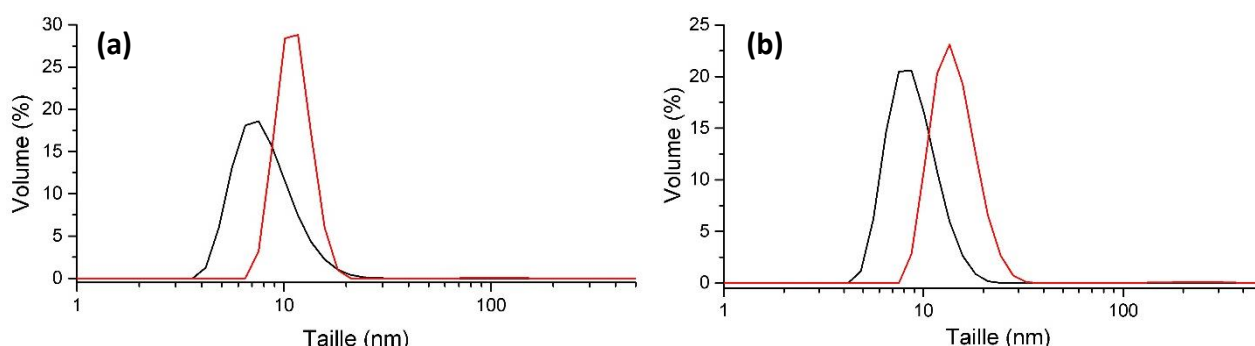
La dispersion en taille semble relativement faible. Le tableau II-6 regroupe les valeurs de taille extraites à partir des distributions en volume.

	[5]	[10]	[25]	[50]	[75]*	[80]*
Taille (nm)	6,5-12	7,5-12	10	12	18	21

**Tableau II-6.** Diamètres hydrodynamiques des nanoparticules Mn<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5], [10], [25], [50], [75], [80] obtenues par DLS en solution aqueuse (\* Thèse Y. Prado)

Les particules enrobées de dextran ont été redispersées dans l'eau et montrent une légère évolution de leurs tailles en DLS due à la présence du dextran (14-15 nm pour les particules Mn<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5] et [10]).

Les distributions en volume des particules Mn<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5] et [10] entourées de dextran et redispersées dans l'eau sont présentées ci-dessous. Pendant 24h, les redispersions sont parfaitement stables, laissant la durée nécessaire pour faire l'ensemble de nos analyses. En revanche au-delà de 24h, il est important de noter que pour des taux de Mn<sup>II</sup> supérieurs à 25%, les redispersions ont montré une augmentation de la taille. Ceci n'a pas été observé pour les particules contenant 5% et 10% de Mn<sup>II</sup>.



**Figure II-11.** Distribution de taille en volume des particules en fin de synthèse (noir) et après redispersion, enrobées de dextran, dans l'eau (rouge) **(a)** Mn<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5] ; **(b)** Mn<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [10] à 20°C.

Comme le montre la figure II-11, le diamètre hydrodynamique est légèrement supérieur à 10 nm pour les particules enrobées de dextran. En tenant compte de la qualité des mesures, qui est fortement altérée dans notre cas, il est possible que la taille soit problématique pour envisager une élimination rénale de nos objets. Toutefois, seules des études de biodistribution permettraient de le confirmer car l'enrobage peut être altéré lors de la circulation des particules.

### III.2.1.2 Diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X menée sur des poudres des composés avec différents taux de Mn<sup>II</sup> permet de mettre en avant la structure CFC des réseaux Mn<sup>II</sup>Fe et Fe<sup>III</sup>Fe. Les paramètres de maille des deux réseaux sont proches (10,17 Å pour le BdP et 10,14 Å pour le Mn<sup>II</sup>Fe) ce qui ne permet pas d'observer une évolution du paramètre de maille pour les particules de Mn<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>Fe.

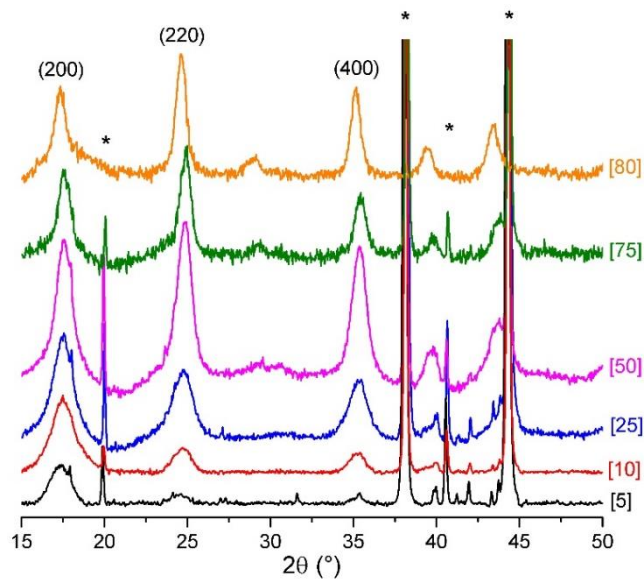


Figure II-12. Diffractogrammes des composés  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$  avec différents taux de  $Mn^{II}$  ;  
Pics de Bragg de la structure CFC () (\* Porte échantillon)

Les tailles calculées à partir des diffractogrammes (Annexe 6) sont regroupées dans le tableau II-7. En accord avec la DLS, l'évolution montre une augmentation de la taille avec le taux de  $Mn^{II}$ .

Echantillon	[5]	[10]	[25]*	[50]*	[75]*	[80]*
Paramètre de maille (Å)	$10,18 \pm 0,03$	$10,16 \pm 0,03$	$10,16 \pm 0,03$	$10,14 \pm 0,03$	$10,11 \pm 0,03$	$10,17 \pm 0,03$
Domaines cristallins (nm)	$5,5 \pm 0,2$	$5,6 \pm 0,2$	$6,6 \pm 0,2$	$8,0 \pm 0,2$	$9,7 \pm 0,2$	$12,8 \pm 0,2$

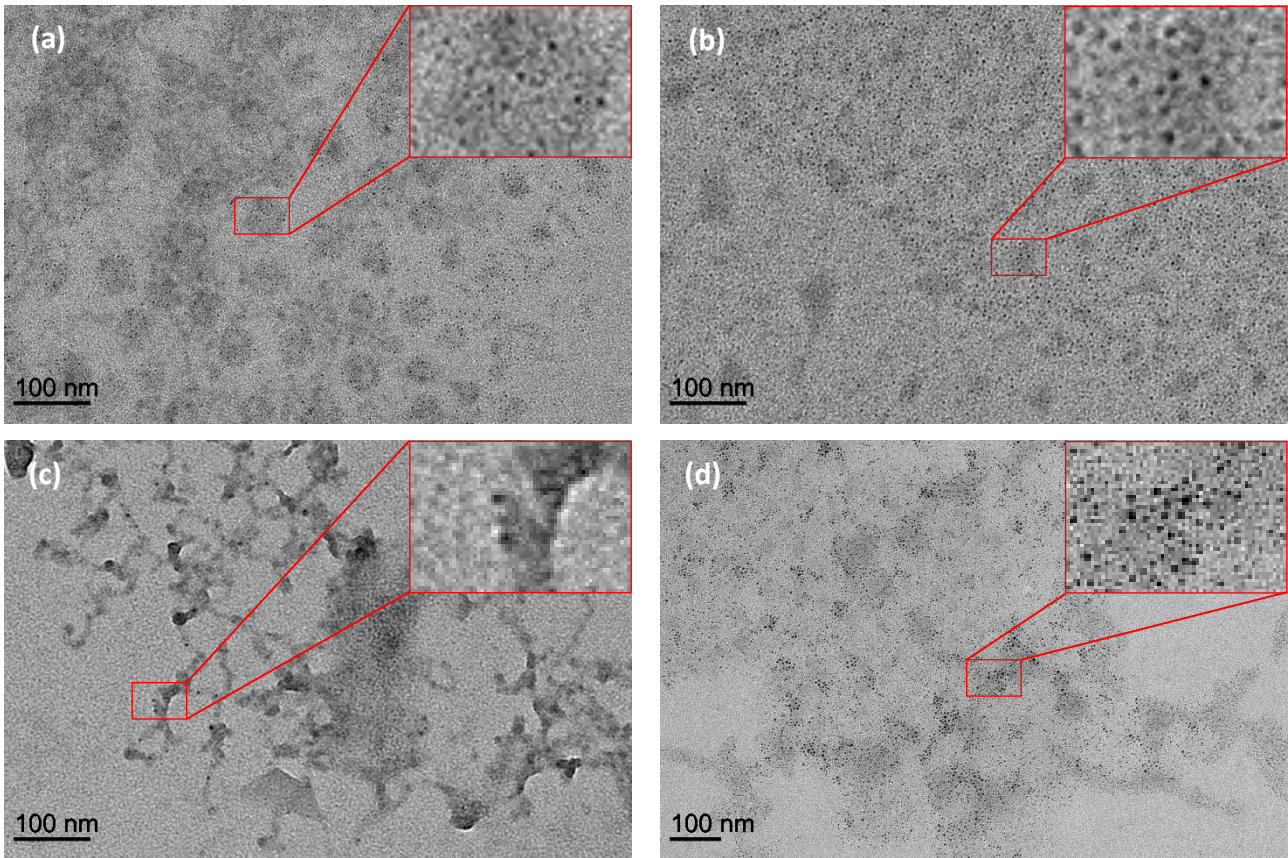
Tableau II-7. Paramètres de maille et tailles des domaines cristallins déduits de la DRX sur poudre pour les échantillons  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$  [5], [10], [25], [50], [75], [80] (\*Thèse Y. Prado)

Les pics de Bragg s'affinent lorsque le taux de  $Mn^{II}$  augmente ce qui est cohérent avec une taille de particules plus grande. Les tailles calculées d'après la formule de Scherrer sont, pour les plus faibles taux en  $Mn^{II}$ , supérieures aux tailles mesurées par MET. Au contraire, pour des taux de  $Mn^{II}$  de 75 % et 80%, les mesures de DRX sont inférieures. La détermination de la largeur des pics sur des objets si petit ainsi que l'utilisation de la formule de Scherrer sur les diffractogrammes sont délicates. Il est probable que les plus petits objets diffractent moins et induisent des domaines cohérents plus importants.

### III.2.1.3 Microscopie électronique à transmission

Les images obtenues par microscopie électronique en transmission des particules  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$  [5], [10], [25], [50] montrent des particules de petites tailles qui apparaissent bien individualisées.





**Figure II-13.** Micrographies des particules après redispersion dans l'eau de  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$  (a) [5] ; (b) [10] ; (c) [25] ; (d) [50]

Dans le cadre de la thèse de Y. Prado, les échantillons contenant 25%, 50%, 75% et 80% de  $Mn^{II}$  ont été synthétisés et caractérisés montrant en MET une augmentation de la taille avec le taux de  $Mn^{II}$ . Les particules [25] et [50] ont fait l'objet d'une nouvelle étude dans le cadre de ce travail ce qui a permis de mettre en avant la présence de particules de petite taille qui semblent légèrement agrégées en solution.

En effet, les tailles mesurées par DLS sont supérieures aux tailles déduites des images MET (*Tableau II-8*) mais cohérentes avec les valeurs calculées d'après les diffractogrammes pour les taux jusqu'à 25%. Pour les taux supérieurs ou égaux à 50%, une incohérence entre les différentes mesures de taille est constatée qui peut être liée à la plus grande instabilité à 75 et 80%.

Echantillon	[5]	[10]	[25]	[50]	[75]*	[80]*
Taille (nm)	3,4±0,6	3,2±0,1	3,7±0,9	2,9±1,1	14,1±2,2	16,2±2,5

**Tableau II-8.** Tailles des particules  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$  [5], [10], [25], [50], [75], [80] obtenues par MET (\*Thèse Y. Prado)

#### III.2.1.4 Discussion

Des particules de type  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$  [X] avec X compris entre 5 et 80% ont été étudiées. Les deux réseaux  $Mn^{II}Fe$  et BdP cristallisant dans un réseau CFC, il y a épitaxie permettant l'étude de composition variée en  $Mn^{II}$ . Les performances en relaxivité des plus hauts taux (de 25% à 80%) ont déjà été étudiées au cours de la thèse de G. Paul montrant des relaxivités longitudinales améliorées par rapport au BdP. Les valeurs restent, cependant, limitées à cause d'une proportion non négligeable d'ions  $Mn^{2+}$  enfouie et à une limitation de la relaxivité par la relaxation électronique du  $Fe^{III}$ .

Les proportions les plus faibles de Mn<sup>II</sup> laissent supposer une localisation uniquement en surface des manganèses conduisant à des relaxivités améliorées. C'est pourquoi nous nous sommes particulièrement intéressés aux plus faibles taux.

	DLS (nm)	DRX (nm)	MET (nm)
[5]	14	5,5±0,2	3,4±0,6
[10]	15	5,6±0,2	3,2±0,1

Tableau II-9. Tailles des particules Mn<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5], [10] mesurées par DLS, DRX et MET

Les particules obtenues sont de petites tailles et apparaissent bien individualisées en MET. Cependant, les valeurs de DLS supposent une agrégation en solution qui peut jouer un rôle par la suite pour des expériences *in vivo*. Ceci peut également augmenter davantage le temps de corrélation rotationnel et favoriser la relaxivité.

### III.2.2 Caractérisation chimique

#### III.2.2.1 Spectroscopie IR

La spectroscopie IR met en avant la présence de liaison Mn<sup>II</sup>-NC-Fe<sup>II</sup> et Fe<sup>III</sup>-NC-Fe<sup>II</sup>. La bande de vibration asymétrique des cyanures pontants se situe autour de 2100 cm<sup>-1</sup>, plus précisément à 2077 cm<sup>-1</sup> pour Fe<sup>III</sup>-NC-Fe<sup>II</sup> et 2066 cm<sup>-1</sup> pour Mn<sup>II</sup>-NC-Fe<sup>II</sup> (Fig.II-14.(a)). Pour les plus bas taux de Mn<sup>II</sup>, un élargissement de la bande est observé montrant la présence des deux enchaînements. Sur le spectre à 75% en Mn<sup>II</sup>, la bande est dédoublée montrant bien la présence des deux contributions.

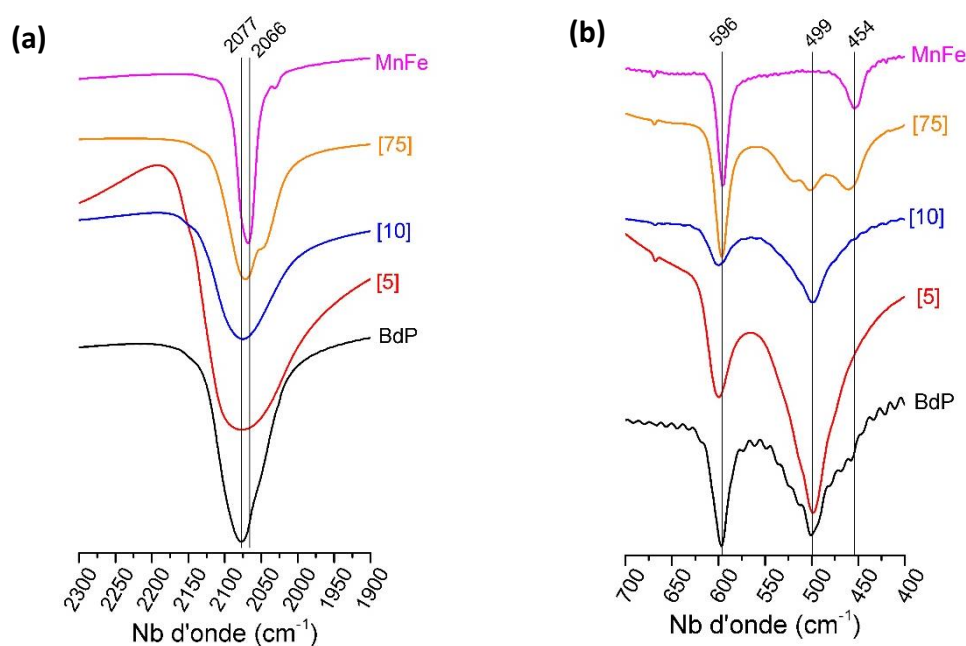


Figure II-14. Spectres IR des Mn<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5], [10], [75], du réseau Mn<sup>II</sup>Fe et BdP dans la zone (a) 2300-1900 cm<sup>-1</sup>; (b) 700-400 cm<sup>-1</sup>

A basse fréquence, la bande caractéristique des liaisons Fe<sup>II</sup>-C(N-Fe<sup>III</sup>) à 499 cm<sup>-1</sup> et la bande caractéristique des liaisons Fe<sup>II</sup>-C(N-Mn<sup>II</sup>) à 454 cm<sup>-1</sup> permettent de montrer la présence de liaison Fe<sup>II</sup>-CN-Mn<sup>II</sup> (Fig.II-14.(b)). Comme pour la bande des cyanures pontants, la présence de Mn<sup>II</sup> se traduit, pour les plus bas taux, par un élargissement de la bande puis un dédoublement visible pour le composé Mn<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [75].

### III.2.2.2 Analyse élémentaire et ICP-OES

Les analyses élémentaires et les mesures ICP-OES donnent les compositions chimiques exactes des échantillons synthétisés. Il est important de connaître la quantité précise de métal paramagnétique contenue dans les objets afin d'estimer de manière précise les performances en relaxivité.

Taux de Mn <sup>II</sup>	Unité formulaire	% de relargage en Mn <sup>II</sup>
[5]	$K_{0,65}Mn^{II}_{0,055}Fe^{III}_{0,945}[Fe^{II}(CN)_6]_{0,90},(Dextran)_{28},(H_2O)_{34}$	0,03
[10]	$K_{0,71}Mn^{II}_{0,11}Fe^{III}_{0,89}[Fe^{II}(CN)_6]_{0,90},(Dextran)_{29},(H_2O)_{37}$	0,04

Tableau II-10. Unité formulaire des particules Mn<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5], [10] et taux de relargage en manganèse déterminé par ICP

Les valeurs de relargage de Mn<sup>II</sup> sont très faibles. Ces mesures sont effectuées sur des filtrats obtenus après ultrafiltration de redispersions des nanoparticules à une concentration à 0,2 mM en Mn<sup>II</sup> (Annexe 5). Ces mesures suggèrent une faible toxicité liée à la présence d'ions libres.

### III.3 Caractérisation des nanoparticules $K_{4y-3}Gd^{III}_xFe^{III}_{1-x}[Fe^{II}(CN)_6]_y$

Les études sur les particules de Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe nous ont montré que pour éviter toute démixtion de phase entre le réseau ABP et le réseau Gd<sup>III</sup>Fe, un dopage inférieur ou égal à 10% en Gd<sup>III</sup> était optimal.

Afin de mettre au point des particules pouvant être efficaces en hyperthermie photoassistée, nous avons synthétisé des particules  $K_{4y-3}Gd^{III}_xFe^{III}_{1-x}[Fe^{II}(CN)_6]_y$  avec x=0,05 et 0,1. Les performances en relaxivité de ces objets seront comparées à celles des Mn<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5], [10]. Les caractéristiques chimiques et structurales des Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5] et [10] sont étudiées ci-dessous.

#### III.3.1 Caractérisations structurales et de taille

##### III.3.1.1 Diffusion dynamique de la lumière

Les tailles de Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5] et [10] sont estimées par DLS sur des solutions colloïdales. Le diamètre hydrodynamique est inférieur à 10 nm. Le diamètre hydrodynamique après enrobage au dextran et redispersion dans l'eau de l'échantillon Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5] est légèrement supérieur à celui des particules en solution colloïdale. Cependant, au vu de la couleur de la solution, qui peut perturber la mesure, et du faible nombre de coups, la qualité de la mesure peut être mise en cause.

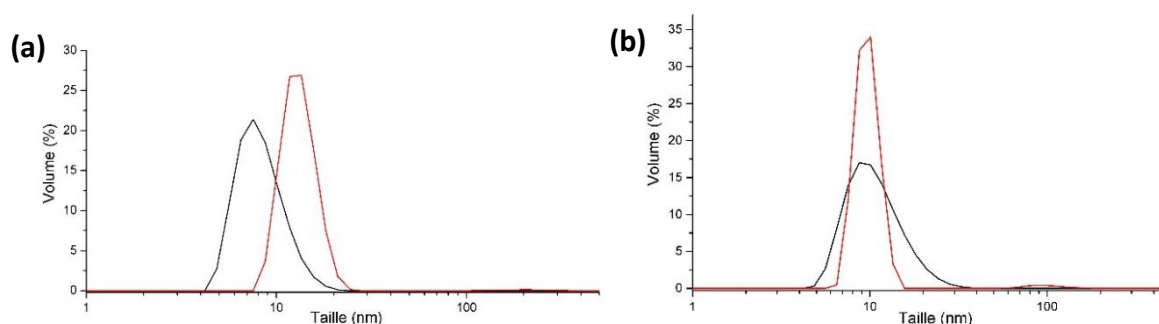


Figure II-15. Mesures DLS en fin de synthèse (noir) et après redispersion et enrobage (rouge) (a) Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5] ; (b) Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [10]



	Solution colloïdale (nm)	Redispersion (nm)
[5]	7	12-14
[10]	10	10

Tableau II-11. Diamètres hydrodynamiques mesurés par DLS pour les composés Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5] et [10]

Ces premières mesures sont une première indication de la petite taille des NPs, écartant la présence d'agrégats de grande taille. Cependant, elles doivent être confirmées par d'autres méthodes. De plus, nous pouvons considérer que les objets ont des diamètres hydrodynamiques en adéquation avec les applications visées.

### III.3.1.2 Diffraction des rayons X

Les diffractogrammes contiennent les pics caractéristiques de la structure CFC des bleus de Prusse. Ils ne semblent pas contenir des pics de la structure Gd<sup>III</sup>Fe, permettant d'écarter toute éventuelle démixtion de phase. Grâce à la formule de Scherrer et la loi de Bragg, nous avons pu calculer les paramètres de maille et le diamètre des domaines cristallins. Le paramètre de maille est le même pour les deux compositions et est de 10,15 Å, proche de celui du BdP (10,17 Å). Celui-ci est inférieur à celui des particules Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe car le rayon ionique du Fe<sup>III</sup> (0,55 Å) est plus petit que le rayon ionique de In<sup>III</sup> (0,8 Å).

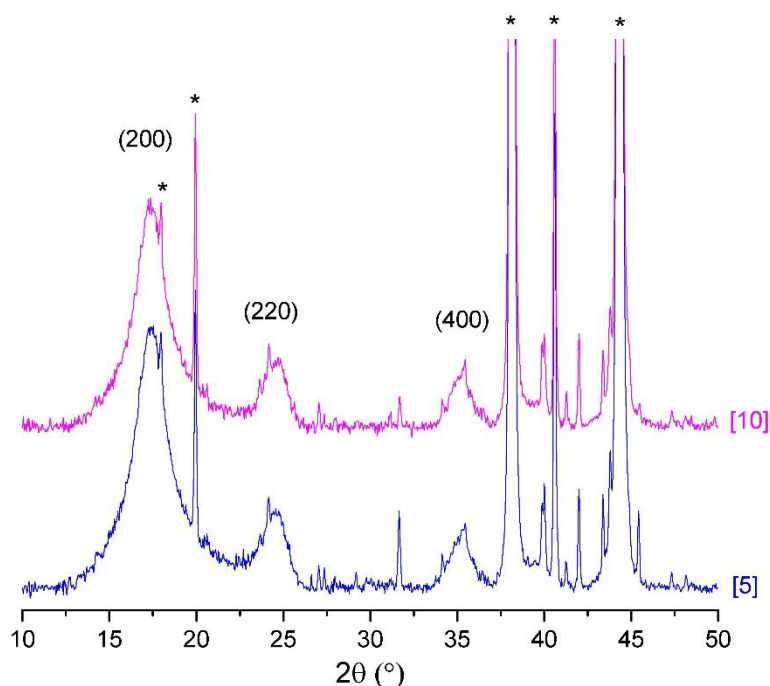


Figure II-16. Diffractogrammes des composés Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5] et [10] (\*porte échantillon ; () pics de Bragg de la structure CFC)

Les tailles des domaines diffractants estimées pour les particules [5] et [10] sont de 4,4 nm et 4,2 nm respectivement.

Seuls les composés dopés à 5% et 10% ont été synthétisés afin d'être comparés aux particules Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe[5] et [10].

### III.3.1.3 Microscopie électronique en transmission

Les micrographies des particules enrobées de dextran et redispersées dans l'eau à 1 mM (Annexe 2) sont présentées à la figure II-17. Des particules d'environ 4 nm, bien individualisées, sont observées.

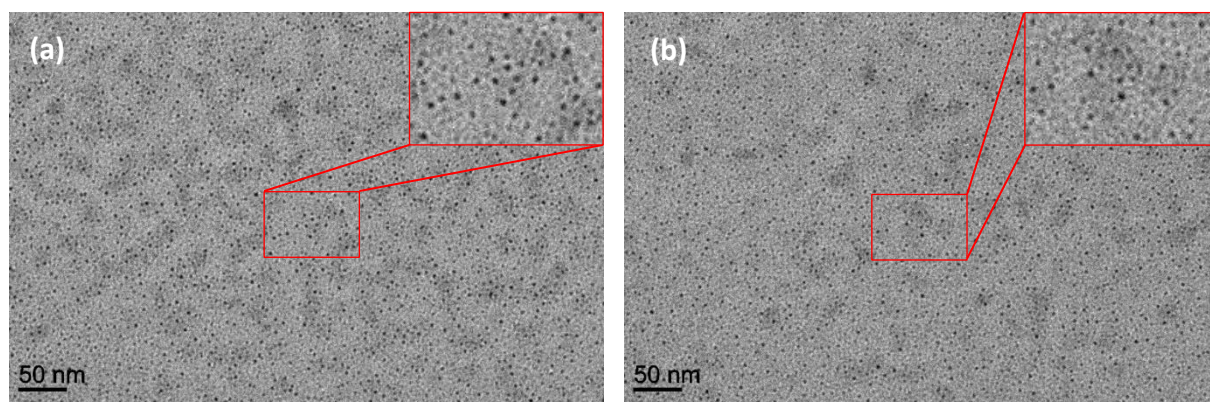


Figure II-17. Images MET des particules après redispersion dans l'eau (a)  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]$  ; (b)  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[10]$

L'ensemble des mesures montre que la DLS surestime la taille des objets. Cette différence, bien que cohérente, peut aussi être expliquée par la mauvaise qualité des mesures par DLS. Cependant, les tailles mesurées par MET et DRX sont en accord.

	DLS (nm)	DRX (nm)	MET (nm)
[5]	12-14	$4,4 \pm 0,2$	$3,08 \pm 0,6$
[10]	10	$4,2 \pm 0,2$	$3,05 \pm 0,7$

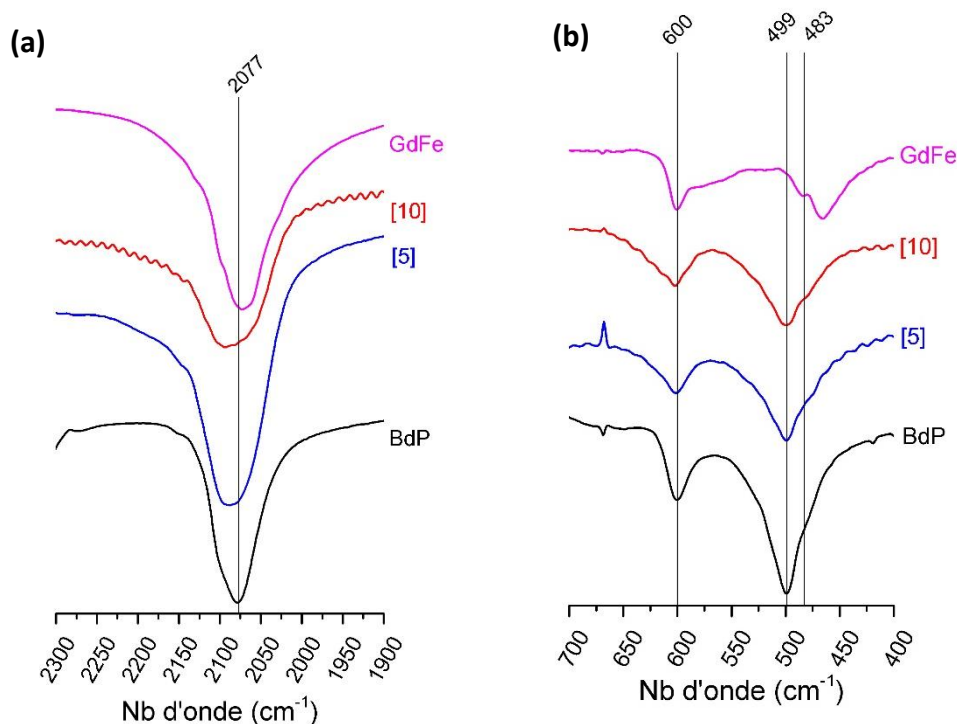
Tableau II-11. Tailles des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe$  [5], [10] enrobées de dextran déterminées par DLS, DRX et MET

La longueur de cohérence extraite par DRX est proche des tailles mesurées par MET, prouvant que les particules sont bien monocristallines. Les deux compositions ont des tailles comprises entre 3 et 4 nm.

### III.3.2 Caractérisation chimique des particules

#### III.3.2.1 Spectroscopie infra-rouge

Les enchaînements  $Fe^{II}-CN-Gd^{III}$  et  $Fe^{II}-CN-Fe^{III}$  sont difficilement distinguables par l'analyse de la bande de vibration des cyanures pontants (Fig. II-18.(a)).



**Figure II-18** Spectres infra-rouge des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe$  [5], [10], du réseau  $Gd^{III}Fe$  et du réseau BdP dans la zone **(a)** 2300-1900  $cm^{-1}$ ; **(b)** 700-400  $cm^{-1}$

A basse fréquence, nous pouvons distinguer la bande caractéristique des liaisons  $Fe^{II}-C(-N-Fe^{III})$  à 499  $cm^{-1}$  et la bande des  $Fe^{II}-C(-N-Gd^{III})$ , qui est dédoublée, à 483  $cm^{-1}$  et 466  $cm^{-1}$ . La présence d'enchaînement  $Fe^{II}-CN-Gd^{III}$  peut se justifier par un élargissement, sur les spectres de  $Gd^{III}Fe^{III}Fe$  [5], [10], de la bande se situant autour de 500  $cm^{-1}$ . Le réseau BdP est caractérisé par une bande autour de 600  $cm^{-1}$ . Ceci suggère que le  $Gd^{III}$  ne se situe pas dans les sites interstitiels de la structure et qu'il y a des liaisons  $Gd^{III}-NC-Fe^{II}$  dans la structure. Par analogie avec les particules de  $Gd^{III}In^{III}Fe$ , il est vraisemblable que les ions  $Gd^{3+}$  sont bien coordonnés en surface.

### III.3.2.2 Analyse élémentaire et ICP-OES

La composition chimique des particules a été étudiée par AE et ICP-OES. La procédure est décrite dans l'annexe 4.

Taux de $Gd^{III}$	Unité formulaire
[5]	$K_{0,60}Gd^{III}_{0,06}Fe^{III}_{0,94}[Fe^{II}(CN)_6]_{0,90},(Dextran)_{26},(H_2O)_{33}$
[10]	$K_{0,60}Gd^{III}_{0,11}Fe^{III}_{0,89}[Fe^{II}(CN)_6]_{0,90},(Dextran)_{29},(H_2O)_{37}$

**Tableau II-12.** Unité formulaire déterminée par AE et ICP-OES

Les taux de  $Gd^{III}$  et de  $Fe$  sont conformes aux quantités initialement introduites. Le nombre de monomères de dextran autour des particules est compris entre 26 et 29.

### III.4 Discussion

Dans le but de développer des objets actifs en hyperthermie photoassistée, nous avons mis au point des bleus de Prusse contenant des ions  $Mn^{2+}$  et  $Gd^{3+}$ . La forte insolubilité des réseaux BdP nous permet d'introduire des entités  $Mn^{II}Fe$  ou  $Gd^{III}Fe$  en surface des particules. La fonctionnalisation par le dextran permet l'étude des propriétés en solution. Les particules de  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$  ont déjà été étudiées chimiquement dans le cadre des thèses de G. Paul et Y. Prado, mais pour des taux de  $Mn^{II}$  supérieurs à 20%. Au cours de ce travail, nous avons étudié les caractéristiques structurales et chimiques de particules de type  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$  [5], [10] et  $Gd^{III}Fe^{III}Fe$  [5], [10]. A ces taux, les ions paramagnétiques insérés dans le réseau BdP se situent préférentiellement en surface. La spectroscopie infra-rouge nous a permis de mettre en avant la présence d'enchaînements  $Gd^{III}-NC-Fe^{II}$ , dans un cas, et d'enchaînements  $Mn^{II}-NC-Fe^{II}$  dans l'autre cas, montrant bien l'intégration des ions dans la structure BdP. Les particules au  $Mn^{II}$  présentent un taux d'ions libres faibles. Les particules  $Gd^{III}In^{III}Fe$  et  $Gd^{III}Fe^{III}Fe$  ont fait l'objet d'une étude de toxicité plus approfondie (relargage d'ions libres et viabilité cellulaire) qui est présentée dans la partie V de ce chapitre. Les composés obtenus ayant été étudiés de manière approfondie, des mesures de relaxivités et des expériences en hyperthermie photoassistée ont pu être menées.

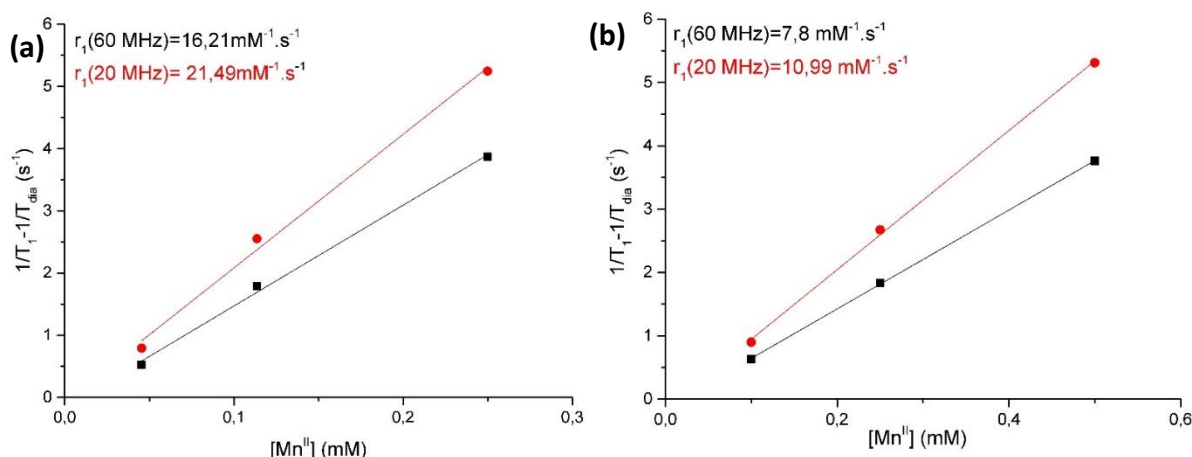
## IV. Mesures de relaxivité et images de contraste

### IV.1 Relaxivité longitudinale

Les mesures de relaxivité se font à 60 MHz et 20 MHz à 37°C sur des solutions aqueuses de nanoparticules enrobées de dextran dont la concentration en ions paramagnétiques est parfaitement connue. Expérimentalement, nous mesurons le temps de relaxation longitudinale, et en connaissant la concentration en ions actifs, il est possible de calculer les valeurs de relaxivités longitudinales  $r_1$ . Des solutions de concentrations différentes sont préparées et analysées. Ainsi, il est possible de représenter l'inverse du temps de relaxation en fonction de la concentration en ions paramagnétiques et d'en déduire les valeurs de relaxivité. Les temps de relaxation transversale  $r_2$  sont également mesurés. L'étude des relaxivités menées par G. Paul sur les particules de  $Mn^{II}In^{III}Fe$  a montré que les particules d'ABP avaient une structure de type cœur-coquille<sup>10</sup>. Une localisation préférentielle des ions paramagnétiques en surface permet des performances remarquables.

#### IV.1.1 Nanoparticules $K_{4y+x-3}Mn^{II}_xFe^{III}_{1-x}[Fe^{II}(CN)_6]_y$

Les particules  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$  [25], [50] et [80] ont été étudiées en relaxivité dans le cadre de la thèse de G. Paul. Au cours de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressées aux particules contenant 5% et 10% de  $Mn^{II}$ . Dans un premier temps, nous avons tenu compte uniquement de l'effet de l'ion paramagnétique  $Mn^{II}$ , car le  $Fe^{III}$  a des performances en relaxivité qui semble négligeable ( $r_1=1,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) par rapport à celles du  $Mn^{II}$ . Les valeurs de relaxivité obtenues à 20 MHz et 60 MHz sont présentées sur la figure II-19. Le tableau II-13 résume les valeurs de  $r_1$  mesurées à 60 MHz et 37°C pour les échantillons  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$  [5], [10], [25], [50] et [80]. Toutes les particules étudiées sont enrobées avec 25 à 30 équivalents de dextran.



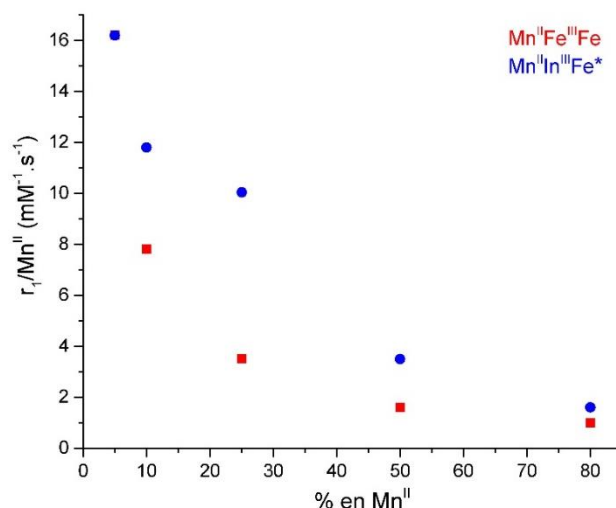
**Figure II-19.** Variation de l'inverse du temps de relaxation longitudinale en fonction de la concentration en  $\text{Mn}^{\text{II}}$  à 60 MHz (noir) et à 20 MHz (rouge) du composé (a)  $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}$  [5] ; (b)

Composés	$r_1/\text{Mn}^{\text{II}}$ ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$r_2/\text{Mn}^{\text{II}}$ ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$r_2/r_1$
[5]	16,2	30,2	1,9
[10]	7,8	12,9	1,7
[25]*	3,5	5,3	1,5
[50]*	1,6	2,2	1,4
[80]*	1,0	1,4	1,4

**Tableau II-13.** Relaxivités longitudinales  $r_1$  et transversales  $r_2$  par  $\text{Mn}^{\text{II}}$  à 60 MHz, 37°C des composés  $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}$  [5], [10], [25], [50], [80] (\* Thèse G. Paul)

La relaxivité longitudinale de particules de BdP obtenues par la voie de synthèse développée au laboratoire et enrobées de dextran est de  $0,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Les résultats obtenus (Tableau II-13) démontrent donc l'effet bénéfique de la présence de  $\text{Mn}^{\text{II}}$  sur la relaxivité. Cependant, plus le taux de manganèse est important, plus la relaxivité diminue. Malgré une augmentation de la taille des objets (précession plus lente) avec le taux de manganèse qui pourrait être favorable, la proportion d'atomes de  $\text{Mn}^{\text{II}}$  enfouie augmente proportionnellement et ne permet pas une exaltation des performances par ion  $\text{Mn}^{2+}$ . Les particules de  $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}$  [5] et [10] ont des relaxivités particulièrement intéressantes. Les particules dopées à 5% ont des performances identiques à des particules de  $\text{Mn}^{\text{II}}\text{In}^{\text{III}}\text{Fe}$  [6] laissant penser que les  $\text{Fe}^{\text{III}}$  de surface n'influencent pas la relaxivité, à ce faible taux. Cependant, pour les taux plus importants, la relaxivité par  $\text{Mn}^{\text{II}}$  est fortement diminuée, en raison d'interactions dipolaires de plus en plus élevées au fur et à mesure que la surface est enrichie en  $\text{Mn}^{\text{II}}$ .

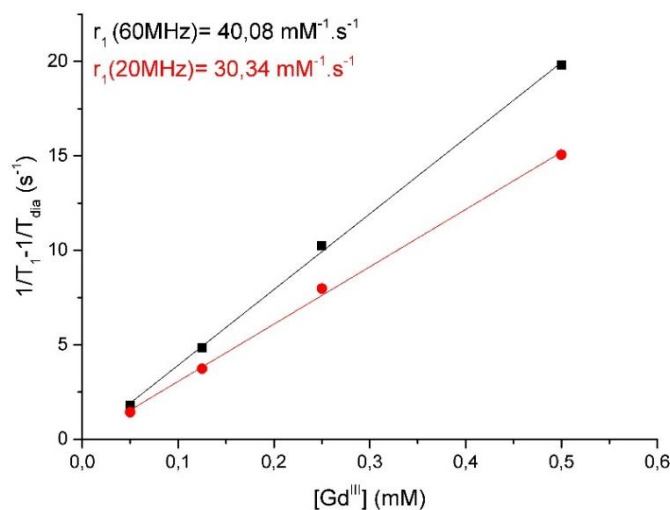
La figure II-20 représente les valeurs de relaxivités longitudinales  $r_1$  en fonction du taux de  $\text{Mn}^{\text{II}}$  pour les composés  $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}$  et  $\text{Mn}^{\text{II}}\text{In}^{\text{III}}\text{Fe}$  qui ont des tailles voisines. Cette représentation montre les meilleures performances pour des particules ayant un cœur diamagnétique. Des interactions dipolaires entre les ions  $\text{Mn}^{2+}$  perturbent la relaxivité. La présence d'ions  $\text{In}^{3+}$  diamagnétique limite ces interactions dipolaires. Au contraire, dans le cas des particules  $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}$ , la présence de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  génère également des interactions dipolaires à plus courtes distances ce qui est défavorable à la relaxivité. Cet effet est peu présent à 80% car la totalité de la surface est constitué de  $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Fe}$  dans les deux cas. La valeur constante de  $r_1 \approx 16 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  est tout à fait remarquable et montre l'intérêt d'un dopage faible en ions actifs.



**Figure II-20.** Relaxivités longitudinales  $r_1$  mesurées à 60 MHz et 37°C en fonction du pourcentage de Mn<sup>II</sup> des particules Mn<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>Fe et Mn<sup>II</sup>In<sup>III</sup>Fe (\*Thèse G. Paul)

#### IV.1.2 Nanoparticules $K_{4y-3}Gd^{III}_xIn^{III}_{1-x}[Fe^{II}(CN)_6]_z$ $x=0,05$ et $0,1$

En accord avec les caractérisations structurales et chimiques, seuls les composés Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe [5] et [10] ont fait l'objet d'une étude en relaxivité. Ces particules sont constituées d'un cœur diamagnétique, In<sup>III</sup>Fe, et de groupements paramagnétiques Gd<sup>III</sup>Fe situés en surface. Les relaxivités ont été déterminées en fonction de la concentration en Gd<sup>III</sup>.



**Figure II-21.** Variation de l'inverse du temps de relaxation longitudinale en fonction de la concentration en Gd<sup>III</sup> à 60 MHz (noir) et à 20 MHz (rouge) du composé Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe [5]

Des mesures de relaxivité ont également été faites à basse température (5°C). Les résultats sont présentés dans le tableau II-14. A plus basse température, le mouvement de précession est plus lent, la relaxivité est alors exaltée car le temps de corrélation augmente. Nous retrouvons bien cette tendance sur nos mesures, montrant ainsi que la relaxivité de nos particules est limitée par le temps de corrélation rotationnel et non par l'échange des molécules d'eau. Le tableau II-14 regroupe les relaxivités longitudinales et transversales obtenues pour les particules Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe [5] et [10] à 37°C et 5°C.

Température	Composés	$r_1/\text{Gd}^{\text{III}}$ ( $\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ )	$r_2/\text{Gd}^{\text{III}}$ ( $\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ )	$r_2/r_1$
37°C	[5]	40,1	51,7	1,3
	[10]	40,9	77,4	1,9
5°C	[5]	63,0	87,2	1,4
	[10]	60,9	83,1	1,4

**Tableau II-14.** Relaxivités longitudinales  $r_1$  et transversales  $r_2$  par  $\text{Gd}^{\text{III}}$  mesurées à 60MHz à 37°C et 5°C pour les composés  $\text{Gd}^{\text{III}}\text{In}^{\text{III}}\text{Fe}$  [5] et [10]

Les rapports  $r_2/r_1$  sont inférieurs à 2, démontrant le caractère  $T_1$  des composés. Nous constatons également une valeur de relaxivité longitudinale particulièrement élevée et constante quel que soit le taux de  $\text{Gd}^{\text{III}}$ . Lorsque ces systèmes sont comparés à ceux développés, à base de  $\text{Mn}^{\text{II}}$ , au laboratoire<sup>11</sup>, les performances sont nettement améliorées. En effet, l'objet optimal est obtenu pour un taux en  $\text{Mn}^{\text{II}}$  de 33% avec une relaxivité longitudinale par  $\text{Mn}^{\text{II}}$  à 60 MHz et 37°C de  $10 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ . Les résultats obtenus avec nos particules sont particulièrement exceptionnels au vu de leurs tailles d'environ 5 nm. Peu de systèmes d'ABP à base de  $\text{Gd}^{\text{III}}$  étudiés dans la littérature présentent ces petites tailles et des performances égales. En effet, des valeurs trois fois plus faibles sont reportées pour des objets de composition proches ayant une taille d'environ 60 nm ( $r_1=12,4 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ )<sup>6</sup>. L'équipe de Guari a mis au point des objets de 4 nm mais présentant une relaxivité à 60 MHz de  $20 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ <sup>16</sup>. Une étude porte sur des particules de 25 nm<sup>15</sup> dont la relaxivité  $r_1$  à 60 MHz est de  $35 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ . Le diamètre hydrodynamique n'a toutefois pas été mesuré et il est peu probable que cette valeur soit représentative, du  $\text{Gd}^{\text{III}}$  se trouvant enfoui et participant donc moins à la relaxivité. Par rapport à des particules d'oxyde de gadolinium de tailles proches, nos objets ont une relaxivité quatre fois plus élevée<sup>17</sup>.

#### IV.1.3 Nanoparticules $\text{K}_{4y-3}\text{Gd}^{\text{III}}_x\text{Fe}^{\text{III}}_{1-x}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$ $x=0,05$ et $0,1$

Au vu des résultats obtenus sur les particules de  $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}$ , nous pouvons nous attendre à avoir les mêmes performances des particules de  $\text{Gd}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}$  que pour les composés  $\text{Gd}^{\text{III}}\text{In}^{\text{III}}\text{Fe}$ . Cependant, les résultats présentés sur la figure II-22 et dans le tableau II-15 montrent que le cœur paramagnétique a une influence positive sur les relaxivités longitudinales.

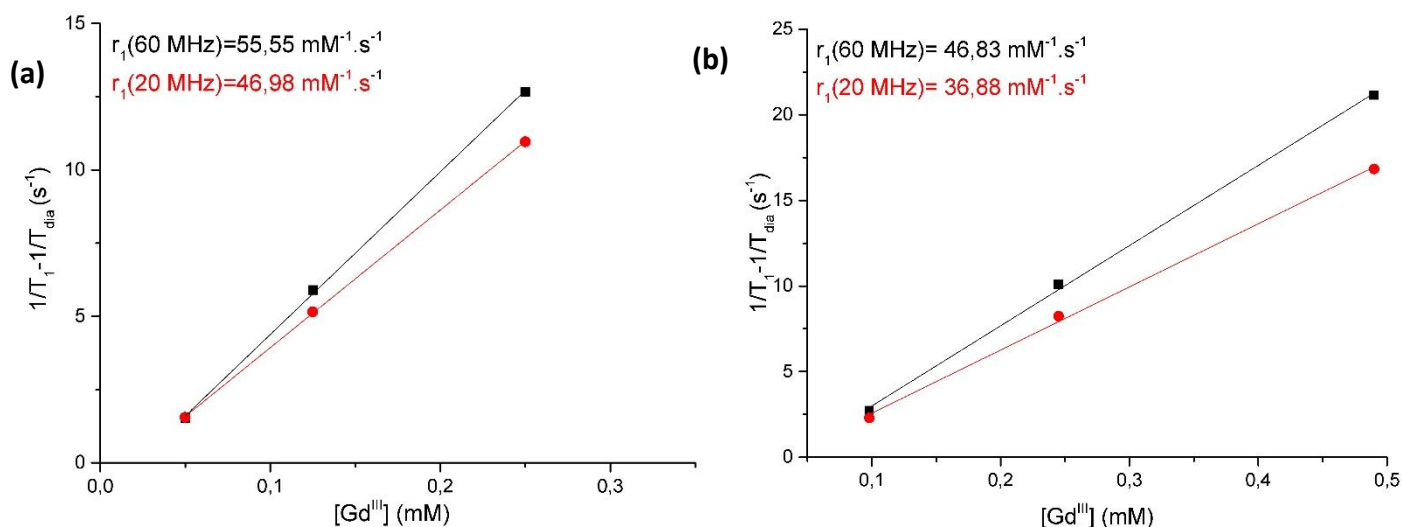


Figure II-22. Variation de l'inverse du temps de relaxation longitudinale en fonction de la concentration en Gd<sup>III</sup> à 20 MHz (rouge) et à 60 MHz (noir) pour les composés (a) Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5] ; (b) Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [10]

Température	Composé	$r_1/\text{Gd}^{\text{III}}$ ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$r_2/\text{Gd}^{\text{III}}$ ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$r_2/r_1$
37°C	[5]	55,6	77,9	1,4
	[10]	46,8	70,5	1,5
5°C	[5]	81,2	55,6	1,4
	[10]	70,0	97,6	1,4

Tableau II-15. Relaxivités  $r_1$  et  $r_2$  mesurées à 60MHz à 37°C et 5°C pour les particules Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5] et [10]

Alors que la relaxivité des particules de Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe est de 40  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  quel que soit le taux de Gd<sup>III</sup>, les composés Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe ont des valeurs de relaxivités exaltées, ce qui s'explique par la présence du cœur BdP paramagnétique. Une diminution de  $r_1$  est observée lorsque le taux de Gd<sup>III</sup> augmente. Les résultats présentés ci-dessus négligent la participation des Fe<sup>III</sup> ce qui, a priori, n'est pas une aberration puisque la relaxivité par Fe<sup>III</sup> est de 1,2  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (mesurée sur des nanoparticules de BdP de même taille). La relaxivité semble diminuer avec le taux de Gd<sup>III</sup>, ainsi la relaxivité est meilleure lorsque le taux de Fe<sup>III</sup> augmente. Une étude évoque l'effet positif d'un cœur paramagnétique en présence de Gd<sup>III</sup>, sans expliciter clairement le phénomène<sup>18</sup>. Cependant, le système de cette étude n'est pas comparable au notre. La présence d'interactions dipolaires entre Fe<sup>III</sup> et Gd<sup>III</sup> aurait un effet défavorable sur la relaxivité. La relaxivité de 55  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  des particules de Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5] est une valeur exceptionnelle pour des particules d'ABP de petite taille.

Comme pour les particules de Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe, les relaxivités mesurées à 5°C sont plus élevées. Ainsi, les performances en relaxivité des particules de Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe sont limitées par le temps de corrélation rotationnel. De plus, les rapports  $r_2/r_1$  inférieurs à 2 sont en accord avec le caractère T<sub>1</sub> de ces potentiels agents de contraste.

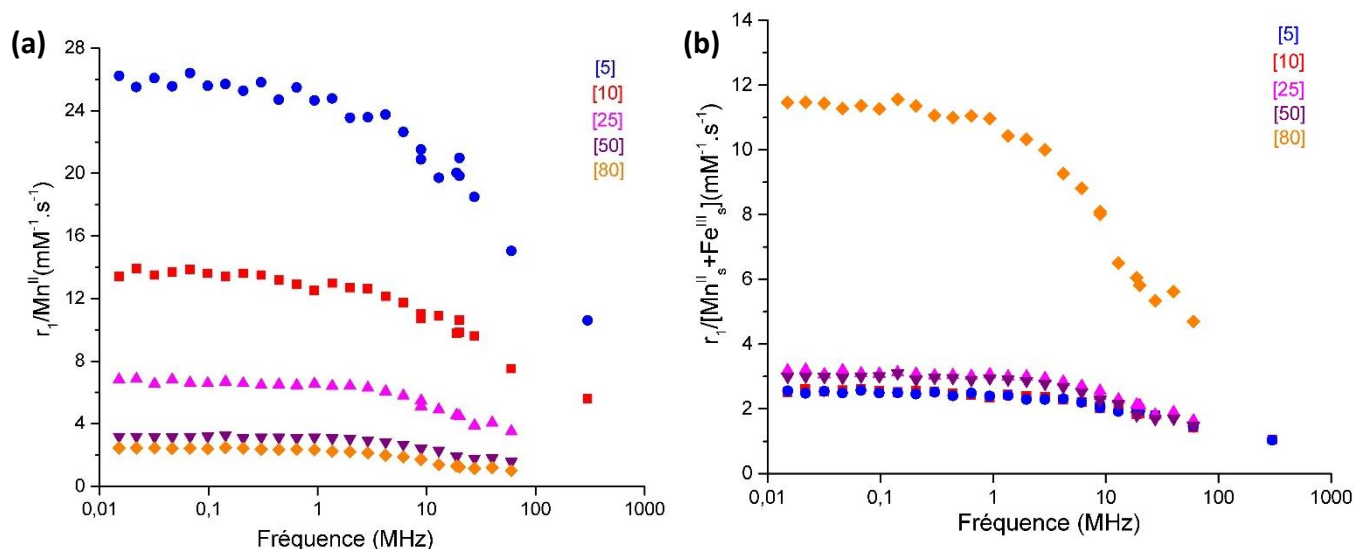
## IV.2 Profils de dispersion

Des mesures de relaxivité à 37°C sont enregistrées à différentes fréquences, ce qui permet de représenter un profil de dispersion appelé aussi profil NMRD. La forme de ce profil permet de rendre compte des temps caractéristiques influençant la relaxivité<sup>19,20</sup>.



#### IV.2.1 Nanoparticules $K_{4y+x-3}Mn^{II}_xFe^{III}_{1-x}[Fe^{II}(CN)_6]_y$

Les profils NMRD des particules  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$  [5], [10], [25], [50] et [80] sont représentés sur la figure II-23 en fonction de la concentration en  $Mn^{II}$  et en fonction de la concentration en ions paramagnétiques en surface des particules



**Figure II-23.** Profils NMRD des particules  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$  [5], [10], [25]\*, [50]\* et [80]\* en fonction de la concentration (a) en  $Mn^{II}$ ; (b) en  $Mn^{II}$  et  $Fe^{III}$  de surface (\* Thèse G. Paul)

Les profils tenant compte uniquement de la proportion en  $Mn^{II}$  montrent une diminution de la relaxivité avec l'augmentation des taux en  $Mn^{II}$  liée à un enfouissement progressif de ceux-ci. En effet, les ions en surface participent majoritairement à la relaxivité, c'est pourquoi nous représentons les profils en fonction des concentrations en ions paramagnétiques de surface. Les valeurs très élevées sont liées au fait que les ions  $Fe^{III}$  participent à la relaxivité de manière non négligeable. Pour déterminer la concentration en  $Mn^{II}$  et  $Fe^{III}$  de surface, il faut commencer par estimer le nombre d'atome de surface et la proportion d'atome de  $Mn^{II}$  et de  $Fe^{III}$  en surface. En connaissant la taille d'une particule de côté  $n$ , le nombre d'atome total  $N_T$  et le nombre d'atome de surface  $N_S$  peuvent être déterminés par les formules suivantes :

$$N_T = 4n^3 + 6n^2 + 3n + 1 \text{ et } N_S = 12n^2 + 2$$

La composition chimique en  $Mn^{II}$  et  $Fe^{III}$  permet d'estimer le nombre d'atome de surface contribuant quasiment exclusivement à la relaxivité. Les calculs sont présentés dans le tableau II-16. Les ions  $Mn^{2+}$  sont considérés comme étant exclusivement en surface jusqu'à 50%. A partir de 80% en  $Mn^{II}$ , une partie de ces ions est enfouie et la surface est composée uniquement de ceux-ci. Ainsi, le nombre d'atomes de  $Mn^{II}$  de surface est obtenu en multipliant le nombre d'atomes total par le pourcentage de  $Mn^{II}$ . La soustraction du nombre d'atomes de surface et du nombre de  $Mn^{II}$  en surface permet de connaître le nombre de  $Fe^{III}$  en surface.

% Mn <sup>II</sup>	%Fe <sup>III</sup>	Taille (nm)	N <sub>T</sub>	N <sub>S</sub>	N <sub>S</sub> (Mn <sup>II</sup> )	N <sub>S</sub> (Fe <sup>III</sup> )
5	95	4	365	194	18	176
10	90	4	365	194	37	157
25	75	4	365	194	91	103
50	50	4	365	194	183	12
80	20	16	17969	3074	3074	0

**Tableau II-16.** Estimation du nombre d'atomes de Mn<sup>II</sup> et de Fe<sup>III</sup> situés en surface des particules

Ensuite, nous pouvons déterminer le pourcentage de chaque ion paramagnétique en surface et la composition de la surface en ions paramagnétiques. Lors de la préparation des solutions à analyser, nous connaissons la concentration en Mn<sup>II</sup> et en Fe<sup>III</sup> total. En multipliant ces valeurs par le pourcentage de Mn<sup>II</sup> et de Fe<sup>III</sup> en surface, nous obtenons la concentration en chacun de ces ions en surface. Le tableau II-17 présente les résultats de ces calculs.

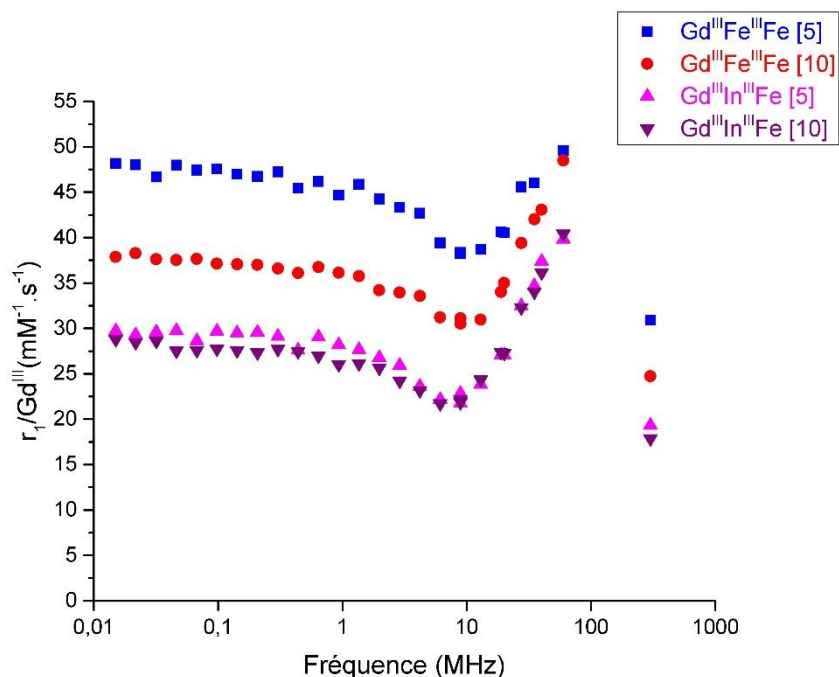
% Mn <sup>II</sup>	%Fe <sup>III</sup>	% de Mn <sup>II</sup> en surface	% de Fe <sup>III</sup> en surface	% de la surface en Mn <sup>II</sup>	% de la surface en Fe <sup>III</sup>	[Mn <sup>II</sup> ] <sub>s</sub> (mM)	[Fe <sup>III</sup> ] <sub>s</sub> (mM)
5	95	100	51	9	91	0,25	2,42
10	90	100	48	19	51	0,50	2,16
25	75	100	38	47	53	2,50	2,85
50	50	100	6	94	6	5,10	0,306
80	20	21,4	0	100	0	1,73	0

**Tableau II-17.** Estimation de la composition en ion paramagnétique de la surface et du pourcentage de chaque ion paramagnétique en surface

A partir de ces données, nous pouvons estimer la relaxivité par ions de surface (*Fig.II-23.(b)*). La proportion de Mn<sup>II</sup> et de Fe<sup>III</sup> en surface est dépendante des tailles. Les composés contenant de 5 à 50% de Mn<sup>II</sup> ont des tailles proches de 4 nm. Dans ces cas, l'ensemble des ions Mn<sup>2+</sup> se trouve en surface et la composition en Fe<sup>III</sup> est variable. Pour les plus faibles taux de dopage en Mn<sup>II</sup>, la présence de davantage de Fe<sup>III</sup> en surface est défavorable, en accord avec la figure II-20. Bien que la composition de la surface en Fe<sup>III</sup> soit différente, les composés Mn<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5] et [10] ont un comportement identique avec des valeurs de relaxivité faible. Cependant, le comportement proche des Mn<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [25] et [50] n'est pas rationnel car le composé [50] a une proportion d'atomes de Fe<sup>III</sup> en surface faible (6%) par rapport au composé à 25% (53%). L'échantillon Mn<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [80] a une taille de 16 nm et la surface est uniquement composée d'ions Mn<sup>2+</sup> expliquant les performances nettement supérieures. Sur cette représentation, il semble y avoir une augmentation de la relaxivité à 60 MHz ce qui signifierait une limitation de la relaxivité par la précession des particules. Les autres profils ont une forme typique d'objets dont la relaxivité est limitée par la relaxation électronique des Fe<sup>III</sup>.

#### IV.2.2 Systèmes composés de Gd<sup>III</sup>

Les profils NMRD permettent de comparer les performances des particules Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe et Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe pour des taux de dopage en Gd<sup>III</sup> équivalents. Nous avons, ainsi, pu étudier l'effet d'un cœur diamagnétique et d'un cœur paramagnétique sur la relaxivité.

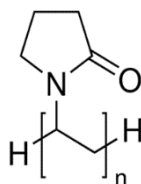


**Figure II-24.** Valeurs de relaxivité  $r_1$  par  $Gd^{III}$  en fonction de la fréquence, à 37°C pour les composés  $Gd^{III}In^{III}Fe$  [5], [10] et  $Gd^{III}Fe^{III}Fe$  [5], [10]

Les profils font clairement apparaitre l'effet positif du cœur paramagnétique de BdP. Le cœur diamagnétique d' $In^{III}Fe$  ne semble pas influencer sur la relaxivité car il apparait que celle-ci est identique quel que soit le taux de  $Gd^{III}$  montrant que la relaxivité par  $Gd^{III}$  est constante ( $40 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  à 60 MHz). En présence de  $Fe^{III}$ , la quantité d'unité  $Gd^{III}Fe$  introduite dans la structure semble avoir un effet sur la relaxivité. Effectivement, le composé  $Gd^{III}Fe^{III}Fe$  [5] a des performances supérieures au  $Gd^{III}Fe^{III}Fe$  [10]. Une rationalisation de l'effet du cœur paramagnétique sur la relaxivité des particules de  $Gd^{III}$  est proposée dans la partie IV.4 de ce chapitre. Bien que les relaxivités des particules de  $Gd^{III}In^{III}Fe$  soient plus faibles, les résultats obtenus pour l'ensemble de ces quatre systèmes sont exceptionnels en comparaison des autres systèmes présentés dans la littérature, compte tenu de leur taille inférieure à 10 nm.

### IV.3 Particules enrobées de PVP

Le polyvinylpyrrolidone, PVP, dont la structure est présentée à la figure II-25 est un polymère biocompatible. Ce composé hydrophile interagit avec les particules à travers des liaisons hydrogène.



**Figure II-25.** Structure chimique du PVP

Expérimentalement, 100 équivalents de PVP sont ajoutés à la solution de nanoparticules. Celles-ci sont ensuite précipitées à l'acétone. Les objets sont ensuite caractérisés structuralement et chimiquement. Un résumé de ces caractérisations est présenté ci-dessous. Les spectres IR, les diffractogrammes et les images de MET sont détaillés dans l'annexe 9.

Echantillon	Unité formulaire	Tailles (nm)
Gd <sup>III</sup> In <sup>III</sup> Fe [5]	K <sub>0,04</sub> Gd <sup>III</sup> <sub>0,08</sub> In <sup>III</sup> <sub>0,92</sub> [Fe <sup>II</sup> (CN) <sub>6</sub> ] <sub>0,76</sub> (PVP) <sub>29</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>28</sub>	5
Gd <sup>III</sup> Fe <sup>III</sup> Fe [5]	K <sub>0,60</sub> Gd <sup>III</sup> <sub>0,06</sub> Fe <sup>III</sup> <sub>0,94</sub> [Fe <sup>II</sup> (CN) <sub>6</sub> ] <sub>0,90</sub> (PVP) <sub>29</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>33</sub>	6

Tableau II-18. Récapitulatif des caractérisations des échantillons enrobés de PVP

Les analyses chimiques montrent un taux de Gd<sup>III</sup> en adéquation avec les quantités initialement introduites et un nombre de chaînes PVP proche de celui obtenu avec un enrobage au dextran, ce qui permet une comparaison des mesures de relaxivités. Celles-ci sont présentées sur le tableau II-19.

	$r_1/\text{Gd}^{\text{III}}$ (mM <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$r_2/\text{Gd}^{\text{III}}$ (mM <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$r_2/r_1$
Gd <sup>III</sup> In <sup>III</sup> Fe [5]	37,3	50,0	1,3
Gd <sup>III</sup> Fe <sup>III</sup> Fe [5]	46,2	76,1	1,6

Tableau II-19. Valeurs de relaxivité  $r_1$  et  $r_2$  mesurées à 60MHz et 37°C des particules enrobées de PVP

Les relaxivités longitudinales sont proches de celles obtenues avec le dextran malgré une légère diminution. Les rapports  $r_2/r_1$  sont inférieurs à 2. Les profils NMRD rendent compte de ces performances proches (Fig.II-26). Ceci montre également tous les avantages de la technique de synthèse utilisée qui permet de moduler la nature de l'enrobage de nos particules. Le PVP est un bon candidat pour les applications visées au vu des résultats encourageants obtenus. D'autres enrobages de type PEG ont été envisagés, deux types de fonctionnalisation des chaînes polymériques ont été testées : carboxylate et amine. Les résultats n'ont pas été concluants. En effet, outre la faible interaction entre les particules et les chaînes PEG, les relaxivités mesurées sont faibles (10,3 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> à 60 MHz pour les Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe[5]). Le PEG se lie aux particules via les fonctions carboxylate ou amine, ce qui entraîne une diminution du nombre de molécules d'eau coordonnées et donc de la relaxivité. Une interaction de type liaison hydrogène entre l'enrobage et les particules est indispensable pour optimiser les performances en IRM.

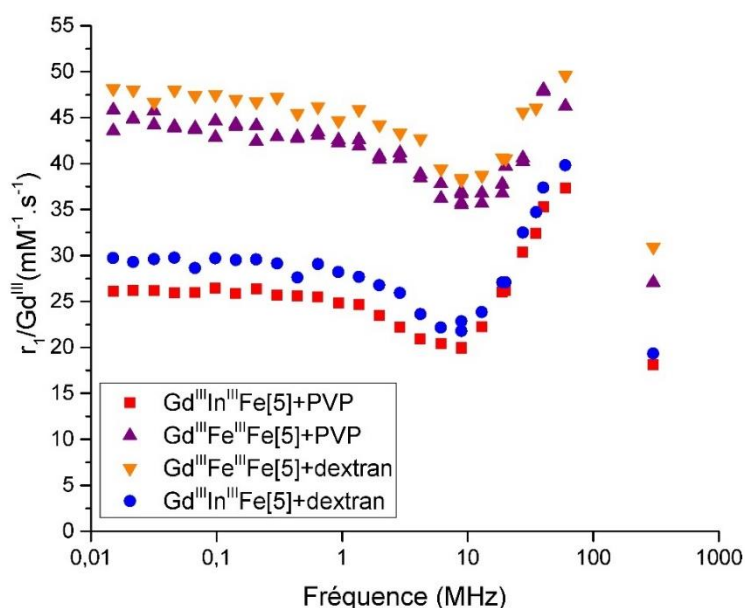


Figure II-26. Comparaison des profils NMRD des particules enrobées de dextran et

## IV.4 Effet du cœur paramagnétique

Comme énoncé précédemment, les particules synthétisées contenant 5 % et 10% de Gd<sup>III</sup> présentent des valeurs de relaxivités très élevées, de l'ordre de 40 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> pour le cœur diamagnétique et comprises entre 46 et 56 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> pour le cœur paramagnétique. Les composés Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe ont des relaxivités indépendantes de la quantité de Gd<sup>III</sup>. Ceci s'explique par une localisation des ions Gd<sup>3+</sup> uniquement en surface et une distance entre ces ions suffisamment importante pour empêcher les interactions dipolaires. Compte tenu de ces remarques, des tailles et des compositions similaires des particules de Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5] et [10], elles devraient présenter un comportement proche. Cependant, pour ces composés, les relaxivités longitudinales sont dépendantes du taux de Gd<sup>III</sup> et exaltées par rapport aux particules Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe à taux de Gd<sup>III</sup> égal. Afin de mieux comprendre ces observations, nous avons tenu compte de la contribution des ions Fe<sup>3+</sup> à la relaxivité que nous avons négligée dans une première approximation. Nous cherchons donc à vérifier la cohérence de cette approximation.

Pour cela, nous devons calculer le nombre d'atome de surface et la proportion d'atome de Gd<sup>III</sup> et de Fe<sup>III</sup> en surface. La même procédure de calcul que pour les particules Mn<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>Fe est utilisée (paragraphe IV.2.1). Les calculs sont présentés dans le tableau II-20.

% Gd <sup>III</sup>	%Fe <sup>III</sup>	Taille (nm)	N <sub>T</sub>	N <sub>s</sub>	N <sub>s</sub> (Gd <sup>III</sup> )	N <sub>s</sub> (Fe <sup>III</sup> )
6	94	4	365	194	22	172
11	89	4	365	194	40	154

**Tableau II-20.** Estimation du nombre d'atomes de Gd<sup>III</sup> et de Fe<sup>III</sup> situés en surface des particules

La relaxivité par ions Fe<sup>3+</sup> a été déterminée à partir de mesure faites sur des particules de BdP<sup>21</sup> et est de 1,2 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>. Une relaxivité de 40 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> par ions Gd<sup>3+</sup> a été estimée dans cette étude sur les particules de Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe. Avec ces informations, nous pouvons calculer la contribution de chaque atome paramagnétique à la relaxivité. Pour calculer la relaxivité par particule par Gd<sup>III</sup> de surface, le nombre de Gd<sup>III</sup> de surface est multiplié par la relaxivité par Gd<sup>III</sup>. La relaxivité par particule par Fe<sup>III</sup> de surface est calculée sur le même principe. La somme de ces deux relaxivités donne la relaxivité par particule pour tous les atomes de surface. La contribution de chaque ion de surface à la relaxivité est calculée en divisant la relaxivité par particule pour le Gd<sup>III</sup> par la relaxivité par particule pour tous les atomes de surface. Le même calcul est effectué pour le Fe<sup>III</sup>. Les résultats sont explicités dans le tableau II-21.

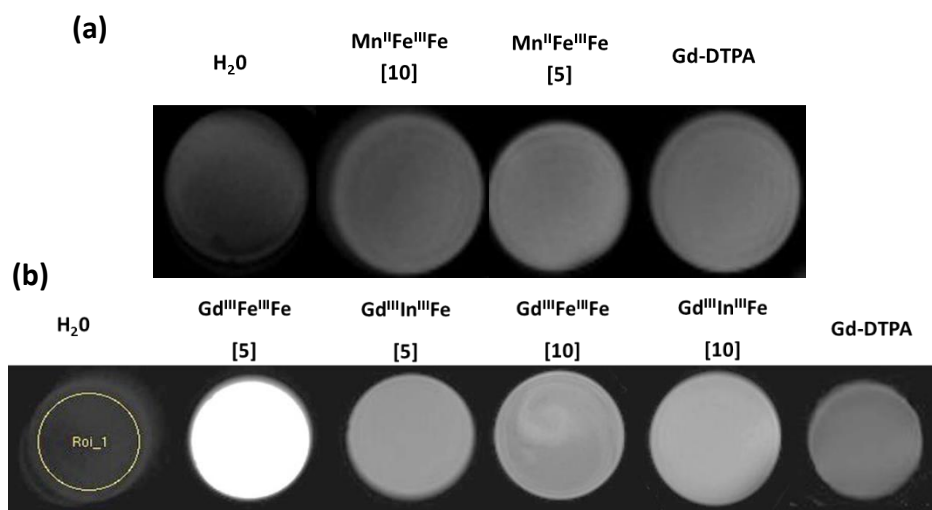
% Gd <sup>III</sup>	N <sub>s</sub> (Gd <sup>III</sup> )	r <sub>1</sub> /Gd <sup>III</sup> <sub>s</sub>	r <sub>1</sub> /part (Gd <sup>III</sup> <sub>s</sub> )	N <sub>s</sub> (Fe <sup>III</sup> )	r <sub>1</sub> /Fe <sup>III</sup> <sub>s</sub>	r <sub>1</sub> /part (Fe <sup>III</sup> <sub>s</sub> )	r <sub>1</sub> /part (Gd <sup>III</sup> <sub>s</sub> +Fe <sup>III</sup> <sub>s</sub> )	% de r <sub>1</sub> (Gd <sup>III</sup> <sub>s</sub> )	% de r <sub>1</sub> (Fe <sup>III</sup> <sub>s</sub> )
6	22	40	876	172	1,2	206,5	1082,5	81	19
11	40	40	1606	154	1,2	184,6	1790,6	90	10

**Tableau II-21.** Estimation de la contribution de chaque ion paramagnétique à la relaxivité

Ces calculs permettent d'expliquer les valeurs de relaxivités obtenues expérimentalement. En effet, ce raisonnement met en avant que la participation des Fe<sup>III</sup> à la relaxivité n'est pas négligeable. Les valeurs de relaxivité présentées pour ces systèmes sont surestimées de 19% pour les particules Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe[5] et de 10% pour les particules de Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe[10] conduisant à des valeurs apparentes de relaxivités de 49,4 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> et de 44,6 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>, respectivement. Ces relaxivités apparentes sont en parfait accord avec les valeurs expérimentales présentées dans le tableau II-15. Notons que la contribution des Fe<sup>III</sup> est rarement prise en compte dans les estimations de relaxivité des systèmes de la littérature.

## IV.5 Images de contraste

Le contraste pondéré en  $T_1$  a été mesuré sur l'ensemble des systèmes étudiés dans ce chapitre. Les images sont prises à partir de solutions aqueuses ayant une concentration de 0,2 mM en ion paramagnétique ( $Gd^{III}$  ou  $Mn^{II}$ ). Les contrastes sont toujours comparés à ceux de l'eau et de l'agent clinique Gd-DTPA dans les mêmes conditions.



**Figure II-27.** Images de contraste à 0,2 mM en  $Gd^{III}$  ou  $Mn^{II}$  pour les particules **(a)**  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$  ; **(b)**  $Gd^{III}In^{III}Fe$ ,  $Gd^{III}Fe^{III}Fe$  [5] et [10]

Les images de contraste sont mesurées à 300 MHz (7T). D'après les profils NMRD, c'est à cette fréquence que les relaxivités par  $Mn^{II}$  ou  $Gd^{III}$  sont les plus faibles. A haut champ, la contribution transversale de la relaxivité est plus importante diminuant la relaxivité longitudinale et augmentant le rapport  $r_2/r_1$ . En accord avec les valeurs de relaxivité, les contrastes des  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$  sont proches de celui de l'agent clinique.

Au contraire, les systèmes au  $Gd^{III}$  ont un contraste nettement amélioré par rapport au Gd-DTPA. Les contrastes des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe$  [10],  $Gd^{III}In^{III}Fe$  [5] et  $Gd^{III}In^{III}Fe$  [10] sont quasiment identiques alors que le contraste du composé  $Gd^{III}Fe^{III}Fe$  [5] est nettement plus brillant ce qui est cohérent avec les profils de dispersion. Ce fort contraste à 7T peut s'expliquer par un ratio  $r_2/r_1$  qui reste modéré. L'augmentation de la relaxivité transversale reste limitée à cause du faible nombre de sites paramagnétiques en surface et d'un échange optimal des molécules d'eau. Les appareils d'IRM utilisés en clinique ont un champ de 3T (soit 120MHz) ce qui conduirait à un contraste plus brillant. Ce serait aussi le cas pour le Gd-DTPA, la différence de contraste sera donc identique à celle observée à 300MHz. Le temps de récupération  $T_R$  utilisé pour enregistrer les images de contraste est de 22 ms.  $T_R$  correspond au temps qui sépare deux impulsions radiofréquences. Ce faible temps signifie que la relaxation longitudinale des spins nucléaires des protons de l'eau en présence des particules est rapide (inférieur à 22 ms), ce qui est en faveur d'un temps d'examen IRM faible.

## IV.6 Conclusion

Dans cette partie, nous avons étudié les performances en tant qu'agent de contraste  $T_1$  de trois types de nanoparticules. Les particules composées de  $Mn^{II}$  et d'un cœur BdP ont des relaxivités limitées par des interactions dipolaires liées à la forte densité d'ions paramagnétiques à courte distance.

Ces objets, malgré des résultats intéressants, restent moins performants que les systèmes au Gd<sup>III</sup> que nous avons développés.

L'influence d'un cœur diamagnétique et d'un cœur paramagnétique à proximité des entités de Gd<sup>III</sup> a été étudiée, montrant une relaxivité constante par Gd<sup>III</sup> pour les particules de Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe. Nous avons pu mettre en avant l'effet bénéfique d'un cœur paramagnétique par l'étude des composés Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5] et [10]. En effet, la relaxivité par particule des Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe est supérieure à celle des Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe grâce à la contribution non négligeable des Fe<sup>III</sup> de surface à la relaxivité.

