



HAL
open science

Caractérisation de nanoparticules en milieux complexes : Applications à des nanoparticules organiques et métalliques

Amandine Arnould

► To cite this version:

Amandine Arnould. Caractérisation de nanoparticules en milieux complexes: Applications à des nanoparticules organiques et métalliques. Science des matériaux [cond-mat.mtrl-sci]. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT: 2018GREAI098 . tel-02067102

HAL Id: tel-02067102

<https://theses.hal.science/tel-02067102>

Submitted on 14 Mar 2019

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Matériaux, Mécanique, Génie civil, Electrochimie**

Arrêté ministériel : 25 Mai 2016

Présentée par

Amandine ARNOULD

Thèse dirigée par **Jean-François DAMLENCOURT**
et co-encadrée par **Maria BACIA (IBS)** et **Romain SOULAS (CEA)**

préparée au sein **Laboratoire de Nanocaractérisation et Nanosécurité
(CEA-LITEN, Grenoble)**
et de l'**École Doctorale IMEP-2 de Grenoble**

Caractérisation de nanoparticules en milieux complexes

Applications à des nanoparticules organiques
et d'oxydes métalliques

Thèse soutenue publiquement le **20 décembre 2018** ,
devant le jury composé de :

Dr Géraldine SARRET

Directrice de recherche, ISTerre, Grenoble, Présidente

Dr Damien ALLOYEAU

Chargé de recherche, MPQ, Paris, Rapporteur

Pr Stéphane ROUX

Professeur, Institut UTINAM, Besançon, Rapporteur

Dr Grégoire NAUDIN

Ingénieur, L'Oréal, Paris, Examineur

Dr Jérôme ROSE

Directeur de recherche, CEREGE, Aix-en-Provence, Examineur

Dr Danièle SPEHNER

Ingénieure de recherche, INSERM, Strasbourg, Invitée

Dr Jean-François DAMLENCOURT

Ingénieur, CEA-LETI, Grenoble, Directeur de thèse



À ma mère

Remerciements

Après ces trois années pendant lesquelles j'ai beaucoup appris scientifiquement mais également sur moi-même, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué directement ou indirectement à ce travail mais aussi celles qui m'ont soutenue jusqu'ici.

Je tiens tout d'abord à remercier Mme Géraldine Sarret d'avoir accepté de présider la soutenance de ma thèse. Je remercie particulièrement les deux rapporteurs de ces travaux à savoir M. Damien Alloyeau et M. Stéphane Roux pour leur relecture minutieuse du manuscrit. Je souhaite également remercier Mme Danièle Spehner, M. Grégoire Naudin ainsi que M. Jérôme Rose d'avoir examiné ce doctorat et pour leurs diverses remarques pertinentes. Les différentes discussions qui ont suivi la soutenance ont été très enrichissantes et je vous en remercie pour cela.

Je tiens également à remercier mon directeur de thèse, Jean-François Damlencourt, de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet et le faire évoluer. Je remercie vivement mes deux encadrants, Maria Bacia et Romain Soulas, pour leurs différents conseils, leur rigueur et leur investissement jusqu'à la soutenance. Vous m'avez appris à ne pas baisser les bras lorsque certaines expériences se révélaient infructueuses et à voir le bon côté des choses. J'ai beaucoup appris à vos côtés et je vous en remercie chaleureusement.

Mes remerciements vont également à Fanny Caputo qui m'a beaucoup aidé pour les différentes caractérisations par diffusion de la lumière. Grazie per esser sempre pronta a dedicarmi il tuo tempo, grazie mille! Isabelle Texier je te remercie d'avoir contribué avec Anne-Claude Couffin à la collaboration entre nos deux laboratoires en ce qui concerne la caractérisation des LNP.

Je souhaite également remercier tout le L2N pour vos différents conseils et discussions et pour votre aide pour certaines expériences : Samir Derrough, Adrien Boulineau, Nathalie Pelissier, François Saint-Antonin, Laure Guetaz, Grégory Si Larbi, Éric De Vito, Anass Benayad, Jessica Thery, Sylvie Motellier, Arnaud Guiot, Cécile Philippot, Simon Clavaguera, Christophe Brouard, Dominique Locatelli, Sébastien Jacquinet, Sébastien Artous, Hervé Giraud, Olivier Sicardy, Chantal Robesson, Lucas Givelet, Manon Berthault, Maria Planells Valencia, Sergio Battiato et Jorge Morales. Je remercie particulièrement Delphine Boutry et Aurélien Auger pour leur investissement dans le marquage des LNP, c'est grâce à vous que le brevet a pu voir le jour. Je remercie tout autant Vincent Bartolomei qui m'a beaucoup aidé sur les TiO_2 .

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes de la PFNC pour leurs conseils et leur bonne humeur, dont notamment Nicolas Lhermet pour son accueil au sein de la plateforme, Zineb Saghi pour la tomographie, Nicolas Mollard et Denis Venet pour leur aide au laboratoire, P-H Jouneau, David Cooper, Nicolas Bernier, Vincent Delaye, Anne-Marie Papon, Cyril Guedj, Hanako Okuno, Éric Robin, Jean-Luc Rouvière, Guillaume Audoit, Carmelo Castagna, Hugo Dansas, Denise Muyard, Anne Bocquillon, Frédéric Laugier, ... Mes remerciements également à l'équipe de Guy Schoehn de l'IBS, et plus spécialement à Winnie Ling, pour son accueil et la coloration négative. Marie Escude merci pour tous les lots de LNP que tu as synthétisés pendant ces trois ans et pour ta rapidité.

Je remercie les personnes que j'ai eu la chance de rencontrer au cours de différentes présentations et conférences que j'ai pu effectuer comme le GUMP : Anne-Laure Favier, Cécile Hebert, Laurent Legras, Stéphane Aguy, ... Les discussions qui en ont suivi ont été très fructueuses.

Si je devais résumer ma vie aujourd'hui avec vous, je dirais que c'est d'abord des rencontres. Des gens qui m'ont tendu la main, peut-être à un moment où je ne pouvais pas, où j'étais seule chez moi. Et c'est assez curieux de se dire que les hasards, les rencontres forment une destinée ... [Otis, 2002]. C'est pourquoi je remercie particulièrement tous les thésards et amis de la PFNC sans qui cette aventure n'aurait pas été la même : l'OoS ou plus connu sous le nom d'Office of Sins (merci David) starring Lyly, Doudou et Titan, pour tous ces moments d'échanges (scientifiques) et de bonne humeur (petite pensée pour Frédéric qui a dû nous supporter trois ans), Deydey, the Mother of Cats, pour ces (petites) pauses au FIB, Maxime, Constantin C., Constantin M. (papy), Nicolas H., Bastien, Hoel, Alexandra, Remy, Ahmed, Carlos, Dipankar, Nicolas M., Martin, Laszlo, Alexandre, Julien, Loïc, Isabelle, Ben, Dimitri, Tony, Mathias, ...

Merci aux potos : mes petits Hope, les membres de l'Asile, mon mili préféré Lukas, les bricolos Henri et Nabil, les Nimois Flo, Nico, Chacha, Pedro, (Oh) Tom, Loulou, Poppy, ... pour m'avoir aussi bien intégrée (I take it smart) et pour toutes ces tresses partagées <3frites la vérité ça me fait plaisir.

Enfin j'aimerais remercier par dessous tout ma famille de m'avoir soutenue jusqu'ici : ma mère-grand, tu as toujours été à nos côtés et j'espère que tu le resteras encore longtemps, tu es une source d'inspiration et d'énergie pour tous, Daniel, mon père, Plumo pour avoir été à mes côtés pendant ces longues soirées de rédaction à (me soutenir) dormir, merci à la famille Outini Lisa, Gisèle et Salah pour tout votre soutien et de m'avoir aussi bien intégrée à votre famille, Keke, Pupuce et Chouchou pour m'avoir toujours soutenue et remonté le moral quand ça n'allait pas (en vrai c'est vous les meilleurs mais chut), et enfin ma madre, mon petit chat, à qui je dédie ce manuscrit c'est grâce à toi si j'en suis là aujourd'hui et je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait. Ah et j'allais oublié (oupsi) mon Mehdou, (ma moitié) mon cinquième, your objective is simple collect the egg! Tu me comprends (et me supporte oui oui) comme personne, merci d'être toi. Et comme l'a dit une sage : je préfère partager une vie de mortelle avec toi que de devoir affronter tous les âges de ce monde toute seule. Je t'aime.

Aux personnes qui souhaiteraient imprimer cette thèse, pensez à la planète ...

Liste des abréviations et symboles

d_{50}	Valeur médiane
D_{eq}	Diamètre équivalent (MET)
D_g	Diamètre de giration/géométrique (MALS)
D_h	Diamètre hydrodynamique (DLS)
D_{max}	Valeur maximale
D_{min}	Valeur minimale
s	Écart-type
\bar{X}	Moyenne
x_m	Valeur modale
AF4	Fractionnement par couplage Flux-Force
BC	Bande de Conduction
BV	Bande de Valence
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
EDS	Spectroscopie X à dispersion d'énergie
EELS	Spectroscopie des pertes d'énergie des électrons
FYY	Formulation de LNP de référence de taille YY nm (DLS)
LNP	Nanoparticule lipidique
LS	Diffusion de la lumière
MALS	Diffusion statique de la lumière sous multiples angles
MET	Microscope Électronique en Transmission
N/A	Non applicable
NCXX	Fraction massique XX de cire des LNP
NLC	Transporteur lipidique nanostructuré
NP	Nanoparticule
PDI	Indice de polydispersité
PSD	Distribution de taille des particules
SLN	Nanoparticule lipidique solide
STEM	Microscopie électronique à balayage en transmission
UA	Unité arbitraire

Table des matières

Liste des abréviations et symboles	vii
Introduction - Contexte de l'étude	1
I État de l'art et techniques expérimentales	5
1 Nanoparticules en milieux complexes et nanocaractérisation	7
1.1 Nanomatériaux et interactions physico-chimiques avec un milieu complexe . .	8
1.1.1 Nanomatériaux et nanoparticules	8
1.1.1.1 Définition	8
1.1.1.2 Morphologie et effets de surface	8
1.1.1.2.1 Dimensionnalité	9
1.1.1.2.2 Structure d'une nanoparticule	12
1.1.1.2.3 État de dispersion	13
1.1.1.3 Synthèse de nanoparticules	14
1.1.2 Interactions physico-chimiques de nanoparticules avec leur milieu . . .	15
1.1.2.1 Milieu complexe : définition	15
1.1.2.2 Interactions entre une nanoparticule et son milieu	16
1.1.3 Bilan	18
1.2 Outils pour la nanocaractérisation	18
1.2.1 Nanocaractérisation et nanosécurité	18
1.2.2 Comparaison des techniques de caractérisation	19
1.2.2.1 Optique	20
1.2.2.2 Électronique	21
1.2.2.3 Balayage	23
1.2.2.4 Photonique	24
1.2.2.5 Ionique et particulaire	24
1.2.2.6 Étude comparative	25
1.2.3 Analyse des données	30
1.2.4 Bilan	33
2 Techniques expérimentales	35
2.1 Diffusion de la lumière	36
2.1.1 Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS)	37
2.1.2 Diffusion Statique de la Lumière - Exemple de la diffusion sous multiples angles (MASLS ou MALS)	39
2.1.3 Modes de fonctionnement	41
2.1.3.1 Mode « batch »	41
2.1.3.2 Mode « on-line »	42
2.2 Microscopie Électronique en Transmission (MET)	43
2.2.1 Modes de fonctionnement	43
2.2.1.1 Mode MET	44

2.2.1.2	Mode STEM et analyses chimiques	46
2.2.1.3	Tomographie et reconstruction	51
2.2.1.4	Conditions expérimentales	53
2.2.2	Préparation d'échantillons	53
2.2.2.1	Voie sèche	54
2.2.2.2	Cryo-microscopie	55
2.2.2.3	<i>In-situ</i> liquide	60
2.3	Applications	61
II Étude de nanoparticules en milieux complexes		63
3 Caractérisation de nanoparticules organiques : les Lipidots		65
3.1	Nanoparticules lipidiques et nanomédecine	66
3.1.1	Nanomédecine	66
3.1.2	Nanomatériaux et nanomédecine	68
3.1.3	Vectorisation de molécules dans des nanoparticules	69
3.1.4	Nanoparticules lipidiques	74
3.1.5	Lipidots	76
3.1.6	Bilan	78
3.2	Caractérisation	80
3.2.1	Diffusion de la lumière	81
3.2.1.1	Mode batch (DLS)	81
3.2.1.2	Mode on-line (AF4-DLS-MALS)	82
3.2.1.3	Bilan intermédiaire LS	87
3.2.2	Microscopie Électronique en Transmission	88
3.2.2.1	Voie sèche	88
3.2.2.1.1	Sans coloration	88
3.2.2.1.2	Coloration négative	89
3.2.2.2	Cryogénie	95
3.2.2.2.1	H1 : Tenue mécanique des LNP	99
3.2.2.2.2	H2 : Cristallisation du cœur des LNP	106
3.2.2.2.3	Hypothèse retenue	107
3.2.2.3	<i>In-situ</i> liquide	108
3.2.2.3.1	Sans greffage	108
3.2.2.3.2	Greffage de métaux	109
3.2.2.3.3	LNP chargées avec un agent de contraste	117
3.2.2.3.4	Bilan : amélioration de contraste en <i>in-situ</i> liquide	118
3.2.2.4	Bilan intermédiaire MET	120
3.2.3	Discussion	121
3.2.3.1	Comparaison des techniques de caractérisation	121
3.2.3.1.1	Dimensionnalité	121
3.2.3.1.2	Structure/forme	124
3.2.3.1.3	État de dispersion	125
3.2.3.1.4	Récapitulatif	125
3.2.3.2	Confrontation avec la bibliographie	126
3.3	Applications : étude de la stabilité des LNP	129

Table des matières

3.3.1	Influence du ratio cire/huile	129
3.3.2	Procédés de synthèse	132
3.3.3	Interaction avec des protéines	134
3.3.4	Bilan	137
4	Caractérisation d'oxydes métalliques nanométriques utilisés dans les crèmes solaires	139
4.1	Nanoparticules d'oxydes métalliques et cosmétologie	139
4.1.1	Cosmétiques et nanotechnologies	139
4.1.2	Photoprotection et filtres UV	140
4.1.3	Nanoparticules de TiO ₂ type cœur/coquille	141
4.1.4	Bilan	143
4.2	Caractérisation	144
4.2.1	Diffusion de la lumière	145
4.2.1.1	Mode batch (DLS)	145
4.2.1.2	Mode on-line (AF4-MALS)	146
4.2.1.3	Bilan intermédiaire LS	148
4.2.2	Microscopie Électronique en Transmission (MET)	149
4.2.2.1	Voie sèche	149
4.2.2.2	Cryogénie	155
4.2.2.3	<i>In-situ</i> liquide	156
4.2.2.4	Bilan intermédiaire MET	157
4.2.3	Discussion	157
4.2.3.1	Comparaison des techniques de caractérisation	157
4.2.3.1.1	Dimensionnalité et état de dispersion	157
4.2.3.1.2	Structure physico-chimique	158
4.2.3.1.3	Récapitulatif	159
4.2.3.2	Confrontation avec la bibliographie	159
4.3	Application : vieillissement sous UV de nanoparticules de TiO ₂	161
4.3.1	Paramètres de l'enceinte climatique	161
4.3.2	Analyse du vieillissement du T-AVO	163
4.3.3	Analyse du vieillissement du T-S	165
4.3.4	Analyse du vieillissement du T-2000	168
4.3.5	Bilan	171
	Conclusions et perspectives	173
	Annexes	179
A	Interprétation de la distribution de taille obtenue par DLS	179
B	Stabilité d'une formulation de LNP	181
B.1	LNP F80 NC75	181
B.2	LNP F80-S-S-Pyr	183
	Bibliographie	185

Introduction - Contexte de l'étude

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, les nanomatériaux ne sont pas exclusivement le fruit de recherches modernes. En effet, ils sont naturellement présents depuis la formation de la Terre, sous forme de nanoparticules d'oxyhydroxyde de fer, d'aluminosilicates, d'oxydes métalliques, ... de part l'activité volcanique notamment et l'érosion de surface qui perdure depuis [1, 2]. L'utilisation de particules métalliques naturelles par l'Homme dans des objets du quotidien a pu être datée de l'Antiquité égyptienne. Le sulfure de plomb, par exemple, était principalement utilisé comme pigment pour cosmétiques (khôl, teintures capillaires) [3]. Les nanoparticules d'or et d'argent trouvaient quant à elles des applications en poterie et en verrerie (coupe de Lycurgue) au Moyen-Age pour leurs propriétés optiques. Ce n'est qu'en 1857 que Michael Faraday décrivit pour la première fois les relations existant entre la matière et ses propriétés et étudia notamment les propriétés optiques de l'or colloïdal [4].

Les nanomatériaux représentent désormais un support clé pour lever certains verrous technologiques du monde industriel. L'intérêt de leur utilisation réside dans leurs effets de surface qui sont très importants, comparés à l'état massif, du fait de leur taille nanométrique ce qui leur confère des propriétés physico-chimiques autres [5]. Leur intérêt provient également de leurs morphologies qui sont très variables : de la nanoparticule au nanofeuillet en passant par le nanotube. De ce fait, selon les applications prévues, l'une peut être plus adaptée que les autres : l'industrie textile rajoute des nanotubes de carbone dans les fibres de tissus afin de les rendre plus résistantes du fait de leur large déformabilité et de leur rigidité élevée, ce qui ne serait pas rendu possible par l'ajout de nanoparticules de noir de carbone [6]. Grâce à leurs différentes propriétés physico-chimiques, les domaines d'application des nanotechnologies sont très vastes : de la dépollution de l'environnement, à la santé (nanomédecine), en passant par l'électronique (transistors) ou encore dans l'industrie agroalimentaire et cosmétique en tant qu'additifs (épaississants, conservateurs, colorants, filtres UV, ...) [7, 8, 9, 10].

Cependant, les risques sanitaires et environnementaux liés à leur exposition sont encore peu connus [11, 12]. Dans un principe de précaution, leurs fabrication, distribution et importation sont désormais soumises à déclaration depuis 2012 [13]. Une caractérisation aussi complète que possible, selon les techniques disponibles, d'un point de vue physique (taille, morphologie, porosité, cristallinité, état de dispersion, ...) et chimique (stabilité, composition, groupes fonctionnels, potentiel zêta, ...) doit donc être effectuée [14, 15]. Cette caractérisation doit être réalisée juste après leur synthèse mais également dans leur milieu d'application, avant et après vieillissement [16]. En effet, du fait de leur très petite taille, les nanomatériaux ont une grande propension à interagir avec leur milieu environnemental, d'autant plus lorsqu'il s'agit de milieux fluides [17, 18, 19]. Toute modification physico-chimique de nanoparticules peut avoir une influence sur leur toxicité, d'où la nécessité d'une caractérisation approfondie.

Le travail de thèse présenté ici s'inscrit dans cette démarche concernant l'observation et l'identification de nanoparticules dans des milieux complexes. Ce dernier a été réalisé au sein du Laboratoire de Nanocaractérisation et Nanosécurité (L2N) du CEA-Grenoble, dont la maîtrise des risques liés à l'exposition à des substances nanoparticulaires est l'une de ses problématiques. Pour cela, les outils de la PlateForme de NanoCaractérisation (PFNC) et de la Plateforme de NanoSécurité (PNS) ont été employés, dont notamment un Microscope Électronique en Transmission (MET) ainsi que des outils utilisant la Diffusion Dynamique ou

Statique de la Lumière (DLS et MALS), avec ou sans dispositif de fractionnement en amont (AF4). Ces équipements, mis à disposition dans le cadre de l'EquipEx NanoID, permettent de détecter et/ou d'identifier des nanoparticules dans des matrices complexes. Ces techniques sont complémentaires l'une de l'autre et permettent de mettre en avant d'éventuels artéfacts d'analyse en vérifiant la cohérence des résultats obtenus. Ainsi, deux types de nanomatériaux, aux propriétés physico-chimiques différentes, ont servi de support pour cette étude. Le premier est une émulsion composée de particules lipidiques (LNP), utilisées comme nanotransporteurs à des fins de diagnostic et thérapeutique. Le second est, quant à lui, constitué de nanoparticules d'oxydes métalliques sous forme de poudres remises en suspension, utilisées en tant que filtres UV dans les crèmes solaires. Ces nanoparticules ont fait l'objet de certains développements en ce qui concerne leur préparation avant analyse, notamment pour une observation par cryo-MET au cœur du prix Nobel de chimie de 2017 (Jacques Dubochet, Joachim Frank et Richard Henderson). Pour cela, une collaboration avec l'Institut de Biologie Structurale (IBS) de Grenoble a été établie, notamment avec le groupe de Microscopie électronique et Méthodes. Le MET étant une technique de caractérisation très fine mais pouvant induire certains artéfacts, une optimisation du procédé de cryo-fixation a été effectuée selon le type de particules étudiées (organiques/inorganiques, cristallines/amorphes). La mise à disposition d'un porte-objet *in-situ* liquide via l'EquipEx NanoID a également nécessité certains développements concernant l'amélioration du contraste pour l'observation de particules organiques.

Ce manuscrit se décompose en deux parties de deux chapitres chacune, la première regroupant état de l'art et techniques expérimentales, et la seconde les études réalisées sur les deux matériaux définis précédemment.

Le premier chapitre s'est attaché à réaliser un état de l'art concernant les nanoparticules en milieux complexes et leur caractérisation. Pour cela, les termes « nanoparticule » et plus généralement « nanomatériau » ont été définis d'un point de vue morphologique, et les synthèses associées ont été décrites succinctement. Ensuite, les différentes interactions entre une nanoparticule et son milieu ont été présentées, en délimitant au préalable ce qui a ici été considéré comme un milieu complexe. Le contexte de nanosécurité lié à l'utilisation des nanoparticules a été évoqué dans une seconde section et les différents outils de caractérisation disponibles à ce jour pour leur analyse ont fait l'objet d'une étude comparative.

Le second chapitre est dédié à la description des techniques expérimentales, au nombre de trois, qui ont été utilisées pour caractériser des nanoparticules en milieux complexes. Les deux premières, à savoir la DLS en mode batch ainsi que l'AF4-MALS-DLS, qui sont des techniques de caractérisation indirectes, utilisent toutes deux le principe de la diffusion de la lumière (LS). La troisième est la Microscopie Électronique en Transmission qui, quant à elle, est une technique directe. Les différents modes de fonctionnement de cette dernière ont été décrits ainsi que les préparations d'échantillons qui ont été utilisées.

Pour ce qui est du troisième chapitre, celui-ci présente tout d'abord un bref état de l'art concernant l'utilisation des LNP en nanomédecine. Les différentes caractérisations effectuées par DLS, MALS et MET sont ensuite présentées et comparées afin de déterminer celle(s) qui serai(en)t la/les plus adaptée(s). Différents points concernant l'optimisation de la préparation d'échantillons sont développés, notamment en ce qui concerne l'utilisation du mode cryogénique ainsi que l'amélioration du contraste des LNP pour une observation en *in-situ* liquide. Les LNP ont ensuite été mises en situation directe d'application (influence de la composition et du procédé de synthèse, interaction avec des protéines) afin de caractériser leur stabilité.

Enfin, le quatrième chapitre expose tout d'abord l'intérêt que présentent l'utilisation de nanoparticules dans des cosmétiques, et notamment dans des crèmes solaires. Les caractérisations effectuées sur des nanoparticules de dioxyde de titane, utilisées en tant que filtres UV, par DLS, MALS et MET sont ensuite détaillées et comparées. Enfin, une étude du vieillissement sous UV de ces particules a été mise en place afin de mettre en avant leur stabilité.

Deux annexes sont présentées à la fin de ce manuscrit. La première justifie le choix qui a été fait concernant la représentation de la distribution de taille par intensité pour la DLS. Elle présente également des études de stabilité par DLS de LNP pour des lots de même composition. La seconde annexe présente les caractérisations physico-chimiques effectuées sur des nanoparticules de dioxyde de titane utilisées en tant que filtres UV mais présentant toutefois un enrobage différent de celles analysées dans le chapitre 4.

Première partie

État de l'art et techniques
expérimentales

Nanoparticules en milieux complexes et nanocaractérisation

Sommaire

1.1	Nanomatériaux et interactions physico-chimiques avec un milieu complexe	8
1.1.1	Nanomatériaux et nanoparticules	8
1.1.1.1	Définition	8
1.1.1.2	Morphologie et effets de surface	8
1.1.1.3	Synthèse de nanoparticules	14
1.1.2	Interactions physico-chimiques de nanoparticules avec leur milieu	15
1.1.2.1	Milieu complexe : définition	15
1.1.2.2	Interactions entre une nanoparticule et son milieu	16
1.1.3	Bilan	18
1.2	Outils pour la nanocaractérisation	18
1.2.1	Nanocaractérisation et nanosécurité	18
1.2.2	Comparaison des techniques de caractérisation	19
1.2.2.1	Optique	20
1.2.2.2	Électronique	21
1.2.2.3	Balayage	23
1.2.2.4	Photonique	24
1.2.2.5	Ionique et particulaire	24
1.2.2.6	Étude comparative	25
1.2.3	Analyse des données	30
1.2.4	Bilan	33

L'objectif de ce chapitre est de situer la caractérisation de nanotechnologies en interaction avec un milieu complexe dans la littérature existante. Pour cela, la première section s'est attachée à définir ce qu'est un nanomatériau pour ensuite étudier ses possibles interactions physico-chimiques avec un milieu complexe. La deuxième section est, quant à elle, centrée sur les outils de nanocaractérisation disponibles à ce jour et met en avant les aspects de sécurité liés à l'utilisation de nanomatériaux. Différentes techniques de caractérisation d'objets nanométriques ont été comparées afin de mettre en évidence celles qui seraient les plus adaptées dans le cadre de cette étude.

1.1 Nanomatériaux et interactions physico-chimiques avec un milieu complexe

Cette section est largement inspirée d'un article de P. Christian publié dans le journal *Ecotoxicology* [20].

1.1.1 Nanomatériaux et nanoparticules

1.1.1.1 Définition

Un nanomatériau est défini, selon la norme ISO/TS 80004-4 :2011, comme un « *matériau ayant [au moins] une dimension externe à l'échelle nanométrique* » (1-100 nm), il s'agit alors d'un **nano-objet**, « *ou possédant une structure interne ou une structure de surface à l'échelle nanométrique* », il est alors question de **matériau nanostructuré** [21].

Afin de mettre en place une procédure de réglementation de l'utilisation des nanomatériaux, la Commission Européenne a quant à elle établi une définition plus complète de ceux-ci. Elle définit un nanomatériau comme étant un « *un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégats ou sous forme d'agglomérats, dont au moins 50% des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm* » [22]. En effet, il existe des nanomatériaux à l'**état naturel** qui sont notamment retrouvés dans deux domaines : la biologie et l'environnement [23, 24, 25]. En ce qui concerne la biologie, certains virus, protéines ou encore brins d'ADN appartiennent au domaine nanométrique. Pour ce qui est de l'environnement, elles sont majoritairement présentes en tant que particules ultrafines dans l'atmosphère. Il s'agit de particules issues de l'activité volcanique, d'incendies ou de la déflation, c'est-à-dire l'érosion éolienne. Les particules ultrafines regroupent également les matériaux d'**origine anthropique**, c'est-à-dire accidentelle tels que les produits de combustion (gaz d'échappement des moteurs, chaudières, cuisinière au gaz) ou d'abrasion (pneus, plaquettes de freins) [26, 27, 28]. Les nanoparticules **manufacturées** ou **synthétisées** trouvent quant à elles de nombreuses applications dans les industries aéronautique, pharmaceutique, cosmétique ou encore agro-alimentaire et permettent de contourner certains verrous technologiques liés aux propriétés physico-chimiques des matériaux massifs [29].

L'état de l'art concernant les deux types de nano-objets retenus pour cette thèse, à savoir des nanoparticules d'oxyde de titane en suspension dans une phase liquide et des nanoparticules lipidiques sous forme de nanoémulsion, sera développé ultérieurement (Chapitres 4 et 3).

1.1.1.2 Morphologie et effets de surface

Connaître la morphologie d'un nanomatériau permet de le caractériser et donc de comprendre ses propriétés physico-chimiques. Elle repose principalement sur trois critères, à savoir :

- la **dimensionnalité** ;
- la **structure** ;
- l'**état de dispersion** des nano-objets.

1.1. Nanomatériaux et interactions physico-chimiques avec un milieu complexe

1.1.1.2.1 Dimensionnalité

En ce qui concerne la dimensionnalité, les nanomatériaux sont catégorisés de zéro à trois dimension(s) [30].

Sous le terme **zéro dimension** (0D) sont regroupés les nano-objets dont toutes les dimensions externes sont à l'échelle nanométrique ou plus communément appelées nanoparticules. Elles peuvent avoir différentes géométries, indépendamment de l'élément qui les compose, dont voici une liste non exhaustive (Figure 1.1) :

- **sphérique** pleine (nanoparticules d'oxyde de fer [31]) ou creuse (fullerènes [32]) ;
- **cubique** (nanoparticules de palladium [33]) ;
- en forme de **bâtonnet** (nanobâtonnet d'or [34]) ;
- en forme d'**étoile** (nano-étoile d'or [35]) ;
- **polyédrique** (nanoparticules d'or icosaédrique [36]).

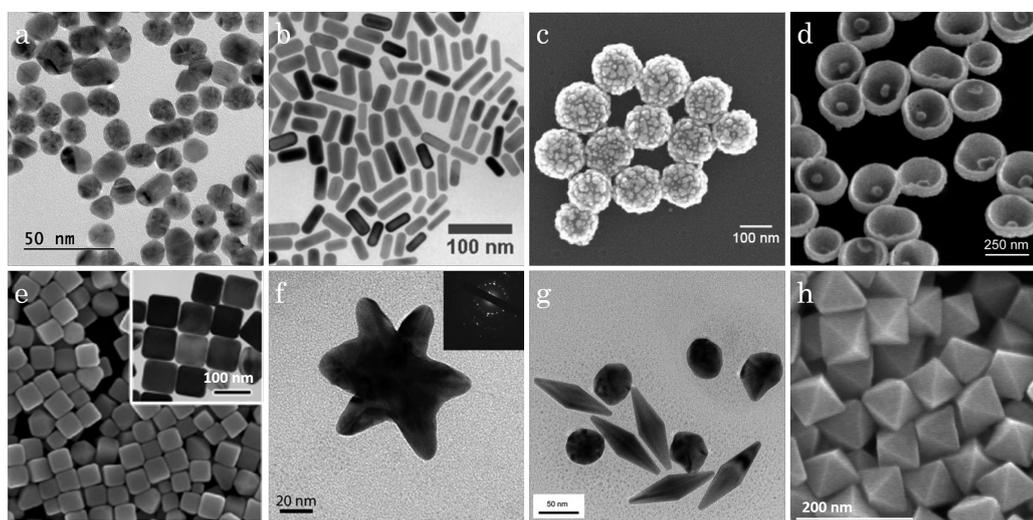


Figure 1.1 – Images de différentes géométries de nanoparticules d'or par microscopie électronique en transmission ou à balayage. (a) Or colloïdal. (b) Nanobâtonnets. (c) Particules de silice entourées d'une nanocoquille d'or. (d) Nanoparticules d'or dans une coupelle d'or. (e) Nanocubes d'argent. (f) Nano-étoile. (g) Nano-bipyramides. (h) Nano-octaèdres [37].

Les nanoparticules sont très rarement utilisées telles quelles après synthèse, mais plutôt sous forme **colloïdale**, c'est-à-dire un mélange de deux phases [38, 39]. La phase dispersée dans le milieu continu solide, liquide ou gazeux, est constituée d'un matériau dont les dimensions peuvent être comprises entre le nanomètre et le micromètre. Ainsi, selon l'état de la phase continue, diverses applications peuvent être ciblées (Tableau 1.1).

Les nanomatériaux à **une dimension** (1D) sont, quant à eux, définis par deux de leurs dimensions externes à l'échelle nanométrique et la troisième dimension de l'ordre du micromètre. Ces matériaux anisotropiques se caractérisent bien souvent par une section transversale plus ou moins arrondie et se retrouvent sous différentes formes comme :

- des **nanofibres** : elle sont beaucoup utilisées en nanomédecine notamment en ingénierie tissulaire osseuse ou musculaire pour leur grande flexibilité ([40, 41]) ;

- des **nanotubes** : ils sont caractérisés par une forme cylindrique creuse, les plus répandus étant les nanotubes de carbone ([42]) ;
- des **nanofils** : ce sont les nanomatériaux 1D qui ont le plus grand ratio longueur sur largeur (≥ 1000) ([43, 44]) ;
- mais aussi des **nanobâtonnets**, si leur longueur excède 100 nm ([45]). Ces derniers sont en réalité à la frontière entre 0D et 1D.

Ils trouvent de nombreuses applications dans les domaines de l'électronique, de l'électrochimie ou encore de l'électromécanique [46].

Tableau 1.1 – Catégories de colloïdes nanoparticulaires obtenus selon l'état de la phase continue.

Phase continue	Phase dispersée nanoparticulaire
Solide	Composite nanoparticulaire Tôle [47], ciment [48]
Liquide	Suspension Encre [49], peinture [50], nanotransporteur de médicament [51]
Gas	Aérosol Détecteur de gaz [52], système de dépollution de l'air [53]

Les matériaux comportant seulement une dimension à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire les **nanomatériaux 2D**, sont regroupés en deux catégories à savoir les nanocouches et les nanofeuillets. Les **nanocouches**, aussi appelées nanorevêtements, sont utilisées pour modifier localement les propriétés d'un matériau massif. Cela se traduit par exemple par l'amélioration de la résistance à la corrosion, une surface rendue conductrice ou encore biocompatible, ... [54, 55]. Ce revêtement peut donc couvrir une grande surface et mesurer plusieurs centaines de micromètres. Lorsque l'épaisseur de ce revêtement n'excède pas quelques couches atomiques, il est alors question de film ultra-mince. Les **nanofeuillets** sont, quant à eux, caractérisés par leur petite taille qui n'excède pas le micromètre.

Les **matériaux nanostructurés** et les **nanocomposites**, quant à eux, se distinguent des nanomatériaux 0D à 2D du fait qu'aucune de leurs dimensions externes n'est à l'échelle nanométrique. L'aspect nanométrique est issu soit de leur structure interne ou de leur surface, il s'agit alors de matériaux nanostructurés ou bien, dans le cas des nanocomposites, au moins l'une des phases qui les composent comporte une dimension nanométrique [21]. Il est alors question de **nanomatériaux 3D**. Par exemple, le cuivre nanocristallin possède des propriétés d'extensibilité superplastiques très élevées [56].

Dans la suite de ce manuscrit, il sera seulement fait référence à des **états nanoparticulaires**, sur lesquels toute l'étude s'est basée.

Ces aspects de dimensionnalité sont importants à souligner car ils permettent de mettre en évidence les **effets de surface** mais également de **volume** mis en jeu à cette échelle, pouvant modifier les propriétés physico-chimiques d'un matériau. Comparée à celle de son homologue massif pour un élément chimique et un volume donnés, la **surface d'interaction** d'un nanomatériau est beaucoup plus importante (Figure 1.2) (Tableau 1.2).

1.1. Nanomatériaux et interactions physico-chimiques avec un milieu complexe

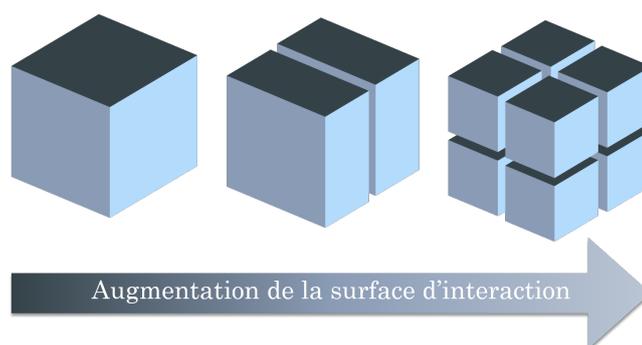


Figure 1.2 – Illustration de l'augmentation de la surface d'interaction pour un volume donné lorsque la taille du motif élémentaire diminue.

Tableau 1.2 – Surface totale d'interaction d'un matériau de 1 cm^3 de volume en fonction de la taille de la/des particule(s) qui le compose(nt) (modèle de particules cubiques).

Taille de la particule	Surface totale d'interaction
1 cm	6 cm^2
1 mm	60 cm^2
1 nm	$60\,000\,000 \text{ cm}^2$

D'autre part, la proportionnalité entre le nombre d'atomes en surface et le nombre total d'atomes dans le volume, notée Σ , est également à prendre en compte [57]. Soit une particule cubique de côté a composée d'atomes modélisés par des cubes de côtés d . Le nombre d'atomes dans le volume de la particule noté ρ et le nombre d'atomes en surface noté σ s'écrivent alors (Équation 1.1) :

$$\rho = \frac{a^3}{d^3} \quad \text{et} \quad \sigma = \frac{a^2}{d^2} \quad (1.1)$$

Soit :

$$\Sigma = \frac{\sigma}{\rho} = \frac{d}{a} \quad (1.2)$$

Par conséquent, pour un élément chimique donné, le ratio entre le nombre d'atomes en surface d'une particule et le nombre total d'atomes dans le volume est inversement proportionnel à la taille de la particule. Ainsi, une macroparticule A de taille 1 cm et une nanoparticule B de taille 1 nm composées d'atomes de 100 pm de diamètre auront respectivement des ratio surface sur volume de $\Sigma_A = 10^{-6}\%$ et $\Sigma_B = 10\%$ (Équation 1.2). La contribution de la **chimie de surface** pour des nanoparticules est donc conséquente comparée à un matériau massif. En effet, les propriétés physico-chimiques d'un matériau massif sont globalement gouvernées par ses atomes de cœur, la proportion d'atomes en surface étant négligeable, sauf dans le cas de réaction chimique par exemple. Or, dans le cas de nanoparticules, la proportion d'atomes

en surface étant bien trop importante pour être négligée, leur **interaction** avec leur environnement est alors à prendre en compte, sachant qu'elles se présentent la plupart du temps sous la forme de suspensions colloïdales. Ceci explique les changements de propriétés observés lorsque que l'on passe d'un état massif à un état nanoparticulaire, comme la modification des propriétés optiques fonction de la taille dans le cas d'or nanoparticulaire [57, 58]. De plus, en ce qui concerne la chimie de surface, celle-ci est bien souvent différente de celle du cœur de la nanoparticule. Par exemple, dans le cas de nanoparticules de silice, le cœur de la particule sera composé de SiO_2 tandis que les atomes en surface ont une chimie proche de $\text{Si}(\text{O})_{(2-x)}(\text{OH})_{(2x)}$ [59]. Ceci en fait alors des nanoparticules entourées d'une pseudo-coquille composée d'une monocouche d'atomes, les atomes de surface.

1.1.1.2.2 Structure d'une nanoparticule

Pour ce qui est de la structure, celle-ci est généralement associée à la **crystallinité**, c'est-à-dire l'arrangement des atomes entre eux. Ainsi, des nanoparticules sont dites **crystallines** s'il existe un ordre atomique à grande distance de telle sorte que les atomes forment un réseau régulier. Elles sont distinguées des nanoparticules **amorphes** qui, quant à elles, ne possèdent aucun ordre atomique à moyenne et grande distance. Cet ordre est indépendant de la nature chimique des éléments qui composent la matière, qu'elle soit **organique** ou **inorganique**. Ainsi, des nanoparticules de silicium, selon leur voie de synthèse, peuvent être soit cristallines, soit amorphes [60].

La structure d'une nanoparticule peut également faire référence à sa **structure interne et de surface**. En effet, selon les applications envisagées, il peut être nécessaire que la surface des nanoparticules soit modifiée chimiquement sur plusieurs couches atomiques. Il est alors question de nanoparticules de type **cœur/coquille** (Figure 1.3). Ces nanocoquilles sont particulièrement intéressantes pour fonctionnaliser une surface que ce soit avec des atomes métalliques, des polymères, des tensioactifs ou encore des petites molécules. Cela permet, par exemple, de protéger le cœur des nanoparticules qui peut être toxique ou de réaliser du ciblage dans le cas d'une interaction avec un milieu protéique [61]. Cela peut aussi améliorer les interactions entre des nanoparticules et leur milieu, comme c'est le cas des nanoparticules cœur/coquille de fer zéro-valent utilisées dans le traitement des boues d'épuration pour éliminer le sulfure d'hydrogène [62]. Les petites molécules greffées en surface peuvent également permettre de mieux stabiliser les nanoparticules lorsqu'elles sont en solution aqueuse en changeant localement la charge, comme c'est le cas du citrate pour les nanoparticules d'argent colloïdales [63]. Cette stabilisation peut également être obtenue grâce à des effets stériques notamment grâce au greffage de longues chaînes de polymères en surface des nanoparticules tel le polyéthylène glycol (PEG) [64].

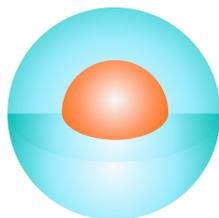


Figure 1.3 – Schéma d'une nanoparticule de type cœur (orange)/coquille (bleu).

1.1. Nanomatériaux et interactions physico-chimiques avec un milieu complexe

Bien que la coquille revête une importance considérable dans l'interaction d'une nanoparticule avec son milieu d'utilisation, ce sont tout de même les éléments constitutifs du cœur de la nanoparticule qui rempliront les objectifs fixés pour son utilisation. Plusieurs **phases**, dans le même état ou non, peuvent être mises en présence dans le cœur d'une nanoparticule. Ainsi, certaines particules lipidiques peuvent avoir un cœur solide et liquide à la fois, selon la température de fusion des composants en présence [65].

1.1.1.2.3 État de dispersion

Enfin, un troisième critère morphologique est à prendre en compte pour l'étude de nanoparticules : il s'agit de leur état de dispersion. Les nanoparticules en suspension peuvent se trouver sous trois états [66] :

- dispersé (Figure 1.4.a) ;
- aggloméré (Figure 1.4.b) ;
- agrégé (Figure 1.4.c).

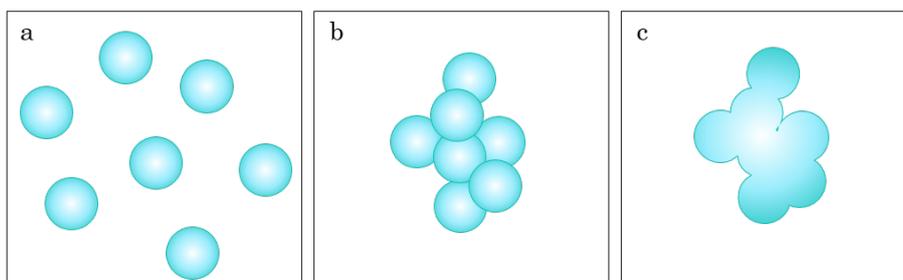


Figure 1.4 – Schéma représentant les états de dispersion de nanoparticules colloïdales. (a) État dispersé. (b) État aggloméré. (c) État agrégé.

Dans le cas de particules **dispersées**, celles-ci sont distribuées de manière homogène et unitaire dans leur milieu de suspension. Pour ce qui est des agglomérats et agrégats, ils divisent les scientifiques, leurs définitions respectives étant souvent permutées [67]. Ainsi, au cours de ce manuscrit sera appelé **agglomérat** tout assemblage de particules faiblement liées (liaisons de van der Waals) par contact entre elles et facilement dispersables. Pour ce qui est d'un **agrégat**, celui-ci sera défini comme étant une recombinaison de particules liées entre elles de façon rigide (liaisons covalentes), c'est-à-dire par fusion, frittage ou par autoépitaxie. L'état de dispersion des nanoparticules est crucial pour caractériser ces dernières. En effet, il a été vu précédemment qu'un changement de taille des particules pouvait entraîner une perte ou une modification des propriétés physico-chimiques de celles-ci. Ainsi, un agglomérat ou un agrégat de plusieurs nanoparticules peut alors être considéré comme une microparticule si les trois dimensions de celui-ci dépassent 100 nm. Cette dispersion unitaire des nanoparticules est notamment recherchée en cosmétologie pour ce qui est des crèmes solaires, composées majoritairement de nanoparticules de titane ou de zinc, afin d'augmenter les performances de protection UV de celles-ci [68].

Du fait de leur taille, les suspensions colloïdales nanométriques devraient être stables. En effet, les particules sont soumises à un mouvement Brownien conséquent d'autant plus que leur taille est petite (Figure 1.5). Or, du fait de leur énergie de surface intense, les nanoparticules

ont tendance à rentrer en collision les unes avec les autres créant ainsi une agglomération ou une agrégation. C'est pourquoi, selon l'application recherchée, il est utile que les nanoparticules soient bien dispersées dans leur milieu. Pour favoriser cette dispersion, diverses solutions existent comme créer un revêtement autour des nanoparticules (coquille) ou encore utiliser un milieu de suspension dispersant [69].

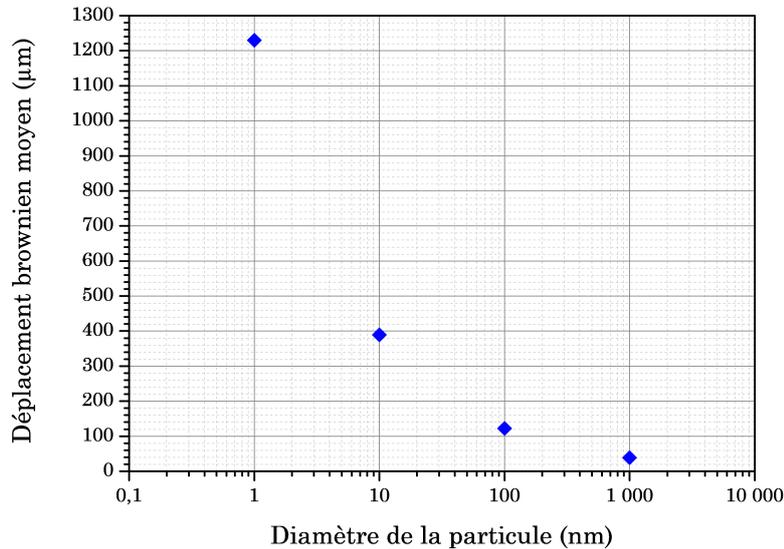


Figure 1.5 – Évolution du déplacement Brownien moyen d'une particule non chargée en fonction de son diamètre après 1h dans l'eau [70].

1.1.1.3 Synthèse de nanoparticules

Il existe deux approches pour synthétiser des nanoparticules : une approche ascendante (ou « bottom-up ») et une approche descendante (« top-down ») (Figure 1.6) [71, 30]. La procédure **descendante** consiste à partir du matériau massif pour concevoir des nanoparticules en utilisant majoritairement des procédés mécaniques comme le broyage et le concassage. Bien que facile à mettre en place et peu coûteuse, cette technique induit des artefacts de préparation comme des défauts structuraux et les particules formées sont la plupart du temps polydisperses. D'autres techniques physico-chimiques ont alors vu le jour comme l'électro-érosion. Pour ce qui est de la synthèse **ascendante**, celle-ci fait notamment appel à des procédés physico-chimiques de nucléation et de croissance (procédé microonde, dépôt chimique en phase vapeur (CVD), ...) en partant cette fois de petites molécules. La distribution de taille des nanoparticules obtenues est dans ce cas plus contrôlée que par broyage.

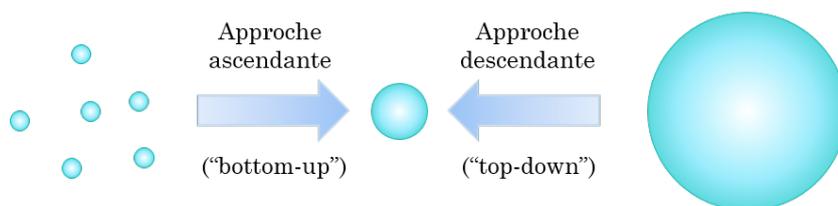


Figure 1.6 – Schéma représentant les voies de synthèses ascendante et descendante de nanoparticules.

1.1. Nanomatériaux et interactions physico-chimiques avec un milieu complexe

Il est important que le procédé de synthèse à l'échelle du laboratoire soit adapté à l'échelle industrielle sans que cela n'entraîne de modifications des propriétés physico-chimiques des particules afin de rester dans les mêmes conditions d'application [72]. Il est donc primordial de connaître et d'adapter la technique de synthèse d'une nanoparticule lors de son étude. En effet, de celle-ci dépendra sa chimie de surface et donc ses propriétés physico-chimiques lorsqu'elle sera mise en contact avec son milieu d'application. Toute variation en ce qui concerne la morphologie de la particule, que ce soit sa taille, sa forme ou encore sa structure peut modifier sa façon d'interagir avec son milieu.

1.1.2 Interactions physico-chimiques de nanoparticules avec leur milieu

1.1.2.1 Milieu complexe : définition

Lorsqu'une nanoparticule est mise en contact avec son milieu d'application, elle va interagir avec celui-ci et sa physico-chimie peut en être modifiée. Il est donc nécessaire de la caractériser dans son environnement d'application. Il en est de même du milieu de synthèse auquel il faut également prêter une attention particulière. Or la caractérisation est rendue d'autant plus difficile que le milieu d'application ou de synthèse est complexe.

Les milieux complexes regroupent tous les **milieux liquides**, qu'ils soient aqueux ou non. En effet, rester dans cet état peut se révéler compliqué lors de leur caractérisation étant donné qu'elle implique généralement un vide plus ou moins poussé [73]. Or ce vide entraîne une évaporation du liquide, ce qui peut altérer les nanoparticules et donc entraîner des artefacts lors de leur caractérisation. Pour ce qui est des milieux de synthèse aqueux, le choix du type d'eau utilisé ne doit pas être laissé au hasard. En effet, l'eau, dans son état non traité, comporte divers ions, cations (sodium, calcium, fer, cuivre) et anions (chlorure, sulfate) compris mais également des bactéries et des virus, qui peuvent interagir avec les nanoparticules mais aussi avec le milieu d'utilisation [74]. Ainsi, une eau distillée sera privée de virus et de bactérie ainsi que d'une grande partie des sels minéraux qui la composent. Une eau déionisée (ou déminéralisée) est quant à elle exempt de sels minéraux mais peut comporter des virus et des bactéries. Il existe désormais des systèmes permettant d'éliminer virus, bactéries et sels minéraux, de l'eau ultra-pure est alors obtenue [75]. Les mêmes problèmes se posent pour des milieux biologiques ou environnementaux où les nanoparticules peuvent interagir avec de nombreux éléments que ce soit les protéines, les cellules, les bactéries, les ions, ... mais aussi subir des modifications liées au pH du milieu [19]. Les fluides biologiques, tels le sang ou les urines, nécessitent de prendre certaines précautions pour éviter toute contamination, que ce soit de l'échantillon ou bien de la personne en charge des analyses, d'où la complexité de leur caractérisation.

La **viscosité** du milieu intervient également dans sa complexité ce qui peut le rendre difficile à caractériser, comme c'est le cas des boues par exemple [76, 57, 77]. En effet, la préparation d'échantillons visqueux est compliquée dans le sens où il sera laborieux d'obtenir un film mince d'échantillon, plus facile à caractériser qu'un échantillon épais (Section 1.2).

Les **milieux nanoparticulaires solides** comme la nourriture, les textiles ou encore les sols font également partie des milieux complexes, d'autant plus que leurs méthodologies de caractérisation commencent seulement à se développer [78, 79, 80]. En effet, d'autres éléments en plus des nanoparticules entrant dans leur composition, il peut être difficile de les séparer avant analyse.

Enfin, la complexité peut également venir du **milieu gazeux** dans lequel se trouvent les nanoparticules comme l'atmosphère ou encore divers aérosols qui requiert bien souvent des études in-vitro [81].

Ainsi, la complexité du milieu de synthèse ou d'application provient majoritairement des divers organismes ou éléments qui le composent et avec lesquels les nanoparticules peuvent avoir de fortes interactions. Elle résulte également de l'état de l'échantillon prélevé, les liquides étant plus difficiles à caractériser que certains solides. La suite de ce manuscrit se concentrera sur des milieux complexes aqueux, biologiques ou non.

1.1.2.2 Interactions entre une nanoparticule et son milieu

Avant de considérer les diverses interactions possibles entre une nanoparticule et son milieu, il faut tout d'abord définir les interfaces et éléments mis en jeu que sont (Figure 1.7) :

- la **nanoparticule** et notamment sa surface propre ;
- le **milieu d'interaction** avec tous les éléments qui le composent ;
- l'**interface** entre la nanoparticule et le milieu d'interaction.

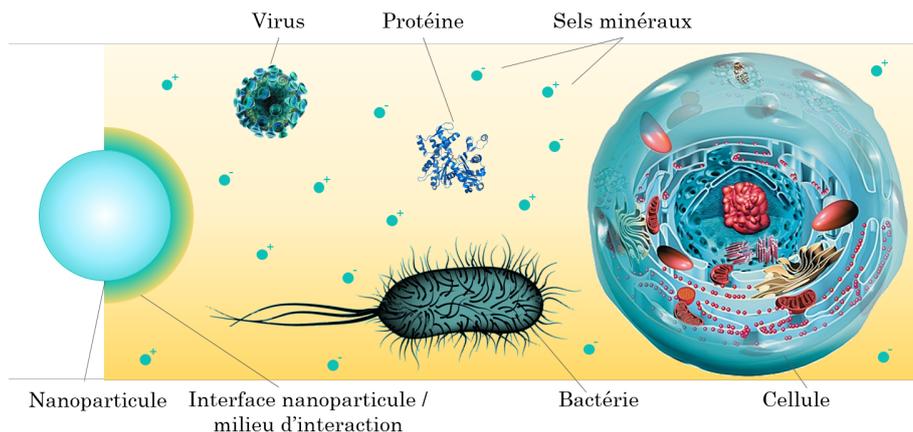


Figure 1.7 – Représentation d'une nanoparticule et de son interface avec un milieu complexe, ici composé de virus, protéines, bactéries, cellules et sels minéraux [82].

Il a été vu précédemment l'importance de la morphologie et des effets de surface des nanoparticules, et c'est au travers de cette surface qu'elles vont subir des interactions avec leur milieu environnant mais aussi avec les autres nanoparticules de la suspension colloïdale. Ces interactions peuvent être de plusieurs types et ont diverses conséquences, résumées dans le tableau ci-dessous (Tableau 1.3) [82].

L'interaction avec un milieu cellulaire est également à prendre en compte. En effet, lorsqu'une nanoparticule arrive au contact d'une cellule, cette dernière peut l'**internaliser** au travers de sa membrane. Si elle venait à se dégrader, cela pourrait interférer avec les brins d'ADN présents dans le noyau [86]. Des mutations génétiques pourraient alors se produire, se traduisant dans certains cas par un cancer. Inversement, dans le domaine de la thérapeutique, ce phénomène d'internalisation peut permettre de détruire des cellules cancéreuses et empêcher ainsi leur prolifération [87].

1.1. Nanomatériaux et interactions physico-chimiques avec un milieu complexe

Tableau 1.3 – Origines et conséquences des interactions entre une nanoparticule et son milieu environnant.

Interactions	Origines	Conséquences sur les nanoparticules
Hydrodynamique	Diffusion Brownienne, forces de cisaillements, de résistance et de portance	Agglomération et agrégation [83]
Électrodynamique	Forces de Van der Waals	Agrégation [84]
Électrostatique	Interface chargée	Répulsion, oxydation [19]
Solvatation	Interaction solvant / nanoparticules	Couche de solvatation, dissolution [85]
Stérique	Phénomène d'adsorption, interfaces répulsives (solvatation)	Amélioration de la stabilité colloïdale [83]

Ainsi, trois conséquences majoritaires sur une nanoparticule se dégagent des interactions entre celle-ci et son milieu environnant à savoir :

- sa **dissolution** en ions, notamment dans des milieux acides (comme l'estomac par exemple) (Figure 1.8.a) ;
- sa **restructuration**, via une stabilisation de la suspension colloïdale (dispersion) ou une agglomération/agrégation (Figure 1.8.b) ;
- une **modification locale de sa chimie de surface** par chimisorption (liaisons fortes, phénomène irréversible), physisorption (liaisons faibles, phénomène réversible) ou encore du fait de l'oxydation de celle-ci par exemple (Figure 1.8.c).

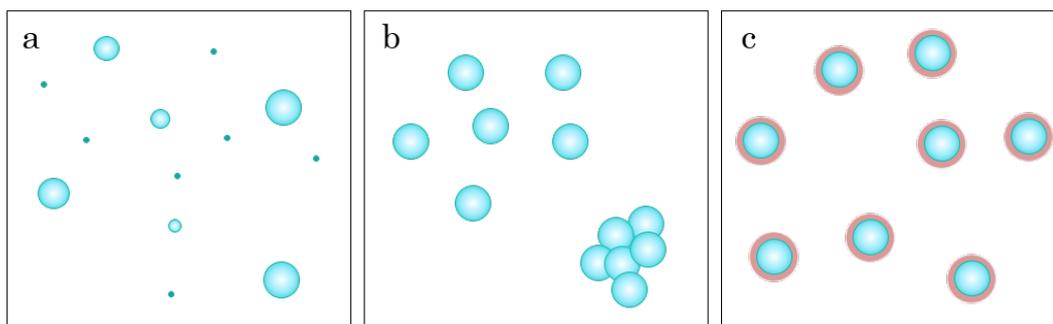


Figure 1.8 – Représentation des conséquences sur une nanoparticule de son interaction avec un milieu complexe. (a) Dissolution. (b) Restructuration. (c) Création d'une couche moléculaire.

Il est donc important de pouvoir caractériser ces changements s'ils surviennent afin de trouver des solutions pour les limiter ou, au contraire, pour les rendre plus effectifs selon les applications envisagées.

1.1.3 Bilan

Cette section a, dans un premier temps, défini le terme « nanomatériau », et notamment ce qu'est une nanoparticule, au travers de ses dimensions. Ainsi, une nanoparticule est définie comme un nano-objet dont les trois dimensions externes sont inférieures à 100 nm. Elle peut se retrouver sous différentes géométries et se présente bien souvent sous la forme de suspensions colloïdales. Les importants effets de surface liés à ces dimensions ont été mis en avant ainsi que les propriétés physico-chimiques qui en résultent. Ces nanoparticules, cristallines ou amorphes, peuvent être structurées sous la forme d'un cœur et d'une coquille, cette dernière servant majoritairement à protéger le cœur et donc la fonction principale du nano-objet. Des molécules greffées en surface de cette coquille permettent d'améliorer leur stabilité colloïdale ou bien de réaliser du ciblage dans le cas de thérapies.

Selon son milieu de synthèse ou d'utilisation, de nombreuses interactions sont mises en jeu pouvant modifier la dispersion des particules en solution, créant des agglomérats ou agrégats ou tendant à dissoudre les particules. Toutes les modifications engendrées par ces interactions doivent pouvoir être quantifiées et/ou qualifiées afin de s'assurer que les propriétés physico-chimiques des particules ne sont pas dénaturées. C'est pourquoi la prochaine section de ce manuscrit s'est attachée à comparer différents outils de nanocaractérisation dans un cadre de nanosécurité.

1.2 Outils pour la nanocaractérisation

1.2.1 Nanocaractérisation et nanosécurité

Avant de comparer les outils de nanocaractérisation désormais disponibles, il est important de replacer ceux-ci dans un contexte de **nanosécurité**. En effet, les nanoparticules sont de plus en plus utilisées dans le milieu industriel du fait de leurs propriétés physico-chimiques particulières. Cependant, leurs effets à plus ou moins long terme sur la biosphère, c'est-à-dire les organismes vivants et leurs milieux de vie, sont encore peu connus. C'est pourquoi la loi française prévoit depuis l'arrêté du 6 août 2012, la déclaration obligatoire de leurs fabrication, distribution et importation¹. De même, la législation européenne prévoit l'enregistrement auprès de l'ECHA, l'Agence Européenne des Produits Chimiques, de toute substance chimique, nanométrique ou non, importée ou fabriquée en Union Européenne [88]. Ainsi, dans une démarche « sûre, intégrée et responsable », toutes les étapes depuis la conception jusqu'à l'exploitation doivent être contrôlées, c'est-à-dire :

- l'**élaboration**, avec des études toxicologiques et écotoxicologiques *in-vitro* (conditions artificielles en dehors d'un organisme), *in-situ* (conditions naturelles en dehors d'un organisme) et/ou *in-vivo* (conditions naturelles dans un organisme) par exemple [89];
- la **production**, en mettant en place des techniques d'analyse d'exposition (par inhalation et cutanée) au poste de travail, [90];

1. Identifiant du déclarant, identité de la substance (composition, taille, distribution, état d'agglomération ou d'agrégation, forme, état, impureté, surface spécifique, état cristallin, charge de surface, nom commercial), quantité, usage, identité des utilisateurs [13].

1.2. Outils pour la nanocaractérisation

- l'**utilisation**, en s'assurant de l'innocuité des nanoparticules ou en limitant l'exposition des consommateurs/utilisateurs [91];
- le **recyclage** ou l'**élimination**, afin d'éviter une contamination des écosystèmes [92].

Dans cette optique, il convient de caractériser des nano-objets à la fois juste après leur synthèse et après leur interaction avec le milieu d'application afin de pouvoir suivre les éventuelles modifications pouvant subvenir entre ces deux étapes. Au cours de ces analyses, il est important de préserver au maximum le milieu afin de reproduire au mieux les conditions d'application. Les paramètres physico-chimiques qui ont été retenus pour la caractérisation de nanoparticules dans le cadre de cette étude sont :

- leur **taille** et leur **distribution** ;
- leur **forme** ;
- leur **état de dispersion** ;
- leur **composition de cœur et de surface**, le cas échéant (coquille).

K. Powers se base sur cinq grands critères pour la caractérisation de nanoparticules, qui ont ici été résumés en trois points [93]. Le premier repose sur le fait que l'échantillon prélevé sur la population de nanoparticules doit être **représentatif** du matériau dans sa globalité. Ainsi, un certain nombre de particules doit être compté (de 10 à 1000 particules ou plus) afin d'avoir une statistique la plus grande possible, notamment dans le cas de la mesure de la taille de celles-ci. La préparation d'échantillons est donc une étape fondamentale et cruciale dans l'analyse des données et ne doit pas être négligée [94]. Le deuxième critère recommande de qualifier (forme) ou quantifier (taille) les particules primaires dans un **état dispersé**. Enfin, le troisième conseille de caractériser, dans la mesure du possible, les nanoparticules seules et dans les conditions d'application et donc d'inclure le **milieu environnemental** de celles-ci. C'est pourquoi le ou les outils de caractérisation doi(ven)t être choisi(s) de façon pertinente selon l'application envisagée.

Bien que les outils de caractérisation physico-chimique des nano-objets soient très nombreux et performants, comme il sera vu dans le prochain paragraphe, il existe encore actuellement très peu de recherches concernant leur recyclage ou élimination après leur utilisation [95].

1.2.2 Comparaison des techniques de caractérisation

Les outils de nanocaractérisation peuvent être classés en deux grandes catégories : les méthodes **directes** regroupant les techniques d'imagerie ou **microscopies** et les méthodes **indirectes**, comme la **spectroscopie**, faisant appel à des calculs basés sur des modèles. Chaque catégorie est elle-même divisée en six ensembles selon la source d'énergie ou la technique utilisée [96] :

- optique ;
- électronique ;
- balayage ;
- photonique ;
- ionique et particulaire ;
- thermodynamique.

Ceux-ci étant très nombreux, ils n'ont pas tous été comparés. Seuls les plus pertinents de chaque catégorie pour la caractérisation de nanoparticules en milieux complexes ont été retenus.

1.2.2.1 Optique

Les microscopes optiques conventionnels ont l'avantage d'opérer à pression atmosphérique et donc de rendre possible l'analyse de matériaux aussi bien en milieux solides que liquides. Cependant, ils ont longtemps été mis de côté pour l'étude de nanoparticules du fait de leur faible résolution [97]. En effet, la plus petite distance δ pouvant être résolue est directement liée à la longueur d'onde λ du faisceau incident ainsi qu'à l'indice de réfraction μ et au semi angle de collection β de la lentille objective selon la théorie d'Abbe (Équation 1.3).

$$\delta = \frac{0,612 * \lambda}{\mu \sin(\beta)} \quad (1.3)$$

Ainsi, pour une longueur d'onde comprise dans le spectre de la lumière visible, c'est-à-dire entre 400 nm et 800 nm, il est complexe d'obtenir une résolution inférieure à 200 nm pour $\mu \sin(\beta)$ proche de 1. Avec ce type de microscope, seul le suivi de leur position est rendu possible, que ce soit par leur marquage via l'utilisation de la fluorescence ou bien par l'enveloppe formée par les rayons lumineux réfléchis sur leur surface, aussi appelée caustique (Figure 1.9.a) [98]. Il en est de même pour la microscopie en champ sombre combinée à de l'imagerie hyperspectrale [99]. Cependant, il a récemment été développé une technique, appelée TSOM (Through-Focus Scanning Optical Microscopy), permettant de mesurer les variations tridimensionnelles de taille de nanoparticules (résolution de l'ordre du nanomètre) grâce à l'analyse des signatures optiques d'images prises selon différentes positions focales (Figure 1.9.b) [100, 101]. L'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle nécessite au préalable de réaliser des courbes de calibration à partir de nanoparticules de dimensions connues et de même forme et composition que celles à analyser. D'autres microscopes optiques ont alors été développés comme les Microscopes Confocaux à Balayage Laser (CLSM, Confocal Laser Scanning Microscopy), utilisant cette fois pour source un laser plutôt qu'une lumière polychromatique. La résolution en est légèrement améliorée du fait d'une moindre diffusion du faisceau incident et la localisation des nanoparticules peut s'effectuer précisément grâce au marquage par fluorescence (Figure 1.10) [102, 103]. Toutefois, les microscopes optiques restent inefficaces pour caractériser la composition chimique de nanoparticules et la surface de matériaux transparents.

Pour ce qui est des techniques optiques indirectes, elles permettent généralement d'obtenir une distribution de taille des particules en utilisant la diffusion de la lumière, comme la Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS, Dynamic Light Scattering) ou encore la Diffusion de la Lumière sous Multiples Angles (MALS, Multi-Angle Light Scattering) [104, 105]. Une mesure de la stabilité des particules est également possible au travers de la mesure de leur potentiel zêta grâce à la DLS [106]. Bien que non destructive, cette technique impose certaines contraintes sur le matériau étudié. En effet, les nanoparticules analysées doivent être en suspension dans un liquide et monodispersées. De plus, la taille mesurée correspond au diamètre équivalent qui serait obtenu dans le cas de particules sphériques [107]. La forme de la particule n'est donc pas prise en compte dans le calcul de sa taille, ce qui n'est pas le cas

1.2. Outils pour la nanocaractérisation

pour le MALS. Enfin un dernier inconvénient est qu'aucune information sur la chimie des nanoparticules ne peut être mise en évidence par ces techniques.

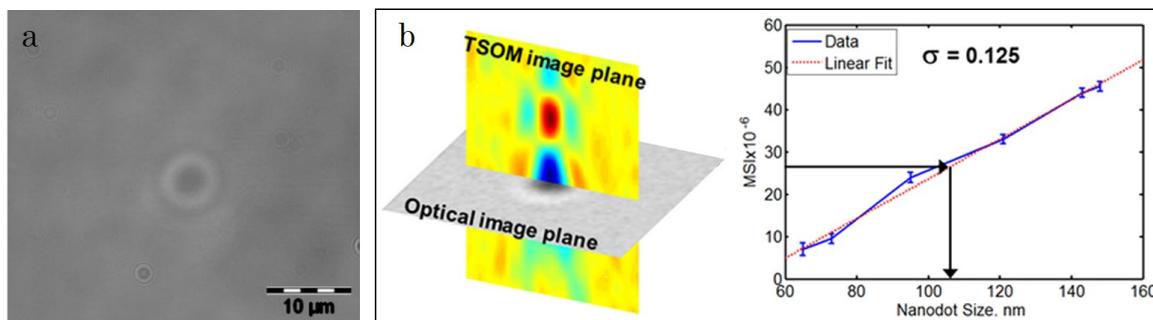


Figure 1.9 – (a) Caustiques obtenues pour des nanoparticules de silice de 50 nm de diamètre [98]. (b) Image TSOM obtenue pour un nanopoint de silicium et courbe de calibration permettant de déterminer la taille de ce dernier (flèches noires) [100].

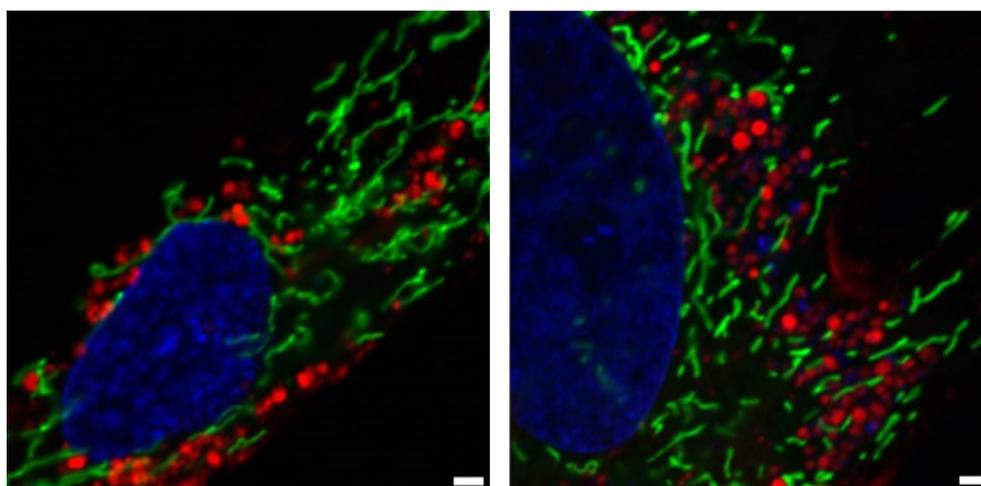


Figure 1.10 – Images de nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques (rouge) internalisées dans une cellule, obtenues par CLSM après marquage. Le noyau apparaît en bleu et les mitochondries en vert (Barre d'échelle = 2 μm) [103].

1.2.2.2 Électronique

Afin de se libérer des contraintes de résolution liées à la source lumineuse des microscopes optiques, des microscopes utilisant cette fois une **source d'électrons** ont été développés dans les années 1930 [108]. Il en existe deux grands types, à savoir les Microscopes Électroniques à Balayage (MEB ou SEM, Scanning Electron Microscopy) et les Microscopes Électroniques en Transmission (MET ou TEM, Transmission Electron Microscopy). Le MEB possède une tension d'accélération allant jusqu'à 30 kV et ne permet d'imager que la surface d'un échantillon donné (Figure 1.11.a). Tandis que dans le cas du MET, possédant une tension d'accélération généralement comprise entre 80 kV et 300 kV, il est possible de visualiser sa structure interne (Figure 1.11.b).

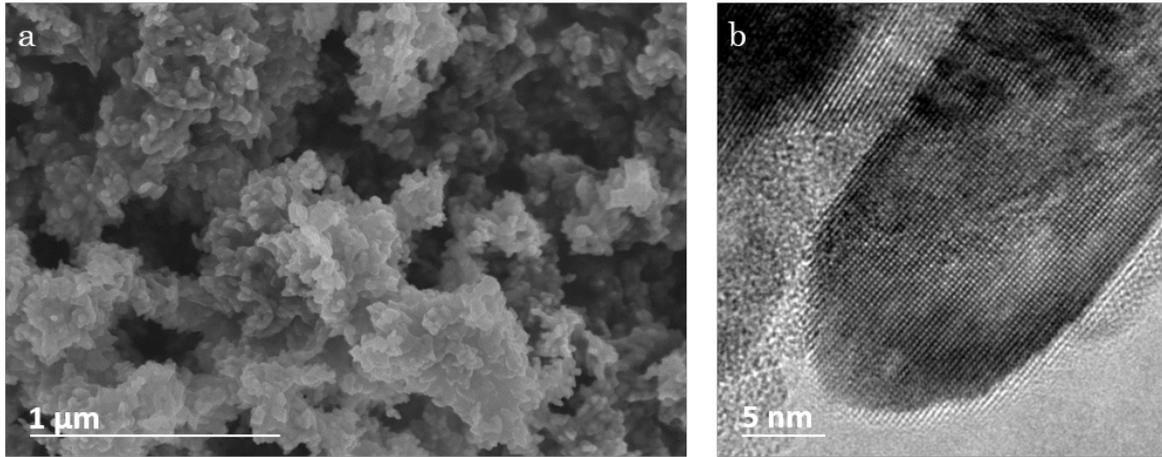


Figure 1.11 – Images MEB (a) et MET (b) de nanoparticules de TiO₂ rutile.

Selon la relation de De Broglie, la longueur d'onde λ d'un électron est donnée par (Équation 1.4) :

$$\lambda = \frac{h}{p} \quad (1.4)$$

où h est la constante de Planck et p la quantité de mouvement d'un électron. Soit, après avoir négligé les effets relativistes, (Équation 1.5) :

$$\lambda = \frac{h}{(2m_0E)^{1/2}} = \frac{hc}{(2m_0c^2)^{1/2} E^{1/2}} \quad (1.5)$$

où c est la vitesse de la lumière dans le vide, m_0 la masse d'un électron et E l'énergie apportée aux électrons pour les accélérer. Après approximation, la longueur d'onde d'un électron peut alors s'exprimer par (Équation 1.6) :

$$\lambda \sim \frac{1,22}{E^{1/2}} \quad (nm) \quad (1.6)$$

Ainsi, pour une tension d'accélération des électrons de 200 kV, la longueur d'onde d'un électron dans des conditions non relativistes est d'environ 3 pm, ce qui est largement inférieur à la longueur d'onde de la lumière du domaine visible. Ceci explique la possibilité d'obtenir des images Haute Résolution (HR) en Microscopie Électronique en Transmission, sachant que cette longueur d'onde est inférieure au rayon atomique. Les microscopes électroniques sont donc des instruments performants pour analyser la morphologie des nanoparticules ainsi que leur taille et dispersion, qu'elles soient en milieu solide ou hydraté. Cependant, dans le cas de milieux hydratés, il est nécessaire de mettre en place des modules complémentaires (platine ou porte-objet adéquats) du fait du vide poussé à l'intérieur de leur chambre d'analyse (jusqu'à 10^{-9} Pa dans un MET) [109, 110].

Ces microscopes sont bien souvent couplés à des techniques de spectroscopie comme la Spectroscopie X par Dispersion en Énergie (EDS, Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) ou encore la Spectroscopie des Pertes d'Énergie (EELS, Electron Energy Loss Spectroscopy),

1.2. Outils pour la nanocaractérisation

permettant d'analyser la composition chimique des matériaux étudiés [111, 112]. La structure cristalline de ces derniers peut également être étudiée grâce au phénomène de diffraction des électrons dans un MET [113]. L'inconvénient majeur de ce type de microscopie vient de la préparation d'échantillons qui peut être lourde et entraîner des artefacts lors de l'observation [114]. De plus, le nombre de particules analysées reste très inférieur à celui obtenu par DLS, par exemple, qui mesure plusieurs millions de particules, ce qui peut poser des problèmes d'échantillonnage. Enfin, notamment en ce qui concerne le MEB, celui-ci reste une technique d'analyse de surface. En effet, la structure interne d'un échantillon ne peut être observée sans passer par un mode où le faisceau est transmis ou mode STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy).

1.2.2.3 Balayage

D'autres techniques d'imagerie utilisant le **balayage** de la surface d'un échantillon à l'aide d'une sonde ont vu le jour des années plus tard, s'affranchissant cette fois de préparations d'échantillons lourdes, comme la Microscopie à Force Atomique ou AFM (Atomic Force Microscopy). Cette dernière permet de reconstruire une image 3D de l'échantillon à analyser en balayant la surface de celui-ci dans toutes les directions de l'espace [115]. Bien que la résolution latérale ne soit que de quelques nanomètres, la résolution verticale est quant à elle bien meilleure puisque de l'ordre de l'Angström, donnant ainsi accès à la taille, à la forme et à l'état de dispersion des particules. Un avantage majeur, comparé aux microscopes électroniques, est qu'un AFM ne nécessite pas de vide poussé et peut même réaliser des analyses sous pression atmosphérique. Il est donc possible d'étudier directement des échantillons hydratés ou en milieu liquide sans nécessité de modules complémentaires [116]. L'interaction de l'extrémité de la sonde avec les atomes de surface permet d'identifier les éléments chimiques en présence [117].

L'inconvénient de ce type de microscope vient majoritairement de la sonde, d'autant plus que son extrémité est particulièrement fragile. En effet, elle peut induire des artefacts de reconstruction qui doivent donc être pris en compte lors des mesures de taille de particules notamment ou encore pour l'analyse de surfaces fortement rugueuses (Figure 1.12) [118]. De plus, seule la surface des objets est analysée et l'acquisition des données peut prendre plusieurs minutes comparée à un MET où l'image est obtenue instantanément.

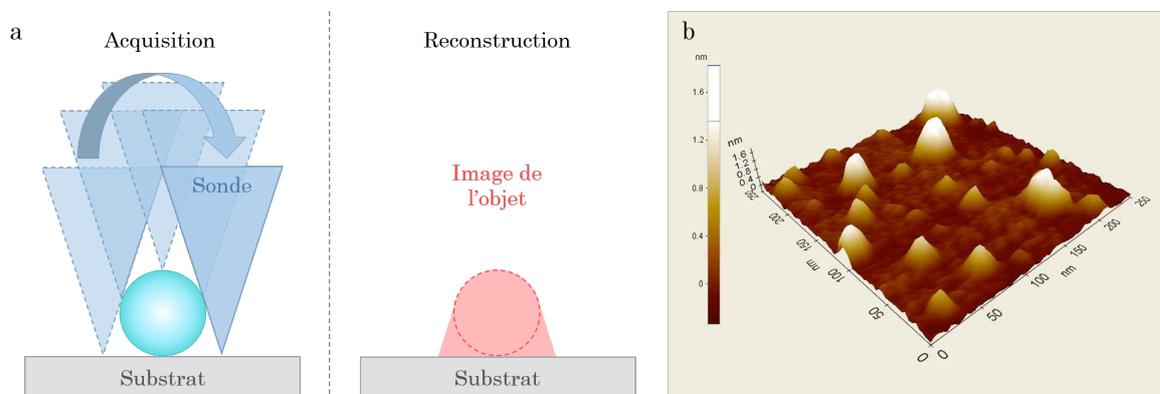


Figure 1.12 – (a) Analyse d'une particule par Microscopie à Force Atomique (AFM) et artefact de reconstruction. (b) Image AFM de nanoparticules d'argent de 20 à 40 nm de diamètre [119].

1.2.2.4 Photonique

Pour ce qui est des méthodes de caractérisation utilisant une **source de photons**, elles regroupent majoritairement des techniques indirectes. Leur principal inconvénient est qu'elles ne permettent pas d'avoir accès à la morphologie des matériaux étudiés, à quelques exceptions près comme La Diffusion des rayons X aux Petits Angles (SAXS, Small Angle X-rays Scattering) [120]. Cependant, une multitude d'autres paramètres sont accessibles comme la concentration des particules en solution, leur composition chimique ou encore leur dimension comme c'est le cas avec la spectroscopie Ultraviolet-Visible (UV-Vis) ou encore la Spectroscopie de Masse à Plasma à Couplage Inductif (ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy) qui possèdent une limite de détection assez sensible [58, 121]. L'ICP-MS présente également l'avantage d'être efficace sur des nanoparticules polydispersées en taille et de donner leur densité ainsi que leur degré de dissolution [122]. Elle est toutefois uniquement adaptée pour l'analyse de nanoparticules sphériques (diamètre équivalent) et non poreuses, en suspension dans un milieu liquide [123]. La sensibilité de son seuil de détection est également directement liée à l'élément analysé. Pour ce qui est de la spectroscopie UV-Visible, des artefacts de mesure peuvent survenir si les miroirs de l'appareil sont souillés et il est nécessaire d'établir des courbes d'étalonnage pour chaque matériau à analyser ce qui prolonge considérablement le temps d'acquisition des données (Figure 1.13). Enfin, en ce qui concerne le SAXS, bien que non destructive, elle reste une technique lourde à mettre en place puisqu'utilisant une source synchrotron et requiert une forte concentration particulaire [124].

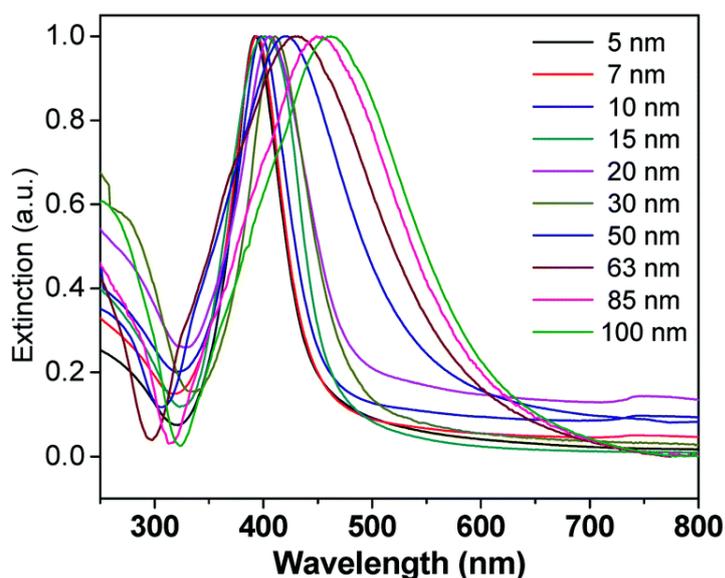


Figure 1.13 – Spectres d'absorption UV-Visible de nanoparticules d'argent de différentes tailles [125].

1.2.2.5 Ionique et particulaire

Enfin pour ce qui est des techniques **ioniques et particulaires**, il en existe peu. Elles comptent notamment la Spectrométrie de Masse des Ions Secondaires à Temps de Vol (ToF-SIMS, Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry). Elle consiste à analyser les ions

1.2. Outils pour la nanocaractérisation

secondaires d'un échantillon après qu'ils aient été éjectés de la surface suite à son bombardement par des faisceaux d'ions primaires et d'abrasion. Les ions analysés donnent alors accès à la composition chimique en surface de l'échantillon mais aussi en profondeur de manière précise du fait du seuil de détection très élevé (ppm à ppb) [126]. Le ToF-SIMS, en plus d'être un spectromètre, est aussi un microscope puisque les ions secondaires émis permettent de générer des images. Cependant, la résolution latérale n'excède pas 50 nm. Du fait de son fonctionnement, cette technique est réservée aux échantillons solides et nécessite un vide poussé. Ainsi, pour étudier des échantillons biologiques hydratés, il est nécessaire qu'ils soient cryofixés pour préserver leur structure et une platine cryogénique doit être mise en place dans la chambre d'analyse [127].

1.2.2.6 Étude comparative

Les méthodes d'analyse **thermodynamiques** ont volontairement été passées sous silence étant très rarement utilisées dans la caractérisation de nanoparticules en suspension.

Un tableau récapitulatif des gammes de taille mesurables, avantages et inconvénients de chaque technique citée précédemment est disponible ci-après (Tableau 1.4) [128, 93, 16]. Il apparaît que le MET, avec les techniques spectroscopiques qui lui sont associées, remplit tous les critères de caractérisation demandés pour cette étude, bien que l'échantillon ne puisse être récupéré après l'acquisition des données (Tableau 1.5). Cependant, elle ne peut être utilisée seule pour caractériser une suspension de nanoparticules, notamment en ce qui concerne leur taille pour des raisons de statistiques [15]. Les résultats obtenus doivent donc être corrélés avec d'autres instruments comme la DLS ou encore l'ICP-MS. Or l'inconvénient majeur de ceux-ci est qu'ils sont réservés à l'étude de particules monodispersées car, bien souvent, les particules les plus petites sont masquées par les plus grosses lors de leur détection. C'est pourquoi, il est nécessaire d'utiliser des systèmes de séparation des nanoparticules avant leur détection selon leur taille, ce qui améliore grandement la résolution des détecteurs [129, 130]. La plus utilisée est le Fractionnement par couplage Flux-Force (FFF, Field Flow Fractionation) [131, 132]. D'autres méthodes de séparation existent comme la Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC, Size Exclusion Chromatography) ou encore la Sédimentation Centrifuge (DCS, Differential Centrifugal Sedimentation), plutôt réservée aux particules dites « dures », les particules molles, telles les émulsions lipidiques, pouvant être déstabilisées par centrifugation [133, 134, 135]. Un autre point important dans le choix des outils de nanocaractérisation est l'état de l'échantillon [15]. En effet, si celui-ci est en phase liquide ou hydraté, il convient de rester dans cet état pour sa caractérisation afin de limiter tout artefact de mesure lié à son séchage comme une agglomération des particules [136]. Enfin, selon l'outil utilisé, il est essentiel de comprendre ce qui est réellement mesuré lorsqu'il est question de taille de particule (Chapitre 1.2.3).

Tableau 1.4 – Gamme de tailles mesurables, applications, avantages et limites de différentes techniques de nanocaractérisation ^a.

Catégorie	Technique	Gamme	Applications et avantages	Limites
Optique	Microscope confocal à balayage laser (CLSM)	50 nm - plusieurs microns	Analyses semi-quantitatives (dimensions 2D) et qualitatives (localisation des nanoparticules) de milieux liquides ou solides Atmosphère et température contrôlées (échantillon hydraté) Marquage (fluorescence)	Faible résolution Pas d'analyse chimique possible Analyse de surface uniquement pour des matériaux opaques Nécessité de traiter les signatures optiques des images pour avoir accès à la taille de petites nanoparticules
	Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	0,3 nm - 10 µm	Analyse quantitative (distribution de taille) de milieux liquides Mesure du potentiel zêta (stabilité des suspensions colloïdales) Non destructive Grande statistique	Particules monodispersées Milieux liquides uniquement Aucune information sur la chimie des particules Particules sphériques, pas d'accès à leur structure
	Diffusion de la lumière sous multiples angles (MALS)	10 nm - 1 µm	Analyse quantitative (distribution de taille) de milieux liquides Modèle géométrique des particules Grande statistique	Milieux liquides uniquement Aucune information sur la chimie des particules Nécessité d'un volume d'analyse (1 mL) assez important contrairement à d'autres techniques

^a. Suite du tableau pages 27 et 28

1.2. Outils pour la nanocaractérisation

Catégorie	Technique	Gamme	Applications et avantages	Limites
Électronique	Microscopie électronique en transmission (MET)	0,08 nm - plusieurs microns	Analyses semi-quantitatives (distribution de taille et composition chimique) et qualitatives (structure interne (2D, 3D) et dispersion) de milieux solides et hydratés Haute résolution (résolution atomique) Contrastes de diffraction et de masse atomique	Vide poussé (détérioration des échantillons hydratés) Petit volume d'analyse (problème de statistique) Préparation d'échantillons adéquate souvent lourde Artefacts de préparation d'échantillons Stabilité du matériau sous le faisceau
	Microscopie électronique à balayage (MEB)	0,4 nm - plusieurs millimètres	Analyses semi-quantitatives (distribution de taille et composition chimique) et qualitatives (surface (3D) et dispersion) de milieux hydratés ou solides Vide et humidité contrôlés (échantillons hydratés ou isolants) Bonne profondeur de champ Bonne résolution	Taille échantillon Échantillon conducteur requis Analyse de surface uniquement Artefacts de préparation d'échantillons Attaque chimique (révélation de la microstructure)
Balayage	Microscopie à force atomique (AFM)	1 nm - plusieurs microns	Analyses quantitatives (distribution de taille) et qualitatives (structure (3D), dispersion et composition chimique) de milieux liquides ou solides Résolution spatiale élevée Imagerie d'échantillons conducteurs ou isolants et hydratés	Artefacts dus à la pointe Vitesse de balayage lente Analyse de surface uniquement Problèmes de mesure pour les surfaces extrêmement rugueuses

Catégorie	Technique	Gamme	Applications et avantages	Limites
Photonique	Spectroscopie ultraviolet-visible (UV-Vis)	5 nm - 100 nm	Analyses quantitatives (composition chimique, concentration en particules et dimensions) de milieux liquides, gazeux ou solides Seuil de détection élevé	Artefacts de mesure (miroir souillé) Nécessité d'établir des courbes d'étalonnage pour chaque matériau à étudier
	Spectroscopie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS)	1 nm - 200 nm	Analyses quantitatives (distribution de taille (mode Single Particle), concentration massique, composition chimique, densité et degré de dissolution) de milieux liquides	Analyse de milieux liquides Limite de détection dépend de l'élément analysé Réservée aux particules sphériques et non poreuses
	Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)	1 nm - 1 µm	Analyses quantitatives (distribution de taille) et qualitatives (structure) de milieux solides et liquides Non destructive	Technique lourde (source synchrotron) Forte concentration particulaire requise
Ionique	Spectrométrie de masse des ions secondaires à temps de vol (ToF-SIMS)	50 nm - plusieurs microns	Analyses quantitatives (composition chimique) et qualitatives (structure 2D et 3D) de milieux solides Seuil de détection très élevé (ppm à ppb)	Résolution latérale limitée Vide poussé (détérioration des échantillons hydratés)

1.2. Outils pour la nanocaractérisation

Tableau 1.5 – Propriétés physico-chimiques quantifiables ou qualifiables pour différents outils de nanocaractérisation.

Outils	Taille des particules	Morphologie	État de dispersion	Composition	Non destructif
CLSM	✓		✓		
DLS	✓		✓		✓
MALS	✓		✓		✓
MET	✓	✓	✓	✓	
MEB	✓	✓	✓	✓	
AFM	✓	✓	✓	✓	✓
UV-Vis	✓			✓	✓
ICP-MS	✓			✓	
SAXS	✓	✓			✓
ToF-SIMS		✓		✓	

1.2.3 Analyse des données

Pour un paramètre physico-chimique donné, notamment en ce qui concerne la morphologie et la taille des particules, une attention particulière doit être portée à la corrélation des données entre elles selon les techniques de caractérisation employées.