Ces expériences démontrent également la localisation exclusive des ions Gd<sup>3+</sup> en surface, en accord avec une structure constituée d'un cœur BdP et d'entités Gd<sup>III</sup>Fe en surface. La toxicité de ces nanoparticules doit être étudiée afin de confirmer leur innocuité. Enfin, ces cœurs permettent d'envisager des applications en hyperthermie photoassistée. Ce point sera exploré dans la partie VI de ce chapitre.

## V. Toxicité des particules Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe et Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe

Les complexes moléculaires de Gd<sup>III</sup> utilisés comme agents cliniques ont montré une toxicité pouvant entraîner des fibroses<sup>22</sup>. Cette toxicité est due à la présence de Gd<sup>III</sup> libre. Les particules de Mn<sup>II</sup>In<sup>III</sup>Fe[33] étudiées au cours de la thèse de G. Paul n'ont pas montré de toxicité *in vitro*, aux concentrations et temps d'incubation étudiés, laissant supposer une innocuité du cœur In<sup>III</sup>Fe<sup>11</sup>. D'autre part, le BdP est un médicament approuvé par la FDA sous le nom de Radiogardase®. De plus, des études de toxicité sur des nanoparticules de BdP contenant du citrate ont montré une bonne viabilité cellulaire<sup>1,3</sup>. Ainsi la présence d'un cœur BdP laisse supposer une faible toxicité. La présence de cyanure dans nos particules n'est pas un problème puisque celui-ci est fortement lié au fer et ne se retrouve pas sous forme libre. Avant de mener des expériences de viabilité cellulaire, nous avons cherché à évaluer la quantité de Gd<sup>III</sup> libre qui pouvait être en solution et entraîner de la toxicité cellulaire.

### V.1 Relargage du Gd<sup>III</sup>

Le relargage du Gd<sup>III</sup> a été mesuré par deux techniques : l'ICP-OES et le dosage au xylénol orange. Bien que les mesures par ICP-OES soient plus précises, le dosage au xylénol orange permet d'accéder à cette information plus rapidement. Il permet aussi de moduler facilement le milieu d'étude. Cette technique est davantage détaillée ci-dessous.

#### V.1.1 Dosage au xylénol orange

Le xylénol orange, dont la structure est présentée à la figure II-28, est connu pour être un indicateur coloré de la présence de Gd<sup>III</sup> libre en solution.

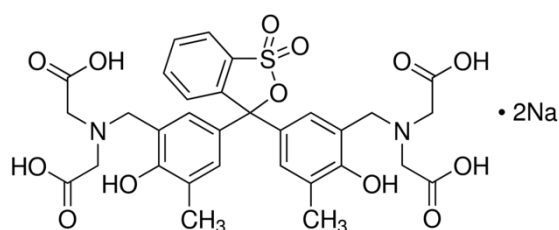


Figure II-28. Structure du xylénol orange

Le xylénol orange à une couleur orange caractéristique en solution qui évolue vers le violet lorsque celui-ci se complexe au  $Gd^{III}$ . Le même virage colorimétrique est observé lorsque le pH est basique. Ainsi, il est important de maintenir un pH acide constant durant les dosages du  $Gd^{III}$ . Ce changement de couleur est le résultat de la coordination du métal sur les sites iminodiacétiques entraînant une déprotonation du groupement phénolique, et donc une augmentation de la délocalisation électronique. La faible constante de stabilité de complexe  $Gd^{III}$ -xylénol ( $\log K=5,9$ ) permet de doser uniquement le  $Gd^{III}$  non complexé<sup>23</sup>. Le dosage est suivi par spectroscopie UV-Visible. En effet, la formation de complexes  $Gd^{III}$ -xylénol entraîne une modification de l'intensité relative des deux bandes caractéristiques du xylénol orange, à 433 nm et 573 nm (Fig.II-29). Le ratio de l'absorbance à ces deux longueurs d'onde est proportionnel à la quantité de complexe  $Gd^{III}$ -xylénol formé et donc d'ions  $Gd^{3+}$  libres en solution.

En établissant une gamme d'étalonnage de concentrations en  $Gd^{III}$  connues, il est donc possible de déterminer la quantité de  $Gd^{III}$  libre d'un échantillon inconnu<sup>24</sup>.

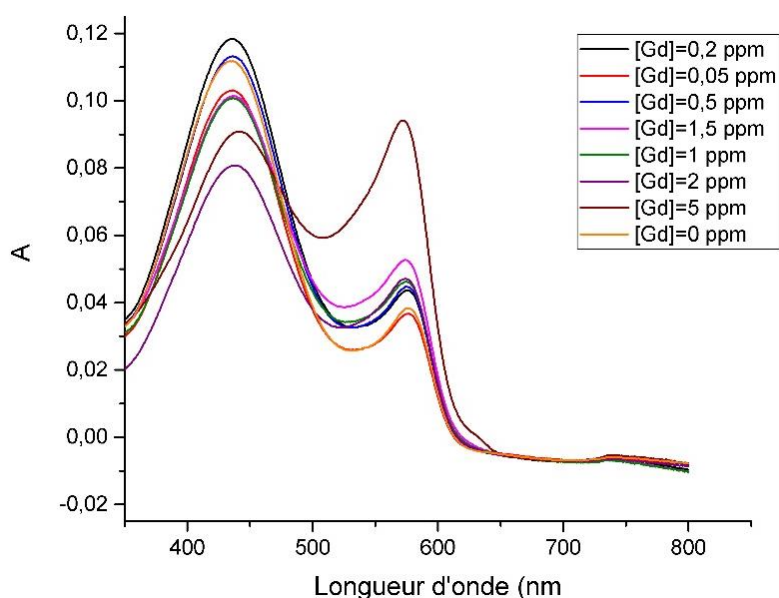


Figure II-29. Spectres UV-visible du xylénol orange en présence de  $Gd^{III}$  libre à différentes concentrations

Le protocole du dosage au xylénol est détaillé dans l'annexe 8. Cette méthode ne permet pas de détecter des concentrations inférieures à  $1 \mu M$  (0,16 ppm) et devient peu fiable pour des concentrations supérieures à  $50 \mu M$  (8 ppm). De plus, le xylénol orange n'est pas spécifique du  $Gd^{III}$ , il peut donc se complexer à d'autres ions métalliques présents en solution, conduisant à une surestimation de la quantité de  $Gd^{III}$  libre. Dans notre cas, nous avons utilisé cette technique afin d'évaluer le relargage du  $Gd^{III}$ . Pour cela, des redispersions de particules enrobées de dextran sont ultrafiltrées et le filtrat est analysé (Annexe 2). Les redispersions sont préparées à une concentration constante en  $Gd^{III}$  (0,2 mM). Le dosage au xylénol est une méthode expérimentale facile à mettre en œuvre et permettant d'obtenir des premières indications quant au relargage du  $Gd^{III}$  rapidement mais dont les résultats doivent être confirmés par des analyses ICP-OES.



### V.1.2 Mesures par ICP-OES

Les mesures ICP-OES ont été faites à l'IUT d'Orsay avec l'aide de P. Méjanelle. Les filtrats obtenus après-ultrafiltration sont dilués dans l'acide nitrique ( $10^{-2}$  M) puis analysés. Ce sont les mêmes que ceux utilisés pour le dosage au xylénol. Le principe de l'ICP-OES est décrit dans l'annexe 4 et le détail des calculs dans l'annexe 5. Le tableau II-22 regroupe les résultats obtenus.

	Gd <sup>III</sup>		In <sup>III</sup>		Fe	
	mg.L <sup>-1</sup> (ppm)	%	mg.L <sup>-1</sup> (ppm)	%	mg.L <sup>-1</sup> (ppm)	%
Gd <sup>III</sup> In <sup>III</sup> Fe [5]	0,02	0,5	0,002	0,0006	0,04	0,03
Gd <sup>III</sup> In <sup>III</sup> Fe [10]	0,03	1,3	0,0005	0,004	0,05	1,06
Gd <sup>III</sup> Fe <sup>III</sup> Fe[5]	0,15	6,2			0,07	0,26
Gd <sup>III</sup> Fe <sup>III</sup> Fe[10]	0,17	8,6			0,07	0,57

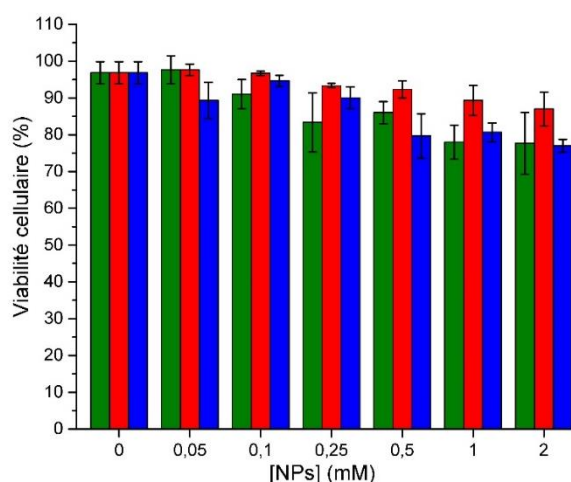
Tableau II-22. Valeurs de relargage en % et en ppm du Gd<sup>III</sup>, de l'In<sup>III</sup> et du Fe mesurées par ICP-OES

Les particules Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe présentent peu de relargage de métaux, en particulier de Gd<sup>III</sup>, ce qui laisse présager une faible toxicité de ces objets. Au contraire, les particules Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe ont un pourcentage de relargage en Gd<sup>III</sup> autour de 6-9 % qui peut sous-entendre une toxicité de ces objets. Mais les valeurs en ppm restent très faibles, inférieures à 1. Un relargage d'environ 0,3 ppm en Gd<sup>III</sup> a été mesuré pour des particules KGd(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]·H<sub>2</sub>O et celles-ci ne présentent aucune toxicité pour les cellules<sup>15</sup>. De plus, les ultrafiltrations sont effectuées en conditions très diluées, favorisant alors le relargage de métaux. Au cours d'injection *in vivo*, seul 1% de la solution atteint les cellules tumorales ce qui implique que les solutions injectées doivent être beaucoup plus concentrées entraînant alors un relargage moindre du Gd<sup>III</sup>. Afin de s'assurer que ces valeurs de relargage en ppm ne sont pas discriminatoires pour des applications médicales, des expériences de viabilité cellulaire ont été menées.

Des mesures de relargage dans du sérum de veau fœtal (SVF), réalisées par dosage au xylénol, n'ont pas montré d'évolution du relargage dans le temps (Annexe 8). Le SVF peut représenter le milieu dans lequel les particules circuleront une fois injectées dans l'organisme. Ces résultats sont encourageants pour des tests *in vivo*.

## V.2 Viabilité cellulaire

Les tests de viabilité cellulaire ont été faits par Lucie Sancey à l'université Claude Bernard (Lyon 1). Les expériences ont été menées sur des cellules U87, qui sont des cellules cancéreuses de glioblastomes. Les cellules ont été incubées avec les particules enrobées de dextran Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5], [10] et Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe [10] pendant 24h. La détermination de la viabilité cellulaire a été faite grâce au bleu de Trypan par un comptage manuel. Le bleu de Trypan est un colorant d'exclusion qui s'insère dans les membranes des cellules mortes permettant alors de les distinguer des cellules vivantes. Différentes concentrations de particules ont été mises en contact avec les cellules.



**Figure II-30.** Etude de toxicité sur des cellules U87 des particules Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe[5], Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe[10] et Gd<sup>III</sup>In<sup>III</sup>Fe [10] à différentes concentrations

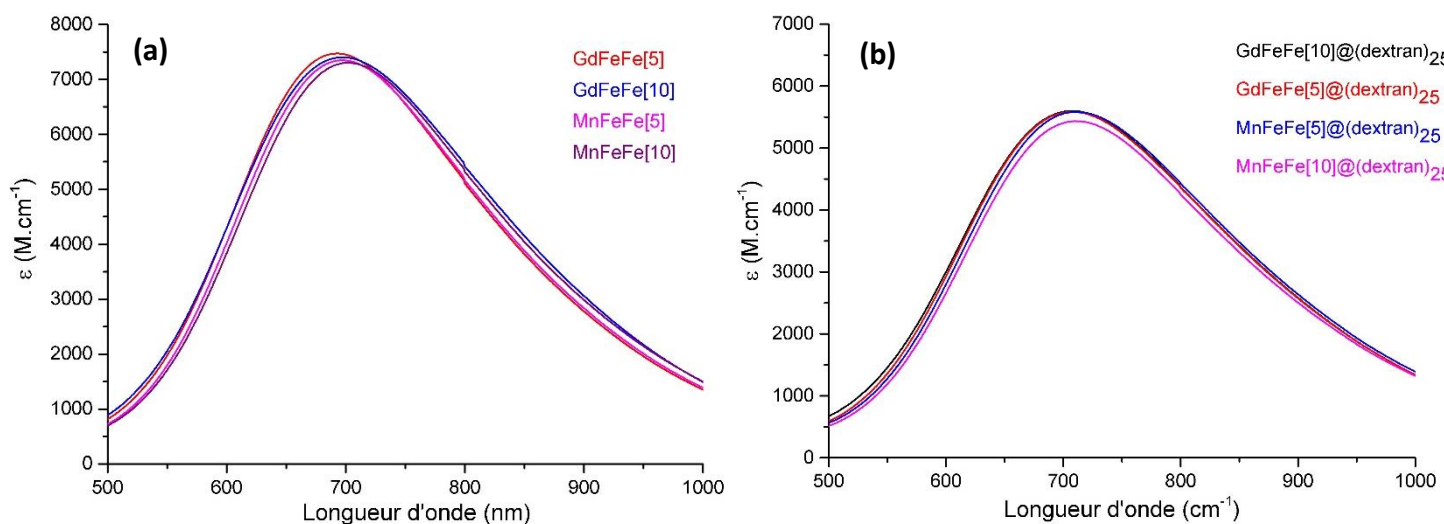
Les particules ne semblent pas toxiques pour des concentrations allant jusqu'à 0,25 mM. Pour les concentrations supérieures, une toxicité cellulaire apparaît entraînant la mort cellulaire. Cependant, la viabilité cellulaire reste supérieure ou égale à 80 % même pour une concentration de 2 mM en particules. Notons que pour avoir une vision plus étendue de la toxicité de nos objets, d'autres expériences devront être menées sur des lignées cellulaires différentes. En effet, les différentes lignées cellulaires peuvent être plus ou moins sensibles à la présence de nanoparticules. Cependant, ces premiers résultats sont très encourageants montrant que le relargage de Gd<sup>III</sup> mesuré dans le paragraphe V.1 n'entraîne pas de toxicité lors d'expérience *in vitro*.

## VI. Hyperthermie photoassistée

Afin de mettre au point des plateformes théranostiques, nous avons cherché à étudier les propriétés en hyperthermie photoassistée des composés Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5] et [10] ainsi que des composés Mn<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5] et [10]. L'hyperthermie photoassistée consiste à envoyer un rayonnement laser sur les tissus tumoraux. L'énergie lumineuse est transformée en chaleur par les nanoparticules, et les cellules cancéreuses, étant plus sensibles à la chaleur, sont tuées.

### VI.1 Caractérisation optique des particules

La bande d'intervalence, à l'origine de la couleur bleue des particules, est observée par spectroscopie UV-visible (Annexe 7) et provient de la transition électronique entre l'état fondamental  $\{Fe^N_N[(t_{2g})^6]Fe^III_C[(t_{2g})^3(e_g)^2]\}$  et l'état excité  $\{Fe^III_N[(t_{2g})^5]Fe^II_C[(t_{2g})^4(e_g)^2]\}$ . Cette transition caractéristique se retrouve dans les composés dopés par du Gd<sup>III</sup> ou du Mn<sup>II</sup> (Fig.II-31).



**Figure II-31.** Spectres UV-visible **(a)** en fin de synthèse ; **(b)** après enrobage au dextran et redispersion dans l'eau des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe$  [5], [10],  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$  [5] et [10]

Les spectres UV-visible des composés contenant du  $Gd^{III}$  ou du  $Mn^{II}$  montrent une bande d'intervallence (MMCT) intense dont le maximum d'absorbance se trouve vers 700 nm, ce qui est cohérent avec les propriétés optiques du bleu de Prusse. Le coefficient d'extinction molaire, calculé en fonction de la concentration en BdP, diminue en présence de dextran (Fig.II-31.(b)). Ceci peut s'expliquer par la sensibilité du BdP à son environnement et à la concentration<sup>25</sup>. Un très léger décalage du maximum d'absorbance est observé pour les particules de  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$ .

Pour ces faibles quantités de  $Mn^{II}$ , cette différence est peu significative, mais est bien visible lorsque le taux de  $Mn^{II}$  augmente (Fig.II-32). M. Robin a attribué l'énergie de la bande d'intervallence à trois termes principaux<sup>26</sup> :

$$h\nu = 13400 - E_{one} - E_{crystal}$$

Où  $13400 \text{ cm}^{-1}$  est la charge électrostatique interatomiques ;  $E_{one}$  est la différence d'énergie entre un électron situé dans les orbitales  $t_{2g}$  du  $Fe^{II}$  (de l'ion lié à l'azote) et dans les orbitales  $t_{2g}$  du  $Fe^{III}$  (de l'ion lié au carbone) ;  $E_{crystal}$  est l'énergie coulombienne nécessaire pour qu'un électron soit transféré de l'atome lié au carbone vers l'atome lié à l'azote dans le champ électrostatique de l'ensemble du réseau.

L'introduction d'ion  $Mn^{2+}$ , de charges différentes des ions  $Fe^{3+}$ , modifierait le potentiel électrostatique du réseau, jouant sur le terme  $E_{crystal}$  de l'énergie de la bande d'intervallence et entraînant une diminution de l'énergie de transfert de charge. Une autre explication pourrait être une modification des énergies des orbitales moléculaires du réseau qui modifierait les deux premiers termes de l'expression. Y. Prado a montré au cours de sa thèse que l'augmentation du taux de  $Mn^{II}$  conduisait à une délocalisation électronique vers les ions  $Fe^{3+}$  et que son influence sur les transferts de charge n'était pas négligeable<sup>27</sup>. Ceci a été également observé pour d'autres systèmes  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$ <sup>8,28</sup>.

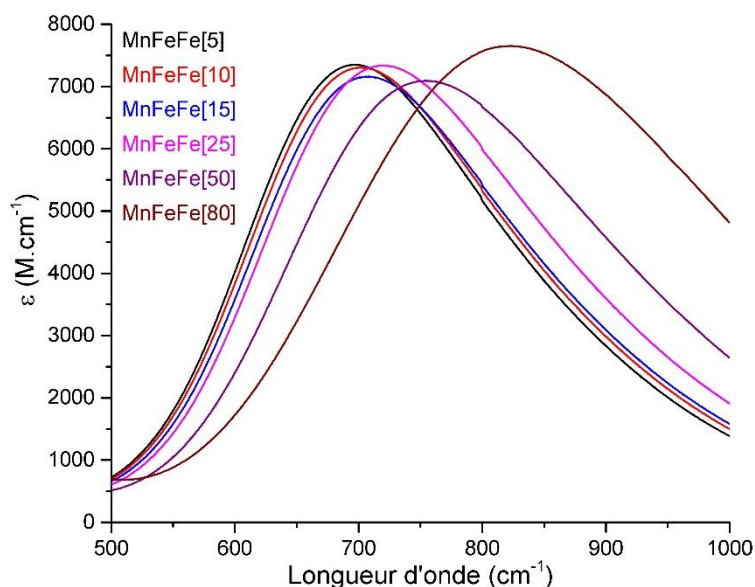


Figure II-32. Spectres UV-visible des composés Mn<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5], [10], [15], [25], [50], [80]

L'introduction d'ions Gd<sup>3+</sup> ne modifie pas les charges présentes dans le réseau et n'influencerait pas le terme  $E_{\text{crystal}}$  de l'expression de l'énergie de la bande d'intervalle. Cependant, le Gd<sup>III</sup> pourrait modifier les niveaux des orbitales moléculaires et conduire à une modification de l'énergie du transfert de charge. Cependant, les données que nous avons sur ce composé ne mettent pas en évidence un décalage du maximum d'absorption mais pour confirmer cette tendance, il faudrait pouvoir analyser des composés contenant davantage de cet ion, ce qui n'est pas possible dans notre cas. Cette modification de l'énergie du transfert de charge n'est pas un obstacle pour notre étude et pourrait être même avantageuse. Dans le cadre de notre étude, nous allons nous intéresser uniquement aux particules Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5], [10] et Mn<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5], [10].

Les performances en hyperthermie photoassistée se font en utilisant un laser à 808 nm, qui est la meilleure longueur d'onde de pénétration dans les tissus. A cette longueur d'onde, l'absorption des quatre échantillons est suffisamment importante pour augurer de bonnes performances en PTT.

## VI.2 Echauffement en solution aqueuse

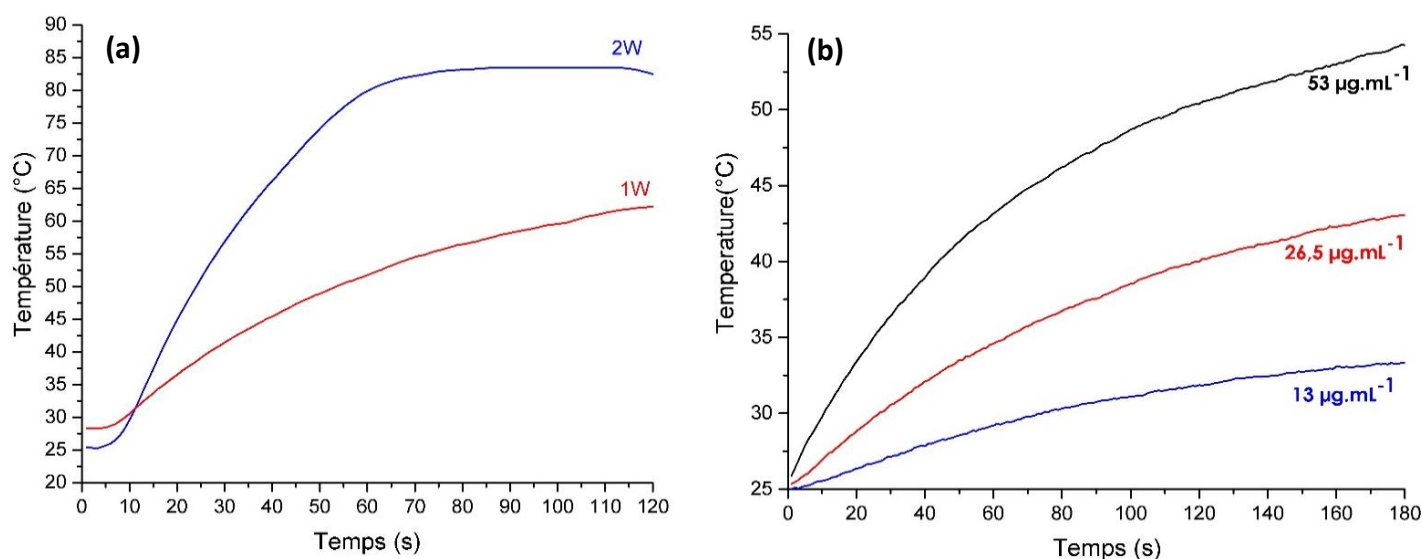
Des mesures d'hyperthermie photoassistée ont été menées à l'université Paris Diderot au Laboratoire Matière et Systèmes Complexes dans le groupe de F. Gazeau avec l'assistance de Jeanne Volatron.

### VI.2.1 Paramètres de mesure

Ce type d'objet étant soumis pour la première fois à des expériences d'hyperthermie photoassistée, des expériences d'optimisation des paramètres de mesures ont été faites. Le schéma du montage de l'expérience est présenté à la figure II-35.(a). Le laser utilisé est à la longueur d'onde de 808 nm, le rayonnement lumineux est acheminé via une fibre optique. Il est possible de varier sa puissance. Une distance de 2,5 cm est toujours respectée entre la solution et la fibre optique. Afin que l'aire irradiée soit constante, le même type de pilulier et le même volume de solution sont utilisés. Grâce à une caméra thermique, les modifications de température au sein des solutions sont mesurées.

Nous avons balayé une gamme de concentration en BdP allant de 12,5 à 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Deux puissances de laser ont été testées : 1W et 2W (Fig.II-33.(a)). Nous avons pu constater que pour une puissance de 2W, un état stationnaire était rapidement atteint avec de très hautes températures, non nécessaires pour les applications visées. De plus, une étude préliminaire sur différentes concentrations en BdP montre bien la proportionnalité entre l'élévation de la température et la concentration en BdP (Fig.II-33.(b)).

Nous avons donc choisi de travailler avec une puissance de 1W qui dans notre système équivaut à  $2\text{W.cm}^{-2}$ , une concentration en BdP égale à  $100\mu\text{g.mL}^{-1}$  et un temps d'irradiation de 180s. Nous nous sommes assurés que l'eau seule n'entraînait pas d'échauffement.

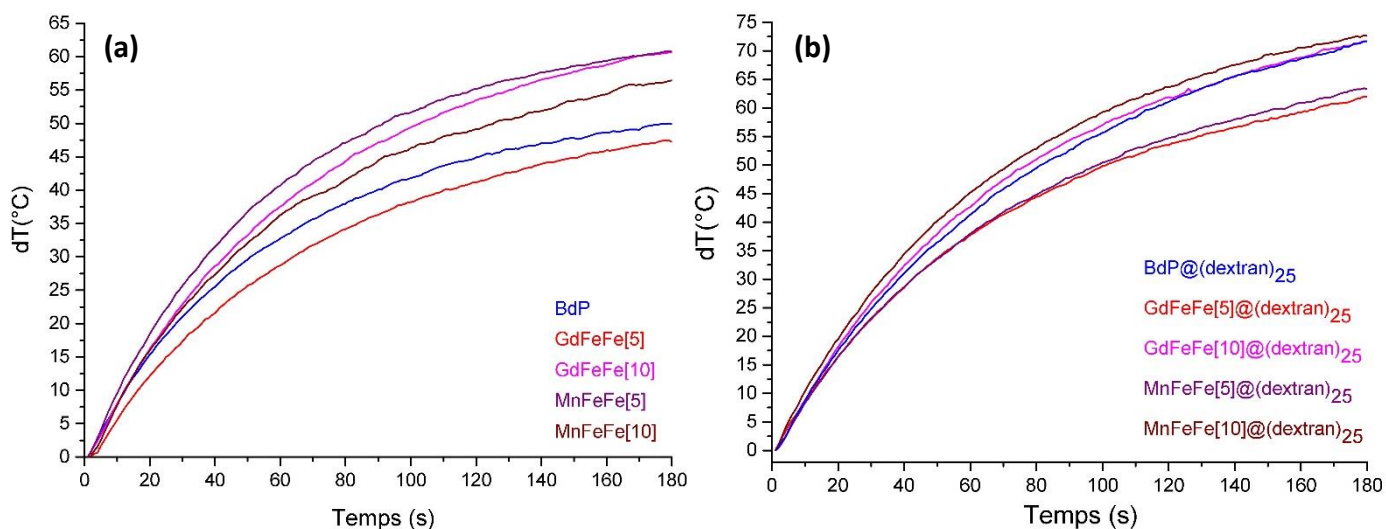


**Figure II-33.** Courbe d'élévation de la température du composé  $\text{Gd}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe} [5]@(\text{dextran})_{25}$  en fonction du temps montrant l'effet de (a) la puissance du laser à  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (b) la concentration en BdP pour une puissance de 1 W ( $2\text{W.cm}^{-2}$ )

### VI.2.2 Hyperthermie photoassistée

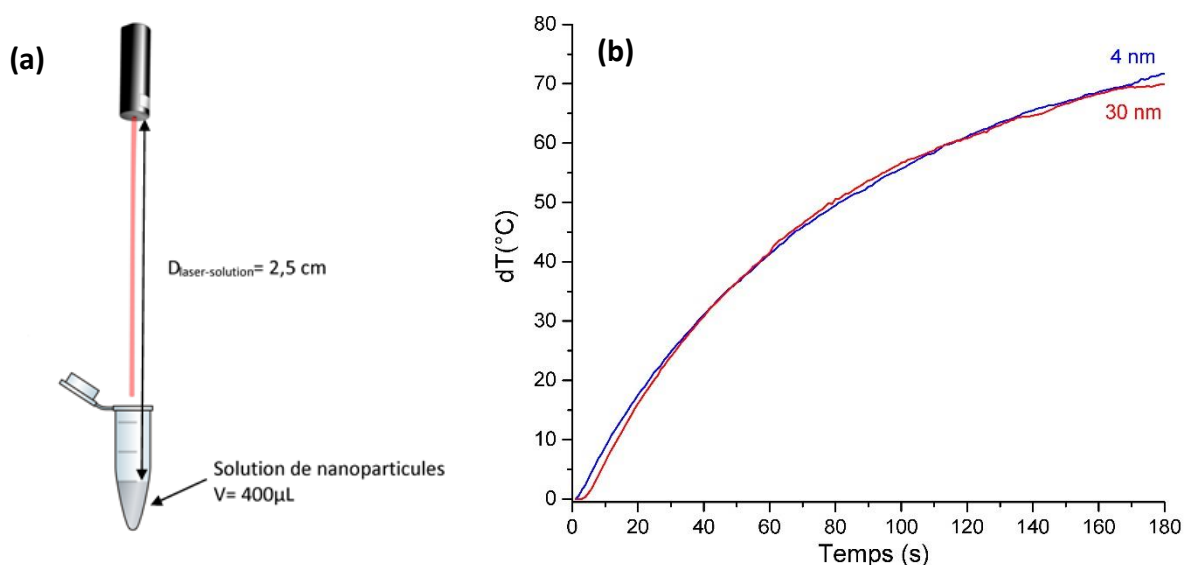
Des expériences d'hyperthermie photoassistée ont été effectuées sur les particules  $\text{Gd}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe} [5]$ , [10] et  $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe} [5]$ , [10] en solution juste après synthèse puis sur les mêmes objets enrobés de dextran et redispersés dans l'eau en utilisant les paramètres précédemment déterminés.

Dans un premier temps, les mesures ont été effectuées en se plaçant à une même concentration en NPs. Or, pour pouvoir comparer les systèmes, il faut être à une même concentration en matière efficace, soit en BdP, dans notre cas. Nous avons donc rapporté la différence de température pour une quantité de BdP égale à  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . La figure II-34 présente les résultats des particules nues et enrobées de dextran. Nous pouvons voir une forte élévation de la chaleur ( $\Delta T > 50^{\circ}\text{C}$ ) en présence de nos particules quel que soit le système. Le dextran semble avoir un effet bénéfique sous irradiation, ce qui est très positif car il est indispensable d'avoir du dextran autour de nos particules pour pouvoir les conserver plus facilement, mais également pour faciliter leur circulation dans l'organisme.



**Figure II-34.** Différence de température sous l'effet de l'irradiation laser rapportés à  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  des différents composés **(a)** en solution colloïdale après synthèse ; **(b)** après enrobage au dextran et redispersion dans l'eau

La différence entre les systèmes semble plus marquée pour les particules nues que pour les particules enrobées de dextran. Les systèmes dopés à 5% en ions paramagnétiques, d'après la figure II-34, sont moins performants. Malgré ces remarques, l'ensemble des systèmes ont une élévation de la température importante, sachant que ces particules ont une taille inférieure à 10nm. Les objets étudiés dans la littérature ont généralement une taille supérieure à 20 nm<sup>6,29-31</sup>. Afin de pouvoir rendre compte de l'influence de la taille sur les capacités d'échauffement, nous avons mis au point des particules de BdP de 30 nm<sup>8</sup> enrobées de dextran et nous avons comparé ces particules avec les particules de 4 nm que nous avons décrites précédemment. Il est difficile de comparer les systèmes de la littérature avec les nôtres car les conditions d'expérimentation sont différentes. C'est pourquoi nous avons voulu mener à bien cette comparaison.



**Figure II-35.** **(a)** Schéma du montage pour les mesures d'hyperthermie en solution ; **(b)** Elévation de la température en fonction du temps sous irradiation laser rapportée à  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de BdP pour des particules de 4 et 30 nm

Les courbes présentées à la figure II-35.(b) permettent de mettre en avant l'absence d'influence de la taille sur l'élévation de la température. L'utilisation de petites particules peut alors être un avantage car celles-ci peuvent être éliminées par les reins et, grâce à l'effet EPR, iront plus facilement jusqu'aux tumeurs sans fonctionnalisation particulière.

### VI.2.3 Images de contraste

Les concentrations étudiées pour les applications en hyperthermie photoassistée et celles utilisées pour tester les performances en IRM sont très différentes. En effet, nous nous basons, dans les deux cas, sur les concentrations en matière active : soit la concentration en BdP pour la PTT, soit la concentration en ions paramagnétique pour l'IRM. Des images de contraste pondérée en  $T_1$  ont donc été faites à 3T pour une concentration en BdP de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , en accord avec celle des expériences d'élévation de température. La concentration en  $\text{Gd}^{\text{III}}$  ou en  $\text{Mn}^{\text{II}}$  pour des dopages à 5% ou à 10% est de 0,019 mM et 0,027 mM, respectivement. Les images obtenues sont présentées à la figure II-36.

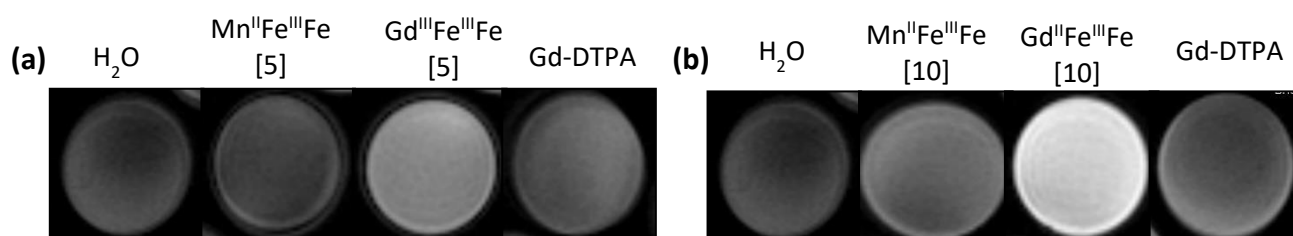


Figure II-36. Images de contraste pondérées en  $T_1$  à 300 MHz (a) [ $\text{Gd}^{\text{III}}$  ou  $\text{Mn}^{\text{II}}$ ] = 0,019 mM ; (b) [ $\text{Gd}^{\text{III}}$  ou  $\text{Mn}^{\text{II}}$ ] = 0,027 mM

Dans ces conditions de concentrations, les apports des particules de  $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}$  [5] et [10] sont limités. Les contrastes sont proches de celui de l'agent clinique  $\text{Gd-DTPA}$  à la même concentration en ions actifs, ce qui est cohérent avec les résultats de relaxométrie décrits dans la partie IV de ce chapitre. De la même manière, les contrastes des particules  $\text{Gd}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}$  [5] et [10] sont nettement améliorés par rapport à l'agent clinique et la référence qui est l'eau. Même à ces concentrations, nous conservons l'effet bénéfique d'un dopage au  $\text{Gd}^{\text{III}}$  de particules de BdP.

## VI.3 Conclusion

Nous avons pu évaluer les performances de nos objets de petites tailles et de composition  $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}$  [5], [10] et  $\text{Gd}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}$  [5], [10] en hyperthermie photoassistée. Sous l'effet d'un rayonnement laser à 808 nm et à une puissance de  $2\text{W.cm}^{-2}$ , nous avons pu constater une élévation de la température supérieure à  $45^\circ\text{C}$  pour une quantité faible de BdP ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Il a été montré que la température de  $43^\circ\text{C}$  est la température barrière à partir de laquelle la mort des cellules cancéreuses commence<sup>32</sup>. La concentration en particules peut donc être diminuée tout en conservant une bonne performance. De plus, nous avons montré que la taille des particules n'avait pas d'effet sur leurs capacités à chauffer le milieu. Ainsi, nos particules de petites tailles sont aussi efficaces que des particules de taille supérieure à 20 nm pour une quantité en  $\text{Gd}^{\text{III}}$  ou  $\text{Mn}^{\text{II}}$ , plus faible ce qui engendrerait une toxicité moindre. Le fort contraste en  $T_1$  est préservé pour les particules à base de  $\text{Gd}^{\text{III}}$ , même à ces faibles concentrations.

## VII. Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons détaillé les synthèses de trois nanoparticules d'analogues de bleu de Prusse :  $Gd^{III}In^{III}Fe$ ,  $Gd^{III}Fe^{III}Fe$  et  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$ . Les réseaux de type bleu de Prusse présentent plusieurs avantages pour être utilisés en tant qu'agents de contraste  $T_1$  pour l'IRM : stabilité, nombreuses molécules d'eau, proportion d'atomes de surface importante. L'utilisation de cœur insoluble de type  $In^{III}Fe$  ou  $Fe^{III}Fe$  a permis d'enrichir des réseaux BdP en  $Mn^{II}$  ou en  $Gd^{III}$  tout en conservant des tailles inférieures à 10 nm. Ces ions paramagnétiques de hauts spins sont situés préférentiellement en surface, favorisant alors la relaxivité.

La taille des objets a été caractérisée par différentes techniques (DLS, MET) permettant de mettre en avant une taille de 4 nm. Nous avons pu constater par DRX une épitaxie des réseaux  $Mn^{II}Fe$  et BdP alors que celle-ci n'est pas possible pour le réseau  $Gd^{III}Fe$ . Pour éviter toute démixtion de phase, nous nous sommes focalisés sur des faibles taux de  $Gd^{III}$ . Deux taux en  $Mn^{II}$  ou  $Gd^{III}$  ont été explorés : 5% et 10%. La spectroscopie IR a permis de confirmer l'insertion des ions  $Gd^{3+}$  et  $Mn^{2+}$  dans le réseau. Les particules ont une structure de type cœur-coquille avec un cœur BdP ou  $In^{III}Fe$  et des unités  $Mn^{II}Fe$  ou  $Gd^{III}Fe$  en surface. Cette structure a été confirmée par l'ensemble des caractérisations effectuées.

Les particules  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$  ont montré des performances en relaxivité dépendantes du taux de  $Mn^{II}$  : plus celui-ci augmente, plus la relaxivité diminue, lié à l'effet défavorable des interactions dipolaires. Pour les objets  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$  [5], une relaxivité par  $Mn^{II}$  de  $16,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  a été mesurée ce qui est nettement amélioré par rapport aux agents cliniques. Grâce à l'étude sur des particules de  $Gd^{III}In^{III}Fe$ , nous avons pu montrer que la relaxivité par  $Gd^{III}$  était constante ( $40 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) et particulièrement élevée. Nous avons ensuite montré l'influence positive d'un cœur paramagnétique de BdP sur des composés  $Gd^{III}Fe^{III}Fe$  qui permet d'exalter la relaxivité ( $50 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Nous avons par le calcul démontré que la participation à la relaxivité des ions  $Fe^{3+}$  n'était pas négligeable. Les objets à base de  $Gd^{III}$  que nous avons mis au point ont des valeurs de relaxivité remarquables par rapport aux autres systèmes de la littérature. De plus, ces particules génèrent un contraste  $T_1$  nettement supérieur à celui de l'agent clinique Gd-DTPA, même à haut champ (300 MHz) et à faible concentration en  $Gd^{III}$  dû à un rapport  $r_2/r_1$  faible. Malgré des valeurs de relargage de  $Gd^{III}$  élevées en pourcentage mais faibles en ppm, la toxicité *in vitro* de ces objets est faible. L'ensemble de ces critères fait des particules  $Gd^{III}In^{III}Fe$  et  $Gd^{III}Fe^{III}Fe$  de potentiels bons agents de contraste  $T_1$  pour l'IRM.

Le cœur BdP présente une forte absorption dans le proche IR permettant d'envisager des applications en hyperthermie photoassistée. Nous avons évalué les performances de nos particules en PTT. Pour cela, nous avons irradié avec un laser à 808 nm des solutions aqueuses de particules de  $Gd^{III}Fe^{III}Fe$  et  $Mn^{II}Fe^{III}Fe$ . Avec une concentration de  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  en BdP, une augmentation de la température supérieure à  $50^\circ\text{C}$  est obtenue. Ainsi, une quantité inférieure de BdP pourrait permettre de dépasser la valeur critique de  $43^\circ\text{C}$ . Nous avons pu montrer que nous avons mis au point des plateformes thérapeutiques de taille inférieure à 10 nm efficaces en tant qu'agents de contraste  $T_1$  en IRM et en hyperthermie photoassistée pour une quantité en métal moindre, limitant ainsi la toxicité.

Ces résultats encourageants nous ont conduit à faire des expériences *in vitro*. Des expériences d'hyperthermie photoassistée sur cellules ont été menées au cours de cette thèse, mais n'ont pas conduit à un effet probant. En effet, au vu des performances de nos objets en solution aqueuse, la combinaison entre NPs et irradiation laser devrait engendrer la mort cellulaire, ce qui n'a jamais été observé.



Les solutions ayant une couleur bleue intense, le milieu de culture cellulaire (DMEM) contenant les particules devrait être bleu, ce qui n'a pas été constaté, laissant penser à une altération de nos particules dans ce milieu. Notons que ceci n'a pas été mis en évidence pour les expériences de toxicité présentées dans la partie V de ce chapitre. Dans le souci d'aller de plus en plus vers des expériences *in vitro* et *in vivo*, nous avons souhaité comprendre davantage ce phénomène d'altération et cherché à connaître la stabilité de nos objets dans des milieux physiologiques ou pouvant rendre compte de ce qui peut se passer une fois les particules injectées dans l'organisme. Cela sera l'objet du chapitre suivant de ce manuscrit.

## **Bibliographie**

1. Shokouhimehr, M. *et al.* Dual purpose Prussian blue nanoparticles for cellular imaging and drug delivery : a new generation of T 1 -weighted MRI contrast and small molecule delivery agents. *J. Mater. Chem.* **20**, 5251–5259 (2010).
2. Chen, H., Ma, Y., Wang, X., Wu, X. & Zha, Z. Facile synthesis of Prussian blue nanoparticles as pH-responsive drug carriers for combined photothermal-chemo treatment of cancer. *RSC Adv.* **7**, 248–255 (2017).
3. Hoffman, H. A., Chakrabarti, L., Dumont, M. F., Sandler, A. D. & Fernandes, R. SI :Prussian blue nanoparticles for laser-induced photothermal therapy of tumors. *RSC Adv.* **4**, 29729 (2014).
4. Kandapitiye, M. S. *et al.* Incorporation of Gallium-68 into the Crystal Structure of Prussian Blue to Form  $K_6Ga_xFe_{1-x}[Fe(CN)_6]$  Nanoparticles: Toward a Novel Bimodal PET/MRI Imaging Agent. *Dalt. Trans.* **45**, 9174 (2016).
5. Dumont, M. F. *et al.* Biofunctionalized gadolinium-containing Prussian blue nanoparticles as multimodal molecular imaging agents. *Bioconjug. Chem.* **25**, 129–137 (2014).
6. Li, Y., Li, C. H. & Talham, D. R. One-step synthesis of gradient gadolinium ironhexacyanoferrate nanoparticles: a new particle design easily combining MRI contrast and photothermal therapy. *Nanoscale* **7**, 5209–16 (2015).
7. Dumont, M. F., Yadavilli, S., Sze, R. W., Nazarian, J. & Fernandes, R. Manganese-containing Prussian blue nanoparticles for imaging of pediatric brain tumors. *Int J Nanomedicine* **9**, 2581–2595 (2014).
8. Zhu, W. *et al.* Mn 2+ -Doped Prussian Blue Nanocubes for Bimodal Imaging and Photothermal Therapy with Enhanced Performance. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 11575–11582 (2015).
9. Brinzei, D. *et al.* Spontaneous stabilization and isolation of dispersible bimetallic coordination nanoparticles of  $Cs_xNi[Cr(CN)_6]_y$ . *J. Mater. Chem.* **16**, 2593–2599 (2006).
10. Paul, G. Nanoparticules de réseaux de coordination pour l'imagerie médicale. (2015).
11. Paul, G. *et al.* Mn(II)-containing coordination nanoparticles as highly efficient T1 contrast agents for magnetic resonance imaging. *Chem. Commun. (Camb)*. **50**, 6740–3 (2014).
12. Kim, T. *et al.* Mesoporous silica-coated hollow manganese oxide nanoparticles as positive T 1 contrast agents for labeling and MRI tracking of adipose-derived mesenchymal stem cells. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 2955–2961 (2011).
13. Liu, J., Yu, M., Zhou, C. & Zheng, J. Renal clearable inorganic nanoparticles: a new frontier of bionanotechnology. *Mater. Today* **16**, (2013).
14. Ning, X. *et al.* Physiological stability and renal clearance of ultrasmall zwitterionic gold nanoparticles: Ligand length matters. *APL Mater.* **5**, 053406 (2017).
15. Perera, V. S. *et al.* Biocompatible Nanoparticles of  $KGd(H_2O)_2[Fe(CN)_6] \cdot H_2O$  with Extremely High T1-Weighted Relaxivity Owing to Two Water Molecules Directly Bound to the Gd(III) Center. *Langmuir* **30**, 12018–12026 (2014).
16. Guari, Y. *et al.* Cyano-bridged coordination polymer nanoparticles with high nuclear relaxivity: toward new contrast agents for MRI. *Dalton Trans.* 3658–3660 (2008). doi:10.1039/b808221a

17. Bridot, J. L. *et al.* Hybrid gadolinium oxide nanoparticles: Multimodal contrast agents for in vivo imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 5076–5084 (2007).
18. Perrier, M. *et al.* Investigation on NMR relaxivity of nano-sized cyano-bridged coordination polymers. *Inorg. Chem.* **52**, 13402–13414 (2013).
19. R.B. Clarkson. Blood-Pool MRI Contrast Agents: Properties and Characterization. *Contrast Agents I* **221**, 201 (2002).
20. Henoumont, C., Vander Elst, L., Laurent, S. & Muller, R. N. Synthesis and Physicochemical Characterization of Gd-C 4 -Thyroxin-DTPA, a Potential MRI Contrast Agent. Evaluation of Its Affinity for Human Serum Albumin by Proton Relaxometry, NMR Diffusometry, and Electrospray Mass Spectrometry. *J. Phys. Chem. B* **114**, 3689–3697 (2010).
21. Dia, N. NANOPARTICULES PHOTOMAGNETIQUES ET AGENTS DE CONTRASTE A BASE DE RESEAUX DE COORDINATION. (2013).
22. Rogosnitzky, M. & Branch, S. Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms. *BioMetals* **29**, 365–376 (2016).
23. Oliver, J. V, Belleza, A. & Villaraza, J. L. Ion charge density governs selectivity in the formation of metal–Xylenol Orange (M–XO) complexes. *Inorg. Chem. Commun.* **47**, 87–92 (2014).
24. Alessandro Barge, Giancarlo Cravotto, E. G. and F. F. How to determine free Gd and free ligand in solution of Gd chelates. A technical note Alessandro. *Contrast Media Mol. Imaging* **1**, 184–188 (2006).
25. Gervais, C. *et al.* Why does Prussian blue fade? Understanding the role(s) of the substrate. **28**, 1533–1668 (2013).
26. Robin, B. Y. M. B. & Ronm, R. The Color and Electronic Configurations of Prussian Blue. *Inorg. Chem.* **1**, 337–342 (1962).
27. Prado, Y. Nanoparticules Multicouches de réseaux de coordination magnétiques. (2010).
28. Ali, L. M. *et al.* Multifunctional manganese-doped Prussian blue nanoparticles for two-photon photothermal therapy and magnetic resonance imaging. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **22**, 65–69 (2018).
29. Liang, X. *et al.* Prussian blue nanoparticles operate as a contrast agent for enhanced photoacoustic imaging. *Chem. Commun.* **49**, 11029 (2013).
30. Hoffman, H., Chakrabarti, L. & Dumont, M. Prussian blue nanoparticles for laser-induced photothermal therapy of tumors. *RSC Adv.* 29729–29734 (2014). doi:10.1039/C4RA05209A
31. Fu, G. *et al.* Magnetic Prussian blue nanoparticles for targeted photothermal therapy under magnetic resonance imaging guidance. *Bioconjug. Chem.* **25**, 1655–63 (2014).
32. Fu, G., Liu, W., Feng, S. & Yue, X. Prussian blue nanoparticles operate as a new generation of photothermal ablation agents for cancer therapy. *Chem. Commun.* **48**, 11567 (2012).

## CHAPITRE III : ETUDE DE LA STABILITE DES PARTICULES $K_{0,6}Gd^{III}_{0,05}Fe^{III}_{0,95}[Fe^{II}(CN)_6]_{0,9}$ DANS LES MILIEUX D'EXPERIENCES *IN VITRO* ET *IN VIVO*

Dans ce chapitre nous allons étudier la stabilité des particules  $K_{0,6}Gd^{III}_{0,05}Fe^{III}_{0,95}[Fe^{II}(CN)_6]_{0,9}$  appelées  $Gd^{III}Fe^{III}Fe$  [5], dans des milieux employés lors des expériences *in vitro* et *in vivo*. Des expériences d'hyperthermie photoassistée sur cellules ont montré un échauffement négligeable, incohérent avec les mesures en solution aqueuse. Ce constat nous a permis de mettre en avant l'instabilité des bleus de Prusse dans certains milieux complexes comme ceux de culture cellulaire. Afin de devancer d'éventuels problèmes de dégradation au cours d'expériences *in vivo*, nous avons cherché à connaître le devenir dans le temps de nos particules dans différents milieux pouvant mimer ce qui se passe après injection intra-veineuse (IV). Différentes stratégies ont été envisagées afin d'obtenir à terme des objets optimaux.

### I. Introduction

Après avoir développé chimiquement des nanoparticules pouvant être efficaces comme plateformes théranostiques pour l'IRM et l'hyperthermie photoassistée, nous avons évalué les capacités de nos objets sur des cellules puis sur le petit animal. Jusqu'ici, l'ensemble des mesures a été mené en solution aqueuse. Nous avons étudié le comportement des particules dans le temps et dans des milieux permettant de rendre compte de ce qui pourrait se passer :

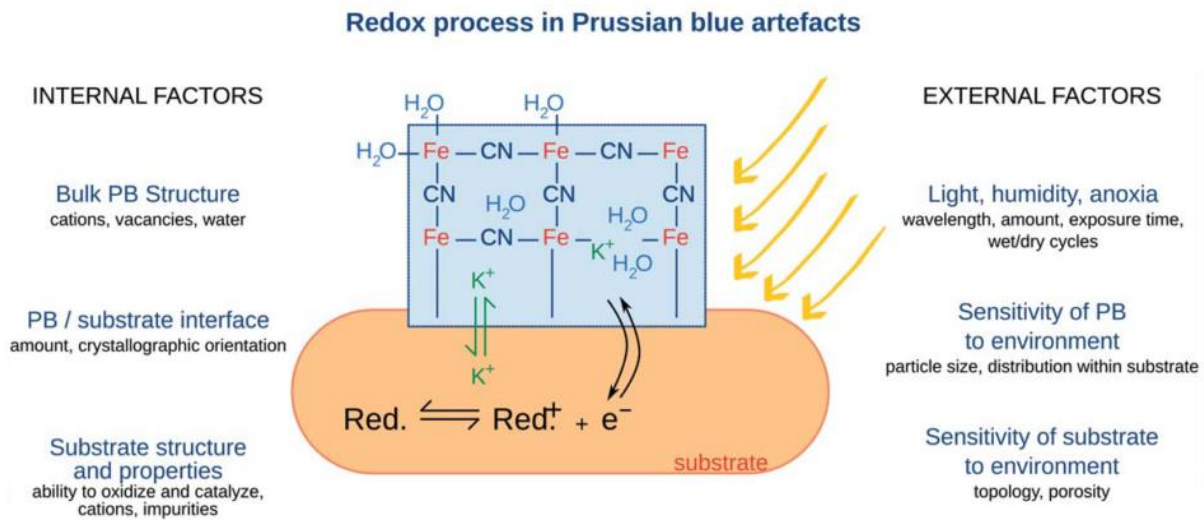
- lors de l'acheminement des particules jusqu'à la tumeur ;
- après internalisation cellulaire, plus précisément dans les lysosomes dans lesquels les particules viennent s'accumuler (constaté sur différentes particules d'ABP<sup>1,2,3</sup>).

Peu d'études ont été reportées à ce sujet et cette méthodologie est peu employée d'une manière générale. L'intensité du transfert de charge MMCT permet de rendre compte de la stabilité des enchaînements  $Fe^{II}-CN-Fe^{III}$ . Ainsi, le suivi par spectroscopie UV-visible s'avère être la méthode la plus simple pour appréhender l'éventuelle dégradation des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe$  [5] enrobées de dextran dans les différents milieux.

### II. Dégradation des bleus de Prusse

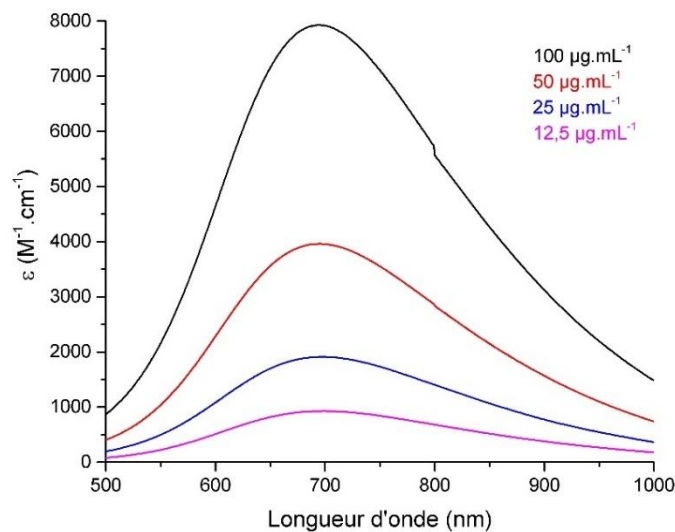
Le bleu de Prusse a été utilisé autrefois comme pigment coloré par les artistes. Ceux-ci ont constaté une perte de l'intensité de la couleur qui peut être expliquée par une photo-dégradation<sup>4</sup>. En effet, les rayonnements UV présents dans la lumière entraînent une réduction des ions  $Fe^{3+}$  en ions  $Fe^{2+}$ . Il y a alors formation de ponts  $Fe^{II}-CN-Fe^{II}$ . Ainsi, le transfert de charge à l'origine de la couleur bleue des particules n'est plus possible entraînant la diminution progressive de l'intensité de la couleur. A terme, il se forme alors un composé,  $K_2Fe^{II}[Fe^{II}(CN)_6]$ , appelé blanc de Prusse. Il est donc indispensable de préserver de la lumière les composés contenant des ponts  $Fe^{II}-CN-Fe^{III}$ . Cette dégradation s'explique par la présence de lacunes et d'ions alcalins dans le réseau BdP. En fonction de ces éléments, la décoloration est réversible en présence d'oxygène, car le  $Fe^{II}$  peut s'oxyder en  $Fe^{III}$ . Celle-ci peut prendre plusieurs jours mais la cinétique est dépendante du milieu de travail.

De nombreux autres facteurs peuvent influencer le transfert de charges des bleus de Prusse. Une étude a été menée, en 2013, afin de mettre en avant ces différents facteurs<sup>5</sup>. Les auteurs ont utilisé un modèle reposant sur l'incorporation de BdP dans un substrat, ils ont donc évalué l'influence de ces substrats sur la réduction des Fe<sup>III</sup> en Fe<sup>II</sup>. Les facteurs principaux influençant le phénomène sont résumés dans un schéma, présenté ci-dessous.



**Figure III-1.** Schéma résumant les facteurs influençant la réduction du BdP associé à un substrat<sup>5</sup>

Les auteurs ont également évoqué un effet de la concentration sur la cinétique de dégradation des BdP. Ils ont montré une différence de réflectance avant décoloration en fonction de la concentration en BdP, justifiant ainsi de comparer des systèmes à même concentration. Nous avons cherché à confirmer cette influence dans le cadre de nos systèmes. Pour cela, des particules Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe[5] enrobées de dextran ont été redispersées dans l'eau à différentes concentrations en BdP et analysées par spectroscopie UV-visible entre 500 et 1000 nm. En connaissant la composition chimique exacte de l'échantillon, nous avons pu calculer le coefficient d'extinction molaire d'après la loi de Beer-Lambert (Annexe 7).



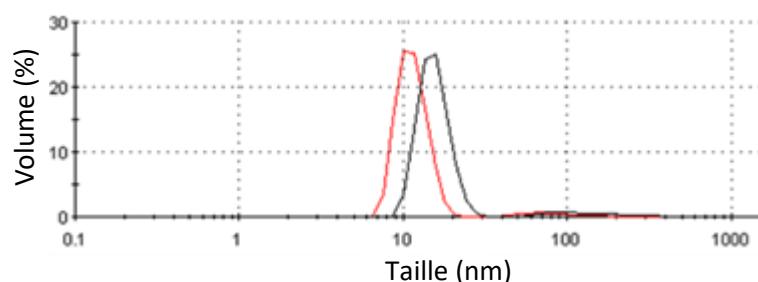
**Figure III-2.** Spectres UV-visible des particules Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe[5]@(dextran)<sub>25</sub> à différentes concentration en BdP 100μg.mL<sup>-1</sup>, 50μg.mL<sup>-1</sup>, 25μg.mL<sup>-1</sup>, 12,5μg.mL<sup>-1</sup>

En représentant le coefficient d'extinction molaire en fonction de la longueur d'onde, l'influence de la concentration sur l'intensité de la bande est évidente. Afin de s'affranchir de l'effet de la lumière, les solutions ont été préparées dans des piluliers en verre teinté et les cuves pour les analyses ont été protégées par du papier aluminium. Cette procédure a été appliquée pour l'ensemble des échantillons analysés dans la suite de ce chapitre. Pour pouvoir comparer les systèmes et les expériences, il faut donc se placer à une même concentration en BdP. En accord avec les résultats d'hyperthermie photoassistée présentés dans le chapitre II, nous avons choisi de travailler à une concentration en BdP égale à  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Dans la suite de ce chapitre, sauf précision contraire, les mesures ont été effectuées à  $37^\circ\text{C}$  pour mimer la température du corps humain.

## II.1 Milieux de culture cellulaire

Les tests *in vitro* sont généralement réalisés en redispersant nos particules dans les milieux de culture cellulaire, comme notamment le DMEM. Il est composé principalement de sels (KCl,  $\text{MgSO}_4$ , NaCl etc.), d'acides aminés, de glucose et de vitamines. Il est complété par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) pour assurer la bonne santé des cellules. Le DMEM est alors considéré comme complet. Le DMEM contient un marqueur de pH, le rouge de phénol. Ce milieu est, en principe basique ( $\text{pH}\approx 7,4$ ). Lors d'expérience *in vitro*, les cellules avec le milieu de culture contenant les particules sont placées dans un incubateur le temps de l'internalisation. L'incubateur permet de maintenir une température de  $37^\circ\text{C}$ , un pH constant et un contrôle du taux de  $\text{CO}_2$ . Dans le cadre de nos expériences, nous n'avons pas d'incubateur à disposition. Le pH du milieu et le taux de  $\text{CO}_2$  n'ont donc pas été maintenus constants. Cependant, grâce au rouge de phénol, il est possible de voir les changements de pH. En effet, à pH basique cet indicateur est rouge ; la zone de virage se situe entre pH 6,6 et 8,4, le rouge de phénol est alors orange puis devient jaune lorsque le pH est acide. Les expériences ont bien été menées à pH basique car l'indicateur était rouge comme l'atteste la bande à 565 nm sur les spectres de la figure III-4.

Nous avons donc préparé des solutions de particules  $\text{Gd}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}[5]$  enrobées de 25 équivalents de monomères de dextran dans du DMEM complet. Nous avons, dans un premier temps, vérifié que les particules ne s'agrègent pas dans ce milieu, ce qui pourrait modifier les performances de nos objets. Pour cela, un suivi dans le temps, par DLS a été effectué.



**Figure III-3.** Distribution en volume de la taille des particules  $\text{Gd}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}[5]@(\text{dextran})_{25}$  obtenue par DLS redispersées dans du DMEM complet à  $t=0$  (en rouge) et  $t=1\text{h}$  (en noir)

Une faible évolution du diamètre hydrodynamique est observée après une heure. La présence de SVF dans le milieu est indispensable pour prévenir de l'agrégation des particules. Dans un second temps, nous avons suivi la stabilité des propriétés optiques du cœur BdP par spectroscopie UV-visible. Une solution de particules à une concentration de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  est alors préparée dans le DMEM complet.

Les spectres représentant le coefficient d'extinction molaire en fonction de la longueur d'onde sont présentés à la figure III-4. La bande à environ 700 nm correspond au transfert de charge MMCT du BdP.

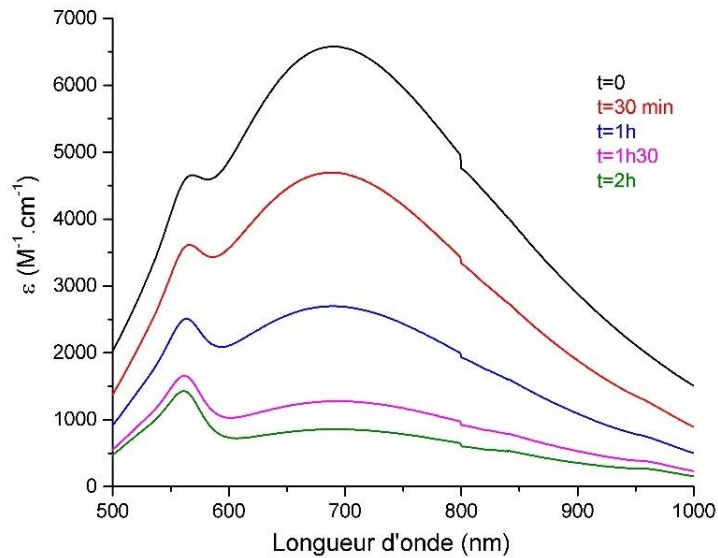
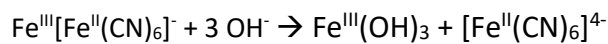


Figure III-4. Spectres UV-visibles des particules  $Gd^{III}(Fe^{II})_2Fe^{III}@ (dextran)_{25}$  dispersées dans le DMEM complet

Une dégradation des ponts  $Fe^{II}-CN-Fe^{III}$  est observée. Celle-ci est rapide : en 2h, une décoloration quasiment totale est constatée. Cette dégradation est une conséquence du pH de la solution. En effet, à pH basique, la réaction suivante se produit :



Ceci atteste d'une décomposition des particules en milieu alcalin conduisant à la formation de ferrocyanure et d'hydroxyde de fer<sup>4</sup>. Le même constat a été fait dans un autre milieu de culture cellulaire, le RPMI. Ainsi, la décomposition entraîne la perte des ponts  $Fe^{II}-CN-Fe^{III}$  expliquant la diminution du coefficient d'extinction molaire. Ceci conduit alors à une inefficacité de nos particules en hyperthermie photoassistée. Ces observations permettent une compréhension des résultats de PTT sur cellules. En effet, les particules se sont décomposées dans le milieu de culture avant l'irradiation, ne permettant pas l'augmentation de température nécessaire à la mort des cellules tumorales. Ce phénomène n'a pas pu être anticipé d'après les résultats de la littérature car la cinétique de celui-ci est accélérée par la faible taille de nos composés. Cependant, ces particules de petites tailles, bien que plus sensibles à la dégradation, sont plus adaptées à l'élimination notamment par voie rénale.

Au vu de ces observations, interpréter et tirer des conclusions d'expériences *in vitro* est peu fiable. Cependant, les tests sur cellules, bien qu'utiles, ne représentent absolument pas ce qui pourrait se passer au niveau de l'organisme. Ainsi, le DMEM n'est pas un milieu représentatif du milieu sanguin ou du milieu cellulaire. Des expériences *in vivo* sont toujours envisageables mais une vérification de la stabilité de nos objets dans des milieux adéquats est indispensable. Pour cela, nous avons choisi deux milieux : l'ALF (Artificial Lysosomal Fluid) et le SVF (Sérum de Veau Fœtal).

## II.2 Stabilité dans l'ALF

L'ALF est un milieu artificiel qui mime le milieu lysosomal des cellules (pH, force ionique). La composition exacte de l'ALF est présentée dans le tableau III-1.

Ce milieu a été utilisé pour sonder la stabilité d'oxydes de fer dans la thèse de J. Volatron<sup>6</sup>. Dans un premier temps, il a été fourni par l'équipe de F. Gazeau puis a été mis au point au laboratoire.

Sels	Quantité g.L <sup>-1</sup>
NaCl	3,210
NaOH	6,000
Acide citrique	20,800
CaCl <sub>2</sub>	0,097
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O	0,179
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,039
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,106
Glycine	0,059
Na <sub>3</sub> citrate,2H <sub>2</sub> O	0,077
Na <sub>3</sub> tartrate ,2H <sub>2</sub> O	0,090
Na lactate	0,085
Na pyruvate	0,086

Tableau III-1. Composition chimique de l'ALF<sup>7</sup>

L'ALF contient de nombreux ions et agents chélatants (acide citrique, notamment). Comme précédemment, nous avons vérifié la stabilité en taille des particules dans l'ALF par un suivi en DLS dans le temps.

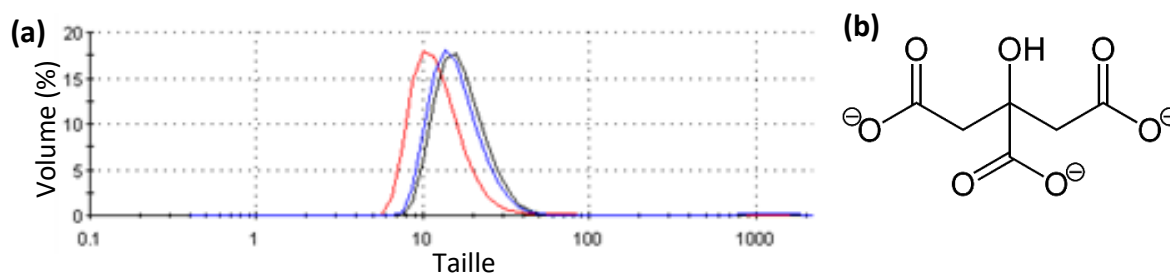
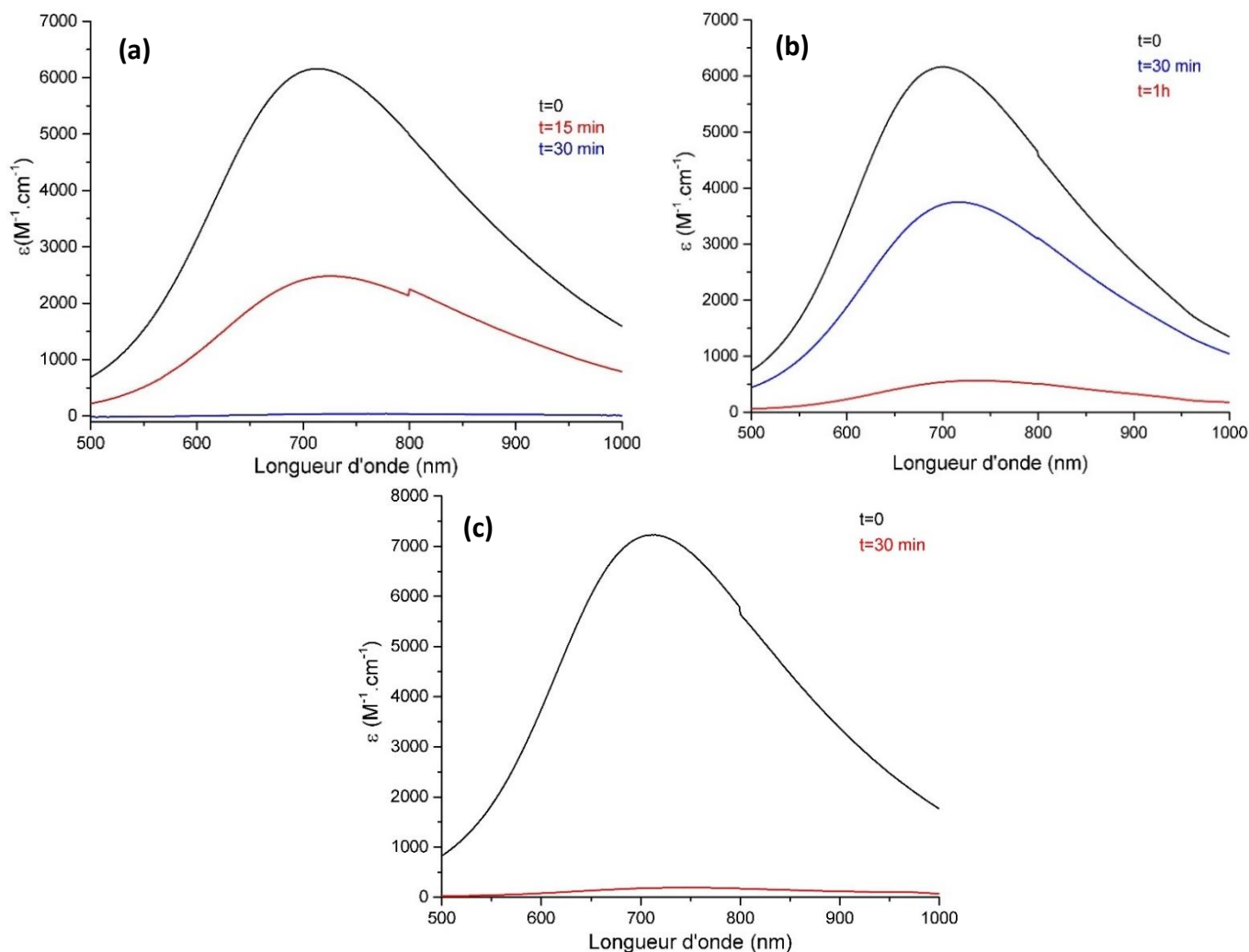


Figure III-5.(a) Distribution en volume du diamètre hydrodynamique des particules Gd<sup>III</sup>/Fe<sup>III</sup>/Fe[5]@(dextran)<sub>25</sub> redispersées dans l'ALF à t=0 (rouge), t=30 min (noir), t=1h (bleu) ; (b) Structure du citrate

Les mesures du diamètre hydrodynamique dans le temps montrent une légère augmentation de celui-ci, passant de 10 nm à 13 nm. Cette augmentation n'est pas significative et ne suggère pas une agrégation des particules en solution. Les particules sont donc stables en taille dans ce milieu. Un suivi en spectroscopie UV-visible a été effectué en conservant les solutions à 37°C entre chaque mesure. En effet, la dégradation est accélérée par la température. Pour éviter tout effet de la température lors de la préparation des solutions, celles-ci ne sont pas passées aux ultra-sons comme fait habituellement car le bain à ultra-sons provoque un échauffement. Pour éviter la présence d'agrégats dans les solutions, nous avons utilisé un vortex. La préparation des solutions pour ces études de stabilité est détaillée dans l'annexe 2. La figure III-6 montre les spectres obtenus. Trois enrobages différents ont été testés : dextran, PVP et poly-cyclodextrine (poly-CD). La poly-CD sera décrite dans la partie VI de ce chapitre.



En 30 minutes, la bande correspondant à la MMCT n'apparaît plus sur les spectres des particules enrobées par le dextran et la poly-CD. Avec le PVP, la cinétique est légèrement ralentie mais après 1h, l'intensité de la bande est très faible. Cette décoloration peut être causée par deux mécanismes : une réduction des ions  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  ou une dissolution des particules par complexation des ions citrate contenus dans l'ALF.



**Figure III-6.(a).** Spectres UV-visibles représentant le coefficient d'extinction molaire en fonction de la longueur d'onde dans l'ALF des particules  $\text{Gd}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}[5]$  enrobées de **(a)** dextran ; **(b)** PVP ; **(c)** poly-CD

En effet, celui-ci peut agir comme agent réducteur mais également comme agent complexant. Bien que l'acide citrique ne soit pas un composant principal du lysosome, il permet dans l'ALF d'ajuster le pH. Pour notre étude, il permet de rendre compte du comportement de nos particules vis-à-vis d'un chélatant fort du fer. La constante de stabilité d'un complexe formé entre l'acide citrique et le  $\text{Fe}^{\text{III}}$  est élevée ( $\log K=11,5$ )<sup>8</sup>. Cette information va dans le sens d'une chélation des groupements citrate de l'ALF avec les ions  $\text{Fe}^{3+}$  en surface des nanoparticules de BdP. Il y aurait alors formation de complexes  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrate et de  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6$ . Néanmoins, le pouvoir réducteur du citrate ne peut pas être négligé ce qui conduirait également à la perte du transfert de charge à travers le pont cyanure par réduction des  $\text{Fe}^{\text{III}}$  en  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . Des études par spectroscopie IR et DRX sur poudre ont été menées afin de comprendre davantage le mécanisme de décoloration et seront présentées dans la partie II.4 de ce chapitre.

Afin de valider notre hypothèse d'interaction entre les groupements citrate et le BdP, une étude de la stabilité des particules au dextran dans un tampon citrate a été réalisée. De la même manière que pour l'étude dans l'ALF, les particules ont été redispersées dans un tampon citrate. Les résultats sont présentés à la figure III-7.

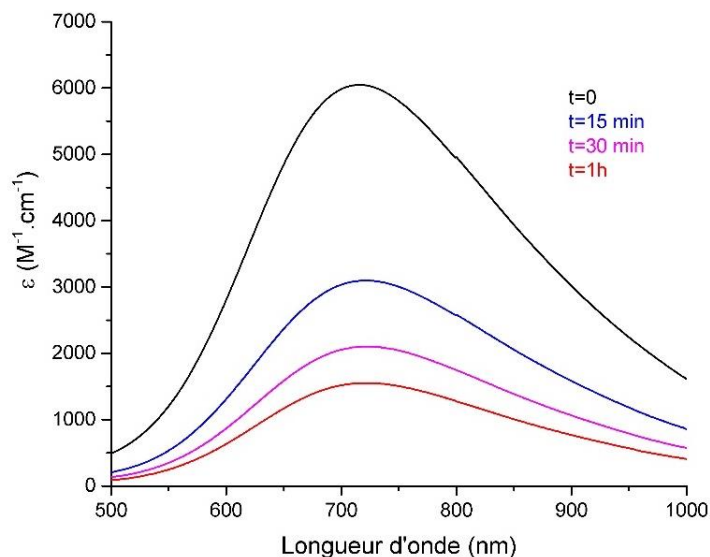


Figure III-7. Spectres UV-visible des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]@(dextran)_{25}$  dans un tampon citrate

Ces expériences ont permis de montrer une diminution rapide de l'absorbance des solutions dans un milieu simple. L'évolution est plus lente dans le tampon que dans l'ALF. En effet, l'ALF est un milieu complexe où d'autres espèces peuvent se complexer au fer (phosphate, notamment) et participer également à la détérioration des ponts  $Fe^{II}-CN-Fe^{III}$ , ce qui accélérerait le phénomène. Cependant, l'évolution dans le tampon citrate montre bien qu'il joue un rôle prépondérant dans la perte de couleur.

Nos particules ne sont donc pas stables dans l'ALF. Cela suggère que leur internalisation pourrait s'accompagner d'une perte de performance en hyperthermie photoassistée. Une étude a montré récemment que des particules composées de PVP, d'acide gallique et de  $Fe^{III}$ , de petites tailles ( $d_H \approx 5,3$  nm) n'avaient pas besoin d'être internalisées pour remplir leur rôle<sup>9</sup>. En se plaçant autour des cellules, les particules entraîneront l'augmentation de température du milieu et celle-ci sera diffusée au sein des cellules. Ceci nécessite que, par la suite, les particules soient éliminées par les reins. Ainsi, l'évolution de nos objets dans le milieu ALF n'est pas rédhitoire mais les particules doivent pouvoir être amenées jusqu'aux cellules sans altération de leur pouvoir en PTT. Après injection IV, elles vont donc circuler dans le milieu sanguin puis se localiser autour des cellules, par effet EPR (ou par un ciblage). La stabilité dans le milieu sanguin doit donc être vérifiée.

### II.3 Stabilité dans le SVF

Le sérum de veau fœtal permet de rendre compte du milieu sanguin. Il est principalement composé d'albumine de bovin, de nombreuses autres protéines et d'ions, notamment des phosphates. Il est difficile d'évaluer la taille des particules par DLS dans ce milieu. Le SVF est un milieu complexe dans lequel les composants ont un diamètre hydrodynamique équivalent à celui de nos particules (5-6 nm). Il est donc impossible de les distinguer.

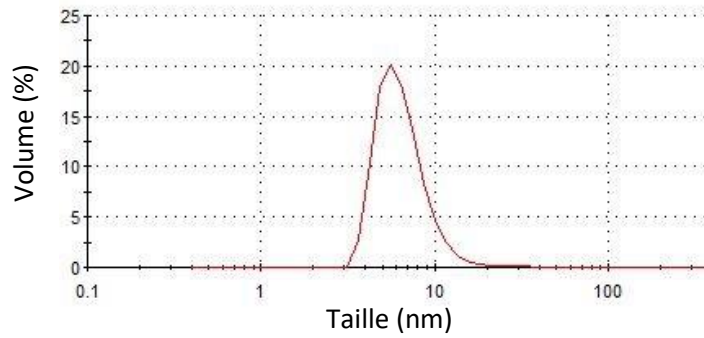


Figure III-8. Distribution en volume du diamètre hydrodynamique du milieu SVF mesurée par DLS

Cependant, en cas de forte agrégation des particules, d'autres populations seraient apparues sur les distributions en volume mesurées. Ceci n'a pas été constaté, suggérant une bonne stabilité de nos particules vis-à-vis de l'agrégation dans le SVF. Un suivi de la stabilité en spectroscopie UV-visible a été effectué pendant 4h en conservant la solution de particules dans une étuve à 37°C. Comme pour l'ALF, les particules avec trois enrobages différents ont été étudiées. Les coefficients d'extinction molaire en fonction de la longueur d'onde sont représentés ci-dessous.