La morphologie des particules a un impact direct sur la mesure de taille de celles-ci, d'autant plus si elles ne sont pas sphériques. En effet, dans le cas de particules sphériques et homogènes, leur taille est définie par une valeur unique : leur diamètre. Or, dans le cas de formes plus complexes, la question à se poser est de savoir comment la mesure est définie pour chaque équipement. Est-ce une projection verticale (L_v) et horizontale (L_h) ? S'agit-il de l'exo-diamètre, aussi appelé diamètre de Feret (D_f), c'est-à-dire la plus grande distance entre deux droites parallèles et tangentes à l'objet et qui incluent celui-ci dans son intégralité ? Du diamètre équivalent pour une sphère de même densité [137] ? Ou encore du diamètre équivalent pour un disque de même aire (D_a) ou de même périmètre (D_p) que la particule ? Il existe donc une multitude de manières de décrire la taille d'une particule de forme quelconque (Figure 1.14). Pour corréler les résultats entre les différentes techniques de caractérisation, il faut donc choisir, dans la mesure du possible, les mêmes descripteurs de taille.

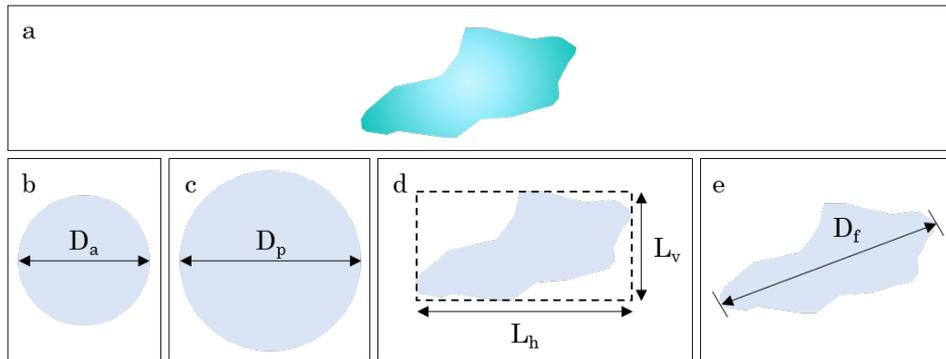


Figure 1.14 – Descripteurs de taille pour une particule de forme complexe (a). (b) Diamètre équivalent pour un disque de même aire que la particule (a). (c) Diamètre équivalent pour un disque de même périmètre que la particule (a). (d) Projection verticale et horizontale. (e) Diamètre de Feret.

Selon les techniques de caractérisation utilisées, il est possible de réaliser des Distributions en Taille des Particules (PSD, Particle Size Distribution) vis à vis du nombre de particules comptées. Deux particules n'ayant jamais exactement les mêmes dimensions, il est important de regrouper les tailles de particules selon des intervalles (aussi appelés binning) [138]. Ces intervalles doivent être adaptés à la largeur de la distribution au risque de masquer certaines données, si les intervalles ont une valeur trop importante, et donc de fausser les interprétations graphiques (Figure 1.15).

La PSD donne également d'autres indications, notamment lorsqu'elle est représentée avec sa courbe cumulative correspondante, à savoir (Figure 1.16) :

- la valeur médiane ou d_{50} qui correspond à la taille pour laquelle 50% des particules ont une taille inférieure à cette valeur ;
- la valeur moyenne \bar{X} ;
- le mode x_m qui est la taille la plus représentée ;

1.2. Outils pour la nanocaractérisation

- l'écart-type s qui est un estimateur de la largeur de la distribution ;
- les quartiles (d_{25} et d_{75}) et déciles (notamment d_{10} et d_{90}) permettant de séparer des groupes de particules de même effectif.

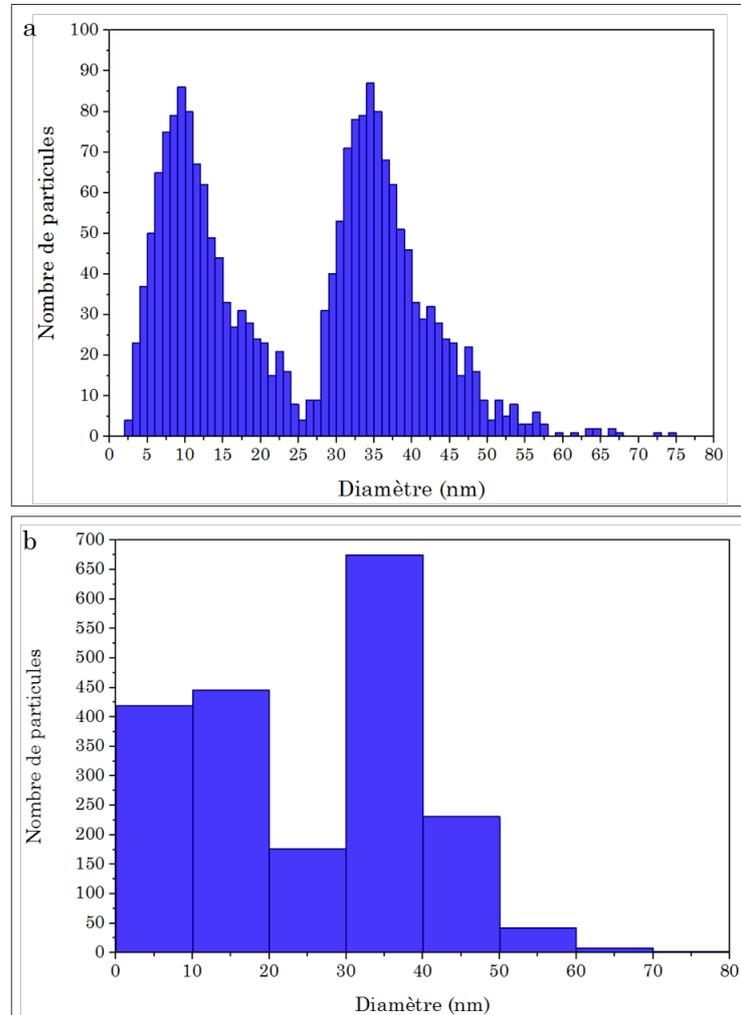


Figure 1.15 – Distribution en taille de nanoparticules avec des intervalles de 1 nm (a) et 10 nm (b).

Afin d'améliorer la précision des données obtenues, celles-ci, après avoir été binnées, peuvent être interpolées par une loi log-normale qui est particulièrement adaptée pour des nanoparticules de petites tailles [139, 140]. Elle admet pour densité de probabilité la fonction f suivante (Équation 1.7) :

$$f(x; \mu, \sigma) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}x\sigma} \exp\left(-\frac{(\ln x - \mu)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (1.7)$$

où $x > 0$ et μ et σ sont respectivement la moyenne (ou espérance) et l'écart-type du logarithme de la variable. Ainsi, la médiane (Équation 1.8), la moyenne (Équation 1.9), le mode (Équation 1.10) et l'écart-type (Équation 1.11) pour cette loi sont respectivement donnés par les relations suivantes [141] :

$$d_{50} = \exp(\mu) \quad (1.8)$$

$$\bar{X} = \exp\left(\mu + \frac{\sigma^2}{2}\right) \quad (1.9)$$

$$x_m = \exp(\mu - \sigma^2) \quad (1.10)$$

$$s = \sqrt{(\exp(\sigma^2) - 1) \exp(2\mu + \sigma^2)} \quad (1.11)$$

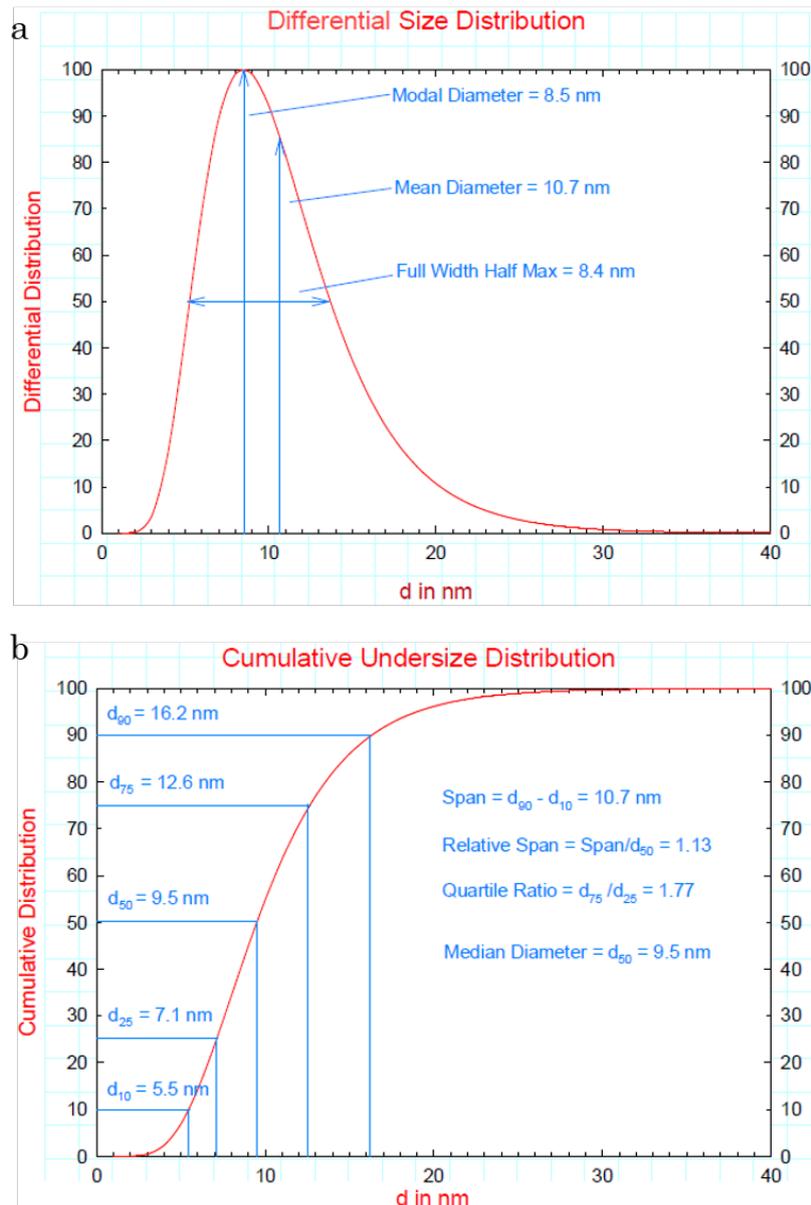


Figure 1.16 – Exemple d’une distribution en taille de nanoparticules (a) et courbe cumulative correspondante (b) [142].

Au vu de la multitude de manières de caractériser une taille de particule, il est donc d’une importance fondamentale pour la corrélation des données de choisir soigneusement celle-ci.

1.2. Outils pour la nanocaractérisation

1.2.4 Bilan

Au cours de cette section ont été comparés différents outils de caractérisation adaptés à l'analyse de nanoparticules en suspension, ceci dans un objectif de nanosécurité. Les caractérisations effectuées pour cette étude se sont majoritairement concentrées sur les étapes d'élaboration et d'utilisation des nanoparticules. Ainsi, quatre critères d'analyse ont été retenus, à savoir la taille des particules, leur forme, leur état de dispersion et enfin leur composition.

Les trois techniques de caractérisation qui ont été retenues sont les plus communément utilisées pour l'analyse de nanoparticules en suspension (Figure 1.17). Tout d'abord, la Microscopie Électronique en Transmission (MET) puisqu'elle permet d'avoir accès à tous les paramètres définis ici pour caractériser une suspension de nanoparticules. Cependant, elle ne peut se suffire à elle-même et doit être complétée avec d'autres techniques d'un point de vue statistique. Ainsi, deux techniques de diffusion de la lumière ont été retenues à savoir la Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS) et la Diffusion de la Lumière sous Multiples Angles (MALS) sans (mode batch) et avec une technique de séparation (mode on-line) qu'est le Fractionnement par couplage Flux-Force (FFF). Il conviendra pour ces trois techniques de prêter une attention particulière au type de taille mesurée par ces instruments afin que les résultats puissent être corrélés. Les résultats pourront être ajustés par une loi log-normale particulièrement adaptée à l'étude de nanoparticules en suspension.

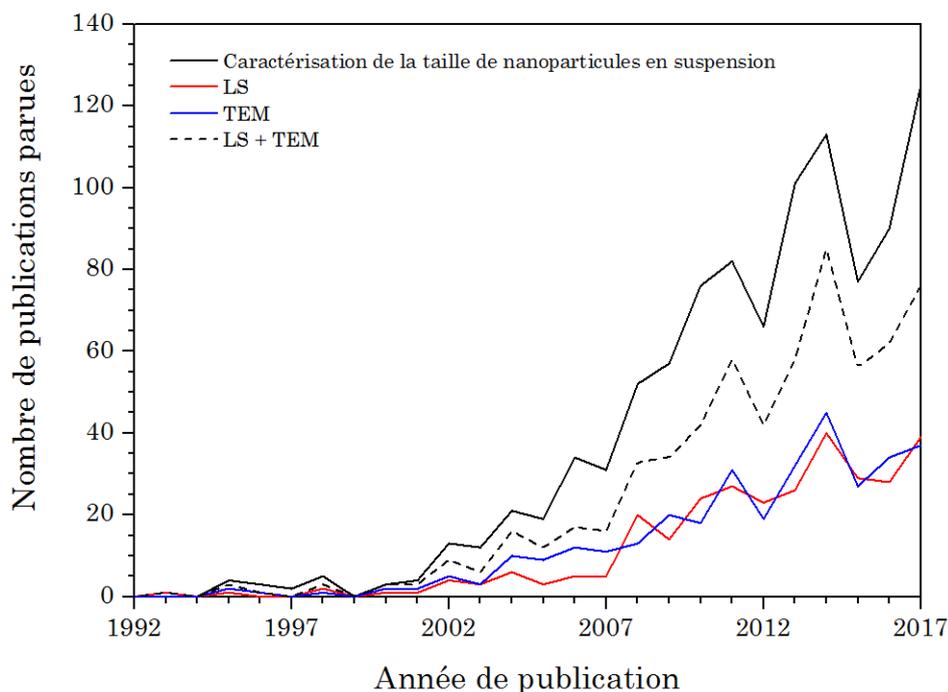


Figure 1.17 – Évolution du nombre de publications concernant la caractérisation de la taille de nanoparticules en suspension entre 1992 et 2017 notamment par diffusion de la lumière (LS) et par MET (source Scopus).

Techniques expérimentales

Sommaire

2.1	Diffusion de la lumière	36
2.1.1	Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS)	37
2.1.2	Diffusion Statique de la Lumière - Exemple de la diffusion sous multiples angles (MASLS ou MALS)	39
2.1.3	Modes de fonctionnement	41
2.1.3.1	Mode « batch »	41
2.1.3.2	Mode « on-line »	42
2.2	Microscopie Électronique en Transmission (MET)	43
2.2.1	Modes de fonctionnement	43
2.2.1.1	Mode MET	44
2.2.1.2	Mode STEM et analyses chimiques	46
2.2.1.3	Tomographie et reconstruction	51
2.2.1.4	Conditions expérimentales	53
2.2.2	Préparation d'échantillons	53
2.2.2.1	Voie sèche	54
2.2.2.2	Cryo-microscopie	55
2.2.2.3	<i>In-situ</i> liquide	60
2.3	Applications	61

Ce chapitre met en avant les différents outils de caractérisation utilisés pour cette étude à savoir la Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS), la Diffusion de la Lumière sous Multiples Angles (MALS) et la Microscopie Électronique en Transmission (MET). Les différentes techniques de préparation de suspensions colloïdales nanoparticulaires en vue de leur observation et analyse par MET ont notamment été détaillées.

2.1 Diffusion de la lumière

Cette section s'est largement inspirée d'un livre de Stepan Podzimek [143].

La diffusion de la lumière (LS, Light Scattering) est une technique d'analyse communément utilisée pour la caractérisation de la taille de nanoparticules en suspension [144]. Elle repose sur l'interaction entre une source lumineuse monochromatique cohérente, ou LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation), et la matière en suspension à étudier. Dans le cas de nanoparticules, leur taille (≤ 100 nm) étant largement inférieure à la longueur d'onde du laser utilisé, comprise généralement entre 400 nm et 800 nm, il est alors question de diffusion de Rayleigh, cas particulier de la diffusion de Mie [145]. Dans le cas où l'énergie de l'onde lumineuse diffusée est la même que celle de l'onde incidente, il est question de diffusion élastique de la lumière et la longueur d'onde reste inchangée. Lorsque le faisceau incident interagit avec une particule, celui-ci est diffusé dans toutes les directions de l'espace. Ainsi, l'intensité de l'onde diffusée par une particule peut ensuite être mesurée soit par un seul détecteur placé selon un angle θ fixe, soit par plusieurs détecteurs positionnés selon différents angles fixes ou encore soit par un détecteur positionné selon un angle variable sur une platine goniométrique (Figure 2.1) [146].

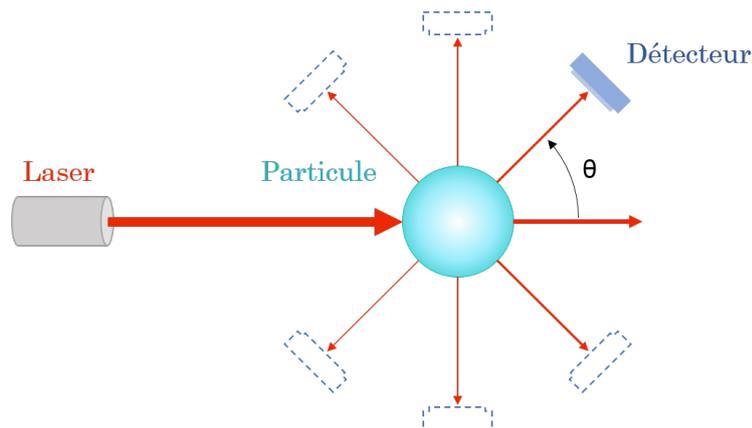


Figure 2.1 – Schéma de principe de la diffusion de la lumière.

Il existe trois types de diffusion de la lumière à savoir :

- la diffusion **dynamique** (Chapitre 2.1.1) ;
- la diffusion **statique** (Chapitre 2.1.2) ;
- la diffusion **Raman** qui ne sera pas ici étudiée car, contrairement aux deux autres types de diffusion de la lumière, la longueur d'onde du faisceau diffusé est différente de celle du faisceau incident.

La différence fondamentale entre la diffusion dynamique et statique de la lumière vient de l'acquisition et de l'interprétation des données. En effet, dans le cas de la diffusion dynamique, ce sont les fluctuations d'intensité de la lumière diffusée au cours d'un laps de temps relativement court qui sont enregistrées. Tandis que dans le cas de la diffusion statique, l'intensité de la lumière diffusée est moyennée sur une période de temps beaucoup plus longue (Figure 2.2).

2.1. Diffusion de la lumière

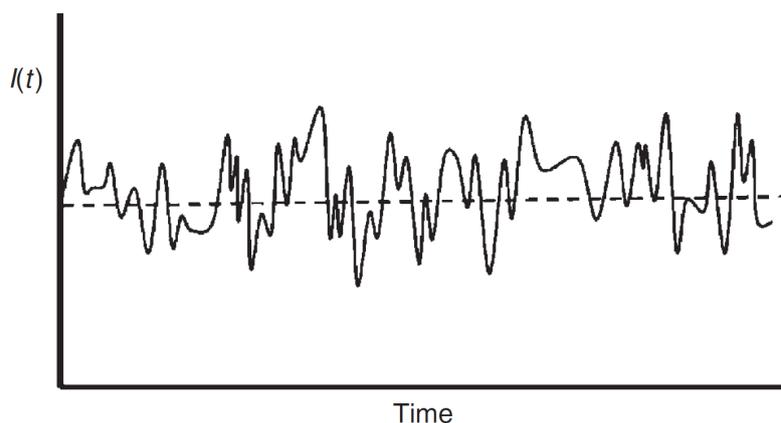


Figure 2.2 – Représentation d’une acquisition de données dans le cas de la diffusion statique (ligne pointillée) et dynamique (trait plein) de la lumière après interaction avec de la matière [143].

2.1.1 Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS)

La Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS) est aussi connue sous le nom de Spectroscopie par Corrélation de Photons ou PCS (Photon Correlation Spectroscopy) et Diffusion Quasi-Élastique de la Lumière ou QELS (Quasi-Elastic Light Scattering) [146]. Elle repose sur le **mouvement Brownien** des particules, c’est-à-dire leur agitation thermique [147]. En effet, des nanoparticules, lorsqu’elles sont en suspension, sont soumises à des mouvements aléatoires et rentrent en collision les unes avec les autres (Figure 2.3) [148]. La position des particules fluctuant au cours du temps, il en est de même pour l’intensité du faisceau de lumière diffusé. Or, plus une particule est grosse, plus elle se meut lentement et donc plus l’intensité du faisceau diffusé fluctue lentement également. Ainsi, l’intensité mesurée par le/les détecteur(s) est intimement liée à la taille des particules en suspension [143]. Il est possible de « convertir » cette intensité en nombre afin d’estimer le pourcentage de particules mesurées pour chaque taille. Or, cette conversion nécessite d’émettre plusieurs hypothèses concernant la forme ainsi que la dispersion des particules [149]. De plus, elle requiert de connaître l’absorption ainsi que l’indice de réfraction des particules analysées, souvent basés sur la littérature. C’est pourquoi il est préférable d’interpréter directement les données issues de l’intensité de la lumière diffusée.

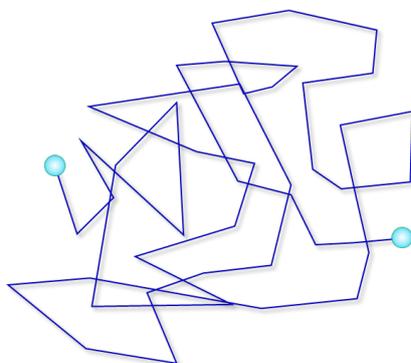


Figure 2.3 – Représentation du mouvement Brownien d’une particule.

La taille des particules est obtenue de façon indirecte grâce à la fonction d'autocorrélation normalisée qui, pour un échantillon monodisperse et une période de temps τ donnée, s'écrit (Équation 2.1) :

$$g(\tau) = 1 + \beta \exp(-2D\mu^2\tau) \quad (2.1)$$

où D est le coefficient de diffusion des particules, β l'amplitude du signal et μ est une constante dépendant de la longueur d'onde du faisceau laser λ et de l'angle de détection θ (Équation 2.2) :

$$\mu = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta/2) \quad (2.2)$$

Ainsi, grâce à l'analyse de la fonction d'autocorrélation, il est possible de déterminer le coefficient de diffusion D des nanoparticules et donc d'obtenir le diamètre D_h de celles-ci par la relation de Stokes-Einstein (Équation 2.3) :

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (2.3)$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T la température de l'échantillon et η la viscosité de la suspension. Le diamètre obtenu est dit « **hydrodynamique** » pour deux raisons. Tout d'abord, pour ce qui est de la partie *dynamique*, il s'agit du diamètre qu'aurait une sphère de même coefficient de diffusion que les particules considérées [150]. Le terme *hydro* prend quant à lui en compte la couche de solvatation formée par les molécules de solvant autour de la particule analysée (Figure 2.4). La taille des particules est donc très légèrement surestimée.

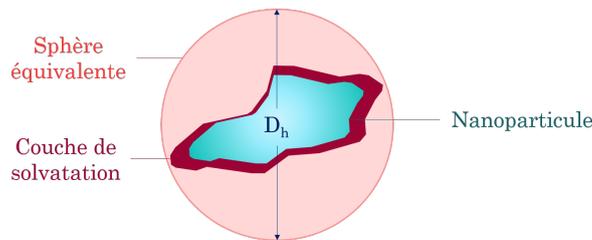


Figure 2.4 – Représentation du diamètre hydrodynamique d'une particule de forme quelconque.

Le diamètre hydrodynamique moyen des particules est normalement calculé en utilisant la méthode des cumulants, il s'agit du *z-average* [147]. Pour ce qui est du mode, il est lui obtenu à partir de l'interpolation de la fonction de corrélation, issue de l'analyse de la distribution de taille. Afin de pouvoir comparer ces valeurs de manière cohérente, il a ici été choisi de déterminer le diamètre hydrodynamique moyen des particules en utilisant directement l'analyse de la distribution de taille obtenue par DLS. De cette façon, il est également possible de déterminer l'écart-type de la population de particules. Un autre indicateur de l'hétérogénéité de la taille des particules est l'indice de polydispersité (PDI, PolyDispersity Index), également obtenu par DLS. Plus sa valeur est élevée, plus la population de particules tend à être polydisperse et donc plus large sera la distribution de taille obtenue (Tableau 2.1) [151].

2.1. Diffusion de la lumière

Tableau 2.1 – Interprétation de la valeur de l'indice de polydispersité pour une suspension de nanoparticules [151].

PDI	Interprétation
< 0,05	Monodisperse (échantillon standard)
0,05 à 0,08	Proche de la monodispersité
0,08 à 0,7	Polydisperse avec une plus ou moins large distribution de taille
> 0,7	Polydisperse avec une très large distribution de taille

Avant analyse des particules, il peut parfois être nécessaire de mettre ces dernières dans un bain à ultrasons afin de limiter leur agglomération due au mouvement Brownien de celles-ci [106].

Bien que la DLS soit une technique possédant une large gamme de tailles mesurables (0,3 nm à 10 μm) et une sensibilité élevée, elle reste uniquement adaptée pour des particules **monodisperses** et **sphériques** au vu de son fonctionnement. En effet, pour ce qui est des particules polydispersées, les signaux de faibles amplitudes peuvent être masqués par celui de plus forte amplitude, entraînant donc des artefacts de mesure [107]. De même, la largeur de la distribution de taille obtenue peut être bien plus grande que celle obtenue par d'autres méthodes et être surestimée [152]. C'est pourquoi, il convient de comparer les mesures de tailles obtenues avec d'autres techniques de caractérisation.

Dans le cadre de cette étude, les mesures par DLS ont été réalisées sur des Zetasizer Nano ZS et ZSP (Malvern Instruments Ltd.) comprenant tous les deux des analyseurs à deux angles. La différence principale entre les deux équipements vient de leur sensibilité, mais cette dernière restant mineure elle ne rentre pas ici en compte. La distribution en intensité a été préférée à celle en nombre (Annexe A).

2.1.2 Diffusion Statique de la Lumière - Exemple de la diffusion sous multiples angles (MASLS ou MALS)

Pour ce qui est de la Diffusion Statique de la Lumière ou SLS (Static Light Scattering), elle repose principalement sur un développement de la théorie de **Rayleigh-Debye-Gans** [153]. Ainsi, l'intensité du faisceau diffusé est liée aux paramètres des nanoparticules à analyser selon l'équation suivante (Équation 2.4) :

$$\frac{KC}{R(\theta)} = \frac{1}{MP(\theta)} + 2A_2C \quad (2.4)$$

avec :

- C la concentration en masse des nanoparticules ;
- M la masse moléculaire des nanoparticules ;
- A_2 le second coefficient du viriel (dont l'équation est utilisée pour décrire le comportement des fluides) ;

- K une constante optique dépendant des paramètres du laser et du système à étudier (Équation 2.5) ;
- $R(\theta)$ le quotient de Rayleigh, proportionnel à l'intensité du faisceau diffusé (Équation 2.6) ;
- $P(\theta)$ le facteur de diffusion de la particule, lié à la taille de celle-ci (Équation 2.7).

$$K = \frac{(2\pi n_0)^2 \left(\frac{dn}{dC}\right)^2}{N_A \lambda^4} \quad (2.5)$$

où n_0 est l'indice de réfraction du solvant entourant les particules, dn/dC est l'incrément d'indice de réfraction des nanoparticules en solution, N_A est la constante d'Avogadro et λ la longueur d'onde du faisceau laser.

$$R(\theta) = \frac{I_{diff}}{I_{laser}} \cdot \frac{a^2}{V_{diff}(\theta)} \quad (2.6)$$

avec I_{diff} et I_{laser} les intensités des faisceaux diffusé et incident respectivement, a la distance entre le volume d'étude et le/les détecteur(s) et $V_{diff}(\theta)$ le volume de solution à analyser.

$$\lim_{\theta \rightarrow 0} \frac{1}{P(\theta)} = 1 + \frac{\mu^2}{3} R_g^2 \quad (2.7)$$

avec R_g le rayon de giration des particules et μ le vecteur de diffusion défini par (Équation 2.8) :

$$\mu = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin(\theta/2) \quad (2.8)$$

De ce fait, en traçant $KC/R(\theta)$ en fonction de $\sin^2(\theta/2)$, il est possible d'avoir accès à la masse moléculaire M des particules qui correspond à l'ordonnée à l'origine du graphique obtenu. De même, il est possible d'obtenir leur **rayon de giration** qui correspond, quant à lui, à la pente (Figure 2.5.b). Ce dernier est différent du diamètre hydrodynamique puisque l'environnement de la particule, comme la couche de solvation, n'est pas pris en compte. Il peut être défini comme la taille de la particule pondérée par sa distribution en masse depuis son centre d'inertie (Équation 2.9) (Figure 2.5.a) [154, 155].

$$R_g^2 = \frac{1}{m} \sum_i r_i^2 m_i \quad (2.9)$$

où r_i est la distance entre l'élément m_i et le centre de masse de la particule de masse totale m .

L'avantage de la diffusion statique de la lumière est que le rayon de giration obtenu peut prendre en compte la **forme des particules**, que ce soit des bâtonnets de longueur L (Équation 2.10) ou des sphères de rayon R creuses (coquille uniquement) (Équation 2.11) ou compactes (Équation 2.12). Cependant, elle reste inefficace pour caractériser des nanoparticules dont la taille est inférieure à 10 nm.

$$\text{Bâtonnet :} \quad R_g = \frac{L}{2\sqrt{3}} \quad (2.10)$$

2.1. Diffusion de la lumière

$$\text{Sphère creuse : } R_g = R \quad (2.11)$$

$$\text{Sphère compacte : } R_g = \sqrt{\frac{3}{5}} R \quad (2.12)$$

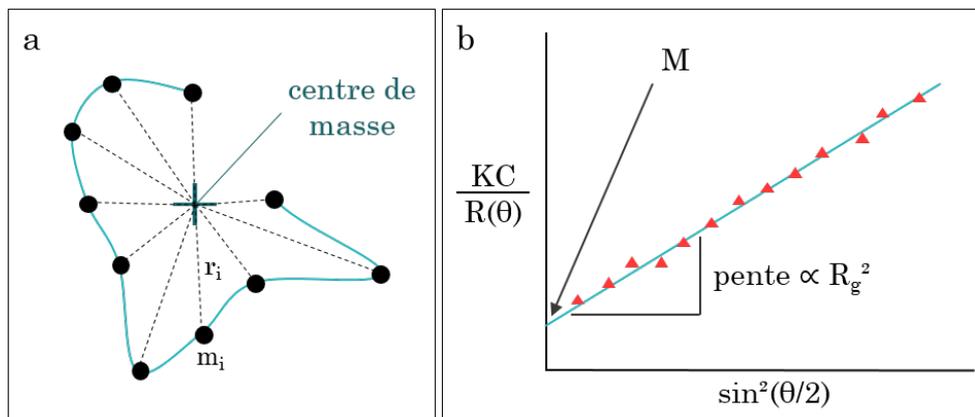


Figure 2.5 – (a) Représentation d’une nanoparticule pour le calcul de son rayon de giration. (b) Méthode d’obtention de la masse molaire et du rayon de giration par détermination graphique.

L’équipement employé pour cette étude, le Dawn Heleos II (Wyatt Technology), utilise la Diffusion Statique de la Lumière sous Multiples Angles ou MALS (Multi-Angle Light Scattering). Il est composé de 18 photodétecteurs, ce qui permet d’améliorer grandement la résolution des distributions de tailles de particules obtenues [105].

2.1.3 Modes de fonctionnement

Que ce soit pour la SLS ou la DLS, il existe deux modes de fonctionnement à savoir le mode dit « batch » et le mode dit « on-line ».

2.1.3.1 Mode « batch »

Pour ce qui est du mode « batch », il consiste à analyser les particules telles quelles en les plaçant dans une cuve pour la DLS ou en les injectant directement dans le système de détection pour le MALS, ce qui requiert quelques **dizaines de microlitres** de suspension. Il n’y a donc aucune préparation d’échantillons requise si ce n’est une étape de dilution avant analyse des particules.

L’avantage majeur de cette méthode est la **vitesse d’acquisition** des résultats qui est très rapide. Elle se révèle donc très efficace lorsqu’il y a de nombreux lots à caractériser.

Cependant, que ce soit pour la SLS ou bien la DLS, les grosses particules peuvent masquer les plus petites lors des mesures et donc biaiser les résultats obtenus concernant la taille des particules. Ainsi, elle se révèle efficace seulement pour des **particules monodispersées**.

2.1.3.2 Mode « on-line »

Afin de limiter ces effets de masquage des petites particules par les plus grosses, il est possible de connecter un appareil en amont de leur détection afin de les ségréger selon leur taille. Ainsi, au lieu de détecter toutes les particules d'un coup, celles-ci seront détectées petit à petit selon leur taille. Plusieurs **systèmes de ségrégation** existent comme la Chromatographie d'Exclusion Stérique ou SEC (Size Exclusion Chromatography) ou encore le **Fractionnement d'Écoulement de Champ par Écoulement Asymétrique**, ou AF4 (Assymetric Flow Field-Flow Fractionation) [143]. C'est ce dernier qui a ici été étudié.

L'AF4 utilise un système de Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance ou HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) couplé à un régulateur de débit. Ce dernier est composé d'un canal d'épaisseur contrôlée dans lequel la suspension de nanoparticules, une fois injectée, est soumise à un flux primaire. La suspension est ensuite soumise à un champ externe, perpendiculaire à ce flux primaire, ce qui a pour effet d'entraîner les particules vers le fond du canal composé d'une membrane semi-perméable. Cette membrane est de porosité adaptée et donc seules les molécules constituant le solvant passent au travers de la membrane, dont la taille des pores est choisie inférieure à la taille des nanoparticules à analyser. Des effets de diffusion des particules depuis la membrane vers le centre du canal contrebalancent le champ externe qui est appliqué. Les petites particules ayant des coefficients de diffusion plus élevées que les grosses particules, elles ont donc tendance à se mouvoir plus loin que les grosses soit vers le centre du canal. Or le flux primaire ayant un profil parabolique, sa vitesse est plus importante au centre du canal que sur les bord, ce qui a pour effet d'entraîner en premier les plus petites particules puis les plus grosses vers le détecteur choisi (Figure 2.6) [156].

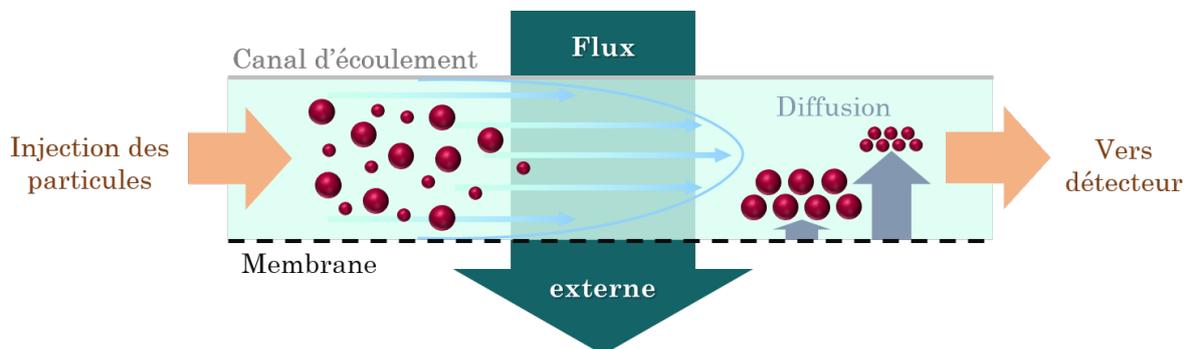


Figure 2.6 – Représentation du fonctionnement du Fractionnement d'Écoulement de Champ par Écoulement Asymétrique (AF4).

Pour ce qui est de la préparation d'échantillons, quelques **dizaines de microlitres** de suspension diluée sont nécessaires pour l'analyse. Il faut toutefois prendre des précautions particulières dans le cas de la formation de précipités dans la suspension. En effet, cela pourrait entraver le flux dans les injecteurs et entraîner des artefacts de mesure.

Cette technique présente un certain intérêt puisqu'elle est aussi bien adaptée à des suspensions **monodisperses** que **polydisperses** grâce au fractionnement des particules selon leur taille avant leur détection. Elle est cependant plus contraignante que le mode « batch » à

2.2. Microscopie Électronique en Transmission (MET)

mettre en place puisqu'il est nécessaire d'**optimiser le procédé de séparation** pour chaque type de particules à analyser.

Les analyses en mode « on-line » réalisées pour cette étude ont été effectuées sur un système HPLC 1260 Infinity (Agilent Technologies) et sur un régulateur de débit Eclipse DualTec (Wyatt Technology). Le canal de séparation (Wyatt Technology) est quant à lui défini par une longueur de 275 mm, une largeur de 50 mm et une entretoise de 350 μm . La membrane du canal (Superon) a été choisie avec une porosité de 10 kDa ce qui correspond environ à une taille de pores inférieure à 2 nm et le volume de suspension injectée est de 100 μL . Enfin, pour ce qui est de l'optimisation du procédé de séparation, celle-ci a été réalisée au cours de précédentes études pour les deux matériaux d'application choisis et ne sera pas détaillée ici [157].

2.2 Microscopie Électronique en Transmission (MET)

Cette section s'est largement inspirée du livre de D. B. Williams et C. B. Carter [108].

Contrairement à la diffusion de la lumière qui est une technique indirecte de caractérisation, la Microscopie Électronique en Transmission repose quant à elle sur l'**observation directe** des particules. Selon la caractérisation à effectuer, il convient d'adapter le(s) mode(s) d'imagerie et d'analyse à utiliser (Chapitre 2.2.1). La préparation d'échantillons est également une étape essentielle à ne pas négliger, notamment dans le cas de nanoparticules en suspension (Chapitre 2.2.2).

2.2.1 Modes de fonctionnement

Il existe différents modes de fonctionnement de la Microscopie Électronique en Transmission selon les analyses envisagées. Ceux qui ont ici été étudiés sont :

- le mode MET comprenant :
 - le mode faible dose (Low-Dose) ;
 - le mode diffraction.
- La Microscopie Électronique en Transmission à Balayage (STEM, Scanning Transmission Electron Microscopy) ;
- l'Analyse Dispersive en Énergie (EDS, Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) ;
- la Spectroscopie des Pertes d'Énergie (EELS, Electron Energy Loss Spectroscopy).

Quel que soit le mode d'imagerie employé, le principe de base reste identique. Des électrons sont émis par un canon à électrons et ensuite accélérés à haute énergie (de 80 kV à 300 kV généralement). Le faisceau formé est focalisé grâce à différentes lentilles électromagnétiques dans la colonne du microscope, possédant un vide poussé (inférieure à 3.10^{-5} Pa). Il traverse ensuite l'échantillon à analyser préalablement déposé sur un porte-objet. L'épaisseur de l'échantillon doit être sub-micrométrique pour que les électrons puissent être transmis à travers celui-ci. Lors de son interaction avec un échantillon, le faisceau d'électrons incident génère divers signaux secondaires recueillis par un/des détecteur(s) (Figure 2.7).

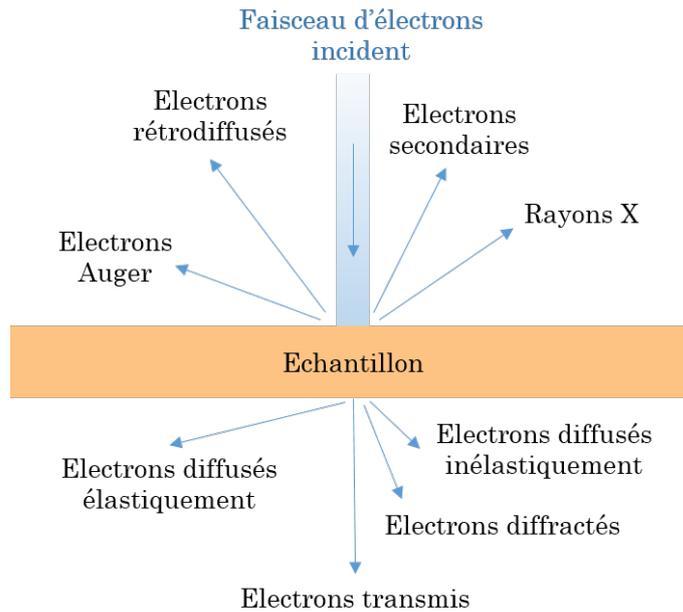


Figure 2.7 – Représentation des interactions électrons/matière.

La différence principale entre les différents modes de fonctionnement vient de la façon dont le faisceau est focalisé dans la colonne du microscope et de la nature des contrastes obtenus.

2.2.1.1 Mode MET

Le fonctionnement du **mode MET** est très proche de celui d'un microscope photonique. En effet, l'échantillon est illuminé de façon **quasi parallèle** par le faisceau d'électrons grâce à des lentilles et diaphragme condenseur. Le porte-objet contenant l'échantillon est situé au niveau de la lentille objective (LO). Des précautions particulières doivent donc être prises lors de la rotation de celui-ci afin d'éviter une collision avec les pièces polaires qui composent la lentille. Après interaction avec l'échantillon, une image de ce dernier est obtenue dans le **plan image de la lentille objective**. Cette image est ensuite agrandie grâce à un système de lentilles de projection (intermédiaire (LI) et projecteur (LP)) puis projetée sur un écran fluorescent ou acquise sur une caméra CCD située sous l'écran (Figure 2.8) [158, 159]. Le **contraste** obtenu dépend alors de la **masse** et de l'**épaisseur** des particules observées mais aussi de leur **orientation cristalline** (dans le cas où elles seraient cristallines). Pour des particules faiblement contrastées, il est possible de mettre en place un diaphragme objectif (DO).

Dans le cas d'échantillons sensibles aux électrons, comme par exemple des objets biologiques, il est possible de travailler dans un mode dit « **faible dose** » (ou **Low-Dose**), afin de limiter les dégâts d'irradiation de la zone étudiée. Pour cela, les zones d'intérêt et de mise au point, espacées de quelques micromètres l'une de l'autre, sont tout d'abord localisées à faible grandissement, la dose d'électrons étant suffisamment faible pour ne pas les endommager (Figure 2.9.a). La focalisation se fait ensuite sur la zone choisie pour la mise au point, le grandissement étant laissé libre de choix à l'utilisateur. La zone de mise au point peut

2.2. Microscopie Électronique en Transmission (MET)

alors subir des dégâts d'irradiation, la dose d'électrons reçue étant plus importante qu'à faible grandissement (Figure 2.9.b). L'acquisition se fait enfin sur la zone d'intérêt et ne dure que quelques secondes, limitant ainsi la dose d'électrons perçue par la zone à étudier (Figure 2.9.c) [160].

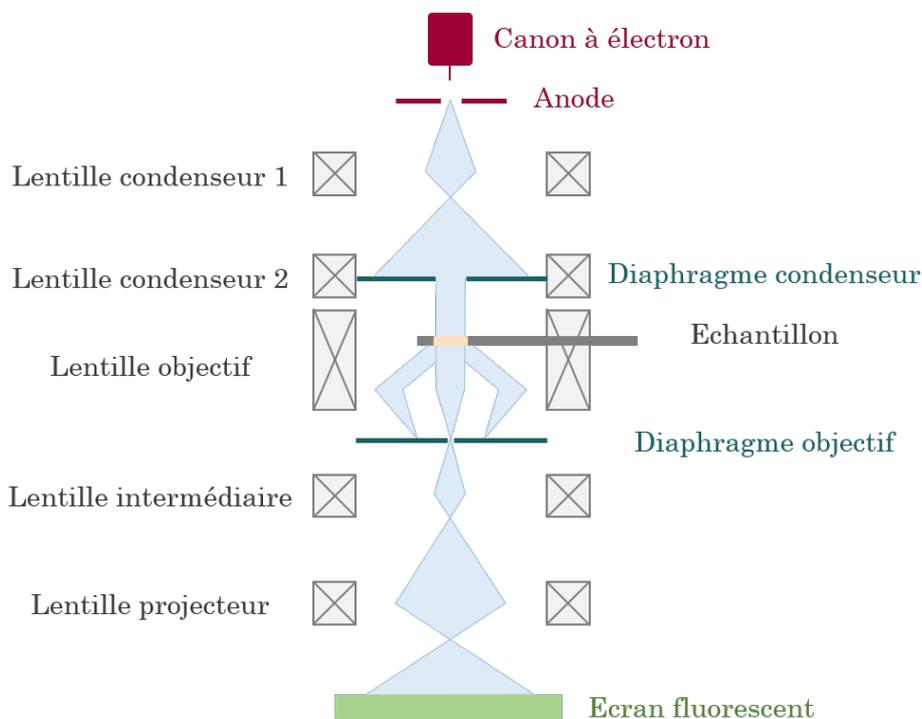


Figure 2.8 – Schéma du faisceau d'électrons en mode MET.

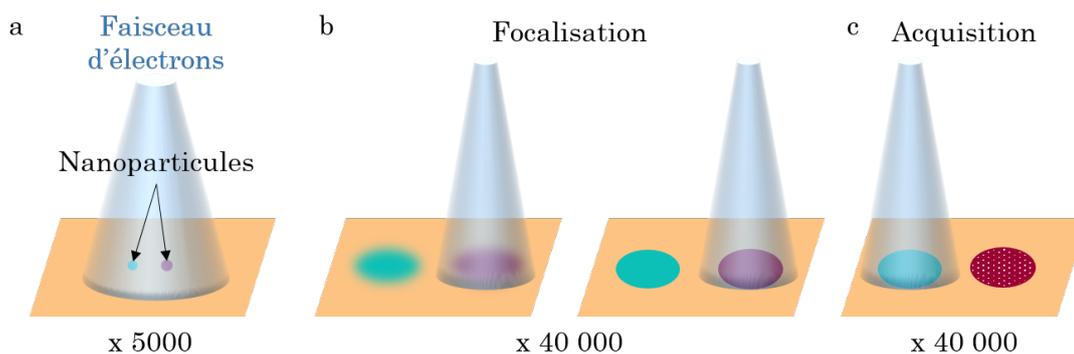


Figure 2.9 – Représentation d'un exemple d'utilisation du mode Low-dose pour l'étude de nanoparticules. (a) Localisation des nanoparticules à étudier à faible grandissement. (b) Ajustement du focus de la nanoparticule dans la zone de mise au point (en rose). (c) Acquisition d'une image de la nanoparticule dans la zone d'intérêt (en bleu).

En modifiant le courant des lentilles intermédiaire et de projection, il est possible de faire en sorte que le **plan focal de la lentille objectif** et l'écran soient optiquement conjugués

(Figure 2.10.b). Ceci permet d'obtenir des clichés de **diffraction** des particules analysées et donc de déterminer la **structure cristallographique** de celles-ci [158, 159]. La zone d'intérêt peut être restreinte grâce à un diaphragme de sélection d'aire (DSA).

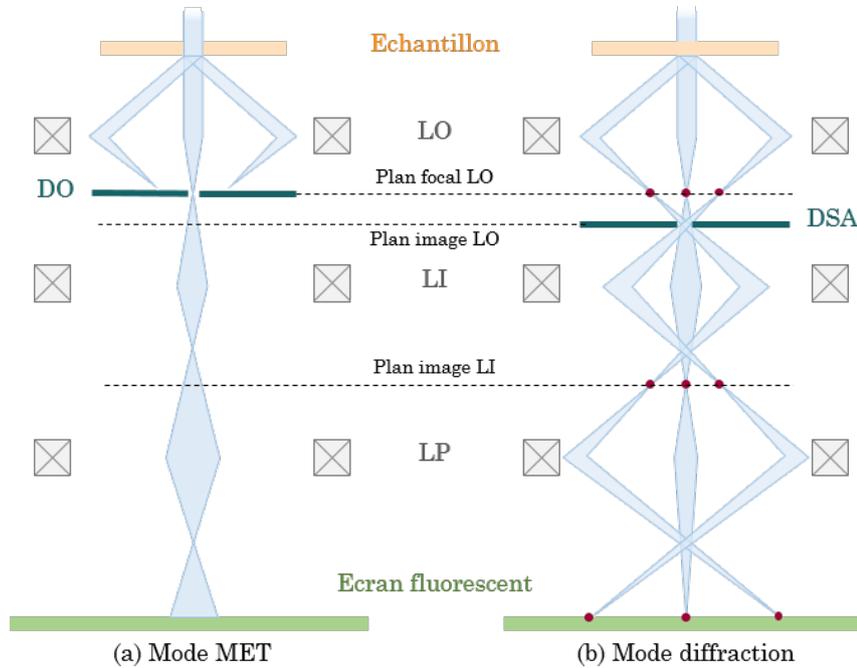


Figure 2.10 – Comparaison du trajet du faisceau d'électrons pour les modes MET (a) et diffraction (b) (adapté de [159] et [158]).

2.2.1.2 Mode STEM et analyses chimiques

Contrairement au mode MET, le faisceau d'électrons du mode STEM est condensé en une **sonde ponctuelle** lorsqu'il arrive sur l'échantillon et n'est donc plus parallèle. Ceci est rendu possible grâce à une modification du courant des lentilles condenseur et objectif. Cette sonde balaie la surface de l'échantillon comme dans un Microscope Électronique à Balayage (MEB) à la différence près que le faisceau d'électrons traverse l'échantillon et que les faisceaux transmis et diffusés sont récupérés par des détecteurs (Figure 2.11).

Pour ce qui est du faisceau transmis, il est collecté par le détecteur champ clair (**BF**, Bright-Field) et les images obtenues sont semblables à celles obtenues en MET. Le contraste des images obtenues est un **contraste d'épaisseur et de diffraction**. En ce qui concerne les électrons diffusés de manière inélastique (faiblement déviés) et élastique (fortement déviés), ils sont respectivement recueillis par les détecteurs champ sombre annulaire (**ADF**, Annular Dark Field) et champ sombre annulaire à grand angle (**HAADF**, High Angle Annular Dark Field) (Figure 2.12). Le contraste obtenu dépend alors du **numéro atomique** des particules observées.

2.2. Microscopie Électronique en Transmission (MET)

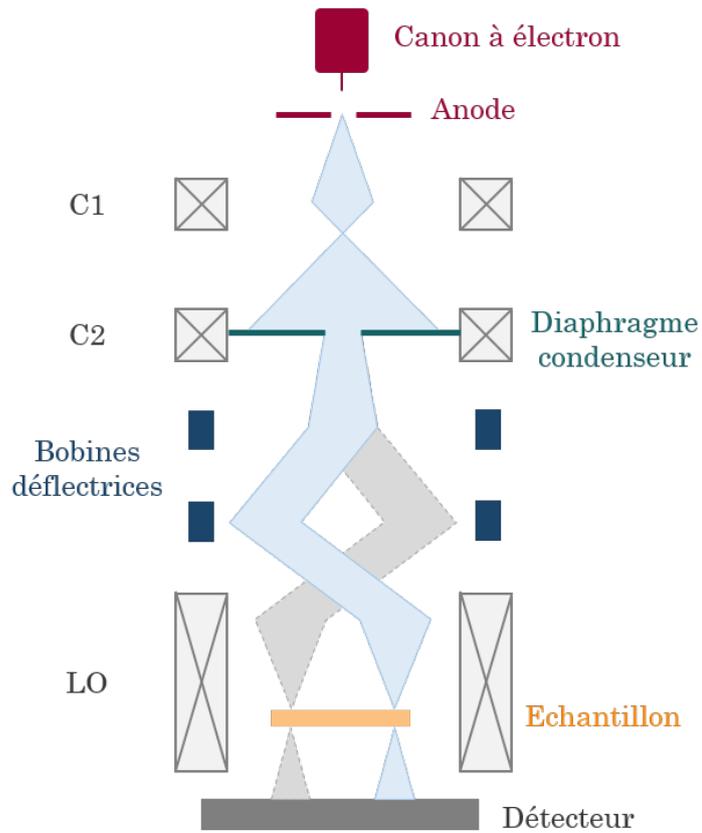


Figure 2.11 – Schéma du faisceau d'électrons en mode STEM.

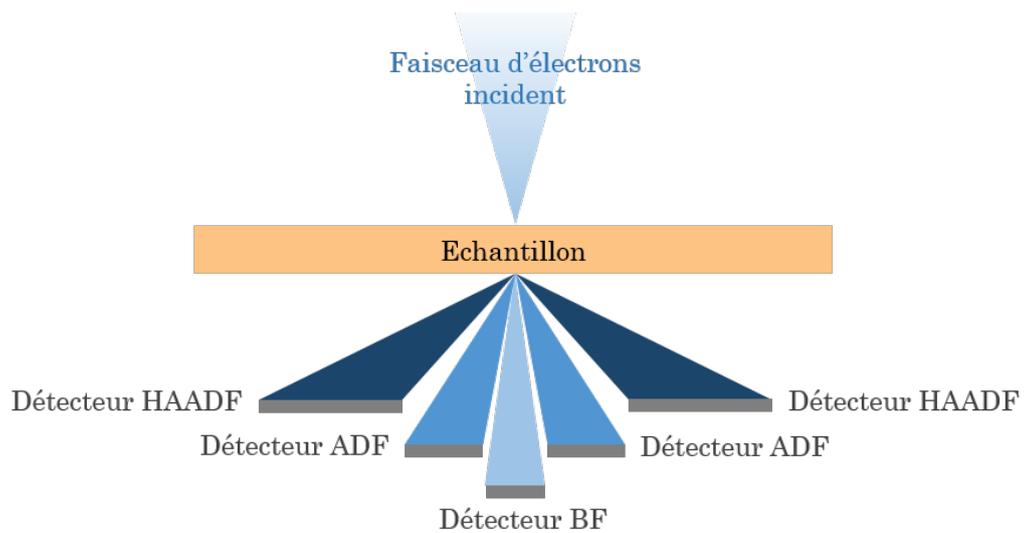


Figure 2.12 – Représentation de la position des détecteurs BF, ADF et HAADF en mode STEM (adapté de [159]).

Le mode STEM, en plus de l'imagerie, permet de réaliser des analyses de la composition de l'échantillon à étudier. Deux types de spectroscopie ont ici été utilisées :

- la Spectroscopie X à Dispersion d'Énergie (**EDS**, Energy Dispersive X-ray Spectrometry) ;
- la Spectroscopie des Pertes d'Énergie des Électrons (**EELS**, Electron Energy Loss Spectroscopy).

L'**EDS** repose sur l'analyse des rayons X émis par l'échantillon d'étude, spécifiques de la matière qui le compose, lorsqu'il est irradié par le faisceau d'électrons du microscope (Figure 2.7). En effet, si ce dernier (Figure 2.13(1)) est suffisamment énergétique, il est possible d'éjecter un électron de cœur (couches électroniques K, L, M) d'un atome composant la matière (Figure 2.13(2)). L'atome étant alors **ionisé**, c'est-à-dire dans un état excité, il tend à se désexciter en comblant la place vacante par un électron d'une couche supérieure. Il est alors question de transition électronique. Celle-ci s'accompagne par l'émission d'un **photon X** (Figure 2.13(3)) dont l'énergie est caractéristique de l'atome et de la transition en question.

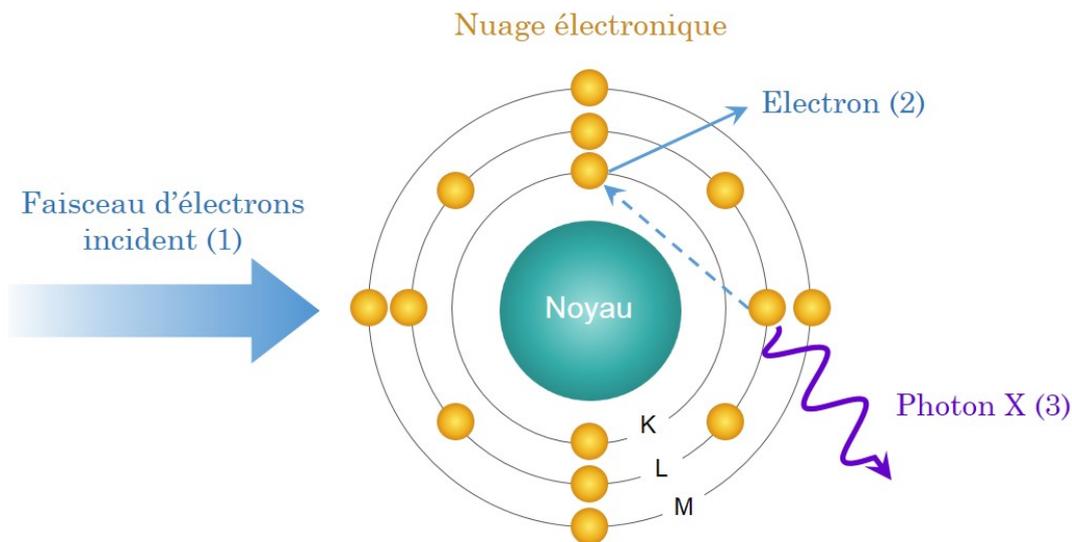


Figure 2.13 – Représentation au niveau atomique du principe de l'EDS (adapté de [159]).

Chaque photon X détecté contribue à l'intensité du pic obtenu pour une énergie donnée (Figure 2.14). Il est alors possible grâce à cette intensité de déterminer la concentration atomique du matériau étudié, celles-ci étant proportionnelles. Il est également possible de réaliser des cartographies de composition (map), des pointés ou encore des analyses linéaires (line-scan), particulièrement utiles dans le cas de nanoparticules de type cœur/coquille pour déterminer l'épaisseur de la coquille par exemple. Le(s) détecteur(s) de rayons X se situe(nt) généralement juste au-dessus de l'échantillon dans la colonne du microscope. Toutefois, l'EDS n'est pas adaptée pour la détection des éléments légers et sa résolution en énergie de l'ordre de 100 eV peut poser des problèmes de superposition d'énergies [161].

2.2. Microscopie Électronique en Transmission (MET)

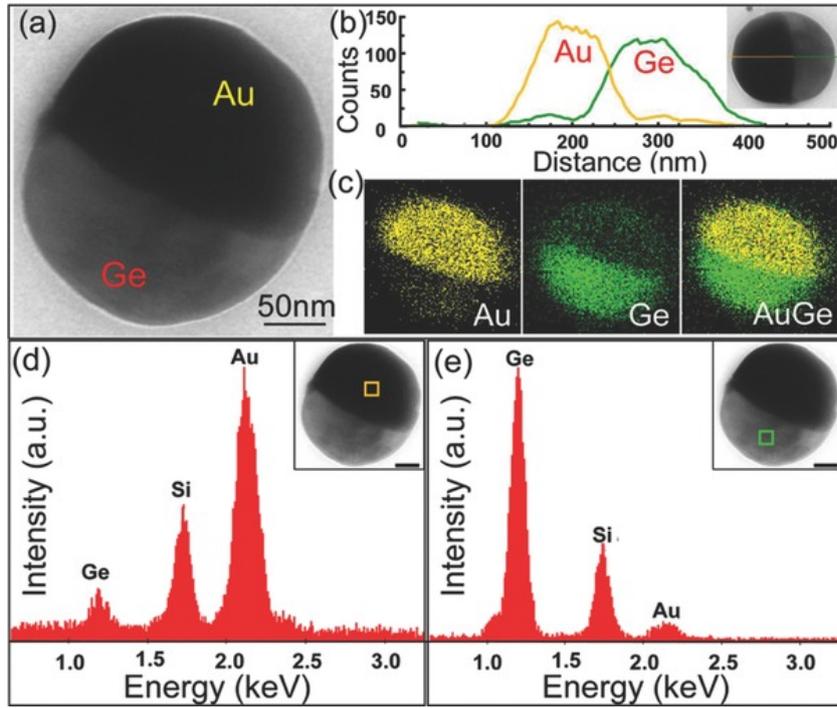


Figure 2.14 – Analyse d’un hétérodimère d’AuGe par EDS. (a) Image MET. (b) Analyse EDS linéaire. (c) Cartographies. (d) Spectre EDS dans le domaine de l’or (carré jaune). (e) Spectre EDS dans le domaine du germanium (carré vert) [162].

De même que pour l’EDS, l’**EELS** se base sur l’ionisation des couches électroniques de cœur, c’est-à-dire proches du noyau de l’atome. Lorsque l’électron de cœur est éjecté (Figure 2.13(2)), le faisceau d’électrons incident d’énergie E_0 lui transfère une certaine énergie, notée ΔE . Ainsi, les **électrons diffusés inélastiquement** à la suite de l’interaction du faisceau incident avec la matière auront une énergie $E = E_0 - \Delta E$ plus faible que l’énergie incidente. C’est cette perte d’énergie, caractéristique des éléments traversés, qui est mesurée par le spectromètre EELS situé soit dans la colonne, soit post-colonne [163]. Ce dernier est composé d’un prisme qui permet de disperser en énergie les électrons diffusés et donc d’obtenir le spectre correspondant (Figure 2.15). Il est possible d’obtenir des images filtrées en énergie à l’aide des spectres de pertes d’énergie obtenus : il est alors question de Microscopie Électronique en Transmission Filtrée en Énergie (**EFTEM**, Energy-Filtered Transmission Electron Microscopy). Cette technique permet d’améliorer le contraste des images et de réaliser des cartographies d’épaisseur de l’échantillon observé [164]. En effet, grâce à la statistique de Poisson pour une diffusion inélastique, il est possible d’obtenir l’épaisseur t de l’échantillon en comparant l’aire sous le pic sans perte d’énergie (zero-loss), I_0 , à l’aire totale sous l’ensemble du spectre, notée I_t (Équation 2.13) (Figure 2.16) :

$$t/\lambda = -\ln\left(\frac{I_0}{I_t}\right) \quad (2.13)$$

où λ (nm) est le libre parcours moyen des électrons diffusés inélastiquement, caractéristique du matériau étudié. La détermination de ce paramètre dépend du mode de fonctionnement du microscope (MET ou STEM) ainsi que de sa configuration, comme l’angle de collection

par exemple [108]. Les différentes acquisitions ayant ici été réalisées en mode MET, le libre parcours moyen des électrons est alors défini par (Équation 2.14) [165] :

$$\frac{1}{\lambda} = \frac{11\rho^{0,3}}{200FE_0} \ln \left(\frac{1 + \beta^2/\theta_E^2}{1 + \beta^2/\theta_C^2} \right) \quad (2.14)$$

avec E_0 l'énergie du faisceau incident, ici de 200 keV, β le semi-angle de collection, ρ la densité du matériau étudié, θ_C le facteur de saturation, θ_E l'angle caractéristique et F un facteur relativiste. Ces deux derniers paramètres sont obtenus à partir des équations suivantes (Équations 2.15 et 2.16).

$$\theta_E = \frac{5,5\rho^{0,3}}{FE_0} \quad (2.15)$$

$$F = \frac{1 + E_0/1022}{(1 + E_0/511)^2} \quad (2.16)$$

D'autres techniques de mesure d'épaisseur d'échantillons existent comme la diffraction des électrons en faisceau convergent (CBED, Convergent Beam Electron Diffraction), la technique du spot de contamination ou encore la méthode des zêta facteurs. Cependant, ces techniques ne sont pas adaptées ou bien trop complexes à mettre en place pour les cas ici étudiés (Chapitre 3.2.2.2).

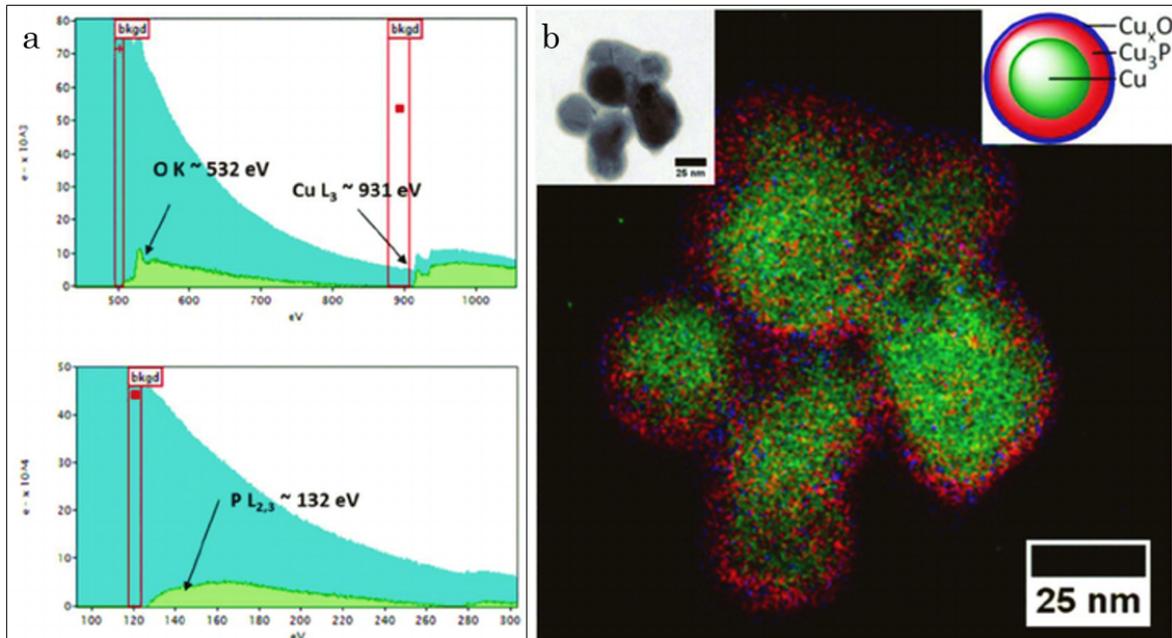


Figure 2.15 – Analyse chimique de nanoparticules type cœur/coquille de Cu_3P par EELS. (a) Spectres EELS. (b) Image MET et cartographie chimique [166].

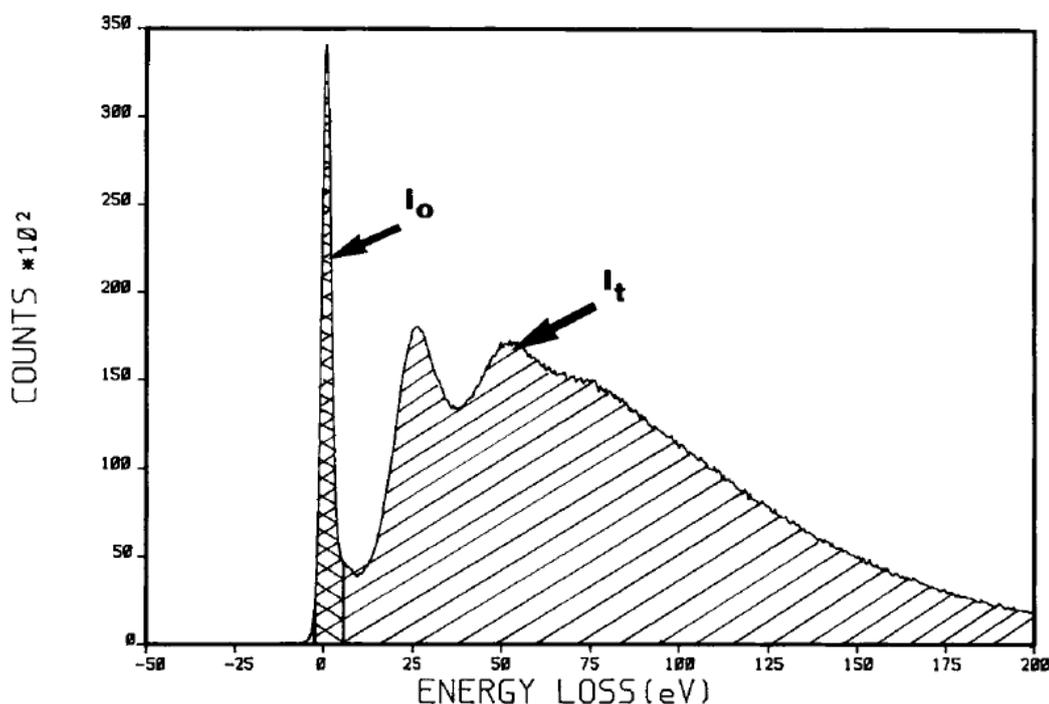


Figure 2.16 – Spectre EELS d'un film de carbone de 400 nm d'épaisseur [164].

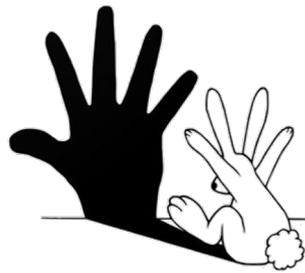
Tout comme en EDS, il est possible de déterminer la concentration atomique de l'échantillon analysé, de réaliser des cartographies et analyses de composition linéaires et ponctuelles. L'EELS possède toutefois une meilleure sensibilité et est plus rapide dans l'acquisition des données. De plus, sa résolution en énergie, de l'ordre de 0,3 à 2 eV, entraîne beaucoup moins de cas de superposition de raie [167]. Un avantage majeur de cette technique est qu'il est également possible d'obtenir des informations sur la structure électronique et cristallographique de l'échantillon. Elle reste cependant plus lourde à mettre en place que l'EDS et nécessite un certain savoir-faire [111].

2.2.1.3 Tomographie et reconstruction

Que ce soit en mode MET ou en mode STEM, il est possible d'obtenir une visualisation 3D des particules observées, il s'agit de la **tomographie électronique**. Lors de l'acquisition des images dans un MET, celles-ci correspondent en réalité à une projection 2D d'un volume 3D, ce qui peut entraîner une interprétation erronée de la forme des particules si seule la projection 2D est analysée (Figure 2.17). C'est pourquoi il peut être nécessaire de mettre en place la tomographie.

Cette technique se décompose en trois grandes étapes (Figure 2.18) [168] :

- l'**acquisition** des images ;
- leur **alignement et reconstruction** ;
- la **visualisation 3D**.



Mebfi

Figure 2.17 – Projection 2D (main) d'un volume 3D (lapin).

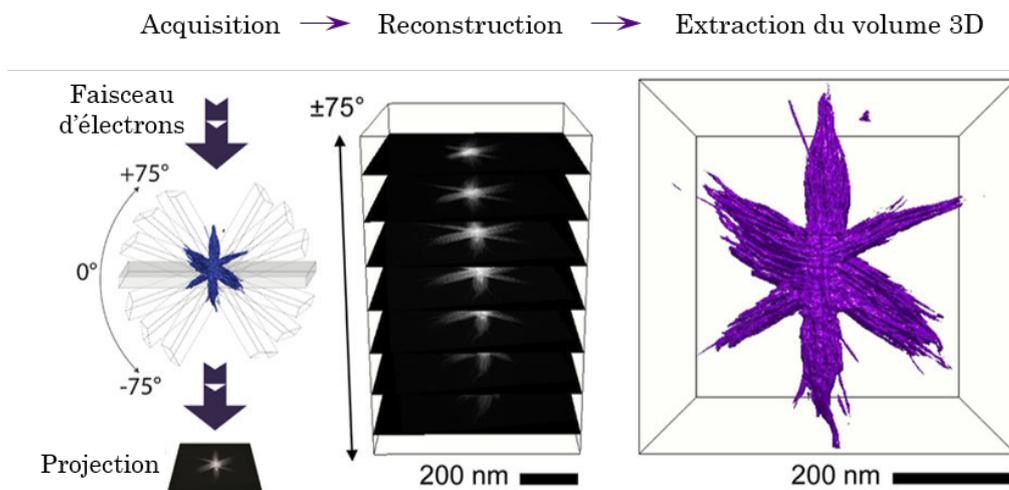


Figure 2.18 – Représentation du principe de la tomographie électronique [169].

Tout d'abord, des images en projection de la zone d'intérêt sont acquises pour différents angles de rotation du porte-objet sur lequel se trouve l'échantillon, selon un axe perpendiculaire au faisceau d'électrons. Différents paramètres doivent être définis au préalable comme l'**intensité** du faisceau d'électrons. En effet, ce dernier restant sur la zone d'intérêt tout le long de l'acquisition, il est primordial de s'assurer qu'elle ne subit pas de dégâts d'irradiation. Il est alors possible de travailler en mode low-dose pour limiter ces effets. Le **temps d'acquisition** par image ou encore l'**amplitude angulaire** du porte-objet doivent également être définis. L'acquisition des images se fait généralement entre -80° et $+80^\circ$ car, au-delà, le support sur lequel se trouve l'échantillon vient masquer la zone d'intérêt par un effet d'ombrage et il est aussi possible de heurter les pièces polaires de la lentille objectif. De même, le **pas angulaire** est primordial car de lui dépendra la résolution et donc la qualité de la reconstruction. Il existe deux types de schéma de pas à savoir le schéma **linéaire**, qui consiste à prendre un incrément constant de $1-2^\circ$, et le schéma de **Saxton**, qui lui permet de définir un pas proportionnel au cosinus de l'angle de rotation. Il est donc de plus en plus petit au fur et à mesure que l'angle de rotation augmente. Le schéma de Saxton permet donc de compenser l'épaisseur d'échantillon traversée par le faisceau d'électrons qui est de plus en plus importante au fur et à mesure que l'angle s'éloigne de 0° [170]. Un logiciel d'acquisition permet généralement de corriger

2.2. Microscopie Électronique en Transmission (MET)

la focalisation et de recentrer la zone d'intérêt, en cas de dérive, de manière automatique (corrélation d'images) ou bien manuellement au besoin.

Une fois l'acquisition terminée, il est nécessaire de traiter les données obtenues afin de réaligner les images entre elles. En effet, la zone d'intérêt peut légèrement dériver d'un angle à l'autre, même après correction par le logiciel d'acquisition. Il est alors recommandé d'ajouter des **marqueurs de références**, des nanoparticules d'or par exemple (celles-ci étant bien contrastées) à la suspension à étudier avant l'acquisition. Ceux-ci permettent un alignement beaucoup plus précis des images que par corrélation d'images. Après l'alignement vient l'étape de reconstruction qui permet, à l'aide d'un algorithme, de calculer l'image en volume des particules étudiées. Il existe deux types d'algorithmes de reconstruction : les techniques analytiques et algébriques [171]. Les méthodes analytiques font appel à la rétroprojection dans l'espace de Fourier, c'est-à-dire l'inversion directe des données obtenues. Bien que rapides à mettre en place, un grand nombre de projections est nécessaire pour obtenir une bonne résolution. En ce qui concerne les méthodes algébriques, elles reposent sur une reconstruction itérative de l'objet et sont donc chronophages. Cependant, la qualité de la reconstruction obtenue est bien supérieure à celle des méthodes analytiques.

Afin de mettre en évidence l'information voulue, il est possible, à partir des sections dans l'épaisseur du volume reconstruit, d'extraire le volume 3D de l'objet à étudier. Pour cela, chaque image obtenue dans l'épaisseur du volume est soumise à des traitements (filtrage, segmentation, érosion, dilatation, ...), ce qui permet d'obtenir une visualisation 3D de celui-ci.

2.2.1.4 Conditions expérimentales

Le microscope utilisé pour cette étude est le MET Tecnai Osiris (Thermo Fisher Scientific) utilisant un canon à électrons à émission de champ haute brillance (XFEG, Field Emission Gun) et travaillant à 200kV. Les images prises en mode MET ont été obtenues grâce à la caméra BM Ultrascan 2k x 2k possédant un scintillateur à grande sensibilité (Gatan). Pour ce qui est des analyses EDS en mode STEM, celles-ci ont été réalisées par le système Super-X (Thermo Fisher Scientific) équipé de détecteurs de dérive 4SDD (Bruker). L'analyse des données EDS a été réalisée avec le logiciel Esprit (Bruker). Les analyses EELS ont été réalisées grâce au filtre GIF Quantum (Gatan) et traitées sous Digital Micrograph (Gatan).

2.2.2 Préparation d'échantillons

Comme dit précédemment, le vide dans la colonne d'un MET est suffisamment élevé pour qu'un état liquide ne puisse exister dans celle-ci [172]. Il n'existe donc que trois solutions pour observer une suspension de nanoparticules, à savoir : soit la laisser sécher, soit la cryo-fixer ou encore soit la piéger à l'intérieur d'un dispositif hermétique. Selon le type de particules à analyser, une méthode de préparation peut s'avérer plus adaptée qu'une autre. Il s'agit ici d'une grosse partie du travail de recherche qui a été mené à bien au cours de cette thèse.

Quel que ce soit le type de support utilisé pour l'observation MET, un nettoyage à l'aide d'un plasma oxygéné, utilisant un mélange spécifique de gaz (25% O, 75% Ar, 25 Watts), a été effectué grâce au plasma cleaner Solarus (Gatan). Celui-ci permet de rendre la surface du support hydrophile et donc d'obtenir une meilleure répartition de la suspension sur ce dernier.

Un traitement similaire est obtenu à l'aide d'une décharge lumineuse (glow discharge). Cette dernière utilise, quant à elle, les gaz ambiants.

2.2.2.1 Voie sèche

La solution la plus simple à mettre en place consiste à déposer et laisser sécher une goutte de suspension sur une grille en cuivre recouverte d'une membrane à trous type dentelle en carbone avec ou sans film continu en carbone (Figures 2.19 et 2.20). Le film de carbone continu est recommandé dans le cas d'étude de nanoparticules dispersées car il sert de support stable à celles-ci. Cependant, dans le cas de nanoparticules agglomérées, le film continu n'est pas nécessaire. En effet, si les agglomérats sont assez gros, ils peuvent reposer directement sur la membrane à trous. Lors d'analyses chimiques, il est préférable de ne pas utiliser de grille avec film carbone continu afin de limiter la contribution du carbone liée à ce dernier.

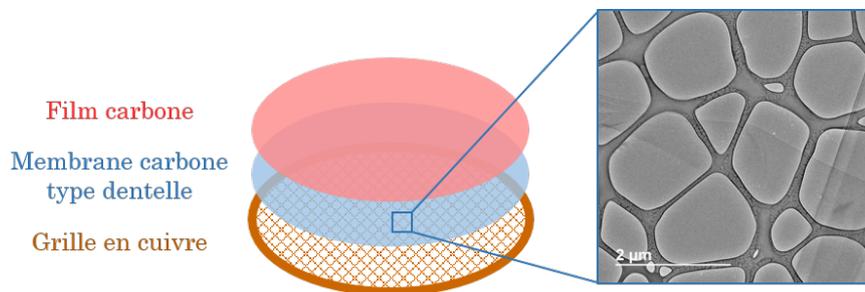


Figure 2.19 – Représentation d'une grille MET type pour une observation en voie sèche.

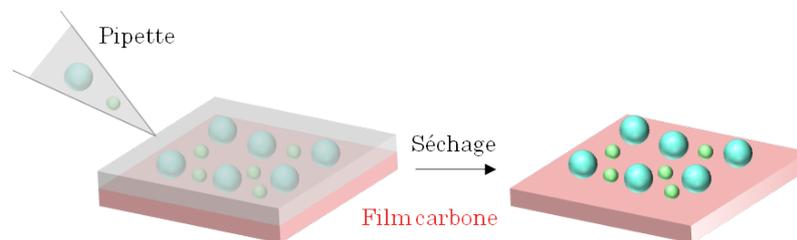


Figure 2.20 – Représentation de la préparation en voie sèche d'une suspension de nanoparticules.

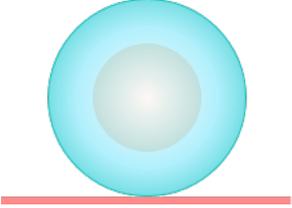
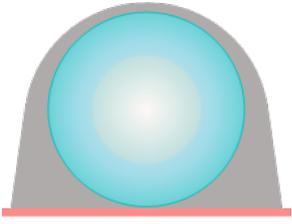
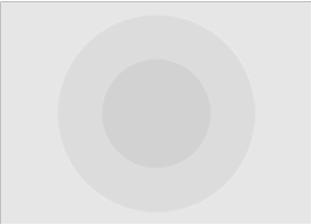
Cette technique fonctionne particulièrement bien pour des nanoparticules métalliques par exemple, ce qui n'est pas toujours le cas des particules organiques [173]. En effet, ces dernières étant composées d'éléments légers (C, O, N, H, ...), elles peuvent être difficiles à observer dû à un manque de contraste [174]. Ainsi, il peut être nécessaire de rajouter un contrastant utilisant des métaux lourds comme l'acétate d'uranyle ou encore le phosphotungstate avant la phase de séchage. Il est alors question de **coloration négative** car seul le contour des particules est mis en évidence (Tableau 2.2) [175, 176]. L'inconvénient est que, dans le cas de structures cœur/coquille, le contrastant ne crée qu'un masque des particules et il est donc impossible d'observer leur structure interne.

La voie sèche est une technique de **première approche** de la forme et de la taille des particules. Cependant, elle peut ne pas rendre compte de l'état réel de dispersion des particules en suspension. En effet, lorsque le solvant s'évapore sur la grille, les nanoparticules ont

2.2. Microscopie Électronique en Transmission (MET)

tendance à s'agglomérer du fait des forces de van der Waals mises en jeu. Ainsi, dans le cadre d'analyses automatiques d'images, cela peut entraîner des artéfacts de mesure de la taille des particules. Il peut alors être utile d'envisager l'utilisation d'un **solvant dispersant**, comme par exemple l'albumine de sérum bovin (BSA, Bovine Serum Albumin) ou encore le FL-70 (détergent) [114]. De plus, dans le cas de particules fragiles, celles-ci peuvent être déstabilisées lors de la phase de séchage.

Tableau 2.2 – Intérêt de la coloration négative en voie sèche pour l'observation de nanoparticules organiques.

Techniques	Voie sèche classique	Coloration négative
Principe		
Image MET obtenue		

Dans le cadre de cette thèse, un volume de 3 à 4 μL de suspension a été déposé soit sur une grille PELCO 01824 (membrane dentelle avec film continu en carbone) soit sur une grille AGAR 166-3 (membrane dentelle en carbone uniquement). Après quelques dizaines de secondes de séchage sur la grille, l'excès de suspension a été absorbé à l'aide d'un papier filtre.

2.2.2.2 Cryo-microscopie

Afin de limiter les artéfacts liés au séchage de la suspension de nanoparticules, il est possible de passer par une étape de cryo-fixation : il s'agit du cryo-MET [177]. L'état des particules en suspension est donc fixé, sans possibilité de réaction ce qui peut être intéressant pour observer des particules à un moment donné de leur réaction avec leur milieu environnant par exemple. Il existe deux grandes techniques pour cryo-fixer une suspension en vue de son observation par cryo-MET. La première, appelée **CEMOVIS** (Cryo-Electron Microscopy Of Vitreous Section), consiste à cryo-fixer la suspension de manière massive sous haute pression (200 bars) sous forme de cylindre par exemple puis à réaliser des coupes dont l'épaisseur est inférieure à la centaine de nanomètres [178]. La seconde utilise un **automate de congélation** qui permet d'obtenir directement un film mince de suspension cryo-fixé sur une grille MET [179]. C'est cette dernière technique qui a ici été utilisée.

La cryogénie est une étape critique de la cryo-microscopie électronique en transmission. En effet, de l'épaisseur du film de suspension cryo-fixée et de l'état amorphe de la glace dépendra l'obtention d'images correctes et donc une analyse optimale des particules. Pour ce qui est de l'épaisseur de l'échantillon, celle-ci ne doit pas excéder la centaine de nanomètres afin de rester transparente aux électrons mais ne doit pas non plus être trop fine pour ne pas être détériorée sous le faisceau d'électrons. En ce qui concerne l'état de la glace, il est important qu'elle soit amorphe, notamment dans le cas d'étude de nanoparticules organiques amorphes. En effet, la glace cristalline a un contraste plus fort que celui de telles particules, ce qui pourrait rendre difficile leur observation (Figure 2.21) [180]. Ces deux paramètres peuvent être modulés grâce au type de fluide cryogénique choisi ainsi que par les différents paramètres de l'automate de congélation.

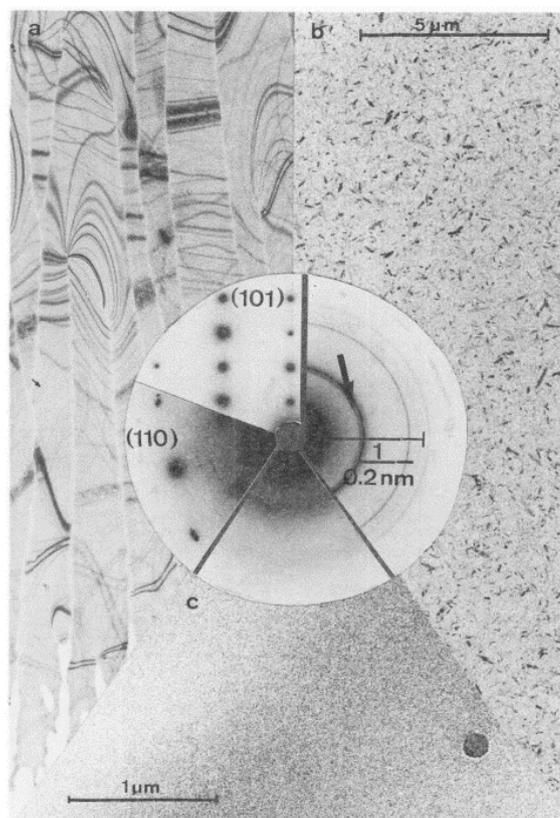


Figure 2.21 – Images et clichés de diffraction associés pour les trois états de la glace à savoir : (a) Hexagonale, (b) Cubique et (c) amorphe [180].

Il est important de choisir le fluide cryogénique adéquat car de ce dernier dépendra la vitesse de cryo-fixation du film mince de suspension et donc de son état amorphe ou non. La température de transition vitreuse de l'eau, solvant majoritaire des suspensions ici étudiées, étant de -135°C , il est nécessaire que le fluide cryogénique choisi soit liquide en dessous de cette température [181]. L'éthane est le plus utilisé car il possède une capacité calorifique élevée, contrairement à l'azote [182]. De plus, il reste liquide sur une gamme de températures assez large, comprise entre -89 et -183°C , ce qui l'empêche de s'évaporer trop rapidement [183].

2.2. Microscopie Électronique en Transmission (MET)

Pour ce qui est de l'automate de cryogénie, son fonctionnement consiste tout d'abord à déposer un faible volume de suspension sur une grille MET, recouverte uniquement d'une membrane à trous (Figure 2.22.a). L'excès de solution est ensuite éliminé grâce à des papiers filtres positionnés de part et d'autre de la grille (Figure 2.22.b). Cette étape permet d'obtenir un film mince de suspension sur la grille dans le but d'obtenir une épaisseur suffisamment fine pour être transparente aux électrons mais aussi pour éviter la formation de glace cristalline. En effet, plus le film est épais, plus il mettra de temps à se cryo-fixer et donc plus la probabilité de créer des sites de germination de cristaux de glace est grande. Une fois le film d'épaisseur adéquate obtenu, la grille est rapidement plongée dans l'éthane liquide (Figure 2.22.c).

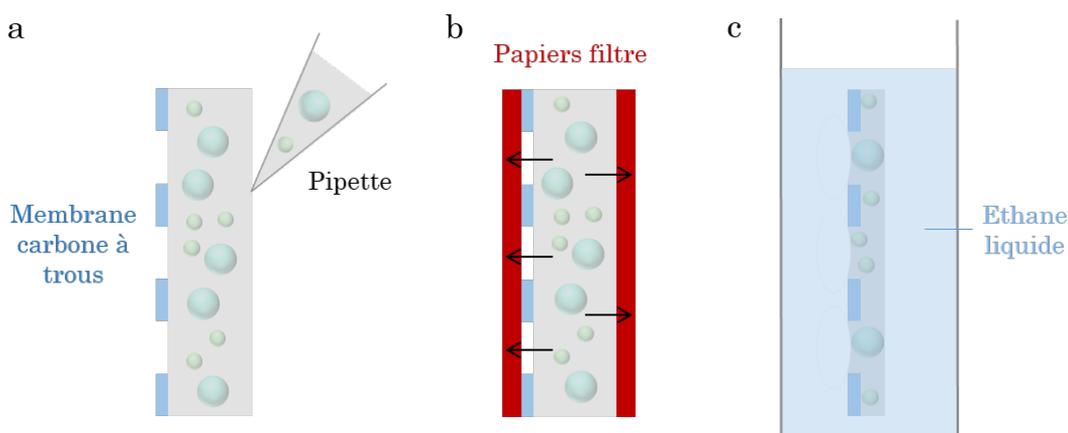


Figure 2.22 – Représentation du fonctionnement de l'automate de congélation. (a) Injection d'une goutte de suspension nanoparticulaire sur une grille MET avec membrane à trous. (b) Absorption de l'excès de suspension à l'aide de papiers filtre. (c) Cryo-fixation rapide du film mince de suspension.

Afin de contrôler au mieux la formation de film mince de suspension ainsi que sa vitrosité, différents paramètres peuvent être modulés depuis l'automate, à savoir :

- la température de l'enceinte de préparation de la grille ;
- l'humidité de l'enceinte ;
- la durée d'absorption des papiers filtre sur la grille ;
- la force d'absorption ;
- le nombre total d'absorption(s) ;
- le temps d'attente avant absorption ;
- le temps d'attente entre l'absorption et la trempe.

L'ajustement de la **température** permet de se placer dans les conditions telles que supportées par l'échantillon, dans le cas où celui-ci serait susceptible à tout réchauffement ou refroidissement pouvant entraîner son évolution. L'**humidité** de l'enceinte est quant à elle importante car elle permet à l'échantillon de ne pas s'évaporer trop rapidement. De plus, elle permet d'hydrater les papiers filtre situés dans l'enceinte afin que ceux-ci ne soient pas trop secs et donc absorbent trop de suspension, laissant la grille vide. Il est également possible de moduler les paramètres liés à l'absorption par les papiers filtre comme leur **force** d'approche, la **durée** ou encore le **nombre d'absorption(s)**. Plus la valeur de chacun de ces paramètres est élevée, plus il est probable que des trous de la membrane carbone de la grille soient vides au moment de son observation et que la glace restante soit amorphe (Figure 2.23.c). Et inversement, plus

leur valeur est faible plus il est possible que les trous soient remplis et que la glace obtenue soit cristalline (Figure 2.23.a). Le **temps d'attente avant absorption** sert à laisser du temps à l'échantillon pour qu'il atteigne un équilibre dans l'enceinte. En ce qui concerne le **temps d'attente entre l'absorption et la trempe**, il peut être utile afin d'obtenir une épaisseur de glace plus homogène au lieu d'un gradient [179]. Trouver les bons paramètres de l'automate est donc une étape indispensable et ceci a donc fait l'objet d'un point important développé dans cette étude.