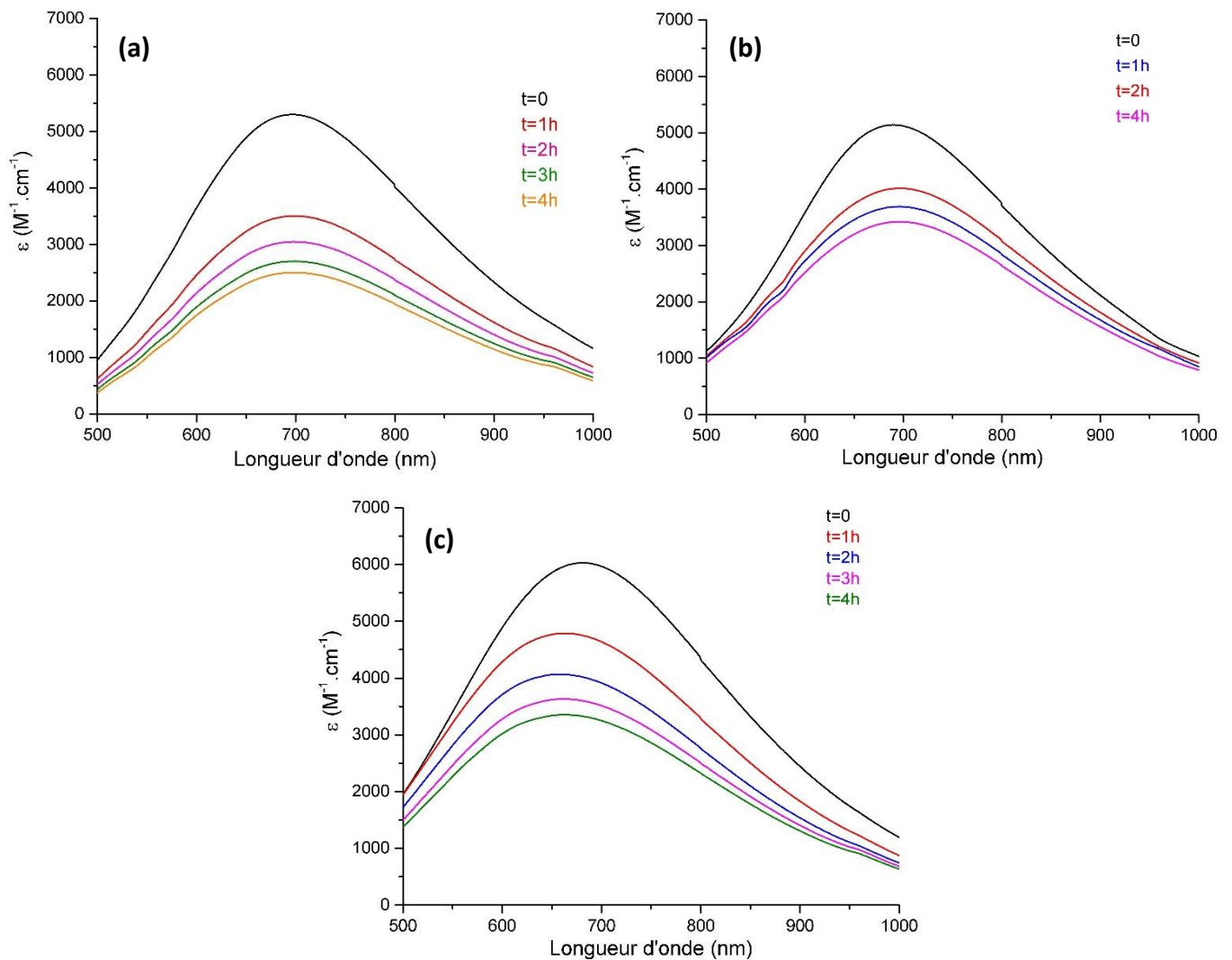
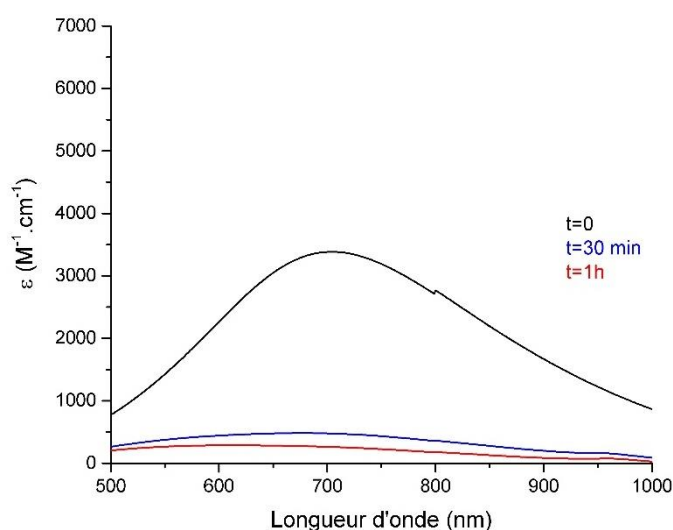


Figure III-9. Spectres UV-visible des particules  $Gd^{III}/Fe^{III}/Fe$  [5] enrobées de (a) dextran ; (b) PVP ; (c) poly-CD redispersées dans le SVF et enregistrés pendant 4h

Une perte de l'absorbance est observée d'environ 50% après 4h pour des enrobages au dextran et à la poly-CD. Malgré une stabilité qui semble meilleure pour le PVP, les expériences menées ne montrent pas une amélioration suffisante pour espérer des performances significatives. Cette diminution est non négligeable mais reste beaucoup plus lente que celle observée dans l'ALF. Dans le cas du sérum, cette évolution peut s'expliquer par la présence importante d'ions phosphates. De la même manière que pour le citrate de l'ALF, les phosphates de ce milieu peuvent complexer le fer étant donné la très forte stabilité du phosphate de fer(III) ( $\log K=8,3$ )<sup>10</sup>. Le SVF étant un milieu complexe contenant de nombreuses protéines et autres agents chélatants, nous avons cherché à démontrer l'effet des phosphates sur la stabilité des BdP. C'est pourquoi nous avons étudié le comportement de nos particules enrobées de dextran dans un tampon phosphate (PBS, 1X). La figure III-10 rend compte des résultats obtenus.



**Figure III-10.** Suivi en spectroscopie UV-visible de la stabilité des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]@(dextran)_{25}$  dans un tampon phosphate

Dans le tampon phosphate, la diminution de l'absorbance est quasiment instantanée car un faible coefficient d'extinction molaire est calculé dès  $t=0$  pour les particules enrobées de dextran. La diminution est alors rapide jusqu'à une perte totale de l'absorbance au bout d'une heure de contact entre le tampon et les particules. Ceci démontre bien le rôle prédominant des ions phosphates dans la perturbation de la stabilité des NPs. La quantité de phosphate dans le SVF par rapport au tampon étant moindre, la perte de stabilité est plus lente dans ce milieu. Les autres composants (protéines) pourraient, également, jouer un rôle protecteur. Ceci signifie que la stabilité dans le sérum n'est pas suffisante pour permettre un transport des particules jusqu'aux cellules tumorales sans détérioration partielle, ne pouvant alors garantir un effet optimal en hyperthermie photoassistée *in vivo*.

Rappelons que les trois enrobages utilisés se lient aux particules par l'intermédiaire de liaisons hydrogène. Ce mode d'interaction commun conduit alors à une stabilité proche dans l'ALF et le SVF. Bien que de nombreuses études ont été menées sur l'utilisation de BdP pour des applications médicales, aucune ne reporte ce phénomène de dégradation dans les milieux cellulaires et sanguins, ce qui est une barrière importante pour diriger les recherches vers des études *in vivo*. La plupart des systèmes actuellement publiés dans la littérature ont des tailles supérieures à 20 nm. Nous nous sommes alors posés la question de l'influence de la taille des particules sur la stabilité.

## II.4 Influence de la taille sur la stabilité

Afin de pouvoir rendre compte de l'effet de la taille sur la stabilité des BdP, nous avons synthétisé quatre échantillons de tailles différentes : 4, 17, 30 et 110 nm. Les particules de 4 nm ont été synthétisées d'après la méthode développée au laboratoire et décrite dans le chapitre 2. Les particules de 17 nm ont été élaborées à partir d'un protocole élaboré au laboratoire pour obtenir des particules cœur-coquilles<sup>11</sup>. Les particules de 30 nm et 110 nm ont été mise au point d'après des protocoles de la littérature<sup>12,13</sup>. Les protocoles de synthèse des différentes nanoparticules sont décrits dans l'annexe 10. Il est important de préciser l'enrobage des particules : les particules de 4 et 17 nm sont enrobées avec du dextran. Les particules de 30 nm contiennent de l'acide citrique et du dextran. Enfin, les plus grandes particules sont synthétisées en condition acide et sont fonctionnalisées par du PVP.

### II.4.1 Comparaison des différentes particules

Ces quatre types de particules ont été redispersés à la même concentration en BdP ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) dans l'ALF. Un suivi de la stabilité de la bande de transition électronique des BdP en spectroscopie UV-visible a été réalisé à  $37^\circ\text{C}$ . Afin de pouvoir comparer l'évolution des différents systèmes, l'absorbance maximale a été normalisée par rapport à l'absorbance maximale mesurée à  $t=0$ . L'évolution de l'absorbance normalisée en fonction du temps de chaque système étudié est représentée à la figure III-11.

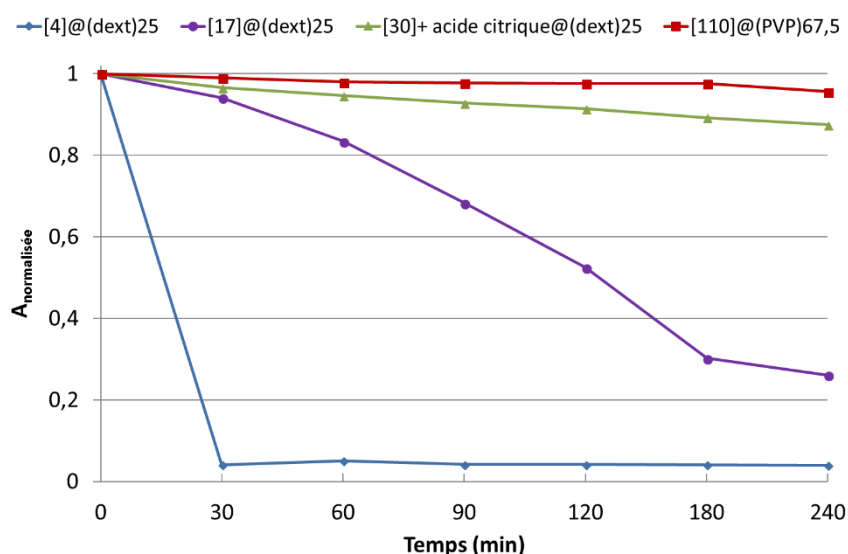
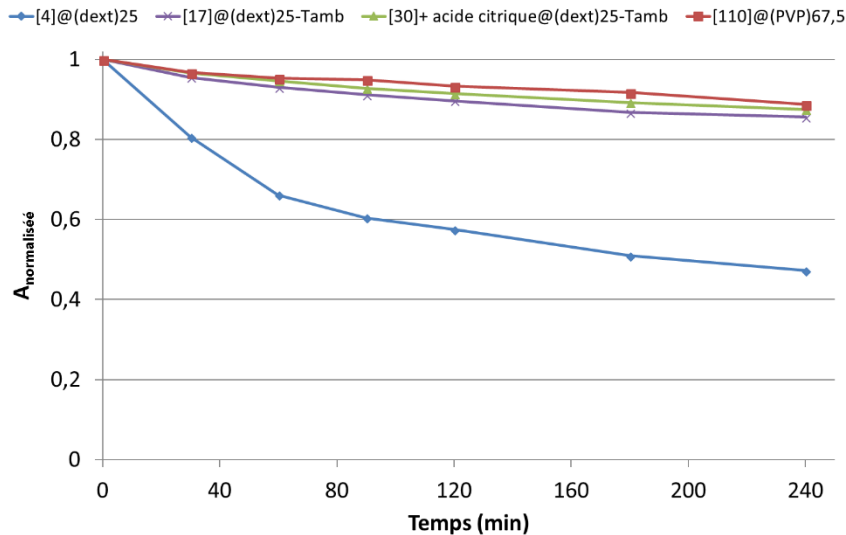


Figure III-11. Représentation de l'absorbance maximale normalisée en fonction du temps pour les particules de 4 nm, 17 nm, 30 nm et 110 nm redispersées dans l'ALF. Les tailles sont indiquées entre crochet.

La même étude a été effectuée dans le SVF et dans les mêmes conditions d'expériences. Certaines mesures ont été effectuées à température ambiante et n'ont pas pu être reproduites à  $37^\circ\text{C}$  (17 nm et 30 nm).

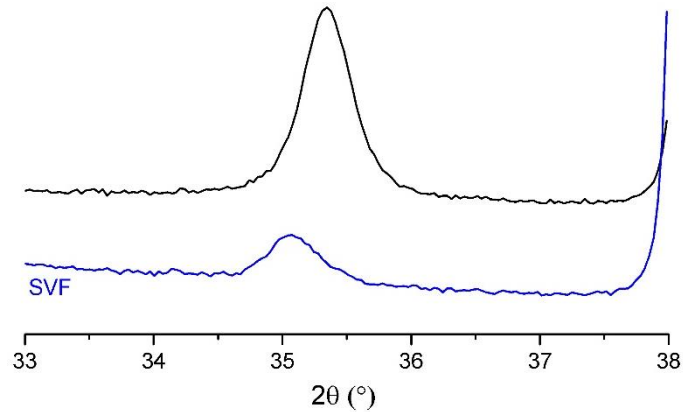


**Figure III-12.** Représentation de l'absorbance maximale normalisée en fonction du temps pour les particules de 4 nm, 17 nm, 30 nm et 110 nm redispersées dans le SVF. Les tailles sont indiquées entre crochet.

De cette étude, il ressort clairement que la cinétique de décoloration est dépendante de la taille des particules. Ceci se constate parfaitement pour les mesures dans l'ALF. Il y a donc une amélioration de la stabilité lorsque la taille augmente. Cependant, une diminution de l'absorbance est quand même observée, particulièrement dans le SVF. Ceci montre qu'une attaque de la surface des particules a lieu, sans expliciter le mécanisme mis en jeu. Les particules de petites tailles ont une surface spécifique plus importante que les particules de plus grandes tailles. Ainsi, son accès est facilité pour les agents comme le citrate ou le phosphate qui peuvent alors agir sur les  $Fe^{III}$  situés en surface. Le phénomène peut alors se propager au reste de la particule. Il faut cependant préciser que la comparaison entre les quatre systèmes peut être faussée par la différence entre les méthodes de synthèse. Par exemple, la présence de citrate dans la synthèse des particules de 30nm peut être un facteur stabilisant non négligeable. Pour parfaire cette étude, il faudrait avoir un enrobage identique mais très clairement, la taille et la cristallinité des objets influencent drastiquement leur stabilité dans les deux milieux.

#### **II.4.2 Caractérisation du devenir des particules**

Pour comprendre davantage ce qui se passe au niveau des nanoparticules lorsqu'elles sont au contact de l'ALF ou du SVF, des mesures de DRX sur poudre et des spectres IR ont été enregistrés. Les particules sont redispersées dans les milieux d'étude et les solutions sont conservées à 37°C, pendant 24h pour les particules de 30 nm et pendant 4h pour les particules de 4 nm. L'ajout d'acétone permet de précipiter les particules et, après séchage sous vide, les particules sont récupérées sous forme de poudre. Les particules de 4 nm, dispersées dans l'ALF, sont incolores en solution avant d'être précipitées, mais après ajout d'acétone, il y a une recoloration de la poudre de particules. Cette observation va dans le sens d'une dégradation liée à une réduction des  $Fe^{III}$  dans l'ALF. L'ajout d'acétone qui induit la précipitation, s'accompagne de la réoxydation du blanc de Prusse, connu pour être instable à l'air. Les diffractogrammes ont été enregistrés entre 33 et 38°, zone dans laquelle se trouve le pic 400 de la structure CFC des BdP. Nous avons comparé les diffractogrammes obtenus pour les particules 30 nm : en fin de synthèse et après redispersion dans le SVF. Les mesures obtenues dans l'ALF et pour les particules de 4 nm n'ont pas abouti à des résultats représentatifs pouvant s'expliquer par une forte dilution des particules dans les éléments du milieu.

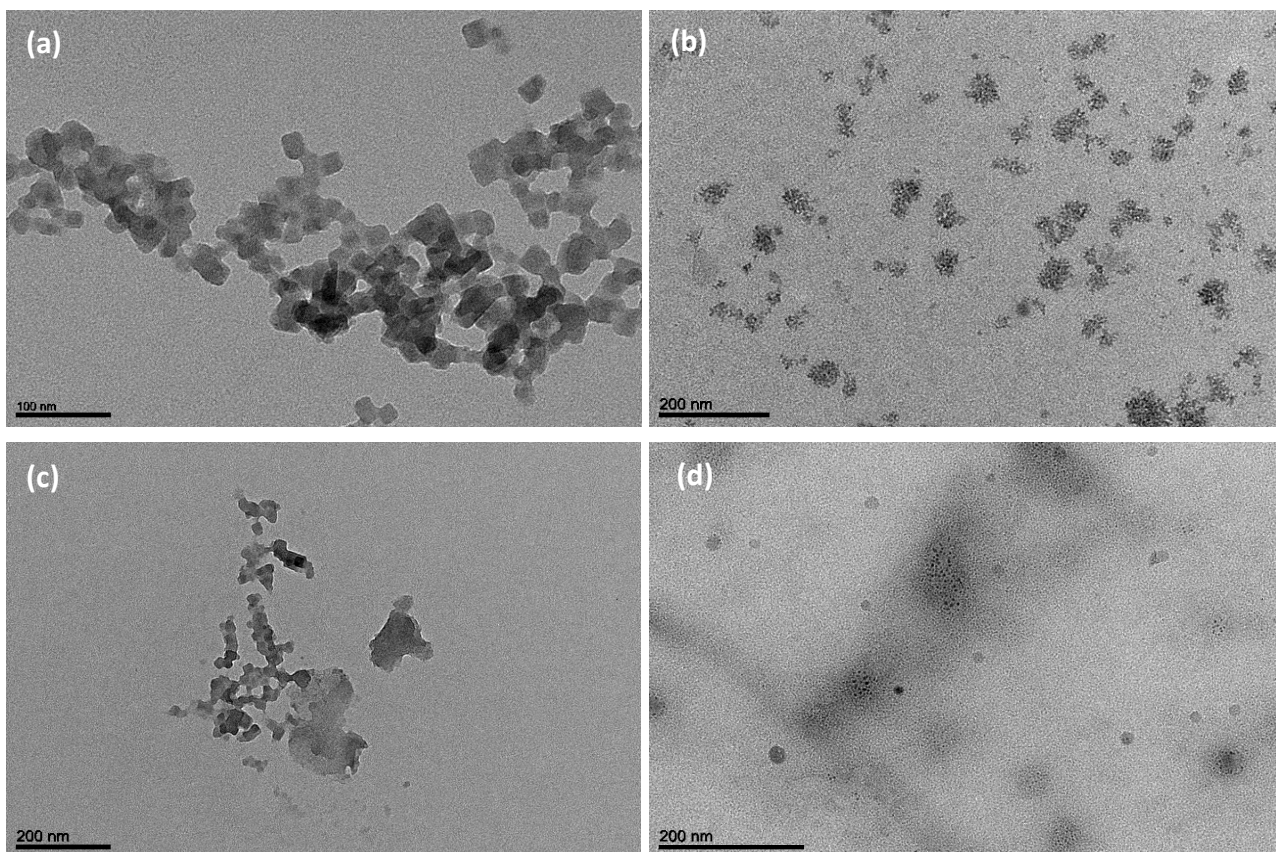


**Figure III-13.** Diffractogrammes du pic 400 des particules de 30 nm en fin de synthèse (noir), après redispersion dans le SVF (bleu)

En fin de synthèse, le pic 400 indique des domaines cristallins de l'ordre de 19,4 nm. Après redispersion dans le SVF, celui-ci correspond à des domaines de l'ordre de 18 nm. La cristallinité des particules ne semble pas altérée dans le SVF, ce qui est cohérent avec les images de microscopie (*Fig.III-14*).

Des observations par MET, dans les milieux ALF ou SVF, sont délicates à faire pour les particules de 4 nm. Leur petite taille complique leur observation. Aucune évolution notable n'est observée quand elles sont redispersées dans les milieux d'intérêt. Nous nous sommes donc intéressés aux particules de plus grandes tailles pour faire cette étude. La figure ci-dessous représente les particules de 17 nm avant et après 19h dans le SVF ainsi que les particules de 30 nm avant et après 24h dans l'ALF. Il est difficile de conclure quant à une modification de la taille des particules car d'autres entités du milieu (protéines par exemple) peuvent s'adsorber en surface des particules ce qui modifierait le contraste mais également la morphologie observée.





**Figure III-14.** Micrographies des particules de 17 nm **(a)** en fin de synthèse ; **(b)** après 19h à 37°C dans le SVF ; des particules de 30 nm **(c)** en fin de synthèse ; **(d)** après 24h à 37°C dans l'ALF

La spectroscopie infra-rouge permet de mettre en avant les liaisons présentes dans les particules. Elle peut ainsi donner accès à des informations quant aux mécanismes de dégradation des ponts  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CN-Fe}^{\text{III}}$ . Nous nous sommes focalisés sur les particules de 4 et 30 nm, dont les conditions d'obtention sont décrites ci-dessus. Les spectres présentés à la figure III-15 sont comparés aux particules sans traitement. A  $2088\text{ cm}^{-1}$  se trouve la bande de vibration asymétrique des cyanures pontants caractéristique des ponts  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CN-Fe}^{\text{III}}$  des BdP. La bande asymétrique des cyanures pontants est présente même après passage des particules dans les milieux d'intérêt, et ce quelle que soit la taille des particules, signifiant que les ponts sont toujours présents. De plus, la contribution de cyanures terminaux ( $2035\text{ cm}^{-1}$ ) évolue légèrement et apparaît plus nettement sur les spectres des particules de 4 nm après passage dans l'ALF et le SVF.

Dans l'ALF, les analyses menées vont dans le sens d'une réduction des ponts  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CN-Fe}^{\text{III}}$  qui sont ré-oxydés sous l'effet de l'acétone. Nous ne pouvons pas totalement écarter qu'une partie des citrates se chélate au  $\text{Fe}^{\text{III}}$  de surface. Dans le SVF, le résultat des analyses est identique. Les ponts  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CN-Fe}^{\text{III}}$  sont conservés ce qui n'exclut pas qu'une partie des ions  $\text{Fe}^{3+}$  de surface soit complexé. Nous ne sondons pas la totalité des espèces par spectroscopie IR puisqu'une partie peut être restée en solution, mais il se dégage de cette étude que la réduction en blanc de Prusse se produit en milieu ALF. Dans le SVF, les particules de grande taille sont peu affectées et une complexation partielle par les ions phosphate se produit sur les particules de 4 nm, induisant une diminution de l'absorbance en spectroscopie UV-visible. L'effet d'une modification de l'environnement influençant le coefficient d'extinction molaire ne peut pas être exclu.



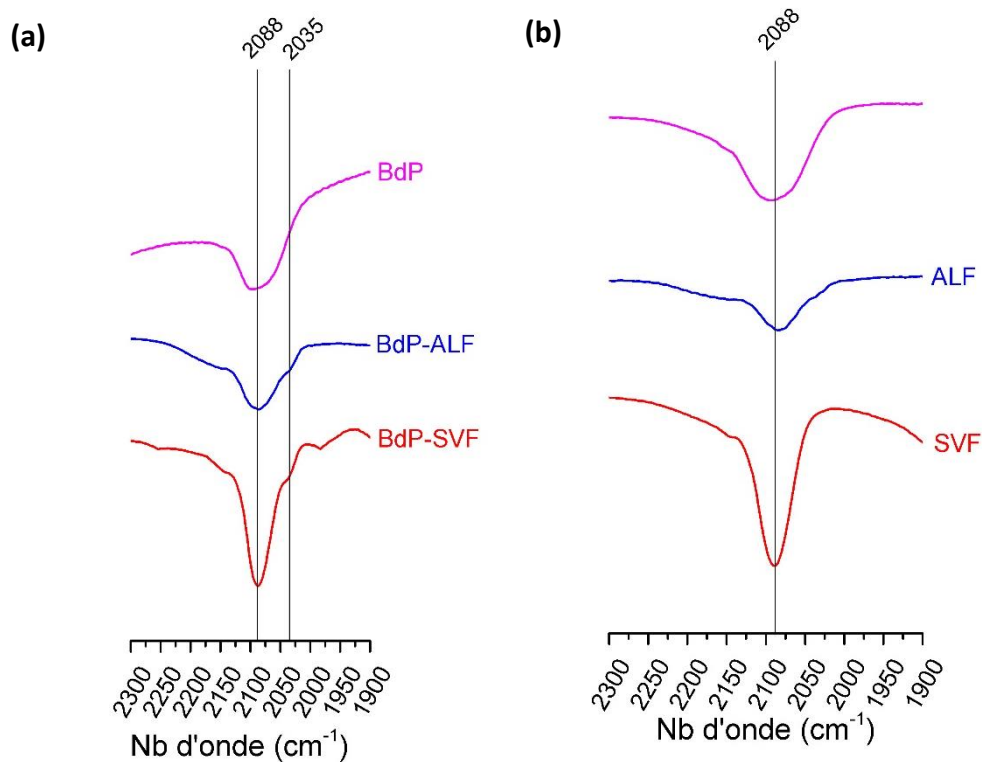


Figure III-15. Spectres IR des particules de (a) 4 nm ; (b) 30 nm après enrobage au dextran (magenta), après redispersion dans l'ALF (bleu) ou le SVF (rouge)

## II.5 Discussion

Nous avons mis en évidence des processus de dégradation des ponts  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CN-Fe}^{\text{III}}$  des bleus de Prusse dans des milieux d'intérêt pour mener à bien des expériences *in vitro* et *in vivo*. Grâce à la forte absorption dans le proche-IR à travers les cyanures pontants, nous avons pu caractériser l'évolution de cette dégradation par spectroscopie UV-visible.

Dans les milieux de culture cellulaire tel que le DMEM, la décoloration observée est la cause d'un pH basique conduisant à la formation en solution d'hydroxyde de fer (III) et de ferrocyanure. Ceci est problématique pour faire des expériences sur cellules. Néanmoins, ces expériences ne sont pas représentatives du comportement des particules dans l'organisme car l'important est de conserver une stabilité dans les milieux se rapprochant le plus possible de l'organisme humain. Pour cela, nous nous sommes intéressés à deux milieux pouvant mimer le milieu lysosomal des cellules et le milieu sanguin dans lequel les particules circuleront, l'ALF et le SVF respectivement. Les particules ne s'agrègent pas dans ces milieux, mais un phénomène de dégradation rapide, visible par une perte de la couleur bleue, a été constaté dans les deux milieux. La décoloration dans l'ALF est beaucoup plus rapide que dans le SVF. Les groupements mis en jeu dans ces processus diffèrent en fonction du milieu. En effet, l'ALF contient beaucoup de groupements citrates qui ont une forte affinité pour les ions  $\text{Fe}^{3+}$  et conduit à une réduction du BdP. Dans le SVF, la proportion importante de phosphate peut jouer le même rôle. La dégradation est liée à une attaque de la surface par des agents complexants et/ou réducteur du  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Une étude sur différentes tailles de BdP a montré que la cinétique de décoloration est dépendante de la taille des particules.

Plus la taille des particules augmente, plus le phénomène est lent, en raison d'une proportion moindre de site  $\text{Fe}^{\text{III}}$  en surface. Pour les particules de 4 nm, la dégradation est rapide laissant peu de chance à une efficacité en hyperthermie photoassistée, après internalisation. La stabilité dans l'ALF, et par extension dans le milieu lysosomal, n'est toutefois pas une condition obligatoire pour obtenir des particules efficaces. Celles-ci peuvent agir en périphérie des cellules si elles sont éliminées ensuite par le système rénal. Au contraire, la stabilité dans le SVF est indispensable pour que les particules puissent circuler jusqu'aux cellules tumorales sans être dégradées. L'utilisation de particules de taille plus importante limite ces problèmes mais l'élimination rénale paraît peu envisageable. De plus, la taille de nos objets est un avantage pour des performances exaltées en tant qu'agent de contraste pour l'IRM. La présence des ions paramagnétiques ( $\text{Gd}^{\text{III}}$  ou  $\text{Mn}^{\text{II}}$ ) en surface ne semble pas influencer la stabilité des particules

Quel que soit le milieu, la dégradation est encore trop importante et doit être limitée par une optimisation de l'enrobage de nos particules. Plusieurs pistes de modification des cœurs de 4 nm de BdP ont été envisagées :

- Elaboration d'un système de type cœur-coquille avec une coquille de  $\text{K}_k\text{Cu}^{\text{II}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$ ,
- Croissance d'une couche de silice à la surface des particules,
- Protection des  $\text{Fe}^{\text{III}}$  de surface par des groupements chélatants.

Ces stratégies seront développées dans la suite de ce chapitre.

### III. Coquille de $\text{K}_k\text{Cu}^{\text{II}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$

Afin de protéger la surface des particules de  $\text{Gd}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe} [5] @(\text{dextran})_{25}$ , nous avons envisagé de faire croître une coquille de  $\text{K}_k\text{Cu}^{\text{II}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$  autour des particules de 4 nm. Le réseau  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Fe}$  cristallise dans un réseau CFC ce qui permet une épitaxie entre ce réseau et le réseau BdP.

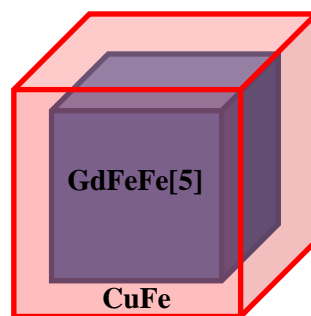


Figure III-16. Schéma des particules envisagées

Le cuivre est un élément de choix pour obtenir des objets multi-modaux avec une application en tomographie à émission de positrons (TEP). L'isotope  $^{64}\text{Cu}$  est un émetteur de positrons qui permettront sa détection. Le TEP est une technique moins résolue que l'IRM mais qui permet de détecter des anomalies métaboliques ou fonctionnelles par suivi d'un traceur radioactif. La combinaison des imageries IRM et TEP permet des diagnostics précis. Les réseaux d'ABP à base de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  ont été envisagés pour protéger la surface des cœurs BdP.

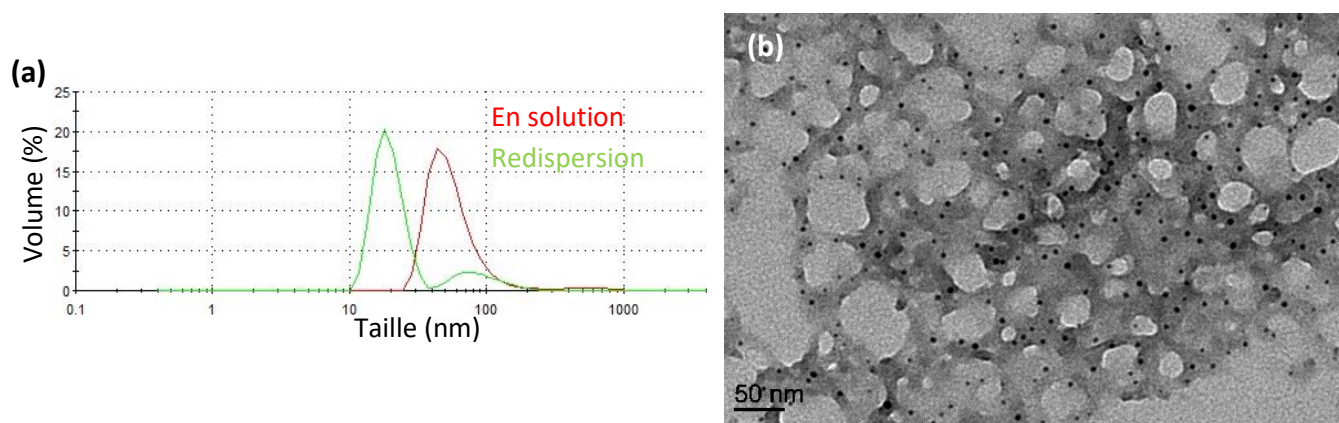
En effet, les groupements citrate et phosphate forment des complexes moins stables avec le  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (log  $K=5,9$  pour les citrates et log  $K=3,2$  pour les phosphates)<sup>8,10</sup>. De plus, la liaison  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-NC-M}$  est particulièrement stable et induit une forte constante de formation du réseau.

### III.1 Stabilité du réseau $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Fe}$

Afin de vérifier la cohérence de la stratégie envisagée, une première étude s'est portée uniquement sur le réseau  $\text{K}_2\text{Cu}^{\text{II}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$  nommé  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Fe}$ .

#### III.1.1 Synthèse et caractérisation des particules de $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Fe}$

Les particules sont synthétisées dans les mêmes conditions que les particules de BdP. Ainsi, une solution contenant un sel de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  ( $\text{CuCl}_2, \text{H}_2\text{O}$ ) à 0,5 mM est ajouté à 2°C dans une solution de  $\text{K}_4\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6$  à 0,5 mM. L'ensemble est laissé sous vive agitation pendant 30 min, puis à température ambiante pendant la même durée. Les particules sont ensuite enrobées par 25 équivalents de monomère de dextran. Les particules sont alors caractérisées afin de connaître leurs tailles. Pour cela, des mesures de diffusion dynamique de la lumière sont effectuées en fin de synthèse, et après enrobage par le dextran et redispersion dans l'eau. Les particules sont également observées par microscopie électronique en transmission.



**Figure III-17. (a)** DLS en volume des particules  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Fe}$  avant et après redispersion ; **(b)** Image MET des particules  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Fe}$  après enrobage au dextran et redispersion dans l'eau

Les mesures en DLS montrent une agrégation des particules en fin de synthèse qui semble réversible sous l'effet du dextran. Quelques agrégats sont encore présents en solution après enrobage et redispersion, mais ceux-ci sont facilement éliminables par filtration. En MET, les images montrent des particules de petites tailles bien individualisées après redispersion dans l'eau. Le tableau III-2 regroupe les tailles obtenues par les différentes techniques.

DLS (nm)		MET (nm)	
Fin de synthèse	Redispersion	Fin de synthèse	Redispersion
44	18-90	$8,7 \pm 4$	$3,1 \pm 0,8$

**Tableau III-2.** Mesures des tailles des particules  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Fe}$  obtenues par DLS et MET

Le diamètre hydrodynamique des particules est grand par rapport à nos objectifs. Mais dans le cadre de cette étude, nous souhaitons dans un premier temps, tester la stabilité de ce réseau dans les milieux ALF et SVF.

### III.1.2 Suivi de la stabilité par spectroscopie UV-visible

Le réseau Cu<sup>II</sup>Fe présente une bande d'absorption dans le visible permettant de caractériser la stabilité du réseau par spectroscopie UV-visible. Cette bande se situe vers 480 nm et a pour origine un transfert de charge (MMCT) de Cu<sup>II</sup>-NC-Fe<sup>II</sup> vers Cu<sup>I</sup>-NC-Fe<sup>III</sup>. La figure III-18 représente les spectres UV-visible obtenus pour les particules de Cu<sup>II</sup>Fe redispersées dans le SVF et l'ALF pendant 4h et conservées à 37°C.

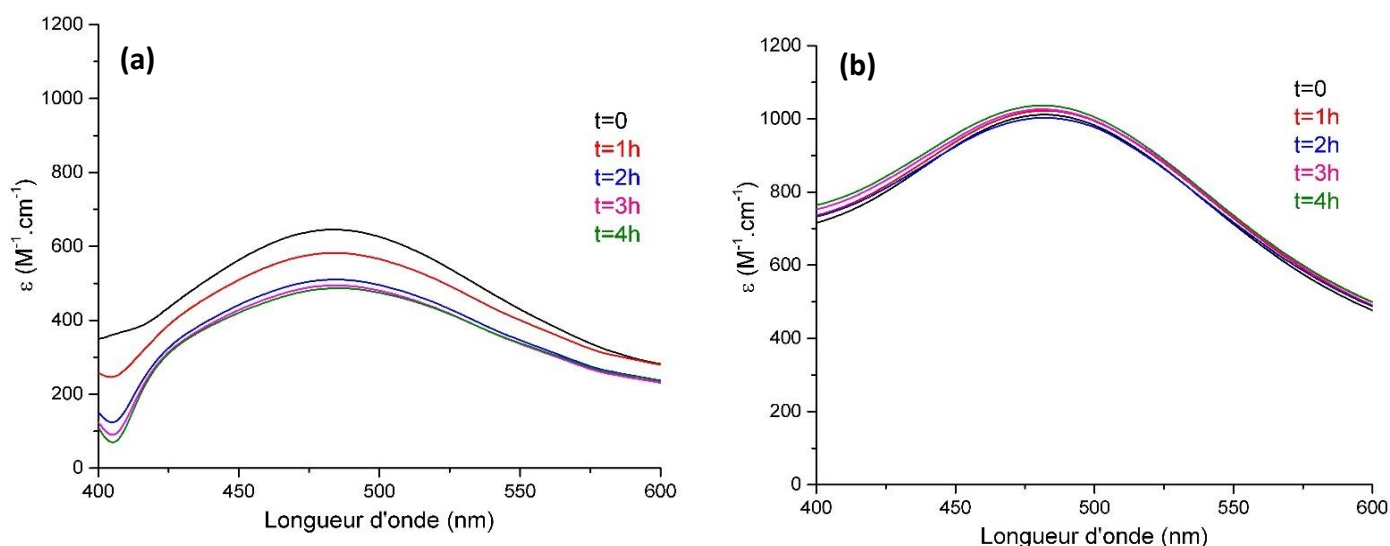


Figure III-18. Spectres UV-visible des particules de Cu<sup>II</sup>Fe enrobées de dextran et redispersées dans (a) le SVF ; (b) l'ALF

Dans l'ALF, le réseau Cu<sup>II</sup>Fe est très stable, laissant supposer une bonne protection des particules de BdP dans ce milieu. Dans le SVF, il semble y avoir une évolution rapide mais modérée qui se stabilise après 2h. Ces résultats sont très encourageants en particulier dans l'ALF et nous ont incité à utiliser ce réseau comme coquille autour de cœurs BdP.

## III.2 Croissance de la coquille Cu<sup>II</sup>Fe

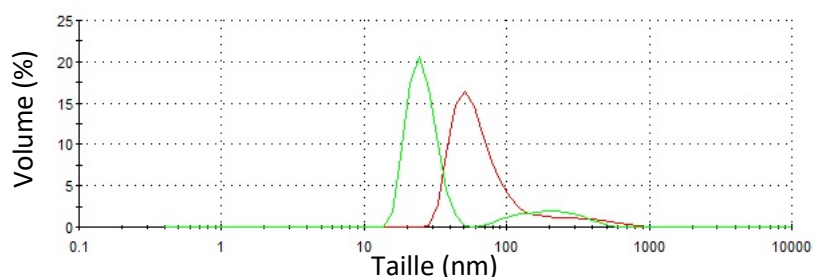
Deux stratégies de croissance de la coquille de Cu<sup>II</sup>Fe ont été envisagées : en une seule étape et en ajout goutte à goutte (séquentiel). Cette seconde stratégie ne sera pas développée dans cette partie (Annexe 13). Les résultats obtenus n'ont pas permis de mettre en avant l'intérêt de cette voie de synthèse pour les objectifs fixés.

### III.2.1 Synthèse en une étape et caractérisation des particules

La forte insolubilité du réseau BdP permet d'envisager l'obtention d'un système cœur-coquille (Fig.III-16) avec un cœur de BdP et une coquille de Cu<sup>II</sup>Fe. Dans l'hypothèse où la répartition des ions seraient statistiques, la présence du Cu<sup>II</sup> en surface favoriserait quand même un ralentissement de la dégradation.

Les particules ont été obtenues, selon un mode voisins de ceux décrits précédemment, par ajout rapide d'une solution contenant les sels de CuCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, GdCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O et Fe<sup>III</sup>(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O sur une solution de ferrocyanure. Les particules sont enrobées par 25 équivalents de monomère de dextran. Dans un premier temps, un rapport Cu<sup>II</sup>/[Fe<sup>III</sup>+Gd<sup>III</sup>] égale à 1 a été exploré mais les particules obtenues ont précipité en solution justifiant une diminution de ce rapport. Les proportions ont alors été ajustées à un ratio Cu<sup>II</sup>/[Fe<sup>III</sup>+Gd<sup>III</sup>]=0,5. Les particules seront nommées par la suite Cu<sup>II</sup><sub>0,5</sub>Gd<sup>III</sup><sub>0,025</sub>Fe<sup>III</sup><sub>0,475</sub>Fe.

L'étude par DLS en fin de synthèse et après redispersion permet de rendre compte d'un état d'agrégation qui est partiellement réversible en présence de dextran, des agrégats étant toujours détectés (Fig. III-19).



**Figure III-19.** Diamètres hydrodynamiques des particules  $\text{Cu}^{\text{II}}_{0,5}\text{Gd}^{\text{III}}_{0,025}\text{Fe}^{\text{III}}_{0,475}\text{Fe}$  obtenus par DLS en fin de synthèse (rouge), après enrobage au dextran et redispersion dans l'eau (vert)

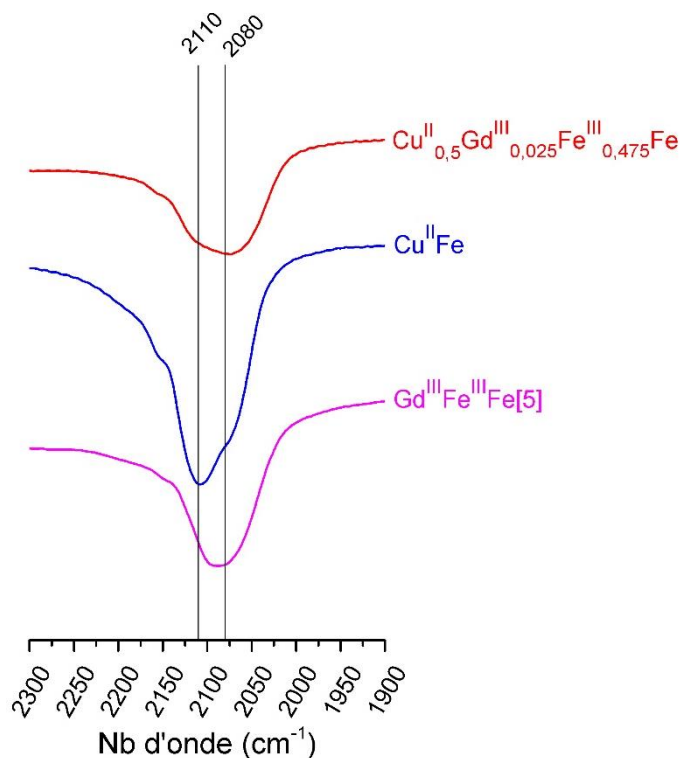
Les diamètres hydrodynamiques mesurés après redispersion dans l'eau sont supérieurs à 8 nm, ce qui peut être limitant pour envisager une élimination rénale des particules. Les observations en MET ont toutefois montré des particules de petites tailles individualisées. Les valeurs de tailles mesurées dans l'eau en fonction des techniques sont regroupées dans le tableau III-3.

DLS (nm)		MET (nm)	
Fin de synthèse	Redispersion	Fin de synthèse	Redispersion
50	24	$3 \pm 0,7$	$2,9 \pm 0,8$

**Tableau III-3.** Mesures des tailles des particules  $\text{Cu}^{\text{II}}_{0,5}\text{Gd}^{\text{III}}_{0,025}\text{Fe}^{\text{III}}_{0,475}\text{Fe}$  obtenues par DLS et MET

Par spectroscopie IR, nous avons pu mettre en avant la présence du réseau  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Fe}$  et BdP au sein des particules (Fig. III-20). En effet, les contributions des bandes de vibration asymétrique des cyanures pontant des entités  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CN-Cu}^{\text{II}}$  ( $2110 \text{ cm}^{-1}$ ) et des entités  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CN-Fe}^{\text{III}}$  ( $2080 \text{ cm}^{-1}$ ) se retrouvent sur le spectre IR des particules  $\text{Cu}^{\text{II}}_{0,5}\text{Gd}^{\text{III}}_{0,025}\text{Fe}^{\text{III}}_{0,475}\text{Fe} @(\text{dextran})_{25}$ .

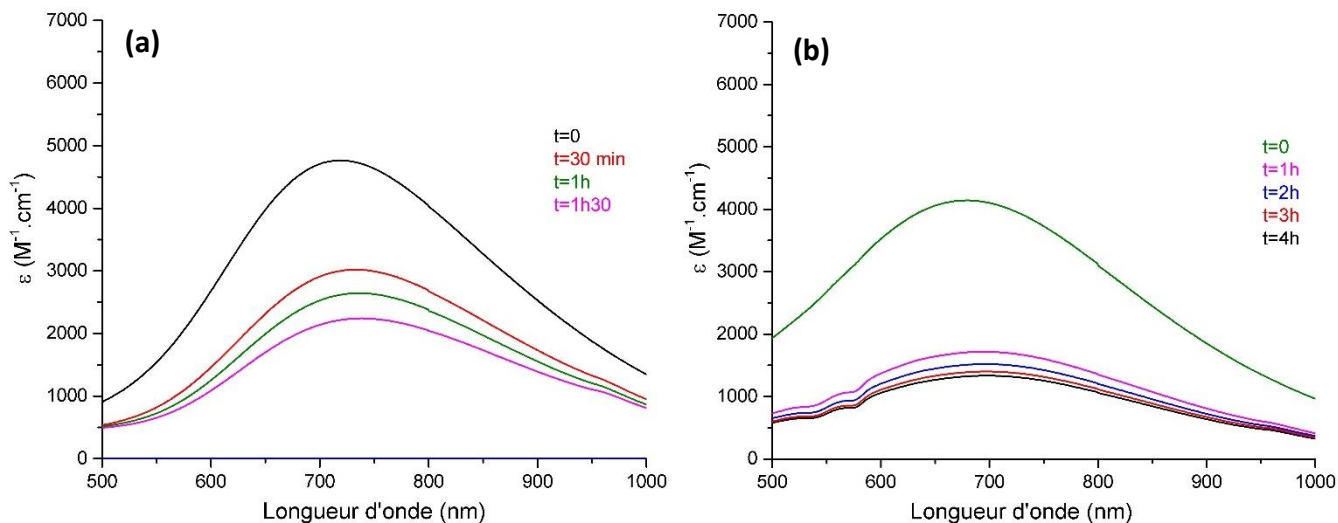
Au cours de ce travail, ces nouvelles particules n'ont pas fait l'objet d'étude structurale ni d'analyse de la composition chimique en métal par ICP-OES. Ainsi, la structure cœur-coquille des particules et la colocalisation du  $\text{Cu}^{\text{II}}$  et du  $\text{Gd}^{\text{III}}$  n'ont pas été confirmées.



**Figure III-20.** Spectre IR, entre  $2300\text{ cm}^{-1}$  et  $1900\text{ cm}^{-1}$ , des particules  $\text{Cu}^{\text{II}}_{0,5}\text{Gd}^{\text{III}}_{0,025}\text{Fe}^{\text{III}}_{0,475}\text{Fe} @(\text{dextran})_{25}$  comparé avec les spectres des particules  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Fe} @(\text{dextran})_{25}$  et  $\text{Gd}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}[5] @(\text{dextran})_{25}$

### III.2.2 Stabilité dans l'ALF et le SVF

Afin d'évaluer la stabilité des particules dans l'ALF et dans le SVF, nous avons effectué un suivi cinétique par spectroscopie UV-visible de l'évolution du coefficient d'extinction molaire de la bande MMCT des enchaînements  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NC-Fe}^{\text{II}}$ .



**Figure III-21.** Coefficient d'extinction molaire en fonction de la longueur d'onde des particules  $\text{Cu}^{\text{II}}_{0,5}\text{Gd}^{\text{III}}_{0,025}\text{Fe}^{\text{III}}_{0,475}\text{Fe}$  redispersées dans (a) l'ALF ; (b) le SVF

Le suivi a été effectué uniquement pendant 2h dans l'ALF (*Fig.III-21.(a)*) car les particules ont précipité en solution. Ainsi, la décoloration observée est liée à une agrégation progressive de celles-ci au cours du temps. Les particules précipitées sont toujours colorées signifiant une faible attaque de la surface ou non dominante. L'agrégation des particules dans le milieu lysosomal des cellules n'est pas limitante pour les applications visées.

Néanmoins, les spectres UV-visible effectués dans le SVF montrent une décoloration des particules. Une agrégation des particules est exclue durant les temps d'expérience par les mesures effectuées en DLS. Ainsi, la décoloration est plus probablement causée par une diminution de la quantité de ponts  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CN-Fe}^{\text{III}}$  liés à la complexation des  $\text{Fe}^{\text{III}}$  par les ions phosphate.

### III.3 Discussion

Dans cette partie, nous avons cherché à exploiter la stabilité du réseau  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Fe}$  dans les milieux ALF et SVF pour protéger les particules de BdP qui se décomposent dans ces milieux. La croissance d'une coquille de ce réseau autour d'un cœur de  $\text{Gd}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}[5]$  en une seule étape a donc été envisagée. Cette voie a montré des résultats encourageants dans l'ALF. En effet, une perte de couleur est observée causé par une précipitation des particules. Ainsi, les NPs pourraient s'agréger après internalisation et également agir efficacement en hyperthermie photoassistée. Le diamètre hydrodynamique ne permet pas d'envisager une élimination rénale, ce qui n'est pas bloquant à partir du moment où les particules peuvent agir au sein des cellules. En revanche, aucune amélioration de la stabilité dans le SVF n'a été constatée. Les objets ne peuvent alors pas circuler dans le système sanguin sans perte d'efficacité lors de leur acheminement vers le microenvironnement des cellules tumorales. Ainsi, la stratégie consistant à enrichir la surface de paires  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Fe}$  sur les cœurs BdP s'est avérée encourageante car la coloration persiste dans les deux milieux, après deux heures, malgré une baisse d'intensité observée. Elle n'a pas été poursuivie pour autant mais nécessiterait de mieux comprendre la baisse rapide de l'intensité puis l'effet de stabilisation dans le SVF. Nous n'avons pas mené à bien des caractérisations permettant de confirmer la structure cœur-coquille de nos particules. Une étude plus approfondie de la localisation des ions  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$  pourrait permettre de comprendre et de justifier la dégradation observée dans le sérum.

Notre intérêt s'est alors porté sur un autre type de coquille inorganique qui a déjà montré son intérêt pour des applications médicales<sup>14,15</sup> : la silice.

## IV. Croissance d'une coquille de silice

Dans l'objectif d'améliorer la stabilité des BdP dans les milieux ALF et SVF mais également de solutionner la question du relargage du  $\text{Gd}^{\text{III}}$ , une coquille de silice a été synthétisée autour d'un cœur de BdP. Ce travail a été initié au cours du stage de M<sub>2</sub> de Youven Benseghir. La présence de silice peut permettre par la suite le greffage de fonction comme des molécules de ciblage ou encore des chélates de  $\text{Gd}^{\text{III}}$ .<sup>16</sup>

### IV.1 Synthèse de la silice

Grâce au procédé sol-gel<sup>17</sup>, il est possible de contrôler la croissance d'un polymère de silice. Basé sur le protocole décrit par Rieter et al.<sup>18</sup>, nous avons travaillé à partir de particules de BdP enrobées par du PVP. Ce polymère permet la redispersion des objets dans l'éthanol absolu.



En effet, la chimie sol-gel repose sur deux étapes principales : l'hydrolyse et la condensation. Afin d'hydrolyser l'alcoxyde de silicium, la quantité d'eau introduite dans le milieu doit être parfaitement contrôlée. C'est pour cela que nous travaillons dans un milieu organique. La croissance de silice dans ces conditions est lente, l'utilisation d'un catalyseur est indispensable. Celui-ci consiste à acidifier ou basifier le milieu. Un pH basique permet d'accélérer fortement la croissance et de densifier la silice obtenue. Un pH acide catalyse également la croissance mais la cinétique est plus lente et les chaînes polymériques sont linéaires donc moins dense. Dans le cas des BdP, il n'est pas possible de travailler en milieu basique, comme expliqué précédemment dans ce chapitre.

Les particules enrobées de PVP sont redispersées dans un volume d'eau faible (2% du volume total) puis dans l'éthanol absolu. Différentes concentrations en NPs ont été explorées : 0,2 mg.mL<sup>-1</sup>, 2 mg.mL<sup>-1</sup> et 20 mg.mL<sup>-1</sup>. La solution de NPs est chauffée au bain-marie à 60°C avec un montage à reflux. Le précurseur de silice est le TEOS (TétraEthylOrthoSilicate) qui est ajouté au mélange réactionnel de manière à conserver le rapport BdP/TEOS constant soit 2 µL, 20 µL et 200 µL par mg de BdP. Le catalyseur choisi est l'acide nitrique à pH=1,6. 4% en volume sont ajoutés à la solution conduisant à un pH de 3. Le temps de chauffage a été varié allant de 4h à 24h. Les ajouts sont effectués sous agitation puis celle-ci est arrêtée pendant le chauffage. Lorsque le temps de réaction choisi est terminé, la solution est remise à température ambiante. Une partie des objets est enrobée de dextran afin de pouvoir mener les analyses sous forme de poudre. L'autre partie est concentrée par évaporation de l'éthanol à l'évaporateur rotatif et par ultrafiltration. La concentration en BdP dans ces solutions est d'environ 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>. Ainsi, les particules pourront être diluées afin d'effectuer des tests de stabilité.

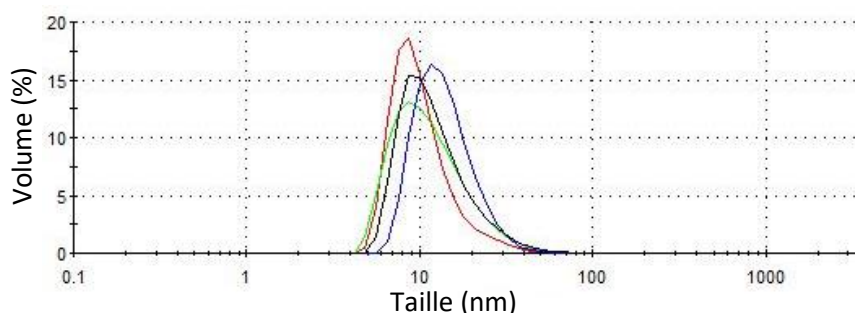
Les particules seront nommées BdP@PVP@SiO<sub>2</sub>-x avec x la valeur de concentration en NPs dans la solution de départ (x= 0,2, 2 et 20).

## IV.2 Caractérisations des systèmes

### IV.2.1 Nanoparticules BdP@PVP@SiO<sub>2</sub>-0,2

#### IV.2.1.1 Evaluation de la taille

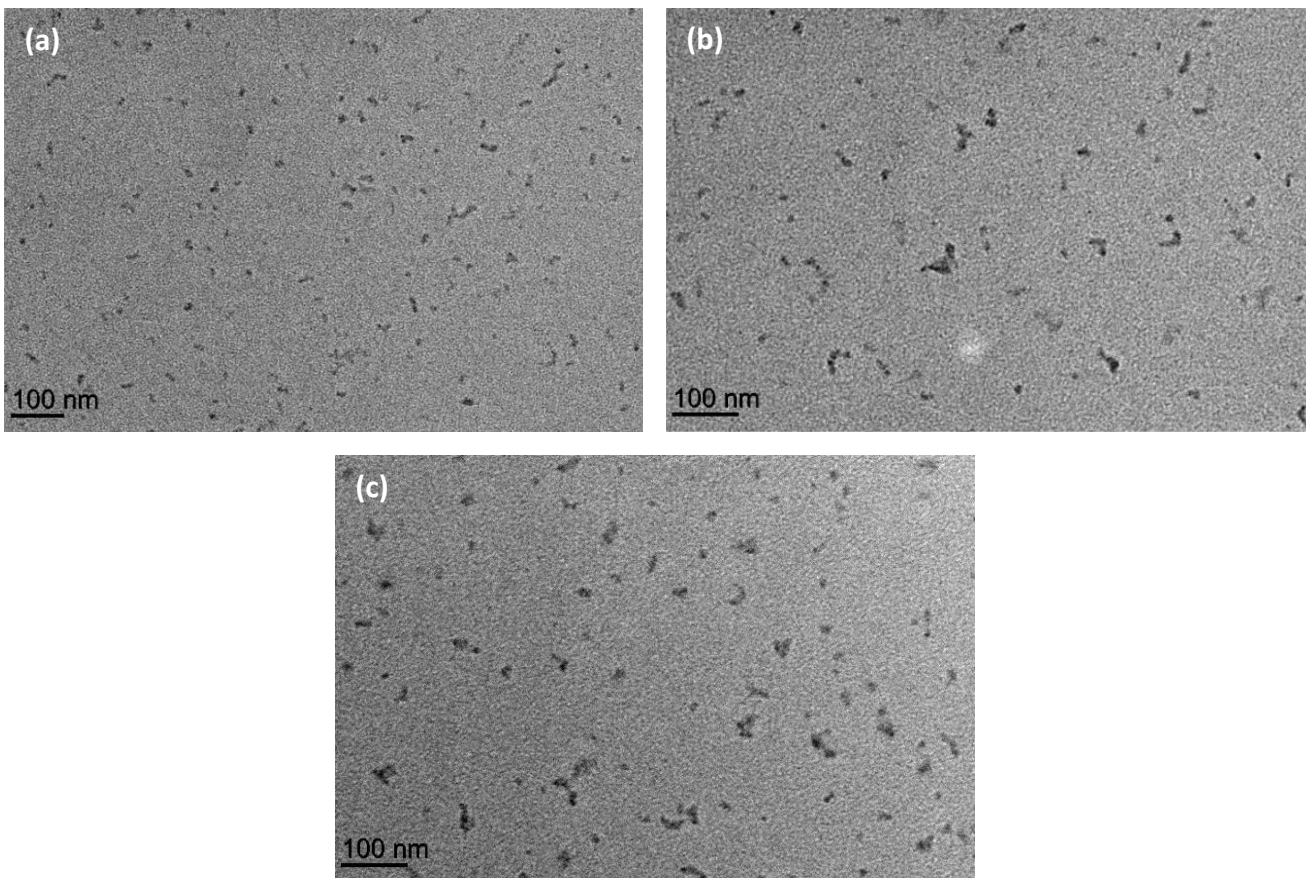
Une légère augmentation du diamètre hydrodynamique est observée pendant les 24h de chauffage mais celle-ci peut être faussée par la couleur bleue de la solution qui interfère avec le laser de l'appareil. Cette technique ne nous permet donc pas de confirmer la croissance d'une coquille autour des cœurs de BdP. Les diamètres mesurés par DLS sont compris entre 8 et 11 nm.



**Figure III-22.** Distributions en volume des diamètres hydrodynamiques des particules BdP@PVP@SiO<sub>2</sub>-0,2 mesurées par DLS à t=0 (rouge), t=4h (vert), t=6h (bleu) et t=24h (noir)



Les objets ont été observés en MET après 4h, 6h et 24h de chauffage. Les images sont présentées sur la figure III-23. Avant croissance de la coquille de silice, les particules enrobées de PVP redispersées dans l'éthanol ont une taille de  $3,8 \pm 1,9$  nm.



**Figure III-23.** Images MET des particules  $\text{BdP@PVP@SiO}_2-0,2$  après (a) 4h ; (b) 6h et (c) 24h de croissance

La détermination des tailles à partir des images MET montre une augmentation de la taille des objets mais les mesures sont peu précises. Les tailles des particules après 4h, 6h et 24h de chauffage sont de  $12,3 \pm 3$  nm ;  $15,5 \pm 4$  nm et  $16,2 \pm 6$  nm, respectivement. Les valeurs d'écart-type augmentent avec le temps de réaction montrant une grande dispersité en taille lié également à la formation de petits agrégats. L'aspect clairement différent et l'absence d'un tapis de petites particules contrastées va dans le sens de la formation de cœur-coquilles (sans pour autant être une preuve).

#### IV.2.1.2 Composition chimique

Les spectres IR mesurés sont présentés sur la figure III-24.

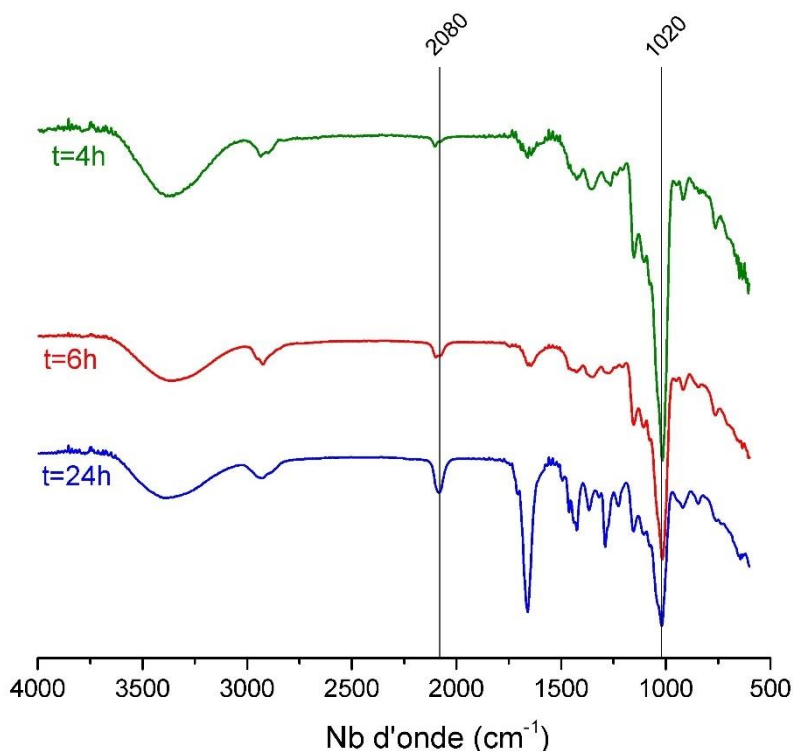


Figure III-24. Spectres IR des particules BdP@PVP@SiO<sub>2</sub>-0,2 après 4h, 6h et 24h de croissance

Deux bandes ont particulièrement attiré notre attention. A 2080 cm<sup>-1</sup>, la bande caractéristique de la vibration asymétrique des cyanures pontants atteste de la présence des cœurs BdP. De la même manière, une bande large située autour de 1020 cm<sup>-1</sup> confirme l'existence de liaisons Si-O-Si<sup>14,19</sup> indiquant une polymérisation du TEOS. Des mesures par EDS permettant de déduire un rapport Si/Fe et ainsi, de quantifier la silice ayant réagi par rapport à la quantité de précurseur engagée.

Temps de réaction	Ratio Si/Fe
4h	1,0
6h	0,6
24h	0,7

Tableau III-4. Rapports atomique Si/Fe mesurés par EDS pour les particules BdP@PVP@SiO<sub>2</sub>-0,2 après 4h, 6h et 24h de chauffage

Les ratios élémentaires sont proches quel que soit le temps de réaction. Ce constat va dans le sens que la condensation de la silice évolue peu au cours du temps dans ces conditions de synthèse, ce qui est en accord avec les observations MET. Le volume de TEOS engagé dans la synthèse correspond à 240 équivalents pour un équivalent de Fe. Malgré l'excès de TEOS, l'EDS montre que peu de précurseur a réagi. Afin d'optimiser la croissance de la coquille de silice, la proportion d'eau a été variée. Les expériences menées en ce sens n'ont pas été concluantes. Un autre paramètre a été varié : la concentration en BdP de la solution. Pour conserver un ratio BdP/TEOS constant, la proportion en TEOS ajouté a été modifiée en conséquence. Les résultats sont détaillés ci-dessous.

#### IV.2.2 Nanoparticules BdP@PVP@SiO<sub>2</sub>-2 et BdP@PVP@SiO<sub>2</sub>-20

Ces nouvelles synthèses ont été effectuées en solubilisant les poudres de BdP@PVP dans l'eau puis l'éthanol absolu à une concentration de 2 mg.mL<sup>-1</sup> et de 20 mg.mL<sup>-1</sup>. Le TEOS ajouté est alors de 20 µL et 200µL par mg de particules, respectivement. Les autres paramètres ne sont pas modifiés et le temps de chauffage est fixé à 4h.

##### IV.2.2.1 Caractérisation de taille

Après 4h de chauffage, les solutions sont analysées par DLS. Comme précédemment, l'évolution de taille par rapport aux systèmes avant réaction est moindre et peut être expliqué par des imprécisions.

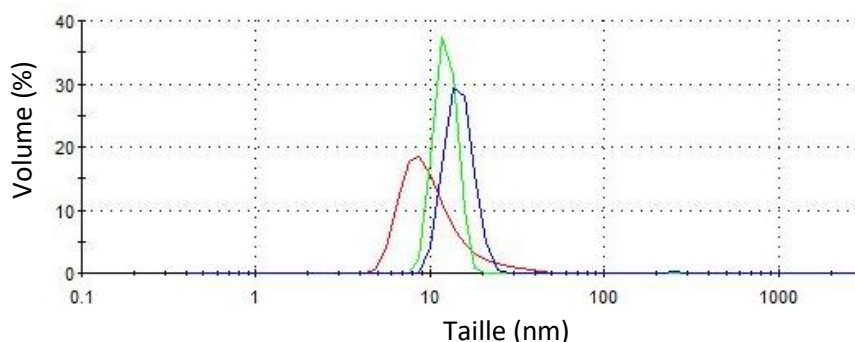


Figure III-25. Mesures des diamètres hydrodynamiques par DLS des particules BdP@PVP (rouge), BdP@PVP@SiO<sub>2</sub>-2 (vert) et BdP@PVP@SiO<sub>2</sub>-20 (noir)

Les diamètres mesurés sont de l'ordre de 11 nm, après croissance. D'après ces analyses, il n'y a pas d'évolution en taille très importante liée à la croissance d'une coquille de silice autour des cœurs de BdP.

Les observations par MET de ces systèmes sont rendues difficile par la présence de PVP et de silice qui donne peu de contraste. Ainsi, la détermination des tailles à partir des images obtenues (Fig.III-26) conduit à une erreur plus importante. Les tailles mesurées sont de  $15 \pm 4$  nm et  $16 \pm 5$  nm pour les systèmes BdP@PVP@SiO<sub>2</sub>-2 et BdP@PVP-SiO<sub>2</sub>-20 respectivement. L'augmentation de la concentration en BdP ne conduit pas à une augmentation de tailles des systèmes après la croissance de silice.

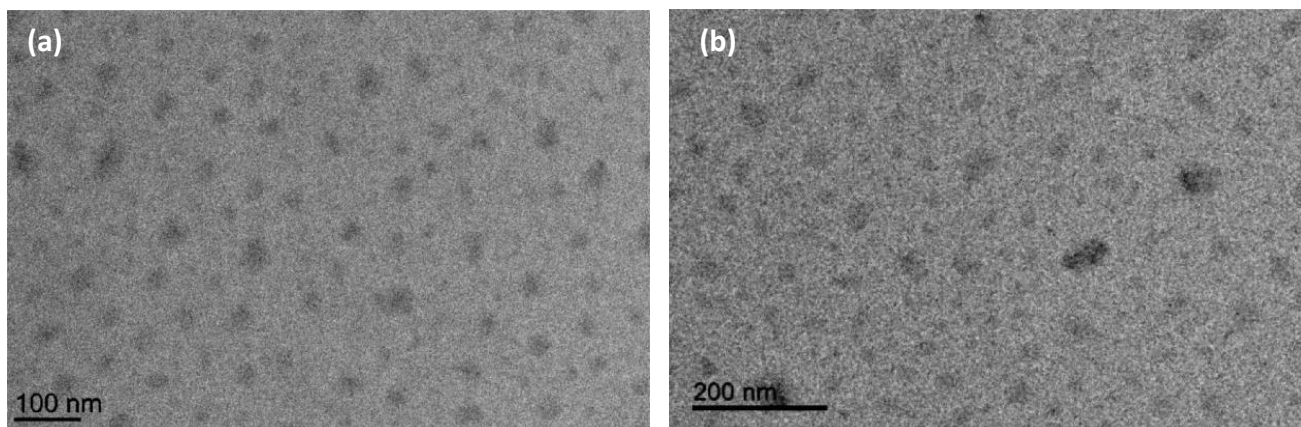


Figure III-26. Micrographie des NPs (a) BdP@PVP@SiO<sub>2</sub>-2 ; (b) BdP@PVP@SiO<sub>2</sub>-20

Une croissance de silice en l'absence de particules de BdP a été effectuée montrant des objets polydispersés et de grandes tailles. Ceci suggère un meilleur contrôle en taille lié à la présence des NPs de BdP.

#### IV.2.2.2 Caractérisation chimique

Les poudres obtenues après enrobage au dextran ont été analysées par spectroscopie IR et par EDS.

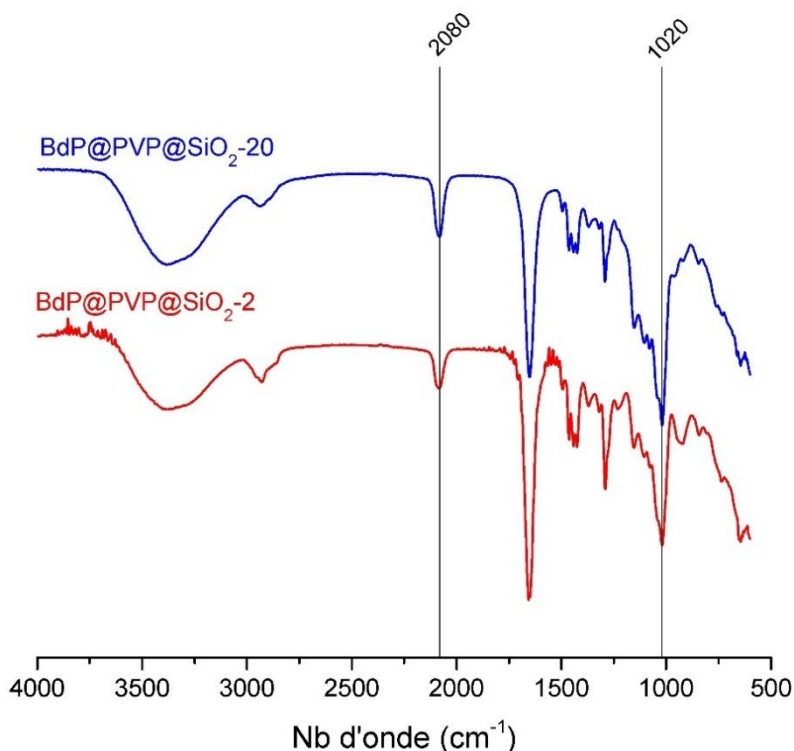


Figure III-27. Spectres IR des particules BdP@PVP@SiO<sub>2</sub>-2 et BdP@PVP@SiO<sub>2</sub>-20

Les spectres IR mettent en avant la présence des ponts cyanure, Fe<sup>II</sup>-CN-Fe<sup>III</sup>, par une bande à 2080 cm<sup>-1</sup> ainsi que les liaisons Si-O-Si de la silice à 1020 cm<sup>-1</sup>. Des analyses par EDS ont été effectuées permettant de connaître le rapport Si/Fe.

Echantillons	Ratio Si/Fe
<b>BdP@PVP@SiO<sub>2</sub>-0,2</b>	1,0
<b>BdP@PVP@SiO<sub>2</sub>-2</b>	2,7
<b>BdP@PVP@SiO<sub>2</sub>-20</b>	10,2

Tableau III-5. Mesures par EDS des rapports atomiques Si/Fe

Les résultats présentés dans le tableau III-5 montrent l'augmentation du taux de Si avec l'augmentation de la concentration. Nous avons donc réussi à faire varier le taux de Si condensé en faisant varier la concentration en BdP dans la solution initiale. Cependant, nous n'avons pas pu déterminer la taille de la coquille de silice synthétisée.

Bien que les images de MET semblent montrer la présence des NPs de BdP au cœur de la silice, ceci n'a pas été prouvé au cours de ce travail. Il est ainsi difficile d'exclure la présence de particules constituées uniquement de silice. Des études par STEM-EELS seront menées dans le but de montrer la co-localisation du fer et de la silice.

### IV.3 Stabilité dans les milieux physiologiques

Nous avons étudié la stabilité des particules  $\text{BdP@PVP@SiO}_2\text{-0,2}$  et  $\text{BdP@PVP@SiO}_2\text{-20}$  dans les milieux SVF et ALF.

#### IV.3.1 Dans l'ALF

Le suivi dans le temps par spectroscopie UV-visible de la transition MMCT des BdP montre une dégradation des ponts  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CN-Fe}^{\text{III}}$  malgré la présence de silice. De plus, la quantité de silice ne semble pas influencer la cinétique de dégradation. En 30 min, les particules sont entièrement dégradées comme pour les particules enrobées uniquement de dextran. Ceci peut s'expliquer par la faible densité de la silice. En effet, en travaillant en condition acide, la formation d'un réseau peu ramifié est favorisée donnant lieu à une porosité plus importante.

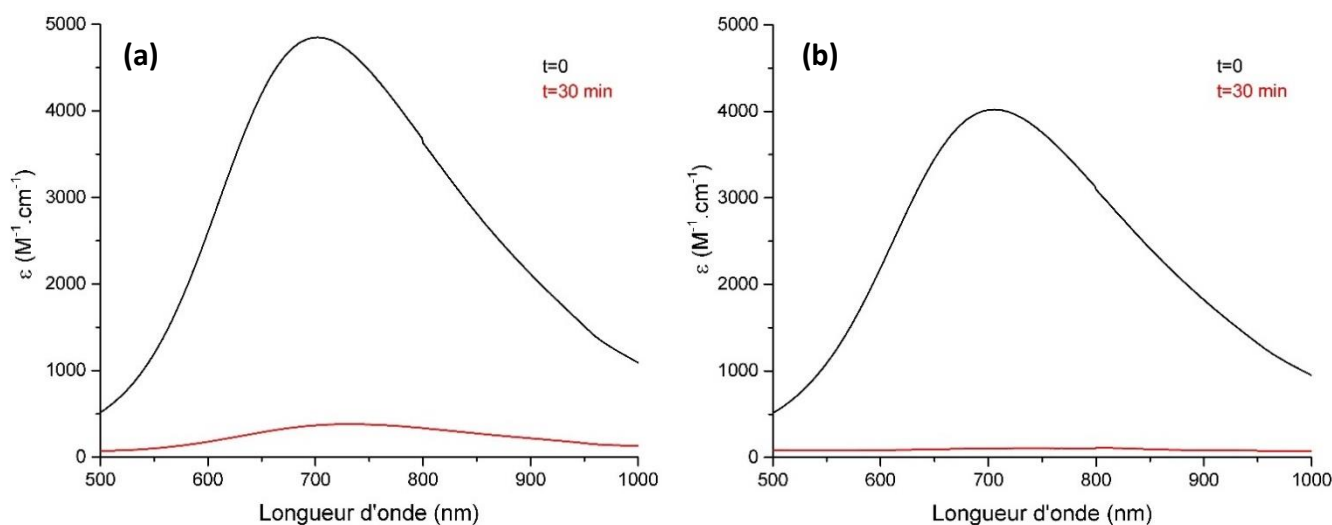


Figure III-28. Spectres UV-visible des particules (a)  $\text{BdP@PVP@SiO}_2\text{-0,2}$  et (b)  $\text{BdP@PVP@SiO}_2\text{-20}$  redispersées dans l'ALF

#### IV.3.2 Dans le SVF

Les mêmes expériences sont effectuées dans le SVF dans les mêmes conditions de température et de concentration. Les spectres sont présentés à la figure III-29.

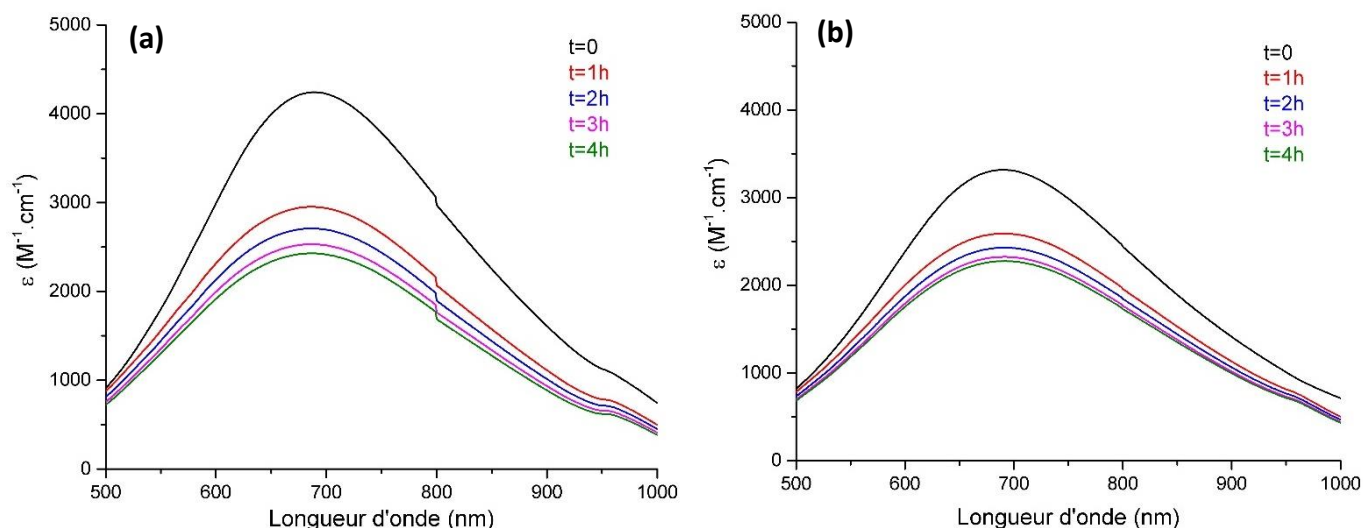


Figure III-29. Spectres UV-visible des particules (a) BdP@PVP@SiO<sub>2</sub>-0,2 et (b) BdP@PVP@SiO<sub>2</sub>-20 redispersées dans le SVF

L'évolution des ponts Fe<sup>II</sup>-CN-Fe<sup>III</sup> est présente quelle que soit la quantité de silice entourant les particules. La différence de coefficient d'extinction à t=0 peut s'expliquer par des imprécisions sur la concentration en BdP liées aux étapes d'évaporation de l'éthanol et d'ultrafiltration. Afin de comparer les systèmes entre eux, les valeurs d'absorbance maximale sont normalisées par rapport aux valeurs d'absorbance maximale mesurées à t=0.