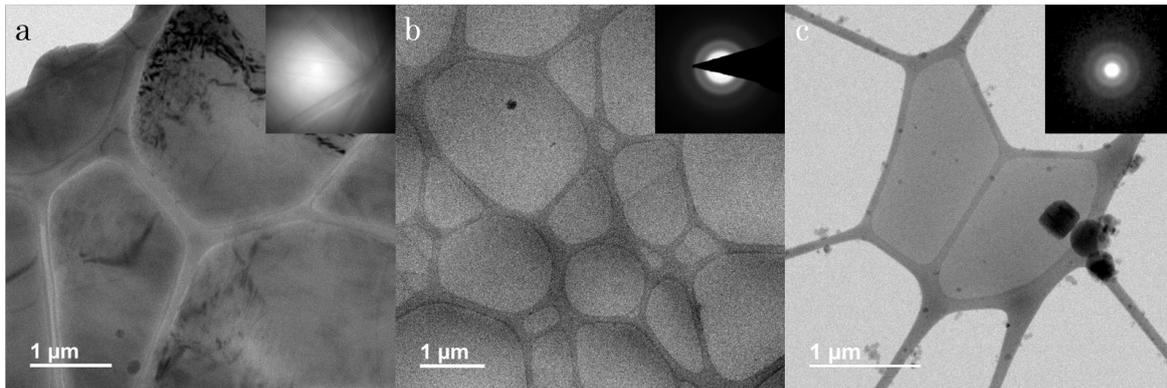


Figure 2.23 – Images en cryo-MET et clichés de diffraction correspondants d'eau cryo-fixée grâce à un automate de congélation (Vitrobot, Thermo Fisher Scientific). De gauche à droite, force d'absorption des papiers filtre de plus en plus grande.

La conservation de la glace à l'état amorphe devant être maintenue jusqu'à la fin des observations, il est nécessaire d'utiliser une station de transfert refroidie à basse température ainsi qu'un porte-objet MET équipé d'un dewar rempli d'azote liquide en bout de canne. Afin de s'assurer d'une épaisseur adéquate de glace dans les trous, il est possible de mesurer celle-ci, une fois le porte-objet inséré dans le MET, grâce au mode EFTEM (Chapitre 2.2.1.2). Des mesures ont ainsi été réalisées sur l'un des deux matériaux analysés afin de mieux comprendre la répartition des particules dans les trous (Chapitre 3.2.2.2). Il est recommandé de travailler avec le mode low-dose du microscope pour les observations en cryo-MET afin d'éviter tout endommagement de la glace par le faisceau d'électrons, notamment dans le cas d'acquisitions d'images tomographiques [184].

La cryogénie d'échantillons est une technique reconnue pour fixer l'état d'une suspension avant cryo-fixation, ce qui permet de s'affranchir des artéfacts liés au séchage comme l'agglomération ou la déstabilisation de la structure des particules (Figure 2.24). Toutefois, elle peut également induire des artéfacts [172].

En effet, lorsque le porte-objet est introduit dans le microscope, la grille, dont la température avoisine les -180°C , devient un piège froid, c'est-à-dire qu'une contamination de la surface de celle-ci peut se produire (condensation de l'eau, dépôt d'hydrocarbures, ...) (Figure 2.25.a). Cependant, cette contamination peut être évitée en plaçant intentionnellement un piège-froid dans la colonne du microscope. De plus, lors de la phase d'absorption par les papiers filtre, les plus grosses particules ont tendance à être captées par ces derniers. Elles sont donc absentes de la distribution de taille, ce qui fausse alors celle-ci. Une certaine prudence est donc requise quant à l'interprétation des données, qui doivent être comparées avec d'autres techniques comme la DLS par exemple. Certaines structures ont également tendance à s'or-

2.2. Microscopie Électronique en Transmission (MET)

donner dans les trous selon leur taille et l'épaisseur de la glace (Figure 2.25.b). Toujours lors de la phase d'absorption, les particules à faible tenue mécanique peuvent subir des distorsions lors de l'absorption, modifiant leur aspect initial. C'est pourquoi un temps de relaxation plus ou moins long est parfois nécessaire, après cette étape et avant la cryo-fixation, pour laisser le temps aux particules de retrouver leur forme primitive [185]. Il existe un automate (EM-GP, Leica) possédant un papier filtre unique n'absorbant que du côté opposé à celui du dépôt de la goutte, ce qui laisse plus de particules sur la grille et évite leur déformation. Dans le cas de nanoparticules organiques, le contraste étant très faible, il peut être nécessaire de sous-focaliser largement (quelques microns) les images MET avant leur acquisition afin de pouvoir observer les particules correctement. Ceci peut être contourné en utilisant la cryo-coloration négative qui permet, en réduisant la sous-focalisation à quelques centaines de nanomètres, d'obtenir une meilleure résolution [186].

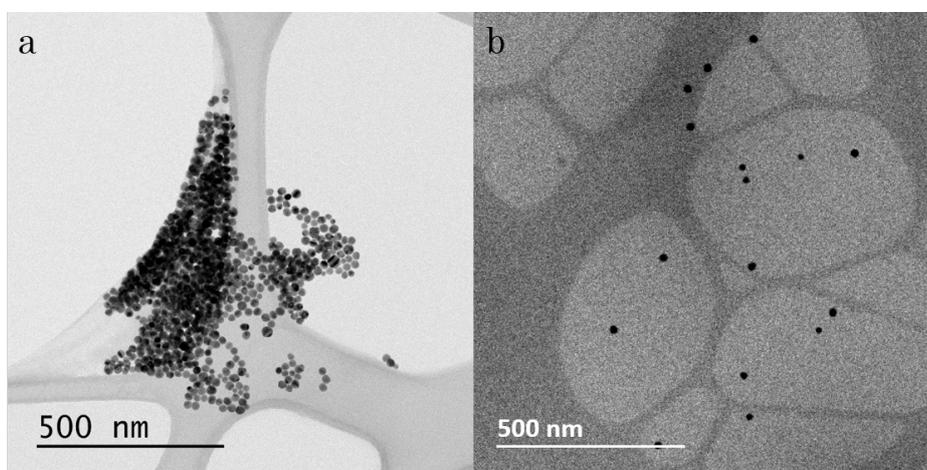


Figure 2.24 – Images MET de nanoparticules d'argent préparées en voie sèche (a) et par un automate de congélation (b).

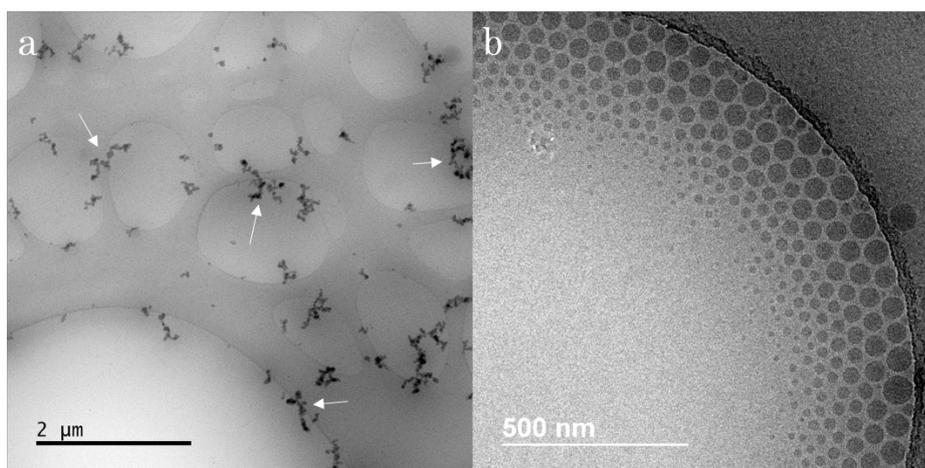


Figure 2.25 – Images MET d'artéfacts lié au cryo-MET et du comportement des nanoparticules cryo-fixées. (a) Contamination de la grille par des cristaux de glace. (b) Ségrégation des particules suivant leur taille.

L'automate de congélation utilisé au cours de cette thèse est un Vitrobot (Thermo Fisher Scientific). Les paramètres utilisés pour la cryo-fixation des différents matériaux seront définis ultérieurement (Chapitres 4.2.2.2 et 3.2.2.2). Pour ce qui est des grilles MET utilisées, les grilles C-Flat CF-2/1-2C-T (Protochips) ont été préférées pour leur tenue sous le faisceau d'électrons mais également pour l'épaisseur contrôlée de la membrane carbone qui est de 40 nm, contrairement aux grilles Agar 166-3 et Quantifoil (Figure 2.26). Trois porte-objets cryo simple rotation ont été utilisés : le modèle 626 de Gatan pour les observations en MET classique et les modèles 2550 de Fischione et 914 de Gatan pour la tomographie électronique.

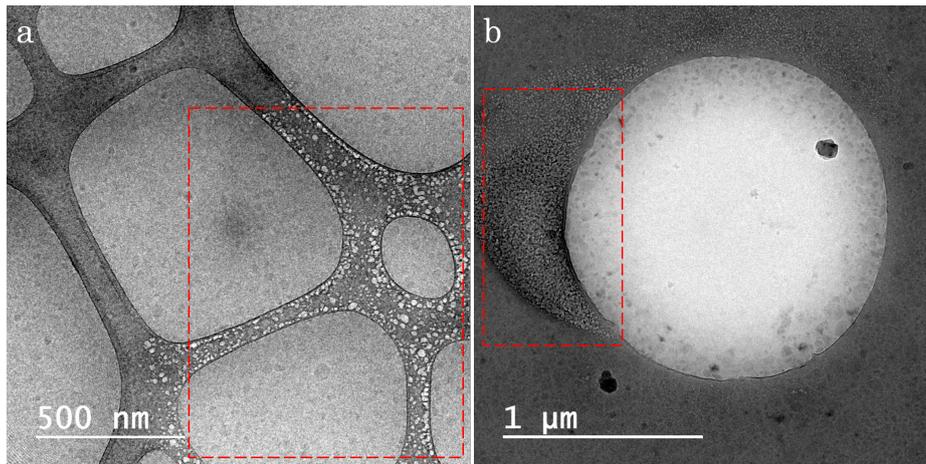


Figure 2.26 – Images cryo-MET des dégâts d'irradiation (rectangle rouge) d'une grille Agar 166-3 (a) et Quantifoil (b) après une dizaine de secondes sous le faisceau d'électrons.

2.2.2.3 *In-situ* liquide

Du fait des différents artefacts issus de la préparation d'échantillons, que ce soit en voie sèche ou par cryogénie, il peut être difficile de rendre compte de l'état natif de la suspension. Une solution pour contourner ces artefacts serait d'éviter tout changement d'état du milieu environnant les nanoparticules à analyser. Des dispositifs existent actuellement permettant de garder l'état liquide de la suspension en vue d'une observation : il s'agit du MET *in-situ* liquide [187]. Le principe de cette technique consiste à piéger hermétiquement la suspension dans un dispositif, composé de puces de silicium, vissé sur un porte-objet spécifique [188, 189]. Ce type de porte-objet peut fonctionner selon deux modes. Le premier est le **mode statique** utilisant une entretoise d'or déposée sur tout le pourtour de la micropuce de silicium inférieure afin de piéger la suspension entre l'entretoise et les puces inférieure et supérieure (Figure 2.27.a). L'observation se fait donc en système fermé. Seuls quelques dixièmes de microlitres sont nécessaires et peuvent être directement déposés sur la puce inférieure à l'aide d'une micropipette. Le second mode de fonctionnement est le **mode flux** qui lui permet de travailler en système ouvert. La puce inférieure est alors composée de quatre entretoises situées à chaque coin de la puce. Ainsi, l'accès est laissé libre au flux de nanoparticules pour s'insérer dans l'espace vide entre les puces supérieure et inférieure (Figure 2.27.b). Ceci est rendu possible grâce à des capillaires permettant au flux, dont la vitesse est contrôlable, d'arriver et de ressortir du dispositif [190]. Il est possible d'utiliser deux capillaires pour l'injection afin de réaliser directement des réactions chimiques à l'intérieur du microscope et de les observer en

2.3. Applications

temps réel [191]. Pour ce qui est des entretoises d'or, il en existe de différentes épaisseurs allant de la dizaine de nanomètres à plusieurs micromètres selon la taille des objets à observer. Seule une petite partie de la solution est observable au travers de fenêtres de nitrure de silicium de quelques micromètres situées sur chaque micropuce.

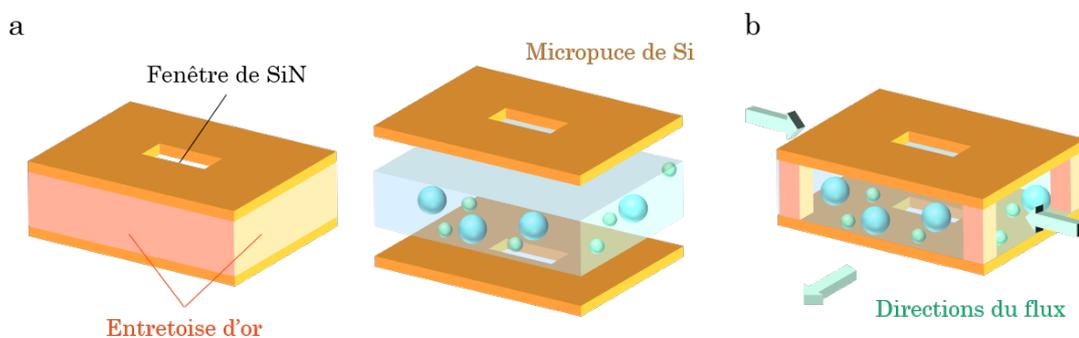


Figure 2.27 – Dispositif du porte-objet *in-situ* liquide. (a) Mode statique. (b) Mode flux.

Grâce à ce type de dispositif, aucune préparation d'échantillons n'est nécessaire. Ainsi, tout artefact lié à un changement d'état de la suspension est évité comme une déformation des particules ou encore leur agglomération. Le mouvement Brownien des nanoparticules étant relativement peu marqué, cela ne pose que rarement des problèmes lors de l'acquisition (particules hors du champ de vue de la caméra). Toutefois, du fait du faisceau d'électrons possédant une énergie assez intense, des phénomènes de radiolyse de l'eau peuvent se produire, c'est pourquoi il est recommandé de travailler avec une faible dose d'électrons et de limiter la surexposition [192]. Il est également possible, lors de l'interaction du faisceau d'électrons avec la suspension à analyser, de modifier la forme ou la taille des particules [193]. De même que pour les autres techniques d'observation (voie sèche et cryo), les particules organiques peuvent être difficilement observables et il peut donc être nécessaire de rajouter un contrastant dans la suspension [192].

Le porte-objet *in-situ* liquide ayant été utilisé pour cette étude est le porte-objet Poséidon (Protochips). Le mode statique a été préféré au mode flux à cause de contaminations dues aux expériences précédentes, ne permettant pas de distinguer les particules à analyser de celles précédemment étudiées. Une entretoise de 50 nm a été utilisée pour toutes les expériences afin d'avoir la meilleure résolution possible. Un volume de 0,3 μL de suspension a été déposé sur les micropuces avant de sceller le dispositif sur le porte-objet. Pour chaque observation menée avec ce porte-objet, l'état liquide de la suspension analysée a été attesté grâce à la visualisation du mouvement des particules en suspension.

2.3 Applications

Les différentes techniques expérimentales décrites au cours de ce chapitre, à savoir la DLS et le MALS avec ou sans fractionnement, et le MET, ont tout d'abord été mises en place sur des particules lipidiques appelées Lipidots utilisées pour la délivrance de médicaments (Chapitre 3). Les points développés au cours de ce chapitre ont ensuite servis de support à l'étude d'autres nanoparticules en milieu complexe : des oxydes métalliques utilisés dans les crèmes

solaires (Chapitre 4). Ces particules ont été choisies pour leur propriétés physico-chimiques très différentes des premières. Il sera vu que les routines de préparation et de caractérisation mises en place pour chacun de ces deux matériaux diffèrent les unes des autres.

Deuxième partie

Étude de nanoparticules en milieux
complexes

Caractérisation de nanoparticules organiques : les Lipidots

Sommaire

3.1	Nanoparticules lipidiques et nanomédecine	66
3.1.1	Nanomédecine	66
3.1.2	Nanomatériaux et nanomédecine	68
3.1.3	Vectorisation de molécules dans des nanoparticules	69
3.1.4	Nanoparticules lipidiques	74
3.1.5	Lipidots	76
3.1.6	Bilan	78
3.2	Caractérisation	80
3.2.1	Diffusion de la lumière	81
3.2.1.1	Mode batch (DLS)	81
3.2.1.2	Mode on-line (AF4-DLS-MALS)	82
3.2.1.3	Bilan intermédiaire LS	87
3.2.2	Microscopie Électronique en Transmission	88
3.2.2.1	Voie sèche	88
3.2.2.2	Cryogénie	95
3.2.2.3	<i>In-situ</i> liquide	108
3.2.2.4	Bilan intermédiaire MET	120
3.2.3	Discussion	121
3.2.3.1	Comparaison des techniques de caractérisation	121
3.2.3.2	Confrontation avec la bibliographie	126
3.3	Applications : étude de la stabilité des LNP	129
3.3.1	Influence du ratio cire/huile	129
3.3.2	Procédés de synthèse	132
3.3.3	Interaction avec des protéines	134
3.3.4	Bilan	137

Ce chapitre a pour but de définir une routine de caractérisation pour l'étude de nanoparticules organiques en s'appuyant sur des particules lipidiques. Dans un premier temps, un bref état de l'art concernant la nanomédecine et l'utilisation de particules lipidiques dans le cadre de traitements et de diagnostics a été réalisé. Diverses caractérisations ont été effectuées, avec les outils définis précédemment (Chapitre 2), sur des particules lipidiques appelées Lipidots. La routine de caractérisation ainsi établie a ensuite été mise en place pour l'étude de la stabilité de ces particules dans divers milieux.

3.1 Nanoparticules lipidiques et nanomédecine

3.1.1 Nanomédecine

La nanomédecine se définit comme étant à la fois une science et une technologie agissant au niveau moléculaire au moyen de dispositifs manufacturés et structures nanométriques [194, 8]. Elle permet de prévenir, diagnostiquer et soigner des maladies ou des lésions traumatiques, de soulager la douleur et de préserver et améliorer la santé. Ce sont les propriétés physico-chimiques mais aussi biologiques de ces nano-objets qui sont de plus en plus exploitées, afin de répondre aux besoins médicaux grandissants (Figure 3.1) [195]. Du fait de leur taille plus ou moins proche de celle d'éléments biologiques qui composent ou affectent le corps humain tels que les protéines, les peptides ou encore les antigènes, les nanomatériaux interagissent aisément avec ceux-ci, qu'ils soient en surface ou bien à l'intérieur de cellules [196].

Trois axes thématiques de recherche de nanomédecine ont été prioritaires, notamment par l'ETPN (European PlatForm on NanoMedicine), à savoir [197] :

- le nanodiagnostic ;
- la nanomédecine régénérative ;
- les nanosystèmes de délivrance de principe actif.

L'intérêt majeur du **nanodiagnostic** réside dans son efficacité à détecter certaines maladies ou infections à un stade encore primaire afin d'être le plus efficace possible lors du traitement [198, 199]. Ainsi, deux voies se sont développées autour des nanotechnologies pour le diagnostic. La première regroupe les outils de diagnostic *in-vitro* direct, à savoir la recherche d'antigènes, d'ADN ou d'ARN provenant directement de la source infectieuse, mais également indirect, c'est-à-dire la recherche d'une réponse immunitaire humorale qui correspond à la production d'anticorps [200, 199]. La dimension nanométrique de ceux-ci a pu, d'une part, augmenter l'efficacité de détection des agents pathogènes et de la réponse immunitaire par des biocapteurs grâce au rapport surface/volume élevé des nanomatériaux [201, 202]. D'autre part, cela a considérablement diminué la taille et automatisé le dispositif final qui peut alors se présenter sous la forme de bandelettes réactives ergonomiques, par exemple, pouvant être utilisées pour le dépistage en laboratoire ou par le patient lui-même [201, 203]. Ceci permet également de réduire les coûts des dispositifs de dépistage et donc de les rendre accessibles à un maximum de personnes [204]. Un autre axe de recherche concerne le diagnostic *in-vivo* notamment en ce qui concerne l'imagerie médicale. En effet, la sensibilité des outils d'imagerie, que ce soit l'IRM, l'échographie, ou encore les rayons X, peut être grandement améliorée en utilisant des molécules fluorescentes ou des agents de contrastes incorporés dans des nanoparticules. Ces dernières ciblent exactement les zones cancéreuses, par exemple, même à un stade très primitif à l'échelle d'une seule cellule [205, 206]. Le problème majeur de cette technique d'imagerie reste la cytotoxicité des nanoparticules utilisées comme les boîtes quantiques (Quantum dots - CdSe-ZnS) qui, pour limiter ce phénomène, doivent être enrobées [207, 208].

Les nanotechnologies jouent également un rôle non négligeable dans la **médecine régénérative** [209, 210]. Certaines surfaces des tissus biologiques ou osseux sont naturellement composées de nanoéléments qui peuvent être reproduits ou mimés *in-vitro*. Combinés à des facteurs de croissance ou des antibiotiques, ces derniers accélèrent les mécanismes de régénération tissulaire ou osseuse en les stimulant grâce aux fortes interactions qu'ils ont avec les protéines présentes dans le corps humain [211]. Ainsi, il existe des implants recouverts d'hydroxyapatite, principal constituant minéral des os trabéculaires et se présentant sous la forme

3.1. Nanoparticules lipidiques et nanomédecine

de nanocristaux dans son état primitif, pouvant être implantés dans des défauts osseux suite à un traumatisme afin d'aider à sa régénération [212]. De même, il est démontré qu'une surface de stent en titane nanostructuré améliore grandement l'adhésion des cellules endothéliales sur celui-ci après une chirurgie vasculaire limitant alors les risques de thrombose [213].

Enfin, pour ce qui est des **nanotransporteurs de médicaments**, leur utilisation in-vivo suscite une réelle attention dans le domaine médical [214]. Ils permettent de modérer la toxicité de certaines molécules utilisées dans des traitements plus ou moins lourds et donc de limiter d'éventuels rejets ou effets secondaires liés à ceux-ci grâce à la mise en place d'un ciblage vers un site d'action biologique. En effet, les molécules utilisées telles qu'elles en chimiothérapie sont très agressives. Elles ont pour objectif de bloquer la mitose, c'est-à-dire la division cellulaire, caractéristique de cellules cancéreuses qui ont tendance à se multiplier de façon incontrôlée. Or les cellules saines sont également touchées ce qui explique les nombreux effets secondaires. Le fait de créer un ciblage permet à la molécule active d'être directement vectorisée et libérée auprès de la source maligne et donc de limiter cette cytotoxicité tout en améliorant l'efficacité du traitement [215]. Cette encapsulation permet également d'utiliser des médicaments qui, en conditions normales, seraient très peu solubles, ce qui augmente le panel de molécules disponibles [216]. La vectorisation de molécules à travers différents types de nanoparticules sera détaillée plus loin dans ce chapitre (Chapitre 3.1.3).

Les études concernant les nanoparticules et les surfaces nanostructurées appliquées à la médecine sont relativement récentes puisqu'elles datent de la fin des années 90 voire du début des années 2000 [217]. Elles connaissent des avancées majeures et se développent de plus en plus notamment en ce qui concerne le transport de molécules actives à des fins thérapeutiques (Figure 3.1) [218].

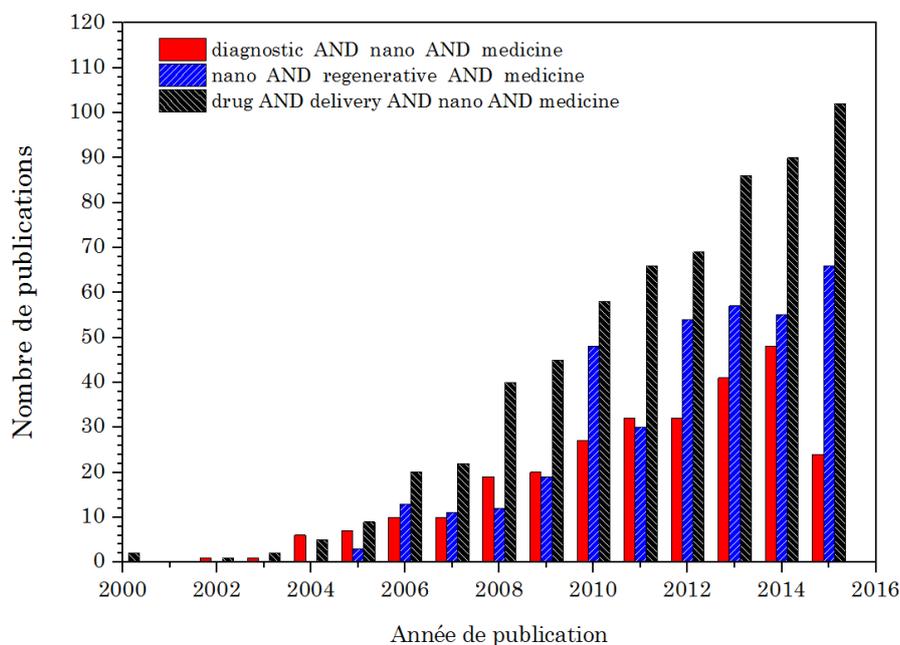


Figure 3.1 – Intérêt pour la nanomédecine dans la recherche. Résultats pour les mots clés "Diagnostic, nano & medicine", "Nano, regenerative & medicine" et "Drug, delivery, nano & medicine" entre les années 2000 et 2015 (source Scopus).

L'un des principaux défis de la nanomédecine est de pouvoir coupler diagnostic et thérapeutique, c'est la théranostique. Elle améliore la précision et l'efficacité du traitement en étant propre à chaque patient. Des études sont actuellement en cours sur ce sujet [219]. Ainsi, différents types de nanostructures, qu'elles soient métalliques ou organiques, peuvent être utilisées en nanomédecine selon les applications recherchées. Cet aspect est développé dans la prochaine section (Chapitre 3.1.2).

3.1.2 Nanomatériaux et nanomédecine

Les nanoparticules ou les nanostructures utilisées en thérapeutique, diagnostic ou médecine régénérative nécessitent d'être biocompatibles, c'est l'un des critères fondamentaux de la nanomédecine. La biocompatibilité est définie comme la capacité d'un matériau à mener sa fonction à bien sans engendrer de réponse inadéquate de son hôte dans une situation spécifique [220]. Ainsi, tout type de matériau peut être utilisé à partir du moment où il est biocompatible ou bien s'il l'est rendu par un enrobage biocompatible. Trois grandes classes de matériaux utilisés en nanomédecine se dégagent, à savoir les matériaux organiques, les matériaux métalliques et les matériaux semi-conducteurs, ces deux derniers pouvant être regroupés sous le nom des matériaux inorganiques [221].

Les **matériaux organiques** sont définis comme des matériaux composés d'atomes de carbone organisés en cycles ou en longues chaînes sur lesquels sont attachés d'autres atomes tels que l'oxygène, l'hydrogène, le phosphore ou encore l'azote. Les plus répandus en diagnostic et thérapeutique sont les polymères, comme le PEG (polyéthylène glycol) ou le PLGA (poly(acide lactide-co-acide glycolide)), qui peuvent être utilisés sous forme de nanoparticules, de nanofilms ou encore en enrobage sur des nanoparticules afin de fonctionnaliser leur surface [200, 222, 223, 224, 225]. D'autres particules, issues du biomimétisme de la membrane des cellules, se sont développées comme les liposomes. Ces particules sont le plus couramment utilisées comme systèmes de vectorisation de médicament ou de marqueurs contrastants ou fluorescents pour l'imagerie médicale et sont déjà commercialisées [226]. Elles suscitent un grand espoir en oncologie [227]. De nouveaux types de particules organiques voient le jour comme les particules lipidiques totalement biocompatibles et biodégradables afin de répondre à de nouvelles problématiques [228].

La classe des **matériaux inorganiques** associés à la nanomédecine regroupe essentiellement les métaux dans leur forme oxydée ou non. Le titane est l'un des métaux les plus connus pour sa biocompatibilité, c'est pourquoi il est beaucoup utilisé en chirurgie dentaire et orthopédique à l'état massif [229]. Il trouve cependant des applications lorsque sa surface est nanostructurée, notamment en médecine régénérative [213]. L'or, l'argent et la silice sont également utilisés dans leur forme nanoparticulaire en diagnostic et traitement, la silice pouvant aussi être couplée à du fer nanométrique pour ce type d'application [205, 221, 230, 231]. Cependant, ces matériaux peuvent poser des problèmes de toxicité [232]. Le platine est quant à lui utilisé sous forme de nanoparticules dans des outils de diagnostic *in-vitro* [202]. Le carbone sous forme de nanotube et de nanodiamant est considéré comme un matériau inorganique. Les nanotubes de carbone peuvent trouver des applications dans la régénération neuronale, par exemple, du fait de leur grande similarité avec les éléments composant le système nerveux (morphologie, conductivité électrique, ...) [209, 233, 234]. Pour ce qui est des nanodiamants, ils trouvent de nombreuses applications en nanomédecine que ce soit pour des outils de diagnostic *in-vitro* ou *in-vivo*, en tant que nanotransporteurs de médicaments [235]. Les matériaux inor-

3.1. Nanoparticules lipidiques et nanomédecine

ganiques regroupent également les nanoparticules minérales, comme l'hydroxyapatite (HA), plutôt utilisées en médecine régénérative [212]. Enfin, certains semi-conducteurs sont utilisés en imagerie et en thérapeutique sous la forme de nanoparticules quantiques (quantum dots) comme les particules cœur/coquille de CdSe-ZnS [236].

Une tendance d'un point de vue applicatif se dégage selon le type de matériau employé. Les particules inorganiques sont beaucoup utilisées en médecine régénérative et pour le diagnostic *in-vitro*. Tandis que les matériaux organiques sont préférés pour des applications thérapeutiques et de diagnostic *in-vivo* notamment en oncologie au travers de la vectorisation de médicaments ou de molécules contrastantes, par des nanoparticules fonctionnalisées en vue d'un ciblage. La notion de vectorisation par des nanoparticules est développée dans la prochaine section. Les nanomatériaux pour la médecine se sont fortement développés ces dernières années et touchent des domaines transverses de celles-ci que ce soit en orthopédie, en rhumatologie, en neurologie, en oncologie ou encore en cardiologie, ce qui explique leur intérêt grandissant (Figure 3.2).

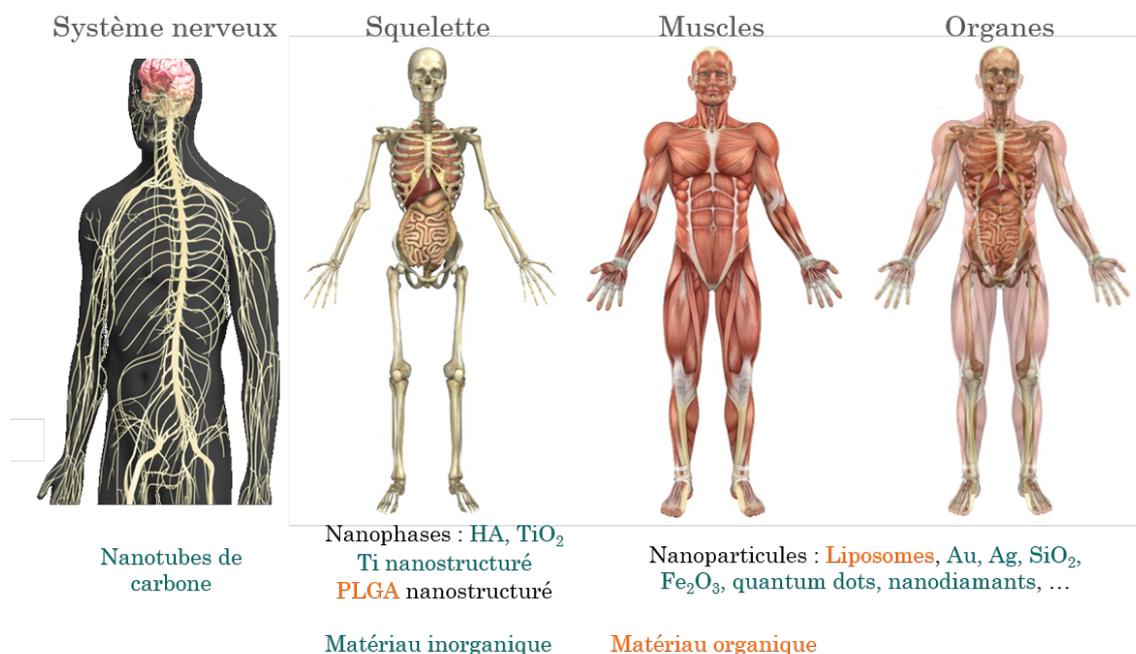


Figure 3.2 – Nanomatériaux et nanomédecine : thérapeutique et diagnostic.

3.1.3 Vectorisation de molécules dans des nanoparticules

Les recherches en nanomédecine se sont particulièrement concentrées sur les nanosystèmes de transport de molécules médicamenteuses ou fluorescentes. En effet, entre 2005 et 2016, la moitié des articles de nanomédecine leur était consacrée (Figure 3.3). Afin de comprendre l'intérêt d'un nanotransporteur, il est tout d'abord crucial de comprendre le mécanisme d'action d'un médicament.

Tout d'abord, celui-ci doit franchir les nombreuses barrières physiologiques et biologiques liées à son administration. Il existe différentes formes d'administration, les voies orale et

parentérale (intraveineuse, sous-cutanée et intramusculaire) étant les plus courantes, le médicament utilisé doit donc être soluble. Dans les deux cas, les molécules ingérées ou injectées se retrouvent dans le système sanguin et subissent des interactions avec celui-ci pouvant neutraliser leurs effets s'ils sont reconnus comme des agents étrangers par les différents acteurs du système immunitaire [237]. Si le médicament réussit à franchir ces obstacles, il est ensuite véhiculé dans tout le corps grâce aux nombreux vaisseaux sanguins et peut alors interagir avec la zone à traiter. Son principe de fonctionnement repose sur une interaction chimique entre la molécule active et un ou plusieurs constituants des cellules afin d'induire une réponse pharmacologique du corps humain. Afin de ne pas se disperser dans tout le corps et donc pour plus d'efficacité, la molécule doit se lier à une cible protéique de ce dernier comme un récepteur ou encore une enzyme [238]. La molécule nécessite donc de présenter certains marqueurs afin de s'activer seulement au contact des sites concernés, ce qui permet également de réduire la concentration de molécules actives dans le traitement. Cependant, il arrive que des cellules saines présentent ces marqueurs et que la molécule s'active donc à leur contact comme c'est le cas en chimiothérapie. En effet, cette dernière stoppe la prolifération cellulaire aussi bien pour les cellules cancéreuses que pour les cellules saines et les quantités injectées tout au long du traitement sont conséquentes pour améliorer les chances de guérison, ce qui augmente donc les effets toxiques du traitement [239].

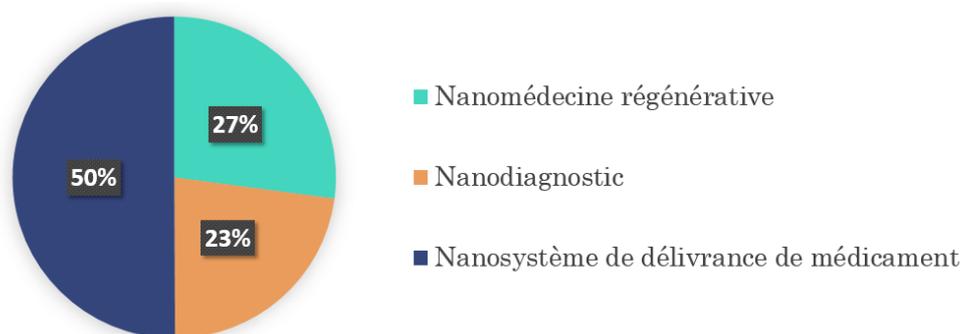


Figure 3.3 – Pourcentage d'apparition des termes "médecine régénérative", "diagnostic" et "système de délivrance de médicaments" en lien avec la nanomédecine dans la littérature entre les années 2005 et 2016 (source Scopus).

L'utilisation de nanotransporteurs de médicaments prend alors tout son sens. Leur vectorisation se faisant au travers du système sanguin et donc des capillaires, leur taille ne doit pas excéder le micromètre pour ne pas provoquer de caillot et donc un infarctus ou un AVC. Idéalement, leur taille doit être inférieure à la centaine de nanomètre pour une meilleure internalisation dans les cellules ciblées, ce qui augmente leur probabilité d'interaction avec les cellules [240].

Il permettent de protéger les molécules actives en leur sein grâce à leur encapsulation, ce qui permet d'augmenter leur durée de vie dans l'organisme jusqu'à ce qu'elles soient véhiculées auprès de leur site d'action : c'est la **vectorisation par ciblage passif** [241, 242]. De plus, l'ajout d'une couche de polymère hydrophile, comme le PEG ou le chitosan, en surface des particules prévient leur reconnaissance par le système immunitaire et donc améliore leur vectorisation [243]. Le ciblage passif est notamment efficace dans le traitement de tumeur, c'est-à-dire un développement anormal de cellules au niveau d'un tissu sein. En effet, lors du

3.1. Nanoparticules lipidiques et nanomédecine

développement d'une tumeur, de nombreux vaisseaux sanguins se forment afin d'irriguer celle-ci, c'est l'angiogenèse [244]. Or cette nouvelle vascularisation comporte des anomalies dont notamment une certaine perméabilité au niveau des cellules endothéliales qui tapissent la face interne des vaisseaux, laissant le champ libre aux nanoparticules pour être diffusées dans la tumeur. Le drainage lymphatique au niveau de la tumeur est également affaibli, compliquant leur élimination. Ces deux altérations sont connues sous le nom d'effet EPR (Figure 3.4 - encadré rouge). Grâce à ce système d'encapsulation, il est désormais possible d'injecter des médicaments jusqu'alors mis de côté car très peu hydrosolubles [245]. Cependant, le ciblage passif peut se révéler insuffisant dans le cas de tumeurs de taille conséquente ou bien peu efficace dans le traitement de métastases [246].

Afin de remédier à ces problèmes et donc d'améliorer l'efficacité des traitements, une nouvelle génération de vecteurs a été développée. Elle repose sur la même formulation que les vecteurs à ciblage passif, avec en plus des marqueurs (anticorps, protéines) greffés en surface de leur membrane ou coquille permettant de cibler très précisément et directement leur site d'action : c'est le **ciblage actif** (Figure 3.4 - encadré bleu). Leur internalisation (endocytose) dans les cellules ciblées en est facilitée. De ce fait, les quantités de médicaments injectées sont donc réduites et le ciblage est quant à lui plus effectif [247, 248, 249].

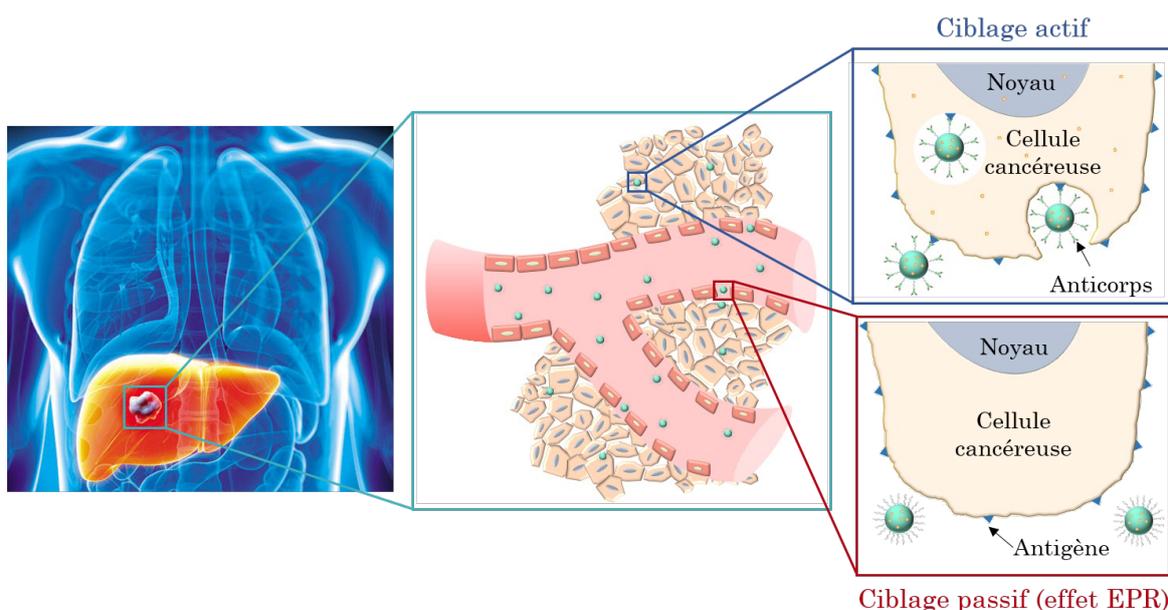


Figure 3.4 – Principe d'action d'un nanotransporteur dans le cas de ciblage passif et actif (schéma adapté de [250, 251]).

Différentes nanoparticules sont actuellement en cours d'étude ou bien déjà commercialisées dans la délivrance de médicaments ou le diagnostic, à savoir :

- les **nanocoquilles** comportant un cœur inorganique et une coquille métallique (Figure 3.5.a) [252, 253] ;
- les **boîtes quantiques** (quantum dots), composés de matériaux semi-conducteurs (Figure 3.5.b) [236, 254, 255] ;
- les **liposomes**, composés d'une ou plusieurs couches lipidiques et d'un cœur aqueux

- hydrophile (Figure 3.5.c) [51, 256] ;
- les **particules lipidiques simple membrane**, possédant un cœur hydrophobe, contrairement aux liposomes (ces particules sont l'objet de la prochaine section) (Figure 3.5.d) [257, 258] ;
 - les **polymersomes**, qui sont des vésicules de polymères synthétiques dont la structure est très proche de celle des liposomes (Figure 3.5.e) [259, 260, 261] ;
 - les **dendrimères**, issues de polymères monodisperses (Figure 3.5.f) [262] ;
 - les **micelles**, qui peuvent être à base de polymère ou bien de lipides (Figure 3.5.g) [224, 263].

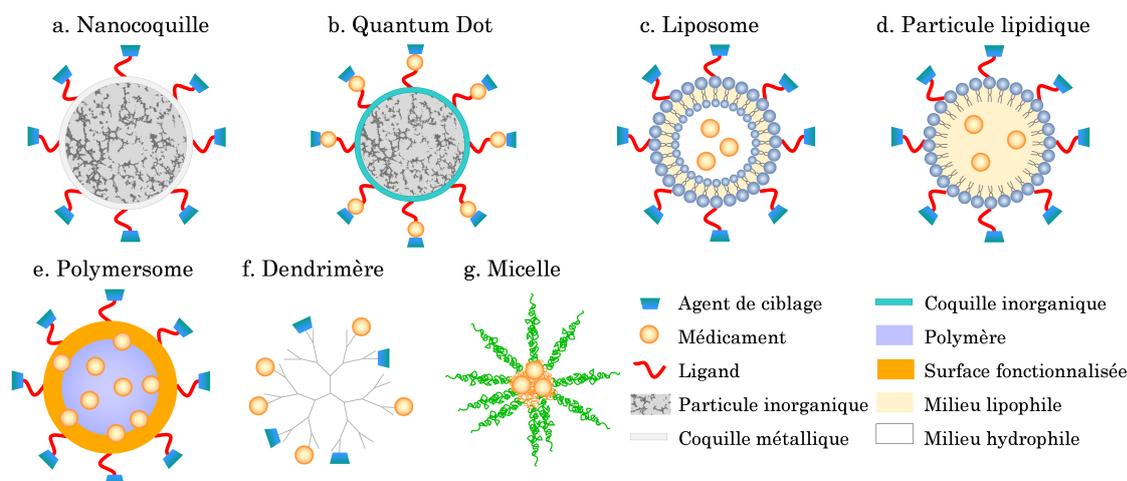


Figure 3.5 – Nanoparticules pour la délivrance de médicaments.

Ces particules présentent de nombreux avantages mais également certains inconvénients, dont une liste non exhaustive est présentée dans le tableau ci-dessous (Tableau 3.1) [237]. Il apparaît qu'une majeure partie d'entre elles sont **toxiques** soit du fait des matériaux présents en leur sein (comme le cadmium dans le cas des boîtes quantiques), soit du fait des solvants organiques utilisés lors de leur synthèse (comme les dendrimères). Ainsi, les **nanoparticules lipidiques** et les **liposomes** se démarquent car leur synthèse ne nécessite pas l'utilisation de solvants organiques et elles sont **biocompatibles** et **biodégradables**. C'est pourquoi l'étude concernant les nanotransporteurs de médicaments s'est principalement concentrée sur les vecteurs lipidiques (Chapitre 3.1.4). Des études sont actuellement en cours pour mettre en évidence la forme de particule qui serait la plus adaptée à la délivrance de médicaments [264].