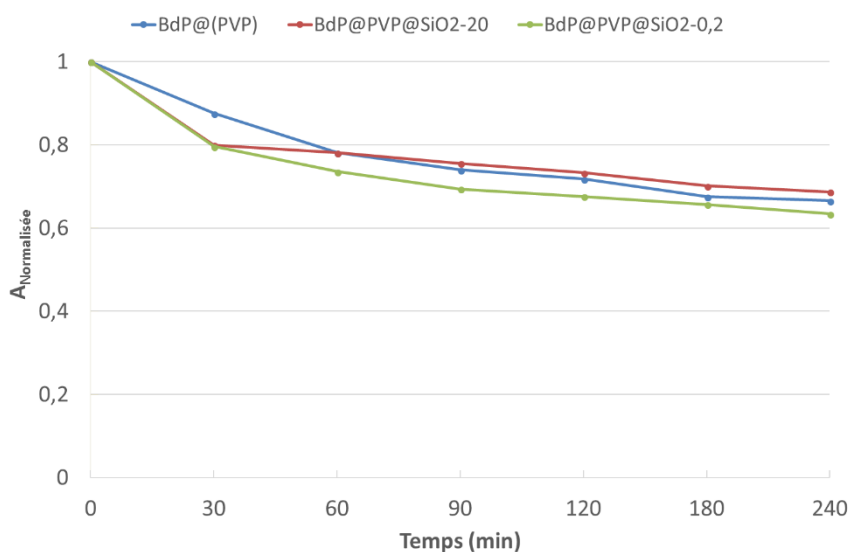


Figure III-30. Comparaison de la stabilité dans le SVF par représentation de l'absorbance maximale normalisée en fonction du temps pour les particules BdP@(PVP), BdP@PVP@SiO<sub>2</sub>-0,2 et BdP@PVP@SiO<sub>2</sub>-20

Sachant que nous avons vu précédemment que le PVP seul ne permettait pas de protéger efficacement les BdP de la dégradation partielle, cette représentation permet de mettre en avant que la silice n'a pas d'effet significatif sur la stabilité. Comme dans le cas de l'ALF, la densité de la silice devra être améliorée afin de mieux protéger la surface des BdP. Pour cela, une modification du précurseur de Si est envisagée. Le TMOS (TétraMéthylOrthoSilicate) est un candidat potentiel car il est plus réactif que le TEOS. La catalyse basique n'est pas envisageable dans notre cas mais se placer à un pH plus élevé peut être une stratégie alternative.



## IV.4 Conclusion

Nous avons pu condenser de la silice par un procédé sol-gel autour de particules de BdP. Dans ce type de chimie, de nombreux paramètres rentrent en jeu pour optimiser la condensation. Nous avons principalement travaillé sur les concentrations en BdP et en TEOS. Des expériences complémentaires pourront être menées afin d'évaluer l'influence du pH, du temps et de la température de chauffage. La nature du solvant et du précurseur de Si devront aussi être variées. Bien que de nombreux points restent à améliorer, la présence d'une coquille de silice peut permettre la fonctionnalisation de nos particules par des entités variées (fluorophore, molécules de ciblage etc). Afin de renforcer le rôle de protection, une silice plus dense devra être synthétisée. Par la suite, le greffage de complexe de Gd<sup>III</sup> à la surface de la silice est envisagé pour créer des objets actifs en IRM à la manière des particules développées par NHTherAguix®.

## V. Fonctionnalisation de surface des NPs

Dans le but de protéger les sites Fe<sup>III</sup> en surface des particules Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe[5] enrobées de dextran, une stratégie développée a été d'utiliser une quantité contrôlée d'ions citrate. En effet, le citrate ayant une affinité importante pour l'ion Fe<sup>3+</sup>, il pourrait permettre de protéger les sites de surface. En empêchant l'accès aux ions de surface, les sites de cœur seront également protégés et l'intégrité de la particule serait conservée. C'est avec cet objectif que nous avons développé ces nouveaux composés.

### V.1 Synthèse des particules

La quantité de citrate nécessaire pour avoir une protection optimale de la surface a été déterminé par le calcul, en employant un ratio d'une molécule de citrate par ion Fe<sup>3+</sup> se situant à la surface des particules. La proportion de Fe<sup>III</sup> en surface a été déterminée.

#### V.1.1 Calcul de la quantité de Fe<sup>III</sup> de surface

Pour cela, les mêmes calculs que ceux décrits dans la partie IV du chapitre II ont été effectués. Les résultats de ces calculs sont explicités dans le tableau III-6.

N <sub>T</sub>	N <sub>S</sub>	N <sub>S</sub> <sup>GdIII</sup>	% de la surface en Gd <sup>III</sup>	% de la surface en Fe <sup>III</sup>	N <sub>S</sub> <sup>FeIII</sup>	N <sub>T</sub> <sup>FeIII</sup>	% de Fe <sup>III</sup> en surface
365	194	18	9	91	176	347	51

Tableau III-6. Calcul du pourcentage de Fe<sup>III</sup> en surface

Ce calcul nous montre que 50% des ions Fe<sup>3+</sup> se situent en surface. Ainsi, expérimentalement, il faut 0,5 équivalent de citrate par rapport au Fe<sup>III</sup> pour que tous les sites de surface soient chélatés.

#### V.1.2 Description de la synthèse

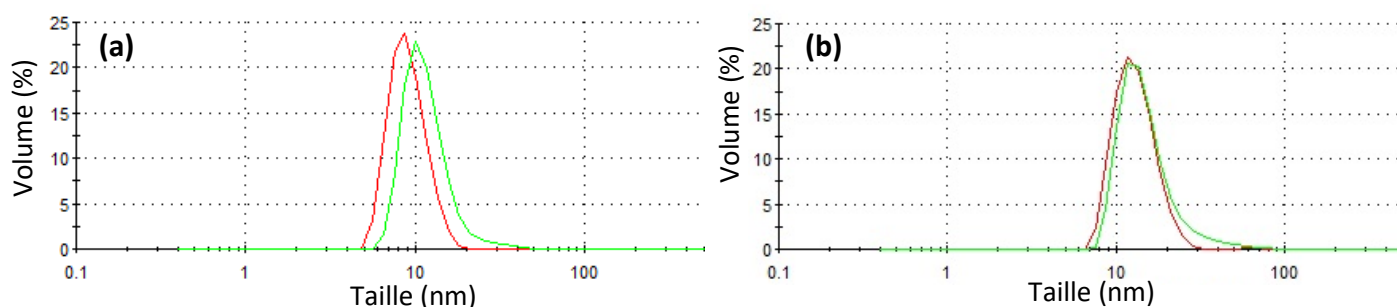
Les NPs sont synthétisées en préparant une solution aqueuse contenant les précurseurs de Gd<sup>III</sup> et Fe<sup>III</sup> à 0,5 mM et 0,25 mM de citrate de sodium dihydraté. Une solution contenant 0,5 mM de ferrocyanure et 0,25 mM de citrate de sodium dihydraté dans l'eau est également préparée. La suite de la synthèse est identique à celle décrite dans l'annexe 1. Après synthèse, les particules sont enrobées par 25 équivalents de monomère de dextran. Les poudres sont obtenues par le même procédé (ajout d'acétone, centrifugation et séchage sous vide).

Les particules obtenues sont de type  $K_{0,6}Gd^{III}_{0,05}Fe^{III}_{0,95}[Fe^{II}(CN)_6]_{0,9}(C_6H_5O_7)_{0,5}@(\text{dextran})_{25}$ . Elles seront abrégées  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]_{0,5}(\text{citrate})_{0,5}@(\text{dextran})_{25}$ .

## V.2 Caractérisation des particules

### V.2.1 Caractérisations de taille et structurale

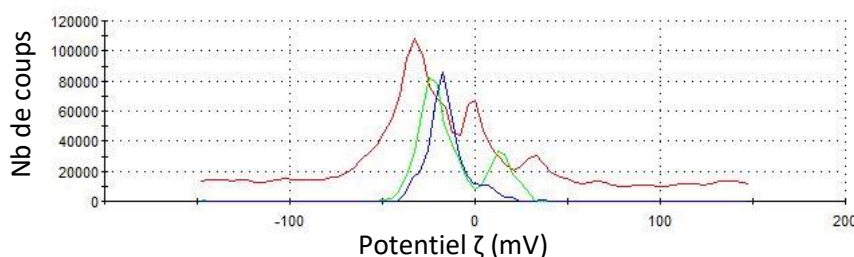
Les mesures de DLS sont faites en fin de synthèse puis après ajout du dextran et redispersion dans l'eau.



**Figure III-31.** Distribution en volume des tailles (a) des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]_{0,5}(\text{citrate})_{0,5}$  en fin de synthèse (rouge) ; après enrobage par le dextran et redispersion dans l'eau (vert) ; (b) des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]_{0,5}(\text{citrate})_{0,5}@(\text{dextran})_{25}$  à  $t=0$  (rouge) et  $t=24\text{h}$  (vert)

La présence du citrate n'entraîne pas d'augmentation de la taille des particules. Une légère augmentation du diamètre hydrodynamique est observée après redispersion dans l'eau. Ceci s'explique par la présence des chaînes dextran. Le diamètre hydrodynamique est alors de 10 nm. Une étude dans le temps démontre la bonne stabilité des particules en solution aqueuse.

Le potentiel  $\zeta$  des particules a également été mesuré aux différents stades de la synthèse (Fig.III-32). Une évolution est observée. Les particules nues présentent un potentiel  $\zeta$  avec une composante majoritairement négative. En présence de citrate, la composante dominante demeure négative (avec une composante positive dont l'origine est mal comprise) tandis que la redispersion entraîne une seule composante négative un peu plus faible, ce qui est souhaitable pour limiter le risque d'agrégation en milieu physiologique.



**Figure III-32.** Potentiel  $\zeta$  des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]$  (rouge) ;  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]_{0,5}(\text{citrate})_{0,5}$  (vert) ;  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]_{0,5}(\text{citrate})_{0,5}@(\text{dextran})_{25}$  (bleu)

Les tailles des particules ont également été déterminées par MET. Les images sont présentées à la figure III-33. Les particules sont de petites tailles et bien individualisées. L'évaporation sur grille de l'échantillon semble induire la formation de domaines plus grands. La DLS semble indiquer une taille légèrement supérieure et compatible avec ces tailles. La présence de ces assemblages de NPs sera vérifiée prochainement en modifiant les conditions de dépôt sur grille.



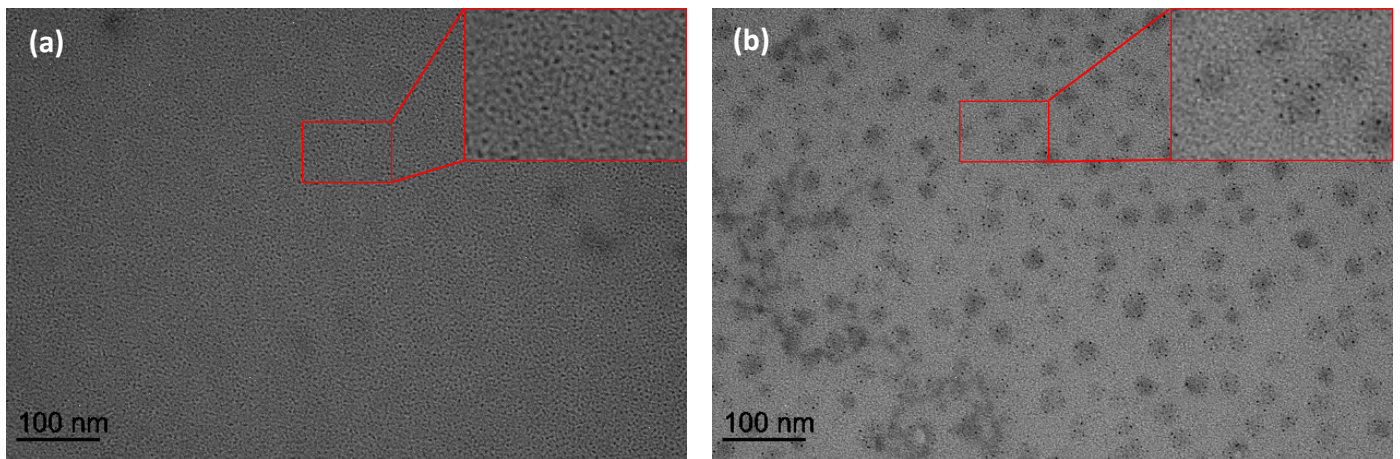


Figure III-33. Images MET des particules (a)  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5](citrate)_{0,5}$ ; (b)  $GdFeFe[5],(citrate)_{0,5}@(dextran)_{25}$

Les particules ont fait l'objet d'une caractérisation structurale par DRX sur poudre qui confirme le réseau CFC dans lequel les particules cristallisent.

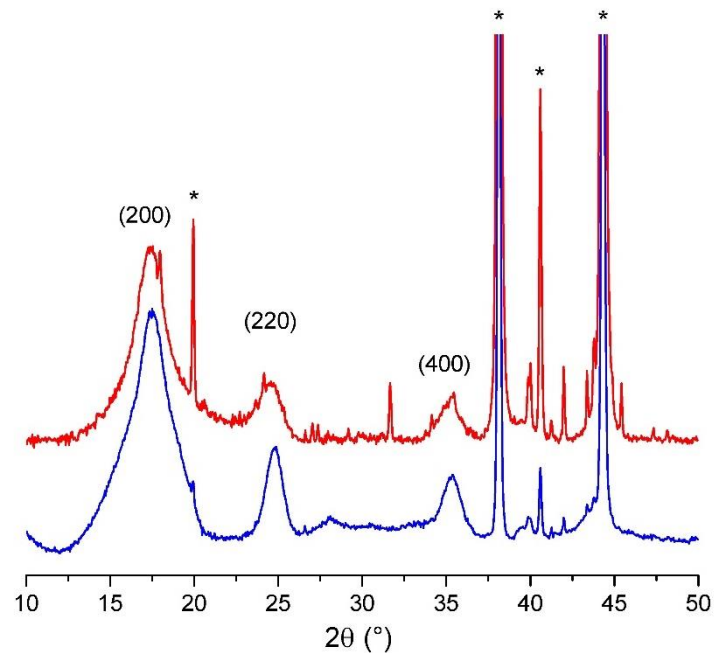


Figure III-34. Diffractogrammes des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5],(citrate)_{0,5}@(dextran)_{25}$  (bleu) et  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]@(dextran)_{25}$  (rouge) (\*porte échantillon ; entre parenthèse : pic de la structure CFC)

Comme attendu, la présence de citrate n'engendre aucun changement structural, comme le montre la figure III-34. Le paramètre de maille calculé (10,15 Å) (Annexe 6) est en accord avec celui du réseau BdP et identique aux particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]@(dextran)_{25}$ . La taille des domaines cristallins déduites est de 7 nm, toujours supérieure à la taille mesurée par MET.

Le tableau III-7 regroupe les valeurs de potentiel  $\zeta$  et de tailles obtenues par les différentes méthodes.

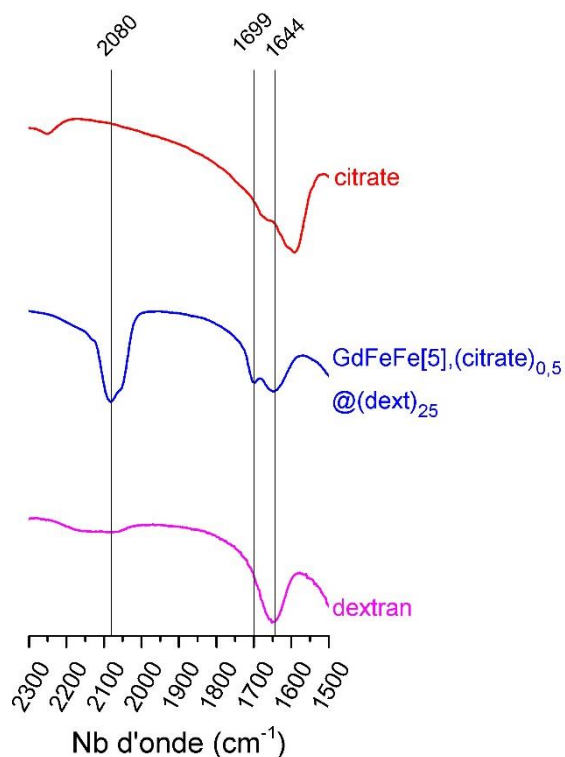
Particules	DLS (nm)	MET (nm)	DRX (nm)	Potentiel $\zeta$ (mV)
Gd <sup>III</sup> Fe <sup>III</sup> Fe[5],(citrate) <sub>0,5</sub>	9	2,7±0,6		-25 ;12
Gd <sup>III</sup> Fe <sup>III</sup> Fe [5],(citrate) <sub>0,5</sub> @(dext) <sub>25</sub>	10	2,2±0,5	7	-17

**Tableau III-7.** Potentiel  $\zeta$  et tailles obtenues pour les particules nues et les particules enrobées de dextran mesurées par DLS et MET

Les tailles des particules déduites sont en accord avec celles obtenues pour les particules sans citrate.

### V.2.2 Caractérisation chimique

Les particules de Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe[5],(citrate)<sub>0,5</sub>@(dextran)<sub>25</sub> ont été caractérisées chimiquement afin de connaître leur composition en métal et en matière organique. Elles ont fait l'objet, dans un premier temps, d'une étude en spectroscopie infra-rouge. Celle-ci a permis de confirmer la présence de citrate dans les composés ainsi que l'accrochage des chaînes dextran.



**Figure III-35.** Spectres IR des particules Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5],(citrate)<sub>0,5</sub>@(dextran)<sub>25</sub>, du dextran et du citrate entre 2300-1500 cm<sup>-1</sup>

La bande de vibration asymétrique des cyanures pontants est présente sur le spectre IR des particules à 2080 cm<sup>-1</sup>. A 1699 cm<sup>-1</sup> se trouve la bande d'élongation des doubles liaisons CO des groupements carbonyle des citrates. Cette bande est décalée par rapport à celle du citrate seul lié à l'interaction avec les particules ce qui est aussi constaté pour les particules de BdP de Shokouhimehr et al.<sup>20</sup> synthétisées en présence de citrate. Le dextran possède également une bande caractéristique à 1644 cm<sup>-1</sup> qui se retrouve sur le spectre des particules montrant bien la présence de celui-ci dans la composition des objets.

Par la suite, en plus d'une étude EDS préliminaire, une campagne d'ICP-OES a été menée afin d'obtenir une composition chimique précise. Deux échantillons de compositions 5% et 10% en Gd<sup>III</sup> ont été analysés. Le nombre de groupement citrate et de chaînes dextran a été déterminé par analyse élémentaire. Les résultats sont présentés dans le tableau III-8.

Taux de Gd <sup>III</sup>	Unité formulaireire
[5]	$K_{0,60}Gd^{III}_{0,01}Fe^{III}_{0,99}[Fe^{II}(CN)_6]_{0,90},(citrate)_{1},(Dextran)_{24},(H_2O)_{31}$
[10]	$K_{0,60}Gd^{III}_{0,02}Fe^{III}_{0,98}[Fe^{II}(CN)_6]_{0,90},(citrate)_{0,5},(Dextran)_{39},(H_2O)_{46}$

Tableau III-8. Unités formulaireires déterminées par ICP-OES et AE

L'ICP-OES a mis en évidence le faible taux de Gd<sup>III</sup> présent dans les particules, 1 à 2%, et ce quelle que soit la quantité de Gd<sup>III</sup> initialement introduite. Afin de confirmer ces résultats, un dosage au xylénol orange a été réalisé sur les surnageants obtenus après l'étape de centrifugation. Le dosage du Gd<sup>III</sup> dans les surnageants a montré que la majorité de la quantité de Gd<sup>III</sup> introduit dans la synthèse se trouve dans ceux-ci (Annexe 8). Ceci s'explique par la forte stabilité des complexes Fe<sup>III</sup>-citrate. En effet, les groupements citrates peuvent se substituer aux entités Gd<sup>III</sup>Fe se trouvant en surface des particules. Le faible taux de Gd<sup>III</sup> contenu dans les particules est problématique pour des performances optimales en relaxivité.

### V.3 Stabilité dans les milieux cellulaire et sanguins

Des expériences de redispersions dans l'ALF et le SVF des particules Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe[5],(citrate)<sub>0,5</sub>@(dextran)<sub>25</sub> ont été menées. La stabilité a ensuite été vérifiée par spectroscopie UV-visible du transfert MMCT à travers le pont cyanure.

#### V.3.1 Dans l'ALF

La première étape de l'évaluation de la stabilité des particules consiste à suivre l'évolution du diamètre hydrodynamique par DLS.

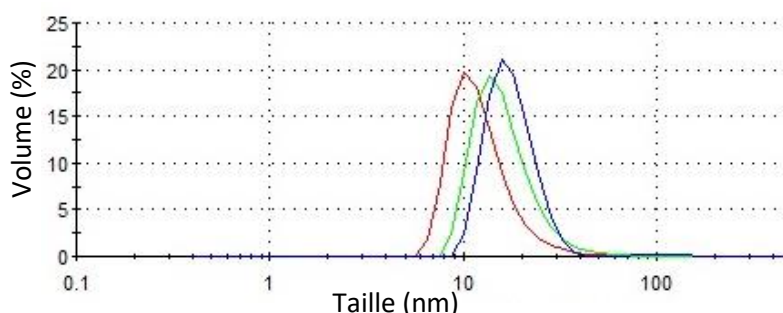
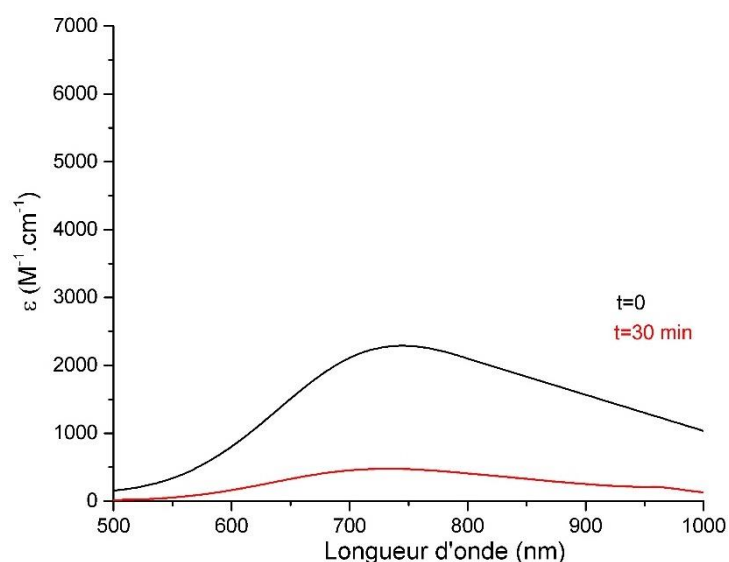


Figure III-36. Distribution en volume de la taille des particules Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5],(citrate)<sub>0,5</sub>@(dextran)<sub>25</sub> dans l'ALF à t=0 (rouge), t=1h (vert), t=24h (bleu)

Les mesures de DLS montrent une légère évolution du diamètre hydrodynamique dans le temps, celui-ci passant de 10 nm à 15 nm après 24h dans l'ALF. Un suivi de la stabilité vis-à-vis de la décoloration par spectroscopie UV-visible a été réalisé.

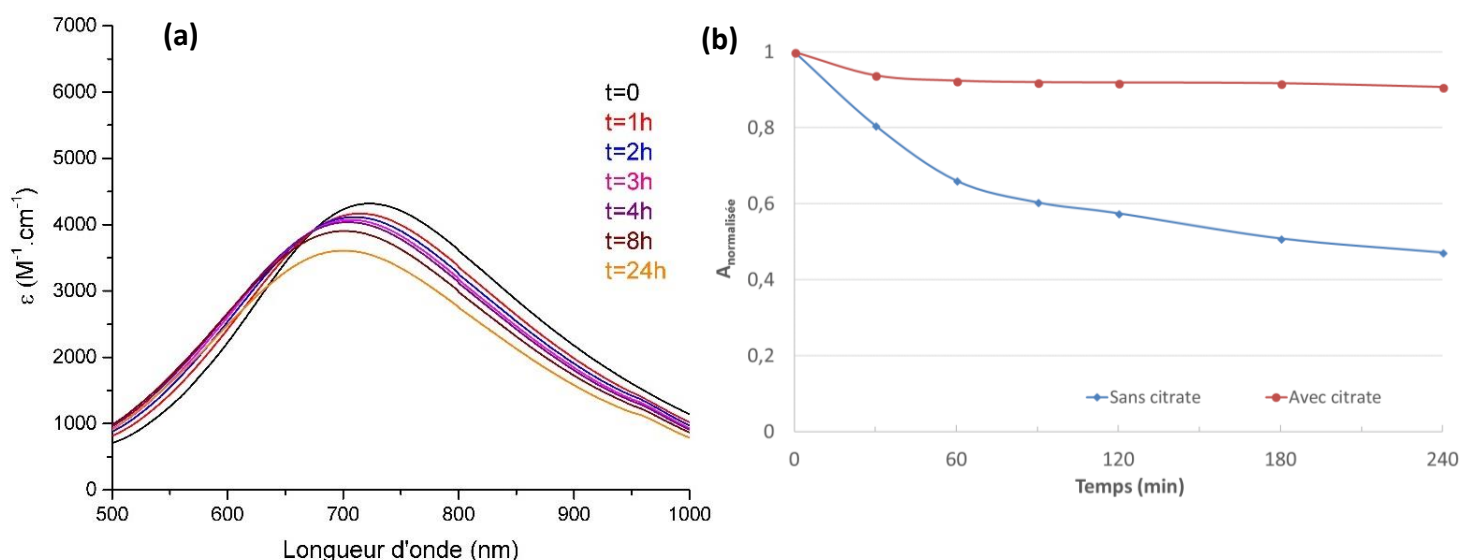


**Figure III-37.** Spectres UV-visible des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5],(citrate)_{0,5}@(dextran)_{25}$  redispersées dans l'ALF

La représentation du coefficient d'extinction molaire en fonction de la longueur d'onde (*Fig.III-37*) met en évidence une décoloration instantanée car le coefficient d'extinction molaire est déjà faible à  $t=0$ . Au bout de 30 min, la dissolution ou la réduction des ponts  $Fe^{II}-CN-Fe^{III}$  est totale. Il n'y a donc pas d'amélioration de la stabilité dans l'ALF grâce à la pré-complexation de citrate au  $Fe^{III}$  de surface. Cette tendance n'est pas surprenante car c'est la quantité importante de citrate dans le milieu ALF qui perturbe la stabilité des BdP. L'objectif d'une protection par des groupements citrate est principalement de contrer l'attaque de la surface par les groupements phosphate dans le SVF.

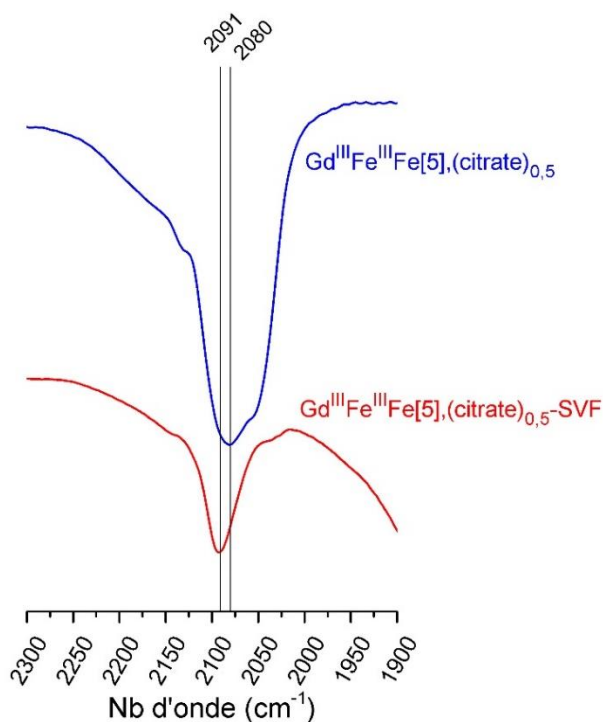
### V.3.2 Dans le SVF

Le même type d'étude que celle décrite ci-dessus a été effectuée dans le SVF. Dans ce cas, la DLS n'est pas fiable comme énoncé précédemment. Cependant, une forte agrégation des particules conduirait à la mesure d'une seconde population, ce qui n'a jamais été observée même après 24h dans le SVF. La stabilité des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5],(citrate)_{0,5}@(dextran)_{25}$  vis-à-vis de l'agrégation est satisfaisante. Le suivi de l'intensité de la bande d'absorption des BdP par spectroscopie UV-visible pendant 24 h est présenté à la figure III-38.(a).



**Figure III-38.** (a) Spectres UV-visible des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]_{0,5}@(dextran)_{25}$  redispersées dans le SVF, suivi pendant 24h ; (b) Représentation de l'absorbance maximale normalisée en fonction du temps des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]_{0,5}@(dextran)_{25}$  (rouge) et  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]_{0,5}@(dextran)_{25}$  (bleu)

Les spectres montrent une bonne stabilité du coefficient d'extinction molaire dans le SVF pendant au moins 4h. Une diminution de celui-ci est constatée après 24h dans le SVF, montrant que le phénomène de dégradation est fortement ralenti grâce à la protection par les groupements citrate. Les valeurs d'absorbance maximale ont été normalisées par rapport à l'absorbance maximale à  $t=0$  permettant de comparer les systèmes entre eux. Ainsi, la figure III-38.(b) permet de comparer la stabilité des particules avec et sans citrate. En 4h, les particules sans citrate ont perdu environ 50% de leur absorbance, alors que les particules avec citrate ont à peine perdu 10% de leur absorbance. La stabilité des complexes citrate- $Fe^{III}$  est beaucoup plus importante que celles des complexes phosphate- $Fe^{III}$ , expliquant l'effet positif de la fonctionnalisation par les citrates.

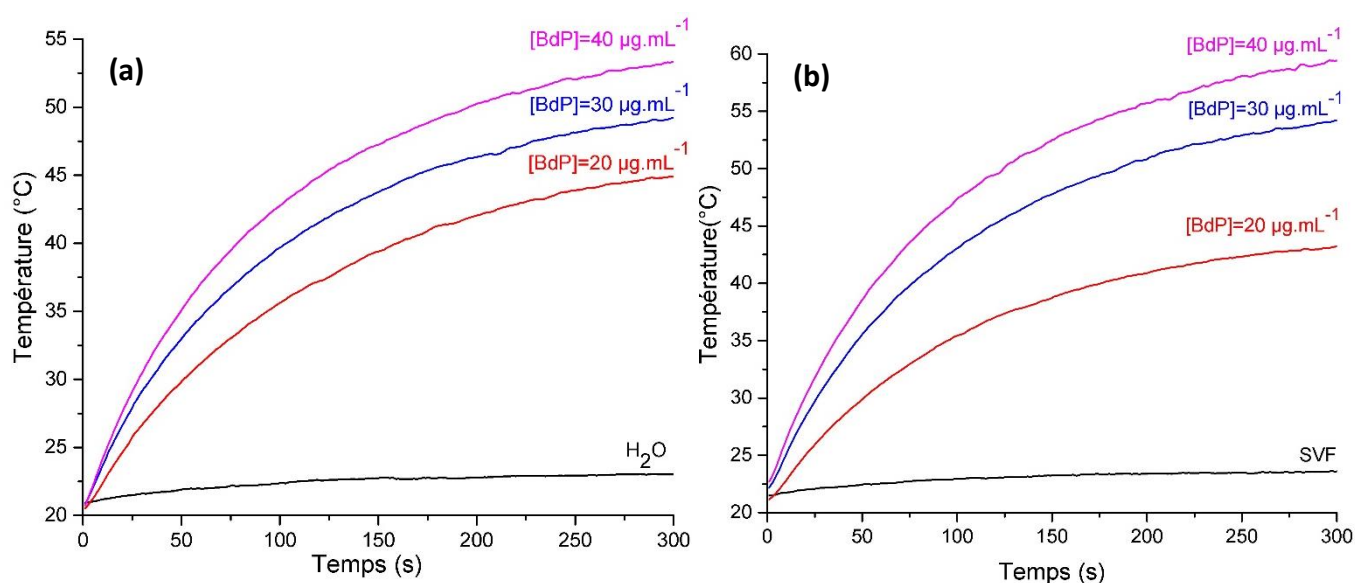


**Figure III-39.** Spectres IR des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]_{0,5}@(dextran)_{25}$  avant et après passage dans le SVF

Après redispersion pendant 4h dans le SVF à 37°C, les particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]_{0,5}@(\text{dextran})_{25}$  ont été précipitées par l'acétone. La caractérisation par DRX de la poudre obtenue n'a pas permis de conclure car, comme dans la partie II.4, les particules sont en quantité moindre par rapport au dextran et aux autres composants non cristallins du milieu. Sur le spectre IR (Fig.III-39), la bande de vibration asymétrique des cyanures pontants est toujours présente mais légèrement décalée vers les plus hautes énergies après traitement dans le SVF, démontrant une modification de l'environnement des cyanures. Néanmoins, les particules sont suffisamment stables pour espérer des performances intéressantes en hyperthermie photoassistée.

#### V.4 Hyperthermie photoassistée

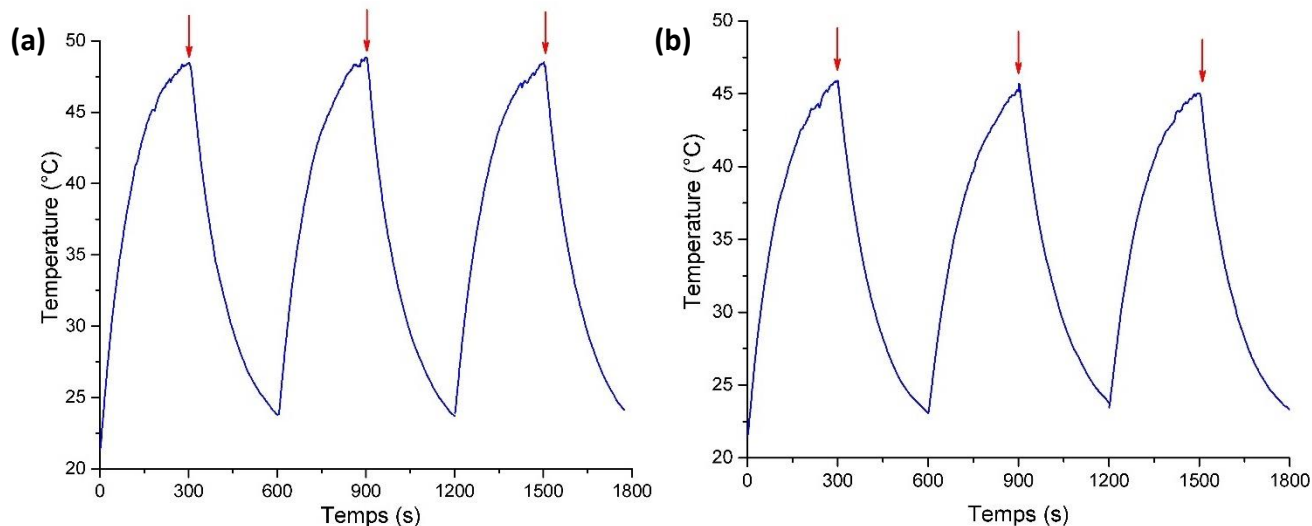
Le principe des expériences d'hyperthermie photoassistée en solution est détaillé dans le chapitre II. Nous avons travaillé avec un volume de solutions de 400  $\mu\text{L}$  et une puissance de laser de  $2 \text{ W.cm}^{-2}$ . Dans un premier temps, une étude avec différentes concentrations en BdP dans l'eau et dans le SVF a été menée.



**Figure III-40.** Mesure de la température en fonction du temps dans les solutions contenant les particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]_{0,5}@(dextran)_{25}$  à différentes concentrations en BdP : **(a)** dans l'eau ; **(b)** dans le SVF

Nous avons préparé des solutions de  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]_{0,5}@(dextran)_{25}$  dans l'eau et dans le SVF à trois concentrations en BdP :  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$  et  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . L'eau ou le SVF seuls n'entraînent aucune augmentation de la température. En toute logique, l'élévation de la température est proportionnelle à la quantité de BdP. Nous constatons dans les deux milieux que la température de  $43^\circ\text{C}$  est dépassée pour une concentration de  $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de BdP ce qui est une quantité faible. Les performances des particules sont donc particulièrement intéressantes. Les mesures dans le SVF sont meilleures que celles dans l'eau et sont très prometteuses pour des expériences *in vivo*. En nous focalisant sur la concentration à  $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , la cyclabilité (Fig.III-41) dans l'eau et le SVF a été testé mettant en avant la bonne stabilité des particules sous l'effet du faisceau laser.





**Figure III-41.** Cycles d'hyperthermie photoassistée des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]_{0,5}(citrate)_{0,5}@dextran_{25}$  dans (a)  $H_2O$  ; (b) SVF (flèche : arrêt du laser)

Un cycle consiste à irradier les solutions pendant 300 s puis à arrêter le laser et laisser la température en solution revenir à température ambiante. Dans les deux milieux, eau et SVF, les performances atteintes sont identiques même après trois cycles.

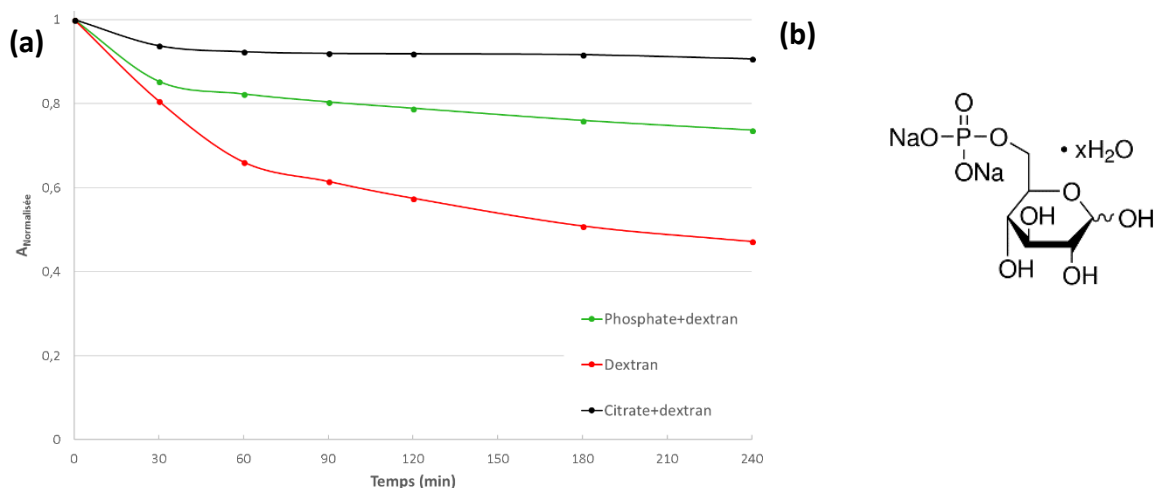
Ces résultats sont très encourageants, ils montrent que nos particules peuvent être des plateformes stables et performantes en hyperthermie photoassistée.

## V.5 Discussion

Dans le but d'empêcher la dégradation des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]@(dextran)_{25}$ , des groupements citrates ont été greffés en surface. Nous avons ainsi obtenu des particules de type  $Gd^{III}Fe^{III}Fe,(citrate)_{0,5} [5]@(dextran)_{25}$ . La forte affinité des citrates pour le  $Fe^{III}$  permet un accrochage facile. Cependant, cette forte stabilité a pour conséquence un faible taux de  $Gd^{III}$  dans les composés. Cet aspect est l'une des limitations pour avoir des agents de contraste  $T_1$  optimaux. La relaxivité de ces systèmes a été étudiée et sera détaillée dans la partie VII de ce chapitre.

En revanche, la dégradation des ponts  $Fe^{II}-CN-Fe^{III}$  n'a pas été limitée, dans l'ALF, ne permettant pas une internalisation des particules dans les cellules. Cependant, nous avons démontré la bonne efficacité de notre stratégie pour protéger la surface de la décomposition dans un milieu proche du milieu sanguin, le SVF. En effet, l'accès des phosphates à la surface est limité par la présence des citrates.

Toujours dans l'idée de protéger la surface par des groupements complexant, l'utilisation d'un groupement de type D-glucose-6-phosphate en surface a été exploré, en parallèle. Une description de la synthèse est faite dans l'annexe 11. Ce système associant phosphate et dextran s'est montré inefficace dans l'ALF avec une décoloration instantanée des solutions. Au contraire, comme le montre la figure III-42.(a), dans le SVF, un ralentissement de la cinétique de dégradation a été constaté. Bien que celui-ci soit plus faible que pour les systèmes combinant citrate et dextran, les performances restent très intéressantes. Les études sur ce système devront être davantage poussées afin de le caractériser chimiquement et structuralement ce qui pourrait permettre une optimisation des performances.



**Figure III-42.**(a) Comparaison de la stabilité des différents systèmes mis au point dans le SVF par représentation de l'absorbance maximale normalisée en fonction du temps ; (b) Structure du D-glucose-6-phosphate

La grande stabilité des particules associant citrate et dextran est particulièrement remarquable comparée aux autres systèmes élaborés. Malgré les bonnes performances des particules développées avec des groupements phosphates, les particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe,(citrate)_{0,5} [5]@(dextran)_{25}$  sont beaucoup plus stables.

Nous avons envisagé une modification de l'enrobage en utilisant des cyclodextrines. Bien que leur interaction avec les NPs est de type liaison hydrogène comme pour le dextran et le PVP, il existe de nombreuses fonctionnalisations de ce composé permettant d'avoir un ancrage varié en surface.

## VI. Systèmes à base de cyclodextrine

La cyclodextrine est un oligosaccharide cyclique constitué de plusieurs chaînons de type glucose. Le nombre de monomères va définir le type de cyclodextrine,  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$  pour 6,7 ou 8 groupements glucose respectivement. Ces différentes formes vont conduire à une taille de la cage mais également à des masses molaires différentes.

	Molecular weight (Da)	Height of torus (Å)	Cavity volume (Å <sup>3</sup> )	Upper rim		Lower rim	
				Outer diameter (Å)	Cavity diameter (Å)	Outer diameter (Å)	Cavity diameter (Å)
$\alpha$ -CD	972	7.9	174	13.2	4.5	13.7	5.7
$\beta$ -CD	1135	7.9	262	14.9	6.1	15.3	7.8
$\gamma$ -CD	1297	7.9	427	16.1	7.7	16.9	9.5

**Tableau III-9.** Résumé des dimensions des différentes formes de cyclodextrines<sup>21</sup>

Nos études se sont basées sur la  $\beta$ -cyclodextrine. Deux types d'enrobage ont été étudiés sur des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]$  :

- La poly-cyclodextrine (CD liées par des chaînes carbonées) (Fig.III-43.(b)),
- Un polymère constitué de CD reliées par des groupements citrate nommé CD-citrate (Fig.III-43.(c)).

Un autre système combinant CD et phosphate a été exploré, il est présenté en annexe 11. Celui-ci ayant été peu caractérisé, seules les propriétés de protection sont présentées ici en parallèle des composés enrobés de CD-citrate.



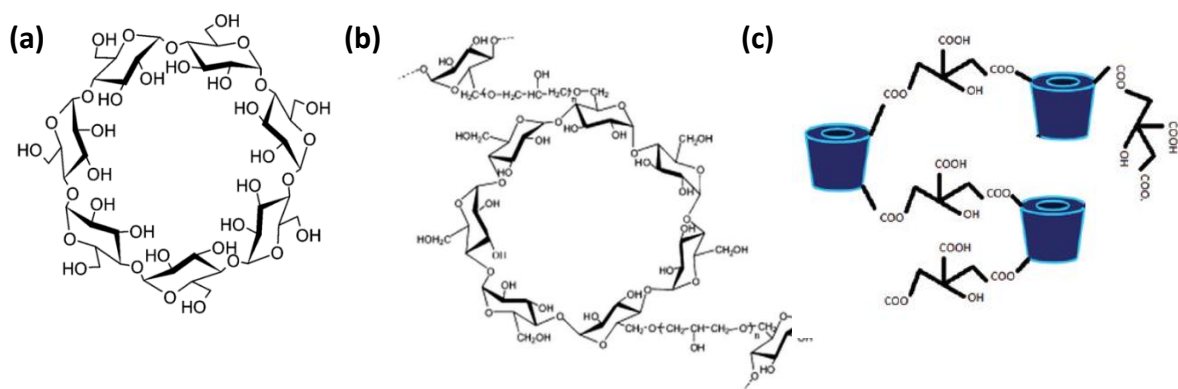


Figure III-43. Structure de (a)  $\beta$ -CD ; (b) poly-CD<sup>22</sup> ; (c) CD-citrate<sup>23</sup>

La poly-CD<sup>22</sup> et la CD-citrate<sup>23</sup> ont été synthétisées au sein de l'équipe de Ruxandra Gref à l'ISMO. La cavité de la CD peut permettre l'encapsulation de principe actif, comme la doxorubicine<sup>23</sup>. Sous l'effet de la chaleur, celui-ci pourrait être relargué et ainsi permettre d'amplifier la mort cellulaire causée par l'hyperthermie photoassistée<sup>24,25</sup>. Ceci pourrait nous permettre, à terme, de mettre au point une plateforme théranostique combinant IRM, hyperthermie photoassistée et chimiothérapie.

## VI.1 Synthèse et caractérisation des particules

### VI.1.1 Particules avec citrate et poly-CD

Comme montré dans la partie II, un enrobage avec de la poly-CD seule ne permet pas de protéger de manière optimale les cœurs de BdP.

Le même protocole que celui pour les systèmes combinant citrate et dextran est utilisé. La poly-CD est ajoutée dans la solution de particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]_{0,5}$ , 3 équivalents par rapport aux  $Gd^{III}$  et  $Fe^{III}$ . Les particules sont ensuite précipitées par de l'acétone (2,5 équivalents en volume). Après une étape de centrifugation, les particules sont séchées sous vide. Les particules seront nommées  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]_{0,5}@(\text{poly-CD})_3$ .

Les caractérisations par DLS et MET nous permettent de connaître la taille des particules. Le potentiel  $\zeta$  est également mesuré et est proche de 0. Une légère augmentation du diamètre hydrodynamique est observée en présence du polymère : le diamètre devient supérieur à 8 nm (*Tableau III-10*). Les tailles extraites des micrographies sont de l'ordre de 3 nm, comme pour les particules contenant citrate et dextran.

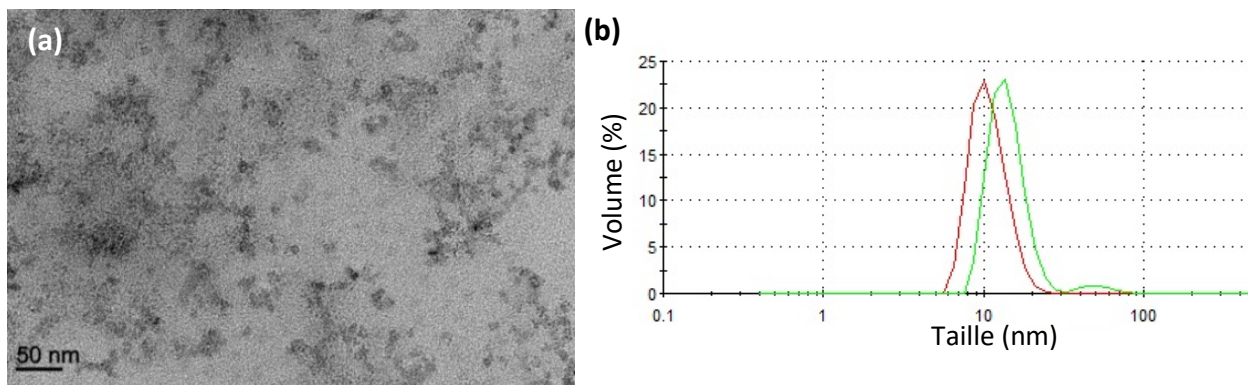


Figure III-44.(a) Image MET des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5],(citrate)_{0,5}@(poly-CD)_3$  après redispersion dans l'eau ; (b) DLS des particules en fin de synthèse (rouge) , après enrobage et redispersion dans l'eau (vert)

	DLS		MET	
	Fin de synthèse	Redispersion	Fin de synthèse	Redispersion
Taille (nm)	8-11	13-18	$2,3 \pm 0,6$	$2,5 \pm 0,5$
Potentiel $\zeta$ (mV)	3	0		

Tableau III-10. Résumé des potentiels  $\zeta$  et tailles mesurées par DLS et MET

La spectroscopie IR permet de confirmer la présence du polymère autour des particules avec une bande à  $1646\text{ cm}^{-1}$ . La signature du citrate se trouve à  $1707\text{ cm}^{-1}$  (double liaison CO des carbonyle), elle est décalée par rapport au citrate seul car l'environnement est différent. La bande de vibration des cyanures pontant ( $2080\text{ cm}^{-1}$ ) atteste également de la présence des particules.

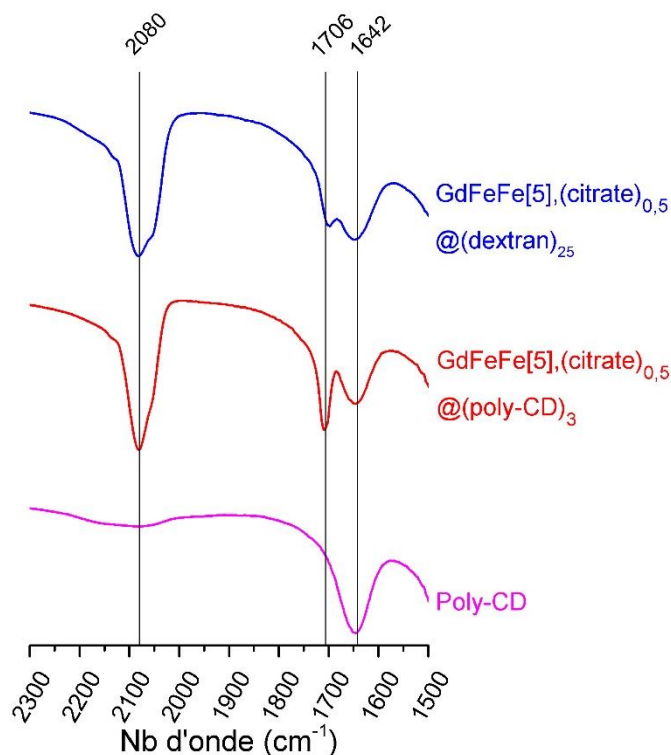


Figure III-45. Spectres IR des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5],(citrate)_{0,5}@(poly-CD)_3$ ,  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5],(citrate)_{0,5}@(dextran)_5$  et de la poly-CD

Des analyses élémentaires et des mesures en ICP-OES ont permis de déterminer la composition exacte des particules. Au cours de ces analyses, une faible proportion de Gd<sup>III</sup> a été mesurée, soit 2%. Ces résultats sont proches de ceux obtenus pour les particules contenant du citrate et du dextran. La formule unitaire obtenue est  $K_{0,6}Gd^{III}_{0,02}Fe^{III}_{0,98}[Fe^{II}(CN)_6]_{0,90},(citrate)_1,(poly-CD)_6,(H_2O)_{20}$ . Ce système est donc très proche chimiquement des particules décrites dans la partie V.

### VI.1.2 Enrobage avec cyclodextrine citrate

Le second enrobage à base de cyclodextrine étudié est la CD-citrate. La présence d'acide citrique dans la composition du polymère devrait permettre une interaction entre particules et polymère via ces groupements.

La procédure de synthèse est identique à celle présentée dans l'annexe 1. Les particules sont enrobées avec 25 équivalents de CD-citrate. Leur précipitation se fait également à l'aide d'acétone. Les échantillons sont centrifugés à 5°C pendant 1h. Les particules sont conservées sous forme de poudre après séchage sous vide et seront appelées Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5]@(CD-citrate)<sub>25</sub>.

Les tailles et le potentiel ζ des particules avant et après enrobage ont été estimés et sont regroupés dans le tableau III-11. Le potentiel ζ est identique avant et après enrobage, montrant la stabilité des particules en solution avec une valeur de -30mV.

	DLS		MET	
	Fin de synthèse	Redispersion	Fin de synthèse	Redispersion
Taille (nm)	8	6	3,1 ± 0,6	1,9 ± 0,5
Potentiel ζ (mV)	-30	-30		

Tableau III-11. Tailles des particules Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5]@(CD-citrate)<sub>25</sub> mesurées par DLS et MET ; Potentiel ζ des particules

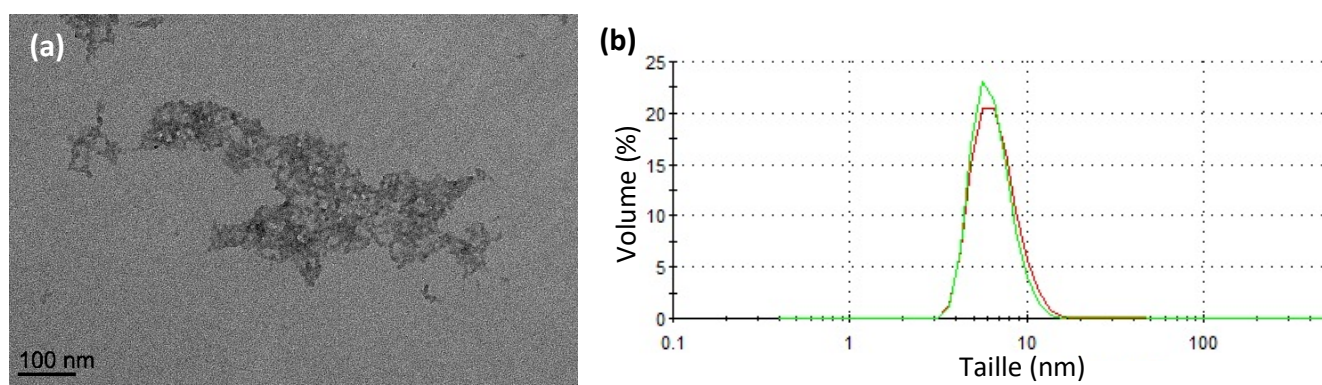


Figure III-46. (a) Image MET des particules Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5]@(CD-citrate)<sub>25</sub> après redispersion dans l'eau ; (b) DLS des particules en fin de synthèse (rouge), après enrobage et redispersion dans l'eau (vert)

Le diamètre hydrodynamique des particules avant et après enrobage est constant et inférieur ou égal à 8 nm, ce qui est positif pour envisager une élimination par les reins. Les tailles extraites des images de MET sont petites, de l'ordre de 3 nm. Comme le montre la figure III-46.(a), il est difficile de discerner les particules après enrobage au CD-citrate. La taille extraite est faussée, expliquant ainsi la faible valeur déterminée.

Le composé  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]@(CD-citrate)_{25}$  n'a pas fait l'objet d'étude de la composition chimique en métal. Les analyses élémentaires ont permis d'estimer que 15 monomères de CD-citrate et 60 molécules d'eau se trouvent autour des particules. L'accrochage du polymère autour des particules a été vérifié par spectroscopie IR (Fig.III-47). La forte stabilité du complexe  $Fe^{III}$ -citrate laisse penser que le polymère forme une liaison par ces groupements citrate avec la surface de la particule. Cependant, les spectres ne montrent pas de modification de l'environnement des groupements citrates en présence de particules indiquant plutôt une interaction de type liaison H, lié probablement au fort encombrement limitant l'accessibilité des fonctions citrate.

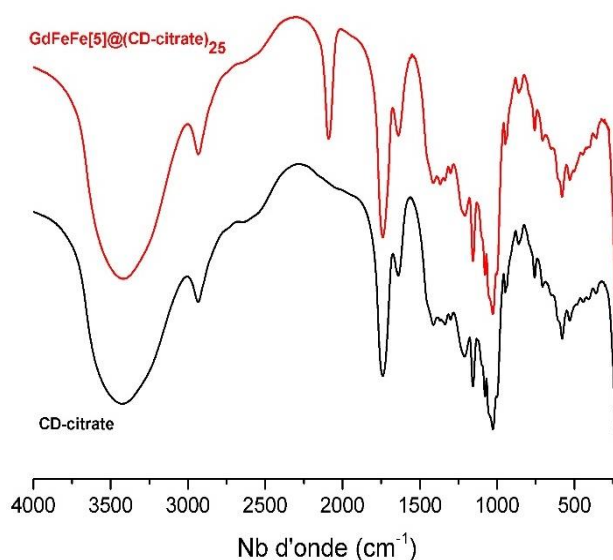


Figure III-47. Spectres IR des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]@(CD-citrate)_{25}$  et de la CD-citrate

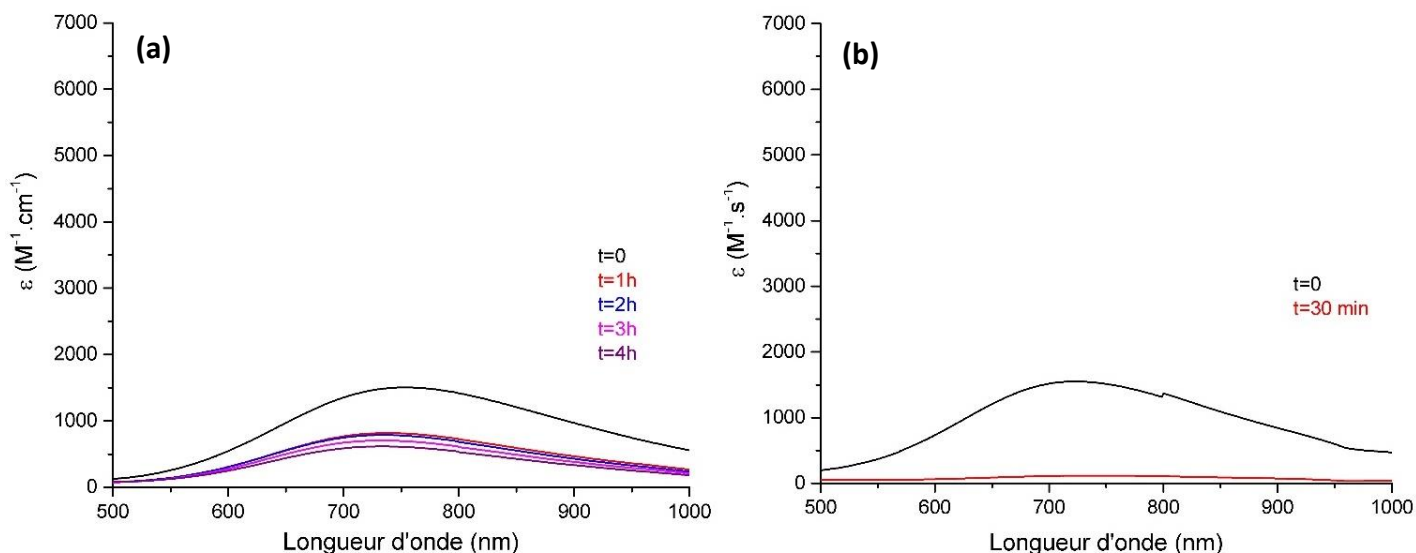
La cage de la  $\beta$ -CD n'a pas une taille optimale pour accueillir une molécule de doxorubicine. La forme  $\gamma$  est davantage adaptée à ce type d'application<sup>23</sup>. Une synthèse de particules avec de la  $\gamma$ -CD-citrate a été faite dans cet objectif montrant l'accrochage de cette forme de la CD autour des particules. Les études seront poursuivies jusqu'à l'encapsulation de doxorubicine en collaboration avec R. Gref.

## VI.2 Stabilité dans les milieux

La stabilité des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]@(CD-citrate)_{25}$  et  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]_{0,5}@(poly-CD)_3$  redispersées dans l'ALF et le SVF ont été évaluées par spectroscopie UV-visible.

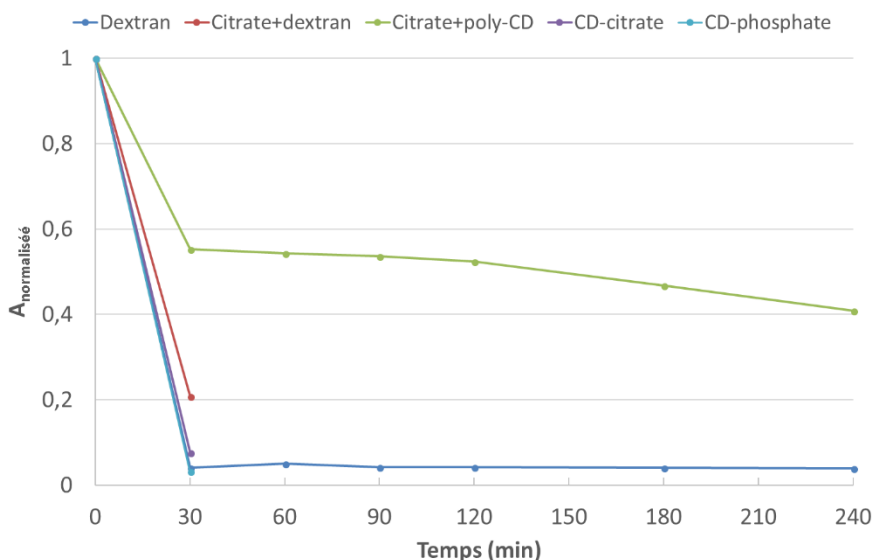
### VI.2.1 Dans l'ALF

Dans un premier temps, aucune agrégation n'a été observée dans ce milieu. Une perte de l'intensité de la couleur et donc du coefficient d'extinction molaire est observée dès le premier spectre enregistré pour les deux composés analysés.



**Figure III-48.** Suivi par spectroscopie UV-visible dans l'ALF de la stabilité des particules **(a)**  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]_1(citrate)_{0,5}@(poly-CD)_3$  ; **(b)**  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]_1(CD-citrate)_{25}$

La présence de CD-citrate ne permet d'améliorer la stabilité dans l'ALF. En moins de 30 minutes, l'intégralité des ponts  $Fe^{II}-CN-Fe^{III}$  est dégradée ne permettant pas des performances en hyperthermie photoassistée. En présence de CD-phosphate, les particules ont été dégradées en moins de 30 min dans l'ALF. Les particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]_1(citrate)_{0,5}@(poly-CD)_3$  présentent un coefficient d'extinction molaire faible à  $t=0$ . Celui-ci semble se stabiliser après 1h et la valeur de 0 n'est pas atteinte, même après 4h ce qui signifierait qu'une partie des ponts  $Fe^{II}-CN-Fe^{III}$  est conservée. Cependant, la faible intensité de la bande après 4h dans l'ALF ne permet pas d'envisager de bonnes performances en PTT dans ce milieu.

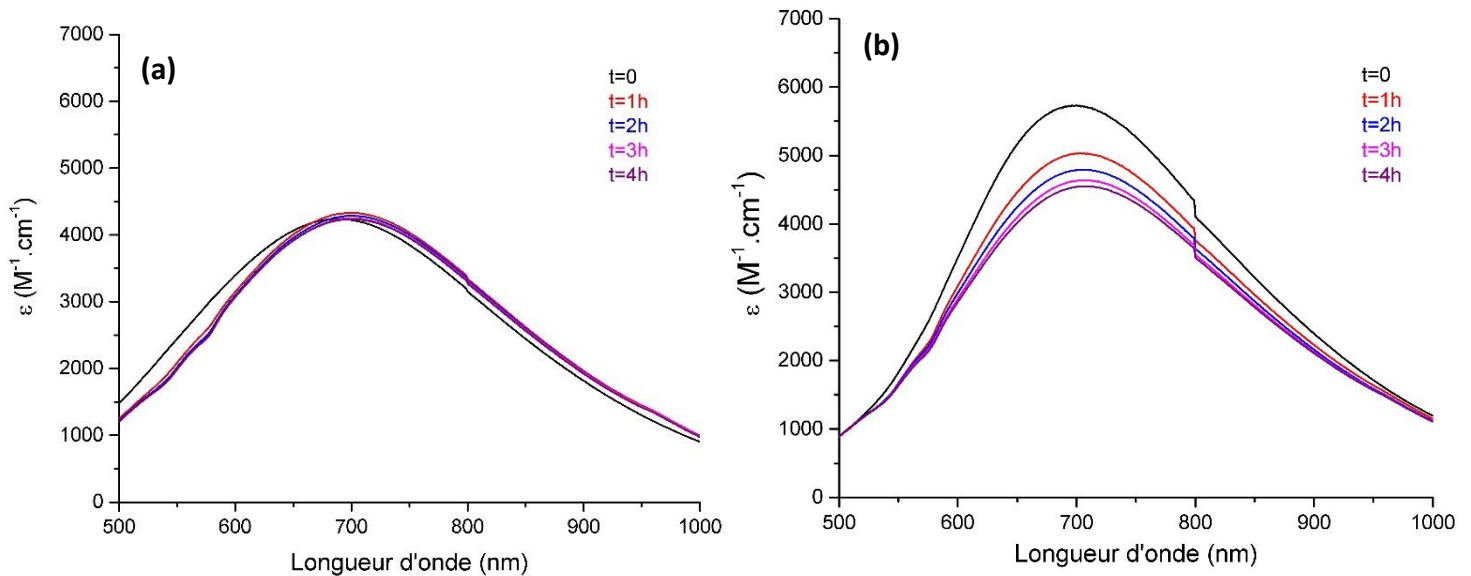


**Figure III-49.** Comparaison de la stabilité dans l'ALF par représentation de l'absorbance maximale normalisée en fonction du temps pour les particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]_1(citrate)_{0,5}@(poly-CD)_3$  (vert) ;  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]_1(CD-citrate)_{25}$  (violet) ;  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]_1(citrate)_{0,5}@(dextran)_{25}$  (rouge) ;  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]_1(CD-phosphate)_{25}$  (bleu clair) et  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]_1@dextran)_{25}$  (bleu foncé)

La comparaison des systèmes par normalisation de l'absorbance maximale par rapport à l'absorbance maximale à t=0 est présentée à la figure III-49. La bonne stabilité apparente du système associant citrate et poly-CD est faussée, car à t=0 la détérioration des particules a déjà commencé. Cette représentation permet, néanmoins, de montrer qu'aucun des systèmes élaborés ne permet de ralentir la dégradation des cœurs BdP dans l'ALF.

### VI.2.2 Dans le SVF

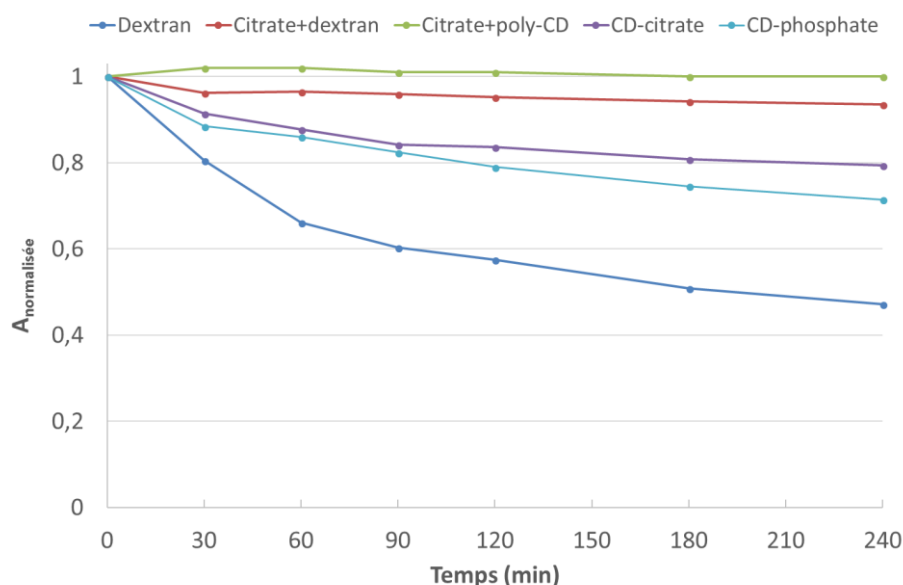
La stabilité des particules dans le SVF a été étudiée.



**Figure III-50.** Suivi par spectroscopie UV-visible dans le SVF de la stabilité des particules **(a)**  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5],(citrate)_{0,5}@(poly-CD)_3$  ; **(b)**  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]@(CD-citrate)_{25}$

Malgré un coefficient d'extinction molaire à t=0 légèrement plus faible, les particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5],(citrate)_{0,5}@(poly-CD)_3$  sont très stables dans le SVF pendant 4h. Ces composés présentent le désavantage d'avoir peu de  $Gd^{III}$ , ce qui est problématique pour des applications en tant qu'agents de contraste  $T_1$  pour l'IRM. Apparemment moins stable, le composé  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]@(CD-citrate)_{25}$  présente quand même un ralentissement de la cinétique de dégradation. Ce système est très intéressant et devra être davantage exploré, par la suite. De plus, le système élaboré avec la CD-phosphate présente des performances proches (*Fig.III-51*).

De la même manière que pour l'étude dans l'ALF, nous avons cherché à comparer les performances des objets entre eux (*Fig.III-51*). Grâce à cette représentation, le rôle de stabilisant du citrate est mis en avant. Bien que les objets combinant citrate et polymère (dextran ou poly-CD) soient très stable pendant 4h dans le SVF, ils contiennent peu de  $Gd^{III}$ . Ainsi, les particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]@(CD-citrate)_{25}$  ou  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]@(CD-phosphate)_{25}$  peuvent être un bon compromis car même si elles sont moins stables dans le SVF, elles pourraient contenir davantage de  $Gd^{III}$ . Cet aspect sera à vérifier lors d'une campagne d'analyse d'ICP-OES.



**Figure III-51.** Comparaison de la stabilité dans le SVF par représentation de l'absorbance maximale normalisée en fonction du temps pour les particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5],(citrate)_{0,5}@(\text{poly-CD})_3$  (vert) ;  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]@(CD-citrate)_{25}$  (violet) ;  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]@(CD-phosphate)_{25}$  (bleu clair) ;  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5],(citrate)_{0,5}@(dextran)_{25}$  (rouge) et  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]@(dextran)_{25}$  (bleu)

### VI.3 Relargage du $Gd^{III}$

Une autre problématique des particules de  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]@(dextran)_{25}$  est le relargage du  $Gd^{III}$ . La présence d'ions  $Gd^{3+}$  libre est une source de toxicité importante. Certains complexes moléculaires de  $Gd^{III}$  utilisés en clinique ne sont plus commercialisés à cause de la présence de  $Gd^{III}$  libre après injection qui ont conduit à l'apparition de fibrose chez certains patients.

Les mesures de relargage se font par analyse par ICP-OES de filtrats. La procédure est détaillée dans l'annexe 5. Les résultats sont présentés dans le tableau III-12.

	Résultats en ppm	% de relargage
$Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]@(dextran)_{25}$	0,10	6,0
$Gd^{III}In^{III}Fe[5]@(dextran)_{25}$	0,02	0,5
$Gd^{III}Fe^{III}Fe [5],(citrate)_{0,5}@(dextran)_{25}$	0,01	2,0
$Gd^{III}Fe^{III}Fe [5],(citrate)_{0,5}@(poly-CD)_3$	0,10	10,0

**Tableau III-12.** Relargage du  $Gd^{III}$  mesuré par ICP-OES

Malgré la présence de peu de  $Gd^{III}$  dans les particules (1 à 2%) pour les composés contenant du citrate, le pourcentage de relargage est important. Cependant, les valeurs en ppm sont faibles et proches de celles obtenues pour les  $Gd^{III}In^{III}Fe[5]@(dextran)_{25}$ . Il semble avoir un effet du polymère sur le relargage du  $Gd^{III}$ . Les particules enrobées de citrate et de poly-CD présentent un relargage dix fois plus important en ppm par rapport au même système enrobé au dextran. Le choix de l'enrobage est donc important pour limiter la présence de  $Gd^{III}$  libre. Les échantillons contenant CD-citrate et CD-phosphate devront être soumis également à ces mesures.



## VI.4 Conclusion

Afin d'améliorer la stabilité des particules de  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]$ , nous avons envisagé de faire varier la nature de l'enrobage. Pour cela, nous avons développé deux nouveaux composés : le premier associe le citrate et la poly-cyclodextrine. Le second consiste à fonctionnaliser les particules par le polymère CD-citrate. La complexation de citrate à la surface des particules avant enrobage est une solution efficace pour ralentir la dégradation. Malheureusement, ceci s'associe à une diminution de la quantité d'ions  $Gd^{3+}$  dans les composés. La question des performances en relaxométrie se pose alors. Les études de ces performances sont présentées dans la partie suivante.

L'utilisation d'un polymère composé de  $\beta$ -CD lié par des groupements citrate ou phosphate est prometteuse. La stabilité dans l'ALF n'a pas été améliorée. Mais la dégradation dans le SVF est fortement ralentie, seulement 20% de l'absorbance est perdu en 4h. Ces systèmes n'ont pas pu faire l'objet d'une étude de leurs compositions chimique en métal au cours de ce travail. Ces informations sont indispensables pour poursuivre l'exploration de ce système, notamment en relaxométrie. Notons qu'un autre système composé d'un dendrimère avec des fonctions phosphonates, élaborés par D. Felder (IPCMS) a été étudié et est présenté en annexe 11. Ce composé permet un ralentissement de la dégradation dans l'ALF mais peu d'effet est observé dans le SVF.

De légères variations de longueurs d'onde et de coefficient d'extinction molaire sont observées en fonction de l'environnement. En effet, celui-ci peut influencer l'énergie de la transition MMCT des BdP (Annexe 14).

## VII. Mesures de relaxivité

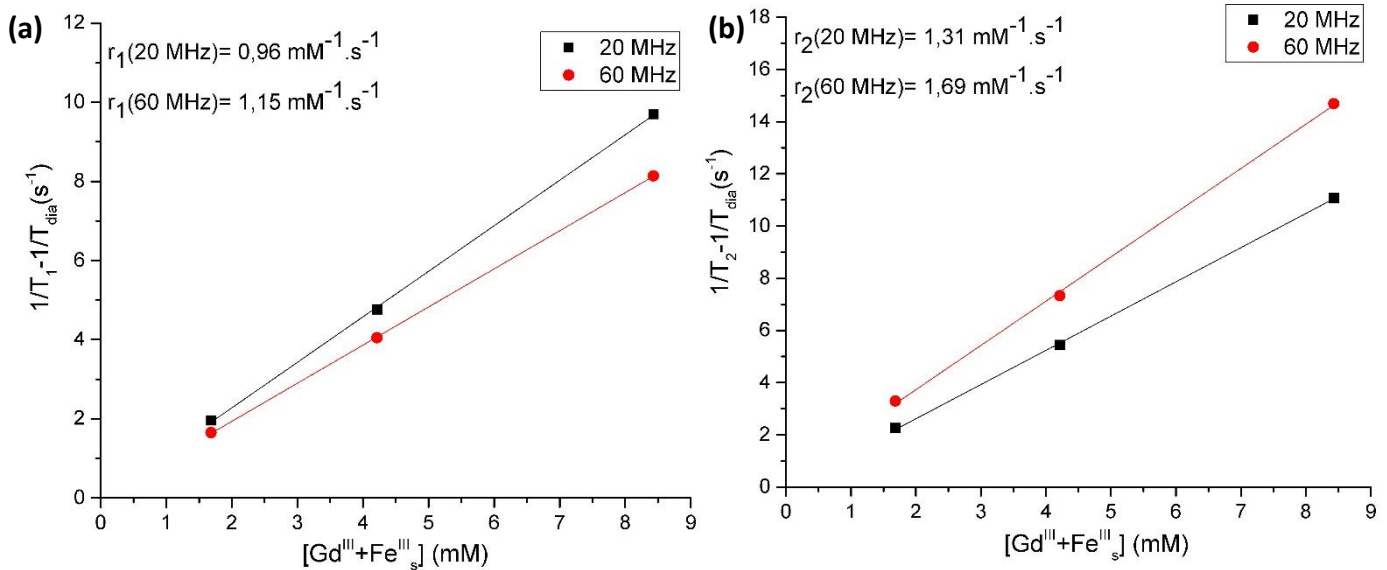
Dans ce chapitre, nous nous sommes focalisées sur l'étude de la stabilité du cœur BdP dans des milieux pouvant nous rapprocher d'expérience *in vivo* en vue d'application en hyperthermie photoassistée. Notre objectif étant de mettre au point des plateformes théranostiques, les performances en relaxivité des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]$  à base de dextran ou de poly-cyclodextrine ont été mesurées. Dans le chapitre II, nous avons mis en évidence les performances remarquables des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]@(dextran)_{25}$  en tant qu'agent de contraste  $T_1$ , ainsi que la contribution non négligeable des  $Fe^{III}$  de surface à la relaxivité.

Ainsi, nous avons déterminé les relaxivités en fonction de la concentration en  $Gd^{III}$  et en  $Fe^{III}$  de surface pour les objets développés dans ce chapitre. Ces mesures ont été réalisées à l'Université de Mons en collaboration avec S. Laurent.