3.1. Nanoparticules lipidiques et nanomédecine

Tableau 3.1 – Avantages et inconvénients de sept types de nanotransporteurs de principes actifs.

Nanotransporteurs	Avantages	Inconvénients
Nanocoquilles	Diffusion (diagnostic amélioré) et/ou absorption (destruction des cellules cancéreuses) de la lumière sur un large spectre [253]	Non biodégradables, accumulation dans le corps, toxiques à long terme [253]
Quantum dots	Propriétés optiques intéressantes pour l'imagerie et le marquage [254]	Non biodégradables, accumulation dans le corps, toxiques à long terme [265]
Liposomes	Biodégradables Concentration interne de principe actif importante Ciblage actif et passif [256] Principe actif amphiphile [87]	Pas de délivrance orale possible Problème de stérilisation [256]
Nanoparticules lipidiques	Délivrance orale possible Composants naturels (glycérides) biodégradables Préparation par HPH (Homogénéisation Haute Pression) (sans solvant)	Principe actif nécessairement lipophile
Polymersomes	Principe actif hydrophile, hydrophobe ou amphiphile Biodégradables [87]	Utilisation de solvants organiques lors de la synthèse, purification compliquée Ciblage à améliorer [260]
Dendrimères	Monodisperses Même topologie que de nombreux systèmes biologiques (ramifications importantes) [262]	Utilisation de solvants organiques lors de la synthèse, purification compliquée [262] Potentiellement toxiques
Micelles	Tailles très petites (5 à 100 nm), accumulation dans les zones cancéreuses Concentrations importantes dans le sang [224] Biodégradables [87]	Amorceur toxique, purification compliquée [224]

3.1.4 Nanoparticules lipidiques

Il a été vu précédemment que de nombreux types de vecteurs nanoparticulaires existent. Cependant, ces derniers doivent présenter certains critères indispensables à leur utilisation en terme de biocompatibilité, biodégradabilité et innocuité, parfois complexes à remplir simultanément. Les nanoparticules organiques, et plus particulièrement les particules lipidiques, répondent à l'ensemble de ces critères.

Les lipides sont les éléments constitutifs de la matière grasse qui compose tout être vivant. Ils sont généralement composés de molécules possédant une **tête hydrophile** et une **queue hydrophobe** (Figure 3.6) [266]. Ainsi, du fait de leur origine physiologique, ils sont naturellement assimilables par le corps humain et donc **biocompatibles**, **biodégradables** et **non toxiques**. Contrairement à d'autres types de nanotransporteurs, ils ont la capacité de passer certaines barrières physico-chimiques du corps humain du fait de l'encapsulation lipidique du médicament, ce qui leur laisse le temps d'être acheminés jusqu'à leur site de délivrance sans être préalablement dégradés ou assimilés [267]. Un autre avantage vient de leur synthèse qui reste simple à mettre en œuvre, contrairement aux particules polymériques qui nécessitent des synthèses lourdes [268]. Ces caractéristiques expliquent leur intérêt croissant en médecine, où ils trouvent notamment des applications pour la vectorisation de molécules. En effet, l'utilisation de vecteurs lipidiques améliore grandement la solubilité et l'absorption des médicaments peu solubles dans l'eau [228]. Ainsi, des molécules jusqu'alors mises de côté du fait de leur incompatibilité avec leur transporteur peuvent désormais être envisagées pour des traitements.



Figure 3.6 – Représentation d'une molécule amphiphile composant un lipide.

Il existe différents types de vecteurs lipidiques, les plus connus étant les liposomes. Il s'agit de vésicules sphériques composées d'une ou plusieurs couches de phospholipides et dont le cœur est aqueux donc hydrophile [269]. Leur taille peut varier de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs microns selon le type de liposomes synthétisés. Ces nanocapsules sont les premières particules lipidiques à avoir passé les essais cliniques et donc à avoir été commercialisées dans le cadre de traitements par chimiothérapie de certains cancers, comme le cancer du sein [248, 249, 270, 271]. De par leur structure, des principes actifs aussi bien hydrophiles qu'hydrophobes peuvent être respectivement encapsulés dans le cœur ou la couche de phospholipides [256]. Cependant, leur synthèse nécessite l'utilisation de solvants organiques, tels que l'éthanol, pouvant interagir avec l'organisme une fois injecté mais également limiter la stabilité des particules dans le temps que ce soit pour leur conservation ou bien dans l'organisme, restreignant leur action [272, 273].

Les lipides présentant de nombreux avantages pour la véhiculation de principes actifs, d'autres types de particules que les vésicules lipidiques ont vu le jour. Tout d'abord, des nanoparticules issues d'**émulsions huile/eau** (O/W, oil/wax) furent élaborées dans les années 80. Une nanoémulsion O/W consiste à disperser des nanogouttelettes d'huile dans une phase aqueuse, le tout étant stabilisé par un surfactant [274]. Bien que ce type de particule puisse

3.1. Nanoparticules lipidiques et nanomédecine

solubiliser un large panel de molécules lipophiles, sa stabilité reste néanmoins très fragile dans le temps.

C'est pourquoi la recherche s'est ensuite tournée vers d'autres types de particules lipidiques, avec une phase lipidique non plus liquide mais plus ou moins solide. Regroupées sous le nom de nanoparticules lipidiques (LNPs - Lipid NanoParticles), il en existe actuellement quatre types à savoir [275] :

- les SLN (Solid Lipid Nanoparticle) : nanoparticules lipidiques solides (Figure 3.7.a) ;
- les NLC (Nanostructured Lipid Carrier) : transporteurs lipidiques nanostructurés (Figure 3.7.b) ;
- les LDC (Lipid-Drug Conjugate) : conjugués lipide - principe actif (Figure 3.7.c) ;
- les LNC (Lipid NanoCapsule) : nanocapsules lipidiques (Figure 3.7.d).

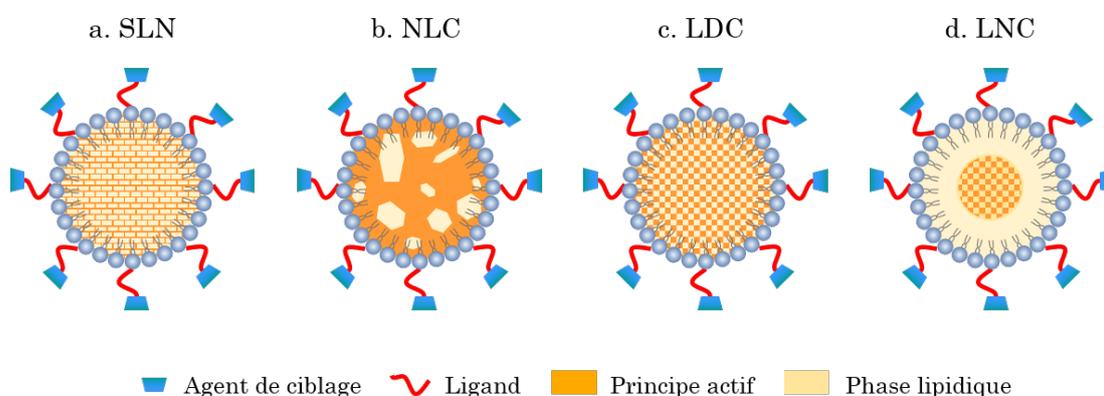


Figure 3.7 – Représentation des quatre grands groupes de nanoparticules lipidiques.

Les **SLN** sont les premières nanoparticules lipidiques autre que les vésicules à avoir été développées. Leur innovation repose sur une phase lipidique solide à température ambiante et non plus sur un lipide liquide comme c'est le cas pour les nanoémulsions [276, 277, 278, 279]. Ainsi, d'autres types de lipides ont pu être envisagés dans leur formulation comme les cires ou encore les glycérides [280]. Le problème de ce type de transporteur vient de sa structure cristalline parfaite, empêchant le principe actif de s'y insérer correctement et pouvant donc conduire à l'expulsion prématurée de ce dernier [268].

Afin de contourner ce problème, le cœur de la particule a été modifié par l'ajout de lipide liquide dans la structure solide lors de la synthèse, il s'agit des **NLC** [281]. La structure finale du cœur est toutefois solide mais amorphe ou cristalline imparfaite. Ainsi, le principe actif peut s'insérer librement entre les chaînes de lipides [258].

Plutôt que d'intervenir sur la nature du lipide, il est également possible de modifier la formulation du principe actif hydrophile en le conjuguant à un lipide insoluble dans l'eau, comme c'est le cas pour les **LDC** [282]. Ainsi, le lipide et la molécule active sont solidaires l'un de l'autre pour former un principe actif lipidique. Ces trois types de particules sont synthétisés soit par ultrasons pour de petites quantités (tests laboratoire) soit par homogénéisation haute pression (HPH) pour des quantités industrielles.

Le quatrième type de nanoparticules lipidiques, les **LNC**, sont quant à elles des nanocapsules lipidiques [283]. Leur cœur est composé d'huile liquide ou semi-liquide et leur coquille

d'un lipide solide à température ambiante [275]. Contrairement aux trois autres types de LNP, les LNC sont synthétisées selon un procédé d'inversion de phase avec la température (PIT). Ces quatre types de LNP sont très prometteurs pour la délivrance de médicaments et le diagnostic de cancers, mais aussi dans le cadre de la thérapie génique ou cellulaire.

3.1.5 Lipidots

Les nanoparticules sur lesquelles s'est concentrée une partie de cette thèse sont des **NLC** appelés **Lipidots**TM, et développés par le CEA-LETI. Il s'agit d'une **nanoémulsion** de plusieurs lipides : un lipide solide composé de **cire** synthétique (Suppocire[®] NC, Gattefossé) et un lipide liquide issu d'**huile de soja** (Super RefinedTM Soybean, CRODA). Ces derniers forment le cœur de la particule et sont stabilisés par une monocouche de surfactants composés de phosphatidylcholine, plus connue sous le nom de **lécithine** (Lipoid S 75, Lipoid) et de stéarate de **PEG** (MyrjTM S40, CRODA) (Figure 3.8) [284]. Ce dernier se trouve à l'extrême surface des particules et permet d'empêcher les protéines, notamment celles présentes dans le sang, de s'adsorber en surface des LNP [241]. Ainsi, les particules lipidiques ne sont pas reconnues par le système immunitaire comme étant des pathogènes, ce qui améliore leur stabilité une fois injectés [280]. Tous ces composants sont entièrement biocompatibles et biodégradables, validés par l'industrie pharmaceutique et facilement éliminés par l'organisme [285].

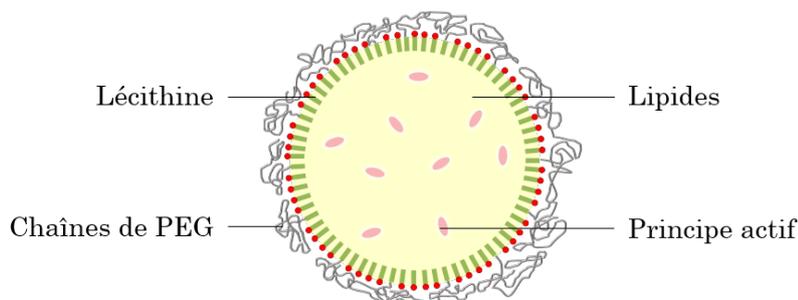


Figure 3.8 – Représentation d'un Lipidot et de ses constituants (adapté de [286]).

Du fait des lipides qui le composent, le cœur des Lipidots ne peut accueillir que des principes actifs **lipophiles** et **amphiphiles** [287]. Leur taille varie selon la composition interne de lipides, notée $NCXX$ pour une fraction massique de cire XX . Elle peut également être modulée grâce au ratio lipides/surfactants. Il apparaît que la taille des Lipidots varie selon la concentration interne en cire d'autant plus que le ratio surfactants/lipides est petit (Figure 3.9). Des formulations de références, notées FYY ont ainsi été établies, où YY représente l'arrondi à la dizaine du diamètre moyen des particules issues de ces formulations (Tableau 3.2). La majeure partie des analyses effectuées dans le cadre de cette étude ont été faites sur des **LNP F80 NC75** et **F50 NC25**, correspondant respectivement à des particules d'environ 80 nm de diamètre comportant 75% de cire dans le cœur et 50 nm de diamètre comportant 25% de cire dans le cœur.

3.1. Nanoparticules lipidiques et nanomédecine

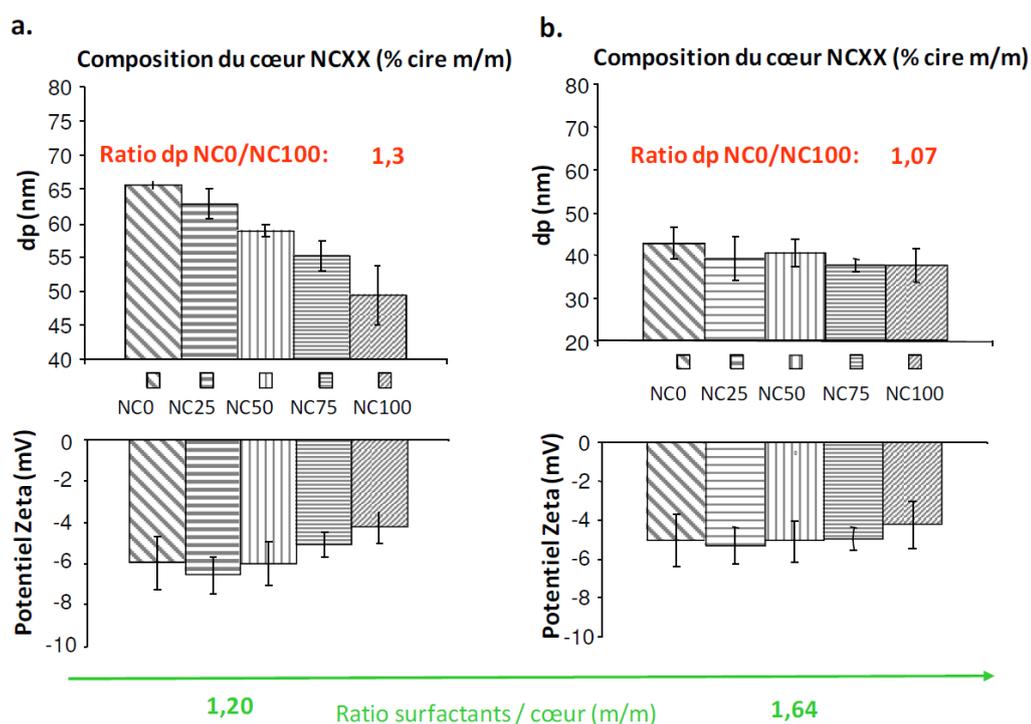


Figure 3.9 – Influence de la concentration en cire du cœur et du ratio lipides/surfactants sur la taille et le potentiel zêta des Lipidots [284].

Tableau 3.2 – Formulations de références des Lipidots [284]

FYY	Eau/PBS (mg)	Cœur lipidique (mg)	Lécithine (mg)	PEG (mg)	D_h (nm)	PDI (UA)	Potentiel zêta (mV)
F30	1400	100	150	350	30,6 ± 1,8	0,177 ± 0,034	-4,9 ± 1,8
F50	1250	340	65	345	54,5 ± 2,4	0,168 ± 0,030	-5,1 ± 2,5
F80	1240	410	50	300	81,3 ± 2,9	0,158 ± 0,011	-6,6 ± 0,3
F100	1060	575	50	325	94,6 ± 2,8	0,127 ± 0,017	-6,9 ± 1,1
F120	1140	600	45	215	122,2 ± 2,5	0,106 ± 0,012	-8,4 ± 0,4

3.1.6 Bilan

Cette section a défini, dans une première partie, ce qu'est la nanomédecine au travers des trois grands axes de recherches qui la composent à savoir le nanodiagnostic, la nanomédecine régénérative et enfin les nanosystèmes de délivrance de principe actif, secteur phare de la nanomédecine. Il a été vu que différents matériaux peuvent être utilisés pour ces applications, qu'ils soient organiques ou inorganiques. Ils trouvent leurs applications dans tout l'organisme, que ce soit sur le système nerveux, le squelette, les muscles ou encore les organes.

Une partie de ces travaux s'est orientée vers la vectorisation de molécules dans des nanoparticules de type cœur/coquille (Figure 3.10). Elle permet d'améliorer grandement l'efficacité des traitements ou diagnostics grâce aux ciblage passif et actif. Différents types de nanotransporteurs existent comme les nanocoquilles, les boîtes quantiques (ou quantum dots), les polymersomes, les dendrimères, les micelles, les liposomes ou encore les particules lipidiques. Ces dernières, du fait de leur origine physiologique, sont entièrement biocompatibles et biodégradables. Elles sont regroupées en quatre catégories selon la structure de leur cœur : les SLN (nanoparticules lipidiques solides), les NLC (transporteurs lipidiques nanostructurés), les LDC (conjugués lipide - principe actif) et enfin les LNC (nanocapsules lipidiques). Les LipidotsTM, sur lesquels reposent cette partie, sont des NLC synthétisés par ultrasons au CEA-Leti et nécessitent une caractérisation poussée (Chapitre 3.2).

3.1. Nanoparticules lipidiques et nanomédecine

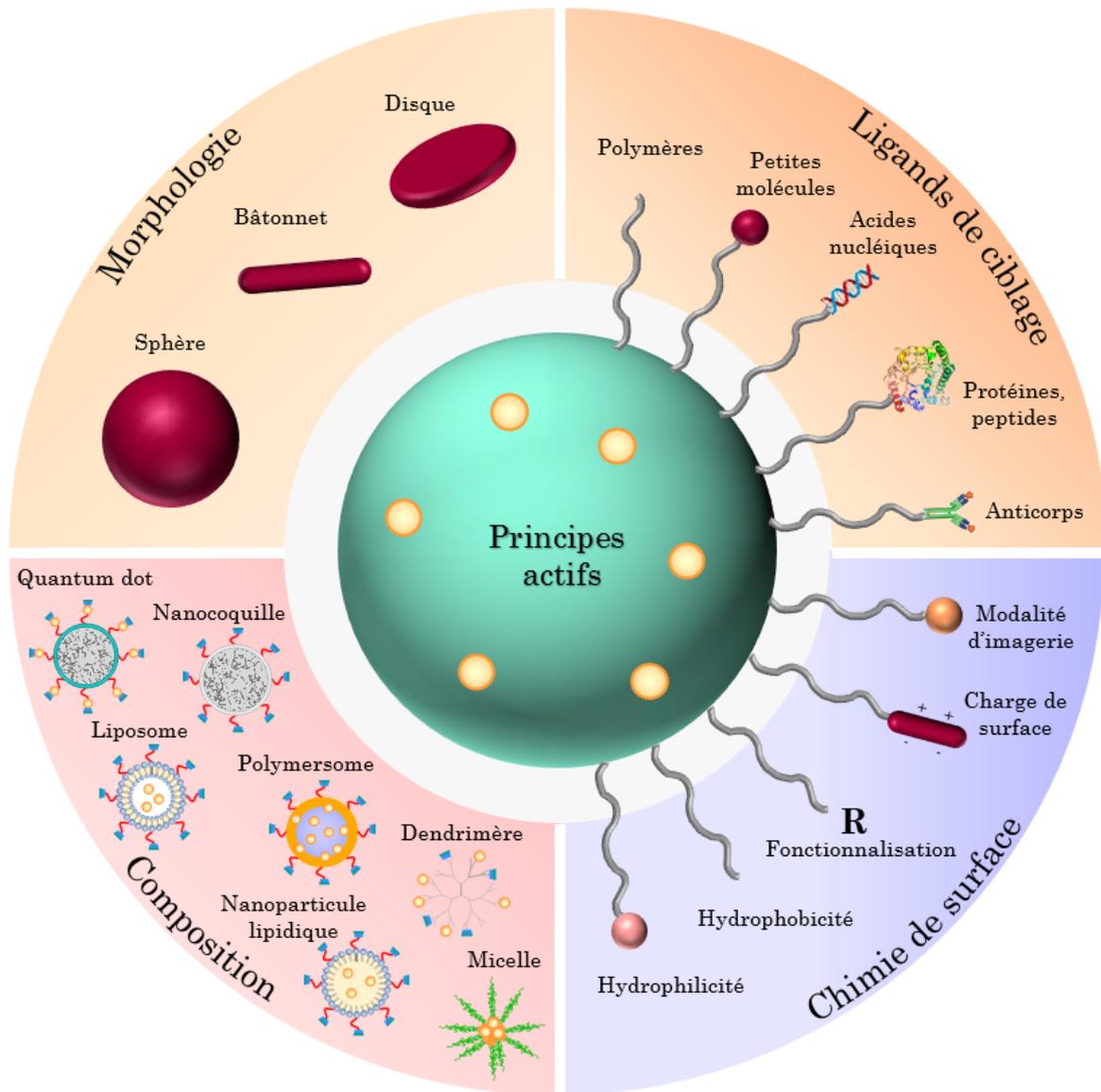


Figure 3.10 – Nanotransporteurs de principes actifs : morphologie, composition, chimie de surface et fonctionnalisation (adapté de [288]).

3.2 Caractérisation

Cette section présente les différentes caractérisations morphologiques effectuées sur des LNP F80 NC75 par DLS et MALS, dans un premier temps, en mode batch et en mode on-line puis par MET avec les différents types de préparation d'échantillons qui lui sont associés.

Plusieurs lots, comprenant de 90 à 110 mg/mL de lipides chacun, ont été nécessaires pour réaliser les différentes analyses. En effet, le volume de LNP synthétisées par ultrasons est limité à quelques millilitres, contrairement aux lots synthétisés par HPH. De plus, les LNP ont tendance en vieillissant à subir des modifications morphologiques, c'est pourquoi il est préférable de travailler avec des lots récemment synthétisés (vieillesse inférieure à 1 mois) ou bien de réaliser les différentes analyses aux mêmes instants (Figure 3.11). La taille des LNP peut également présenter une légère variabilité d'un lot à un autre de quelques nanomètres, pouvant aller jusqu'à ± 10 nm dans le pire des cas, ce qui n'a pas été le cas de manière significative dans cette étude (Annexe B).

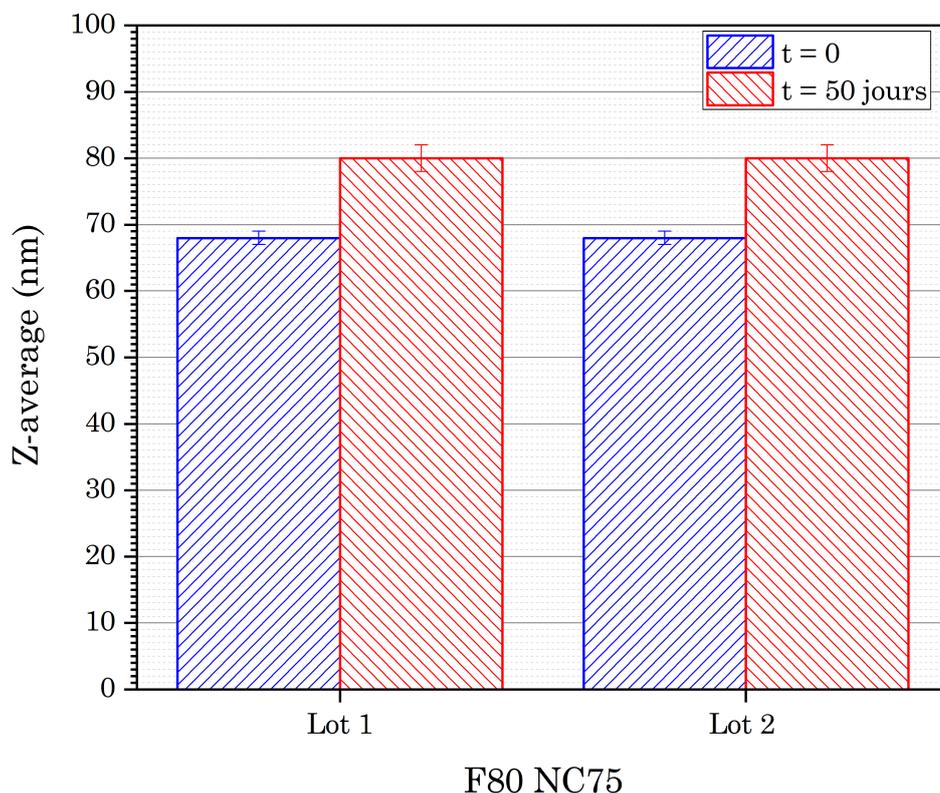


Figure 3.11 – Analyse du diamètre hydrodynamique (z-average) obtenu par DLS en mode batch après vieillissement de deux lots de F80 NC75 à température ambiante pendant 50 jours.

Afin de rester cohérent dans la comparaison des données obtenues, seuls le diamètre moyen \bar{X} , le mode x_m , l'écart-type s , la médiane d_{50} et les valeurs minimales et maximales des tailles des particules ont été relevés, dans la mesure du possible, pour chaque technique de caractérisation.

3.2. Caractérisation

3.2.1 Diffusion de la lumière

3.2.1.1 Mode batch (DLS)

Les LNP F80 NC75 ont tout d'abord été analysées par DLS en mode batch, après avoir été diluées à hauteur de 0,5 mg/mL de lipides dans de l'eau ultra-pure. Les distributions de taille différentielle et cumulative en intensité obtenue par cette technique de caractérisation sont représentées ci-dessous (Figure 3.12). Au total, 10 séries de mesures ont été réalisées sur le même lot afin d'attester de la conformité des résultats obtenus.

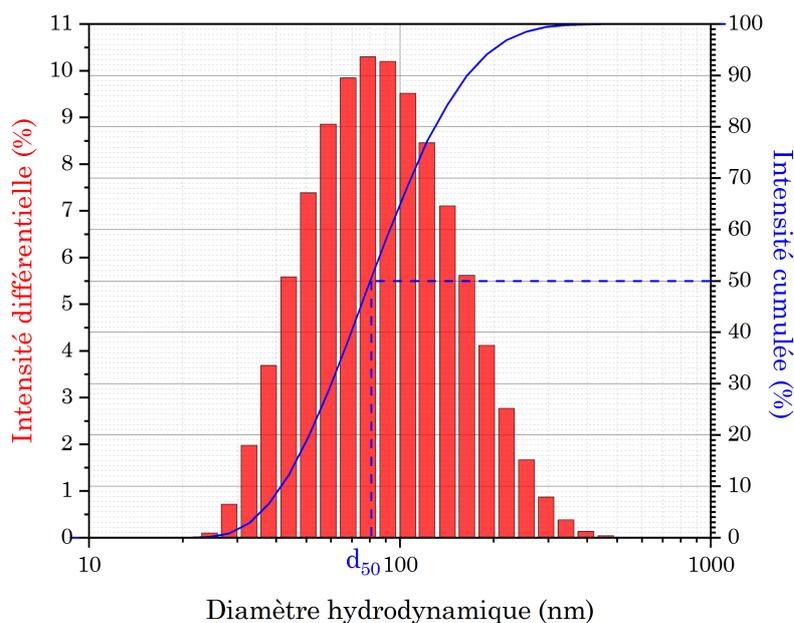


Figure 3.12 – Distributions de taille différentielle (rouge) et cumulée (bleu) en intensité des LNP F80 NC75, obtenues par DLS en mode batch.

Le **diamètre hydrodynamique moyen**, calculé à partir de la distribution différentielle de taille, est de 101 ± 1 nm et l'**écart-type** de 57 ± 1 nm (Chapitre 2.1.1). La valeur donnée par le z-average du logiciel, qui est de 79 nm, est assez éloignée du diamètre moyen issu de la distribution de taille, ce qui suggère une polydispersité des LNP. Pour ce qui est du **mode**, il est déduit directement du maximum du pic de la distribution différentielle de taille, ce qui correspond à 79 ± 1 nm. La distribution de taille des LNP est relativement large, ce qui est confirmé par les **valeurs minimale et maximale** de diamètres hydrodynamiques mesurés qui sont respectivement de l'ordre de **20 nm et 500 nm**. L'indice de polydispersité (PDI) étant de 0,213, ceci corrobore une nouvelle fois la polydispersité de la suspension de LNP, puisqu'il est compris entre 0,08 et 0,7 (Chapitre 2.1.1, Tableau 2.1). En ce qui concerne la **taille médiane**, elle est quant à elle obtenue à partir de la distribution cumulative et est de **81 nm** environ. Le z-average et le PDI sont cohérents avec ceux issus de la bibliographie lors d'analyses mises en place ultérieurement, ce qui confirme la reproductibilité de la technique d'analyse (Tableau 3.2, Chapitre 3.1.5) [284].

En ce qui concerne la fiabilité des résultats obtenus, celle-ci peut être remise en question. En effet, la DLS en mode batch montre des particules assez polydispersées en taille, les plus grosses particules pouvant masquer les plus petites. C'est pourquoi il est préférable de coupler

cette technique à une technique de séparation et notamment l'AF4, pour confirmer ou non cette grande disparité de tailles de particules. De plus, le logiciel d'acquisition des données de DLS ici utilisé impose obligatoirement une distribution gaussienne des données pour une échelle logarithmique de l'axe des abscisses (représentant la taille des particules), soit une distribution log-normale pour une échelle linéaire. Cette contrainte peut ne pas être représentative de la distribution de taille des particules en suspension et masquer des populations dans le cas d'un échantillon pluri-modal (modes multiples très rapprochés).

3.2.1.2 Mode on-line (AF4-DLS-MALS)

Afin d'améliorer la détection des LNP, celles-ci ont ensuite été analysées par DLS puis par MALS, couplés à un module de fractionnement d'écoulement de champ par écoulement asymétrique (AF4).

Un tampon phosphate salin (PBS, Phosphate Buffered Saline) a été choisi comme éluant pour les différentes phases du flux transverse. Un flux constant de 1 mL/min est tout d'abord appliqué pendant les 16 premières minutes. Celui-ci décroît ensuite linéairement jusqu'à la 56^{ème} minute pour finalement être nul le reste de l'analyse (Figure 3.13 - courbe rouge). Les LNP, diluées à 0,5 mg/mL dans de l'eau ultra-pure, ont ensuite été injectées à hauteur de 30 μ L dans le canal de l'AF4 entre la 4^{ème} et la 9^{ème} minute. Le détecteur commence à enregistrer du signal à partir de la 20^{ème} minute et ce durant 15 minutes, il s'agit du profil d'éluion des LNP (Figure 3.13 - courbe bleue). Il est possible de déterminer un pourcentage massique de récupération de particules en sortie du canal de l'AF4, ceci dans le but d'estimer si une population de particules seraient ou non restée piégée dans la membrane de ce dernier. Pour les LNP ici étudiées, il est supérieur à 85% ce qui implique une perte minimale de particules et laisse donc suggérer que celle-ci n'influence pas les analyses.

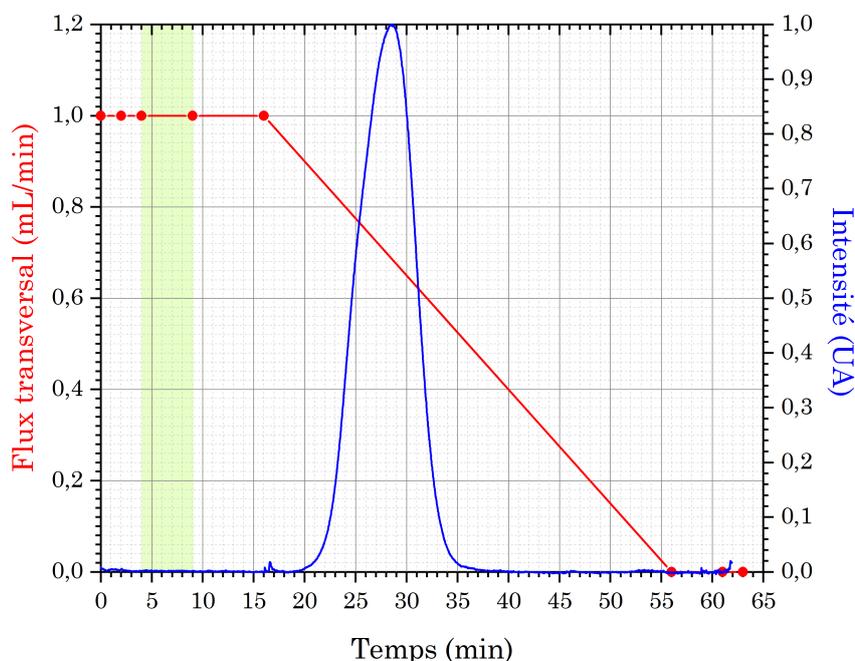


Figure 3.13 – Paramètres du flux transverse (rouge) et durée d'injection (vert) employés pour l'analyse des LNP F80 NC75 et profil d'éluion correspondant (bleu).

3.2. Caractérisation

Le diamètre moyen des particules ainsi que l'écart-type de la distribution de taille sont ici obtenus en moyennant les données interpolées sur le pic à partir du logiciel de traitement de données Astra (Wyatt Technology). Pour ce qui est de la valeur modale, celle-ci est directement déduite du pic d'élution en projetant le maximum d'intensité perçue par le(s) détecteur(s), situé entre 28 et 29 minutes après l'injection, sur la courbe de données représentant la taille des particules en fonction du temps d'injection (Figures 3.14 et 3.15). Les tailles minimales et maximales quant à elles sont également obtenues grâce à cette dernière. Enfin, pour ce qui est de la médiane, elle est issue de la distribution cumulative, tracée à partir de la distribution de taille différentielle en volume générée par le logiciel Astra (Figures 3.16 et 3.17). Ces différents paramètres sont récapitulés dans le tableau ci-dessous (Tableau 3.3).

Tableau 3.3 – Comparaison des diamètres hydrodynamiques et géométriques moyens, écarts-types, modes, médianes et tailles minimale et maximale (valeurs en nm) des LNP F80 NC75 obtenus par diffusion de la lumière en mode on-line.

Technique	\bar{X}	s	x_m	d_{50}	$D_{min} - D_{max}$
AF4-DLS	45	9	47	40	24 - 71
AF4-MALS	46	8	46	44	33 - 69

Théoriquement, le mode pourrait également être estimé à partir de la distribution de taille différentielle générée par le logiciel Astra. Cependant, il est préférable de déduire celui-ci des données brutes (pic d'élution) afin d'éviter dans la mesure du possible les approximations et erreurs générées par le logiciel de traitement de données. Toutefois, les valeurs obtenues par ces deux méthodes restent cohérentes.

Les distributions de tailles différentielles générées par Astra, que ce soit pour la DLS ou le MALS, sont toutefois discutables au vu de leur forme (Figures 3.16 et 3.17). En effet, s'agissant de nanoparticules, une distribution de type log-normale est attendue, ce qui n'est pas le cas ici contrairement à ce qui est obtenu dans la littérature pour d'autres types de LNP (Figure 3.18) [289]. Ainsi, les valeurs médianes issues des distributions cumulatives, elles-mêmes résultant des distributions différentielles, peuvent être critiquables.

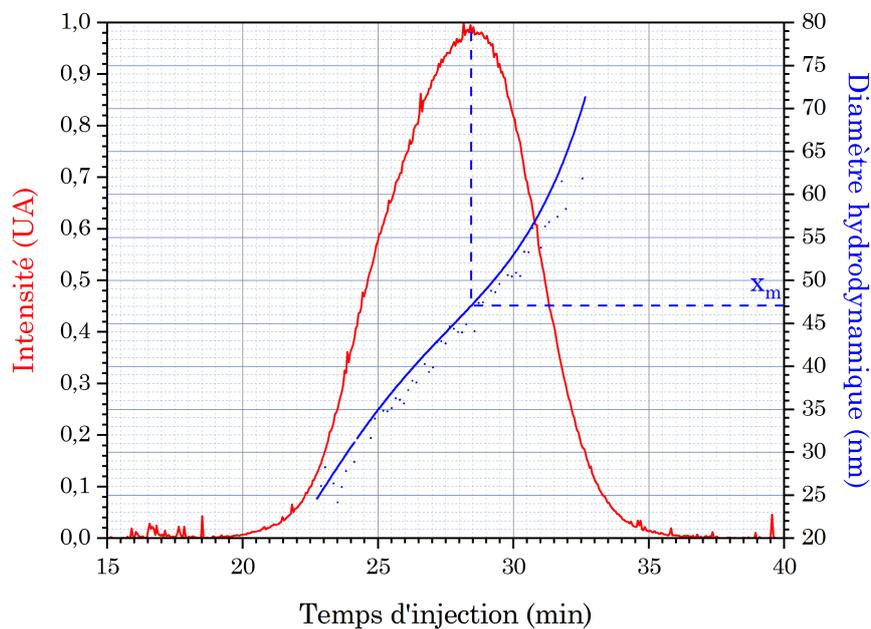


Figure 3.14 – Mesure du diamètre hydrodynamique des LNP F80 NC75 selon le temps d'injection par AF4-DLS.

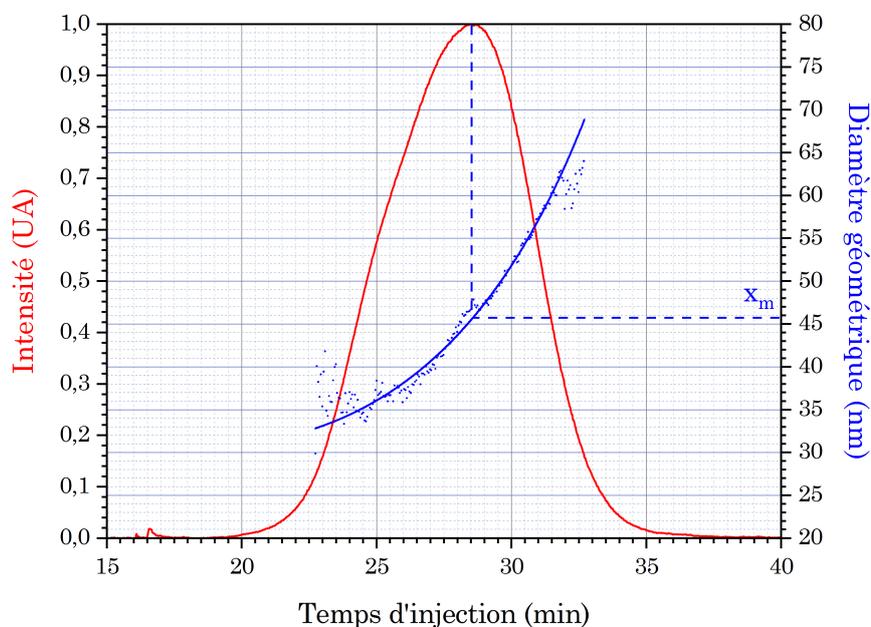


Figure 3.15 – Mesure du diamètre géométrique des LNP F80 NC75 selon le temps d'injection par AF4-MALS.

3.2. Caractérisation

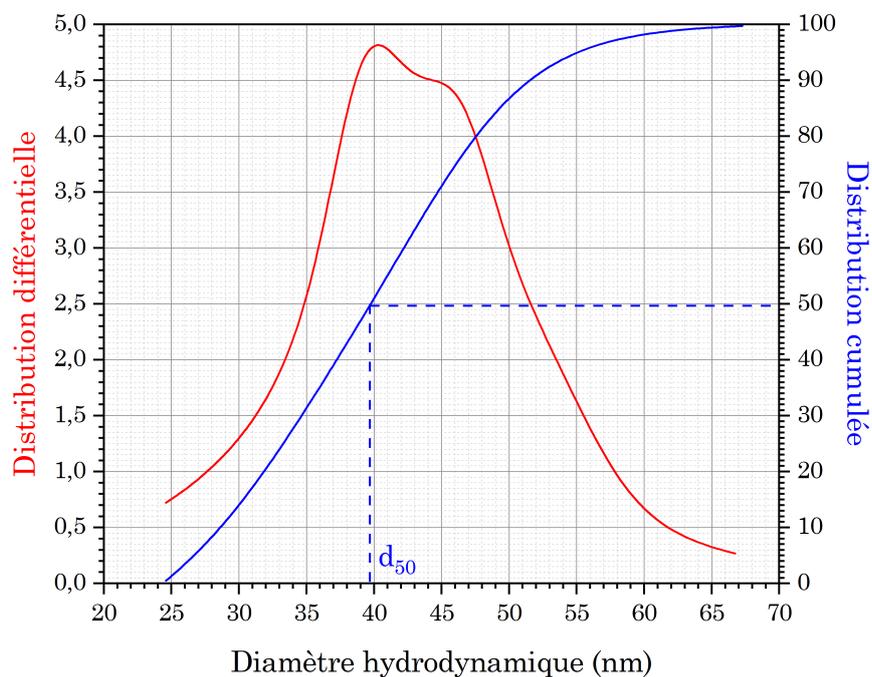


Figure 3.16 – Distributions de taille différentielle (rouge) et cumulée (bleu) en volume des LNP F80 NC75, obtenues par AF4-DLS.

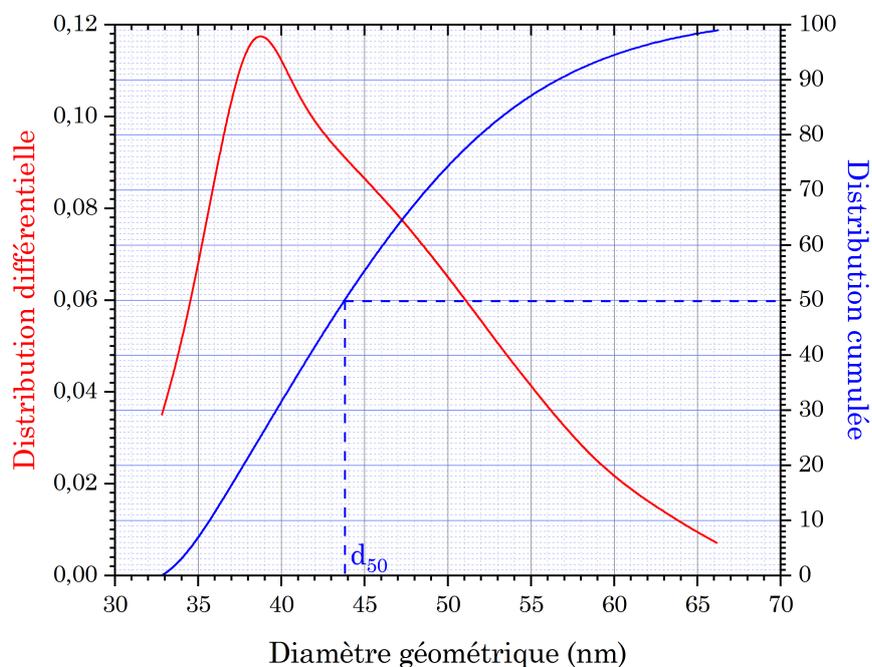


Figure 3.17 – Distributions de taille différentielle (rouge) et cumulée (bleu) en volume des LNP F80 NC75, obtenues par AF4-MALS.

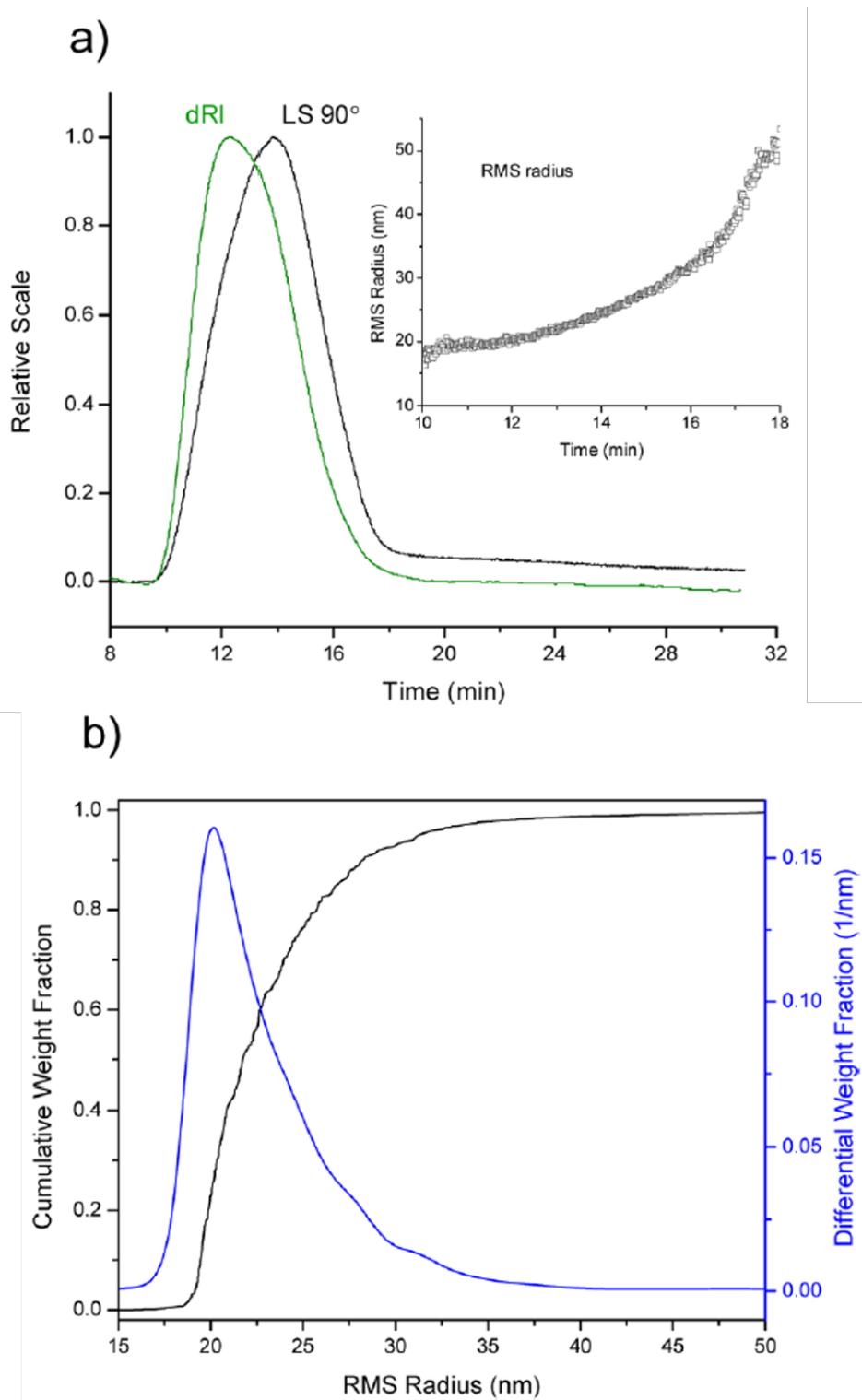


Figure 3.18 – Profil d'éluion et rayon géométrique de LNP obtenus par AF4-MALS (a). Distributions cumulative et différentielle correspondantes [289].