### VII.1 Systèmes enrobés par du dextran

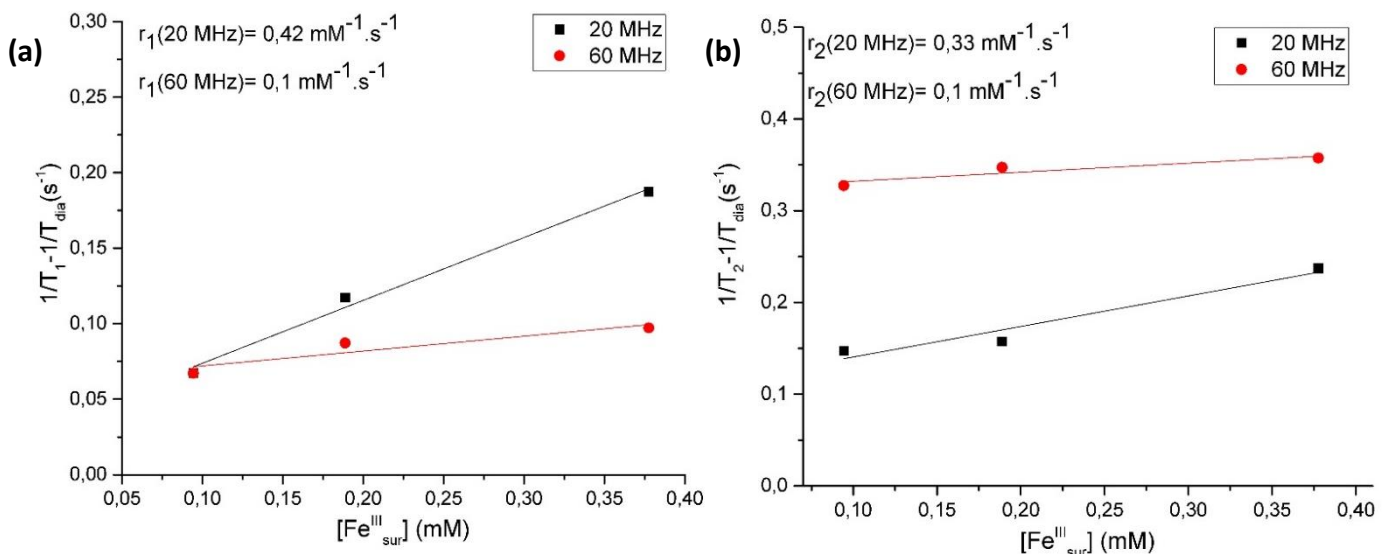
Les analyses chimiques des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]_(citrate)_{0,5}@(dextran)_{25}$  ont montré un faible taux de  $Gd^{III}$ . Les relaxivités longitudinales et transversales de ces objets ont été mesurées à 20 MHz et 60 MHz. En représentant l'inverse des temps de relaxation en fonction des concentrations en  $Gd^{III}$  et  $Fe^{III}$  de surface, nous avons pu estimer les relaxivités correspondantes.





**Figure III-52.** Variation de l'inverse des temps de relaxation (a) longitudinale ; (b) transversale en fonction de la concentration en Gd<sup>III</sup> et Fe<sup>III</sup> de surface à 20 MHz (noir) et 60 MHz (rouge) des particules Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe[5],(citrate)<sub>0,5</sub>@(dextran)<sub>25</sub>

Ces valeurs sont bien inférieures à celles des particules sans citrate ( $r_1 = 7\text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ), en accord avec le faible taux de Gd<sup>III</sup>. Le rapport  $r_2/r_1$  est de 1,47 montrant le caractère T<sub>1</sub> des objets. Au vu du peu de Gd<sup>III</sup> contenu dans les composés, leurs relaxivités devraient être proches de celles des BdP contenant du citrate en surface et enrobés de dextran.

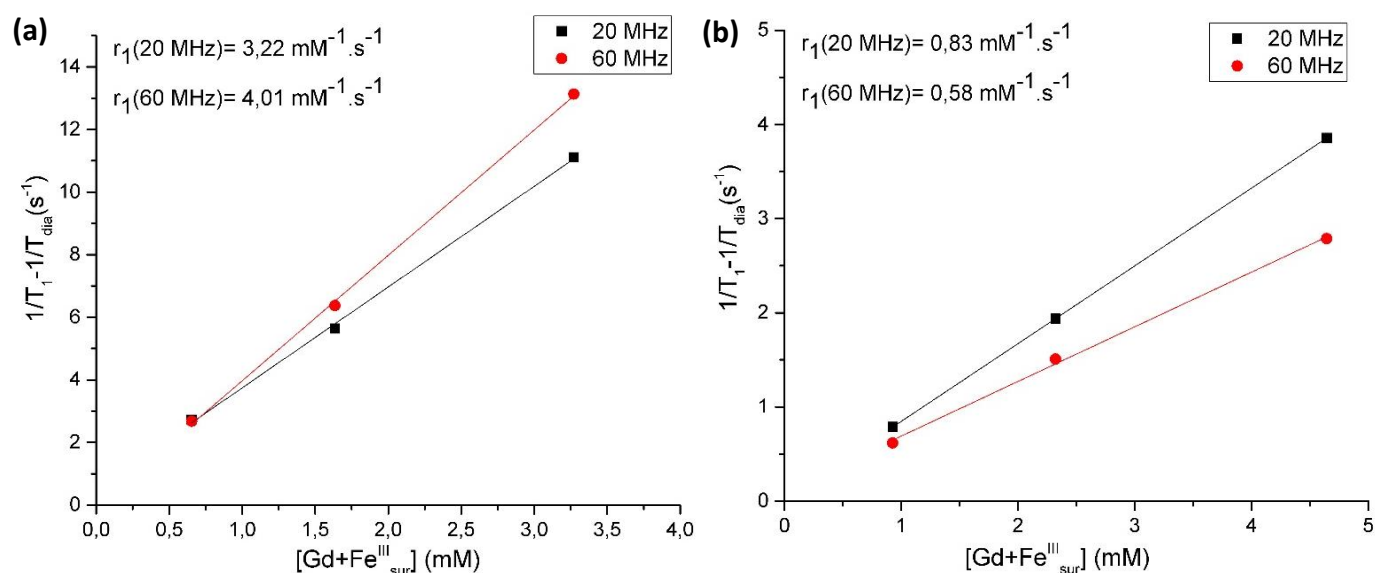


**Figure III-53.** Variation de l'inverse des temps de relaxation (a) longitudinale ; (b) transversale en fonction de la concentration en Fe<sup>III</sup> de surface à 20 MHz (noir) et 60 MHz (rouge) des particules BdP(citrate)<sub>0,5</sub>@(dextran)<sub>25</sub>

L'analyse en relaxivité des particules de BdP entourées des groupements citrate et de dextran démontre une relaxivité longitudinale faible de ces objets ( $0,1\text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  à 60 MHz). Ainsi, malgré le faible taux de Gd<sup>III</sup>, celui-ci a un effet bénéfique sur la relaxivité. En présence de Gd<sup>III</sup>, la relaxivité longitudinale à 60 MHz est multipliée par 10. Cependant, les valeurs de relaxivité longitudinale des particules Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe[5],(citrate)<sub>0,5</sub>@(dextran)<sub>25</sub> restent modestes et ne permettent pas une amélioration des performances par rapport aux agents cliniques. En revanche, elles permettent de combiner au sein d'un même objet thérapie (PTT) et diagnostic (IRM).

## VII.2 Systèmes enrobés par de la poly-cyclodextrine

Nous avons voulu évaluer l'influence de la poly-cyclodextrine sur la relaxivité. Les objets  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]@(poly-CD)_3$  n'ont pas été analysés par ICP-OES. Ainsi, la quantité de métaux contenue dans les particules a été estimée à partir des résultats d'AE et des quantités initialement introduites. La figure III-54 représente l'inverse des temps de relaxation longitudinale en fonction de la concentration en ions actifs pour les particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]@(poly-CD)_3$  et  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5],(citrate)_{0,5}@(poly-CD)_3$ .



**Figure III-54.** Variation de l'inverse des temps de relaxation longitudinale en fonction de la concentration en  $Gd^{III}$  et  $Fe^{III}$  de surface à 20 MHz (noir) et 60 MHz (rouge) des particules **(a)**  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]@(poly-CD)_3$  ; **(b)**  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5],(citrate)_{0,5}@(poly-CD)_3$

Les particules sans citrate ont une relaxivité longitudinale à 60 MHz de  $4\text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ , alors qu'en présence de citrate la relaxivité diminue jusqu'à une valeur de  $0,6\text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ . Ceci démontre bien le faible taux de  $Gd^{III}$  en présence de citrate. De plus, la poly-CD ne permet pas d'atteindre des performances égales aux particules enrobées avec 25 équivalents de dextran.

## VII.3 Comparaison des différentes particules

Pour avoir une vision complète des performances des différents objets étudiés, nous avons comparé les relaxivités longitudinales et transversales par  $Gd^{III}$  et  $Fe^{III}$  de surface. Pour calculer la quantité de  $Fe^{III}$  en surface, nous devons déterminer le nombre d'atome métallique total composant la particule. Pour cela, une estimation de la taille des particules est nécessaire. Pour éviter toute approximation, nous avons calculé la relaxivité longitudinale en fonction de la concentration en  $Gd^{III}$  et  $Fe^{III}$  totale déterminée par ICP. Ces résultats sont regroupés dans le tableau III-13.

	$r_1$ / $[\text{Gd}^{\text{III}}+\text{Fe}^{\text{III}}]_s$ ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )	$r_2$ / $[\text{Gd}^{\text{III}}+\text{Fe}^{\text{III}}]_s$ ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )	$r_2/r_1$	$r_1$ / $[\text{Gd}^{\text{III}}+\text{Fe}^{\text{III}}]$ ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )	$r_2$ / $[\text{Gd}^{\text{III}}+\text{Fe}^{\text{III}}]$ ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )	$r_2/r_1$
<b>BdP@(dextran)<sub>25</sub></b>	1,20	1,97	1,64	0,61	1	1,64
<b>Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe[5]@(dextran)<sub>25</sub></b>	7,07	9,92	1,40	3,19	5,27	1,65
<b>Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5]@(poly-CD)<sub>3</sub></b>	4,01	6,32	1,58	2,77	4,37	1,58
<b>Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe[5],(citrate)<sub>0,5</sub>@(dextran)<sub>25</sub></b>	1,15	1,69	1,47	0,62	1,09	1,76
<b>Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe[5],(citrate)<sub>0,5</sub>@(poly-CD)<sub>3</sub></b>	0,58	0,99	1,71	0,37	0,63	1,70
<b>BdP,(citrate)<sub>0,5</sub>@(dextran)<sub>25</sub></b>	0,1	0,1	1	0,06	0,06	1

Tableau III-13. Mesure de relaxivités longitudinales et transversales à 60 MHz et 37°C (à gauche, en ions paramagnétiques de surface et à droite, en ions paramagnétiques total)

Lorsque les composés BdP non dopés avec et sans citrate sont comparés, nous constatons que le citrate a un effet négatif sur la relaxivité. Le citrate formant des complexes avec les Fe<sup>III</sup> de surface, le nombre de molécules d'eau coordonnées est diminué, ce qui est défavorable à la relaxivité. Ceci se retrouve aussi avec les valeurs des composés Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe[5] avec et sans citrate. La présence du Gd<sup>III</sup> permet une amélioration de la relaxivité malgré la présence de citrate. Ces résultats montrent également que la nature de l'enrobage influence la relaxivité : les particules contenant de la poly-CD ont des performances environ 40% plus faibles que les particules enrobées de dextran. Des profils NMRD ont été enregistrés et sont présentés à la figure III-56.

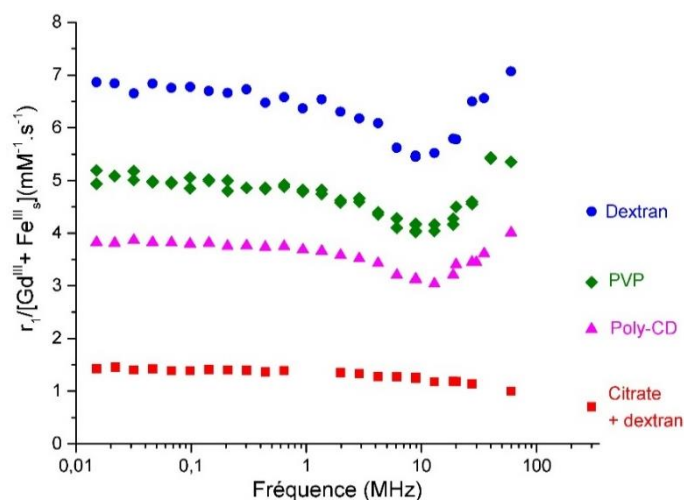


Figure III-56. Profils NMRD des particules Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe[5],(citrate)<sub>0,5</sub>@(dextran)<sub>25</sub>, Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe[5]@(dextran)<sub>25</sub> et Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5]@(poly-CD)<sub>3</sub>, Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe[5]@(PVP)<sub>100</sub> en fonction de la concentration en Gd<sup>III</sup> et Fe<sup>III</sup> de surface

En absence de citrate, les profils ont la forme typique d'objets en précession lente avec un maximum à 60 MHz. Ceci est en accord avec une limitation de la relaxivité par le temps de corrélation rotationnel. Dans le cadre des particules contenant du citrate, le profil NMRD n'a plus la même forme, une diminution constante de la relaxivité est observée. Du au faible taux de Gd<sup>III</sup>, la surface des particules est essentiellement constituée de Fe<sup>III</sup>. La relaxivité est alors limitée par le temps de relaxation électronique des Fe<sup>III</sup>.

Lorsque les profils des trois polymères (Dextran, PVP et Poly-CD) sont comparés, nous pouvons constater l'influence de la nature de l'enrobage sur les performances de relaxivité qui peut être liée à l'efficacité de l'échange des molécules d'eau et/ou à une variation du diamètre hydrodynamique.

Ils mettent également en avant des performances moins bonnes pour un enrobage avec de la poly-CD. Cependant, pour les particules enrobées de dextran, une étude d'optimisation de la quantité a été menée dans le cadre de la thèse de Gabriella Paul<sup>26</sup>, ce qui n'est pas le cas pour l'enrobage avec de la poly-CD. Une quantité optimale de ce polymère pourrait permettre d'atteindre les mêmes performances que pour le dextran.

## VIII. Conclusion

Après avoir étudié les performances en solution aqueuse en hyperthermie photoassistée et en IRM des particules d'ABP enrobées de dextran, des expériences *in vitro* et *in vivo* auraient été l'étape suivante de notre projet. Pour anticiper le comportement de nos objets, nous avons étudié leur stabilité dans les milieux d'intérêt. La forte absorption liée aux ponts Fe<sup>II</sup>-CN-Fe<sup>III</sup> permet de suivre facilement l'évolution de l'intégrité des particules par spectroscopie UV-visible. La basicité des milieux de culture cellulaire conduit à la décomposition des BdP en hydroxyde de fer (III) et en ferrocyanure. Les expériences *in vitro* sont donc compromises ou nécessitent de contrôler convenablement le pH.

Pour le comportement vis-à-vis des tests *in vivo*, nous avons redispersé les particules dans le SVF et l'ALF qui représentent ce qui se passe dans le milieu sanguin et dans le milieu lysosomal respectivement. Ces milieux sont complexes. Le SVF est riche en ions phosphates et l'ALF est riche en ions citrates qui sont deux complexants du fer. Le citrate peut également jouer le rôle de réducteur. Ainsi, deux voies peuvent être à l'origine de la décomposition des particules :

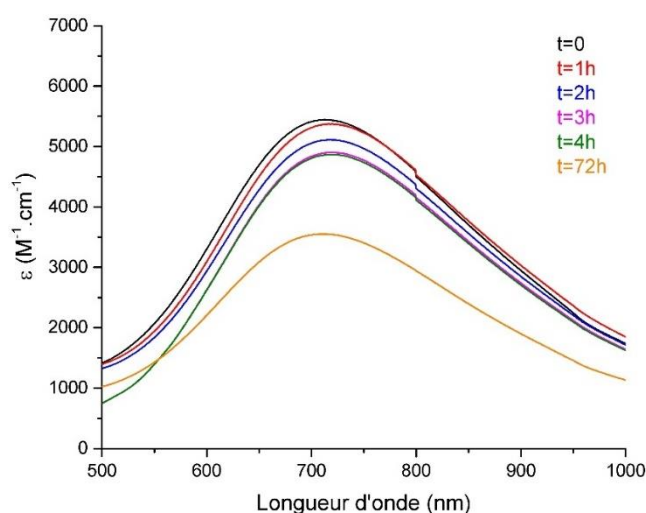
- Réduction des ions Fe<sup>3+</sup> en ions Fe<sup>2+</sup> conduisant à la formation de ponts Fe<sup>II</sup>-CN-Fe<sup>II</sup> ne présentant pas d'absorption dans le proche IR,
- Complexation de groupements citrate ou phosphate au Fe<sup>III</sup> de surface menant à la décomposition des ponts Fe<sup>II</sup>-CN-Fe<sup>III</sup>.

La dissolution ou réduction des entités Fe<sup>II</sup>-CN-Fe<sup>III</sup> signifie la perte d'activité en hyperthermie. Peu décrits auparavant, ces phénomènes sont amplifiés dans notre cas par la forte proportion de surface de nos petites particules. Afin de les contrer, plusieurs stratégies ont été développées : formation d'une coquille de Cu<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> ou d'une coquille de silice, greffage de groupements citrate ou phosphate en surface, modification du polymère (Cyclodextrine). Aucune de ces voies n'ont permis de stabiliser les particules dans le milieu lysosomal artificiel. Dans ce cas, les particules peuvent remplir leur fonction en se plaçant en périphérie des tumeurs. Mais les particules doivent alors être éliminées par les reins pour éviter toute toxicité. Des études de biodistribution sur le système optimal seront donc effectuées afin de répondre à cette question.

Dans le SVF, l'utilisation d'un réseau Cu<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> n'a pas abouti à des résultats pouvant répondre à notre problématique. Cependant, une grande stabilité a été obtenue pour les particules associant des groupements citrate en surface et un polymère (dextran ou poly-CD). La faible quantité de Gd<sup>III</sup> dans les composés s'est avérée limitant pour des applications en tant qu'agent de contraste en IRM. La croissance d'une coquille de silice autour des cœurs de BdP a été explorée en vue de greffer par la suite des complexes de Gd<sup>III</sup> (Gd-DOTAGA). Cette stratégie peut être prometteuse mais nécessite un travail afin de synthétiser soit une silice plus dense soit de combiner complexation par du citrate et croissance de silice. Ces complexes Gd-DOTA permettraient d'accéder à un contraste nettement amélioré en IRM.

La CD est composée de cage permettant d'envisager l'encapsulation de principe actif et le relargage de celui-ci par échauffement local. L'étude menée dans le cadre de cette thèse a porté sur la forme  $\beta$  de la CD qui n'a pas une taille de cage favorable pour envisager l'encapsulation de doxorubicine. La doxorubicine est choisie car ses propriétés de fluorescence permettent un suivi de l'encapsulation facilement. La suite du travail devra se poursuivre avec la forme  $\gamma$  du polymère.

Récemment, une nouvelle stratégie qui n'avait pas été envisagée jusqu'alors a consisté à évaluer l'effet de la couronne protéique. Après injection IV, les particules circuleraient d'abord dans le milieu sanguin puis seraient internalisées dans les lysosomes des cellules. Le SVF est constitué majoritairement d'albumine qui peut interagir avec les particules. Nous avons donc redispersé les particules  $\text{BdP}@\text{(dextran)}_{25}$  d'abord dans le SVF puis le milieu ALF a été ajouté au mélange. Un suivi par spectroscopie UV-visible pendant 3 jours ( $37^\circ\text{C}$  et  $[\text{BdP}]=100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) a montré une stabilité exceptionnelle avec peu de dégradation en 4h.



**Figure III-57.** Suivi par spectroscopie UV-visible des particules  $\text{BdP}@\text{(dextran)}_{25}$  redispersées dans le SVF puis dans l'ALF

Cette première expérience démontre un effet de protection des protéines contenues dans le SVF. Ainsi, le même type d'expérience devrait être menées sur les autres types d'enrobage (PVP, coquille de silice, cyclodextrine) afin de comprendre si le phénomène de protection est dépendant de l'enrobage. De plus, des études d'interaction des BdP et de l'albumine devront être menées pour comprendre les phénomènes conduisant à cette stabilité. L'utilisation d'albumine seule permet une simplification du milieu.

La question du devenir de l'enrobage devra également être abordée car celui-ci a une grande influence sur le diamètre hydrodynamique des particules et par extension sur la voie d'élimination. De plus, l'influence de la couronne protéique sur le relargage de  $\text{Gd}^{\text{III}}$  devra également être explorée.

Un autre point important ressort de ce premier test qui est l'effet de l'adsorption de protéines sur le coefficient d'extinction molaire. En effet, ceci peut engendrer une modification de la polarité de l'environnement des BdP qui pourrait expliquer la diminution de celui-ci au cours du temps. Cet aspect pourra être facilement vérifié par l'étude de l'interaction entre les particules et l'albumine. Ces derniers résultats très encourageants permettent d'envisager d'exploiter de nouveau les performances exceptionnelles des particules  $\text{Gd}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}[5]@\text{(dextran)}_{25}$  en tant qu'agents de contraste  $T_1$  pour l'IRM.

## **Bibliographie**

1. Li, J. *et al.* Drug “Pent-Up” in Hollow Magnetic Prussian Blue Nanoparticles for NIR-Induced Chemo-Photothermal Tumor Therapy with Trimodal Imaging. *Adv. Healthc. Mater.* **6**, 1–12 (2017).
2. Zhang, W. *et al.* Prussian Blue Nanoparticles as Multienzyme Mimetics and Reactive Oxygen Species Scavengers. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 5860–5865 (2016).
3. Shokouhimehr, M. *et al.* Dual purpose Prussian blue nanoparticles for cellular imaging and drug delivery : a new generation of T 1 -weighted MRI contrast and small molecule delivery agents. *J. Mater. Chem.* **20**, 5251–5259 (2010).
4. Ware, M. Prussian Blue: Artists’ Pigment and Chemists’ Sponge. *J. Chem. Educ.* **85**, 612–621 (2008).
5. Gervais, C. *et al.* Why does Prussian blue fade? Understanding the role(s) of the substrate. **28**, 1533–1668 (2013).
6. Volatron, J. *et al.* Ferritin Protein Regulates the Degradation of Iron Oxide Nanoparticles. *Small* **13**, 1–13 (2017).
7. Stopford, W., Turner, J., Cappellini, D. & Brock, T. Bioaccessibility testing of cobalt compounds. *J. Environ. Monit.* **5**, 675–680 (2003).
8. Martell, A. & Smith, R. M. in **3**, (1977).
9. Liu, F. *et al.* Gram-scale synthesis of coordination polymer nanodots with renal clearance properties for cancer theranostic applications. *Nat. Commun.* **6**, 1–9 (2015).
10. Smith, R. M. & Martell, and A. E. *Critical Stability Constants.* **4**, (1976).
11. Catala, L. *et al.* Core-multishell magnetic coordination nanoparticles: Toward multifunctionality on the nanoscale. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 183–187 (2009).
12. Zhu, W. *et al.* Mn 2+ -Doped Prussian Blue Nanocubes for Bimodal Imaging and Photothermal Therapy with Enhanced Performance. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 11575–11582 (2015).
13. Hu, M. *et al.* Synthesis of Prussian blue nanoparticles with a hollow interior by controlled chemical etching. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **51**, 984–988 (2012).
14. Su, Y. Y. *et al.* A Multifunctional PB@mSiO<sub>2</sub>-PEG/DOX Nanoplatform for Combined Photothermal-Chemotherapy of Tumor. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 17038–17046 (2016).
15. Juan L. Vivero-Escoto, R. C. H.-P. and W. L. Silica-based nanoprobe for biomedical imaging and theranostic applications. *Chem Soc Rev* **41**, 2673–2685 (2012).
16. Mignot, A. *et al.* A top-down synthesis route to ultrasmall multifunctional Gd-based silica nanoparticles for theranostic applications. *Chem. - A Eur. J.* **19**, 6122–6136 (2013).
17. Stober, W., Fink, A. & Bohn, A. E. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range 1. *J. Colloid Interface Sci.* **26**, 62–69 (1968).
18. Rieter, W. J., Pott, K. M., Taylor, K. M. L. & Lin, W. Nanoscale Coordination Polymers for Platinum-Based Anticancer Drug Delivery. doi:10.1021/ja803383k

19. Innocenzi, P. Infrared spectroscopy of sol–gel derived silica-based films: a spectra-microstructure overview. *J. Non. Cryst. Solids* **316**, 309–319 (2003).
20. Shokouhimehr, M., Soehnlén, E. S., Khitrin, A., Basu, S. & Huang, S. D. Biocompatible Prussian blue nanoparticles: Preparation, stability, cytotoxicity, and potential use as an MRI contrast agent. *Inorg. Chem. Commun.* **13**, 58–61 (2010).
21. Lai, W.-F., Rogach, A. L. & Wong, W.-T. Chemistry and engineering of cyclodextrins for molecular imaging. *Chem. Soc. Rev. Chem. Soc. Rev* **46**, 6379–6419 (2017).
22. Li, X., Salzano, G., Zhang, J. & Gref, R. Spontaneous Self-Assembly of Polymeric Nanoparticles in Aqueous Media: New Insights From Microfluidics, In Situ Size Measurements, and Individual Particle Tracking. *J. Pharm. Sci.* **106**, 395–401 (2017).
23. Anand, R. *et al.* Citric acid– $\gamma$ -cyclodextrin crosslinked oligomers as carriers for doxorubicin delivery. *Photochem. Photobiol. Sci.* **12**, 1841 (2013).
24. Chen, H., Ma, Y., Wang, X., Wu, X. & Zha, Z. Facile synthesis of Prussian blue nanoparticles as pH-responsive drug carriers for combined photothermal-chemo treatment of cancer. *RSC Adv.* **7**, 248–255 (2017).
25. Chen, W. *et al.* Cell Membrane Camouflaged Hollow Prussian Blue Nanoparticles for Synergistic Photothermal-/Chemotherapy of Cancer. *Adv. Funct. Mater.* **27**, (2017).
26. Paul, G. Nanoparticules de réseaux de coordination pour l'imagerie médicale. (2015).

## CHAPITRE IV : STABILISATION EN MILIEU AQUEUX DE CYANOSOLS CONTENANT DES IONS LOURDS DE TYPE Pt<sup>II</sup>, Pd<sup>II</sup> OU Au<sup>I</sup>

Ce chapitre est consacré à l'élaboration de nouveaux composés appelés cyanosols. Les cyanogels sont un type de polymère de coordination à ponts cyanures étudiés par l'équipe de Bocarsly au début des années 1990<sup>1</sup>. Ces composés amorphes sont des gels obtenus par réaction entre un cyanométallate et un tétrachlorométallate (cf. Chapitre I). Une seule étude sur ces composés à l'état de sol a été publiée, par la même équipe<sup>2</sup>. Cependant, cette étude consiste à piéger les particules en solution par un contre ion, à différents temps de réaction. Notre objectif est de stabiliser en milieu aqueux des nanoparticules de cyanosol de petites tailles (<10 nm) en l'absence de surfactant en vue de diverses utilisations en catalyse et théranostique. Plusieurs combinaisons ont été mises au point : Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>, Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>, Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup>, Pd<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> ou encore Pd<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>.

### I. Introduction

Nous avons cherché à mettre au point ce type d'objets contenant des ions lourds pour des applications médicales, notamment en hadronthérapie, dans le cadre de l'IRS NanoTheRad (collaboration ICMMO, ISMO, LCP). Cette technique de traitement des cancers est une forme de radiothérapie utilisant des ions très énergétiques comme source de radiation<sup>3</sup>. Les radio-amplificateurs, composés d'éléments de numéro atomique élevé servent de réservoirs d'électrons pour augmenter l'effet du rayonnement. Les nanoparticules contenant ces éléments lourds sont de bons candidats en tant que radio-amplificateurs<sup>4</sup> (cf. Chapitre I). Le rayonnement incident (rayons X ou ions) va activer les nanoparticules qui vont entraîner la production de radicaux. Ces espèces radicalaires très réactives réagissent avec les biomolécules environnantes et entraînent la mort cellulaire. Des nouveaux systèmes à pont cyanure contenant des ions lourds, et donc pouvant être efficaces dans ce domaine, ont été développés en partie dans le cadre du stage de M<sub>1</sub> d'Adrien Barroux. La synthèse consiste en un mélange de solutions de précurseurs de types tétrachlorométallates et cyanométallates, laissant la possibilité d'utiliser de nombreux éléments chimiques. Les ions lourds tel que le platine sont peu labiles, entraînant un mauvais contrôle de l'étape de nucléation. Ainsi, l'obtention de nanoparticules parfaitement contrôlées et contenant ces ions par la méthode de stabilisation à basse température développée au laboratoire n'est pas possible. Une voie de synthèse proche, à haute température a donc été explorée pour obtenir des cyanosols. L'état de gel peut également être atteint, ce qui n'a pas été l'objet de ce travail. Dans un premier temps, après synthèse, les particules ont été précipitées par un contre-ion pour les caractériser. Puis, dans un second temps, une étape d'enrobage au dextran a été explorée. Celle-ci est indispensable pour pouvoir redisperser les objets en milieu aqueux, mais également pour améliorer leur circulation dans le sang après injection. L'utilisation de ces objets en tant que radio-amplificateurs a été évaluée sur une sonde moléculaire (plasmide) ainsi que sur des cellules humaines.



De plus, il a été montré au laboratoire que les ABP pouvaient être des précurseurs d'alliages bimétalliques pour la croissance de nanotubes de carbone (NTc) mono-parois. Ces études ont montré que les ABP pouvaient être réduits en alliages bimétalliques de composition homogène, et qu'ils étaient des catalyseurs efficaces permettant un meilleur rendement de la croissance de NTc et des diamètres homogènes de ceux-ci<sup>5</sup>. Les cyanosols ont également été mis au point dans le but d'être utilisés comme pré-catalyseurs de la croissance de NTc. En effet, les études menées sur les cyanogels montrent qu'ils sont des précurseurs intéressants pour le dépôt fin d'alliage<sup>6</sup>. Des expériences dans ce sens ont été initiées au cours de ce travail, dans la thèse d'Alice Castan.

## II. Synthèses et caractérisations de cyanosols à base de Pt<sup>II</sup> ou Pd<sup>II</sup> et Fe<sup>II</sup> ou Fe<sup>III</sup>

### II.1 Synthèse des particules

La réaction consiste en une substitution progressive des ligands chloro par les ligands cyanure du cyanométallate. Cette substitution est partielle et peut être contrôlée en fonction du temps et de la température de réaction.

#### II.1.1 Particules contenant du Pt<sup>II</sup>

La formation de germes en présence de Pt<sup>II</sup> nécessite l'apport d'énergie pour initier la réaction. Pour cela, un chauffage au bain-marie est mis en place.

Une première partie de cette étude a consisté à faire varier les conditions de concentrations et de chauffage (température et durée) afin d'obtenir des particules contenant du Pt<sup>II</sup> et du Fe<sup>II</sup>. Deux solutions de précurseurs sont préparées dans l'eau distillée : la première contient un sel de platine, K<sub>2</sub>[PtCl<sub>4</sub>], et la seconde contient le ferrocyanure, K<sub>4</sub>[Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>]. Ces expériences ont été réalisées dans une stœchiométrie 1/1 en Pt<sup>II</sup>/Fe<sup>II</sup> à des concentrations allant de 2 à 40 mM. Les synthèses ont été menées à température ambiante (T<sub>Amb</sub>), 55°C et 85°C. Les solutions de précurseurs sont chauffées séparément, au bain-marie, à la température souhaitée, puis la solution de Pt<sup>II</sup> est ajoutée rapidement dans la solution de Fe<sup>II</sup>, sous vive agitation. Le mélange est maintenu à la température d'ajout. La réaction est arrêtée en fonction du temps de chauffage choisi : 15 min ou 60 min. En fin de réaction, la solution est laissée sous agitation hors du bain-marie pour revenir à T<sub>Amb</sub>. Les particules obtenues ont une composition de type K<sub>y-4-3x</sub>Cl<sub>4-x</sub>Pt<sup>II</sup><sub>y</sub>[Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>]<sub>x</sub>, elles seront appelées Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>.

Des particules ont été obtenues par mélange à chaud, à 85°C, des solutions de précurseurs K<sub>2</sub>[PtCl<sub>4</sub>] et K<sub>3</sub>[Fe<sup>III</sup>(CN)<sub>6</sub>]. Ces solutions sont à une concentration de 10 mM. L'ajout se fait toujours dans la solution contenant les cyanures. Comme pour les particules de Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>, deux temps de chauffage ont été testés : 15 min et 60 min. Ces objets seront appelés par la suite Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>.

Les cyanosols sont chargés négativement et peuvent être précipités par neutralisation de la charge grâce à l'ajout d'un équivalent en volume d'une solution de CTABr (Bromure d'hexadécyltriméthylammonium). La structure du CTA est présentée ci-dessous. La poudre de CTA est dissoute à une concentration de 6 mM dans le méthanol.

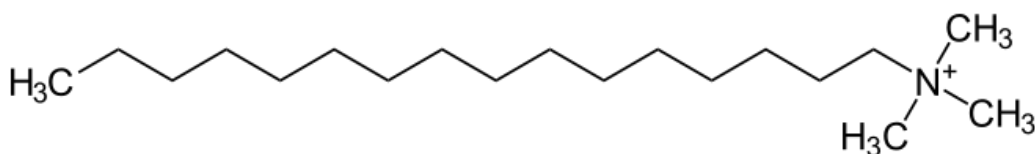


Figure IV-1. Structure du CTA

Les solutions sont ensuite centrifugées pendant 15 min à 8000 tours/min. Le surnageant est éliminé et les particules sont séchées sous vide. Les poudres obtenues sont vertes pour les particules Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> et rouge foncé pour les Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>. Elles pourront alors être analysées.

### II.1.2 Particules contenant du Pd<sup>II</sup>

La procédure de synthèse est identique à celle des composés à base de Pt<sup>II</sup>. Deux compositions ont été synthétisées :  $K_{y-4-3x}Cl_{4-x}Pd^{II}_y[Fe^{II}(CN)_6]_x$ , nommée Pd<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> et  $K_{y-4-3x}Cl_{4-x}Pd^{II}_y[Fe^{III}(CN)_6]_x$ , nommée Pd<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>. Les synthèses sont réalisées à température ambiante en mélangeant des solutions de K<sub>2</sub>[PdCl<sub>4</sub>] et K<sub>4</sub>[Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>] ou K<sub>3</sub>[Fe<sup>III</sup>(CN)<sub>6</sub>] à 10 mM. Le palladium est un élément plus réactif que le platine, ce qui permet la nucléation sans apport de chaleur. La cinétique de réaction étant beaucoup plus rapide, celle-ci est stoppée après 30 min sous agitation. Des poudres sont obtenues après ajout de 1 équivalent en volume de CTA, centrifugation et séchage sous vide.

## II.2 Système à base de Pt<sup>II</sup> et Fe<sup>II</sup>

### II.2.1 Suivi de la réaction *in situ*

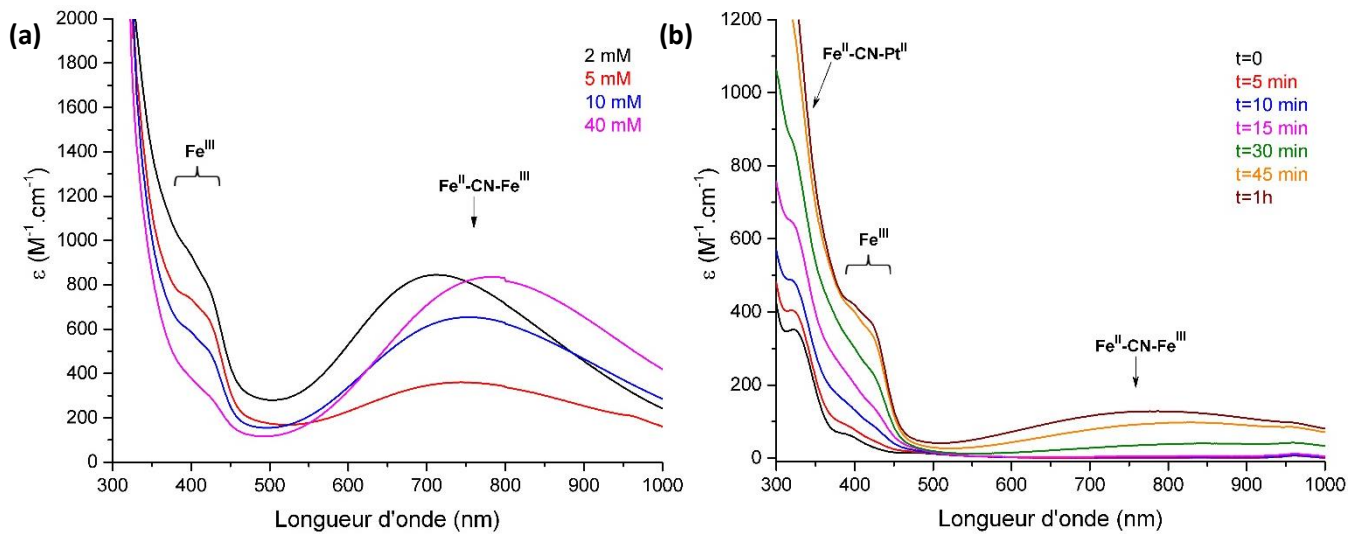
Un suivi de la réaction de formation des cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> peut être fait visuellement car un changement de couleur est observé. En fonction des conditions de synthèse (concentration, température et durée), les évolutions sont différentes. Celles-ci sont regroupées dans le tableau IV-1. Avant mélange des solutions de précurseurs, la solution de Pt<sup>II</sup> est orangée et la solution de Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub> est incolore. Après ajout, la solution de NPs devient orangée et sa couleur évolue jusqu'au vert.

Cyanosols		Temps de chauffage (min)		
Concentration en précurseur (mM)	Température (°C)	0	15	60
2	85	Brun/orangé	Vert clair	Vert clair
5	85	Brun/orangé	Vert clair	Vert foncé
10	55	Brun/orangé	Jaune	Vert clair
10	T <sub>amb</sub>	Brun/orangé	Brun/orangé	Brun/orangé
10	85	Brun/orangé	Vert	Vert foncé
40	85	Brun/orangé	Vert foncé	Vert foncé

Tableau IV-1. Evolution de la couleur des NPs de Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> en fonction des conditions de synthèse

L'observation des changements de couleur conforte le fait que la réaction a besoin d'un apport en énergie, sous forme de chaleur, pour être initiée. En effet, à T<sub>Amb</sub>, aucune évolution de la couleur n'est relevée. Ceci s'explique, une nouvelle fois, par la forte inertie du Pt<sup>II</sup>. Lorsque les solutions sont chauffées, à 55°C ou 85°C, la couleur évolue, avec une cinétique différente, vers le vert. Plus la température est élevée, plus la cinétique est rapide. La concentration en précurseur dans la gamme étudiée (2-40 mM) semble avoir moins d'effet que la température.

Les changements de couleur peuvent être suivis par spectroscopie UV-visible en fonction de la concentration en précurseurs (Fig.IV-2.(a)) et en fonction du temps de réaction (Fig.IV-2.(b)).



**Figure IV-2.** Spectres UV-visible du suivi de la réaction de formation des NPs de  $Pt^{II}Fe^{II}$  : **(a)** à 85°C,  $t=1h$  et avec différentes concentrations en précurseur ; **(b)** à 55°C et 10 mM en précurseurs, évolution en fonction du temps.

Trois bandes caractéristiques sont présentes sur ces spectres, dont les attributions initiales envisagées sont :

- Transfert de charge MMCT des paires  $Fe^{II}-CN-Fe^{III}$  compris entre 710 et 790 nm,
- Transfert de charge MMCT des paires  $Fe^{II}-CN-Pt^{II}$  vers 320 nm,
- Transfert de charge lié à la présence de  $Fe^{III}-CN$  libre ou lié entre 390 et 430 nm.

Nous avons considéré, au départ, la formation de deux types d'enchaînements :  $Fe^{II}-CN-Pt^{II}$  et  $Fe^{II}-CN-Fe^{III}$ . La concentration en précurseurs de départ ne modifie pas significativement les espèces présentes. L'analyse des spectres en fonction du temps de réaction permet de mettre en avant plusieurs étapes. Dans un premier temps, il y a formation progressive de ponts  $Fe^{II}-CN-Pt^{II}$  et  $Fe^{II}-CN-Fe^{III}$ . Les enchaînements BdP semblent se former après les ponts  $Fe^{II}-CN-Pt^{II}$ . Après une trentaine de minutes de réaction, la présence de BdP est détectée, ceux-ci absorbent dans le rouge. D'un autre côté, les bandes autour de 400 nm semblent augmenter en intensité au cours du temps, signifiant la production de nouvelles espèces composées de  $Fe^{III}$ . A ce stade, il n'est pas possible de discriminer les entités libres des entités pontantes de  $Fe^{III}-CN$ . Les espèces contenant du  $Fe^{III}-CN$  absorbent dans le bleu. Les différentes contributions expliquent la couleur verte des solutions de NPs

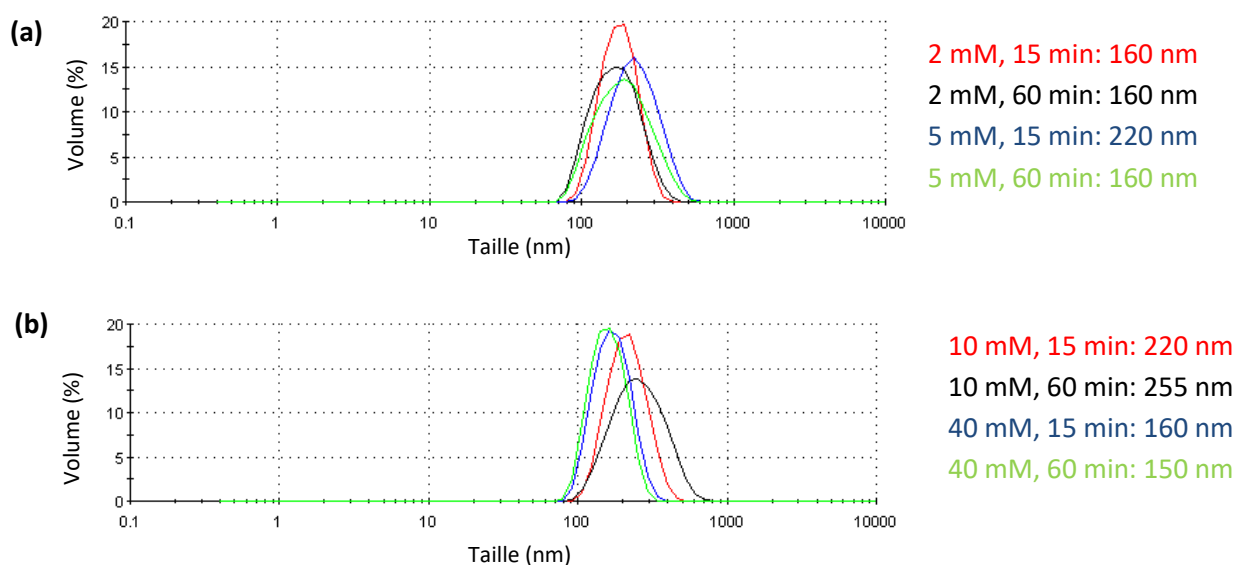
Dans tous les cas, la formation de ponts de type bleu de Prusse est observée même si l'intensité faible montre qu'elles demeurent minoritaires (environ  $7000 M^{-1} \cdot cm^{-1}$  attendu, soit moins de 10% de paires). Cette bande subit un déplacement du maximum de longueur d'onde vers les plus basses énergies lorsque la concentration en précurseurs augmente. Ce décalage peut s'expliquer par la présence du platine qui peut modifier le potentiel électrostatique du transfert de charge<sup>7</sup>. Afin de confirmer la formation progressive de BdP, une expérience a consisté à chauffer une solution de NPs pendant 18h à 85°C. Un précipité s'est alors formé, constitué principalement de BdP qui est le produit thermodynamique de la réaction.

Le suivi de la réaction *in situ* par spectroscopie UV-visible montre la possibilité de contrôler la formation de ponts Fe<sup>II</sup>-CN-Fe<sup>III</sup> en jouant sur le temps et la température de chauffage. Par exemple, les composés chauffés à 55°C pendant 1h présentent une faible proportion de BdP par rapport aux paires Fe<sup>II</sup>-CN-Pt<sup>II</sup>.

## II.2.2 Caractérisation de tailles et de structure

### II.2.2.1 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

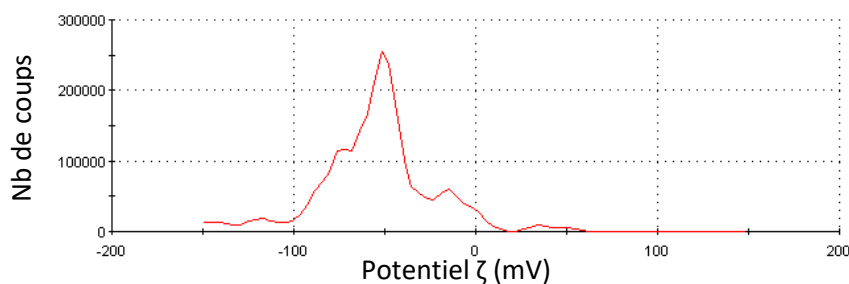
Les diamètres hydrodynamiques ont été mesurés sur les particules en solution aqueuse à différents temps de réaction et en fonction de la concentration en précurseurs.



**Figure IV-3.** Distributions en volume des diamètres hydrodynamiques mesurées par DLS des particules de Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> chauffées à 85°C pour différentes concentrations en précurseurs et différents temps de chauffage **(a)** 2 mM et 5 mM, 15 min et 60 min ; **(b)** 10 mM et 40 mM, 15 min et 60 min

Ces mesures montrent que la taille des objets ne semble pas fortement dépendante des conditions de synthèse. Cependant, les diamètres hydrodynamiques sont compris entre 150 nm et 250 nm, suggérant un état d'agrégation qui n'a pas été observé par MET.

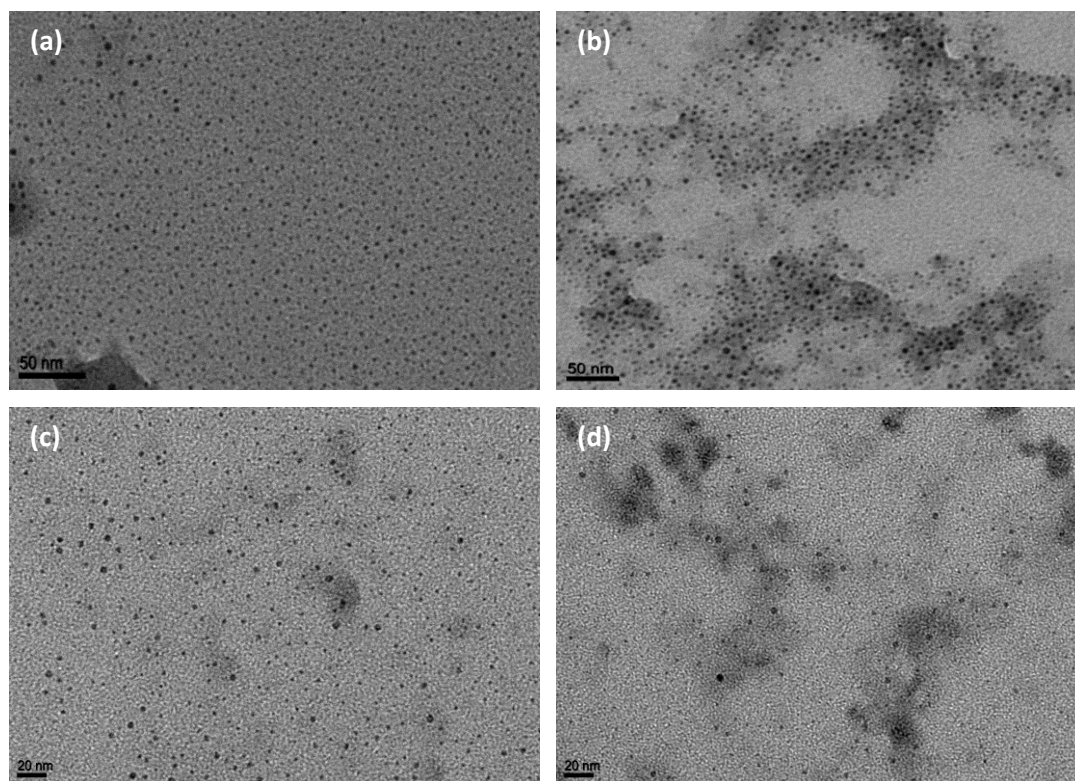
Le potentiel  $\zeta$  des particules de Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> en solution aqueuse est négatif, compris entre -30 mV et -60 mV, témoignant de la stabilité des particules en solution.



**Figure IV-4.** Potentiel  $\zeta$  des particules de Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>

### II.2.2.2 Microscopie électronique en transmission (MET)

Les particules en solution ont été observées par MET afin de déterminer la taille des objets. Les conditions de synthèse n'ont pas d'influence significative sur la taille des particules, d'après cette technique. Les micrographies obtenues pour les différentes synthèses menées sont présentées dans la figure IV-5.



**Figure IV-5.** Images MET des particules de Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> obtenues dans différentes conditions de synthèses **(a)** 2mM, 85°C, 15 min ; **(b)** 2 mM, 85°C, 60 min ; **(c)** 10 mM, 85°C, 15 min ; **(d)** 10 mM, 55°C, 15 min.

Les observations MET ont montré la présence de particules de petites tailles (environ 3-4 nm), bien individualisées. Les tailles mesurées sont regroupées dans le tableau IV-2. Ces tailles ne sont pas en accord avec celles obtenues par DLS. De plus, aucune agrégation n'a été observée quelles que soient les conditions de synthèse.

Echantillons	85°C 2 mM 15 min	85°C 2 mM 60 min	85°C 10 mM 15 min	55°C 10 mM 15 min
Taille (nm)	2,8 ± 1,1	3,2 ± 1,0	3,9 ± 1,2	2,8 ± 1,0

**Tableau IV-2.** Tailles des particules Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> déterminées à partir des images MET

Il semble que l'étape d'évaporation du solvant au moment de la préparation des grilles de microscopie (Annexe 3) provoque une désagrégation des particules. Pour comprendre cet effet, nous avons tenté des expériences en cryo-MET. Cette forme de microscopie consiste à préparer des grilles congelées pour lesquelles l'épaisseur de la couche de glace doit être suffisamment fine pour observer les NPs. Les observations se font également à froid, entraînant une diminution du contraste. Par cette technique, il est possible de visualiser les objets sans modification de leur état en solution.



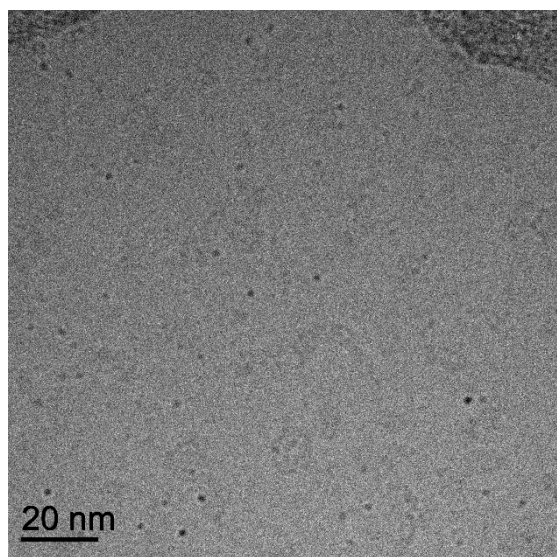


Figure IV-6. Micrographie des particules Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> obtenue par cryo-MET

Au cours de ces observations, nous n'avons pas pu nous placer dans de vraies conditions de cryo-MET car nous avons dû faire fondre la glace présente sur la grille pour pouvoir observer les particules. Cependant, aucun agrégat n'a été observé, seules des particules de petites tailles ont pu être aperçues. Ces expériences ne nous ont pas permis d'explicitier les diamètres hydrodynamiques mesurés par DLS.

### II.2.2.3 Caractérisation structurale par DRX

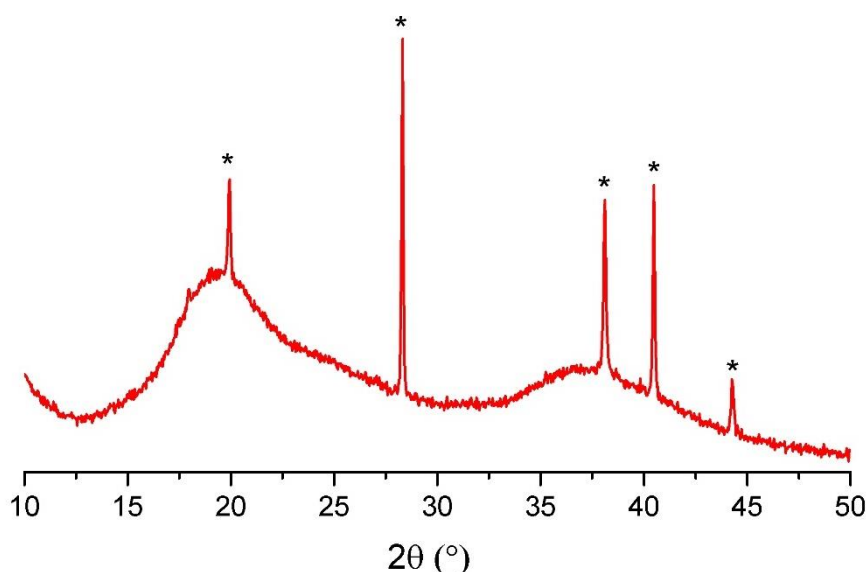


Figure IV-7. Diffractogramme des particules de cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> (\* porte échantillon)

Afin de confirmer la cristallinité des cyanosols de Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>, ceux-ci ont été analysés par DRX sur poudre. La substitution des ligands chloro autour du Pt<sup>II</sup> se fait de manière aléatoire, conduisant à une absence de cristallinité. Le diffractogramme d'un cyanosol de Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> obtenu par chauffage à 85°C pendant 1h est présenté sur la figure IV-7. Le diffractogramme obtenu est caractéristique d'un objet amorphe. L'absence de pic de Bragg démontre que la structure des particules n'est pas celle des BdP. Les deux pics larges présents sur le diffractogramme proviennent de la présence du CTA entourant les particules.

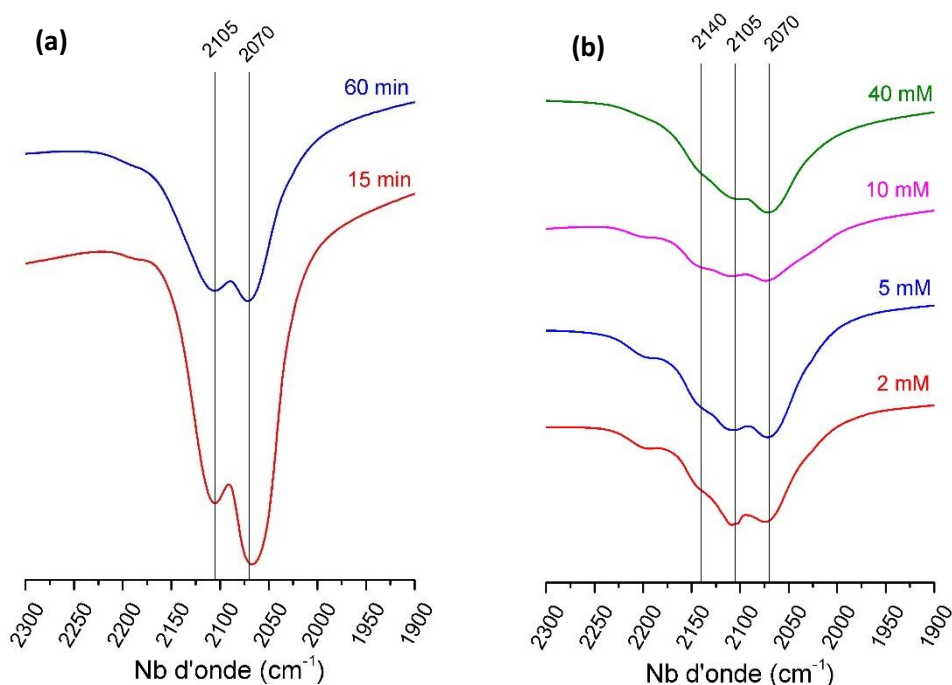
L'absence de cristallinité peut avoir pour origine la présence de défauts dans la maille ou le faible nombre d'atomes sondés.

### II.2.3 Caractérisation chimique

Les caractérisations chimiques ont été effectuées sur les particules sous forme de poudres précipitées grâce au CTA.

#### II.2.3.1 Spectroscopie IR

La spectroscopie IR permet de caractériser les liaisons présentes dans les particules. Les cyanures des enchaînements M-NC-Fe<sup>II</sup> ont une bande caractéristique vers 2100 cm<sup>-1</sup>, qui évolue en fonction de la nature du pont. A basse fréquence, une bande d'élongation à 600 cm<sup>-1</sup> caractéristique des liaisons Fe<sup>II</sup>-C(N-) est observée et n'est pas modifiée quelles que soient les conditions de synthèse. Une évolution de la bande caractéristique des cyanures est cependant constatée.



**Figure IV-8.** Spectres IR des particules Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> à **(a)** une concentration de 10 mM en précurseur, chauffées à 55°C pendant 15 min et 60 min ; **(b)** différentes concentrations en précurseurs, chauffées 15 min à 85°C

La comparaison des spectres IR à différents temps de chauffage (*Fig. IV-8.(a)*) montre une diminution du rapport d'intensité entre les deux contributions présentes. Les attributions de ces bandes peuvent être les suivantes : vibration des cyanures terminaux, Fe<sup>II</sup>-CN, à 2070 cm<sup>-1</sup>, et vibration des cyanures pontants, Fe<sup>II</sup>-CN-Pt, à 2105 cm<sup>-1</sup>. L'intensité de la bande des cyanures terminaux est moins importante lorsque le temps de chauffage augmente, ce qui est dû à une augmentation du taux de substitution des Cl dans la sphère de coordination des platines. Ce constat est en accord avec une évolution de la réaction. Cependant, nous pouvons observer que lorsque la température de chauffage est plus élevée (85°C) (*Fig. IV-8.(b)*), une nouvelle bande apparaît vers 2140 cm<sup>-1</sup>, traduisant la présence de nouveaux enchaînements contenant, sans doute, du Fe<sup>III</sup>.

La figure IV-8.(b) permet de comparer l'effet de la concentration sur la composition chimique des cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>. Le rapport entre les deux contributions principales des bandes des cyanures diminue lorsque la concentration diminue et la contribution des cyanures pontants est plus importante à faible concentration.

Cependant, ces changements sont peu significatifs. Ceci est cohérent avec les observations lors du suivi de l'évolution de la couleur de la solution en fonction des conditions de synthèse. En effet, pour un chauffage à 85°C, en 15 min de réaction, les solutions ont déjà pris une couleur verte quelle que soit la concentration en précurseurs, justifiant qu'il y ait peu d'évolution entre les systèmes. A cette température, la cinétique de la réaction est rapide. Au-delà de 15 min de chauffage, il y a peu de changement.

### II.2.3.2 Analyse par EDS

L'EDS est une technique spectroscopique qui permet de mesurer les proportions en K, Cl, Pt et Fe. En déterminant les ratios entre les différents éléments, il est possible d'estimer une composition moyenne en métaux et le taux de substitution en Cl. Les résultats sont détaillés dans le tableau IV-3.

La géométrie du Pt<sup>II</sup> est plan carré et celle du Fe<sup>II</sup> est octaédrique. En fonction du taux de substitution des ligands chloro dans la sphère de coordination du Pt<sup>II</sup>, les ratios Pt<sup>II</sup>/Fe<sup>II</sup> peuvent alors être les suivants, si l'on considère que tous les azotes des cyanures sont liés au Pt<sup>II</sup> :

- S'il y a substitution totale des 4 Cl autour du Pt<sup>II</sup> : 4 Fe<sup>II</sup>-CN pourront alors se trouver autour de chaque Pt<sup>II</sup> et 6 Pt<sup>II</sup> seront autour de chaque Fe<sup>II</sup>. Dans ce cas, le ratio Pt<sup>II</sup>/Fe<sup>II</sup> est égal à 1,5/1. La charge peut être contrebalancée par la présence de K<sup>+</sup>.

- Quand 3 Cl sont substitués : 3 Fe<sup>II</sup> sont autour de chaque Pt<sup>II</sup> et 6 Pt<sup>II</sup> se trouvent autour de chaque Fe<sup>II</sup>. Le ratio Pt<sup>II</sup>/Fe<sup>II</sup> est de 2/1.

- Lorsque 2 Cl sont substitués dans la sphère de coordination des Pt<sup>II</sup>, 2 Fe<sup>II</sup> se trouvent autour de chaque Pt<sup>II</sup> et 6 Pt<sup>II</sup> sont autour de chaque Fe<sup>II</sup>. Le ratio Pt<sup>II</sup>/Fe<sup>II</sup> est de 3/1.

% Atomique moyen	Ratio Cl/Pt	Ratio Pt/Fe	Ratio K/Fe
<b>10mM 55°C 15min</b>	1,4	2,3	0,6
<b>10mM 55°C 60min</b>	1,0	1,8	0,9
<b>10mM 85°C 15min</b>	0,1	1,6	0,6
<b>10mM 85°C 60min</b>	0,2	1,8	0,9
<b>40mM 85°C 15min</b>	0,6	1,6	2,4
<b>40mM 85°C 60min</b>	1,2	1,5	3,3

**Tableau IV-3.** Ratios Cl/Pt, Pt/Fe et K/Fe obtenus par EDS pour les particules Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> synthétisées dans différentes conditions

Les ratios mesurés par EDS sont en accord avec l'augmentation du taux de substitution des Cl avec le temps de chauffage. Lorsque la température augmente, le ratio Pt/Fe tend vers la valeur de 1,5, signifiant que la substitution des Cl autour du Pt<sup>II</sup> est presque totale. Ce constat est cohérent avec les ratios Cl/Pt mesurés, à l'exception des échantillons à 40 mM. Les ratios élevés peuvent s'expliquer par la coprécipitation des particules et de chlorure de potassium, corroboré par le fort rapport K/Fe pour ces concentrations. Ces expériences devront être reproduites sur des poudres obtenues après un lavage par ultrafiltration.



Elles donnent toutefois une tendance et nous ont permis de sélectionner des conditions menant à une composition autour de 1,5 Pt pour 1 Fe.

La composition chimique peut être modulée par la température et le temps de chauffage. Ceci est un point très intéressant car la composition chimique peut être choisie en fonction des applications visées, par exemple.

### II.3 Système à base de Pt<sup>II</sup> et Fe<sup>III</sup>

La synthèse des cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> a été effectuée à 85°C à partir de solutions aqueuses à 10 mM en précurseur. La réaction a été arrêtée après 15 et 60 min de chauffage afin d'étudier la taille et la composition chimique des particules.

#### II.3.1 Suivi *in situ* de la réaction

Une évolution de la couleur a été observée au cours de la réaction chimique passant de brun lors du mélange des solutions de précurseurs à rouge foncé après 15 min de chauffage. L'augmentation du temps de chauffage ne conduit pas à un changement de couleur.

Afin de caractériser ce changement de couleur, un suivi de la réaction par spectroscopie UV-visible a été effectué (Fig. IV-9).

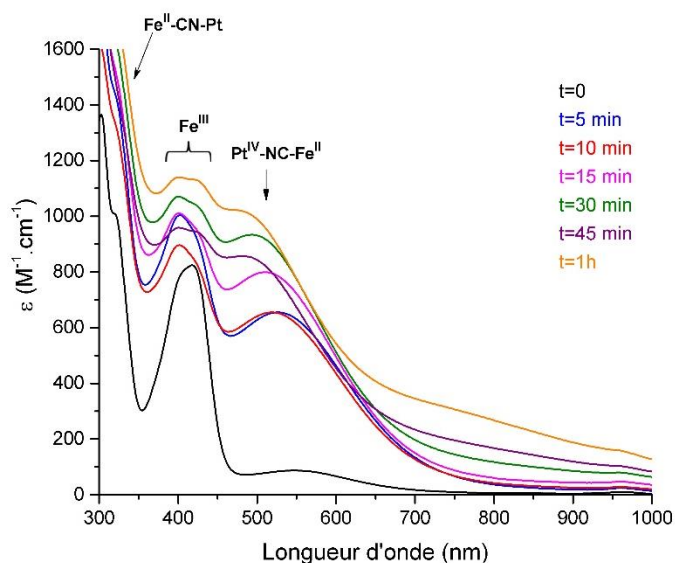


Figure IV-9. Spectres UV-visible des solutions de Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> en cours de réaction

Deux zones principales sont observées sur les spectres UV-visible :

- Entre 400 et 420 nm, à t=0, le signal est dominé par la présence d'une transition LMCT (Ligand Metal Charge Transfer) du ferricyanure. L'évolution des transitions dans ce domaine est liée à la formation de ponts Fe<sup>III</sup>-CN-Pt.

- Entre 490 et 530 nm, nous supposons que le transfert de charge MMCT est dû à la présence d'entités Fe<sup>II</sup>-CN-Pt<sup>IV</sup>. Un décalage de cette bande, vers les plus grandes énergies, est constaté lorsque le temps de chauffage augmente. Celle-ci est présente dès le début de la réaction et le coefficient d'extinction molaire augmente, signifiant que cette espèce est produite au cours du temps.

Une légère contribution est observée, vers 320 nm, pouvant être attribuée à des entités  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CN}$  pontantes. La présence de forme libre ne peut pas être exclue. Les bandes d'absorption se situent dans le vert et le violet-bleu, expliquant la couleur rouge foncé des solutions de cyanosols.

### II.3.2 Caractérisation de taille et de structure

#### II.3.2.1 Diffusion dynamique de la lumière

Des mesures de DLS ont été effectuées aux différents temps de chauffage de la synthèse. Ainsi, l'influence du temps de réaction sur le diamètre hydrodynamique des particules peut être étudiée.

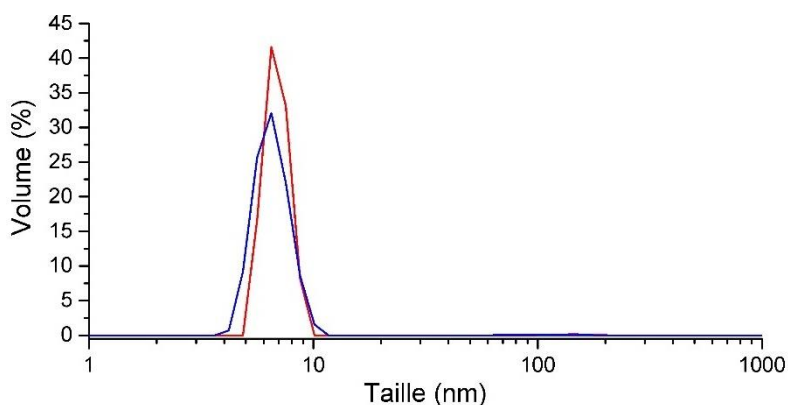


Figure IV-10. DLS des particules  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$  chauffées 15 min (rouge) et 60 min (bleu)

Le temps de chauffage ne provoque pas de modification du diamètre hydrodynamique des cyanosols, qui est d'environ 6 nm. Le potentiel  $\zeta$  a également été mesuré. Celui-ci est négatif, de l'ordre de -50 mV, expliquant la bonne stabilité de ces objets en solution aqueuse sur plusieurs semaines.

#### II.3.2.2 Microscopie électronique en transmission

Des grilles de MET, contenant les particules de  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$  chauffées 15 et 60 min, ont été préparées et observées. Les tailles des objets ont ensuite pu être mesurées. La figure IV-11 est un exemple des images de microscopie obtenues et le tableau IV-4 résume les tailles mesurées par DLS et MET.

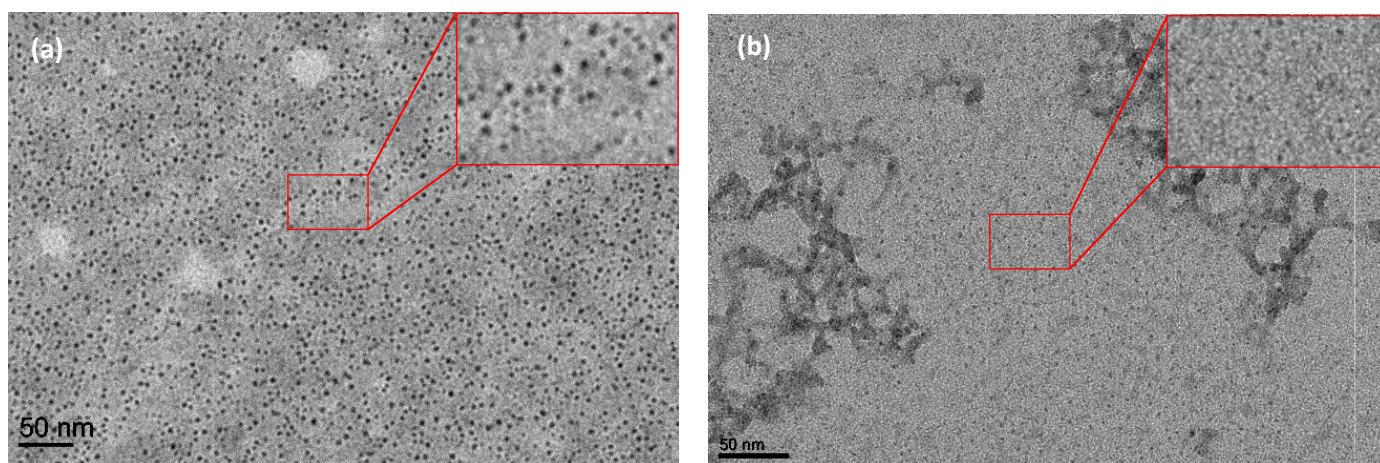


Figure IV-11. Images MET des particules  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$  en fin de synthèse (a) 15 min de chauffage ; (b) 60 min de chauffage

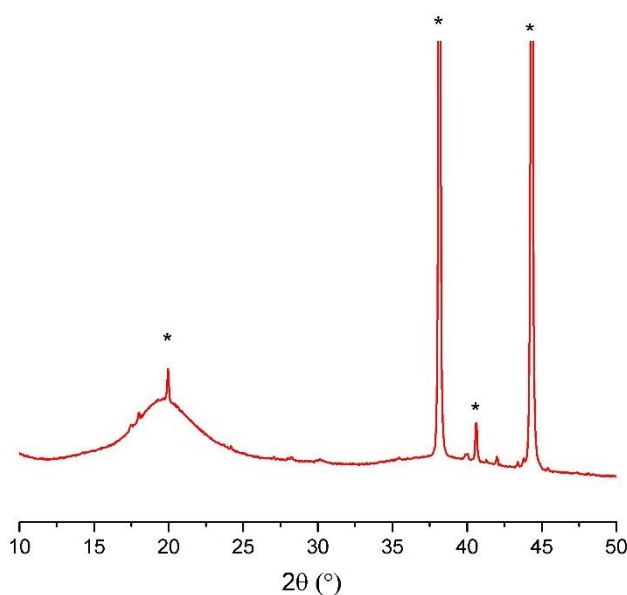
DLS (nm)		MET (nm)	
15 min	60 min	15 min	60 min
6	6	2,8 ± 0,8	2,6±0,9

**Tableau IV-4.** Bilan des tailles obtenues par DLS et MET pour les particules Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>@(dextran)<sub>25</sub>

Les cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> sont des particules de petites tailles, d'environ 3 nm, et bien individualisées d'après la microscopie. Le temps de chauffage n'a pas d'influence sur la taille des particules.

### II.3.2.3 Diffraction des rayons X

Les composés ont été analysés par DRX sur poudre. Sur les diffractogrammes obtenus, il n'y a pas de pics de Bragg pouvant être attribués à la présence des particules.



**Figure IV-12.** Diffractogramme des particules de cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> chauffées pendant 60 min (\* porte échantillon)

Le CTA est à l'origine du pic large se situant autour de 20°. Cette analyse démontre la structure amorphe des cyanosols liée à la présence de défauts et/ou à la très faible taille des objets.

L'ensemble de ces caractéristiques montre que les cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> et Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> sont des systèmes proches d'un point de vue morphologique et structural.

### II.3.3 Caractérisation chimique par spectroscopie IR

La composition chimique des NPs a été explorée par spectroscopie IR. Par cette méthode, nous pouvons mettre en avant la nature des enchaînements M-NC-Fe présents dans les NPs. Ceux-ci ont une bande de vibration intense autour de 2100 cm<sup>-1</sup>, qui se déplace en fonction de la nature des métaux dans l'environnement. Des bandes caractéristiques de nos composés peuvent également être présentes à plus basse fréquence (Fig.IV-13(b)).

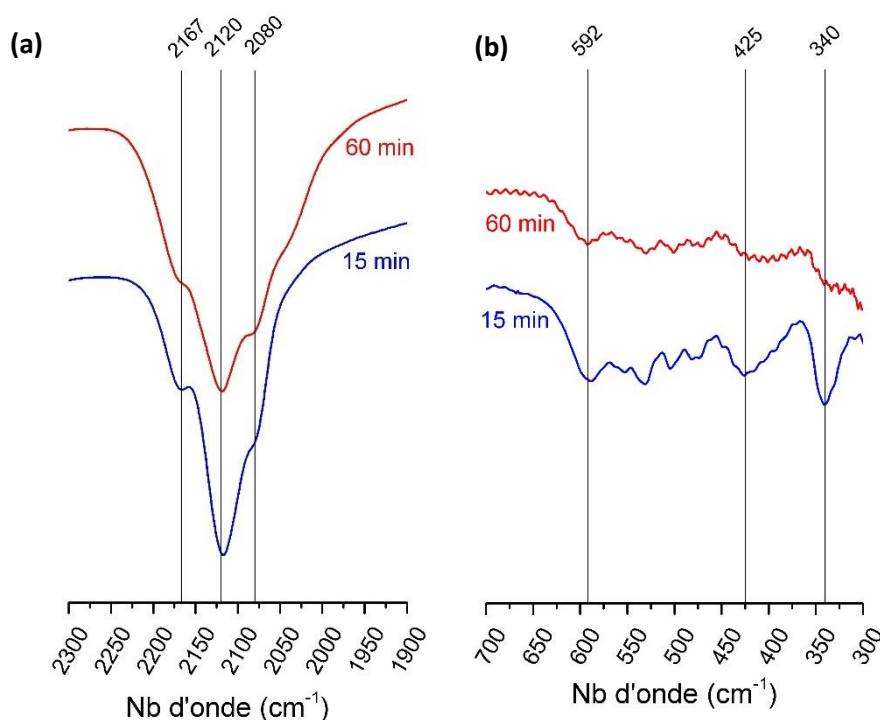


Figure IV-13. Spectres IR des particules Pt<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup> (a) entre 2300 et 1900 cm<sup>-1</sup>; (b) entre 700 et 300 cm<sup>-1</sup>

A plus basse fréquence, à 340 cm<sup>-1</sup>, une bande caractéristique des liaisons Pt-Cl du précurseur engagé dans la réaction est présente pour les composés chauffés 15 min. Ceci signifie que le précurseur de Pt<sup>II</sup> n'a pas totalement réagi en 15 min de réaction et qu'il se trouve piégé au moment de l'ajout de CTA dans la solution. Cette bande n'est pas présente après une heure de chauffage. Dans les deux conditions de synthèse, une vibration à 592 cm<sup>-1</sup> correspondant à la liaison Fe-C est présente. L'analyse à basse fréquence exclut la présence de Fe<sup>III</sup>-CN libres (à 390 cm<sup>-1</sup>). En revanche, la bande à 425 cm<sup>-1</sup> environ atteste de la présence résiduelle de Fe<sup>III</sup>-CN pontants.

Plusieurs bandes caractérisant les cyanures des enchaînements M-NC-Fe se situent entre 2300 cm<sup>-1</sup> et 1900 cm<sup>-1</sup>. Ces bandes correspondent aux différents environnements des cyanures :

- 2080 cm<sup>-1</sup> : cyanures terminaux de type Fe<sup>II</sup>-CN ;
- 2120 cm<sup>-1</sup> : plusieurs attributions sont possibles, Fe<sup>II</sup>-CN pontants et/ou Fe<sup>III</sup>-CN terminaux ;
- 2167 cm<sup>-1</sup> : vibration des cyanures associés aux paires Fe<sup>III</sup>-CN-Pt.

Le temps de chauffage ne modifie pas l'environnement des ponts cyanures. La proportion de chaque contribution semble identique pour les particules chauffées pendant 15 et 60 min. L'analyse par spectroscopie IR met en lumière la réduction d'une partie importante du Fe<sup>III</sup> introduit en Fe<sup>II</sup>.

Des analyses EDS ont été effectuées sur ces échantillons au CTA, celles-ci sont présentées en annexe 15. Cependant, avec ces conditions de précipitation, nous ne sommes pas capables de discriminer les particules d'éventuelles impuretés. Les résultats obtenus ne sont, ainsi, pas fiables. La suite de l'étude sur ces composés se fera avec un enrobage au dextran. Ce polymère biocompatible interagit par des liaisons hydrogène avec les cyanures en surface des particules permettant de les précipiter seules.

## II.4 Cyanosols à base de Pd<sup>II</sup>

Afin d'obtenir des cyanosols Pd<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>, le tétrachloroplatinate a été remplacé par le tétrachloropalladate. Les réactions ont été menées à température ambiante. Deux compositions différentes ont été élaborées : l'une avec du ferrocyanure et l'autre avec du ferricyanure. Comme pour les particules composées de Pt<sup>II</sup>, les cyanosols de Pd<sup>II</sup> ont été analysés afin de connaître leurs tailles, leurs structures et leurs compositions chimiques.

### II.4.1 Caractérisation de taille et structurale

#### II.4.1.1 Diffusion dynamique de la lumière

Les diamètres hydrodynamiques des particules en fin de synthèse ont été mesurés par DLS. Les cyanosols Pd<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> et Pd<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> sont de faibles tailles, autour de 3 nm. Une étude dans le temps a montré une évolution du diamètre hydrodynamique des particules de Pd<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> : après 24h, le diamètre est de 7,5 nm. Après 30 min, le potentiel  $\zeta$  est positif puis il évolue après 1h vers une valeur de -30 mV et se stabilise. Ceci démontre de manière indirecte que la réaction n'est pas terminée au bout de 30 min. Les particules de Pd<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> sont beaucoup plus stables de ce point de vue. En effet, le diamètre hydrodynamique n'évolue pas pendant plusieurs jours.

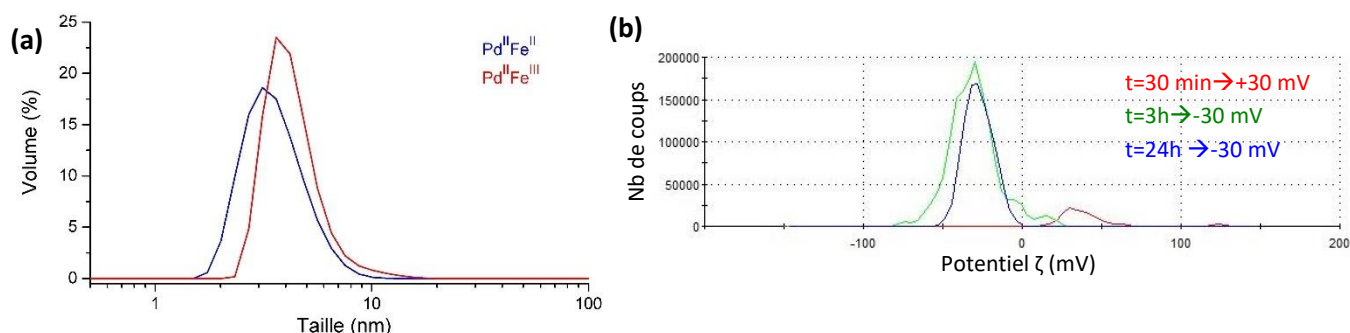


Figure IV- 14.(a) Diamètres hydrodynamiques mesurés par DLS des particules Pd<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> et Pd<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> ; (b) Potentiel  $\zeta$  des cyanosols Pd<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>

#### II.4.1.2 Microscopie électronique en transmission

Les cyanosols Pd<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> ont été observés par MET après 1h et 4h de réaction mais ne montrent pas d'évolution de la taille contrairement à la DLS. Ceci peut être dû à une agrégation progressive des particules en solution. Les systèmes au Pd<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> ont également fait l'objet d'une étude en microscopie. Les systèmes sont proches avec une taille d'environ 3 nm.



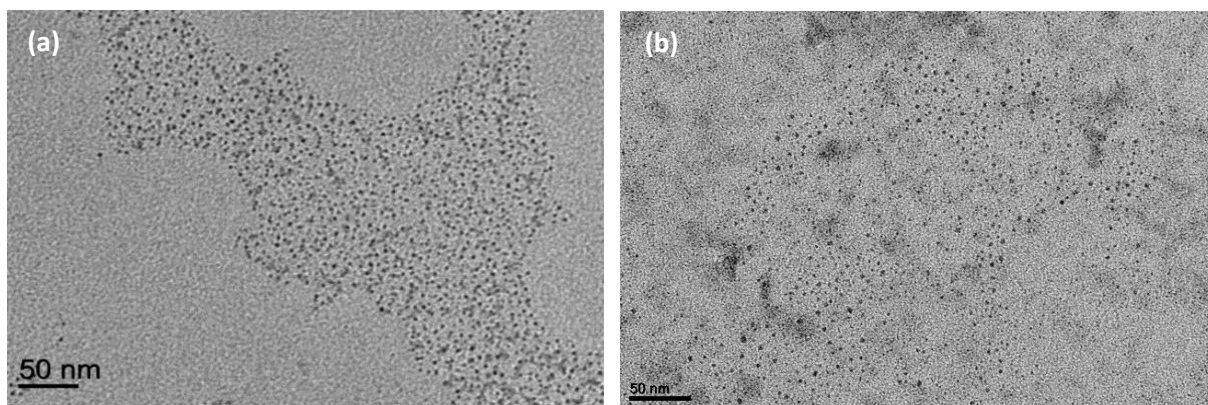


Figure IV- 15. Micrographies des cyanosols (a) Pd<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> après 1h de réaction ; (b) Pd<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> après 30 min de réaction

Les tailles mesurées, à partir des images présentées sur la figure IV-15, sont de  $2,3 \pm 0,6$  nm pour les composés Pd<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> et de  $3,5 \pm 0,9$  nm pour les cyanosols Pd<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>.

#### II.4.1.3 Diffraction des rayons X

La substitution aléatoire des ligands chloro dans la sphère de coordination du palladium est à l'origine du caractère amorphe des particules qui sont de très faibles tailles et présentent des défauts. Le diffractogramme montre la présence de pics sans doute dus à des impuretés dans le composé (Fig.IV-16).

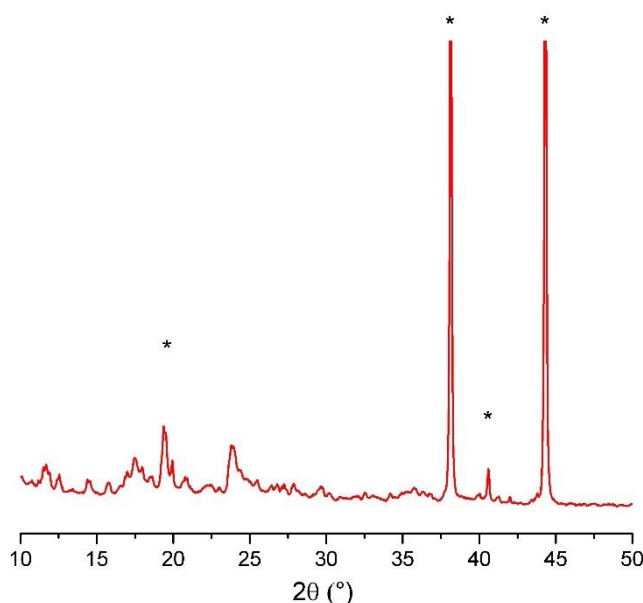


Figure IV-16. Diffractogramme des cyanosols Pd<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> (\* porte échantillon)

### II.4.2 **Caractérisation chimique**

#### II.4.2.1 Spectroscopie infra-rouge

Comme précédemment, l'environnement des cyanures a été caractérisé par spectroscopie IR.

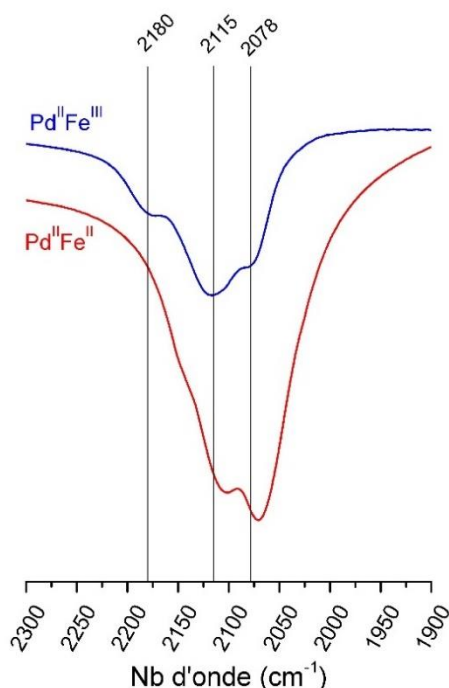


Figure IV-17. Spectres IR des cyanosols Pd<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> et Pd<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> focalisés dans la zone des enchainements cyanures

Cette technique montre une différence d'environnement des ponts cyanure en fonction du précurseur de fer. Les cyanosols Pd<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> présentent deux contributions : à 2070 cm<sup>-1</sup> sont présents les cyanures terminaux, Fe<sup>II</sup>-CN, et à 2102 cm<sup>-1</sup>, la bande caractérise la présence de cyanure pontant de type Fe<sup>II</sup>-CN-Pd<sup>II</sup>.

Dans le cas des composés Pd<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>, trois contributions sont présentes : à 2078 cm<sup>-1</sup> se trouvent les cyanures terminaux reliés au Fe<sup>II</sup> et à 2180 cm<sup>-1</sup>, les cyanures liés au Fe<sup>III</sup>. La bande de vibration située à 2115 cm<sup>-1</sup> peut être attribuée à la présence d'entités Fe<sup>II</sup>-CN-Pd et de cyanures terminaux, Fe<sup>III</sup>-CN.

Un décalage des bandes attribuées à la présence de Fe<sup>II</sup> est constaté sur les deux spectres. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de Pd<sup>IV</sup> dans le composé Pd<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> qui serait à l'origine d'un environnement modifié des cyanures.

Ces attributions sont en parfait accord avec ce qui a été obtenu pour les cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> et Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>. Ces analyses montrent que, comme dans le cas du platine, une partie du Fe<sup>III</sup> introduit est réduit en Fe<sup>II</sup>. Les solutions de Pd<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> évoluent d'une couleur rouge vers une couleur verte après 24h de réaction (Annexe 16). Les solutions de Pd<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> ont une couleur orangée.

#### II.4.2.2 Analyses EDS

Après avoir analysé l'environnement des cyanures, il est important de connaître la composition en métaux et le taux de substitution des chlores dans la sphère de coordination des Pd<sup>II</sup>. Le tableau IV-11 résume les résultats obtenus.

Echantillons	Ratio Cl/Pd	Ratio Pd/Fe	Ratio K/Fe
Pd <sup>II</sup> Fe <sup>II</sup>	0,2	1	1,2
Pd <sup>II</sup> Fe <sup>III</sup>	0,1	1,1	1,5

Tableau IV-11. Rapports Cl/Pd, Pd/Fe et K/Fe déterminés par EDS pour les composés Pd<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> et Pd<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>

La composition chimique contient peu de Cl et environ un Pd pour un fer. La présence de Fe<sup>II</sup> ou de Fe<sup>III</sup> ne semble pas influencer le rapport métallique, qui est voisin de la stœchiométrie initiale. Ceci peut s'expliquer par la plus forte réactivité du Pd<sup>II</sup>, conduisant à un échange de la totalité des ligands chloro, mais avec une coordination statistique de 4 azotes sur les 6 autour du ferrocyanure dans le cas de la poudre Pd<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>. Sur le système Pd<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>, le changement de géométrie autour du palladium lié à son oxydation partielle induit un environnement octaédrique qui peut expliquer une stœchiométrie voisine de 1:1. Ces particules n'ont pas pu faire l'objet d'une étude en XPS mais seront analysées par la suite.

## II.5 Conclusion

Des cyanosols contenant du Pt<sup>II</sup> ou Pd<sup>II</sup> et du Fe<sup>II</sup> ou Fe<sup>III</sup> ont été mis au point en solution aqueuse avec différentes conditions de synthèse. La concentration en précurseurs, la température et le temps de réaction ont été variés montrant que ces paramètres ont peu d'influence sur la taille des particules. D'après les mesures de DLS, les particules Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> sont agrégées en solution (diamètre hydrodynamique d'environ 160 nm), mais ceci n'a pas été confirmé par la microscopie.

De plus, l'ajout d'une faible quantité de polymère dans les solutions permet de lever cet état d'agrégation (diamètre hydrodynamique inférieur à 10 nm). Cette tendance n'a pas été observée pour les autres systèmes développés. En MET, quel que soit le système, les tailles mesurées sont de l'ordre de 3 nm.

Afin d'augmenter la taille des objets Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>, plusieurs stratégies de grossissement ont été envisagées. La première a été de jouer sur les conditions de synthèse. Ainsi nous avons modifié le temps de chauffage, la vitesse d'ajout des solutions de précurseurs, la concentration de ces solutions (0,5 mM) et la vitesse d'agitation. Chaque changement de paramètre a fait l'objet d'une nouvelle expérience. Une seconde stratégie a été la croissance d'une coquille de même composition par ajout séquentiel. Ces expériences n'ont pas permis de montrer une évolution significative de la taille des particules.

Des cyanosols à base de palladium ont également été développés. Ces composés ont fait l'objet d'une étude préliminaire de la croissance par « épitaxie » d'une coquille de même composition de manière analogue à celle mise au point sur les ABP<sup>8</sup>. Des cœurs-coquille d'une soixantaine de nanomètres sont obtenus mais sont agrégés en solution comme le montre la figure IV-18.

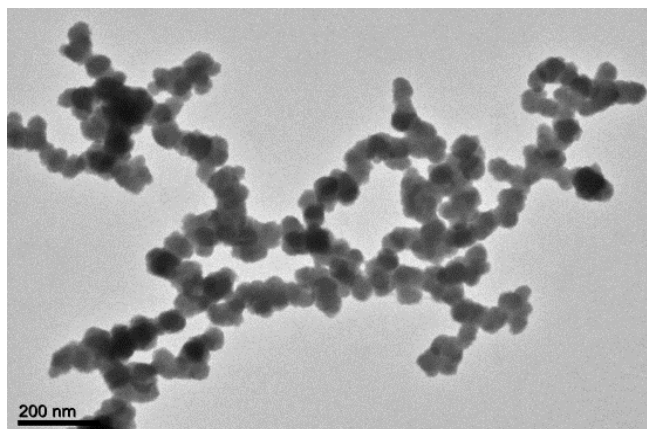


Figure IV-18. Image MET des particules Pd<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>@Pd<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>



Afin de mettre en évidence la croissance, nous avons choisi de faire croître une coquille épaisse. En diminuant la taille de la coquille, il sera sans doute possible de limiter l'état d'agrégation. Ceci démontre également que le Pd<sup>II</sup> permet de moduler plus facilement les objets. En effet, le platine est un élément très inerte qui est difficile à faire réagir. Malgré cela, nous avons exploré la croissance d'une coquille de Gd<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup> sur des cœurs Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> afin de conférer des propriétés d'agents de contraste T<sub>1</sub> pour l'IRM (Annexe 19). Bien que la spectroscopie IR montre la présence du réseau Gd<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup>, la taille des particules est constante et aucune preuve n'a pu être apportée, pour l'instant, quant à la co-localisation du Pt<sup>II</sup> et du Gd<sup>III</sup> au sein d'une même particule. Une analyse par STEM-EELS serait nécessaire.

Les cyanosols Pd<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> ont été étudiés, dans le cadre de la thèse d'Alice Castan<sup>9</sup>, en tant que pré-catalyseurs de la croissance de NTc. Bien que l'étape de production des NTc par CVD n'ait pas été concluante, la réduction en particules bimétalliques a montré des résultats intéressants avec l'obtention de systèmes contenant un cœur de Pd et une coquille de Fe (Annexe 21). Ce sont ces particules métalliques qui serviront de catalyseurs. L'optimisation des cyanosols pour cette application sera d'avantage étudiée par la suite.

La grande inertie du Pt<sup>II</sup> a permis de mettre au point des cyanosols stables en solution pendant plusieurs jours, et dont la composition chimique peut être contrôlée par la température et le temps de chauffage. Les systèmes au Pd<sup>II</sup> et au Pt<sup>II</sup> sont très proches d'un point de vue structural et chimique.

La spectroscopie IR a mis en avant l'environnement proche des cyanures, qui est dépendant de l'utilisation du ferricyanure ou du ferrocyanure. Les cyanosols au palladium sont beaucoup plus réactifs, rendant la cinétique de réaction rapide. Ainsi, il est difficile de contrôler la composition car les ligands chloro sont rapidement substitués. En revanche, en modifiant la stœchiométrie de départ, cette modulation est possible.

Dans cette partie, les particules étudiées ont été précipitées à l'aide de CTA pour les caractériser. L'utilisation de cet ammonium peut, toutefois, entraîner la coprécipitation des particules et d'autres molécules contenues dans la solution. De plus, pour viser des applications médicales, il est nécessaire d'enrober les particules par un polymère biocompatible. Comme pour les particules de BdP, nous avons choisi de travailler avec le dextran qui est un polymère ayant une forte affinité pour les cyanures.

### **III. Les cyanosols comme radio-amplificateurs ?**

L'hadronthérapie est une nouvelle forme de radiothérapie utilisant des sources ioniques (C<sup>6+</sup>, He<sup>2+</sup>, H<sup>+</sup>) comme rayonnement. L'utilisation de nanoparticules à base d'éléments lourds, riches en électrons, permet d'amplifier l'effet de l'irradiation. Les propriétés radio-amplificatrices des cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> et Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> enrobés de dextran ont été étudiées. Nous avons choisi ces deux composés car le platine a déjà été étudié sous forme de nanoparticules métalliques<sup>10</sup>. De plus, les cyanosols à base de cet élément sont très stables.

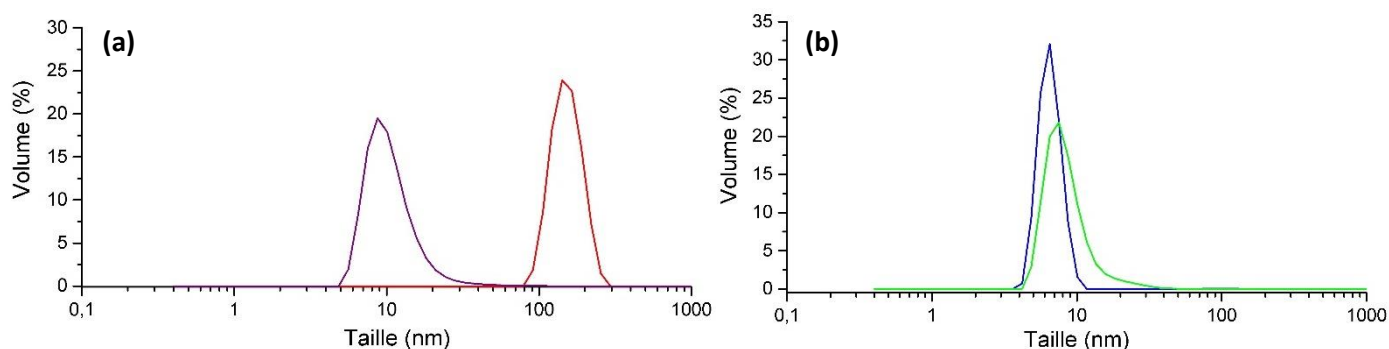
### III.1 Caractérisation des particules enrobées de dextran

Après synthèse, les particules sont enrobées par 25 équivalents de monomère de dextran par rapport à la quantité de Pt<sup>II</sup> et de Fe<sup>III</sup>. Les objets sont ensuite précipités par ajout d'acétone. Après une étape de centrifugation et de séchage sous vide, une poudre est obtenue. Ces échantillons seront appelés Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>@(dextran)<sub>25</sub> et Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>@(dextran)<sub>25</sub>.

#### III.1.1 Détermination de la taille

##### III.1.1.1 Diffusion dynamique de la lumière

Comme décrit dans le paragraphe précédent, en fin de synthèse, les NPs de cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> ont un grand diamètre hydrodynamique, sans doute lié à une agrégation en solution. Comme le montre la figure IV-19.(a), la présence de dextran permet de supprimer cet état d'agrégation. Les particules enrobées de dextran sont redispersées dans l'eau à une concentration en Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> de 2 mM et ont un diamètre hydrodynamique d'environ 9 nm.



**Figure IV-19.** Diamètres hydrodynamiques déterminés par DLS des particules **(a)** Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> en fin de synthèse (rouge), après enrobage au dextran et redispersion dans l'eau (violet); **(b)** Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> en fin de synthèse (bleu), après enrobage au dextran et redispersion dans l'eau (vert)

Les cyanosols de Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> ne présentent pas cet état d'agrégation en solution et ont un diamètre hydrodynamique d'environ 7 nm, qui est proche après enrobage au dextran.

##### III.1.1.2 MET

Les redispersions ont fait l'objet d'observation en MET. La quantité importante de polymère entourant les particules, ainsi que leurs petites tailles compliquent l'observation et la détermination des tailles à partir des images.

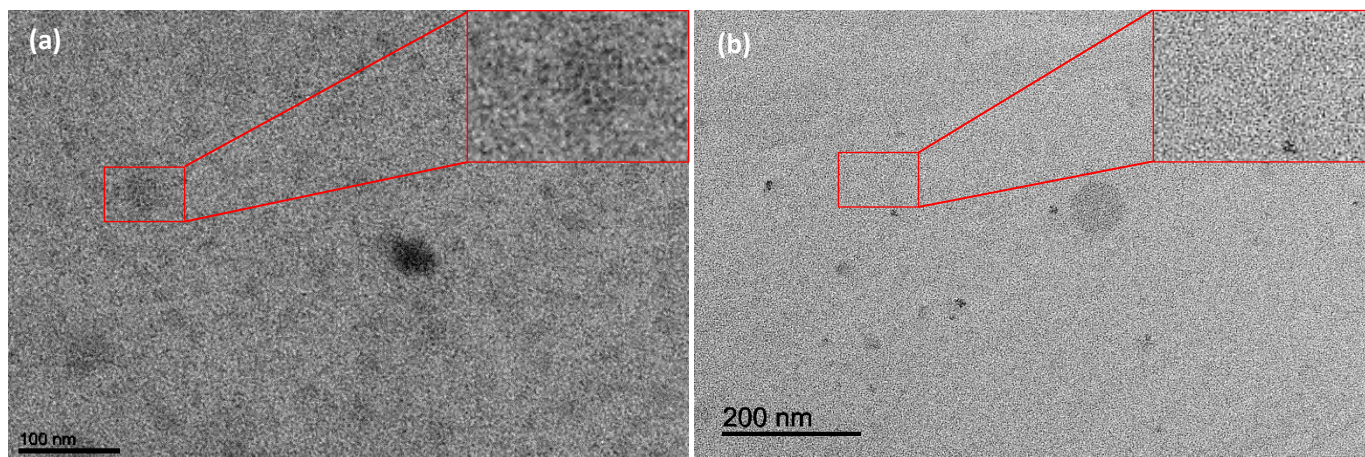


Figure IV-20. Images MET des particules redispersées dans l'eau (a)  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}@(\text{dextran})_{25}$  ; (b)  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}@(\text{dextran})_{25}$

DLS (nm)		MET (nm)	
$\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}@(\text{dextran})_{25}$	$\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}@(\text{dextran})_{25}$	$\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}@(\text{dextran})_{25}$	$\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}@(\text{dextran})_{25}$
9	7	$2,5 \pm 0,6$	$2,8 \pm 0,4$

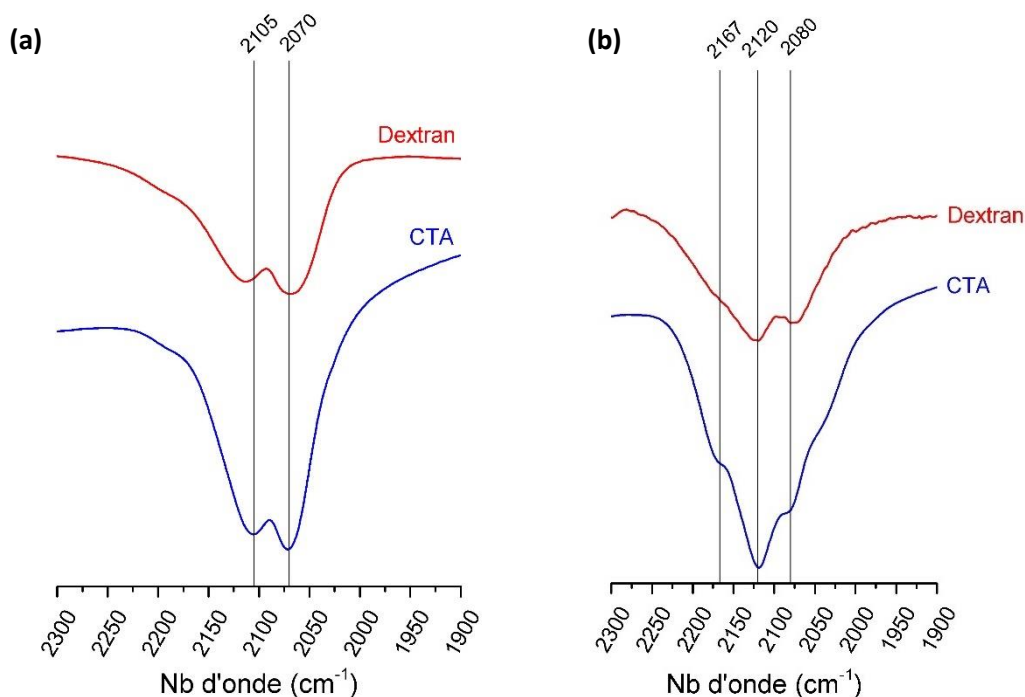
Tableau IV-12. Tailles obtenues par DLS et à partir des images MET pour les particules redispersées  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}@(\text{dextran})_{25}$  et  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}@(\text{dextran})_{25}$

La présence du dextran n'entraîne pas d'augmentation de la taille. Les particules ont une taille proche de 3 nm, quelle que soit leur composition chimique.

### III.1.2 Composition chimique

#### III.1.2.1 Spectroscopie IR

Afin de connaître la composition chimique des objets synthésés, ceux-ci ont été analysés par spectroscopie IR. La présence du dextran empêche la détection de toutes les bandes caractéristiques des cyanures à basse fréquence. C'est pourquoi l'étude s'est concentrée sur la bande de vibration des cyanures autour de  $2100 \text{ cm}^{-1}$ . Les spectres obtenus ont été comparés à ceux des NPs précipitées par ajout de CTA.



**Figure IV-21.** Spectres IR focalisés sur la bande caractéristique des cyanures précipitées au CTA (bleu) ou enrobées de dextran (rouge) des particules **(a)**  $Pt^{II}Fe^{II}$ ; **(b)**  $Pt^{II}Fe^{III}$

Les bandes présentes sur les spectres IR sont identiques en présence de dextran et de CTA. Les composés  $Pt^{II}Fe^{II}$  ne semblent pas influencés par la nature de l'enrobage. Au contraire, pour les particules  $Pt^{II}Fe^{III}$ , la proportion de chaque bande est modifiée. Leur attribution est décrite dans le paragraphe II.3.3.1. La proportion de  $Fe^{III}-CN$  libre semble diminuée en présence de dextran, alors que les bandes attribuées à la présence de cyanures liés ou terminaux du  $Fe^{II}$  sont plus importantes. L'enrobage par un polymère permet de précipiter uniquement les particules synthétisées, tandis que le CTA peut entraîner d'autres entités chargées.

### III.1.2.2 Analyse élémentaire et EDS

Les particules ont ensuite été analysées en EDS afin de déterminer la proportion en métaux dans leur composition, ce qui est indispensable pour mener des expériences d'irradiation. Les résultats obtenus par cette mesure permettent de déterminer des rapports atomiques entre les éléments. Ceux-ci sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Echantillons	Ratio Cl/Pt	Ratio Pt/Fe	Ratio K/Fe
$Pt^{II}Fe^{II}@(\text{dextran})_{25}$	0,8	1,2	3,1
$Pt^{II}Fe^{III}@(\text{dextran})_{25}$	2	1,2	3,9

**Tableau IV-13.** Rapports atomiques déterminés par EDS

D'après ces analyses pour les composés avec du  $Fe^{II}$ , trois ligands chloro ont été substitués, il y a donc environ un Cl résiduel dans la sphère de coordination du  $Pt^{II}$ . Le rapport Pt/Fe est compris entre 1 et 1,5, inférieur à celui des particules précipitées à l'aide de CTA. Les résultats obtenus par EDS montrent une quantité inférieure de  $Pt^{II}$  dans les particules enrobées de dextran, suggérant la présence de précurseur n'ayant pas réagi en solution. Les analyses élémentaires ont permis de déterminer la quantité de monomère de dextran présent autour des particules ainsi que le nombre de molécules d'eau.

Les unités formulaires déduites des analyses chimiques sont  $K_2Cl_{0,8}Pt^I[Fe^{II}(CN)_6]_{0,8}@(\text{dextran})_{39},(H_2O)_{48}$  et  $K_{2,4}Cl_2Pt^I[Fe^{III}(CN)_6]_{0,8}@(\text{dextran})_{129},(H_2O)_{154}$ . La forte proportion de dextran dans le composé  $Pt^II Fe^{III}$  est certainement due à une erreur au moment de la synthèse. Celui-ci a été synthétisé dans le cadre du stage de M<sub>2</sub> de Youven Benseghir.

### III.1.2.3 Spectrométrie photoélectronique X (XPS)

La spectrométrie photoélectronique X, appelée XPS, est une analyse de surface qui consiste à sonder les électrons de cœur des éléments, par des rayons X. L'énergie des électrons mesurée est caractéristique de l'élément sondé et de son degré d'oxydation. Cette forme d'analyse est également dépendante de l'environnement de l'atome sondé. Ces mesures ont été effectuées à l'ICMMO par Diana Dragoe. L'objectif est de déterminer le degré d'oxydation du Pt et du Fe dans les cyanosols synthétisés. Les spectres XPS sont présentés dans l'annexe 22. La présence de dextran empêche la détection d'un signal suffisamment intense. Les mesures ont été effectuées sur les particules récupérées par du CTA dans le cas des  $Pt^II Fe^{II}$  et sur les particules obtenues après filtration sans enrobage pour le composé  $Pt^II Fe^{III}$ .

Dans un premier temps, les analyses des cyanosols  $Pt^II Fe^{II}$  ont montré la présence de fer aux degrés d'oxydation +II et +III. Les conditions de synthèse incluent un temps de chauffage qui pourrait entraîner des réactions d'oxydo-réduction avec l'oxydation du ferrocyanure. L'interprétation des spectres obtenus, dans ce cas, est difficile car le CTA entraîne probablement les précurseurs chargés négativement donnant lieu à des mélanges qui ne représentent pas la composition des particules.

C'est pourquoi nous avons choisi d'analyser les particules de  $Pt^II Fe^{III}$  nues après une étape permettant d'éliminer les autres espèces. Ceci sera également fait pour les cyanosols  $Pt^II Fe^{II}$  par la suite. Les analyses XPS montrent alors clairement la présence de  $Fe^{II}$  et de  $Fe^{III}$ , mais également la présence de  $Pt^{IV}$ . Ceci signifie que les cyanosols  $Pt^II Fe^{III}$  sont en réalité composés, en majorité, d'enchaînements  $Pt^{IV}-NC-Fe^{II}$ . Une étude de l'équipe de Bocarsly sur la formation de gel trimétallique de type  $[(NC)_5Fe^{II}-CN-Pt^{IV}(NH_3)_4-CN-Fe^{II}(CN)_5]^{4-}$  en présence de Pd montre que la formation d'un cyanogel à partir de précurseur de  $Fe^{III}$  et de  $Pt^{II}$  conduit à la formation d'entité trinuécléaire de  $Pt^{IV}Fe^{II,11}$ . Pour étudier uniquement ces entités, les auteurs passent par une étape de purification permettant d'éliminer le  $Fe^{III}$  notamment.

Pour résumer, les composés nommés  $Pt^II Fe^{III}$  sont majoritairement composés d'entités  $Pt^{IV}Fe^{II}$  et ont une couleur rouge se justifiant par la présence d'une bande d'intervallence vers 500 nm en spectroscopie UV-visible. L'absence de cette bande sur les spectres des cyanosols  $Pt^II Fe^{II}$  nous permet de penser que ceux-ci ne contiennent pas ou peu de  $Pt^{IV}$ . Ainsi, ils sont composés en majorité d'espèces  $Pt^II Fe^{II}$  ainsi que d'une faible proportion de  $Fe^{II}-CN-Fe^{III}$ . Ces composés ont alors une couleur verte caractéristique justifiée par la présence d'une bande d'intervallence vers 750 nm et d'un transfert de charge vers 410 nm en spectroscopie UV-visible.

## III.2 Irradiation de plasmides en présence de particules

En vue d'application en hadronthérapie, une première étape est d'étudier les propriétés radio-amplificatrices des particules de  $Pt^II Fe^{II}@(\text{dextran})_{25}$  sur une sonde moléculaire, les plasmides. Ces expériences ont été menées en collaboration avec Erika Porcel et Sandrine Lacombe à l'ISMO (Université Paris-Sud).

### III.2.1 Principe

Un plasmide est une molécule d'ADN hélicoïdal, double brin, circulaire extraite d'une bactérie. Ils peuvent adopter trois conformations : super-enroulé, circulaire et linéaire. La conformation adoptée par les plasmides est caractéristique des dommages subits par ceux-ci. Les plasmides utilisés sont de type pBR322. Ils sont commercialisés par Thermofisher et contiennent environ 95% de plasmides super-enroulé, environ 5% de plasmides circulaire et pas de conformation linéaire. Les plasmides sont contenus dans une solution tampon Tris-EDTA (TE) à pH=8 : 10 mM en Tris (trishydroxyméthylaminométhane) et 1 mM d'EDTA (Ethylènediaminetétraacétique). Le tableau IV-14 résume les conformations adoptées par l'ADN en fonction des dommages subis.

Conformation	Type de dommages
Super-enroulé	Pas de dommages
Circulaire	1 cassure dans 1 brin (SSB)
Linéaire	2 cassures face à face dans 2 brins (DSB)

Tableau IV-14. Conformation de l'ADN lorsque les brins ont été endommagés

Le protocole des expériences d'irradiation de plasmides a été mis au point par l'équipe d'Erika Porcel et Sandrine Lacombe<sup>42</sup>. Celui-ci est détaillé dans l'annexe 17. Cette expérience repose sur l'interaction entre les particules et les brins d'ADN. Dans notre cas, la situation n'est pas favorable car l'ADN et les particules de cyanosols sont chargés négativement. Ainsi, une distance non négligeable entre plasmide et NPs pourrait conduire à une réaction des radicaux avec d'autres molécules du milieu ou entre eux. Ces espèces ne diffusent pas sur de longues distances et doivent donc être proches des plasmides pour engendrer des dommages. Il est important de préciser que ce type d'expérience ne peut pas représenter ce qui va se passer lors d'expériences *in vitro* ou *in vivo* car les NPs se situent rarement dans le noyau des cellules<sup>13,14</sup> et ne sont donc pas en interaction directe avec l'ADN. Elles donnent toutefois une première indication de l'effet radio-amplificateur.

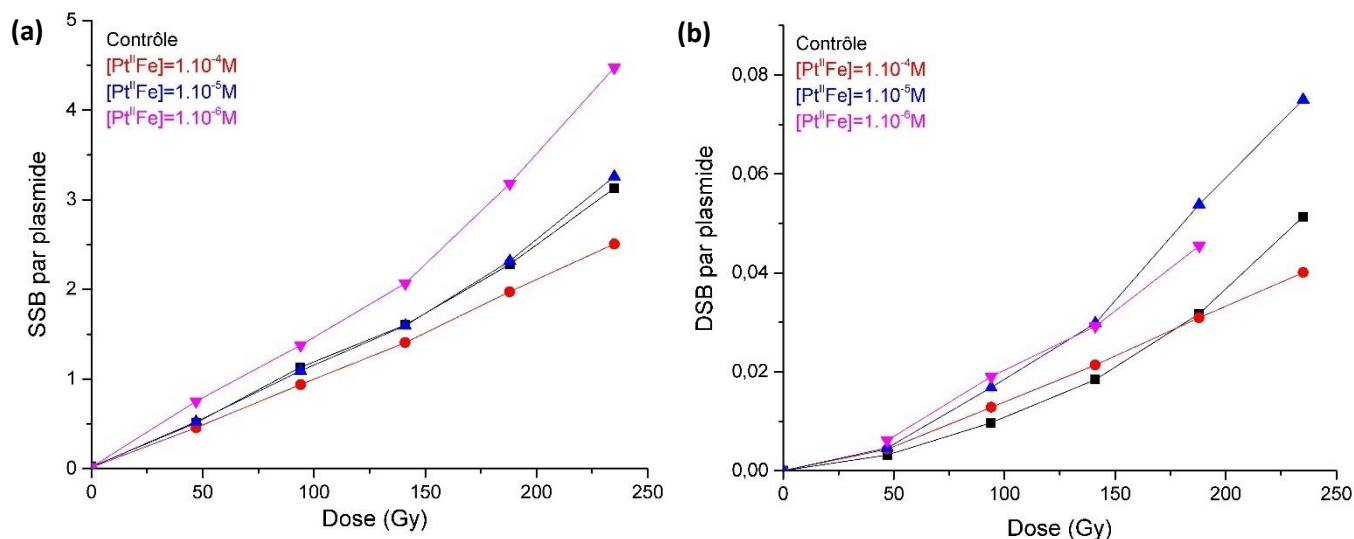
### III.2.2 Irradiations

Des solutions contenant une concentration variable de particules et des plasmides sont irradiées par des photons  $\gamma$  (Source de  $^{60}\text{Co}$ , Débit de dose :  $5,87 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Energie : 1,25 MeV). Trois concentrations en NPs ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  M en métaux) et six doses croissantes, de 0 à 250 Gy, ont été testées. Les différentes conformations plasmidiques sont quantifiées par une électrophorèse sur gel d'agarose. Les différentes formes vont migrer à des vitesses différentes. Un intercalant fluorescent de l'ADN (excité par une caméra UV) permet d'observer la fluorescence des plasmides. Celle-ci est enregistrée par une caméra CCD afin de pouvoir évaluer la quantité de chaque conformation présente. Comme présenté dans le tableau IV-14, deux types de cassures sont observés dans le cadre de ces expériences.

Pour mener à bien ces expériences, nous nous sommes assurés de la stabilité des particules dans le milieu de travail, le tampon TE. Ces données sont regroupées dans l'annexe 20.

#### III.2.2.1 Cyanosols $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}@(\text{dextran})_{25}$

Par calcul (Annexe 17), nous pouvons déterminer la quantité de dommages simples et complexes par plasmide en fonction de la dose d'irradiation.



**Figure IV-22.** Nombre moyen de dommage par plasmide en fonction de la dose **(a)** Cassure simple brin (SSB) ; **(b)** Cassure double brin (DSB)

Pour les dommages simples, un effet de la concentration est observé, mais celui-ci est inversement proportionnel à la concentration. Plus de dommages sont engendrés à faible concentration. Lorsque la concentration en  $Pt^{II}$  et  $Fe^{II}$  augmente, les performances des particules deviennent plus faibles que le contrôle, signifiant que les particules protègent, dans une certaine mesure, les plasmides de l'irradiation.

Les dommages complexes engendrés par les cyanosols ne semblent pas présenter une cohérence dans les effets qui peut être liée à une saturation de ceux-ci. Cependant, comme pour les dommages SSB, il semble que l'effet soit amplifié lorsque la concentration en NPs est plus faible, avec plus de dommages pour les concentrations de  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  M que pour le contrôle.

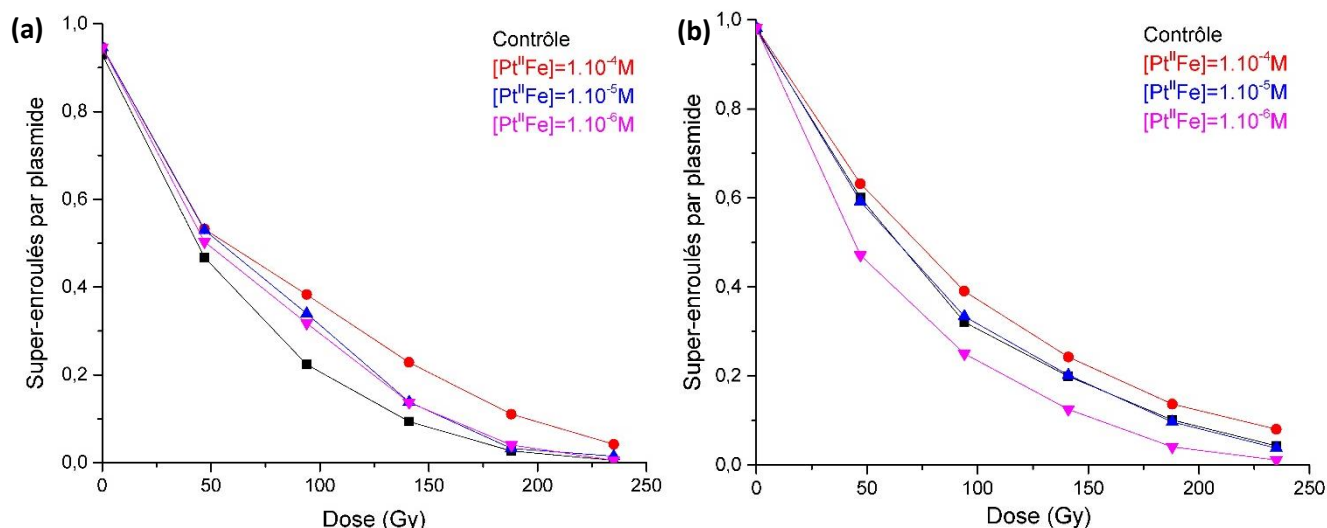
Pour avoir une idée plus précise de l'impact de nos NPs de cyanosols, des expériences d'irradiation sur cellules ont été effectuées et sont présentées dans la partie III.3 de ce chapitre.

### III.2.2.2 Cyanosols $Pt^{II}Fe^{III}@(\text{dextran})_{25}$

Les expériences d'irradiation sur plasmide ont été réalisées dans les mêmes conditions pour les particules de  $Pt^{II}Fe^{III}$ .

Au cours de cette expérience, les formes linéaires et les formes circulaires de l'ADN ne se sont pas séparées à cause d'un problème technique. Dans ces conditions, il n'est pas possible de quantifier les dommages simples et les dommages complexes. Nous avons, cependant, pu évaluer la quantité de forme super-enroulée qui est la forme intacte des plasmides. En normalisant les données par rapport à la quantité initiale de plasmides, il est possible d'obtenir des résultats exploitables (Fig.IV-23). Pour pouvoir comparer les résultats, la même représentation a été faite pour les cyanosols  $Pt^{II}Fe^{II}$ .





**Figure IV-23.** Représentation de la quantité de la forme super-enroulés par plasmide en fonction de la dose d'irradiation : **(a)** Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> ; **(b)** Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>

A travers cette représentation, nous constatons une diminution de la forme super-enroulée avec l'augmentation de la dose. La disparition de cette forme signifie que les brins d'ADN ont été abimés par l'irradiation. Cette diminution est plus importante et plus rapide pour le contrôle, c'est-à-dire en absence de particules. En présence de particules, la diminution de conformation super-enroulée est inversement proportionnelle à la concentration, ce qui signifie que ces particules protègent des effets du rayonnement.

Ces données sont proches de celles obtenues pour les cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>. Deux explications sont possibles pour justifier la diminution de dommage en présence de NPs. La première est un effet de recombinaison des ROS (saturation de l'effet). Les ROS (reactive oxygen species) sont des espèces radicalaires très réactives de type OH<sup>•</sup>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui sont à l'origine des dégradations de l'ADN. Lorsque ces espèces sont nombreuses, elles peuvent se recombinaison et former des espèces beaucoup moins réactives, d'autant plus si elles sont éloignées de la sonde moléculaire, ce qui entraînent moins de dommage. La seconde explication est un effet de radioprotection par capture des ROS par les particules.

### III.3 Expériences *in cellulo*

Pour évaluer l'effet des cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>@(dextran)<sub>25</sub> à l'échelle cellulaire, ceux-ci doivent être stables dans le milieu de culture des cellules, ici le DMEM. Pour cela, les NPs ont d'abord été redispersées dans ce milieu. La stabilité des particules dans ce milieu a été vérifiée par DLS et par un suivi UV-visible. Les résultats sont présentés dans l'annexe 20. Les particules ne s'agrègent pas dans le milieu et ne sont pas dégradées ce qui permet d'envisager des expériences sur cellules.

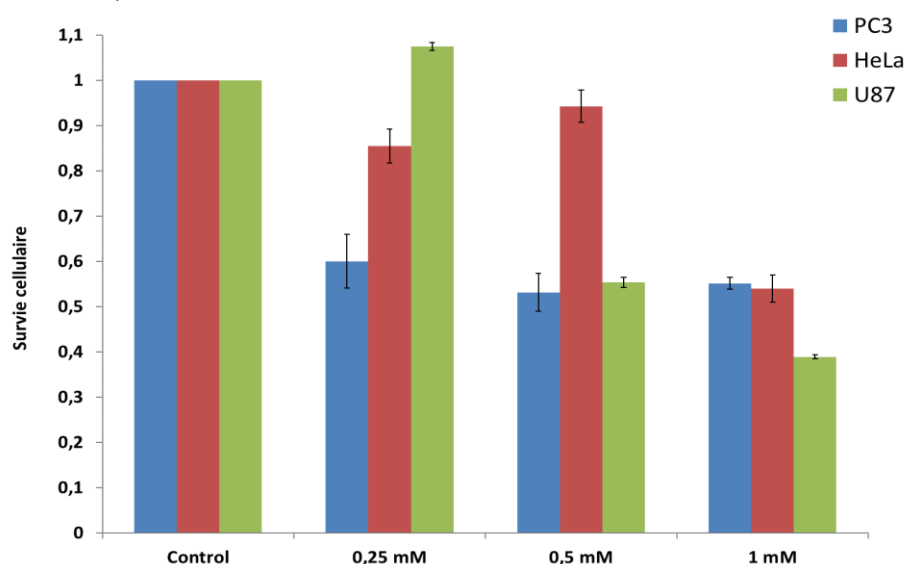
#### III.3.1 Expériences de toxicité

Afin de pouvoir évaluer l'effet de radio-amplification des cyanosols *in vitro*, il est important de connaître leur toxicité cellulaire. La toxicité des particules de cyanosols a été évaluée par survie clonogénique dont le protocole est explicité en annexe 18. Trois lignées cellulaires humaines tumorales ont été testées car celles-ci sont plus ou moins sensibles à la présence des particules. Les trois lignées utilisées sont :



- PC3 : cellules du cancer de la prostate,
- HeLa : métastases du cancer du col de l'utérus,
- U87 : cellules du glioblastome.

Le test de survie clonogénique consiste à évaluer la capacité des cellules à se diviser ce qui rend compte de leur survie ainsi que de leur capacité à proliférer. Après 6h d'incubation des particules dans les cellules, celles-ci sont remises en culture pendant 15 jours. Si la cellule se divise plusieurs fois, elle va former des colonies. Celles-ci sont ensuite comptées. En connaissant le nombre de cellules mises en culture au départ, nous pouvons alors déterminer la survie cellulaire en fonction de la concentration en particules et de la lignée cellulaire. Comme le montre la figure IV-24, les cyanosols de  $Pt^{II}Fe^{II}$  ont une toxicité non négligeable pour les lignées cellulaires PC3 et U87. Les concentrations en métaux évaluées au cours de ces expériences *in vitro* sont élevées, ce qui peut expliquer la toxicité non négligeable. Les cellules HeLa semblent moins sensibles à la présence des NPs. En effet, pour des concentrations de 0,25 mM et 0,5 mM en  $Pt^{II}$  et  $Fe^{II}$ , la viabilité est supérieure à 90%, permettant de mener à bien des expériences d'irradiation sur les cellules HeLa.

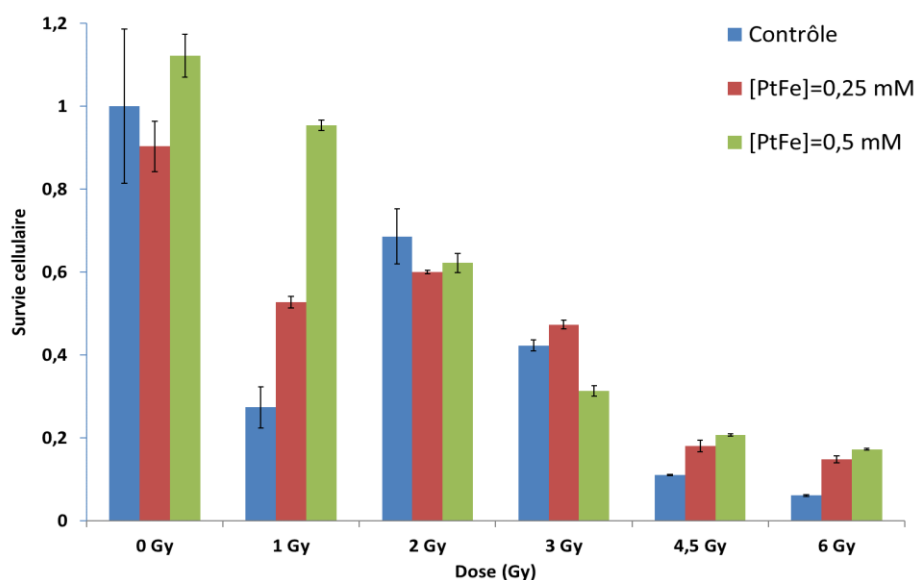


**Figure IV-24.** Survie cellulaire des particules  $Pt^{II}Fe^{II}@(\text{dextran})_{25}$  évaluées sur 3 lignées cellulaires (PC3, HeLa et U87) à 3 concentrations en métaux (0,25 mM, 0,5 mM et 1 mM)

### III.3.2 Irradiations des cellules HeLa en présence de cyanosols

Afin de mesurer l'effet des NPs combinées à l'irradiation, des mesures de survie clonogénique ont été effectuées de la même manière que pour l'évaluation de la toxicité. Nous avons mené cette étude sur les cellules HeLa irradiées par une source  $\gamma$  ( $^{137}\text{Cs}$ , énergie 0,66 MeV, débit de dose  $\approx 1 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Les solutions aqueuses de NPs pour incubation des cellules doivent être très concentrées (50 mM en métaux) afin de minimiser la quantité d'eau en contact des cellules et éviter un choc osmolaire. La forte proportion en dextran conduit à une viscosité très importante des solutions, rendant leur manipulation compliquée. C'est pourquoi la quantité de monomère de dextran enrobant les particules a été diminuée à 12,5 équivalents. Ainsi, les particules utilisées pour ces expériences ont la composition chimique suivante :  $K_{2,1}Cl_{0,5}Pt^{II}_1[Fe^{II}(CN)_6]_{0,9}@(\text{dextran})_{23}, (H_2O)_{38}$ .

Les cellules HeLa ont été incubées pendant 6h avec les particules  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}@(\text{dextran})_{12,5}$  à des concentrations en  $\text{Pt}^{\text{II}}$  et  $\text{Fe}^{\text{II}}$  de 0,25 mM et 0,5 mM. Les cellules ont ensuite été rincées puis irradiées avec 6 doses différentes comprises entre 0 et 6 Gy. Les doses utilisées pour irradier les cellules sont beaucoup plus faibles que celles utilisées pour les plasmides à cause de la taille de la cible et du milieu des plasmides qui peut capter des espèces radicalaires. Après irradiation, les cellules sont remises en culture pendant 15 jours. Puis les colonies formées sont comptées. De la même manière que pour les tests de toxicité, la survie cellulaire est déduite en fonction de la concentration en  $\text{Pt}^{\text{II}}$  et  $\text{Fe}^{\text{II}}$  et de la dose. Les résultats sont présentés à la figure IV-25.



**Figure IV-25.** Survie cellulaire mesurée par test clonogénique après irradiation des cellules HeLa à plusieurs doses sans particules (contrôle), avec les particules  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}@(\text{dextran})_{12,5}$  à une concentration métallique de 0,25 mM ou 0,5 mM

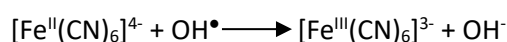
Un effet contraire à celui attendu est observé. En effet, en présence de cyanosols, la survie cellulaire est améliorée pour la plupart des doses, et ce, proportionnellement à la concentration.

### III.4 Discussion

Le platine est un élément de choix pour être utilisé comme radio-amplificateur. C'est pourquoi nous avons choisi de développer des cyanosols de type  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II/III}}@(\text{dextran})_{25}$ . Ces objets sont de petite taille et ont un diamètre hydrodynamique inférieur à 10 nm même en présence de polymère.

L'étude des compositions chimiques montre que les ions  $\text{Fe}^{3+}$  introduits au cours de la synthèse des cyanosols  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$  sont réduits en partie en ions  $\text{Fe}^{2+}$  conduisant à des entités  $\text{Pt}^{\text{IV}}\text{Fe}^{\text{II}}$ . Grâce à des analyses XPS, nous avons pu mettre en avant la présence de ces entités. Les cyanosols à base de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  sont composés de  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}$  et d'une faible proportion de BdP. Ces deux composés se distinguent également par leurs couleurs : rouge pour le  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$  (attribué aux entités  $\text{Pt}^{\text{IV}}\text{Fe}^{\text{II}}$ ) et vert pour le  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}$ .

L'association d'irradiation par photons  $\gamma$  et NPs a mis en avant, à l'échelle moléculaire, un effet radio-protecteur des cyanosols contenant du fer. Les expériences sur les cyanosols  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$  ont été menées avant de connaître la composition en  $\text{Fe}^{\text{II}}$  de ces objets. Une publication a montré récemment que le ferrocyanure pouvait capter les radicaux, principalement hydroxyle<sup>15</sup>, selon l'équation suivante :



Ceci conduit à une diminution de l'effet sous irradiation. L'étude montre que les NPs de BdP agissent comme les enzymes de type catalase, peroxydase et superoxyde dismutase. Les différentes formes redox du BdP permettent de transporter les électrons et donc de capter les espèces radicalaires. Bien que les mécanismes d'action du BdP à l'échelle cellulaire ne soient pas explorés, le caractère anti-oxydant de ces NPs a été démontré sur différentes lignées cellulaires. Les auteurs justifient ce comportement par la présence du ferrocyanure.

Une première série d'expériences en collaboration avec Hynd Remita (LCP, Université Paris-Sud) visant à expliciter le comportement des cyanosols vis-à-vis des ROS a été menée. Celle-ci a été réalisée en irradiant les solutions colloïdales en présence de  $\text{TiO}_2$ , qui est un photocatalyseur<sup>16,17</sup>. Le principe est expliqué dans l'annexe 23. Après irradiation des particules  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}$ , celles-ci sont enrobées au dextran et analysées par spectroscopie IR.

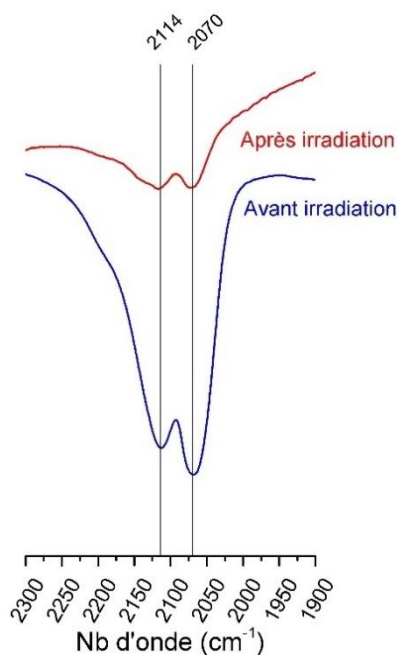


Figure IV-26. Particules  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}$  après irradiation à la lampe au xénon caractérisées par spectroscopie IR

La présence d'un élargissement de la bande à  $2114\text{ cm}^{-1}$  après irradiation justifie de la présence de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-CN}$  démontrant bien que les particules ont réagi avec les radicaux hydroxyles. Le suivi de la formation d'entité contenant des  $\text{Fe}^{\text{III}}$  par spectroscopie UV-visible a été effectué à faible concentration dans le domaine UV mais ne permet pas de conclusion claire. Cette expérience a été menée sur les cyanosols  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}$  et  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ , les résultats sont détaillés en annexe 23. Une nouvelle campagne sera réalisée à plus grande concentration avec un suivi des bandes présentes dans le visible. Cependant, visuellement nous avons pu observer que la solution rouge des cyanosols appelés  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$  devenait verte après irradiation indiquant qu'une proportion de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  a réagi avec les ROS (induisant la suppression de la bande d'intervallence des espèces  $\text{Pt}^{\text{IV}}\text{-NC-Fe}^{\text{II}}$ ). Ces expériences permettent donc de confirmer le caractère anti-oxydant des particules synthétisées. Cette propriété a été confirmée à l'échelle cellulaire après irradiation, la survie des cellules HeLa est augmentée en présence de NPs.

Bien que l'application visée dans un premier temps ne puisse être envisagée, l'aspect anti-oxydant peut être exploité de différentes manières. Il peut diminuer la production de ROS dans les réactions inflammatoires<sup>18</sup>. Ce type de propriété peut également permettre de diminuer le stress oxydant créé dans le tissu sain en cas de chimiothérapie, par exemple<sup>19</sup>. Cette propriété très intéressante devrait donner lieu à de nouvelles études pour la valoriser.

L'ensemble des études menées sur les cyanosols a permis de déterminer que les objets à ponts cyanure contenant du fer ne peuvent être exploités en tant que radio-amplificateurs. Cependant, l'avantage des structures de type cyanosols est leur grande versatilité chimique permettant d'envisager d'autres combinaisons pouvant être efficace en tant que radio-amplificateurs. Nous pouvons envisager la synthèse de cyanosols contenant uniquement du Pt<sup>II</sup>. Une première synthèse a été effectuée conduisant à l'obtention de particules de très petite taille en MET ( $1 \pm 0,3$  nm). La composition chimique et la stabilité de ces objets n'ont pas pu être explorées dans le cadre de ce travail mais sera poursuivie. La réactivité en présence de ROS sera examinée au préalable en suivant la même méthodologie.

## IV. Cyanosols composés de Pt<sup>II</sup> et d'Au<sup>I</sup>

Afin d'aller vers des systèmes de dimensionnalité différente, nous avons mis au point des objets contenant du dicyanoaurate.

### IV.1 Synthèse des particules

Le fort caractère inerte du platine nécessite un apport d'énergie, sous forme de chaleur, pour engendrer la nucléation de germes. Le chloroplatinate est dissous dans l'eau distillée à une concentration de 10 mM et est chauffé au bain-marie à 85°C. Une solution aqueuse de dicyanoaurate est chauffée dans les mêmes conditions. Plusieurs stœchiométries ont été synthétisées, en faisant varier la concentration en précurseur de 10 à 50 mM. Lorsque les deux solutions sont à température, la solution contenant le Pt<sup>II</sup> est ajoutée rapidement et sous vive agitation dans la solution d'[Au<sup>I</sup>(CN)<sub>2</sub>]<sup>-</sup>. Le mélange est maintenu sous agitation à 85°C pendant 60 min. Deux enrobages ont été testés. Le premier est le CTA, dont la structure est présentée à la figure IV-1 : un équivalent en volume est ajouté dans la solution de NPs. Le second enrobage est le dextran : 25 équivalents de monomère par rapport à la concentration en particule sont ajoutés, puis l'ensemble est précipité avec de l'acétone. Les solutions contenant les particules précipitées sont centrifugées pendant 15 min à 8000 tours/min. Les poudres obtenues sont séchées sous vide avant d'être conservées à froid.

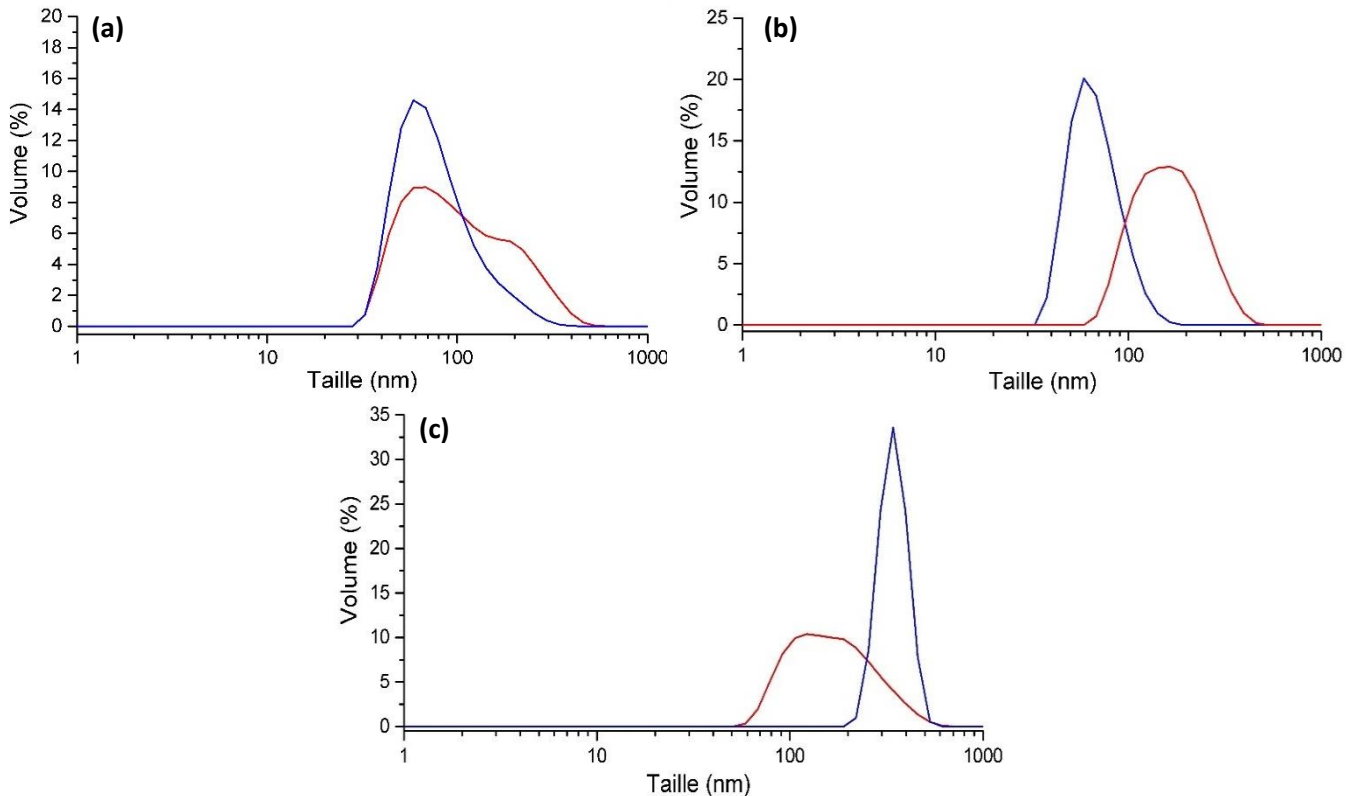
Les objets sont ensuite caractérisés afin de connaître leurs tailles, leurs structures et leurs compositions chimiques.

Trois stœchiométries Pt/Au ont été explorées : 1/1, 1/2 et 1/5. Ces objets seront nommés Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup>-1/1, Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup>-1/2, Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup>-1/5. Une annotation « @(dextran)<sub>25</sub> » sera ajoutée en cas d'enrobage au dextran. Les caractérisations des particules précipitées au CTA sont présentées dans l'annexe 25.

## IV.2 Caractérisations de taille et structurale

### IV.2.1 Diffusion dynamique de la lumière

Les particules  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}$  à différentes stœchiométries ont fait l'objet de mesures du diamètre hydrodynamique en fin de synthèse et après enrobage au dextran et redispersion dans l'eau. Les mesures sont présentées à la figure IV- 27.



**Figure IV-27.** Distributions de taille en volume mesurées par DLS en fin de synthèse (bleu), après enrobage au dextran et redispersion dans l'eau (rouge) pour les particules **(a)**  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}-1/1$  ; **(b)**  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}-1/2$  ; **(c)**  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}-1/5$

Pour le composé  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}-1/5$ , les particules s'agrègent au moment de la synthèse et commencent à précipiter après l'arrêt de l'agitation, ce qui explique le diamètre hydrodynamique autour de 340 nm. Après redispersion, un état d'agrégation est également visible avec un pic large décrivant des agrégats non homogènes en taille entre 100 et 200 nm.

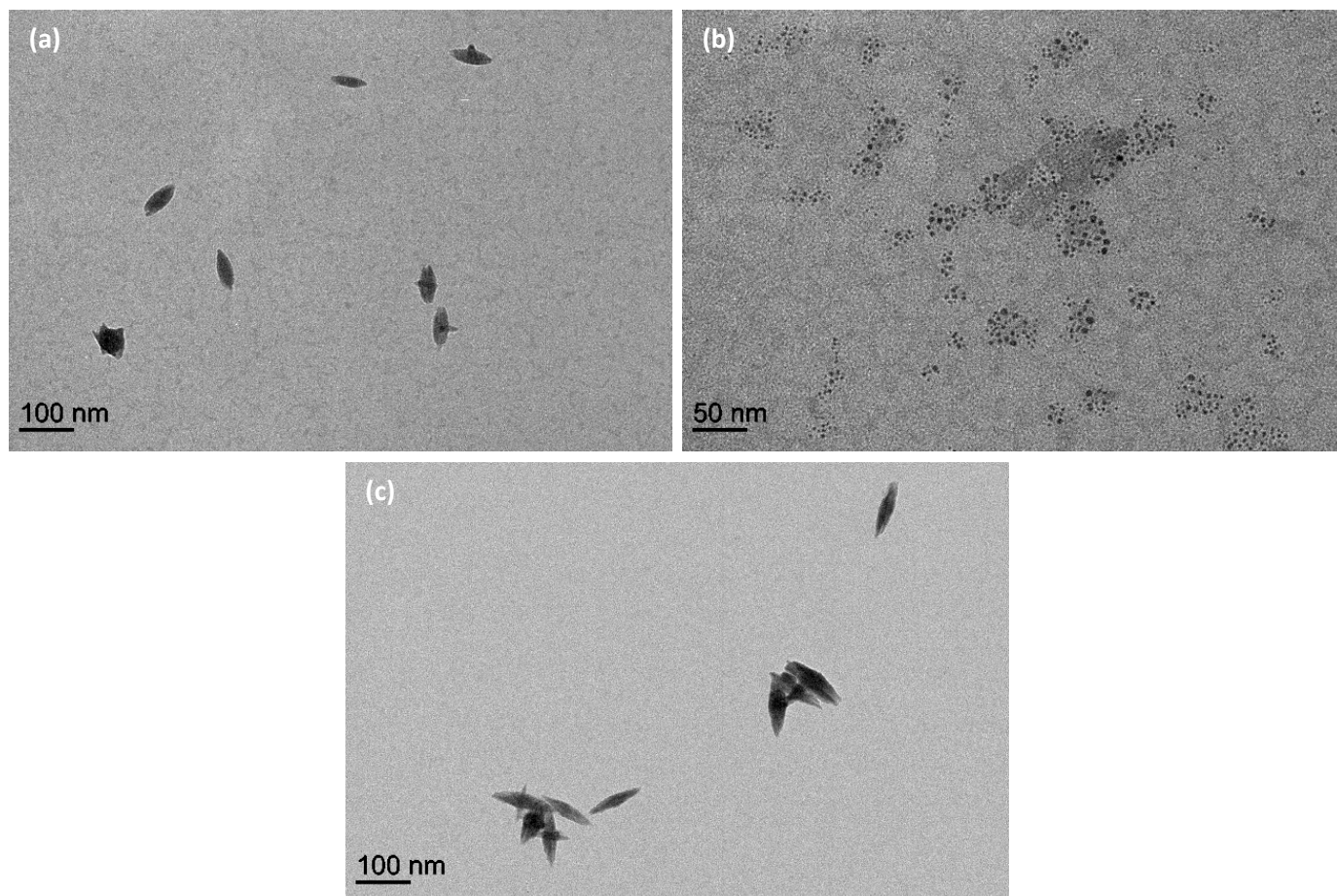
En fin de synthèse, les composés  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}-1/1$  et  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}-1/2$  ont un diamètre hydrodynamique proche de 60 nm. La présence d'une seconde composante sur les composés 1/1 suggère des agrégats en solution. Les redispersions de ces objets montrent également un état d'agrégation.

Les particules  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}-1/2@(\text{dextran})_{25}$  ont un diamètre plus grand que les particules nues s'expliquant par une certaine agrégation.

La stœchiométrie n'a pas d'influence sur la charge des cyanosols  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}$  qui est négative (-50 mV environ).

### IV.2.2 Microscopie électronique en transmission

Les cyanosols ont été déposés sur des grilles de cuivre afin d'être observés en MET. Ces observations ont permis de distinguer la présence de deux morphologies de particules : fuseaux et particules sphériques, comme présenté sur la figure ci-dessous.



**Figure IV-28.** Images MET du cyanosols  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}-1/2$  en fin de synthèse : (a) fuseaux ; (b) particules sphériques ; (c)  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}-1/2@(\text{dextran})_{25}$

Les cyanosols  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}-1/2$  présentent des fuseaux de  $73 \pm 5$  nm et des particules sphériques de  $2,7 \pm 0,8$  nm. Les redispersions de ces objets montrent également la présence des deux morphologies, bien que les particules sphériques de petites tailles soient difficiles à distinguer à cause du dextran. Les fuseaux présentent une polydispersité faible.

Quelle que soit la stœchiométrie des objets, les deux morphologies ont été observées. Les fuseaux semblent moins bien formés pour les  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}-1/1$  (Fig.IV-29.(a)) et ont des tailles inhomogènes ( $64 \pm 16$  nm). Dans le cas des  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}-1/5$ , les fuseaux sont très agrégés (Fig.IV-29.(b)), et fortement contrastés rendant plus compliquée l'observation des particules de petites tailles. Mais elles ont pu être observées isolées des fuseaux. L'état d'agrégation ne permet pas l'estimation de la taille des fuseaux.



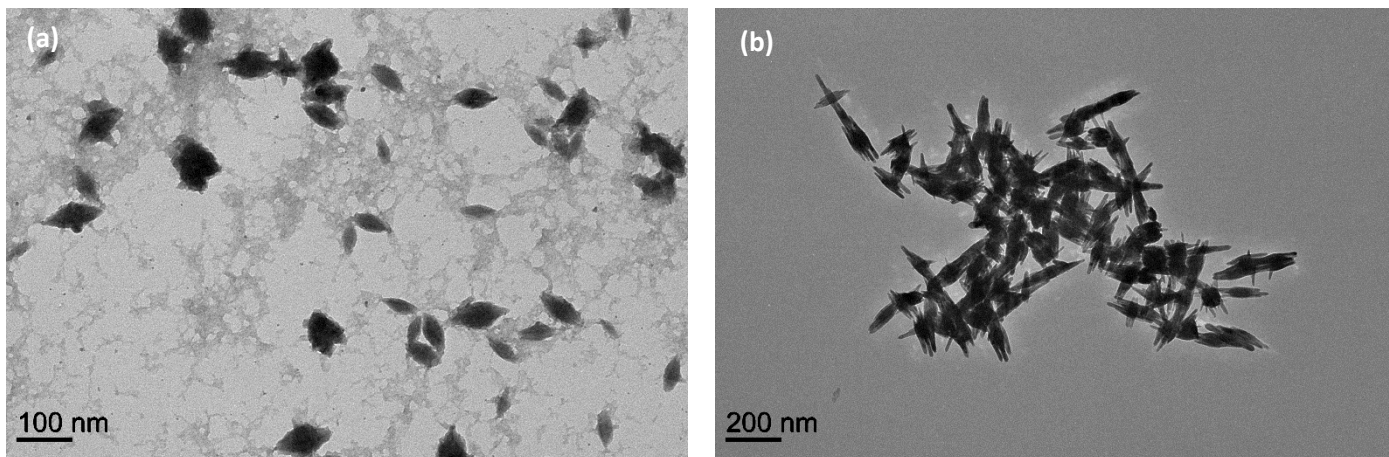


Figure IV-29. Micrographies obtenues par MET des cyanosols en fin de synthèse : (a)  $Pt^{II}Au^I-1/1$  ; (b)  $Pt^{II}Au^I-1/5$

La présence de fuseaux peut être due, soit à une association des particules sphériques de manière organisée soit à deux espèces de composition chimique différentes. Les fuseaux étant polydispersés en taille, il est difficile de les séparer des particules sphériques. Des expériences ont été menées dans ce sens, sans succès.

#### IV.2.3 Diffraction des rayons X sur poudre

Nous avons montré précédemment que les cyanosols contenant du fer étaient des composés amorphes. Les cyanosols  $Pt^{II}Au^I$  semblent être des objets plus cristallins. Nous avons donc voulu vérifier la structure de ces nouveaux composés.

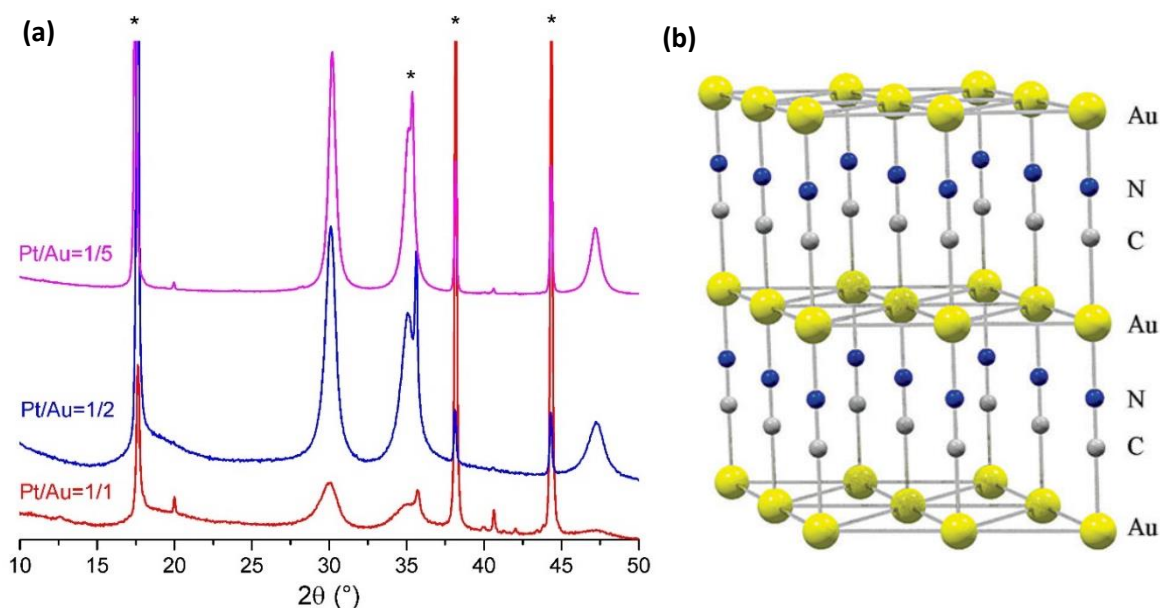
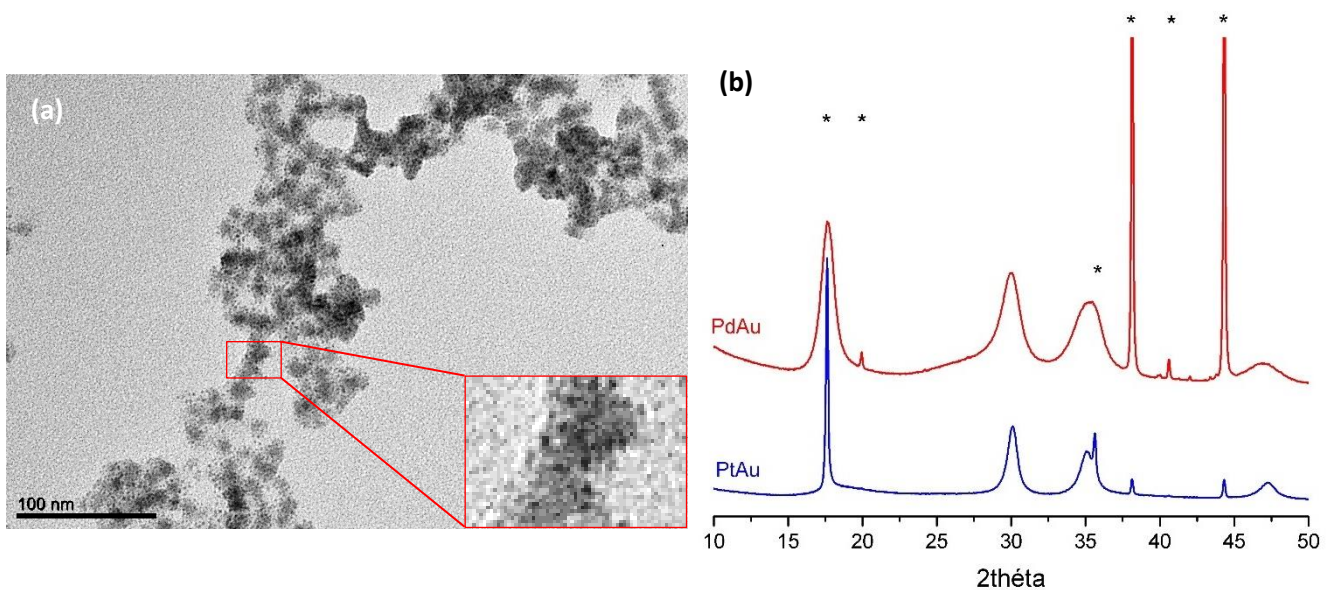


Figure IV-30.(a) Diffractogrammes des particules  $Pt^{II}Au^I-1/1$ ,  $Pt^{II}Au^I-1/2$  et  $Pt^{II}Au^I-1/5$  (\* pic du porte échantillon) ;  
(b) Structure du bulk  $Au(CN)^{27}$

Les diffractogrammes des particules avec différentes stœchiométries montrent la présence d'une structure cristalline de très faible paramètre de maille comparativement à ceux attendus. Après recherche bibliographique, ces pics de Bragg correspondent à la structure d'enchaînement  $-Au-CN-Au-CN-$  au sein du composé  $Au^I(CN)$ . Ceux-ci s'organisent dans un hexagone<sup>20</sup>. Le groupe d'espace est  $P6mm$  avec  $a=3,396 \text{ \AA}$  et  $c=5,092 \text{ \AA}$ .

Un atome d'Or est lié à 6 autres et forment des plans. Au sein de ceux-ci, les chaînes interagissent entre elles à travers des liaisons Au-Au. Toutefois, peu d'exemples de nanoparticules Au<sup>I</sup>(CN) ont été reportés.

Les pics des diffractogrammes sont de plus en plus fins lorsque la proportion d'Or augmente. Cet affinement des pics peut être assimilé à une augmentation de la taille des domaines cristallins. Par la formule de Scherrer, la taille des domaines cristallins a pu être déterminée : 7 nm pour les Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup>-1/1, 9 nm pour les Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup>-1/2 et 13,5 nm pour les Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup>-1/5. Les tailles des domaines cristallins sont nettement inférieures à celles déduites par MET suggérant que les fuseaux sont composés de sous-unités cristallines. La question de la présence du Pt<sup>II</sup> au sein du réseau d'or ne peut être résolue par cette méthode d'analyse.



**Figure IV-31. (a)** Image MET des particules Pd<sup>II</sup>Au<sup>I</sup> ; **(b)** Diffractogrammes des cyanosols Pd<sup>II</sup>Au<sup>I</sup> comparés aux Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup> (\*porte échantillon)

Des cyanosols constitués de palladium et d'or ont été synthétisés dans une stœchiométrie 1/2 afin de mieux comprendre la structure des Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup>. Bien que les fuseaux ne soient pas observés pour les particules de Pd<sup>II</sup>Au<sup>I</sup>, les particules de petites tailles semblent se regrouper de manière organisée, d'après la microscopie (*Fig.IV-31.(a)*), formant des agrégats sphériques autour de 20 nm sur la grille.

Les diffractogrammes des particules Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup> et Pd<sup>II</sup>Au<sup>I</sup> présentent les mêmes pics indiquant des structures identiques dues à la structure Au(CN). La taille des domaines cristallins des particules Pd<sup>II</sup>Au<sup>I</sup> est de 5 nm. Ceci démontre, de manière indirecte, que les particules sphériques de plus petites tailles, présentes dans les composés Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup>, sont également cristallines. Elles sont sans doute les constituants des fuseaux observés.