3.2. Caractérisation

3.2.1.3 Bilan intermédiaire LS

Le MALS permet de prendre en compte au mieux la forme des particules dans la mesure de leur taille et de s'affranchir de la couche de solvation autour de celles-ci. Or la DLS et le MALS après fractionnement donnant ici des résultats similaires, il est envisageable que la couche de solvation autour des LNP ainsi que leur forme n'influencent pas la mesure de leur taille (Tableau 3.4). En plus de connaître la taille des particules en suspension, la mesure des diamètres hydrodynamique et géométrique en mode on-line de celles-ci permet d'avoir une idée de leur forme grâce au facteur de forme, noté ρ (Équation 3.1). La valeur de ce facteur étant ici de 1 environ, cela correspondrait à une sphère molle [290].

$$\rho = \frac{D_g}{D_h} \quad (3.1)$$

Les résultats obtenus en mode batch (sans fractionnement) diffèrent quant à eux grandement de ceux obtenus en mode on-line (Tableau 3.4). Contrairement à la DLS en mode batch, la dispersion des données obtenue en mode on-line est beaucoup plus petite, de même que les diamètres moyens et modaux. Ceci peut venir du fait que de nombreuses petites particules (inférieures à 50 nm) soient présentes dans la suspension et sont masquées par les plus grosses. En effet, pour des particules plus grosses (de l'ordre de 200 nm), les résultats en mode batch et on-line sont cohérents [291, 292].

Ainsi, deux hypothèses sont envisageables. Soit la DLS en mode batch n'est pas adaptée pour l'étude des LNP. Elle nécessite alors un dispositif de fractionnement on-line afin de ségréger les particules selon leur taille avant leur détection. Soit les plus grosses particules sont retenues dans la membrane du dispositif de l'AF4 et ne sont donc pas mesurées. D'après la bibliographie et le pourcentage massique de récupération de particules obtenus ici, la première hypothèse serait plutôt à privilégier [293].

Afin de répondre à la problématique ici soulevée par les différentes caractérisations utilisant la diffusion de la lumière, les LNP ont ensuite été observées puis analysées par Microscopie Électronique en Transmission.

Tableau 3.4 – Comparaison des diamètres moyens, écarts-types, modes, médianes et tailles minimale et maximale (valeurs en nm) des LNP F80 NC75 obtenus par DLS et MALS en mode batch et/ou en mode on-line.

Technique	\bar{X}	s	x_m	d_{50}	$D_{min} - D_{max}$
DLS mode batch	101	57	79	81	20 - 500
DLS mode on-line	45	9	47	40	24 - 71
MALS mode on-line	46	8	46	44	33 - 69

3.2.2 Microscopie Électronique en Transmission

3.2.2.1 Voie sèche

3.2.2.1.1 Sans coloration

Les LNP ont tout d'abord été observées en voie sèche sans coloration et non diluées. Il apparaît que le peu de particules observables, en admettant qu'elles soient bien des LNP, sont soit peu contrastées soit déshydratées, ce qui entraîne une déformation des particules (Figure 3.19). Leur taille est donc difficilement mesurable. Ainsi, cette technique de préparation n'est pas adaptée pour l'observation de LNP par MET. Elle n'est d'ailleurs jamais utilisée en tant que telle dans la littérature pour observer des particules lipidiques.

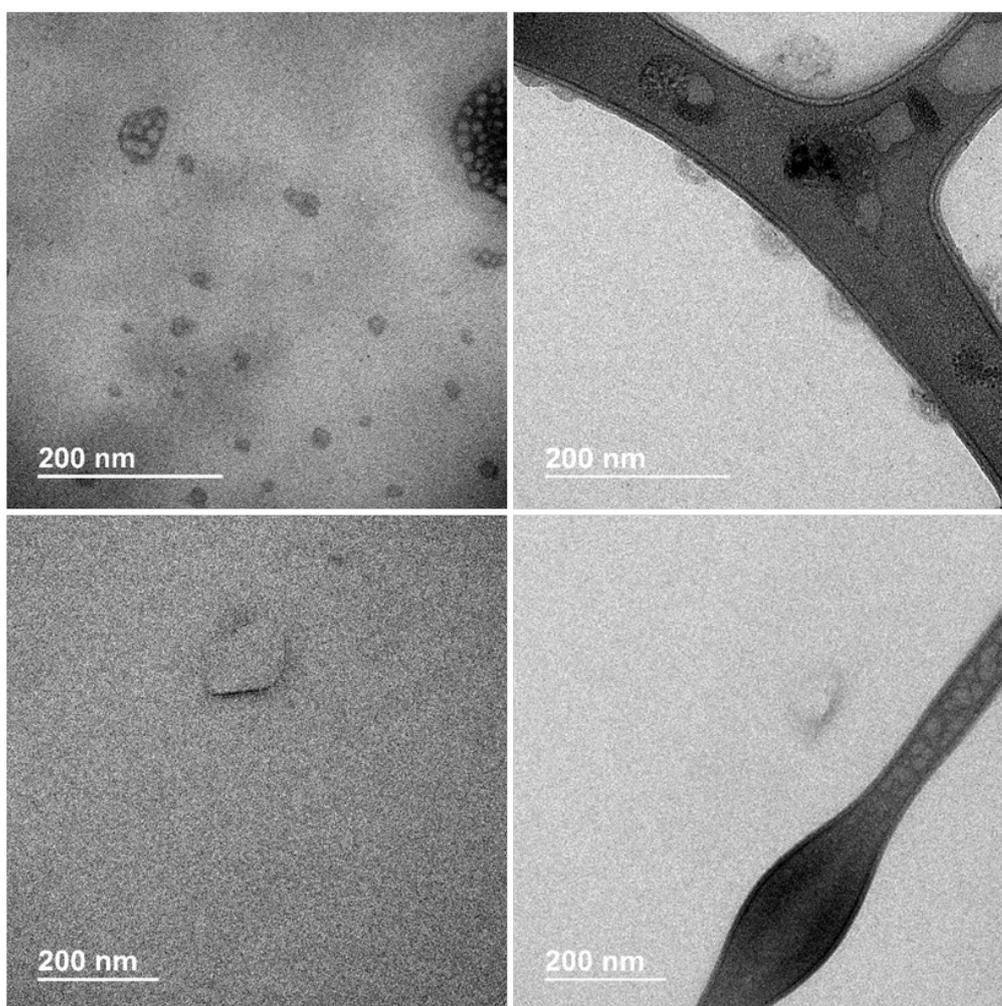


Figure 3.19 – Images MET de LNP préparées en voie sèche.

Afin d'éviter cette déshydratation et d'améliorer le contraste des particules, ces dernières ont ensuite été préparées par coloration négative en voie sèche.

3.2. Caractérisation

3.2.2.1.2 Coloration négative

3.2.2.1.2.1 Choix du colorant

Deux types de colorants ont été testés sur un lot non dilué ceci afin de déterminer lequel serait le plus adapté pour l'observation de LNP :

- l'acétate d'uranyle (AcUr) (Figure 3.20.a et b) ;
- le silicotungstate de sodium (SST) (Figure 3.20.c et d).

Ces colorants, aussi appelés contrastants, sont communément utilisés dans la littérature [174].

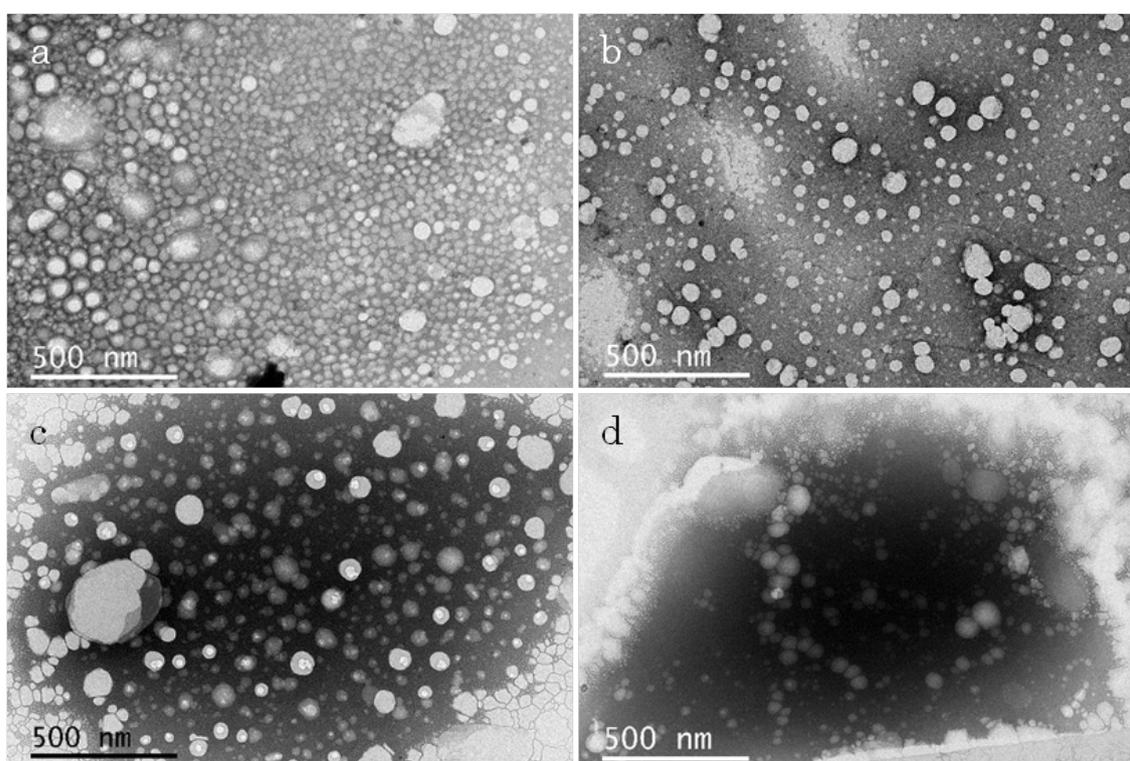


Figure 3.20 – Images MET de LNP F80 NC75 préparées par coloration négative avec différents colorants. (a et b) Acétate d'uranyle. (c et d) Silicotungstate de sodium.

Le critère retenu pour le choix du colorant s'est porté sur la qualité des images obtenues par MET. En effet, afin de réaliser des mesures semi-automatiques de taille de particules via un logiciel de traitement tel qu'*ImageJ*, les particules doivent être bien contrastées et se différencier du fond, correspondant à la membrane carbone. Ceci facilite grandement le traitement des images par la suite. Le choix s'est ainsi porté sur l'**acétate d'uranyle**, grâce auquel plusieurs zones de la grille comportent des LNP se démarquant de façon nette du fond, ce qui simplifie le seuillage des images, contrairement au SST (Figure 3.21). D'autres types de colorants, comme l'acide phosphotungstique (PTA) ou encore le tétroxyde d'osmium (OsO_4) peuvent être utilisés pour imager des particules lipidiques et mesurer leur taille (Figure 3.22) [294]. Ils n'ont cependant pas été testés ici.

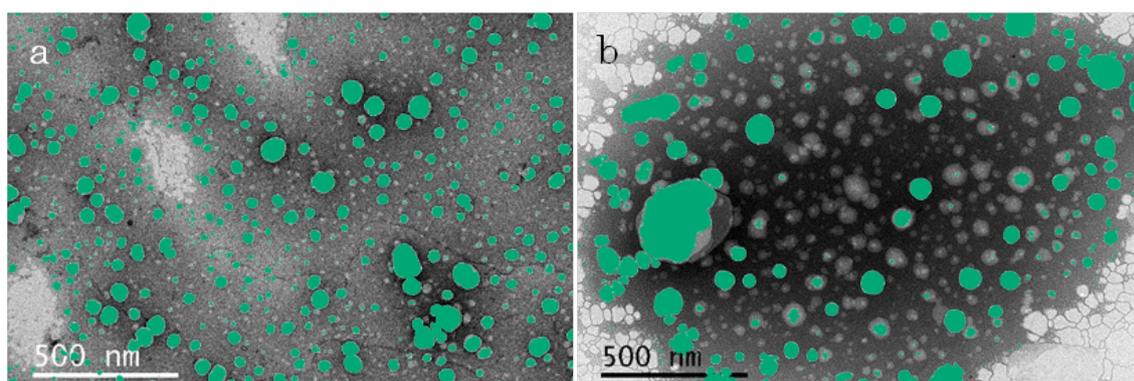


Figure 3.21 – Superposition d’images MET et d’images seuillées de LNP F80 NC75 préparées par coloration négative avec différents colorants. (a) Acétate d’uranyle. (b) Silicotungstate de sodium.

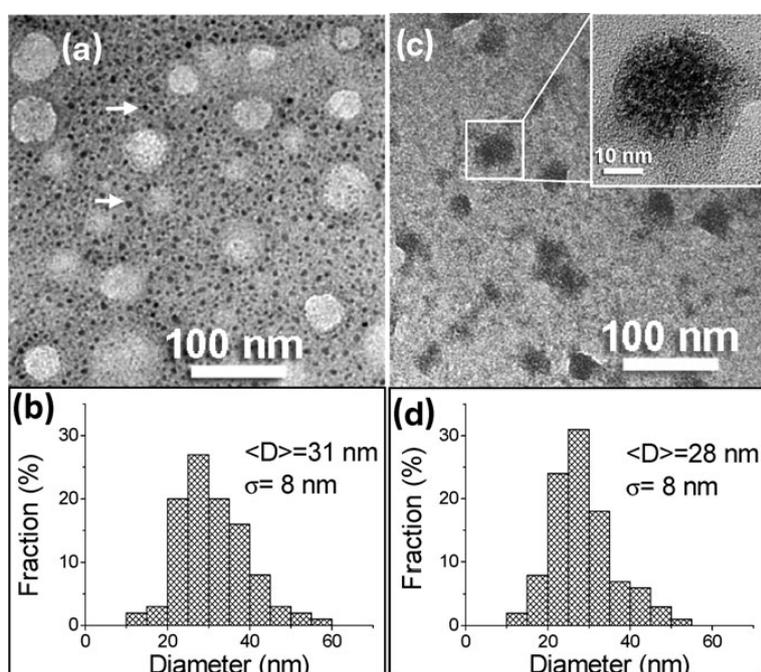


Figure 3.22 – Images MET de SLN non chargées et distributions de tailles correspondantes pour des échantillons colorés au PTA (a et b) et au tétr oxyde d’osmium (c et d). $\langle D \rangle$ et σ représentent respectivement le diamètre moyen des particules et l’écart-type des données [294].

3.2.2.1.2.2 Analyse des particules

Contrairement à la voie sèche seule, les LNP ne semblent pas déshydratées et apparaissent bien rondes. Ce qui est cohérent avec de précédentes observations de LNP F50 NC75 (Figure 3.23). En effet, bien que de tailles plus petites, ces dernières ont la même forme que les LNP F80 NC75. Cette morphologie se retrouve également pour d’autres types de particules lipidiques (Figure 3.24). Il n’est cependant pas possible d’observer la structure cœur/coquille des LNP, le colorant créant un masque autour de celles-ci et masquant leur structure interne. Les particules ayant tendance à s’agglomérer en séchant, les lots de LNP analysés ultérieurement par MET en coloration négative ont été préalablement dilués à 2 mg/mL (Figure 3.20.a).

3.2. Caractérisation

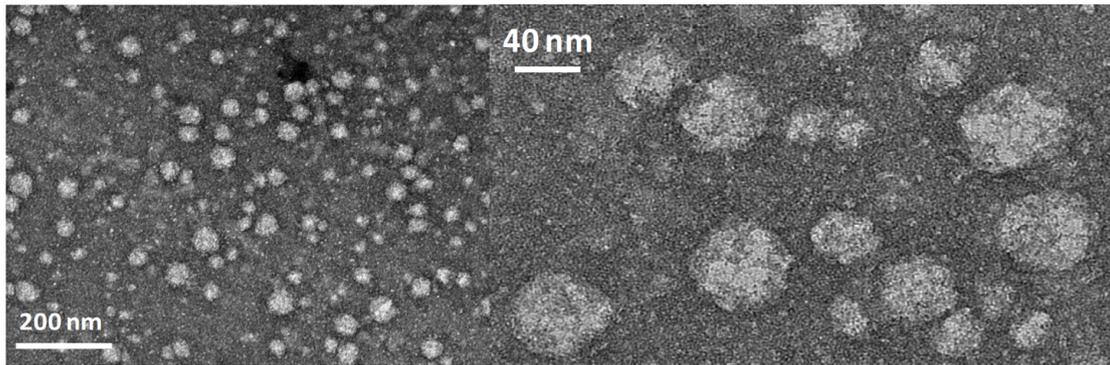


Figure 3.23 – Images MET de LNP F50 NC75 colorées négativement à l’acétate d’uranyle [284].

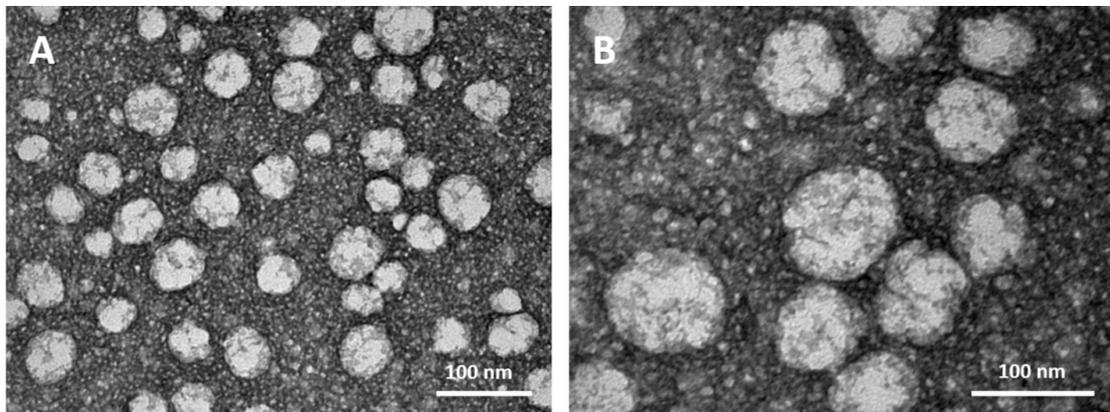


Figure 3.24 – Images MET de LNP colorées négativement à l’acétate d’uranyle [295].

Les analyses de taille ont été réalisées sur 1500 particules environ, de manière automatique via le logiciel *ImageJ*, après traitement des images (filtre médian, binarisation). Les particules dont le diamètre était inférieur à 15 nm n’ont pas été comptées du fait d’un manque de résolution de celles-ci (Figure 3.21). Afin de pouvoir comparer au mieux les diamètres mesurés à ceux obtenus par diffusion de la lumière, la taille des particules a été déduite de leur aire. Les LNP apparaissant plutôt rondes, leur diamètre $D_{\mathcal{A}}$ est facilement déduit de leur aire \mathcal{A} (Équation 3.2).

$$D_{\mathcal{A}} = 2\sqrt{\frac{\mathcal{A}}{\pi}} \quad (3.2)$$

A partir des données recueillies, il est également possible de déterminer un coefficient de rotondité des particules, indicateur de leur élongation et compris entre 0 et 1, en ajustant leur forme à une ellipse de grand axe b (Équation 3.3). Ainsi, plus sa valeur se rapproche de 1 et plus les particules auront tendance à être rondes. Inversement, plus sa valeur est éloignée de 1 et plus les particules auront une forme allongée.

$$r = \frac{4\mathcal{A}}{\pi b^2} \quad (3.3)$$

La moyenne sur l'ensemble des données du coefficient de rotondité obtenu est de 0,8, une valeur de 1 correspondant à un cercle cela confirme que les particules observées peuvent être considérées comme étant rondes. Les données brutes, après avoir été arrondies à l'unité, donnent un **diamètre moyen de 36 ± 2 nm**, un **écart-type de 17 ± 2 nm**, un **mode de 22 ± 2 nm**, une **médiane de 31 ± 1 nm** et des **tailles comprises entre 16 ± 2 nm et 138 ± 2 nm**.

Il a ensuite été tracé la distribution de taille des particules en utilisant une largeur d'intervalle de 1 nm (Figure 3.25). Les données apparaissant trop bruitées pour réaliser correctement une interpolation, différentes largeurs d'intervalle de 1 nm à 10 nm ont donc été testées (Figure 3.26). Il apparait que la distribution de tailles des LNP semble bien suivre une loi log-normale. Ceci est confirmé par le coefficient de détermination ajusté obtenu pour ce type d'interpolation, noté R^2 , qui est de 0,88 pour une largeur d'intervalle de 5 nm (Tableau 3.5). L'interpolation par la loi log-normale obtenue pour des largeurs d'intervalles entre 1 nm et 10 nm sont très similaires, en différentielle et en cumulé, ce qui implique que même avec des données bruitées, l'ajustement reste cohérent (Figure 3.27).

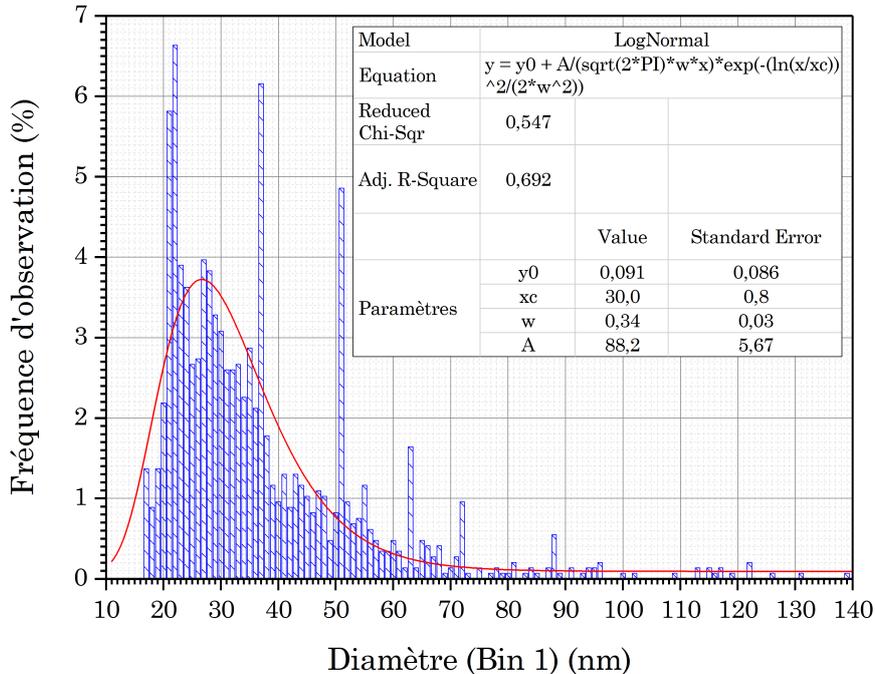


Figure 3.25 – Distribution de taille des LNP F80 NC75 (histogramme bleu) et interpolation des données (courbe rouge), obtenues par MET.

Cette interpolation permet d'obtenir le **diamètre moyen \bar{X}** , l'**écart-type s** , le **mode x_m** , la **médiane d_{50}** et les **tailles minimale et maximale** des LNP pour différentes largeurs d'intervalle données, récapitulés dans le tableau ci-dessous (Tableau 3.5) (Chapitre 1.2.3, Équations 1.9 à 1.11). L'interpolation des données est cohérente dans la mesure où les paramètres obtenus sont proches de ceux des données brutes.

3.2. Caractérisation

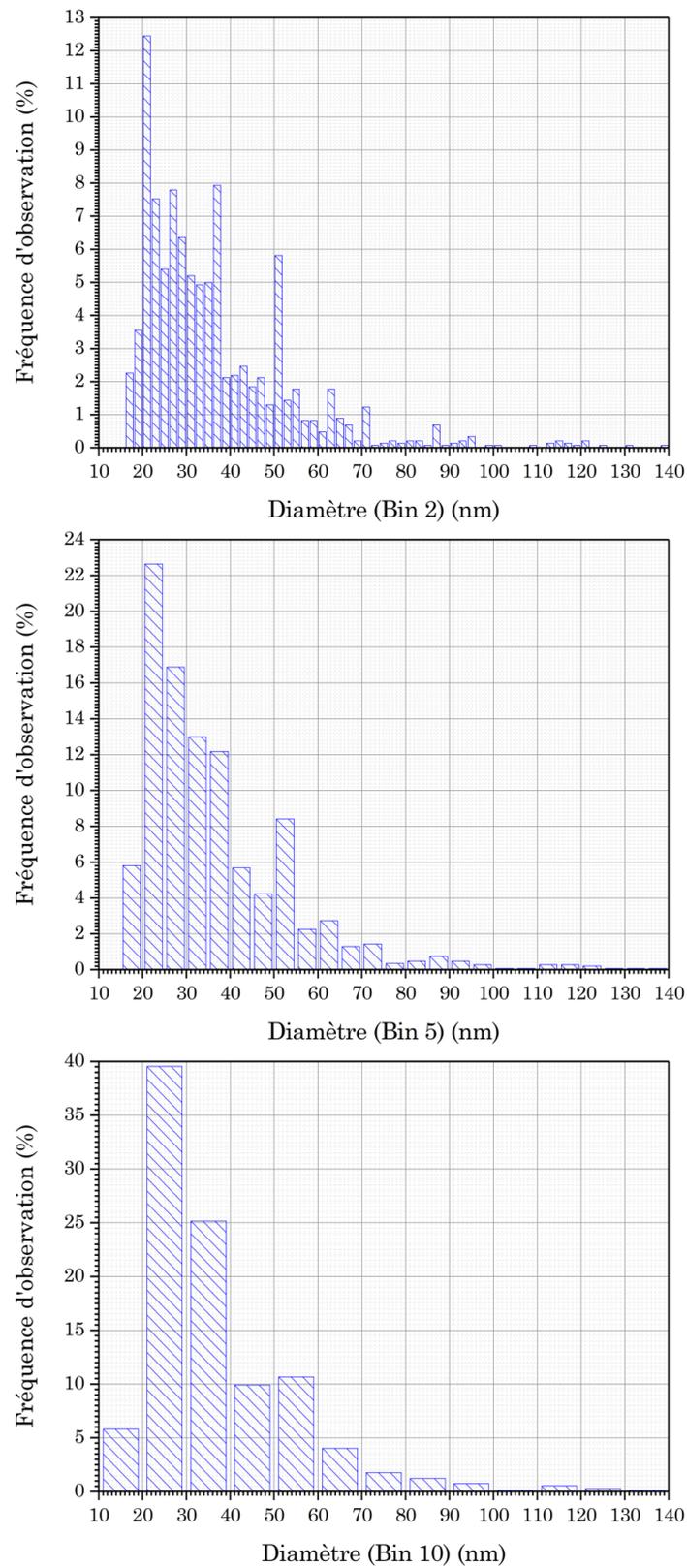


Figure 3.26 – Distributions de taille des LNP pour des intervalles de 2, 5 et 10 nm.

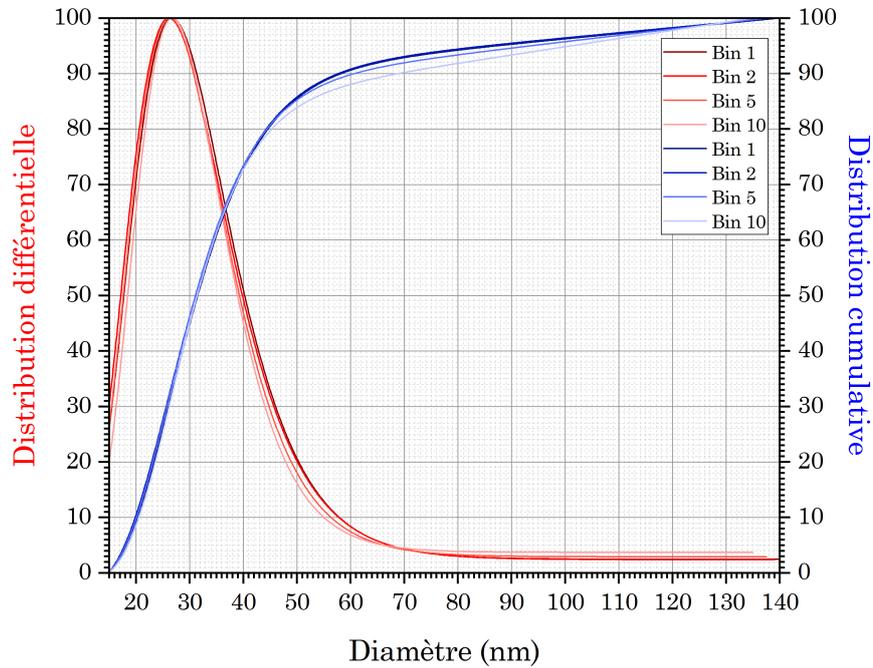


Figure 3.27 – Distributions différentielle et cumulative des LNP, obtenues par MET en voie sèche avec coloration négative après interpolation des données.

Tableau 3.5 – Diamètre moyen, écart-type, mode, médiane et tailles min et max (nm) des LNP obtenus à partir des données brutes et de leur interpolation par une loi log-normale pour différentes largeurs d'intervalle (nm).

Données (nm)	\bar{X}	s	x_m	d_{50}	$D_{min} - D_{max}$
Brutes	36 ± 2	17 ± 2	22 ± 2	31 ± 2	$16 \pm 2 - 138 \pm 2$
Intervalle 1	32	11	27	31	16 - 80
Intervalle 2	31	11	26	31	16 - 80
Intervalle 5	31	11	26	31	16 - 80
Intervalle 10	31	10	27	31	16 - 80

3.2. Caractérisation

3.2.2.2 Cryogénie

Afin de s'assurer que la phase de séchage n'introduisait pas d'artéfact sur la morphologie des particules, celles-ci ont ensuite été observées après avoir été cryo-fixée via un automate de congélation (Chapitre 2.2.2.2). Les paramètres du Vitrobot utilisés initialement pour cryo-fixer les LNP sont :

- une température d'enceinte de 20°C ;
- une humidité de 100% ;
- une durée d'absorption de 3 s ;
- une force d'absorption de -5 (UA) ;
- une seule absorption ;
- un temps d'attente avant absorption de 0s ;
- un temps d'attente entre l'absorption et la trempe de 0s.

Il est nécessaire de défocaliser de l'ordre de -6 à -10 μm les LNP afin qu'elles soient visibles dans la couche de glace (Figure 3.28). Ces valeurs sont également celles qui sont utilisées pour l'observation d'autres types de nanoparticules lipidiques [296].

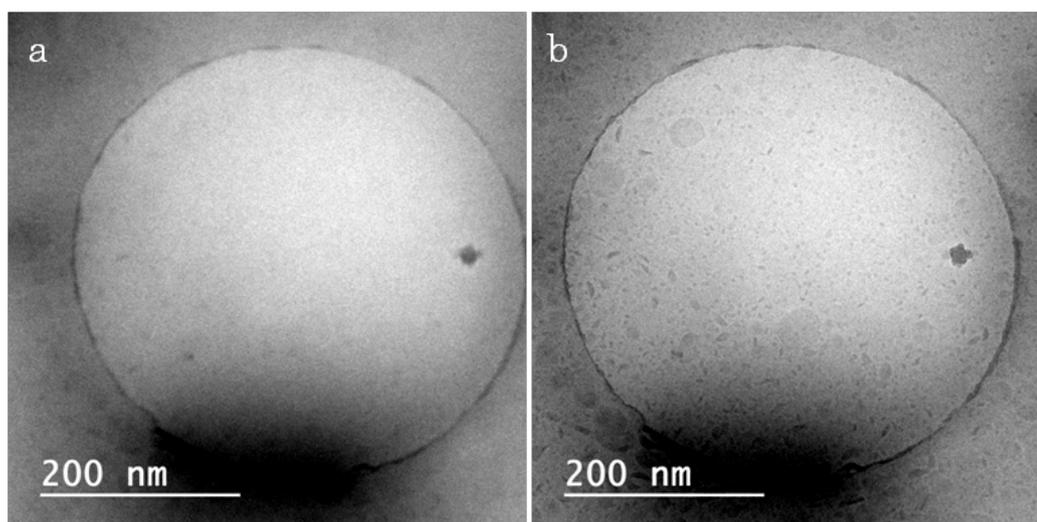


Figure 3.28 – Images cryo-MET de LNP au focus (a) et avec une défocalisation de -9 μm (b).

Les LNP ont tout d'abord été préparées à 100 mg/mL. L'observation MET montre que la suspension pure est beaucoup trop concentrée pour que les LNP soient observées correctement (Figure 3.29.a). C'est pourquoi, les observations ultérieures ont nécessité une dilution au 1/10 des LNP dans de l'eau ultra-pure avant leur cryo-fixation. Cette dilution semble bien adaptée pour l'observation des LNP qui apparaissent bien dispersées (Figure 3.29.b). Cependant, seul le cœur des particules est observable. Cela vient du fait que les chaînes de PEG ont un contraste trop faible pour pouvoir être observées [297]. Contrairement à la coloration négative, les LNP ne sont pas toutes rondes et certaines d'entre elles apparaissent allongées, comme distordues, contrairement à d'autres types de LNP qui elles apparaissent bien rondes (Figure 3.30) [289]. La question se pose alors de déterminer si ces formes correspondent bien aux formes initiales des particules en suspension, dans ce cas la coloration négative masquerait la vraie structure des LNP. Dans le cas contraire, ce serait la préparation par cryogénie qui entrainerait des artéfacts sur la morphologie des LNP.

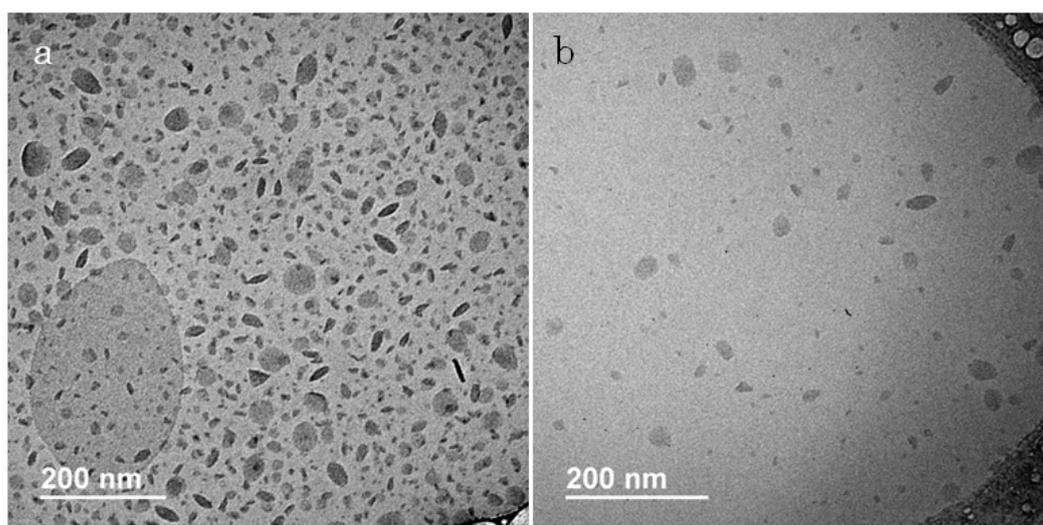


Figure 3.29 – Images cryo-MET de LNP avant (a) et après dilution à 10 mg/mL dans de l'eau ultra-pure (b).

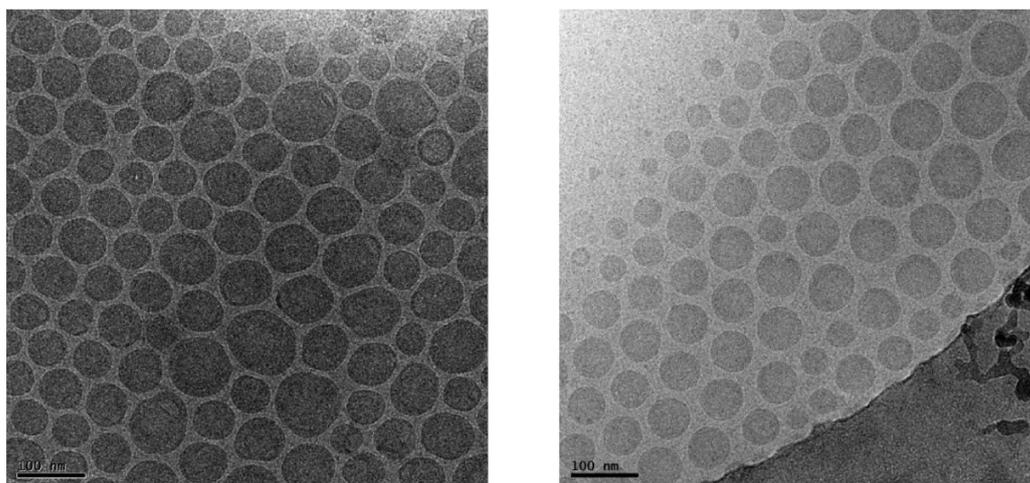


Figure 3.30 – Images cryo-MET de LNP (barre d'échelle : 100 nm) [289].

Plusieurs recherches font état de particules lipidiques, notamment des NLC et des SLN, dont la morphologie est particulière après préparation et observation par cryo-MET. Celles-ci montrent en effet des particules ayant une forme de « cuillère », qui serait imputée à un excès de matière sur l'extrémité des particules (Figures 3.31 et 3.32) [291, 297].

Afin de confirmer ou non la présence d'excès de matière en surface des LNP F80, le porte-objet cryogénique a été incliné d'une dizaine de degrés et des acquisitions ont été réalisées pour différents angles de rotation. Ces dernières montrent que les formes allongées des LNP ne proviennent ni d'une orientation particulière de celles-ci, ce qui biaiserait l'interprétation de leur forme, ni de la présence d'excès de matière (Figures 3.33 et 3.34). Il apparaît que les LNP F80 sont repliées sur elles-mêmes pour certaines, ce qui confirmerait l'hypothèse d'un artefact de préparation dû à la cryo-fixation rapide. L'interprétation des images cryo-MET doit donc se faire de manière très critique concernant les LNP.

3.2. Caractérisation

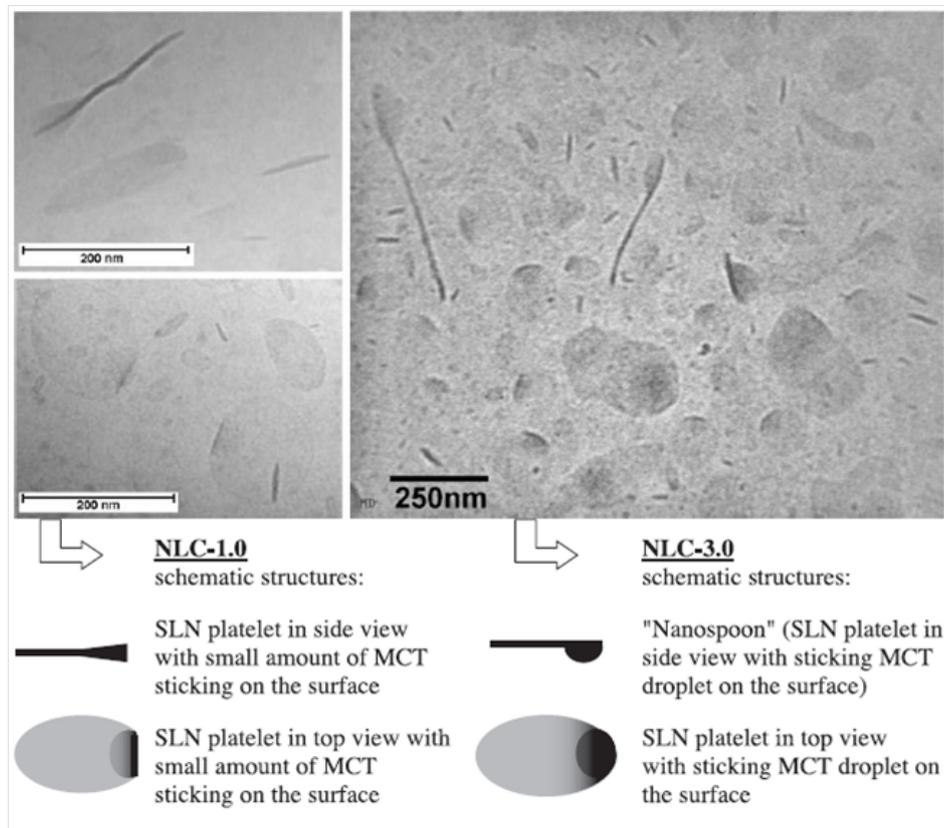


Figure 3.31 – Images cryo-MET de NLC et proposition d'interprétation des formes observées [291].

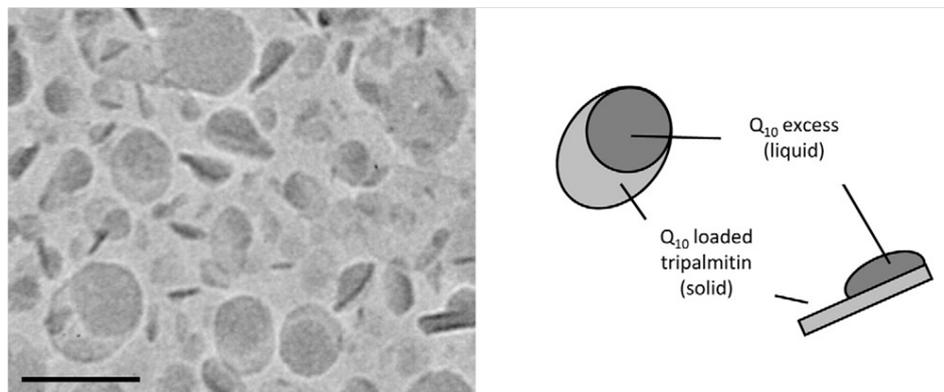


Figure 3.32 – Images cryo-MET de SLN et proposition d'interprétation des formes observées (barre d'échelle : 100 nm) [297].

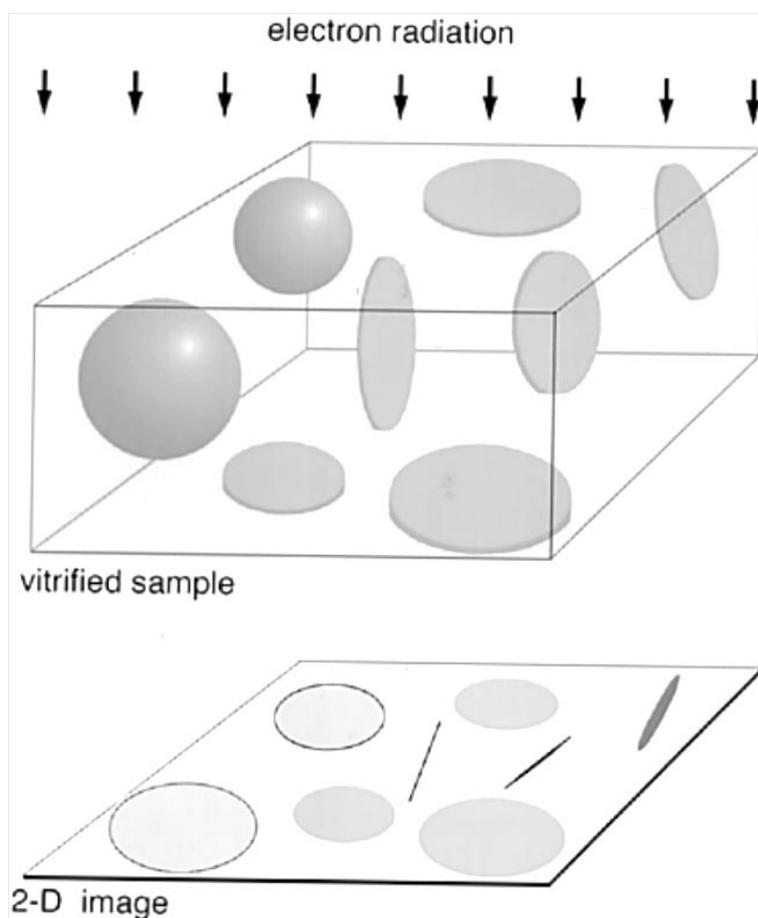


Figure 3.33 – Illustration de la projection 2D d’une grille MET comportant des particules sphériques et en forme de disques.