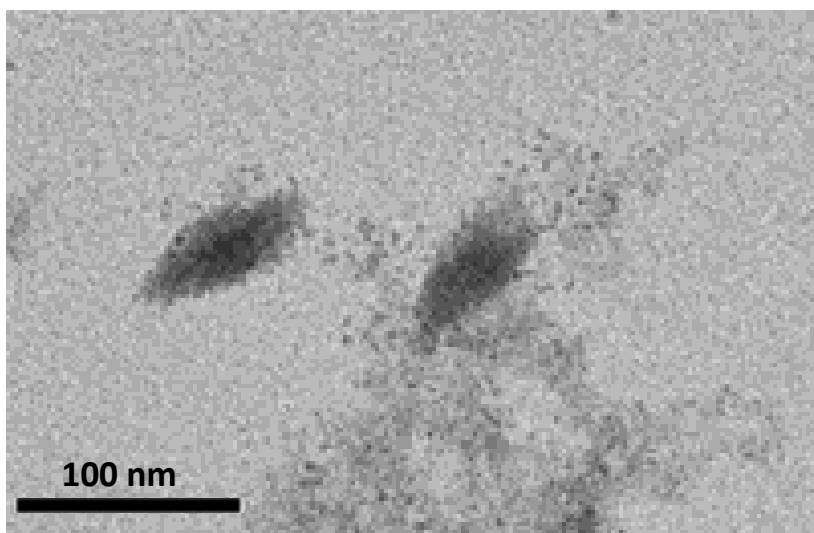


Figure IV-32. Image MET des particules  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}$  montrant des fuseaux formés de particules sphériques

### IV.3 Caractérisation chimique

#### IV.3.1 Spectroscopie IR

Les particules  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}$  à différentes stœchiométries ont été analysés par spectroscopie IR. Trois contributions, dans la zone des cyanures, sont présentes pour les deux enrobages et ont été attribuées de la manière suivante :

- $2235 \text{ cm}^{-1}$  : cyanures pontants des enchaînements  $\text{Au}^{\text{I}}\text{-CN-Au}^{\text{I}}$ <sup>20,21</sup>;
- $2200 \text{ cm}^{-1}$  : cyanures pontants  $\text{Au}^{\text{I}}\text{-CN-Pt}^{\text{II}}$ ;
- $2156 \text{ cm}^{-1}$  : cyanures terminaux  $\text{Au}^{\text{I}}\text{-CN}$

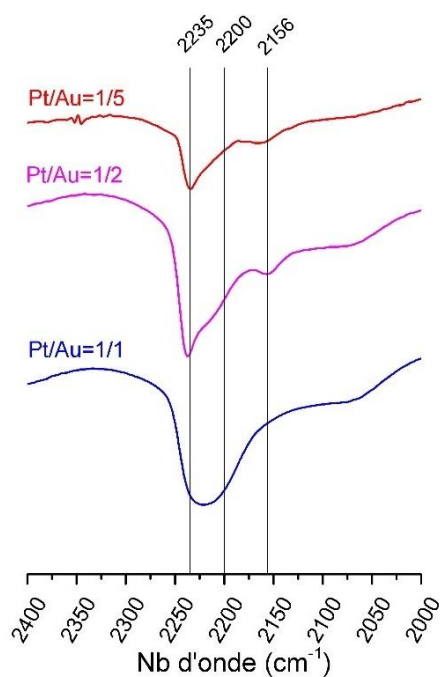


Figure IV-33. Spectres IR des particules  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}\text{-1/1}$ ,  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}\text{-1/2}$ ,  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}\text{-1/5}$  enrobées de dextran

A plus basse fréquence, la présence de bande caractéristique des liaisons métal carbone n'a pas été observée.

En cas de stœchiométrie 1/1, les trois contributions des cyanures ne sont pas bien définies, conduisant à une bande large masquant les autres bandes. Ceci peut être interprété comme une égale contribution des ponts  $\text{Au}^{\text{I}}\text{-CN-Au}^{\text{I}}$  et  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{-NC-Au}^{\text{I}}$ .

Pour les stœchiométries plus riches en  $\text{Au}^{\text{I}}$ , la contribution des ponts  $\text{Au}^{\text{I}}\text{-CN-Au}^{\text{I}}$  est très marquée, ainsi que celle des cyanures terminaux liés à l'or. La bande des ponts  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{-NC-Au}^{\text{I}}$  se traduit par un simple épaulement, montrant que ceux-ci sont minoritaires par rapport aux ponts  $\text{Au}^{\text{I}}\text{-CN-Au}^{\text{I}}$ . Le spectre des particules  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}\text{-1/5}$  traduit la présence d'une forte proportion d' $\text{Au}^{\text{I}}$ .

L'analyse par spectroscopie IR des composés de  $\text{Pd}^{\text{II}}$  et d' $\text{Au}^{\text{I}}$  a permis de confirmer la formation d'enchaînement  $\text{Au}^{\text{I}}\text{-CN-Au}^{\text{I}}$  avec la présence d'une bande à  $2230\text{ cm}^{-1}$ . La formation de cette structure nécessite la présence d'un autre élément pour favoriser la germination et la croissance du réseau. En effet, l'échauffement pendant 1h du dicyanurate seul ne permet pas la formation de NPs.

### IV.3.2 Analyse élémentaire et EDS

Les rapports métalliques des différents échantillons ont été mesurés par EDS. Les résultats sont présentés dans le tableau IV- 15.

Echantillons	Ratio Cl/Pt	Ratio Pt/Au	Ratio K/Au
Pt/Au-1/5	0,70	0,02	0,04
Pt/Au-1/2	0,10	0,20	0,01
Pt/Au-1/1	1,30	0,50	0,20

Tableau IV-15. Rapports Cl/Pt, Pt/Au et K/Au obtenus par EDS pour les échantillons à différentes stœchiométries entourés de dextran

Les composés ont un taux de platine faible, montrant un large excès d'or notamment pour l'échantillon  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}\text{-1/5@}(\text{dextran})_{25}$ . La quantité de ligand chloro par rapport au  $\text{Pt}^{\text{II}}$  est faible quel que soit le système montrant un taux de substitution important.

Les analyses élémentaires ont permis de calculer le nombre de monomère de dextran entourant les particules. Ainsi, les unités formulaires sont déterminées (Tableau IV-16).

Echantillons	Unités formulaires
$\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}\text{-1/1@}(\text{dextran})_{25}$	$\text{K}_{1,1}\text{Cl}_{1,3}\text{Pt}_1[\text{Au}(\text{CN})_2]_{1,8}@(\text{dextran})_{36}, (\text{H}_2\text{O})_{27}$
$\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}\text{-1/2@}(\text{dextran})_{25}$	$\text{K}_{3,1}\text{Cl}_{0,1}\text{Pt}_1[\text{Au}(\text{CN})_2]_5@(\text{dextran})_{79}, (\text{H}_2\text{O})_{72}$
$\text{Pt}^{\text{II}}\text{Au}^{\text{I}}\text{-1/5@}(\text{dextran})_{25}$	$\text{K}_{38,7}\text{Cl}_{0,7}\text{Pt}_1[\text{Au}(\text{CN})_2]_{40}@(\text{dextran})_{99}, (\text{H}_2\text{O})_{116}$

Tableau IV-16. Unités formulaires déterminées par AE et EDS

La quantité de monomère de dextran entourant les particules est supérieure à ce qui a été initialement introduit car les proportions de  $\text{Pt}^{\text{II}}$  et  $\text{Au}^{\text{I}}$  expérimentales sont différentes des proportions estimées.

Un point important est de savoir s'il y a bien une co-localisation du Pt<sup>II</sup> et de l'Au<sup>I</sup> au sein des fuseaux. Pour cela, une étude en EDS ciblée sur les fuseaux a été effectuée en différents points. Ces analyses ont montré la présence de platine et d'or au sein des fuseaux et une composition homogène de ceux-ci au sein d'un agrégat (Annexe 24). La caractérisation de ces objets par STEM-EELS serait plus précise pour confirmer la co-localisation.

## IV.4 Réduction chimique

Les particules Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup>-1/5@(dextran)<sub>25</sub> ont fait l'objet d'un essai préliminaire de réduction chimique par NaBH<sub>4</sub>. Pour cela, les particules sont redispersées dans l'eau à une concentration de 1 mM en Au<sup>I</sup>. D'après les analyses chimiques de cet échantillon, celui-ci contient peu de Pt<sup>II</sup>. Après dissolution, le réducteur chimique est ajouté en large excès afin de réduire l'ensemble des métaux. Après quelques minutes, le mélange réactionnel change de couleur pour passer du jaune caractéristique de ces objets à une couleur rouge-violet caractéristique de NPs métallique d'Au. Après la fin de la réaction, les particules réduites sont précipitées à l'aide d'acétone et conservées sous forme de poudre.

### IV.4.1 Caractérisation de taille et chimique

#### IV.4.1.1 Evaluation de la taille

Après réduction, les particules métalliques sont analysées par DLS et MET. Les résultats sont présentés ci-dessous.

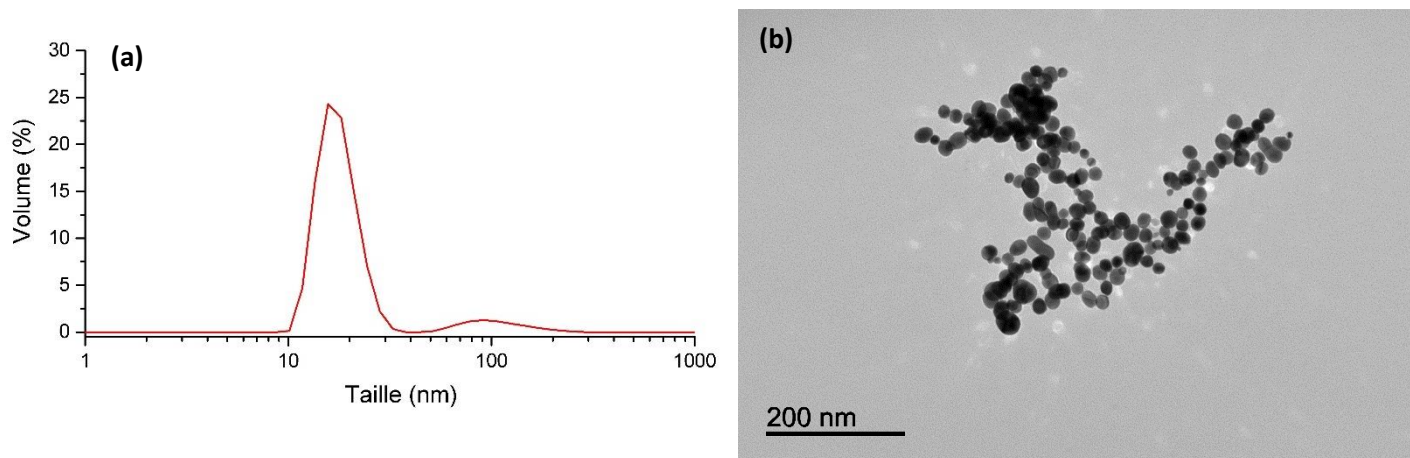


Figure IV-34. (a) Mesure de la taille en DLS ; (b) Micrographie des particules réduites

Les mesures de DLS révèlent la présence de deux populations : l'une d'environ 16 nm et l'autre d'environ 90 nm. Cette seconde population est sans doute due à une agrégation des particules en solution.

Les observations par MET permettent de confirmer l'agrégation des particules en solution (Fig.IV-34.(b)). Les agrégats sont constitués de particules sphériques de  $19 \pm 5$  nm. Le fort contraste des objets atteste de la réduction des métaux. Les particules observées sont de tailles variées, démontrant un contrôle modéré au moment de la réduction.

#### IV.4.1.2 Spectroscopie IR

Après réduction, la poudre obtenue a été analysée par spectroscopie IR. Ce spectre est comparé à celui mesuré pour les particules avant réduction.

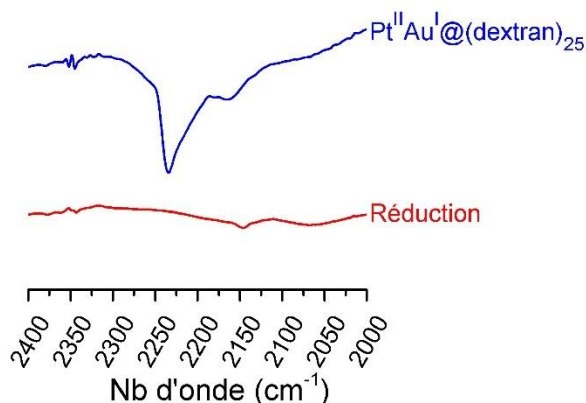


Figure IV-35. Spectres IR des particules Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup>-1/5@(dextran)<sub>25</sub> et des particules réduites dans la zone 2400-2000 cm<sup>-1</sup>

L'analyse confirme que les ponts cyanures ont été dégradés par la réduction chimique. Cependant, une bande semble être présente à 2145 cm<sup>-1</sup> ce qui correspondrait à la présence d'Au-CN libre en très faible proportion, probablement entraîné en solution.

#### IV.4.2 Propriétés optiques

Les nanoparticules d'or ont la particularité de présenter une bande de résonance plasmon. Celle-ci est dépendante de la taille et de la morphologie des NPs<sup>22</sup>. Afin de caractériser les propriétés optiques des nanoparticules d'Au que nous avons synthétisées, celles-ci ont été analysées par spectroscopie UV-visible.

Le spectre montre la présence de deux maxima d'absorption à 520 nm et 750 nm (Fig.IV-36). Ces deux bandes signifient la présence de deux tailles d'objets, en accord avec les mesures de DLS. En microscopie, des agrégats de tailles différentes ont été observés. La bande à 520 nm peut être attribuée aux particules sphériques de 20 nm et la bande à 750 nm à des agrégats de plus grande taille<sup>23</sup>.

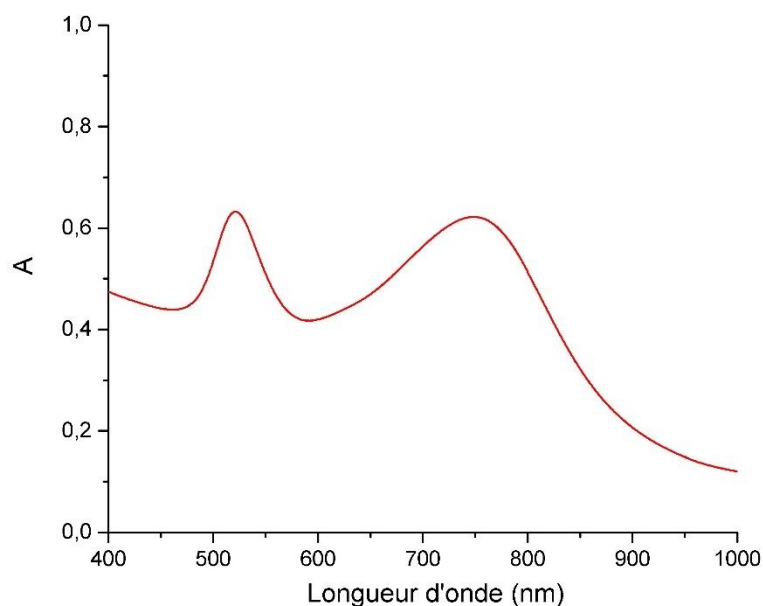


Figure IV-36. Spectre UV-visible des particules Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup>-1/5@(dextran)<sub>25</sub> réduites

Cet essai préliminaire montre que la réduction des fuseaux Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup>-1/5 conduit bien à des particules métalliques mais ni la taille ni la forme ne sont préservées. La présence de platine est en cours de validation.

#### IV.5 Bilan

Nous avons pu mettre au point de nouvelles nanoparticules contenant un réseau d'Au<sup>I</sup>(CN) dopé par différents taux de Pt<sup>II</sup>. D'un point de vue structural, les particules d'Au<sup>I</sup>(CN) sont cristallines. Celles-ci s'associent en fuseaux. La taille de ceux-ci est contrôlée par le taux d'Au<sup>I</sup> engagé dans la synthèse. Lorsque le platine est remplacé par le palladium, les enchaînements Au<sup>I</sup>-CN-Au<sup>I</sup> sont également formés ce qui a été montré par spectroscopie IR et par DRX. Les systèmes Pd<sup>II</sup>Au<sup>I</sup> sont constitués de particules de petites tailles qui ont tendance à s'agréger. Les fuseaux de Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup> sont très certainement constitués de particules de plus petites tailles.

La présence d'un autre métal que l'or, tel que le Pt<sup>II</sup> ou le Pd<sup>II</sup>, est nécessaire pour générer la formation de ces nanoparticules d'Au<sup>I</sup>(CN). D'autres combinaisons pourront être testées afin de moduler les propriétés de ces objets. Beaucoup d'applications peuvent être envisagées pour ces particules :

- Dans le domaine médical, la présence de deux ions lourds dans la composition permet d'envisager des applications en tant que radio-amplificateur ;
- Des NPs d'or ont été obtenues lors d'un test préliminaire de réduction chimique avec une absorption forte dans le proche IR et la formation d'alliages ou cœur-coquille bimétalliques devra être examinée sur l'ensemble de ces systèmes. La réduction des particules par voie radiolytique est une autre piste qui devra être explorée par la suite, en collaboration avec H. Remita.

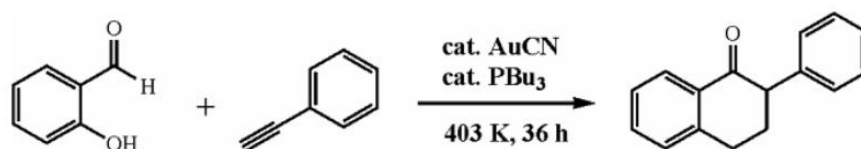
## V. Conclusion

En conclusion, nous avons mis au point de nouveaux polymères de coordination à pont cyanure appelés cyanosols. Ces objets avaient été étudiés à l'état de gel. Notre objectif de stabilisation des polymères en solution colloïdale a été atteint. Notre étude s'est focalisée sur des systèmes à base de fer, platine, palladium ou or.

Une première partie du travail a consisté à mettre au point des cyanosols à base de Pt<sup>II</sup> et Fe<sup>II/III</sup>. La présence du platine nous a obligé à chauffer la solution pour entraîner la nucléation. Deux composés ont été mis au point : l'un à partir de ferrocyanure et l'autre à partir de ferricyanure. Ces objets sont particulièrement petits (< à 3nm), ce qui rend leur efficacité en tant que pré-catalyseur pour la croissance de NTc faible. Des essais de grossissement se sont avérés non fructueux mais seront poursuivis par la suite. Grâce à la détermination des degrés d'oxydation par XPS, nous avons pu montrer que les particules Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> étaient principalement composés de Pt<sup>IV</sup>Fe<sup>II</sup>. Les cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> feront également l'objet d'une étude XPS sur un échantillon purifié. Une étude d'irradiation des particules en présence de TiO<sub>2</sub> a montré que le [Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> pouvait réagir avec les radicaux OH• pour former du [Fe<sup>III</sup>(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>. Ainsi, les radicaux sont captés et ne peuvent plus interagir avec l'ADN. Les deux cyanosols synthétisés incluant tous deux l'entité ferrocyanure, leurs comportements vis-à-vis des radicaux sont identiques.

Les propriétés de radioprotection de ces objets ne permettent pas d'envisager des applications en radiothérapie. La suite de ce travail consistera à valoriser ces capacités anti-oxydantes pour limiter les dégâts des rayonnements par exemple dans les tissus sains environnants la tumeur. La présence de Pt permettrait un suivi des particules par tomographie<sup>24</sup>.

Dans un second temps, de nouveaux systèmes à base de Pt<sup>II</sup> et d'Au<sup>I</sup> ont été mis au point avec différentes stœchiométries. Ces objets sont constitués d'une structure de type Au<sup>I</sup>(CN)<sub>n</sub>, avec des atomes Pt<sup>II</sup> insérés dans le réseau. La microscopie a permis de montrer la présence de deux morphologies : fuseaux et particules sphériques. D'après nos études, les fuseaux sont composés de sous-unités, sans doute des particules sphériques de 3 nm, qui s'assemblent de manière organisée. Les particules Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup> ont principalement été étudiées chimiquement et devront être davantage explorées dans la suite de ce travail. Leur potentiel en tant que radio-amplificateur pour l'hadronthérapie sera exploré, en sondant leur comportement préalablement par une étude en solution (TiO<sub>2</sub> et/ou source) avant des études *in cellulo*. Les systèmes à base d'Au(CN)<sub>n</sub> dopés par du Pt<sup>II</sup> ou Pd<sup>II</sup> pourront également être examinés en catalyse. En 2015, une équipe a mis au point des oligomères d'Au<sup>I</sup>(CN)<sub>n</sub> par irradiation UV d'un mélange de NPs d'Au, de benzaldéhyde et d'acétonitrile<sup>25</sup>. Les auteurs suggèrent que la réaction se découpe en plusieurs étapes dont la principale consiste en la production d'espèces radicalaires •CN (ayant pour origine la dissociation de l'acétonitrile) qui vont réagir avec les NPs métalliques pour former l'espèce souhaitée. Les oligomères obtenus sont adsorbés sur différentes matrices supports et ont fait l'objet d'une étude préliminaire pour la catalyse de la réaction d'annélation de salicylaldéhyde avec le phénylacétylène pour former de l'isoflavanone (Fig.IV-37).



**Figure IV-37.** Réaction d'annélation catalysée par les oligomères d'Au<sup>I</sup>(CN)<sup>25</sup>

Le rendement de réaction est de 48% en présence d'Au<sup>I</sup>(CN) alors qu'il est de 2% lorsque la réaction est catalysée par NPs métalliques d'or. Ce premier test catalytique très encourageant ouvre de nombreuses portes pour l'utilisation de ces nanoparticules peu explorées, dans ce domaine.

D'une manière générale, nous avons développé des synthèses en milieu aqueux permettant d'accéder à toute une gamme de nouveaux nanosystèmes versatiles. Ces premiers travaux exploratoires devront être confirmés et valorisés. En particulier, sur les systèmes Au<sup>I</sup>(CN) dopés, des propriétés optiques (photoluminescence en particulier) ont été étudiées sur le composé massif<sup>21,26</sup> et sur des oligomères en solution. Les propriétés optiques seront étudiées dans la continuité de ce travail.



## **Bibliographie:**

1. Pfennig, B. W., Bocarsly, A. B. & Prud'homme, R. K. Synthesis of a Novel Hydrogel Based on a Coordinate Covalent Polymer Network. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 2661–2665 (1993).
2. Burgess, C. M., Yao, N. & Bocarsly, A. B. Stabilizing cyanosols: amorphous cyanide bridged transition metal polymer nanoparticles. *J. Mater. Chem.* **19**, 8846 (2009).
3. Porcel, E. *et al.* Gadolinium-based nanoparticles to improve the hadrontherapy performances. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **10**, 1601–1608 (2014).
4. Thomas Schlathölter *et al.* Improving proton therapy by metal-containing nanoparticles: nanoscale insights. *Int. J. Nanomedicine* **11**, 1549–1556 (2016).
5. Castan, A. *et al.* New method for the growth of single-walled carbon nanotubes from bimetallic nanoalloy catalysts based on Prussian blue analog precursors. (2017). doi:10.1016/j.carbon.2017.07.058
6. Vondrova, M., Mcqueen, T. M., Burgess, C. M., Ho, D. M. & Bocarsly, A. B. Autoreduction of Pd - Co and Pt - Co Cyanogels : Exploration of Cyanometalate Coordination Chemistry at Elevated Temperatures. *J. Am. Chem. Soc.* 5563–5572 (2008).
7. Robin, B. Y. M. B. & Ronm, R. The Color and Electronic Configurations of Prussian Blue. *Inorg. Chem.* **1**, 337–342 (1962).
8. Catala, L. *et al.* Core-multishell magnetic coordination nanoparticles: Toward multifunctionality on the nanoscale. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 183–187 (2009).
9. Alice Castan. Growth and Characterization of Single-walled Carbon Nanotubes from Chemically Synthesized Catalyst Precursors.
10. Schlathölter, T. *et al.* Improving proton therapy by metal-containing nanoparticles: Nanoscale insights. *Int. J. Nanomedicine* **11**, 1549–1556 (2016).
11. Watson, D. F., Willson, J. L. & Bocarsly, A. B. Photochemical image generation in a cyanogel system synthesized from tetrachloropalladate(II) and the trimetallic mixed-valence complex [(NC)<sub>5</sub>Fe<sup>II</sup>-CN-Pt<sup>IV</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>-NC-Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>5</sub>]<sub>4</sub><sup>-</sup>: Consideration of photochemical and dark mechanistic pathways of Prussian bl. *Inorg. Chem.* **41**, 2408–2416 (2002).
12. Porcel, E. *et al.* Platinum nanoparticles: a promising material for future cancer therapy? *Nanotechnology* **21**, 085103 (2010).
13. Štefanciková, L. *et al.* Effect of gadolinium-based nanoparticles on nuclear DNA damage and repair in glioblastoma tumor cells. *J. Nanobiotechnology* **14**, 1–15 (2016).
14. Brun, E. & Sicard-Roselli, C. Actual questions raised by nanoparticle radiosensitization. *Radiat. Phys. Chem.* **128**, 134–142 (2016).
15. Zhang, W. *et al.* Prussian Blue Nanoparticles as Multienzyme Mimetics and Reactive Oxygen Species Scavengers. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 5860–5865 (2016).
16. Ghosh, S. *et al.* Visible-light active conducting polymer nanostructures with superior photocatalytic activity. *Nat. Publ. Gr.* (2015). doi:10.1038/srep18002
17. Ghosh, S. *et al.* Conducting polymer nanostructures for photocatalysis under visible light

- Visible-light-responsive photocatalysts can directly harvest energy from solar light, offering a desirable way to solve energy and environment issues. (2015). doi:10.1038/NMAT4220
18. Zhao, H. *et al.* Polydopamine nanoparticles for the treatment of acute inflammation-induced injury. *Nanoscale* **10**, 6981 (2018).
  19. Yang, Q. *et al.* Porous Au@Pt Nanoparticles: Therapeutic Platform for Tumor Chemo-Photothermal Co-Therapy and Alleviating Doxorubicin- Induced Oxidative Damage. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 150–164 (2018).
  20. Bowmaker, G. A., Kennedy, B. J. & Reid, J. C. Crystal Structures of AuCN and AgCN and Vibrational Spectroscopic Studies of AuCN, AgCN, and CuCN. *Inorg. Chem.* **37**, 3968–3974 (1998).
  21. Bayse, C. A., Jasprina L. Ming, Kayla M. Miller, Shannon M. McCollough & Pike, R. D. Photoluminescence of silver(I) and gold(I) cyanide 1D coordination polymers. *Inorganica Chim. Acta* **375**, 47–52 (2011).
  22. Narges Elahia, Mehdi Kamalia & Mohammad Hadi Baghersad. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta* **184**, 537–556 (2018).
  23. Aihua Liu, Guoqing Wang, Fei Wang & Yang Zhang. Gold nanostructures with near-infrared plasmonic resonance: Synthesis and surface functionalization. *Coord. Chem. Rev.* **336**, 28–42 (2017).
  24. Bo Wu *et al.* Gadolinium-chelate functionalized bismuth nanotheranostic agent for in vivo MRI/CT/PAI imaging-guided photothermal cancer therapy. *Biomaterials* **159**, 37–47 (2018).
  25. Renhong Li, Hisayoshi Kobayashi, Jiawei Tong, Xiaoqing Yan, Yu Tang, Shihui Zou, Jiabin Jin, Wuzhong Yi, and J. F. Radical-Involved Photosynthesis of AuCN Oligomers from Au Nanoparticles and Acetonitrile. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 18286–18294 (2012).
  26. Rawashdeh-Omary, M. A., Omary, M. A., Patterson, H. H. & Fackler, J. P. Excited-State Interactions for [Au(CN) Oligomers in Solution. Formation of Luminescent Gold-Gold Bonded Excimers and Exciplexes. doi:10.1021/ja011176j
  27. Daniel B. Leznoff and Julie Lefebvre. Coordination Polymers with Cyanoaurate Building Blocks: Potential New Industrial Applications for Gold. *Gold Bull.* **38/2**, 47–54 (2005).



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse s'est découpé en trois parties principales. La première a été consacrée à la synthèse et la caractérisation de particules d'analogues du bleu de Prusse dopées par des ions paramagnétiques,  $Mn^{II}$  ou  $Gd^{III}$ . La localisation préférentielle de ces ions en surface permet d'obtenir des valeurs de relaxivité particulièrement élevées. Ces systèmes de type cœur-coquille ont été synthétisés soit en présence d'un cœur diamagnétique ( $In^{III}Fe$ ), soit en présence d'un cœur paramagnétique ( $Fe^{III}Fe$ ). Le cœur paramagnétique a un effet négatif en présence de  $Mn^{II}$ , entraînant des performances pour un même taux de dopage inférieures aux particules  $Mn^{II}In^{III}Fe$ . Cependant avec un dopage à 5% en  $Mn^{II}$ , les performances sont les mêmes pour les deux entités ( $r_1/Mn^{II}=16 \text{ mM}^{-1}.s^{-1}$ ), ce qui correspond à une valeur tout à fait remarquable pour des systèmes à base d'ions  $Mn^{2+}$ . Comparativement, les particules de  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]$  ( $r_1/Gd^{III}=50 \text{ mM}^{-1}.s^{-1}$ ) ont des performances notablement supérieures aux particules de  $Gd^{III}In^{III}Fe[5]$  ( $r_1/Gd^{III}=40 \text{ mM}^{-1}.s^{-1}$ ). Nous avons mis en avant que la contribution des ions  $Fe^{3+}$  à la relaxivité ne pouvait être négligée. Dans la plupart des systèmes de la littérature, les valeurs de relaxivités obtenues ne tiennent pas compte de la contribution des  $Fe^{3+}$ , surestimant alors la relaxivité. Nous avons pu décorrélérer ces contributions, et expliciter les valeurs exceptionnelles de contraste obtenues pour ces particules.

Par ailleurs, les composés avec un cœur BdP ont fait l'objet d'une étude en hyperthermie photoassistée en solution aqueuse montrant une élévation de la température supérieure à  $43^\circ C$  pour des quantités inférieures à  $100 \mu g.mL^{-1}$ . Nos objets ont ainsi montré des performances équivalentes voire supérieures aux systèmes de la littérature pour une taille inférieure ( $d < 10 \text{ nm}$ ) ce qui est un avantage non négligeable pour que les NPs s'accumulent dans les tumeurs et soient éliminées par voie rénale.

La seconde partie de ce projet s'est focalisée sur l'étude du comportement de nos objets (en particulier des particules  $Gd^{III}Fe^{III}Fe [5]$ ) dans des milieux physiologiques ou des milieux pouvant mimer les conditions *in vivo*. L'objectif était d'anticiper les éventuels problèmes de stabilité rencontrés au cours d'expériences *in vitro* et *in vivo*. Ces études ont permis de révéler l'instabilité des ponts  $Fe^{II}-CN-Fe^{III}$  dans diverses conditions (pH basique, exposition à la lumière UV, présence de chélatant du fer). La forte absorption des entités BdP dans le proche IR a permis de suivre la stabilité des particules par spectroscopie UV-visible à  $37^\circ C$ . La décomposition des cœurs BdP (en ferrocyanure et hydroxyde de fer) à pH basique limite les expériences *in vitro*, car les milieux de culture cellulaire sont conservés à ce pH. Cependant, ce point n'est pas limitant car l'étude du comportement à l'échelle de la cellule n'est pas représentative de ce qui peut se passer dans l'organisme. Les redispersions de nos objets dans le SVF et l'ALF ont montré une évolution du cœur BdP avec une perte de la couleur. Ceci s'explique par la présence de groupement ayant une forte affinité pour le  $Fe^{III}$  (phosphate dans le SVF et citrate dans l'ALF). La stabilité dans l'ALF s'est avérée ne pas être primordiale, car les particules peuvent agir en périphérie des cellules tumorales. De plus, le citrate présent dans ce milieu artificiel a pour rôle le maintien du pH acide, alors que le milieu lysosomal des cellules est composé majoritairement d'enzymes. Cette étude permet toutefois d'anticiper des problèmes liés à la présence de chélatants ou réducteurs dans le milieu. La stabilité dans le SVF, qui représente la circulation sanguine s'est avérée plus problématique. Pour pallier à ce problème, plusieurs stratégies ont été envisagées pour protéger les groupements de surface des NPs. La chélation de citrate en quantité contrôlée est prometteuse mais l'absence de  $Gd^{III}$  dans les composés ne permet pas des applications en tant qu'agent de contraste pour l'IRM. Ainsi, la croissance d'une coquille de silice permettant le greffage de chélates de  $Gd^{III}$  a été explorée.

Bien que les premiers résultats montrent un effet protecteur limité de la coquille de silice, un travail important d'optimisation de la synthèse de silice (densification, contrôle de la taille de la coquille) reste à faire pour envisager la fonctionnalisation de la surface.

L'enrobage des particules par un polymère de type  $\beta$ -CD fonctionnalisé par des groupements citrates est une bonne stratégie qui permet par la suite l'encapsulation de principe actif dans la cavité des CD. En effet, la forme  $\gamma$  de la CD a des cavités de taille plus adaptée pour l'encapsulation de doxorubicine. Cette partie n'a pas été étudiée au cours de ce travail et constitue la suite de celui-ci sur ces objets.

Récemment, nous avons montré que les protéines du SVF pouvaient former une couronne autour de nos NPs, les protégeant de la dégradation notamment dans les lysosomes. Le projet devra donc se poursuivre par l'étude des interactions entre NPs et albumine (principale protéine du sérum). Cette couronne est en général à éviter mais l'adsorption d'albumine pourrait permettre un contrôle de la stabilité sans opsonisation.

L'objectif principal visé à la suite de ce travail sera de procéder à une étude *in vivo* en IRM et PTT, dans le cadre de la collaboration menée avec F.Gazeau. L'élimination rénale observée, lors du premier essai, est encourageant mais n'a pas pu être reproduit et sera un objectif notable. Beaucoup d'études ont été publiées mais aucune n'a clairement montré, à notre connaissance, une élimination rénale. La stratégie serait identique à celle développée pour les NPs d'AguiX® avec une accumulation, par effet EPR, au voisinage des tumeurs avec une élimination de la proportion de particules non internalisées.

Ce travail montre l'importance d'anticiper la dégradation (ou l'agrégation) des particules dans les milieux (sérum, par exemple) en amont de l'étude *in vivo*.

Enfin, de nouveaux objets ont été élaborés, dans le cadre de cette thèse. Ceux-ci, nommés cyanosols, sont des polymères de coordination à pont cyanure obtenus par substitution des ligands chloros d'un tétrachlorométallate M (dans notre cas, M=Pt<sup>II</sup> ou Pd<sup>II</sup>) par les groupements cyanures d'un polycyanométallate [M'(CN)<sub>n</sub>]<sup>q-</sup> (M'=Fe<sup>II</sup> ou Fe<sup>III</sup> ou Au<sup>I</sup>). Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à des systèmes Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> et Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>. Leurs compositions chimiques se sont avérées plus complexes que prévu. En effet, les particules nommées Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> contiennent effectivement des entités Pt<sup>II</sup>-NC-Fe<sup>II</sup> mais également des entités composées de Pt<sup>IV</sup> et de Fe<sup>III</sup>. Une proportion de BdP a également été détectée. De la même manière, les cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> sont majoritairement composés de Pt<sup>IV</sup>-NC-Fe<sup>II</sup> et une proportion d'enchaînements contenant du Fe<sup>III</sup> a également été mise en avant. Ces objets ont été développés car ils sont stables en solution aqueuse et sont composés d'ions lourds permettant de viser initialement des applications à long terme en hadronthérapie. Les premiers essais d'irradiations à l'échelle moléculaire et cellulaire ont mis en évidence le caractère radio-protecteur de ces objets. En effet, une expérience en présence de TiO<sub>2</sub> a montré que les radicaux OH• produits réagissaient avec le ferrocyanure pour former du ferricyanure. Ce comportement conforte ce qui avait déjà été reporté récemment dans la littérature, sur les BdP. Ainsi, si ces particules ne sont pas de bons candidats pour la radiothérapie en général, les propriétés antioxydantes devront être davantage étudiées afin d'être valorisées, notamment dans les réactions anti-inflammatoires. Des systèmes originaux ont été mis au point composés de Pt<sup>II</sup> et Au<sup>I</sup>. Ceux-ci sont composés d'un réseau Au<sup>I</sup>-CN-Au<sup>I</sup> dans lequel les ions Pt<sup>II</sup> s'insèrent. Les caractérisations par MET ont mis en évidence la présence de fuseaux, qui sont le résultat d'un regroupement organisé de particules de petites tailles. La réduction chimique de ces objets a permis d'obtenir des particules métalliques mais dont la taille n'est pas contrôlée. La réduction de ces objets par une voie radiolytique pourra être explorée.

De plus, les cyanosols Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup> devront être soumis à des irradiations en présence de TiO<sub>2</sub> pour caractériser leur comportement vis-à-vis des ROS pour envisager à terme des applications en radiothérapie et hadronthérapie. Les réseaux Au<sup>I</sup>(CN) ont montré des propriétés de fluorescence et leur intérêt en catalyse a été démontré. Ces points devront être développés dans la suite (panne du fluorimètre détectée lors de nos mesures).

La méthodologie acquise permettra également de mieux anticiper les effets radio-protecteurs versus radio-amplificateurs. Par ailleurs, des déclinaisons et perspectives intéressantes seront menées sur les composés Cu(CN) ou Ag(CN) qui pourraient être obtenus selon la même procédure.



## ANNEXES

### **Annexe 1 : Synthèse des particules $Gd^{III}_xIn^{III}_{1-x}[Fe^{II}(CN)_6]$ , $Gd^{III}_xFe^{III}_{1-x}[Fe^{II}(CN)_6]$ et $Mn^{II}_xFe^{III}_{1-x}[Fe^{II}(CN)_6]$**

Selon la composition des particules synthétisées, des solutions mères à  $10^{-2}$  M des sels correspondants ( $K_4Fe^{II}(CN)_6$  (m=42,2 mg),  $GdCl_3$  (m= 37 mg) ou  $MnCl_2$  (m= 19,8 mg) et  $InCl_3$  (m=22,1 mg) ou  $Fe^{III}(NO_3)_3$  (m= 40,4 mg)) sont préparées, dans 10 mL d'eau distillée.

Les synthèses ont été réalisées dans un volume total de 400 mL. Pour cela, une solution aqueuse de 100 mL, contenant les sels  $InCl_3$  ou  $Fe^{III}(NO_3)_3$  et  $GdCl_3$  ou  $MnCl_2$  à 0,5 mM, est ajoutée sous forte agitation dans une solution aqueuse de  $Fe^{II}$  (100 mL à 0,5 mM). Cette étape est répétée deux fois pour obtenir le volume total de 200 mL. Le volume de solution mère à ajouter est calculé pour obtenir une concentration de 0,5 mM, selon le pourcentage d'ions souhaité. Les solutions sont complétées à l'eau distillée afin d'obtenir un volume total. Le taux de  $Fe^{II}$  étant constant, le volume de solution mère est le même pour tous les composés synthétisés, soit 5 mL. Le volume d'eau ajouté est donc de 95 mL. Le tableau A-1 présente le volume de solutions mères utilisé pour chaque composition.

$Gd^{III}_xIn^{III}_{1-x}[Fe^{II}(CN)_6]$	x=[5]	x=[10]	$Gd^{III}_xFe^{III}_{1-x}[Fe^{II}(CN)_6]$	x=[5]	x=[10]
[Gd <sup>III</sup> ] (mM)	0,025	0,050	[Gd <sup>III</sup> ] (mM)	0,025	0,050
V <sub>mèreGdCl3</sub> (mL)	0,250	0,500	V <sub>mèreGdCl3</sub> (mL)	0,250	0,500
% In <sup>III</sup>	95	90	% Fe <sup>III</sup>	95	90
[In <sup>III</sup> ] (mM)	0,475	0,450	[Fe <sup>III</sup> ] (mM)	0,475	0,450
V <sub>mèreInCl3</sub> (mL)	4,750	4,500	V <sub>mère Fe(NO3)3</sub> (mL)	4,750	4,500
V <sub>eau</sub> (mL)	95	95	V <sub>eau</sub> (mL)	95	95

$Mn^{II}_xFe^{III}_{1-x}[Fe^{II}(CN)_6]$	x=[5]	x=[10]
[Mn <sup>II</sup> ] (mM)	0,025	0,050
V <sub>mèreMnCl2</sub> (mL)	0,250	0,500
% Fe <sup>III</sup>	95	90
[Fe <sup>III</sup> ] (mM)	0,475	0,450
V <sub>mère Fe(NO3)3</sub> (mL)	4,750	4,500
V <sub>eau</sub> (mL)	95	95

**Tableau A-1.** Volumes de solutions mères à ajouter pour les particules de formules :  $K_xGd^{III}_yIn^{III}_{1-x}[Fe^{II}(CN)_6]_y$  ;  $K_xGd^{III}_yFe^{III}_{1-x}[Fe^{II}(CN)_6]_y$  et  $K_xMn^{II}_yFe^{III}_{1-x}[Fe^{II}(CN)_6]_y$

Les solutions sont ajoutées à 2°C. Pour cela, celles-ci sont placées dans un bain de glace. Cette température est maintenue pendant 30 min après ajout. Après 30 min à température ambiante, les particules sont enrobées par 25 équivalents de monomère de dextran par rapport à la quantité de  $Fe^{II}$ . Ainsi, la masse de polymère préalablement pesée (m=405 mg) est ajoutée en solution sous agitation. Lorsque la poudre est totalement dissoute, les particules enrobées sont précipitées avec 0,8 équivalents en volume d'acétone. Une étape de centrifugation de 15 min à température ambiante et 8000 tours par min permet de séparer les particules du surnageant. Ensuite, les particules sont séchées sous vide pour être conservées sous forme de poudre.



## Annexe 2 : Redispersion des particules dans les milieux d'étude

La redispersion consiste à mettre en suspension les particules qui sont sous forme de poudre. Cette étape est importante pour les applications visées. Dans un premier temps, les particules sont redispersées dans l'eau distillée à une concentration de 10 mM pour les particules de  $Gd^{III}In^{III}Fe^{II}$  et de 5 mM pour les particules de  $Gd^{III}Fe^{III}Fe^{II}$  et  $Mn^{II}Fe^{III}Fe^{II}$ . Afin d'éliminer les éventuels agrégats, les solutions obtenues sont passées au bain à ultra-sons pendant 5 min. Les solutions sont ensuite analysées par DLS et MET afin de s'assurer du maintien de la taille des particules malgré la présence du dextran

### Redispersion dans l'ALF et le SVF :

Les redispersions dans les milieux ALF et SVF ont pour objectif d'évaluer la stabilité des ponts BdP ( $Fe^{II}-CN-Fe^{III}$ ). Les solutions sont ainsi préparées à une concentration de  $100 \mu g \cdot mL^{-1}$  en BdP (la concentration en NPs varie en fonction de la quantité de chaînes dextran effectivement présentes). Dans ces milieux, l'étape du bain à ultra-son est remplacée, dans le même objectif, par l'utilisation d'un vortex qui n'entraîne pas d'échauffement des solutions. Celles-ci sont ensuite analysées.

## Annexe 3 : Caractérisations chimiques et de taille

### Diffusion dynamique de la lumière (DLS) :

La diffusion dynamique de la lumière est une technique basée sur l'utilisation d'un laser et le principe de la diffusion Rayleigh.

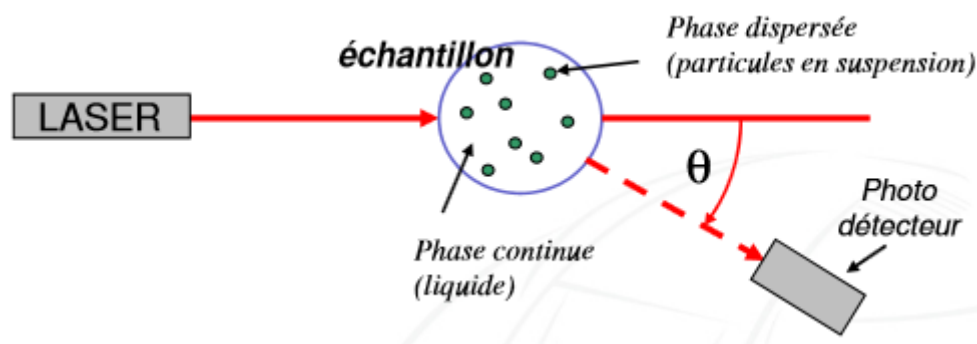
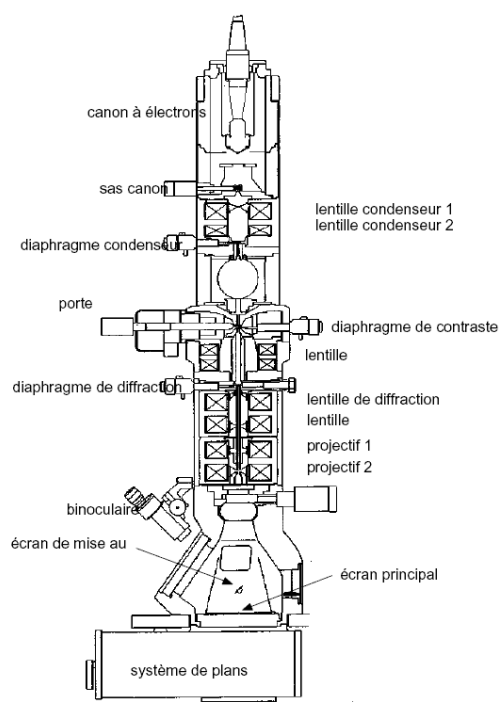


Figure A-1. Principe de la DLS

Cette analyse donne accès à la mesure du diamètre hydrodynamique, c'est-à-dire le diamètre d'une particule associé à une couche d'ions diffus et une couche de solvatation. Les valeurs obtenues sont donc supérieures à la taille des particules. Cette technique simple d'utilisation permet une mesure rapide en solution sans altération des objets. Il est possible de suivre l'évolution des tailles au cours des différentes étapes de synthèse mais également au cours du temps. La DLS permet aussi de rendre compte de l'état de dispersion des particules en solution. L'appareil utilisé est un zetasiser de la marque Malvern. Le potentiel  $\zeta$  des particules peut également être mesuré sur cet appareil permettant de connaître le signe de la charge de surface et d'évaluer la stabilité colloïdale.

### Microscopie électronique en transmission (MET) :

La microscopie électronique en transmission permet de visualiser les particules en solution nues ou enrobées de polymère. Un faisceau d'électrons produit par un canon à électron est accéléré sous une haute tension de 120 kV, dans notre cas. Des lentilles électromagnétiques permettent de focaliser le faisceau sur l'échantillon. Celui-ci est transmis à travers l'échantillon et est détecté par une caméra CCD qui transcrit les données électroniques en images optiques. Les observations MET ont été menées en autonomie sur la plateforme Imagif à l'ICSN au CNRS de Gif sur Yvette. Le microscope est le JEOL 1400.



**Figure A-2.** Schéma d'un microscope électronique en transmission

Les échantillons sont déposés sous forme de goutte sur une grille en cuivre composée d'une membrane en carbone. Le nombre de gouttes déposées est adapté en fonction de la concentration des solutions. Les grilles sont ensuite séchées à l'air libre puis observées en MET.

### Spectroscopie infra-rouge (IR) :

La spectroscopie IR permet d'identifier les liaisons présentes dans le composé analysé. L'échantillon sous forme de poudre est préparé dans une pastille KBr. Pour cela, 1 mg d'échantillon est mélangé à 99 mg de KBr (transparent dans l'IR). Les spectres sont enregistrés entre  $200\text{ cm}^{-1}$  et  $4000\text{ cm}^{-1}$ . Cela nous permet d'identifier la bande de vibration des cyanures autour de  $2100\text{ cm}^{-1}$ , qui est sensible à la nature du pont. L'appareil est un spectromètre infra-rouge à transformée de fourrier (IR-FT) de la marque Perkin-Elmer.

### Analyse élémentaire (AE) :

Les analyses élémentaires ont pour but de déterminer la proportion de carbone, d'azote et d'hydrogène contenue dans les particules. A partir de ces résultats, la quantité de chaîne dextran et de molécules d'eau présente dans les objets est déterminée. Ces analyses sont effectuées par l'ICSN au CNRS de Gif sur Yvette.

### Analyse dispersive en énergie (EDS : Energie Dispersive Spectroscopy) :

L'EDS est une technique spectroscopique utilisant un microscope électronique à balayage, dans notre cas. Grâce à ces analyses, nous pouvons obtenir la proportion en K, Cl, Pt, Pd, Fe, Au et Gd dans les composés. Pour cela, un faisceau d'électrons (rayonnement X) est envoyé sur l'échantillon conduisant à l'éjection d'électrons de cœur de la matière. Une lacune électronique est ainsi créée et va être comblée par un électron d'une couche énergétique supérieure. Un photon est alors émis avec une énergie caractéristique de l'atome sondé. L'énergie et le nombre de coups détectés permettent de remonter au pourcentage atomique de chaque élément de l'échantillon. Ces analyses ont été réalisées par François Brisset à l'ICMMO.

## **Annexe 4 : Spectrométrie par torche à plasma (ICP : Inductively Coupled Plasma)**

L'ICP est une technique d'analyse élémentaire permettant de doser la plupart des éléments de la classification périodique. L'appareil utilisé, Thermo ICAP 6500, possède un détecteur optique (OES : Optical Emission Spectrometry). Celui-ci se situe à l'IUT d'Orsay et les mesures ont été effectuées en partenariat avec Philippe Méjanelle. La mesure consiste à ioniser un échantillon en solution grâce à un plasma d'argon. La détection optique consiste à mesurer les longueurs d'onde de la lumière émise ainsi que son intensité. Chaque élément a un spectre propre avec des longueurs d'onde caractéristiques. La concentration en un élément dosé est proportionnelle à l'intensité détectée.

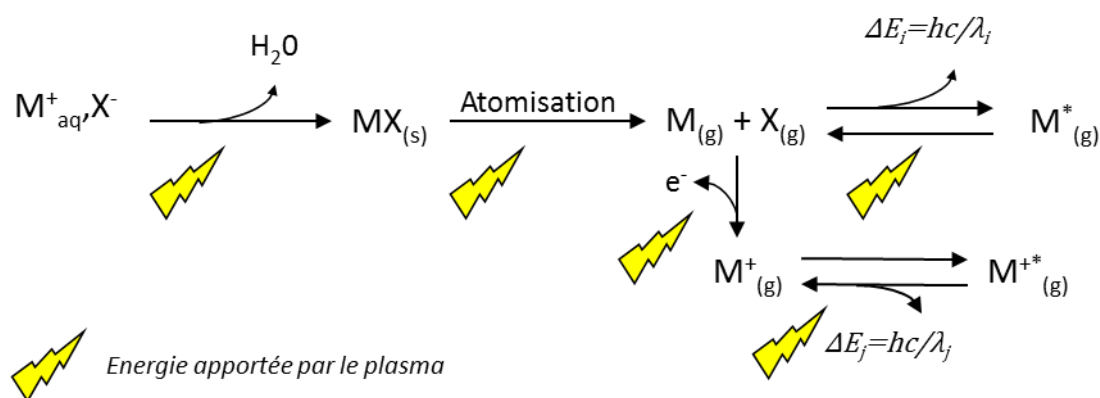


Figure A-3. Principe de l'ICP

Afin de pouvoir déterminer les concentrations en éléments de solutions inconnues, des courbes d'étalonnage sont réalisées pour chaque longueur d'onde caractéristique et chaque élément dosé. Trois solutions étalons sont préparées contenant  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  et  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  de chaque élément à doser dans  $HNO_3$  à  $10^{-2} \text{ M}$ . La figure A-4 représente des courbes d'étalonnage obtenues pour les éléments Fe, In, Gd et Mn à une longueur d'onde précise. A partir de ces courbes d'étalonnage, les concentrations des échantillons inconnus peuvent être déterminées.

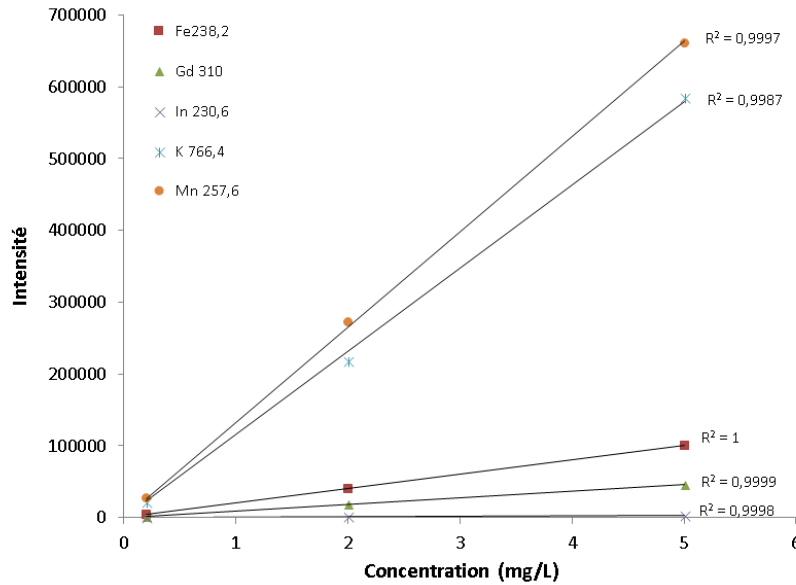


Figure A-4. Courbes d'étalonnage établies pour une longueur d'onde de chaque élément dosé (K, Fe, In, Gd, Mn)

#### Analyse des poudres :

Les échantillons sous forme de poudre sont redispersés (10 mg) dans 50 mL de HNO<sub>3</sub> à 10<sup>-2</sup>M. Les solutions sont ensuite analysées. Les valeurs de concentration en mg.L<sup>-1</sup> en chaque élément sont déterminées. Les éléments analysés, en fonction du type de NPs, sont K, Fe, In, Mn et Gd. Les rapports K/Fe, In/Fe, Mn/Fe et Gd/Fe permettent de déterminer la composition chimique des particules.

#### Analyse des ultrafiltrats :

La préparation des ultrafiltrats est détaillée dans l'annexe 5. Ceux-ci sont dilués dans 10 mL de HNO<sub>3</sub> à 10<sup>-2</sup> M puis analysés par ICP-OES. Préalablement, une gamme d'étalonnage a été établie avec des concentrations en éléments de 0,05 mg.L<sup>-1</sup>, 0,2 mg.L<sup>-1</sup>, 0,5 mg.L<sup>-1</sup> et 1 mg.L<sup>-1</sup>. Des valeurs de concentrations en K, Fe, Mn, In et Gd en mg.L<sup>-1</sup> sont obtenues.

### **Annexe 5 : Détermination de la quantité de métaux libres par ultrafiltration**

Le but est de déterminer la quantité de relargage (ions libres) en Gd<sup>III</sup> et en Mn<sup>II</sup> car ces éléments peuvent être à l'origine de toxicité. Le relargage des autres composants a également été mesuré.

#### Ultrafiltration :

Les particules sont redispersées dans 1 mL d'eau distillée à une concentration en ions paramagnétiques (Gd<sup>III</sup> ou Mn<sup>II</sup>) de 0,2 mM. Les solutions colloïdales sont centrifugées pendant 30 min à 8000 tours/min dans un système spécial appelé Vivaspin 6 avec une membrane de 5000 Da. Les particules sont ensuite lavées avec un 1 mL d'eau distillée puis centrifugée une nouvelle fois dans les mêmes conditions. Les ultrafiltrats peuvent alors être analysés.

### Calcul de la quantité d'ions libres :

La composition chimique des particules a été déterminée par les mesures ICP sur poudre. En connaissant la masse de poudre engagée dans la procédure d'ultrafiltration et le facteur de dilution pour préparer les solutions analysées en ICP, la quantité totale d'ions métalliques dans la dispersion peut être déterminée. Les mesures d'ICP sur filtrat rendent compte de la quantité massique d'ions libres. En utilisant ces données, le pourcentage de relargage de chaque élément analysé peut être calculé selon la formule suivante :

$$\text{Relargage en métal M (\%)} = \frac{[M]_{\text{dispersion}}}{[M]_{\text{filtrat}}} \times 100$$

Avec  $[M]_{\text{dispersion}}$  : concentration en métal dans les redispersions avant ultrafiltration

$[M]_{\text{filtrat}}$  : concentration en métal dans les filtrats

## **Annexe 6 : Diffraction des rayons X (DRX) sur poudre**

La diffraction des rayons X permet de déterminer la structure cristalline des composés (dans notre cas, cubique à faces centrées), le paramètre de maille et la taille des domaines diffractant des nanoparticules d'ABP. Les mesures de DRX se font sur les poudres avec un diffractomètre Panalytical PW3040/60 X'Pert Pro ( $\theta - 2\theta$ ). Cet appareil utilise un rayonnement monochromatique,  $K_{\alpha 1}$  du cuivre avec  $\lambda = 1,54059 \text{ \AA}$ . Après mesure, un diffractogramme est obtenu, c'est-à-dire une représentation de l'intensité des pics de diffraction en fonction de l'angle  $2\theta$ . Ensuite, chaque pic de diffraction est associé à la famille de plan atomique hkl correspondante. En connaissant la valeur de  $2\theta$  des pics de diffraction ainsi que la longueur d'onde incidente, la loi de Bragg permet de déterminer la distance interréticulaire des plans atomiques du composé :

$$2d \sin \theta = n \lambda$$

Où  $\theta$  est l'angle de diffraction ;  $\lambda$  est la longueur d'onde incidente ; d est la distance interréticulaire et n est un entier que nous prenons égal à 1.

En connaissant la distance interréticulaire et les indices hkl, nous pouvons déterminer a, le paramètre de maille, à partir de la formule suivante applicable uniquement aux structures cubiques.

$$a = d \cdot \sqrt{h^2 + k^2 + l^2}$$

Où a est le paramètre de maille ; d, la distance interréticulaire ; h, k, l ; les indices de Miller des plans atomiques

La formule de Scherrer permet de déterminer la taille des domaines diffractants D à partir de la largeur des pics à mi-hauteur  $\beta_{1/2}$ .

$$D = \frac{k \lambda}{\beta_{1/2} \cos \theta}$$

k est une constante liée à la forme du domaine. Généralement, k est égal à 0,9. La taille des domaines diffractant peut être considérée comme la taille des particules.

## Annexe 7 : Spectroscopie UV-visible

La spectroscopie UV-visible permet de caractériser les propriétés optiques des systèmes étudiés. Cette technique consiste à mesurer l'intensité lumineuse (photons) absorbée par un échantillon par rapport à une référence, généralement le solvant. Les photons mis en jeu sont compris dans les domaines allant du proche infra-rouge jusqu'aux ultra-violet. La matière sondée, ayant été soumise à un rayonnement dans ces domaines, va subir des transitions électroniques propre à sa nature. La loi de Beer-Lambert permet de calculer le coefficient d'extinction molaire,  $\epsilon$  :

$$A = \log \frac{I_{\text{incident}}}{I_{\text{détecté}}} = \epsilon lc$$

Avec A, l'absorbance

$I_{\text{incident}}$ , l'intensité du rayonnement avant l'échantillon

$I_{\text{détecté}}$ , l'intensité du rayonnement après absorption par l'échantillon

$\epsilon$ , le coefficient d'extinction molaire en  $\text{mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  ou  $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

l, la longueur de la cuve (1 cm)

c, la concentration en  $\text{mol.L}^{-1}$  ou M

Les spectres des particules de BdP ou ABP ont été enregistrés entre 500 et 1000 nm et ceux des cyanosols ont été fait entre 200 et 1000 nm. Le spectrophotomètre est un Cary 5000 de la marque Varian. Les mesures dans l'ALF et le SVF ont été menées à 37°C grâce à un contrôleur de température de l'unité contenant les cuves.

## Annexe 8 : Dosage d'ions libres au xylénol orange

Le dosage au xylénol orange a été utilisé pour évaluer la proportion de  $\text{Gd}^{\text{III}}$  libre<sup>146</sup>. Le xylénol orange est un composé organique pouvant former des complexes avec les ions  $\text{Gd}^{3+}$  libres. L'affinité du xylénol et du  $\text{Gd}^{\text{III}}$  n'est pas suffisamment importante pour que le xylénol capte les ions déjà complexés. Ainsi, seuls les ions libres formeront des complexes avec le xylénol et seront dosés. Comme son nom l'indique, le xylénol orange en solution aqueuse a une couleur orange caractéristique. La complexation avec du  $\text{Gd}^{\text{III}}$  entraîne un virage colorimétrique vers le violet. Le dosage du  $\text{Gd}^{\text{III}}$  libre doit se faire à pH constant. Pour cela, les solutions utilisées pour le dosage sont préparées dans une solution tampon acétate à pH=5,8. La première étape du dosage consiste à établir une gamme d'étalonnage. Pour cela, une solution standard, pour ICP, monoélément de  $\text{Gd}^{\text{III}}$  ( $[\text{Gd}]=1000 \text{ mg.L}^{-1}=6,36 \text{ M}$ ) est utilisée comme solution mère. Cinq solutions étalons sont préparées, elles sont présentées dans le tableau ci-dessous.

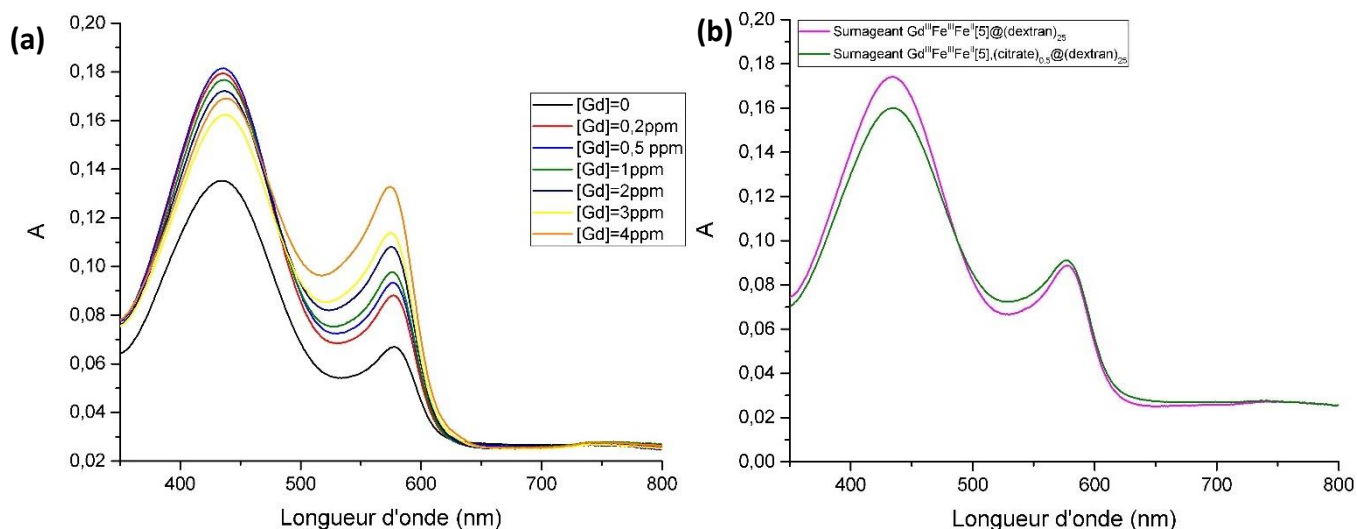
[Gd] ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	0,2	0,5	1	2	3	4
[Gd] ( $\mu\text{M}$ )	1,27	3,18	6,36	12,7	19,1	25,4
Solution mère	4 ppm	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard
$V_{\text{fiolle}}$ (mL)	100	100	100	100	100	100
$V_{\text{solution mère}}$ (mL)	5	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4

Tableau A-2. Préparation des solutions étalons de  $\text{Gd}^{\text{III}}$

Une solution contenant 3 mg de xylénol orange dans 250 mL de tampon acétate est préparée. Les solutions à analyser en spectroscopie UV-visible sont préparées sous agitation. Elles contiennent 1 mL de la solution de xylénol et 100  $\mu$ L de solution à doser (étalons ou échantillons inconnus).

### Spectres UV-visibles :

Le xylénol orange présente deux maxima d'absorption à 433 nm et 573 nm. La bande à 433nm est la plus intense. Lorsqu'il y a formation d'un complexe avec le  $Gd^{III}$ , les intensités relatives des deux bandes s'inversent. A titre d'exemple, les résultats obtenus pour le dosage du  $Gd^{III}$  libre dans les surnageants des échantillons  $Gd^{III}Fe^{III}Fe^{II}[5]@(dextran)_{25}$  et  $Gd^{III}Fe^{III}Fe^{II}[5], (citrate)_{0,5}@(dextran)_{25}$  sont présentés.



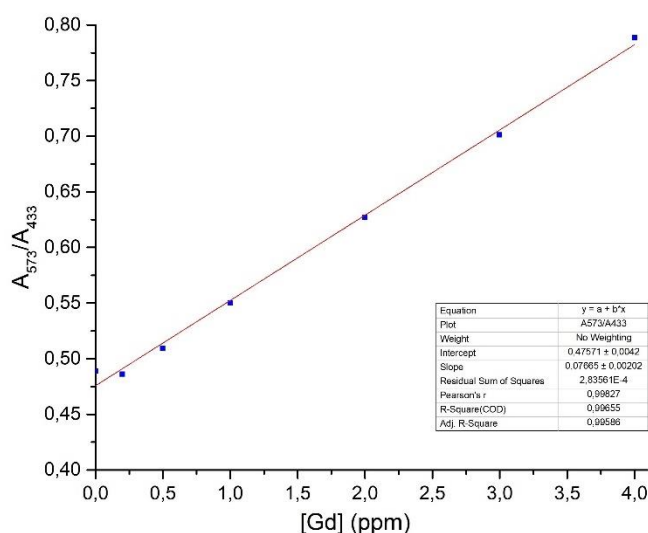
**Figure A-5.** Spectres UV-visible des solutions de complexes xylénol orange et  $Gd^{III}$  (a) Gamme d'étalonnage ; (b) Surnageant des échantillons  $Gd^{III}Fe^{III}Fe^{II}[5]@(dextran)_{25}$  et  $Gd^{III}Fe^{III}Fe^{II}[5], (citrate)_{0,5}@(dextran)_{25}$

### Traitements des données :

Les valeurs d'absorbance sont relevées aux longueurs d'onde caractéristiques, 433 nm et 573 nm, puis les rapports des absorbances sont calculés pour les étalons et les échantillons inconnus. Les valeurs obtenues pour les étalons permettent de tracer une droite d'étalonnage. A partir de l'équation de la droite d'étalonnage et des rapports  $A_{573}/A_{433}$  des échantillons inconnus, il est possible de calculer les concentrations en  $Gd^{III}$  dans ces échantillons. Les résultats du dosage des surnageants des échantillons  $Gd^{III}Fe^{III}Fe^{II}[5]@(dextran)_{25}$  et  $Gd^{III}Fe^{III}Fe^{II}[5], (citrate)_{0,5}@(dextran)_{25}$  sont présentés ci-dessous.

Echantillons	$A_{573}$ (nm)	$A_{433}$ (nm)	$A_{573}/A_{433}$
Surnageant $Gd^{III}Fe^{III}Fe^{II}[5]@(dextran)_{25}$	0,08732	0,17401	0,50181024
Surnageant $Gd^{III}Fe^{III}Fe^{II}[5], (citrate)_{0,5}@(dextran)_{25}$	0,09007	0,15989	0,56332479

**Tableau A-3.** Valeurs d'absorbance aux deux maxima de longueur d'onde du xylénol orange pour les échantillons inconnus



Equation de la droite :

$$\frac{A_{573}}{A_{433}} = 0,077 [\text{Gd}] + 0,476$$

Figure A-6. Droite d'étalonnage déterminée à partir du rapport des absorbances relevées à 573 nm et 433 nm.

Echantillons	[Gd <sup>III</sup> ] (ppm)	[Gd <sup>III</sup> ] (μM)	% de Gd <sup>III</sup> libre	% de Gd <sup>III</sup> dans NPs
Surnageant Gd <sup>III</sup> Fe <sup>III</sup> Fe <sup>II</sup> [5]@(dextran) <sub>25</sub>	0,3	2,1	1,5	3,5
Surnageant Gd <sup>III</sup> Fe <sup>III</sup> Fe <sup>II</sup> [5], (citrate) <sub>0,5</sub> @(dextran) <sub>25</sub>	1,1	7,2	5,4	0

Tableau A-4. Résultats obtenus pour les échantillons Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup>[5]@(dextran)<sub>25</sub> et Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup>[5], (citrate)<sub>0,5</sub>@(dextran)<sub>25</sub>

Ces résultats nous ont permis de confirmer que la majorité du Gd<sup>III</sup> engagé dans la synthèse des particules Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup>[5], (citrate)<sub>0,5</sub>@(dextran)<sub>25</sub> se trouvait sous forme libre dans le surnageant au moment de l'étape de centrifugation. Le xylénol orange pouvant former des complexes avec d'autres ions métalliques comme le fer, les résultats sont souvent surestimés, expliquant les différences entre ces résultats et ceux obtenus en ICP-OES.

Le dosage au xylénol orange est une technique simple à mettre en place et rapide pour obtenir une première estimation de la quantité de Gd<sup>III</sup> libre.

#### Résultats du dosage du Gd<sup>III</sup> libre d'un échantillon Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup>[5]@(dextran)<sub>25</sub> redispersé dans l'eau et dans le SVF :

Les analyses sont effectuées après ultrafiltration des particules redispersées soit dans l'eau soit dans le SVF.

Echantillons	[Gd <sup>III</sup> ] (ppm)	[Gd <sup>III</sup> ] (μM)	% de Gd <sup>III</sup> libre
Gd <sup>III</sup> Fe <sup>III</sup> Fe <sup>II</sup> [5]@(dextran) <sub>25</sub> -H <sub>2</sub> O	0,5	3,2	3,1
Gd <sup>III</sup> Fe <sup>III</sup> Fe <sup>II</sup> [5]@(dextran) <sub>25</sub> -SVF-t=0	1,1	7,0	7,1
Gd <sup>III</sup> Fe <sup>III</sup> Fe <sup>II</sup> [5]@(dextran) <sub>25</sub> -SVF-t=1h	0,9	5,7	5,5
Gd <sup>III</sup> Fe <sup>III</sup> Fe <sup>II</sup> [5]@(dextran) <sub>25</sub> -SVF-t=4h	0,8	5,1	5,2
Gd <sup>III</sup> Fe <sup>III</sup> Fe <sup>II</sup> [5]@(dextran) <sub>25</sub> -SVF-t=24h	0,7	4,5	4,5

Tableau A-5. Résultats obtenus par dosage aux xylénol orange des filtrats des échantillons Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup>[5]@(dextran)<sub>25</sub> redispersés dans l'eau et le SVF



## Annexe 9 : Caractérisation des particules $Gd^{III}In^{III}Fe[5]@(PVP)_{100}$ et $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]@(PVP)_{100}$

- Caractérisation de tailles :

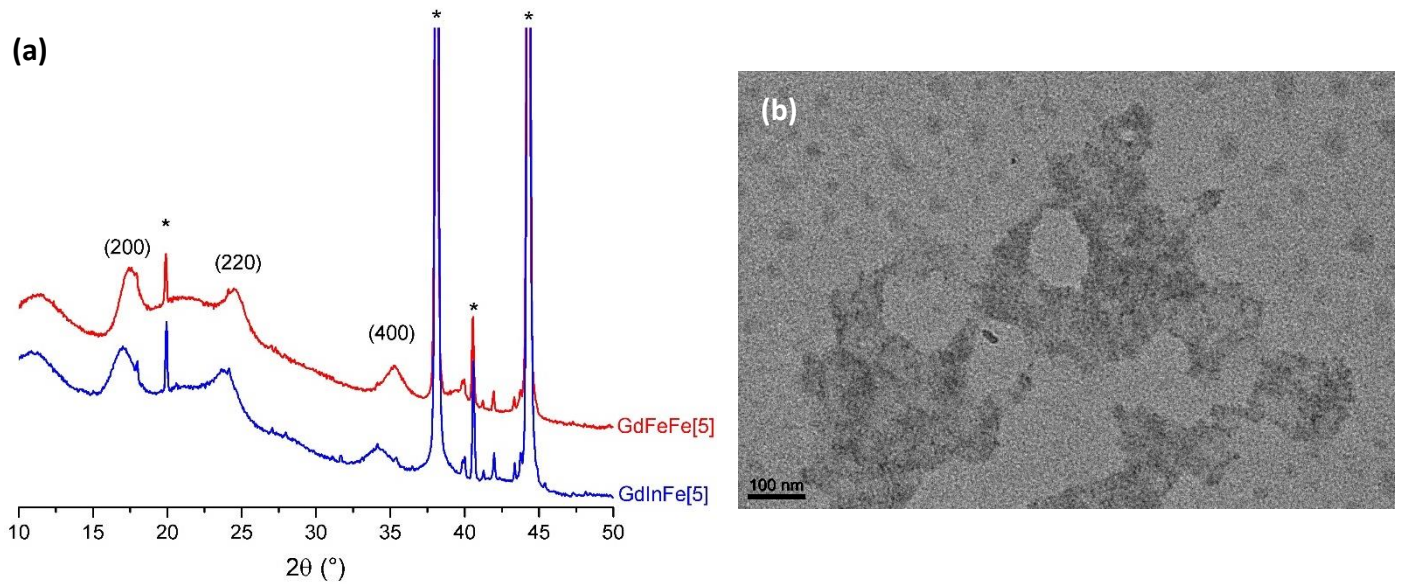


Figure A-7. (a) Diffractogrammes des particules enrobées au dextran ; (b) Image MET des particules  $Gd^{III}In^{III}Fe[5]@(PVP)_{100}$

- Caractérisation chimique :

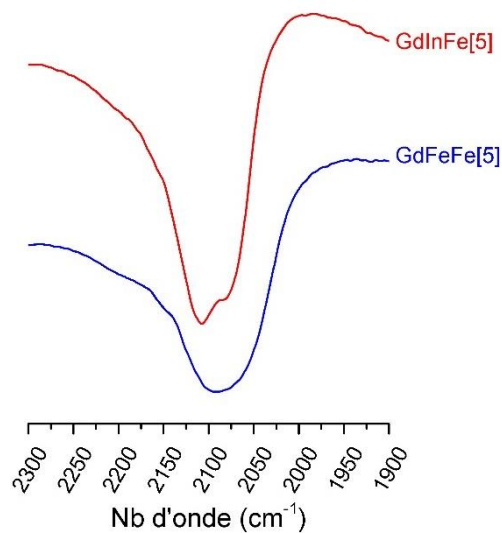


Figure A-8. Spectres IR des particules  $Gd^{III}In^{III}Fe[5]@(PVP)_{100}$  et  $Gd^{III}Fe^{III}Fe[5]@(PVP)_{100}$

## **Annexe 10 : Synthèses des bleus de Prusse de 30 nm et 110 nm**

- **Synthèse des BdP de 17 nm :**

A partir de la solution colloïdale de particules de BdP de 4 nm diluée par 2 placée à 2°C et sous vive agitation, sont ajoutés goutte à goutte 19 mL d'une solution à 0,5 mM de  $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (0,950 mL de solution mère + 18,05 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ ) et 19 mL d'une solution à 0,5 mM de  $\text{K}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$  (0,950 mL de solution mère + 18,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ ). Les quantités sont telles que le rapport  $n_s/n_c = 38$  de sorte à obtenir une coquille de 6 nm d'épaisseur (cf. Annexe 12).

- **Synthèse des BdP de 30 nm<sup>90</sup> :**

Une solution de 20 mL contenant 0,5 mmol d'acide citrique ( $m=96,1$  mg) et 10 mM du précurseur de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (chlorure de fer III) ( $m=54$  mg) est chauffée à une température de 60°C. De la même manière, une solution de 20 mL composée de 10 mM de  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6$  ( $m=84,4$  mg) et 0,5 mmol d'acide citrique est portée à 60°C. L'ajout de la solution de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  se fait, sous agitation, par un goutte à goutte dans la solution de ferrocyanure, à chaud. Le mélange est laissé sous agitation et à chaud pendant 5 min. Après retour à  $T_{\text{Amb}}$ , les particules sont enrobées par 25 équivalents de monomère de dextran. Celles-ci sont précipitées par ajout de 0,8 équivalent en volume d'acétone. L'ensemble est centrifugé pendant 15 min à 8000 tours/min. Le surnageant est éliminé et la poudre obtenue est séchée sous vide.

- **Synthèse de BdP de 110 nm<sup>161</sup> :**

La mise au point de particules de 110 nm se fait en condition acide. Pour cela, 3g de PVP et 131,7mg de ferricyanure ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) sont additionnés à une solution d'HCl à 0,01 M (40 mL) sous agitation. Après 30 min d'agitation, une solution claire est obtenue. L'ensemble est placé à l'étuve (80°C) pendant 20h. Un précipité est obtenu après centrifugation et lavage (eau et éthanol). Il est séché sous vide et les particules sont conservées sous forme de poudre.

## **Annexe 11 : Systèmes avec un enrobage contenant des phosphates**

Les cœurs BdP sont synthétisés en solution aqueuse par mélange d'une solution aqueuse de ferrocyanure à 0,5 mM et d'une solution aqueuse de nitrate de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  à 0,5mM à froid (2°C), selon le même protocole que celui décrit dans l'annexe 1.

- **Synthèse des particules avec enrobage avec D-glucose-6-phosphate et dextran**

0,25 mM de D-Glucose-6-phosphate (6,1 mg) sont ajoutés dans 80 mL d'une solution de BdP. Puis, le dextran (25 équivalents de monomère) est ajouté à la solution. L'ajout d'acétone (64 mL) permet de précipiter les particules qui seront séchées sous vide et conservées sous forme de poudre.

- Enrobage avec des  $\beta$ -cyclodextrines fonctionnalisées par des groupements phosphates

La  $\beta$ -CD-phosphate est ajoutée dans la solution de BdP à une concentration de 4,62 mM soit 18,5 équivalents ( $m=117,5$  mg). L'ajout de 6 équivalents en volume d'acétone permet de précipiter les particules. Puis, elles sont centrifugées pendant 1h à 4°C (8000 tours/min) et séchées sous vide.

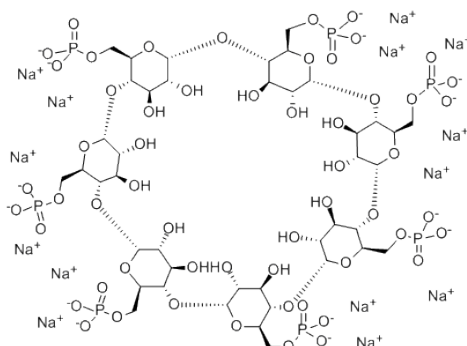
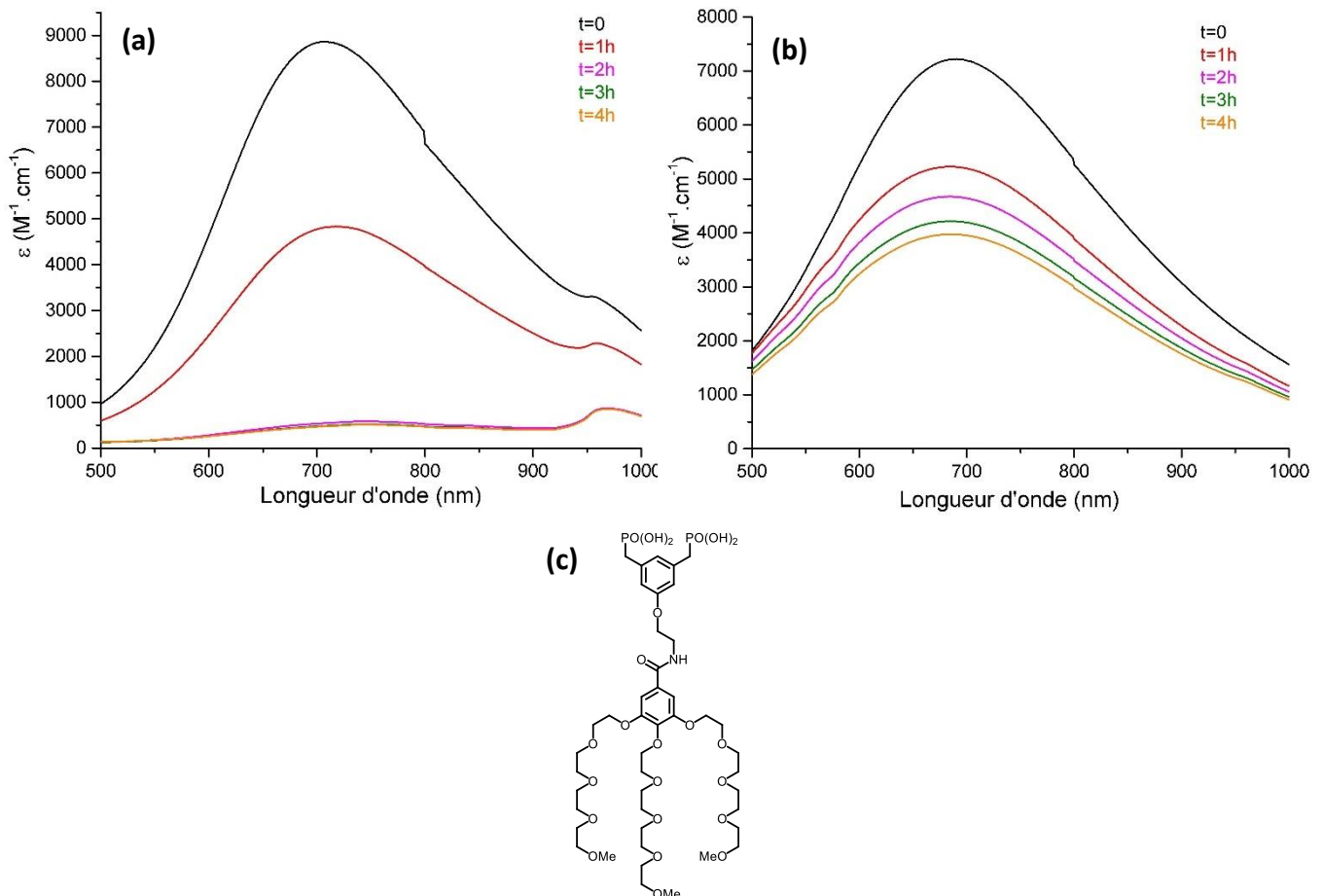


Figure A-9. Structure de la  $\beta$ -CD-phosphate

- Enrobage avec un dendrimère

Ce dendrimère dont la structure est présentée ci-dessous a été mis au point par l'équipe de Delphine Felder-Flesch à l'IPCMS<sup>184</sup>. Il a été associé à des nanoparticules d'oxyde de fer<sup>185</sup> qui peuvent servir d'agent de contraste  $T_2$  pour l'IRM. Le dendrimère permet une grande stabilité des particules dans des milieux physiologiques et favorise une élimination par les reins et les voies hépato-biliaires. De plus, les auteurs ont montré une amélioration de la relaxivité en présence du dendrimère<sup>184</sup>. D'après cette étude, le dendrimère semble être une réponse à notre problématique. Le dendrimère est conservé sous forme solide. Une solution à une concentration de 48 mM en dendrimère est préparée dans l'eau milliQ. 250 $\mu$ L de cette solution est ajouté dans le milieu réactionnel contenant les BdP en solution (30 mL). Ainsi, le dendrimère est à une concentration de 0,4 mM soit 1,5 équivalents par rapport au fer. L'ensemble est conservé en solution à -20°C.

La présence de dendrimère autour des particules n'entraîne pas d'augmentation du diamètre hydrodynamique (6-9 nm). Les particules n'ont pas été caractérisées chimiquement et ont été étudiées uniquement en stabilité dans l'ALF et le SVF par un suivi en spectroscopie UV-visible.



**Figure A-10.** Spectres UV-visible des particules  $BdP@(dendrimer)_{1,5}$  redispersées dans (a) l'ALF ; (b) le SVF ;(c) Structure du dendrimer

Ce suivi montre une dégradation rapide dans l'ALF. Bien que la dégradation soit présente dans le SVF, celle-ci est ralentie par rapport à un enrobage au dextran. Ces systèmes pourront être d'avantage optimisés par la suite afin d'optimiser les propriétés de protection dans le SVF.

## **Annexe 12 : Synthèse de particules cœur-coquille**

- Calcul des quantités de précurseurs à ajouter :

Les analogues de bleus de Prusse cristallisent dans un réseau CFC dont le paramètre de maille varie peu, ce qui permet de considérer la densité de la coquille et du cœur comme constante. Ainsi,

$$\frac{N_C}{V_C} = \frac{N_{CS}}{V_{CS}}$$

Où  $N_C$  et  $N_{CS}$  sont le nombre d'atomes dans le cœur et le cœur-coquille respectivement ;  $V_C$  et  $V_{CS}$  sont le volume du cœur et du cœur-coquille respectivement. Le nombre d'atomes  $N_{CS}$  est égal à la somme du nombre d'atomes contenus dans le cœur,  $N_C$ , et dans la coquille,  $N_S$ . L'expression précédente peut alors s'écrire :

$$\frac{N_C}{V_C} = \frac{N_C + N_S}{V_{CS}}$$

L'équation peut aussi s'écrire sous la forme :

$$\frac{N_S}{N_C} = \frac{V_{CS}}{V_C} - 1$$

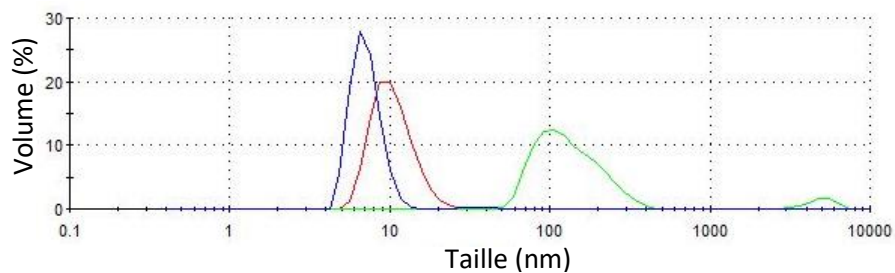
Le rapport du nombre d'atomes est égal au rapport des quantités de matière,  $n_S/n_C$ , lorsque tous les ions ajoutés sont insérés dans les particules. Cette équation peut être écrite de manière à faire apparaître la taille d'un cœur cubique de côté  $a_C$ , et la taille d'un cœur-coquille cubique de côté  $a_{CS}$ .

$$\frac{n_S}{n_C} = \left(\frac{a_{CS}}{a_C}\right)^3 - 1$$

Ainsi, en déterminant la quantité  $n_C$  de précurseurs contenus dans la solution colloïdale de particules, la taille des objets  $a_C$  et la taille du cœur-coquille désirée  $a_{CS}$ , il est possible de calculer la quantité de précurseur  $n_S$  à ajouter.

### **Annexe 13 : Croissance d'une coquille de Cu<sup>II</sup>Fe par ajout séquentiel sur un cœur de BdP**

- Coquille de 2 nm : rapport  $n_S/n_C=7$



**Figure A-11.** DLS des particules BdP@Cu<sup>II</sup>Fe@dextran<sub>25</sub> ; cœur BdP (rouge) ; cœur-coquille (vert) ; redispersion (bleu)

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) montre une agrégation des particules en solution après croissance de la coquille de Cu<sup>II</sup>Fe. La présence de polymère permet de lever l'agrégation qui n'est pas observée sur les images de MET.

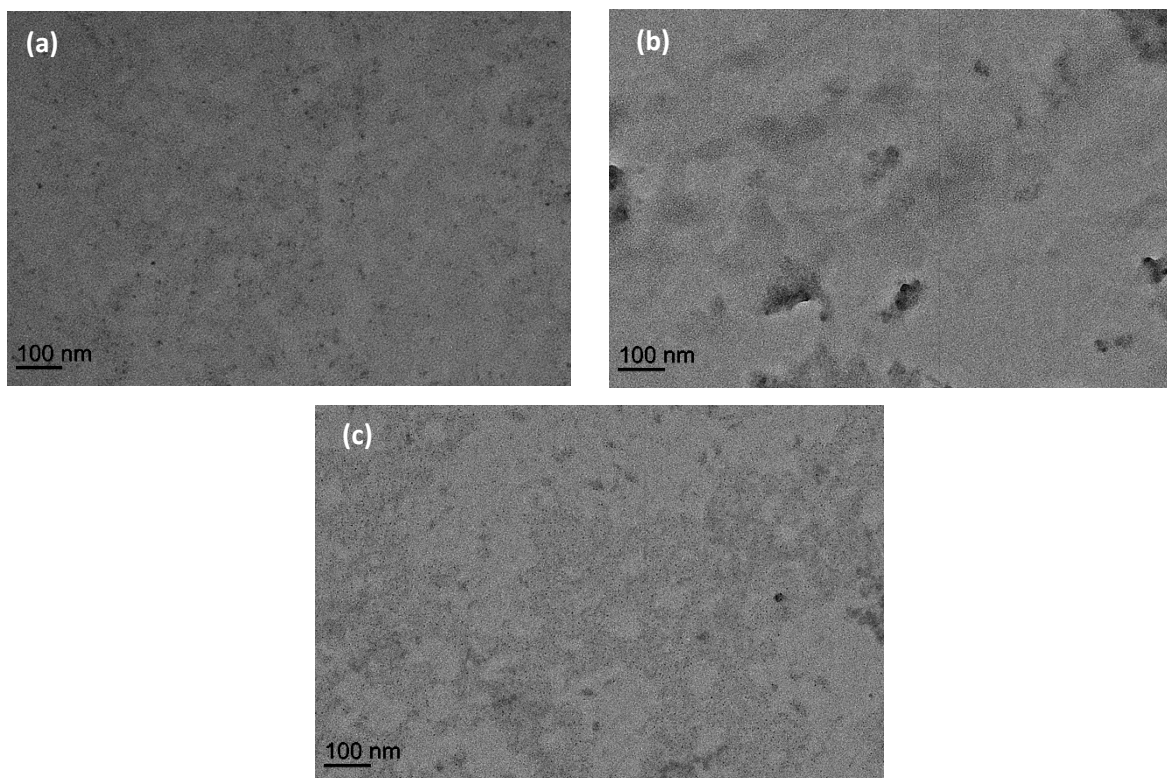


Figure A-12. Images MET des particules (a) BdP ;(b) BdP@Cu<sup>II</sup>Fe ; (c) BdP@Cu<sup>II</sup>Fe@(dextran)<sub>25</sub>

Les tailles mesurées par DLS et MET sont résumées dans le tableau A-6. Ces mesures montrent que la taille des particules n'évolue pas lorsqu'il y a croissance d'une coquille de Cu<sup>II</sup>Fe. Les particules cœur-coquille devraient avoir une taille d'environ 8 nm. Cette taille constante peut s'expliquer par la nucléation de particules de Cu<sup>II</sup>Fe seule, ainsi les particules de cœur-coquille ne seraient pas formées.

	BdP	BdP@Cu <sup>II</sup> Fe	BdP@Cu <sup>II</sup> Fe@(dextran) <sub>25</sub>
MET (nm)	2,5±0,7	2,5±0,7	2,4±0,6
DLS (nm)	10	33-105	6

Tableau A-6. Détermination des tailles par MET et DLS des particules BdP, BdP@Cu<sup>II</sup>Fe, BdP@Cu<sup>II</sup>Fe@(dextran)<sub>25</sub>

Ainsi, le rapport  $n_s/n_c$  a été augmenté.

- Coquille de 2 nm : rapport  $n_s/n_c=15$

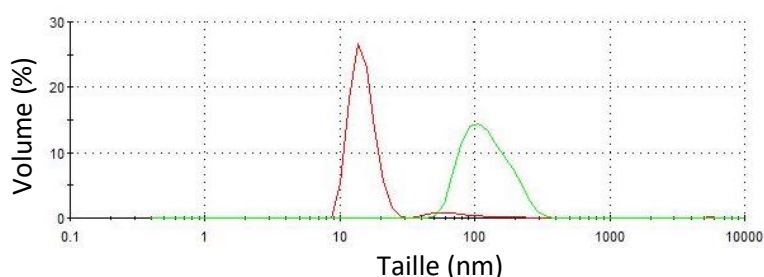
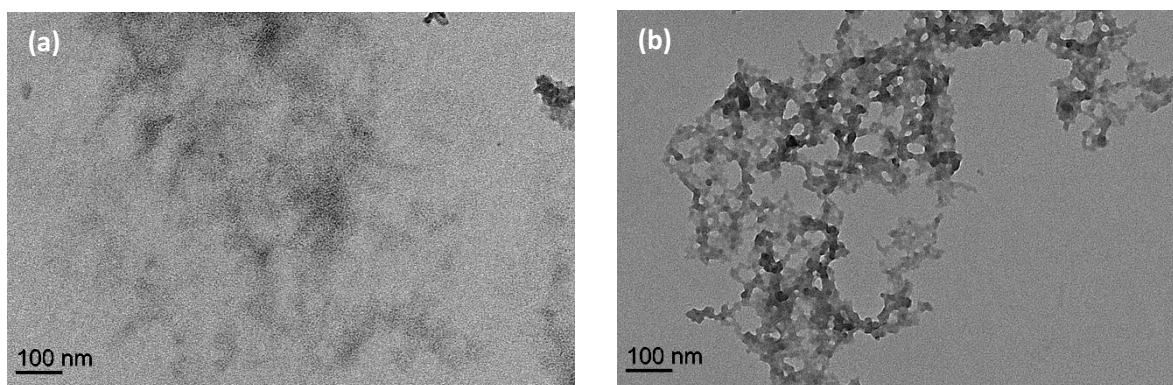


Figure A-13. DLS des particules BdP@Cu<sup>II</sup>Fe@(dextran)<sub>25</sub> ; cœur BdP (rouge) ; cœur-coquille (vert)

Comme dans la synthèse précédente, la croissance de la coquille de Cu<sup>II</sup>Fe entraîne une agrégation en solution. En MET, après croissance, des particules de petites tailles (2,5±0,4 nm) et des agrégats sont observés.





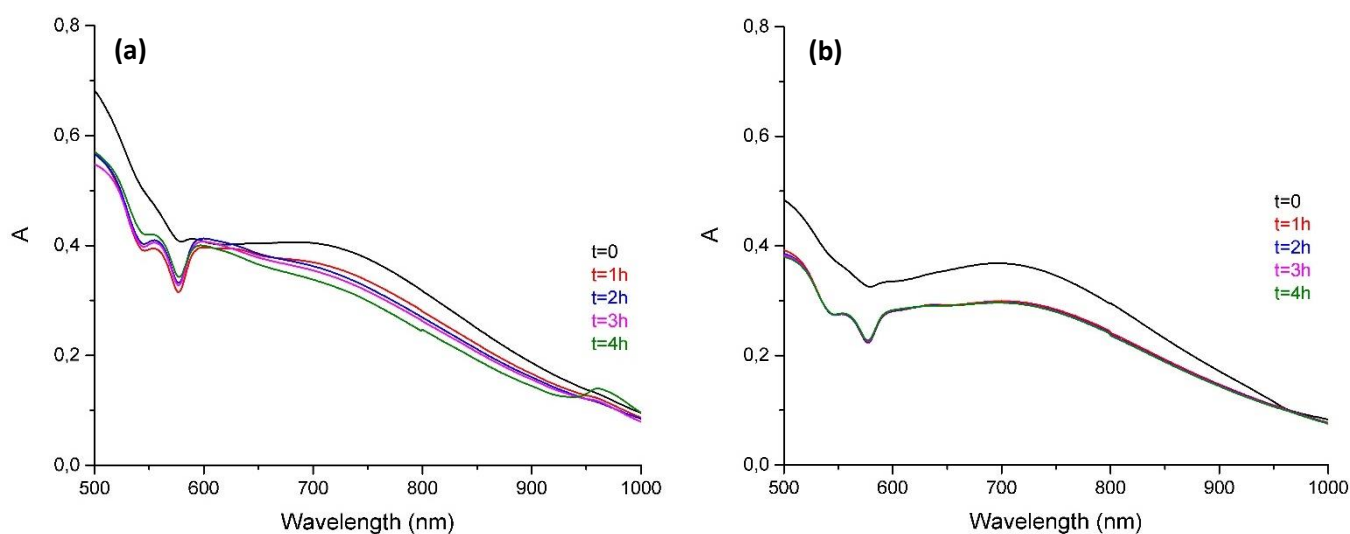
**Figure A-14.** Images MET des particules Bdp@Cu<sup>II</sup>Fe ; **(a)** petites NPs ; **(b)** agrégats

- Stabilité dans l'ALF :

Pour les deux types de synthèses, les particules ont précipité dans le milieu après 30 minutes. Ainsi, la problématique est différente et l'agrégation n'est pas forcément limitante pour les applications visées.

- Stabilité dans le SVF :

Les particules ont été redispersées dans le SVF puis les solutions ont été analysées par spectroscopie UV-visible.



**Figure A-15.** Spectres UV-visibles des particules Bdp@Cu<sup>II</sup>Fe@(dextran)<sub>25</sub> redispersées dans le SVF ; **(a)** rapport  $n_S/n_C=15$  ; **(b)** rapport  $n_S/n_C=7$

Ces particules n'ont pas fait l'objet d'une étude des compositions chimiques. Les analyses par spectroscopie UV-visibles montrent une bande de transfert de charge à travers le pont cyanure peu intense traduisant de la présence d'une faible quantité de Bdp. Quel que soit le rapport  $n_S/n_C$ , il est difficile de conclure quant à la stabilité de ces objets dans le SVF, au vu de la qualité des spectres.

## **Annexe 14 : Variation du maximum de longueur d'onde des particules Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5]**

Lors des caractérisations par spectroscopie UV-visible des différents systèmes contenant les particules Gd<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>Fe [5], un décalage de la longueur d'onde maximale est observé. Les valeurs de longueur d'onde correspondantes au maximum d'absorbance sont reportées dans le tableau A-7.

Milieu	Particules nues (nm)	Dextran (nm)	Citrate+dextran (nm)	Poly-CD (nm)	Citrate+ poly-CD (nm)
H <sub>2</sub> O	696	693	715	702	693
SVF		698	724	680	689

**Tableau A-7.** Longueurs d'onde maximales mesurées dans l'eau et le SVF de différents systèmes étudiés

Les particules nues sont considérées comme notre référence. En présence de dextran, que ce soit dans l'eau ou dans le SVF, l'écart par rapport à la référence est moindre. Au contraire, l'association du citrate et du dextran autour des particules provoque une augmentation du maximum de longueur d'onde, qui est accentuée dans le SVF. Cette tendance est opposée à celle constatée pour les systèmes contenant du citrate et de la poly-CD qui, dans le SVF, va vers une diminution de la longueur d'onde. Nous avons interprété la décoloration des solutions dans le SVF comme l'effet de l'interaction entre des groupements phosphates et la surface des particules.

Cette interaction conduit alors à une modification de l'environnement, notamment des ions Fe<sup>3+</sup>, qui pourrait modifier le niveau des orbitales moléculaires et donc l'énergie de la bande d'intervallence. Le fait d'avoir des groupements citrates coordonnés aux Fe<sup>III</sup> de surface pourrait avoir la même conséquence. Cependant, il ne ressort aucune tendance cohérente des décalages de longueur d'onde rendant leur interprétation difficile. Le SVF étant un milieu complexe contenant des protéines notamment, celles-ci en interagissant avec les particules et l'enrobage pourraient modifier l'énergie de la transition électronique des BdP.

## **Annexe 15 : Analyse par EDS des cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> enrobés au CTA**

Les mesures par spectroscopie EDS permettent de déterminer les rapports Cl/Pt, Pt/Fe et K/Fe. Le tableau A-8 contient les rapports obtenus pour les cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> chauffés 15 et 60 min.

Temps de chauffage	Ratio Cl/Pt	Ratio Pt/Fe	Ratio K/Fe
15 min	0,8	1,9	0,13
60 min	0,4	1,6	0,14

**Tableau A-8.** Rapports atomiques Cl/Pt, Pt/Fe et K/Fe déterminés par EDS des cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>

Les échantillons précipités avec le CTA montrent une augmentation du taux de substitution des Cl avec le temps de chauffage. Après 15 min de réaction, le ratio Pt/Fe est proche de 2. Il reste donc 1 Cl autour de chaque Pt, ce qui est cohérent avec les mesures. A 60 min de chauffage, le rapport Pt/Fe diminue démontrant un taux de substitution supérieur des Cl. Cependant, la quantité de potassium mesurée est inférieure à celle attendue. Le CTA ne précipitant pas uniquement les particules de cyanosols, ces mesures peuvent être faussées par la présence d'impuretés.



## Annexe 16 : Spectres UV-visible des cyanosols Pd<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>

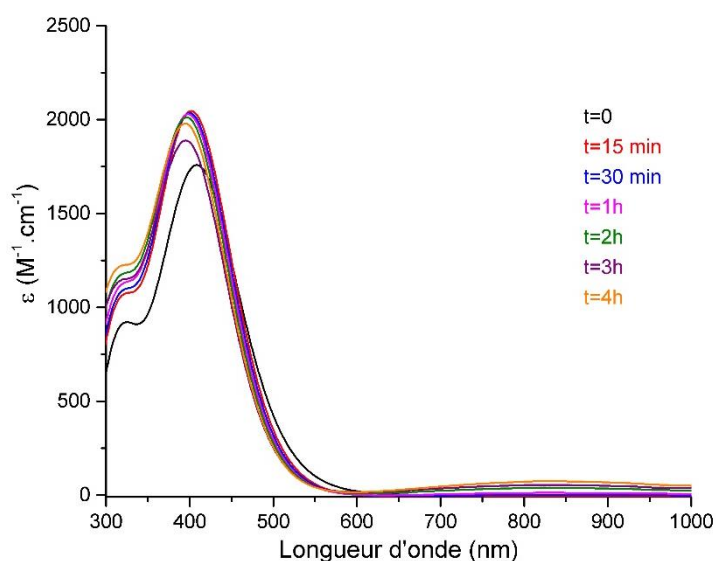


Figure A-16. Spectres UV-visibles du suivi *in situ* de la formation des particules Pd<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>

## Annexe 17 : Expériences d'irradiation de plasmides

- Préparation des solutions de cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II/III</sup>

Une solution mère est préparée à une concentration de 10<sup>-3</sup> M en Pt<sup>II</sup> et Fe<sup>II/III</sup>. Celle-ci est diluée afin d'obtenir des solutions aux concentrations souhaitées.

Solution fille (M)	Solution mère (M)	V <sub>mère</sub> (μL)	V <sub>H2O</sub> (μL)	V <sub>total</sub> (μL)
10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	100	900	1000
10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup>	10	990	1000

Tableau A-9. Préparation de solutions filles de cyanosols

Ensuite, des solutions contenant les NPs, les plasmides (ADN), le milieu tampon des plasmides (TE) et l'eau sont préparées. Ce sont ces solutions qui seront irradiées par la suite.

[PtFe <sup>II/III</sup> ] (M)	0	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
TE 1x (μL)	123	123	123	123
ADN (μL)	10	10	10	10
NPs 10 <sup>-5</sup> M (μL)	-	-	-	18
NPs 10 <sup>-4</sup> M (μL)	-	-	18	-
NPs 10 <sup>-3</sup> M (μL)	-	18	-	-
H <sub>2</sub> O (μL)	47	29	29	29
Volume total (μL)	180	180	180	180

Tableau A-10. Préparation de solutions contenant les cyanosols, les plasmides et le tampon TE pour les irradiations

Les solutions seront irradiées par 6 doses différentes. Ainsi, chaque solution est séparée dans 6 piluliers (un par dose). La même quantité d'ADN doit être irradiée donc les piluliers contiennent tous 18 µL de solutions.

- Irradiations

**Source :** Gamma Co<sup>60</sup>  
**Débit de dose :** 5,87 Gy.min<sup>-1</sup>  
**Energie :** 1,25 MeV

Le temps de demi-vie du Co<sup>60</sup> est de 5,2714 ans. Ainsi, le temps d'irradiation va conditionner la dose reçue par les échantillons.

Dose (Gy)	0	47	94	141	188	235
Temps (min)	0	8	16	24	32	40

Tableau A-11. Temps d'irradiation et doses correspondantes

- Electrophorèse

Un gel d'agarose à 0,8% est préparé dans un tampon TAE (TrisAcétate EDTA). De nouveaux piluliers sont préparés contenant un colorant de charge bleu (2µL) et 9 µL de solution irradiée. Ces nouvelles solutions sont introduites dans les puits du gel d'agarose. Une électrophorèse est alors réalisée à 4°C pendant 110 min et à 80 V.

A la fin de l'électrophorèse, le gel est placé dans un bain contenant 20µL de BET (bromure d'éthidium) et 200 mL d'eau. Le BET est un intercalent fluorescent de l'ADN. Le gel est ensuite lavé deux fois à l'eau. Ainsi, les formes d'ADN seront révélées grâce à une caméra UV (302 nm) qui permettra d'enregistrer des images. Ces images contiennent différentes traces correspondant aux formes de l'ADN, le schéma ci-dessous représente ce qui est obtenu.

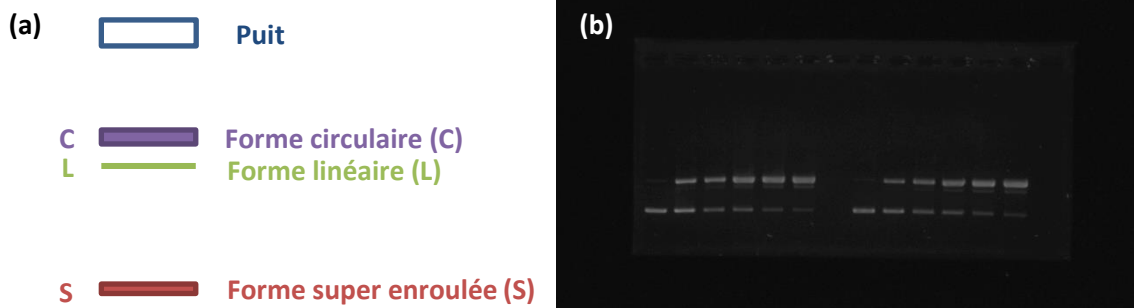


Figure A-17.(a). Schéma de migration des formes de l'ADN ; (b) Image d'un gel après révélation

Le logiciel ImageJ permet de quantifier l'intensité de chaque bande donc de chaque forme de l'ADN. Le BET se lie moins bien à la forme super-enroulée (1,47 fois). La quantité totale de dommages subit par l'ADN peut alors être exprimée comme :

$$\text{Dommages totaux} = 1,47S + C + L$$

Où S est la quantité de forme super-enroulée ; C, la quantité de forme circulaire et L, la quantité de forme linéaire. Afin de normaliser la quantité de chaque forme en fonction de la quantité d'ADN introduit dans chaque puit, la quantité de chaque forme est divisée par le total de dommages. Nous appellerons alors les quantités indépendantes de la quantité initiale d'ADN S', C' et L', suivant la forme de l'ADN. Il est alors, possible d'estimer le taux de dommages simples (SSB) et de dommages complexes (DSB) par plasmides, selon les expressions suivantes :

$$SSB = \ln\left(\frac{1 - L'}{S'}\right)$$

$$DSB = \frac{L'}{1 - L'}$$

Ce protocole a été mis au point par l'équipe d'Erika Porcel et Sandrine Lacombe<sup>119</sup>.

### **Annexe 18 : Tests de survie clonogénique**

Ces tests ont été effectués lors des expériences de toxicité des cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> et d'irradiation sur cellules du même composé. Le protocole des irradiations sur cellules est détaillé ci-dessous. Le protocole est identique en cas d'expérience de survie cellulaire sans l'étape d'irradiation.

Une solution mère à une concentration de 50 mM en Pt<sup>II</sup> et Fe<sup>II</sup> est préparée. Cette solution doit être préparée dans des conditions stériles. La solution est alors diluée dans le milieu de culture DMEM afin d'avoir deux solutions à une concentration de 0,25 mM et 0,5 mM. Le tableau A-12 résume les conditions de préparations.

	DMEM (mL)	NPs stérile (mL)	H <sub>2</sub> O stérile (mL)	Volume total (mL)
<b>Contrôle ([Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>]= 0 mM)</b>	31,360	0	0,640	32 mL
<b>[Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>]= 0,25 mM</b>	31,360	0,160	0,320	32 mL
<b>[Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>]= 0,5 mM</b>	31,360	0,32	0	32 mL

**Tableau A-12.** Volume de chaque composant des solutions mises en contact avec les cellules

Les solutions préparées sont mises en contact des cellules et incubées pendant 6h. Après incubation, les cellules contenant les particules sont irradiées par une source  $\gamma$  au <sup>137</sup>Cs (énergie : 0,6617 MeV) à 6 doses différentes.

Dose (Gy)	0	1	2	3	4,5	6
Temps (min:s)	0	1:07	2:18	3:29	5:15	7:01

**Tableau A-13.** Conditions d'irradiations des cellules

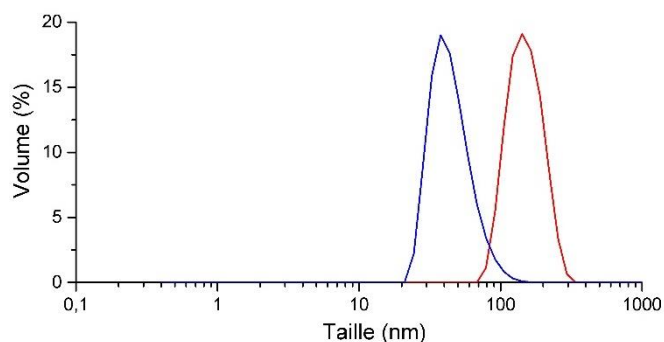
L'étape suivante consiste à compter les cellules afin de déterminer le nombre de cellules introduit dans chaque boîte de Pétri. Le comptage s'effectue grâce à un appareil appelé LUNA<sup>®</sup>. Ainsi, entre 300 et 6000 cellules HeLa sont introduites dans chaque boîte de Petri. Des expériences préalables ont permis de mesurer la quantité de cellules HeLa survivant à l'irradiation en fonction de la dose. Chaque condition c'est-à-dire à une concentration en NPs et une dose d'irradiation, ont fait l'objet de trois tests clonogéniques donc trois boîtes de Pétri. Après préparation des boîtes, elles sont placées à l'incubateur pendant 15 jours. Pendant cette période, les cellules vivantes vont pouvoir se diviser et former des colonies. A la fin de ce temps, les cellules sont fixées et colorées par un mélange de méthanol et de bleu de méthylène. Les cellules contenues dans chaque boîte sont alors comptées manuellement. En connaissant le nombre de cellules initialement introduites et le nombre de colonies comptées, un facteur de survie peut être calculé. Les résultats sont normalisés par rapport à ce qui a été obtenu pour les cellules non irradiées et non incubées de NPs.

## Annexe 19 : Croissance d'une coquille de Gd<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup> sur un cœur de cyanosol Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>

Un des objectifs de ce travail de thèse est de mettre au point des nanoparticules théranostiques. Afin d'apporter des propriétés de diagnostic aux cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>, une coquille de Gd<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup> a été synthétisée autour des cœurs de cyanosols. La coquille a été synthétisée par ajout séquentiel de Gd<sup>III</sup> et de Fe<sup>II</sup> dans une solution de Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>. Les proportions choisies sont de 1 équivalent de Gd<sup>III</sup> par rapport au Pt<sup>II</sup>. Après précipitation au CTA, la poudre obtenue a été séchée sous vide et conservée sous cette forme. Les particules seront nommées Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>@Gd<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup>.

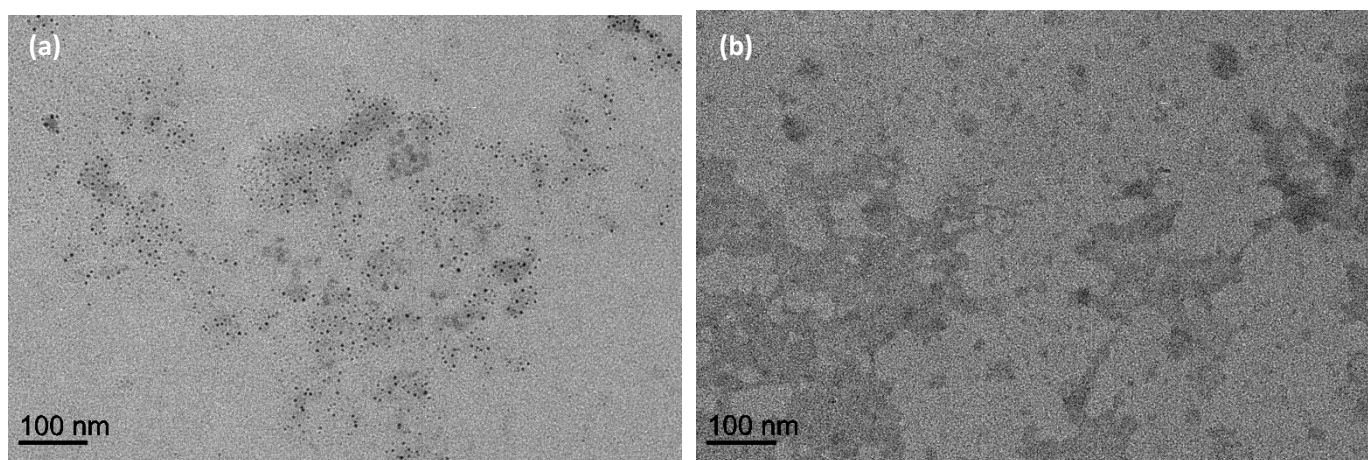
- Evaluation de la taille :

Les mesures de diamètre hydrodynamique permettent de mettre en avant une diminution de l'agrégation par rapport aux particules nues. Cependant, les tailles restent élevées, suggérant la présence d'agrégats de plus petites tailles. Le diamètre hydrodynamique des composés Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>@Gd<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup> est de 38 nm.



**Figure A-18.** Mesure des diamètres hydrodynamiques par DLS des particules Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> (rouge) et Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>@Gd<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup> (bleu)

Il n'est pas possible d'observer la croissance de la coquille par DLS car celle-ci est masquée par l'état d'agrégation des objets en solution. Ainsi, des observations en MET ont été réalisées sur les objets avant et après croissance.



**Figure A-19.** Micrographies obtenues par MET des particules (a) Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> ; (b) Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>@Gd<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup>

La microscopie montre des particules de petites tailles qui ne semblent pas agrégées. Un bilan des tailles mesurées par les deux techniques est présenté dans le tableau A-14. L'évaluation des tailles par MET ne montre pas une différence de taille significative ne permettant pas de conclure quant à la taille de la coquille de  $Gd^{III}Fe^{II}$ .

DLS (nm)		MET (nm)	
Cœur	Cœur-coquille	Cœur	Cœur-coquille
142	38	$2,8 \pm 0,8$	$2,2 \pm 0,7$

Tableau A-14. Tailles des particules cœur-coquille  $Pt^{II}Fe^{II}@Gd^{III}Fe^{II}$  mesurées par DLS et MET

- Caractérisation chimique

Les particules récupérées au CTA ont été analysées par spectroscopie IR. Entre  $2070\text{ cm}^{-1}$  et  $2105\text{ cm}^{-1}$ , plusieurs contributions sont visibles attestant de la présence des deux réseaux  $Pt^{II}Fe^{II}$  et  $Gd^{III}Fe^{II}$ .

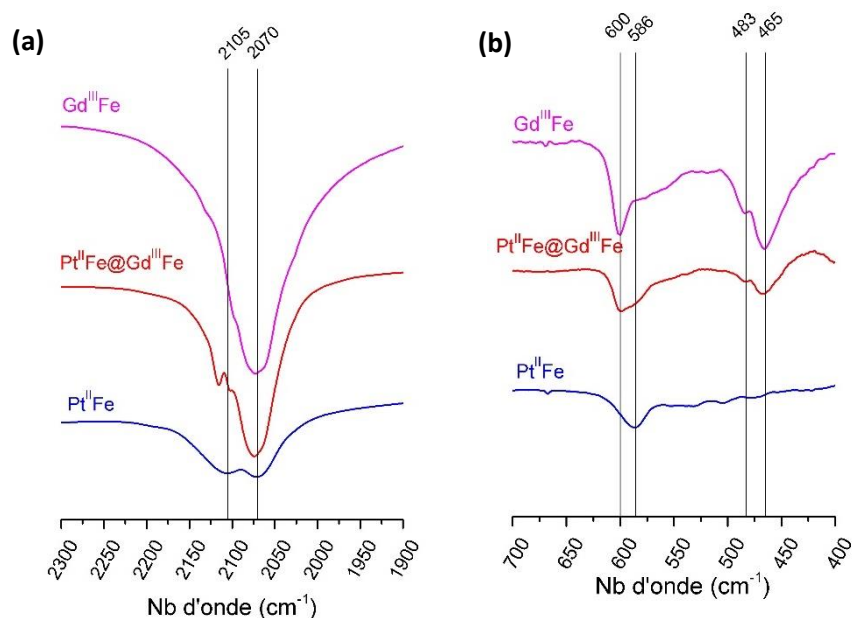


Figure A-20. Spectres IR des particules  $Pt^{II}Fe^{II}$ ,  $Gd^{III}Fe^{II}$  et  $Pt^{II}Fe^{II}@Gd^{III}Fe^{II}$  enregistrés (a) entre  $2300$  et  $1900\text{ cm}^{-1}$ ; (b) entre  $700$  et  $400\text{ cm}^{-1}$

Grâce aux spectres enregistrés à plus basses fréquences, il est possible de mettre en avant la présence des entités  $Pt^{II}Fe^{II}$  et  $Gd^{III}Fe^{II}$ . Un élargissement de la bande comprise entre  $586$  et  $600\text{ cm}^{-1}$  confirme la présence de ponts  $Fe^{II}-C(N-Pt^{II})$  et  $Fe^{II}-C(N-Gd^{III})$ . Deux bandes caractéristiques du réseau  $Gd^{III}Fe^{II}$  se trouvent à  $465\text{ cm}^{-1}$  et  $483\text{ cm}^{-1}$ . La composition des particules a été analysée par EDS. Cette analyse permet de connaître le pourcentage atomique en potassium, chlore, platine, gadolinium et fer. Les rapports entre ces différents éléments permettent de déduire une unité formulaire.

Ratio Cl/Pt	Ratio Pt/Fe	Ratio Pt/Gd	Ratio K/Fe
1	0,38	0,74	0,24

Tableau A-15. Rapports atomiques calculés à partir des mesures EDS

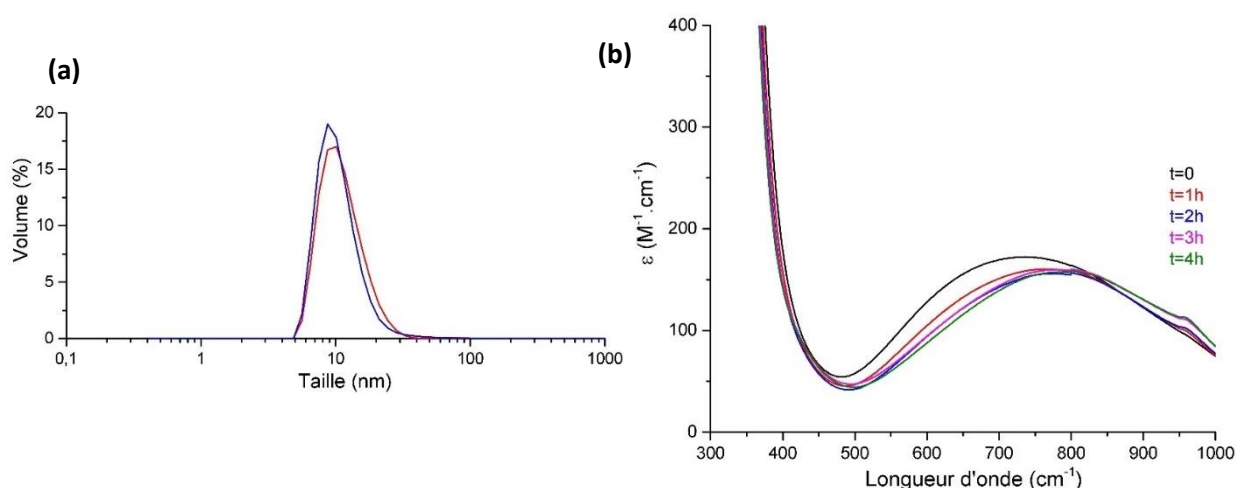
A partir de ces résultats, la formule unitaire suivante est déduite :  $K_7Cl_1Pt_1^{II}[Fe^{II}(CN)_6]_2@K_{0,7}Gd_{0,7}^{III}[Fe^{II}(CN)_6]_{0,7}$  démontrant une quantité de  $Pt^{II}$  plus faible par rapport au  $Fe^{II}$ .

Le ratio  $Pt^{II}/Gd^{III}$  est proche de 1 ce qui est cohérent avec les quantités initialement introduites. Les études menées sur les particules  $Pt^{II}Fe^{II}@Gd^{III}Fe^{II}$  ne permettent pas de montrer l'association des deux réseaux sous forme d'une NPs cœur-coquille. Une étude par STEM-EELS pourrait permettre de montrer la co-localisation du  $Gd^{III}$  et du  $Pt^{II}$  au sein d'un même objet. Ces échantillons n'ont pas fait l'objet d'une étude avec un enrobage au dextran

## **Annexe 20 : Stabilité des cyanosols $Pt^{II}Fe^{II}@(dextran)_{25}$**

- **Stabilité dans le tampon TE**

Le tampon TE est le milieu dans lequel les plasmides sont conservés. Dans un premier temps, la taille des particules de  $Pt^{II}Fe^{II}@(dextran)_{25}$  redispersé dans le tampon a été évaluée par DLS. Un suivi pendant 24h montre que les particules ne s'agrègent pas dans ce milieu (*Fig.A-21.(a)*). Le diamètre hydrodynamique mesuré est de 9 nm.



**Figure A-21.** (a). Mesures par DLS du diamètre hydrodynamique des particules  $Pt^{II}Fe^{II}@(dextran)_{25}$  redispersées dans le tampon TE à  $t=0$  (rouge) et  $t=24h$  (bleu) ; (b) Spectres UV-visible enregistrés pendant 4h des particules  $Pt^{II}Fe^{II}@(dextran)_{25}$  redispersées dans le tampon TE à  $[Pt^{II}Fe^{II}]=2$  mM

Dans un second temps, un suivi de la stabilité par spectroscopie UV-Visible a été effectué. Dans ces conditions, une seule bande de transition est observée correspondant au transfert électronique à travers le pont  $Fe^{II}-CN-Fe^{III}$  vers 750 nm. Cette technique met en avant l'absence de dégradation des particules dans le milieu ce qui permet d'envisager les expériences d'irradiation des plasmides en présence de cyanosol.

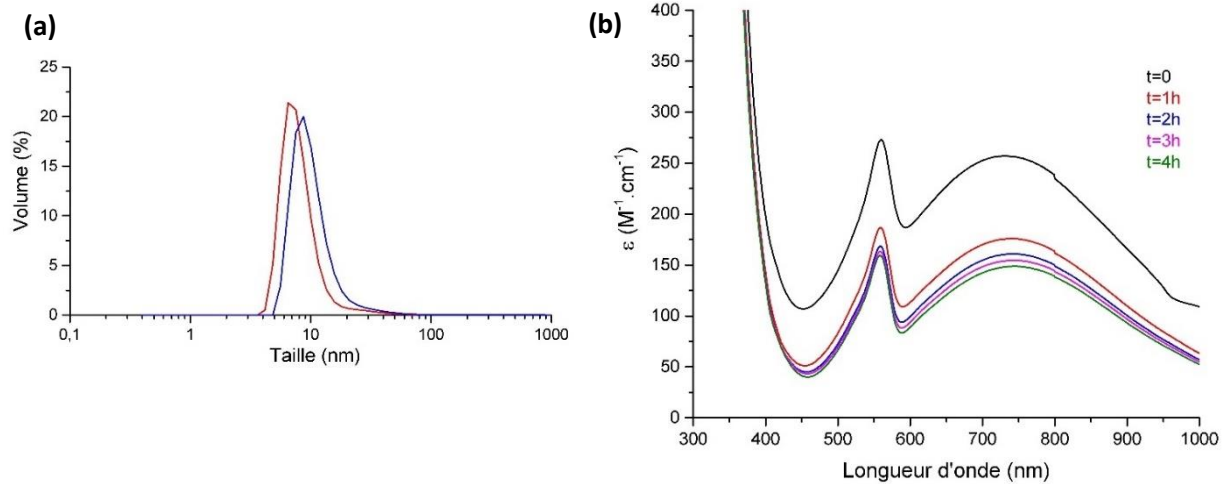
- **Stabilité dans le DMEM complet :**

Les particules de  $Pt^{II}Fe^{II}@(dextran)_{25}$  ont été redispersées dans le DMEM à une concentration de 2 mM en métal. La diffusion dynamique de la lumière montre une légère augmentation du diamètre hydrodynamique dans le temps. Cependant, celui-ci reste inférieur à 10 nm comme le montre la figure A-22. Les particules ne semblent pas agrégées dans le milieu de culture.



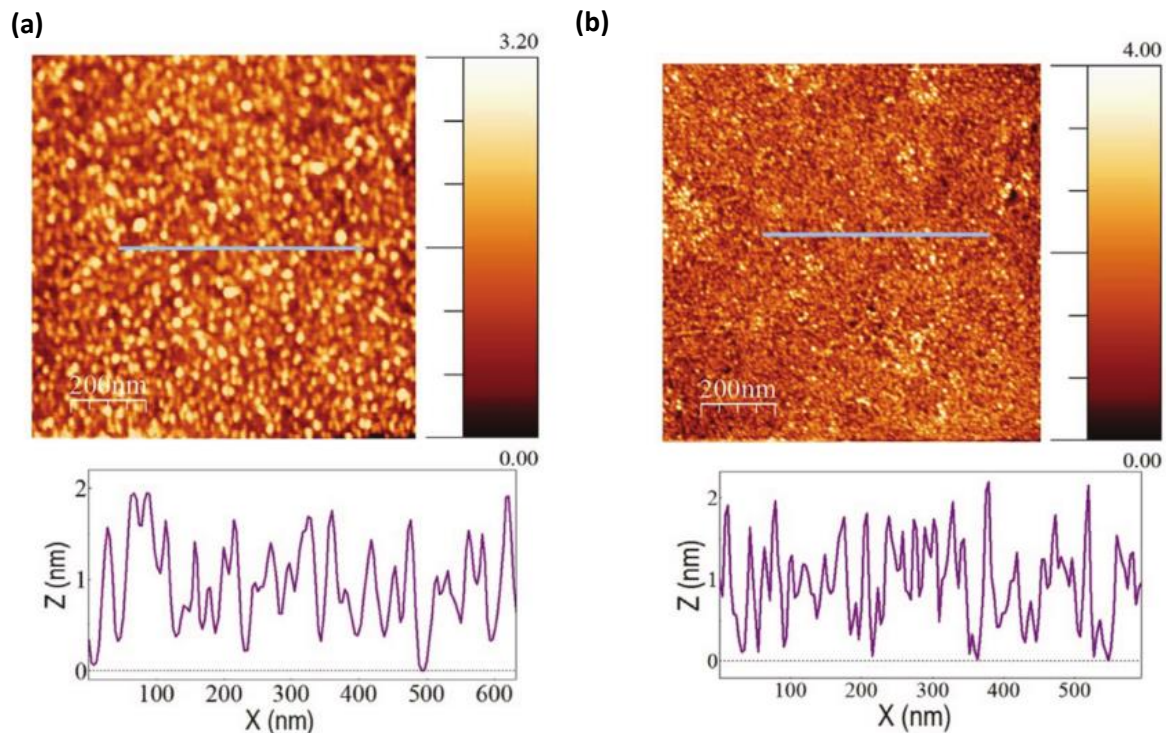
Une évaluation de la stabilité des objets par spectroscopie UV-visible a montré une légère dégradation des ponts Fe<sup>II</sup>-CN-Fe<sup>III</sup> dans le DMEM. Ceci n'est pas étonnant car ce phénomène a déjà été observé pour les particules de BdP qui se dégradent sous l'effet du pH basique de ce milieu.

Cependant, dans le cas des cyanosols, les paires Fe<sup>II</sup>-CN-Fe<sup>III</sup> représentent une faible proportion de la composition des objets.



**Figure A-22.** (a). Evaluation du diamètre hydrodynamique des particules Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>@(dextran)<sub>25</sub> redispersées dans le DMEM complet à t=0 (rouge) et t=24h (bleu) ; (b). Suivi pendant 4h par spectroscopie UV-visible de la stabilité des particules Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>@(dextran)<sub>25</sub> redispersées dans le DMEM complet

## Annexe 21 : Réduction des cyanosols Pd<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> pour la croissance de NTc



**Figure A-23.** Dépôts des particules Pd<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> sur un wafer de Si (a) en fin de synthèse ; (b) après réduction dans la chambre de CVD (H<sub>2</sub>, 800°C, 5 min)

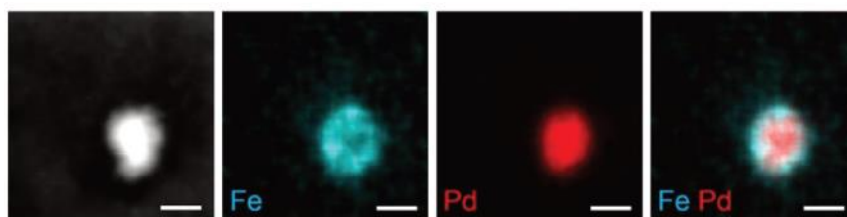


Figure A-24. Images de STEM-HAADF des cyanosols réduits, cartographie de gauche à droite du Fe, du Pd et superposition des deux.

## Annexe 22 : Spectres XPS des cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> et Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>

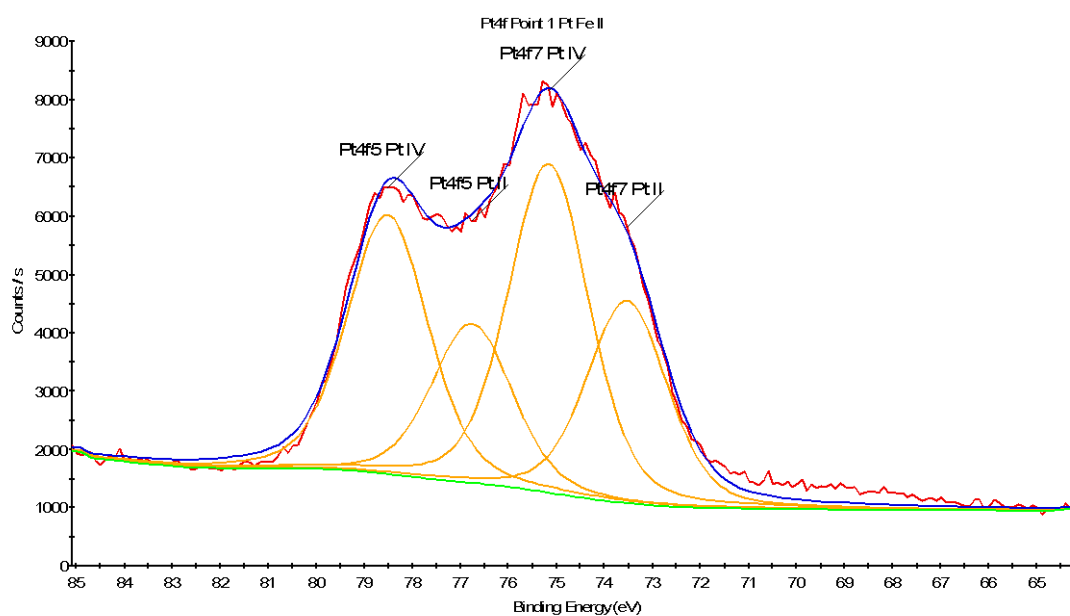


Figure A-25. Spectre XPS dans la zone du Pt des particules Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> précipitées au CTA

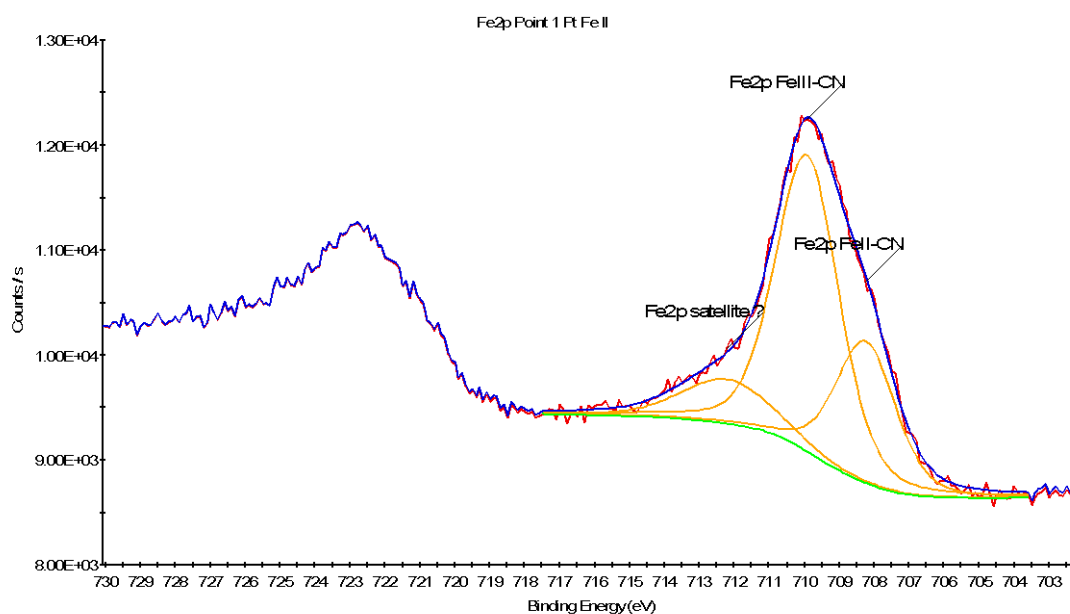


Figure A-26. Spectre XPS dans la zone du Fe des particules Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> précipitées au CTA



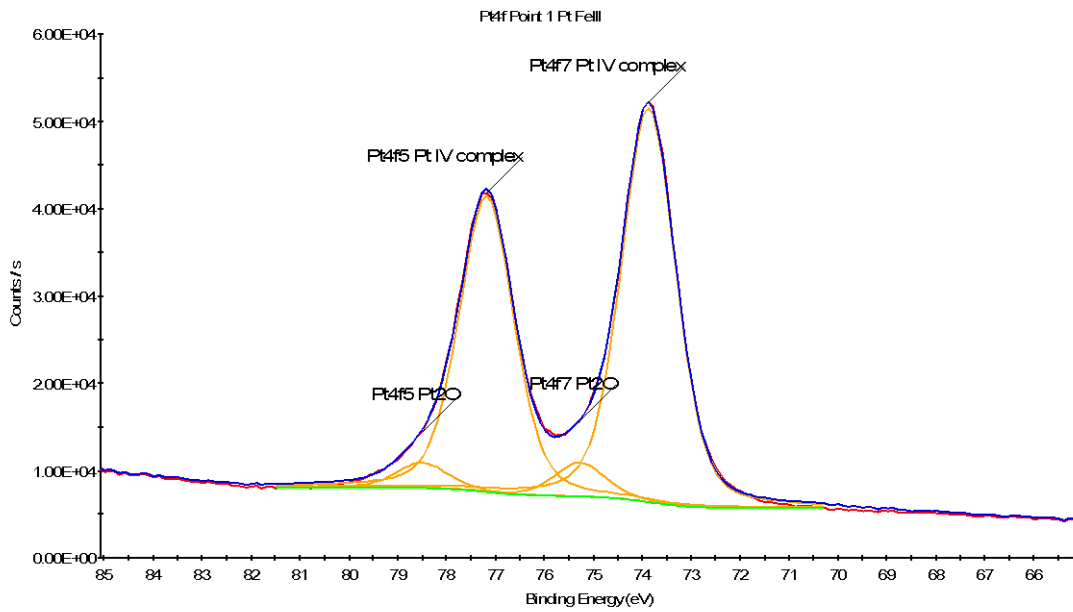


Figure A-27. Spectre XPS dans la zone du Pt des particules Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> nues après filtration

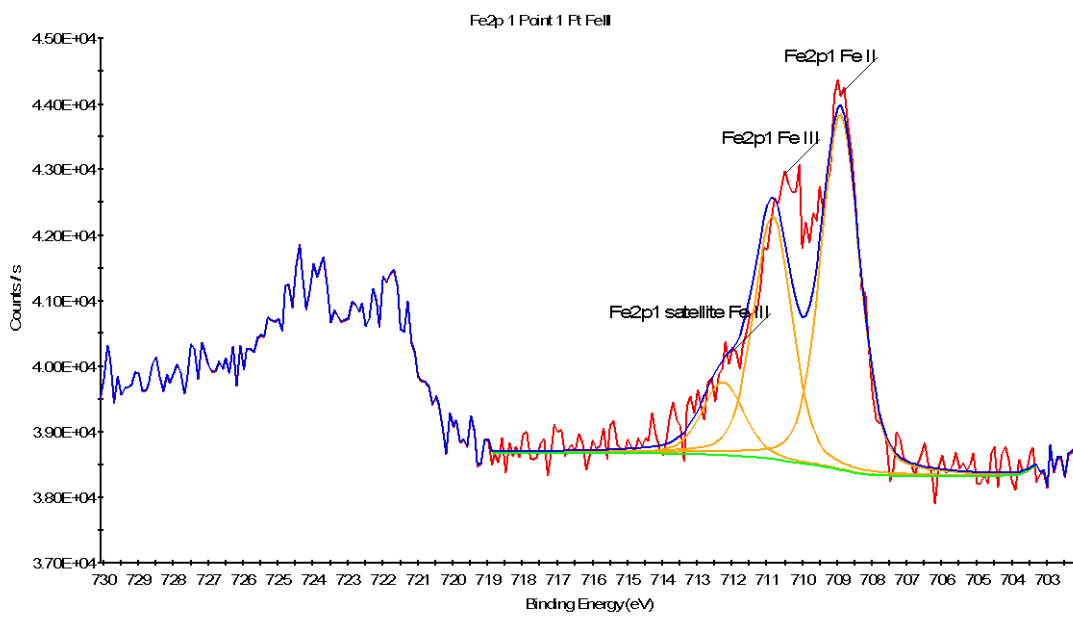


Figure A-28. Spectre XPS dans la zone du Fe des particules Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> nues après filtration

## Annexe 23 : Production de ROS en présence de TiO<sub>2</sub>

- Principe

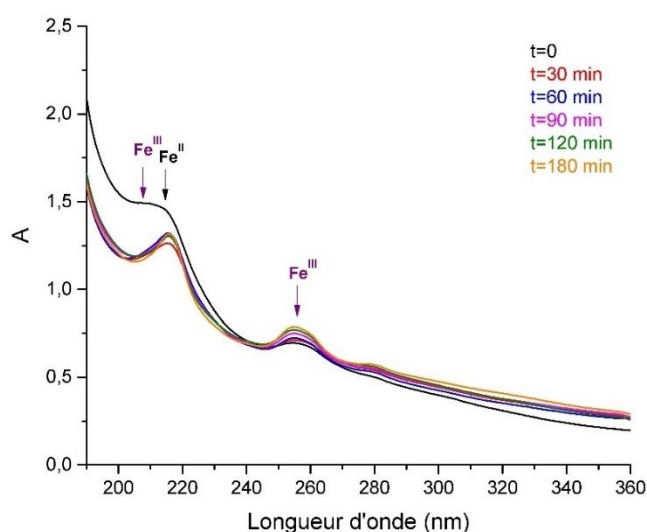
Le dioxyde de titane, TiO<sub>2</sub>, est un des photocatalyseurs les plus communs car il a une haute activité catalytique. Le TiO<sub>2</sub> permet donc la production de ROS. Lorsque le TiO<sub>2</sub>, d'une manière générale un semi-conducteur, est soumis à une excitation, des électrons se retrouvent alors dans la bande de conduction. Ainsi, des charges, électrons (e<sup>-</sup>) et trous (h<sup>+</sup>), migrent en surface du semi-conducteur. En présence d'eau et d'oxygène, ces charges génèrent des radicaux (O<sub>2</sub><sup>•-</sup> avec l'oxygène et OH<sup>•</sup> majoritairement avec l'eau) <sup>176</sup>. Ces expériences ont été mises au point par l'équipe de Hynd Rémita au LCP.

Les cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> et Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> sont préparés dans l'eau à une concentration de 0,5 mM. Les NPs de TiO<sub>2</sub> sont ajoutées aux solutions à une concentration de 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Les solutions sont irradiées par une lampe au Xénon pendant 3h. Des prélèvements sont effectués à des temps réguliers. Chaque prélèvement est centrifugé afin de retirer les particules de TiO<sub>2</sub>. Le surnageant obtenu est alors analysé.

Les mêmes expériences sont conduites sur les particules Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> avec une irradiation par une source gamma au Co<sup>60</sup>.

- Cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>

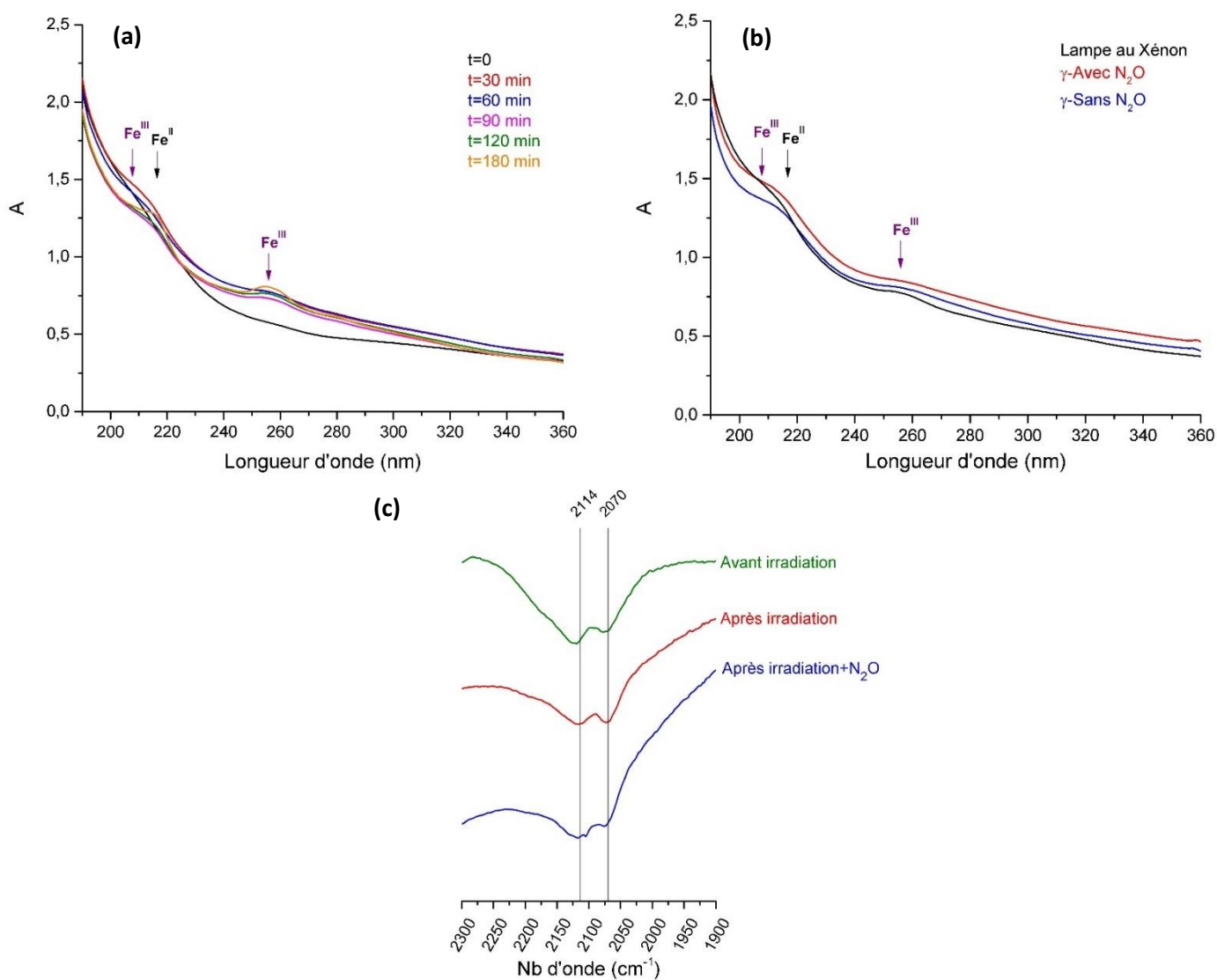
Les spectres UV-visible des prélèvements effectués au cours du temps montrent qu'il n'y a pas d'évolution des particules. Un fond de diffusion explique l'évolution des absorbances. En effet, bien que le TiO<sub>2</sub> soit retiré selon la même procédure pour chaque prélèvement, il peut rester une proportion faible et non constante en solution. Des spectres du ferrocyanure et du ferricyanure ont été enregistrés permettant d'attribuer les bandes présentes. Ainsi, la présence de ferricyanure est confirmée à travers deux bandes (205 nm et 255 nm) et celle du ferrocyanure par la bande à 218 nm. Les particules contiennent donc une proportion non négligeable de Fe<sup>III</sup> et également du Fe<sup>II</sup>.



**Figure A-29.** Particules Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> après irradiation à la lampe au xénon caractérisées par un suivi dans le temps en spectroscopie UV-visible

- Cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>

Les mêmes expériences ont été réalisées avec les cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>. Le suivi par spectroscopie UV-visible montre une évolution. En effet, avant irradiation, le spectre UV-visible met en avant la présence de ferrocyanure. Au cours de l'irradiation, deux bandes (218 et 255 nm) apparaissent avec une intensité croissante. Ces bandes sont identiques à celles observées pour les particules Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>, pouvant traduire de la production progressive de Fe<sup>III</sup>(CN)<sub>6</sub>. Les cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> en solution ont également été irradiés pendant 40 min par une source gamma au <sup>60</sup>Co. Deux solutions ont été soumises à l'irradiation : l'une contenant du N<sub>2</sub>O et l'autre sans ce gaz. Le gaz a pour rôle de capter les électrons générés par la photocatalyse et produisant des radicaux de type O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Ceci peut nous permettre de distinguer l'effet des différents radicaux. Dans notre cas, les spectres obtenus sont identiques montrant que ce sont principalement les radicaux OH<sup>•</sup> qui interagissent avec nos objets. Les spectres IR obtenus sont très proches de ceux des particules Pt<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> irradiées montrant la présence d'un élargissement vers 2160 cm<sup>-1</sup> attribuable à la présence de Fe<sup>III</sup> dans les objets



**Figure A-30.** Spectres UV-visibles des cyanosols Pt<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> après irradiation **(a)** lampe au xénon, suivi dans le temps ; **(b)** gamma ; comparaison des systèmes ; **(c)** Spectres IR des particules non irradiées, irradiées en présence et en absence de N<sub>2</sub>O

## Annexe 24 : Image MEB et analyse EDS des fuseaux Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup>

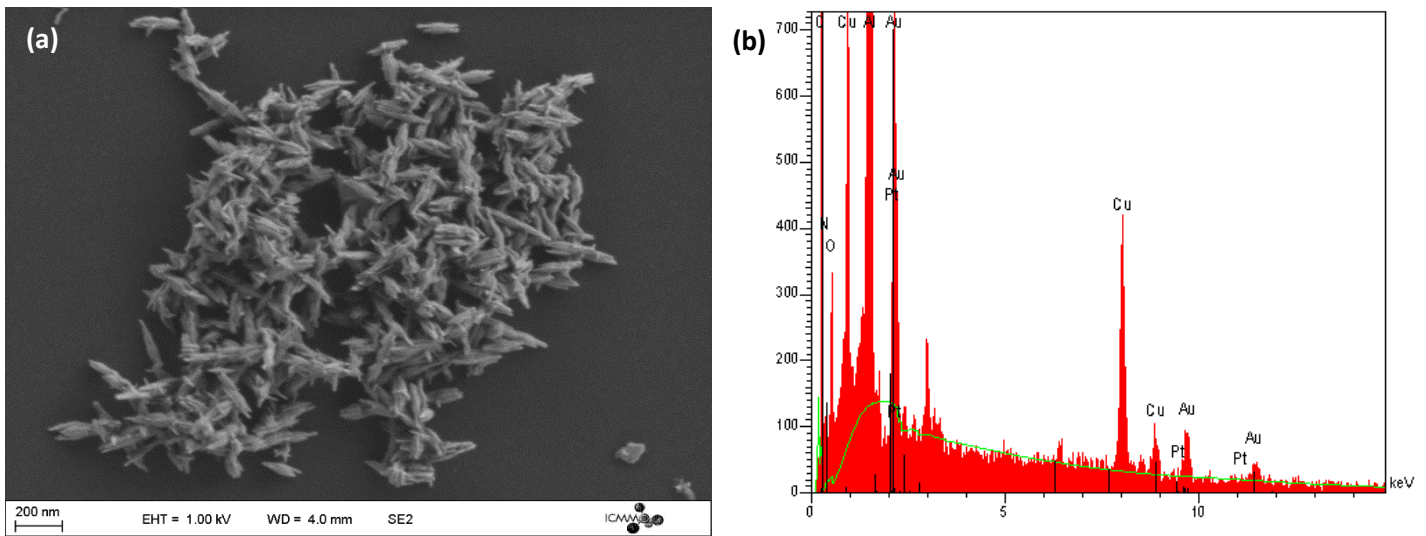
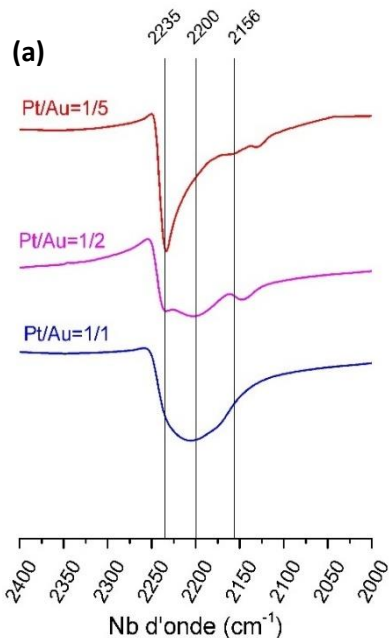


Figure A-31.(a) Image MEB ; (b) Spectre d'énergie obtenu en EDS des particules Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup>-1/5 déposées sur une grille de cuivre

## Annexe 25 : Caractérisation des particules Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup> précipitées au CTA

La précipitation des particules par le CTA entraîne d'autres impuretés qui viennent compliquer les analyses chimiques de ces composés. Les spectres IR des particules au CTA présentent une bande à 2147 cm<sup>-1</sup> caractéristique de la présence du précurseur de dicyanurate.



(b)

Echantillons	Ratio Cl/Pt	Ratio Pt/Au	Ratio K/Au
Pt/Au=1/5	0,1	0,08	0,01
Pt/Au=1/2	0,2	0,5	0,03
Pt/Au=1/1	0,3	1	0,01

Figure A-32.(a). Spectres IR ; (b). Rapports atomiques mesurés par EDS des particules Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup> à différentes stœchiométries

D'après les résultats EDS, le rapport Pt/Au mesuré est en accord avec les quantités initialement engagées, à l'exception du composé Pt<sup>II</sup>Au<sup>I</sup>-1/5. Celui-ci a un rapport Pt/Au égale à 0,08 démontrant la présence de peu de Pt<sup>II</sup>.

## **Bibliographie :**

1. Alessandro Barge, Giancarlo Cravotto, E. G. and F. F. How to determine free Gd and free ligand in solution of Gd chelates. A technical note Alessandro. *Contrast Media Mol. Imaging* **1**, 184–188 (2006).
2. Zhu, W. *et al.* Mn<sup>2+</sup>-Doped Prussian Blue Nanocubes for Bimodal Imaging and Photothermal Therapy with Enhanced Performance. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 11575–11582 (2015).
3. Hu, M. *et al.* Synthesis of Prussian blue nanoparticles with a hollow interior by controlled chemical etching. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **51**, 984–988 (2012).
4. Walter, A. *et al.* Validation of a dendron concept to tune colloidal stability, MRI relaxivity and bioelimination of functional nanoparticles. *J. Mater. Chem. B* **3**, 1484–1494 (2015).
5. Daou, T. J. *et al.* Hydrothermal Synthesis of Monodisperse Magnetite Nanoparticles. *Chem. Mater.* **18**, 4399–4404 (2006).
6. Porcel, E. *et al.* Platinum nanoparticles: a promising material for future cancer therapy? *Nanotechnology* **21**, 085103 (2010).
7. Ghosh, S. *et al.* Conducting polymer nanostructures for photocatalysis under visible light  
Visible-light-responsive photocatalysts can directly harvest energy from solar light, offering a desirable way to solve energy and environment issues. (2015). doi:10.1038/NMAT4220

**Titre :** Nanoparticules de réseaux de coordination à visée théranostique

**Mots clés :** Nanoparticules, IRM, Théranostique, Chimie de coordination

**Résumé :** La médecine se dirige de plus en plus vers des traitements personnalisés. Pour répondre à cela, des objets permettant de diagnostiquer et de soigner dans un temps restreint ont été développés. Ceci a conduit à l'émergence d'un nouveau domaine : la théranostique (thérapie et diagnostic). Les nanoparticules sont une des réponses à ces problématiques mais nécessite de maîtriser parfaitement la taille, la morphologie et la composition chimique des particules. Les analogues de bleu de Prusse sont des polymères de coordination à ponts cyanures cristallins qui ont beaucoup été étudiés pour leurs propriétés magnétiques mais également pour des applications médicales. La taille nanométrique, la porosité de la structure, la présence de molécules d'eau et une grande versatilité chimique font de ces matériaux des candidats prometteurs pour un développement en tant qu'agent de contraste pour l'IRM.

L'élaboration de nanoparticules de bleu de Prusse dopées par du  $Gd^{III}$  ou du  $Mn^{II}$  et les études de leurs propriétés font partie des aspects développés. Les performances en relaxivité et en hyperthermie photoassistée ont pu être évaluées. Afin de mener des expériences *in vivo*, le comportement des objets dans les milieux adaptés a été exploré, ce qui a permis d'initier l'émergence d'un système optimal. Au cours de cette thèse, la stabilisation de colloïdes de polymères de coordination incluant des ions  $Pt^{II}$ ,  $Pd^{II}$  et  $Au^I$  de type « cyanosols », ont été développés pour être notamment évalués en tant que radio-amplificateur en hadronthérapie. Ces objets amorphes permettent d'envisager de nombreuses combinaisons. L'objectif est de faire de ces nouveaux polymères de coordination des nanoplateformes théranostiques alliant IRM et hadronthérapie.

**Title :** Coordination-based nanoparticles for theranostics

**Keywords :** Nanoparticles, MRI, Theranostics, Coordination chemistry

**Abstract :** Personal medicine is the future to treat cancer. To address this concern, researchers started to develop objects which can be effective for both diagnostic and treatment in a short time. A new domain has emerged: theragnostic (therapy and diagnostic). Nanoparticles are a promising answer to this problematic. Synthesizing these objects implies to control size, morphology and chemical composition of the particles. Prussian blue analogues are coordination polymers with cyanide bridges which are considerable studied for their magnetic properties, but also for medical application. The size (nanometric), the porosity, the presence of water molecules and the high chemical versatility are the key argument to make Prussian blue good candidates as contrast agent for MRI.

Synthesis of Prussian blue doped with  $Gd^{III}$  or  $Mn^{II}$  and study of the chemical and structural properties is one of the aspects developed during this thesis. Relaxivity and photothermal therapy performances have been measured. In order to conduct *in vivo* experiments, evolution of our nanoparticles in appropriate media have been evaluated which led to the development of an optimal system. During this thesis, new nanoparticles composed of heavy ions such as  $Pt^{II}$ ,  $Pd^{II}$  or  $Au^I$  called cyanosols, have been elaborated to be used as radiosensitizers for hadrontherapy. Cyanosols are linked by cyanide bridge to other metallic ions. The purpose of this future work is to create new theranostic nanoplatfroms combining MRI and hadrontherapy.