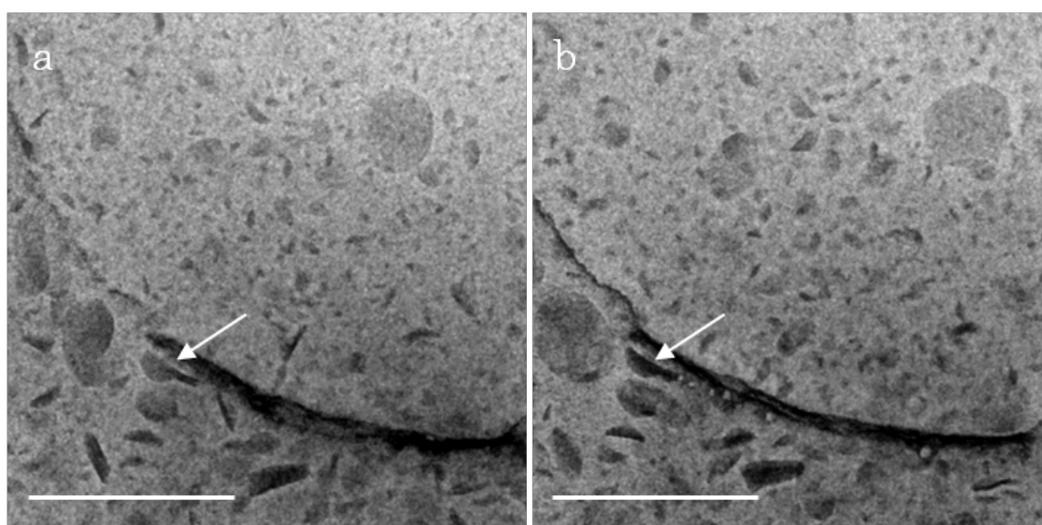


Figure 3.34 – Images cryo-MET de LNP déformées (flèche blanche), prises avec une rotation de -25° (a) et $+5^\circ$ (b) du porte-objet (barre d’échelle : 100 nm).

3.2. Caractérisation

Plusieurs hypothèses expliqueraient cet artéfact de préparation, à savoir la faible tenue mécanique des particules (H1) ou encore la cristallisation du cœur de celles-ci (H2). Chacune de ces deux hypothèses a donc été vérifiée.

3.2.2.2.1 H1 : Tenue mécanique des LNP

Les LNP ici étudiées ne sont composées que d'une simple membrane, contrairement à certains liposomes qui en possèdent deux. Ceci pourrait expliquer qu'elles aient une plus faible tenue mécanique que ces derniers, restant bien ronds même après cryo-fixation (Figure 3.35). Différentes solutions ont alors été testées afin de vérifier cette hypothèse.

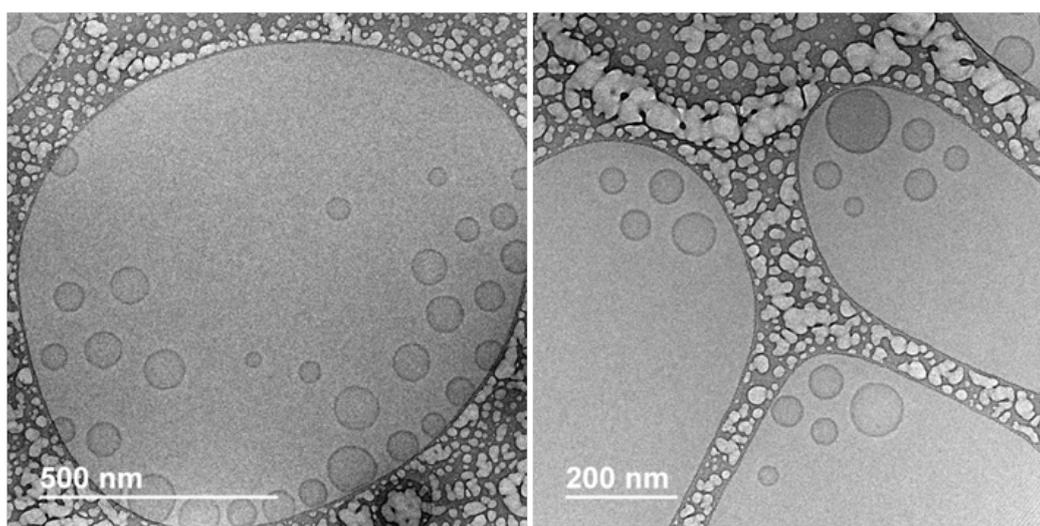


Figure 3.35 – Images cryo-MET de liposomes non chargés en principe actif.

3.2.2.2.1.1 Ajout d'un cryo-protecteur

Un moyen de protéger des éléments lors de leur cryo-fixation est de leur ajouter un **cryo-protecteur**. Ce dernier est généralement réservé à la préservation des cellules, tissus ou encore bactéries lorsque ces derniers sont préparés par CEMOVIS [298] (Chapitre 2.2.2.2). Dans le cas présenté ici, un cryo-protecteur pourrait permettre de préserver la simple membrane des LNP lors de leur cryo-fixation et ainsi éviter leur déformation.

Le cryo-protecteur qui a ici été retenu est le **tréhalose**, un sucre composé de molécules de glucose, particulièrement efficace pour la préservation des structures membranaires [299, 300]. Celui-ci a été ajouté à hauteur de 120 mg/mL dans la suspension de LNP diluées. Aucune amélioration concernant la forme des particules n'est obtenue (Figure 3.36). Celles-ci apparaissent toujours déformées. Ainsi, l'ajout d'un cryo-protecteur ne permet pas de préserver la sphéricité des LNP lors de leur préparation par cryo-fixation ultra-rapide. La déformation des particules pourrait donc venir de l'**épaisseur de la glace** dans les trous de la grille qui serait alors mal ajustée pour des LNP.

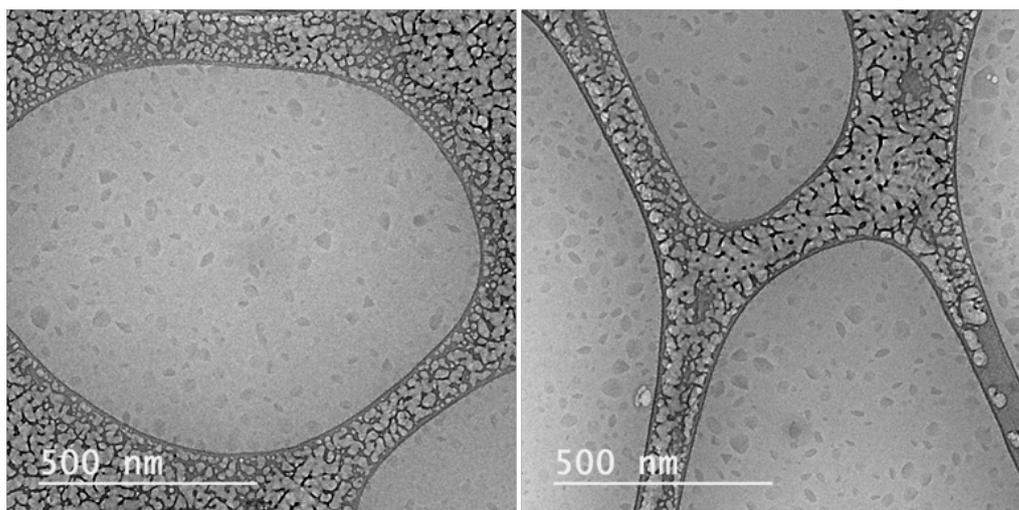


Figure 3.36 – Images cryo-MET de LNP dans du tréhalose.

3.2.2.2.1.2 Épaisseur de glace sur la grille

Si la glace est plus fine que le diamètre des particules, il est probable qu'une contrainte puisse s'exercer sur celles-ci et les déformer. Deux types de paramètres peuvent être ajustés afin d'augmenter l'épaisseur de glace dans les trous : les paramètres de cryo-fixation de l'automate et l'épaisseur de la membrane carbone de la grille de dépôt.

L'ajustement des paramètres du Vitrobot permet de contrôler la vitrosité de la glace mais aussi son épaisseur. Ainsi, il est probable que plus la durée d'absorption des papiers filtres est petite et plus l'épaisseur de glace formée sera importante. Avec les paramètres du Vitrobot utilisés précédemment, notamment une durée d'absorption de 3 s, sur des grilles C-Flat CF-2/1-2C (Protochips), nombre de trous contenaient des LNP concentrées sur leurs bords. Afin de comprendre l'effet de cette durée sur l'épaisseur de la glace, des échantillons ont été préparés par l'automate avec des durées d'absorptions plus faible, de 2 s et 1 s. Il apparaît que les particules sont généralement mieux réparties dans les trous de la membrane carbone pour une durée de 1 s que pour une durée de 2 s, signe d'une glace d'épaisseur plus importante (Figure 3.37.a et b).

La technique retenue pour la mesure d'épaisseur de la glace est la méthode du t/λ . D'autres techniques de mesure d'épaisseur comme la Diffraction des Électrons par Faisceau Convergent (CBED, Convergent Beam Electron Diffraction) ou celle utilisant les zêta-facteurs existent mais ne sont soit pas adaptées, soit trop complexes à mettre en place [108, 301]. La méthode choisie a nécessité l'utilisation des paramètres et données suivants (Chapitre 2.2.1.2) :

- un semi-angle de collection de 100 mrad ;
- une énergie incidente de 200 kV ;
- un facteur de saturation de 20 mrad ;
- la densité de la glace amorphe qui est environ de 1 g/cm³.

Il est ainsi possible de déduire le libre parcours moyen λ des électrons dans la glace, qui est alors de 184 nm, et donc de remonter à l'épaisseur de glace grâce à des acquisitions en mode EFTEM de la zone d'intérêt. L'épaisseur de glace est bien plus épaisse pour une plus faible

3.2. Caractérisation

durée d'absorption des papiers filtres (Figure 3.37.c). De plus, la partie hachurée du graphique montre que l'épaisseur au centre du trou pour 2 s d'absorption est plus fine que le diamètre des LNP, ce qui explique pourquoi elles ont parfois tendance à se concentrer sur les bords des trous.

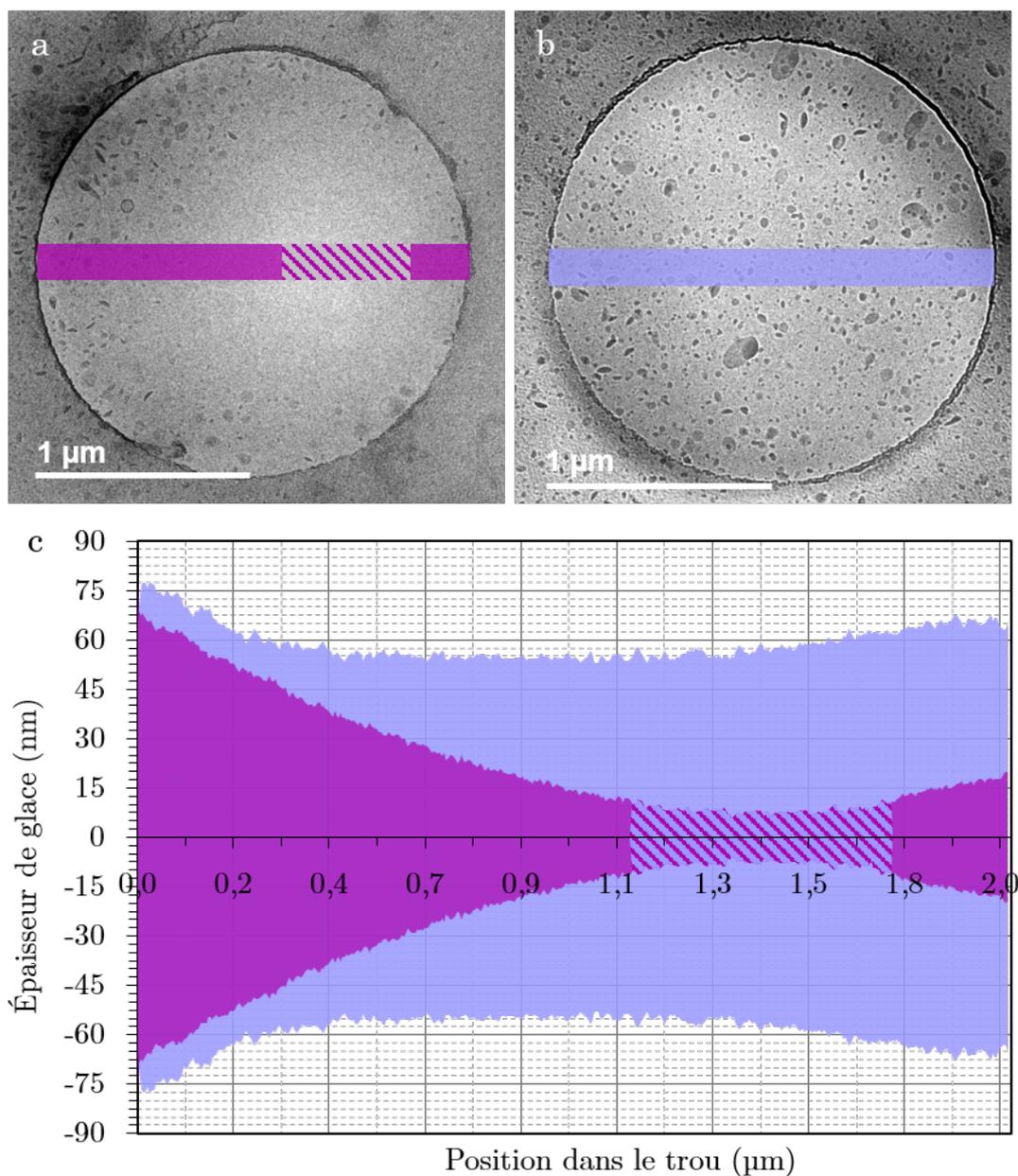


Figure 3.37 – Images cryo-MET (a et b) et mesures d'épaisseur de glace correspondantes (c) pour une durée d'absorption de 1 s (violet) et 2 s (rose). La partie hachurée représente la zone pour laquelle l'épaisseur de glace est plus fine que le diamètre des LNP F80.

Bien que les particules aient assez de place pour se répartir correctement dans les trous avec 1 s d'absorption, cela ne les empêche pas d'être déformées. L'hypothèse de l'épaisseur de glace trop fine quand à la déformation des particules n'est donc pas valide. Il apparaît

toutefois après ces essais qu'une épaisseur plus importante de glace permette une meilleure répartition des LNP. On observe ainsi la formation d'un ménisque de glace dans les trous, qui correspond au ménisque formé par la suspension après absorption par les papiers filtres (Figure 3.37.c). C'est pourquoi un changement de type de grille a été envisagé.

En cryo-MET, il est préférable d'obtenir une répartition uniforme des particules dans les trous. Ceci peut être obtenu en modifiant l'épaisseur de la membrane carbone de la grille de dépôt. En effet, les grilles C-Flat possèdent une membrane carbone de 20 nm d'épaisseur. Or il existe également des grilles, les C-Flat-T, possédant une épaisseur de carbone de 40 nm. Différentes mesures d'épaisseur ont été réalisées pour des échantillons préparés sur des grilles C-Flat et des C-Flat-T avec les mêmes paramètres de cryo-fixation à savoir :

- une température d'enceinte de 20°C ;
- une humidité de 100% ;
- une durée d'absorption de 3 s ;
- une force d'absorption de -2 (UA) ;
- une seule absorption ;
- un temps d'attente avant absorption de 0s ;
- un temps d'attente entre l'absorption et la trempe de 0s.

La force d'absorption des papiers filtres a dû être optimisée pour les grilles C-Flat-T et être augmentée de -5 à -2 car la glace était trop épaisse et cristalline et les LNP très peu visibles (Figure 3.38). Il apparaît que l'épaisseur de glace obtenue avec les grilles C-Flat-T sous forme de ménisque est généralement plus épaisse que celle obtenue pour les mêmes paramètres de cryo-fixation avec les grilles C-Flat (Figure 3.39). Elles sont donc plus adaptées pour observer les LNP par cryo-MET que les grilles C-Flat standard et permettent une répartition homogène des particules les plus grosses dans les trous. C'est pourquoi elles ont été préférées pour la suite de cette étude.

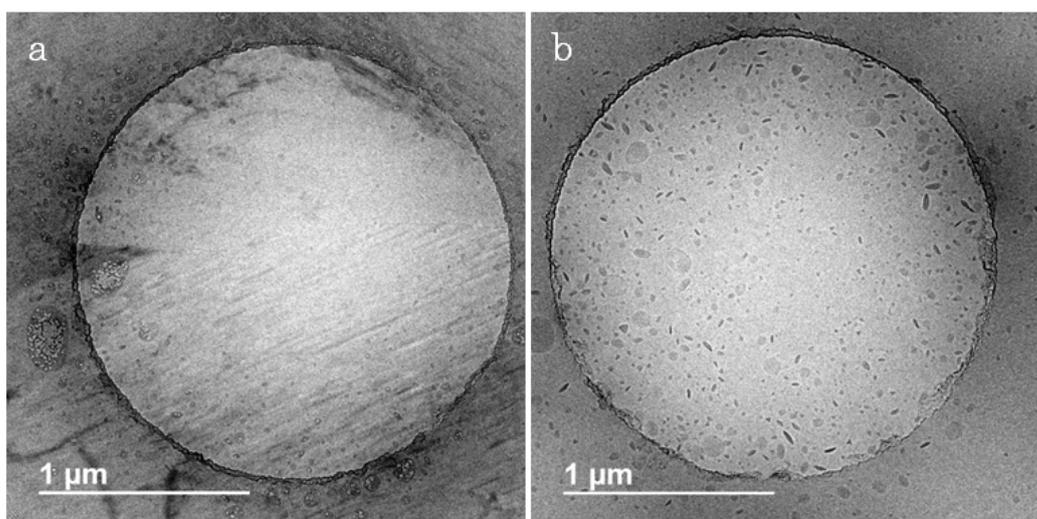


Figure 3.38 – Images cryo-MET de LNP préparées sur des grilles C-Flat-T avec une force d'absorption de -5 (a) et -2 (b).

3.2. Caractérisation

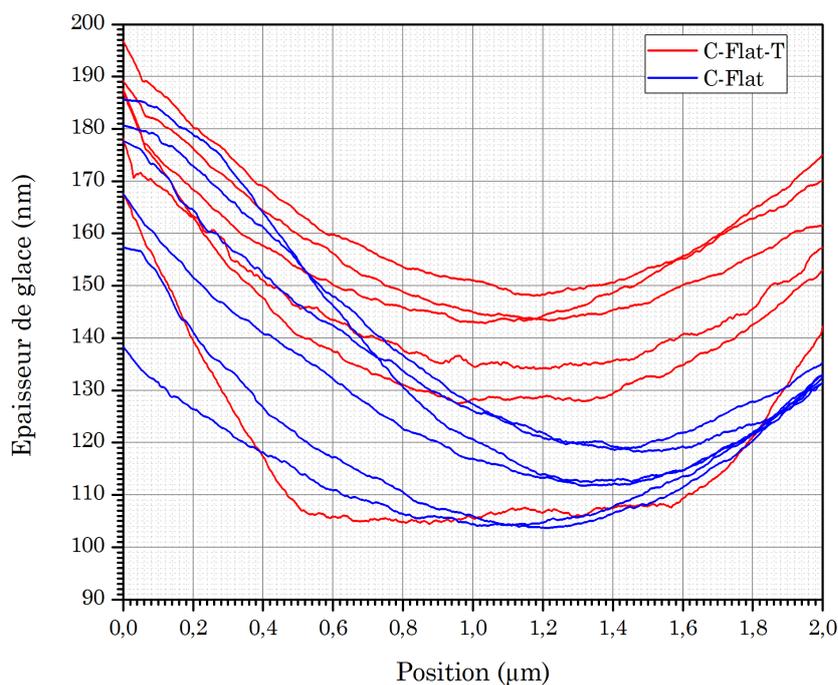


Figure 3.39 – Comparaison des épaisseurs de glace dans les trous obtenues pour des grilles C-Flat (bleu) et C-Flat-T (rouge) après lissage des données.

3.2.2.2.1.3 Nettoyage plasma des grilles

Afin de s'assurer que la déformation des particules n'était pas due au caractère super-hydrophile de la grille suite à son passage sous un plasma oxygéné, une grille de LNP a été cryo-fixée sans avoir été nettoyée au préalable (Chapitre 2.2.2). Les LNP apparaissent tout de même déformées, malgré l'absence de nettoyage plasma (Figure 3.40). Ce dernier est donc hors de cause quant à la déformation des particules.

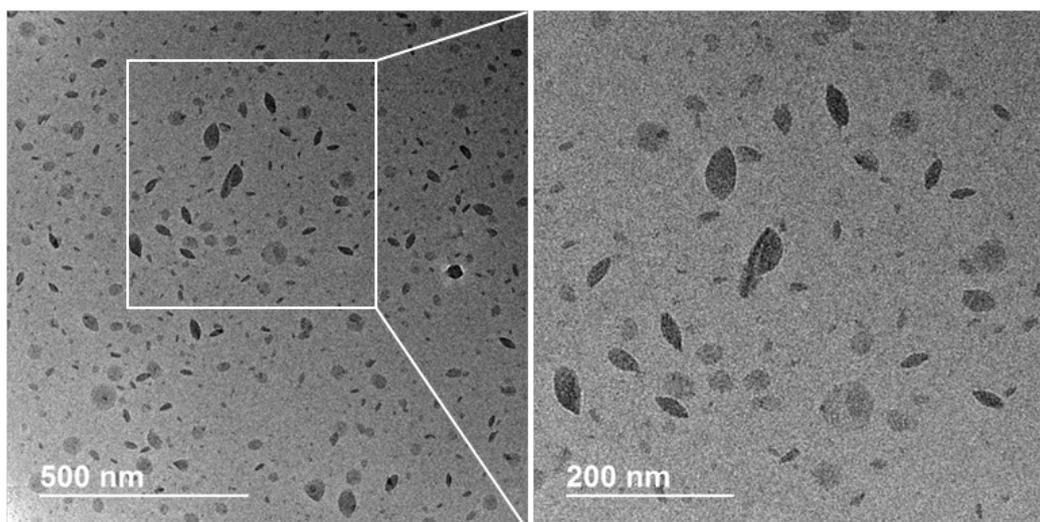


Figure 3.40 – Images cryo-MET de LNP préparées sur une grille C-Flat-T sans nettoyage plasma.

3.2.2.2.1.4 Temps de relaxation

Lorsque des éléments fragiles sont préparés par cryo-fixation ultra-rapide, il peut être nécessaire de leur laisser un temps de relaxation après absorption de l'excès de liquide sur la grille et avant cryo-fixation. En effet, ceci pourrait permettre d'éviter tout artéfact venant de la compression des papiers filtres contre la grille [302, 303]. Les particules peuvent ainsi retrouver leur forme initiale [185]. Il est généralement recommandé d'imposer un temps de relaxation de l'ordre de 15 à 60 secondes.

Différentes durées de relaxation, de 5 s à 75 s ont été testées sur les LNP juste avant leur cryo-fixation. Un temps de 75 s était beaucoup trop important, étant donné la fine couche de liquide laissée sur la grille après absorption par les papiers filtres. Ceci a eu pour effet d'évaporer le peu de liquide restant après absorption, malgré une humidité relative de 100% dans l'enceinte de l'automate. Les trous de la grille apparaissaient donc vides en MET. La durée d'absorption a donc été réduite à 15 s, ce qui a engendré une concentration des particules en bordure des trous, l'épaisseur de liquide restant dans ceux-ci n'étant plus assez importante pour que les LNP puissent s'y répartir uniformément (Figure 3.41.b). La durée de relaxation a enfin été diminuée à 5 s. Bien que les LNP soient réparties uniformément dans les trous, cette durée n'a pas eu d'effet sur leur forme et elles restent donc déformées (Figure 3.41.a). Cette technique de relaxation ne semble donc pas avoir l'effet escompté sur les LNP. Ainsi, si la déformation des particules provient bien de la phase d'absorption du fait de leur faible tenue mécanique, cela voudrait dire que celle-ci est irréversible.

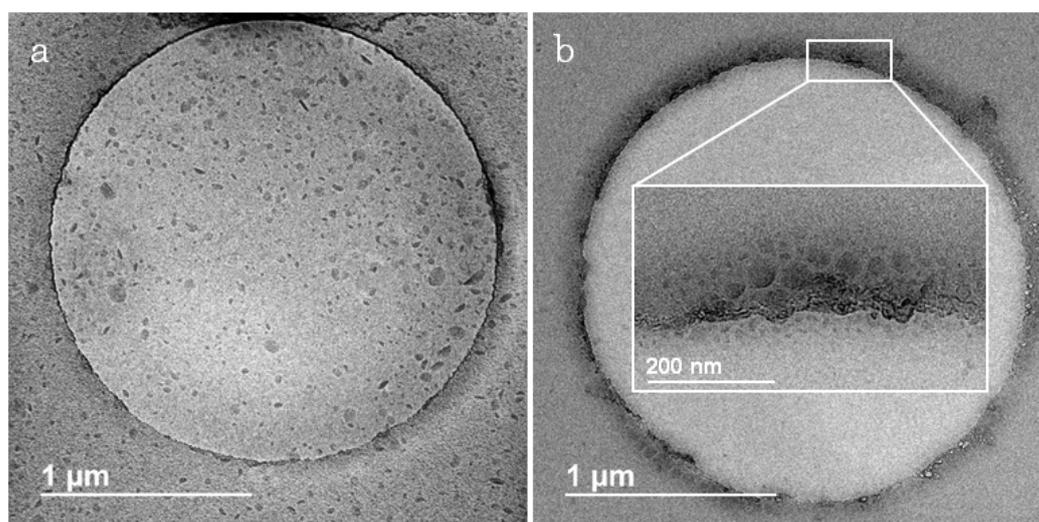


Figure 3.41 – Images cryo-MET de LNP préparées avec différentes durées de relaxation. (a) 5 s. (b) 15 s.

3.2.2.2.1.5 Papiers filtres

La déformation des particules pourraient venir du fait que la force exercée par les papiers filtres sur la grille est trop intense, imposant des contraintes sur celles-ci (Figure 3.42) [185]. C'est pourquoi cette dernière a été abaissée de -5 à -8 afin d'observer d'éventuels effets sur la forme des LNP. Il apparaît que celles-ci sont déformées malgré une force d'absorption moins

3.2. Caractérisation

intense (Figure 3.43). Ceci tendrait à confirmer l'hypothèse de la faible tenue mécanique des LNP. Toutefois, le positionnement des papiers filtres pourrait aussi jouer sur la forme des LNP.

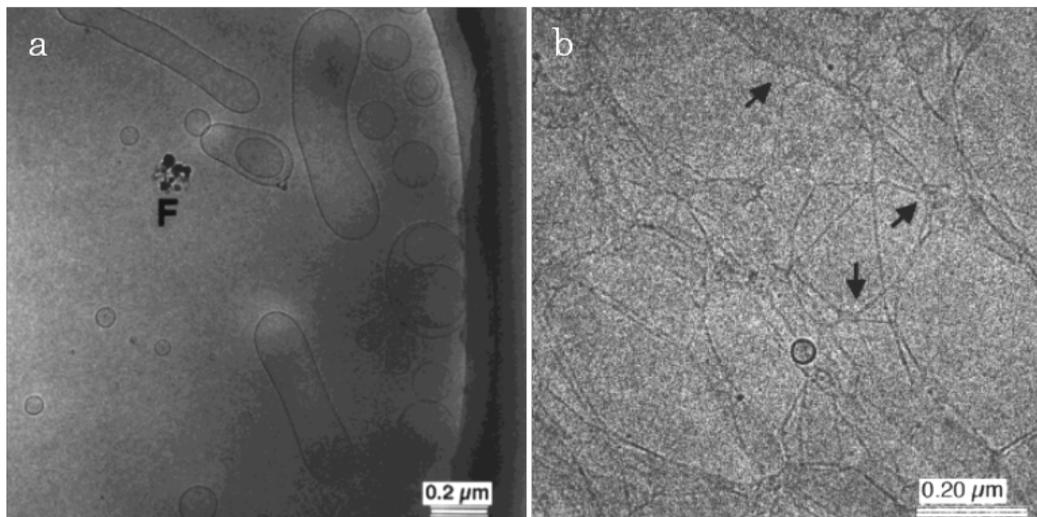


Figure 3.42 – Images cryo-MET de chlorure de cétyltriméthylammonium (CTAC)/3-méthylsalicylate de sodium (NaCH_3Sal) aqueux préparés avec une force d'absorption faible (a) et forte (b) [185].

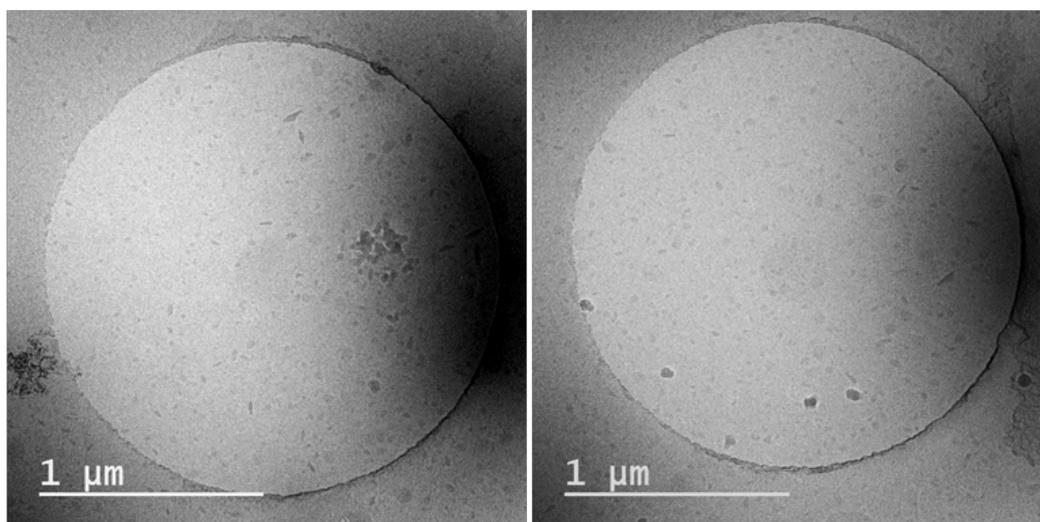


Figure 3.43 – Images cryo-MET de LNP préparés avec une force d'absorption des papiers filtres de -8.

L'automate de congélation utilisé pour cette étude, le Vitrobot, comporte deux mors en mousse sur lesquels sont fixés les papiers filtres. Ainsi, l'absorption de l'excès de suspension sur la grille se fait de chaque côté de cette dernière. Cette double absorption pourrait augmenter les contraintes subies par les particules. L'automate EM-GP (Leica), ne possédant qu'un seul mors en mousse et donc n'absorbant l'excès de liquide que d'un seul côté de la grille, a donc été testé pour la cryo-fixation des LNP. N'ayant pas d'accès permanent à celui-ci, seul un test a été effectué avec les paramètres habituellement utilisés pour cet automate, à savoir 1 s

d'absorption et une humidité relative de 85% (la force d'absorption n'est pas un paramètre modifiable en tant que tel sur cet automate). La forme des particules reste inchangée comparée aux résultats obtenus avec le Vitrobot (Figure 3.44). La déformation des LNP ne vient donc pas de la double absorption de l'automate, mais peut-être de l'absorption en elle-même.

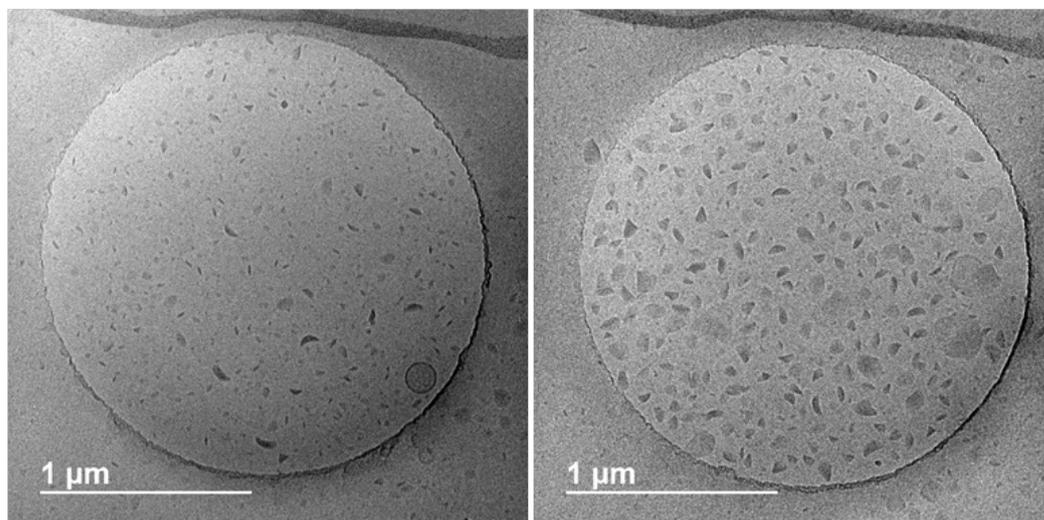


Figure 3.44 – Images cryo-MET de LNP préparés avec l'automate EM-GP (Leica).

Malgré les différentes tentatives pour préserver la forme des LNP, aucune ne s'est révélée efficace. Ainsi, l'hypothèse d'une faible tenue mécanique de ces particules est toujours envisageable. Toutefois, cela pourrait également être lié à une cristallisation de leur cœur.

3.2.2.2.2 H2 : Cristallisation du cœur des LNP

Le cœur des LNP étant composé de cire et d'huile, il est possible que ce dernier cristallise lors de la trempe des LNP dans l'éthane liquide, ce qui pourrait entraîner leur déformation. Afin de tester cette hypothèse, quelques dizaines de microlitres de LNP, déposés dans un tube Eppendorf, ont été plongés dans de l'éthane liquide afin de les cryo-fixer rapidement, ceci afin de s'approcher au mieux de ce qu'il se passe lors de la cryo-fixation par le Vitrobot. La suspension cryo-fixée a ensuite été réchauffée lentement jusqu'à température ambiante. Ainsi, si le cœur des particules venait à cristalliser lors de la cryo-fixation, une observation par coloration négative révélerait la déformation engendrée par cette cristallisation si tel était le cas. Les observations MET montrent que les LNP cryo-fixées puis réchauffées apparaissent facettées et n'ont donc pas la même forme que lorsqu'elles sont observées en coloration négative juste après leur synthèse (Figure 3.45) (Chapitre 3.2.2.1.2, Figure 3.20).

Afin de mettre en évidence une possible cristallisation des LNP, un lot de LNP F80 NC100, composé d'un cœur comportant 100% de cire et donc cristallin, a été observé en coloration négative et par cryo-MET. Les LNP F80 NC100 apparaissent facettées comme le sont les LNP F80 NC75 après cryo-fixation du tube Eppendorf et de son réchauffement (Figure 3.46). Ces dernières ont donc cristallisées.

3.2. Caractérisation

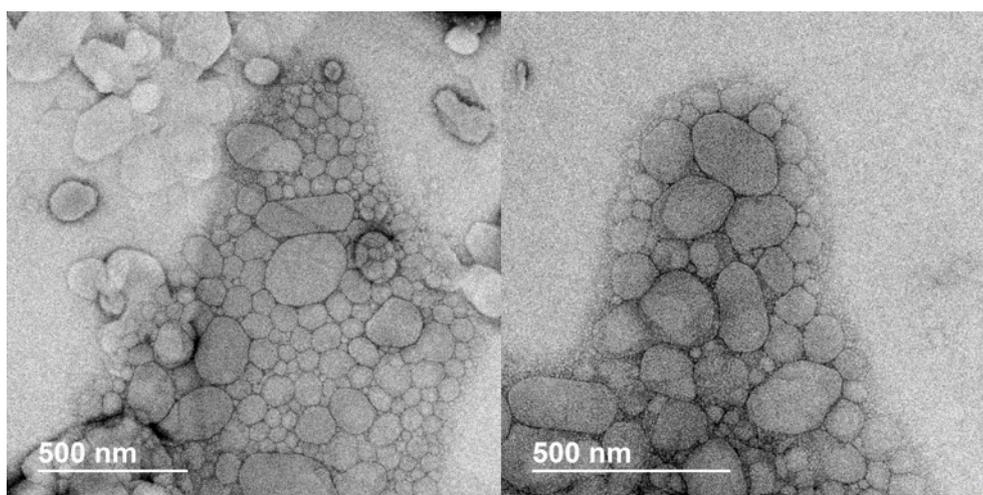


Figure 3.45 – Images MET en coloration négative de LNP F80 NC75 cryo-fixées dans un tube Eppendorf puis réchauffées à température ambiante.

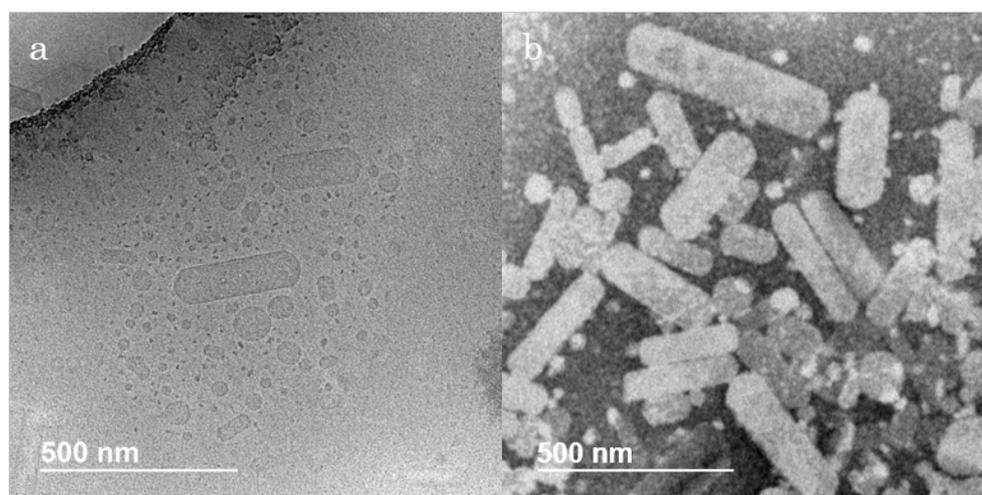


Figure 3.46 – Images cryo-MET (a) et MET en coloration négative (b) de LNP F80 NC100.

Cependant, les formes facettées obtenues dans le cas de la cristallisation du cœur des LNP par cryo-MET ne correspondent pas aux formes obtenues lors de la cryo-fixation de LNP F80 NC75 avec le Vitrobot, où les LNP apparaissent repliées sur elles-mêmes et non pas facettées (Figure 3.34). L'hypothèse de cristallisation du cœur des particules lors de leur préparation par un automate de congélation semble donc peu probable.

3.2.2.2.3 Hypothèse retenue

La problématique ici posée était de comprendre quel mécanisme induisait la déformation des LNP F80 NC75 lors de leur observation par cryo-MET. Ainsi, deux hypothèses ont été émises à savoir soit une faible tenue mécanique des LNP liée à la membrane unique qui les compose, soit une cristallisation du cœur de celles-ci. La cristallisation

a été mise hors d'état de cause, cette dernière facettant les LNP sous forme de bâtonnets majoritairement. L'hypothèse la plus probable proviendrait donc de la faible tenue mécanique des LNP qui, lors de l'étape d'absorption par les papiers filtres, se déformeraient en se repliant sur elles-mêmes. Il a été démontré que cette altération semblerait difficilement réversible en utilisant les moyens classiques de préparation cryogénique. En effet, le temps de relaxation après absorption et avant cryo-fixation n'a pas permis aux particules de retrouver leur forme initiale. Le grade du papier filtre pourrait également être en cause. Ainsi une vitesse de filtration plus lente serait peut-être plus adaptée, cependant cette hypothèse n'a pu être testée.

Afin de s'affranchir de tout artéfact potentiel lié à la préparation d'échantillons, les LNP ont donc ensuite été observées grâce à un porte-objet *in-situ* liquide, ce qui a nécessité certains développements afin d'améliorer leur contraste.

3.2.2.3 *In-situ* liquide

Afin d'étudier la forme et la taille des LNP sans artéfact lié à leur préparation, celles-ci ont été observées à l'aide du porte-objet liquide Poséidon (Protochips) (Chapitre 2.2.2.3).

3.2.2.3.1 Sans greffage

Tout comme en voie sèche, les particules ont tout d'abord été observées telles quelles dans le porte-objet *in-situ* liquide Poséidon (Protochips) monté en mode statique. Une entretoise de 50 nm est suffisante car les fenêtres de SiN ont tendance à se courber, dû à une différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur du porte-objet. Les LNP sont très difficilement observables (Figure 3.47). Leur contraste devant être trop faible pour qu'elles puissent être distinguées du solvant, il n'a ainsi pas été possible d'effectuer de mesure de taille de celles-ci. Le contraste des LNP nécessite donc d'être amélioré afin de pouvoir les observer correctement et mesurer leur diamètre.

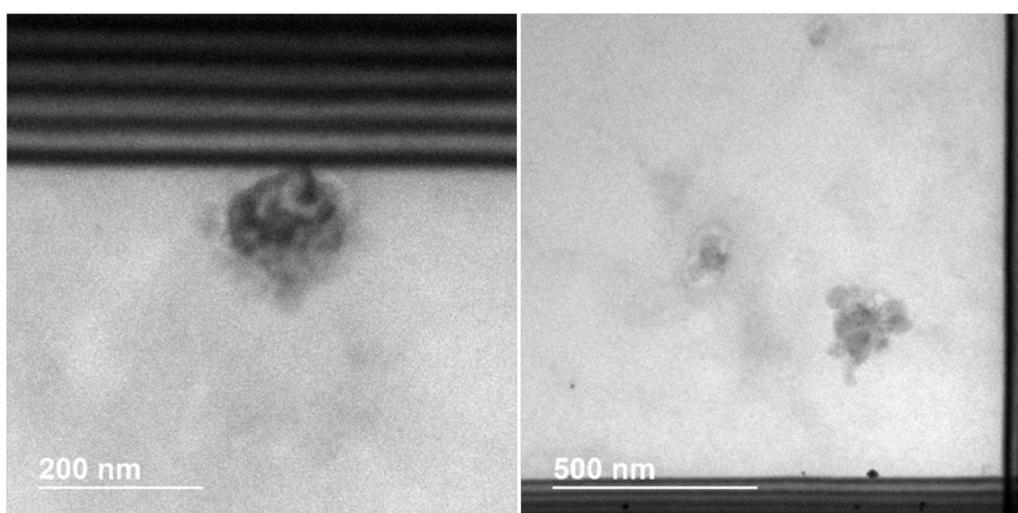


Figure 3.47 – Images MET de la suspension de LNP observée telle quelle à l'aide du porte-objet *in-situ* liquide Poséidon.

3.2. Caractérisation

L'emploi du contrastant utilisé pour la coloration négative (l'acétate d'uranyle) directement à l'intérieur du porte-objet liquide n'était pas envisageable du fait de sa radioactivité même très faible. C'est pourquoi, il a été envisagé dans un premier temps de greffer des nanoparticules métalliques à la surface des LNP afin d'améliorer leur contraste. Dans un second temps, un agent de contraste utilisé en imagerie médicale, le iopentol, a été ajouté lors de la synthèse des LNP.

3.2.2.3.2 Greffage de métaux

3.2.2.3.2.1 Nanoparticules d'or

Les LNP étant très peu contrastées du fait de leur composition majoritairement carbonée et de l'épaisseur du liquide, un greffage de particules métalliques sur leur surface pourrait améliorer grandement leur contraste.

Des nanoparticules d'or de 5 nm de diamètre stabilisées dans du citrate (Sigma-Aldrich) ont donc tout d'abord été ajoutées à la suspension de LNP F80 NC75 afin d'observer si l'or pouvait se greffer directement sur les chaînes de PEG des LNP. La suspension de LNP et de nanoparticules d'or obtenue a ensuite été observée à l'aide du porte-objet *in-situ* liquide. Seules les nanoparticules d'or étaient visibles en *in-situ* liquide (Figure 3.48.a). L'observation de la suspension par MET après préparation par coloration négative a montré que les nanoparticules d'or ne se sont pas greffées aux chaînes de PEG et se retrouvent dispersées sur la membrane carbone de la grille (Figure 3.48.b). Le greffage n'étant pas effectif sur les chaînes de PEG, il a fallu trouver des éléments pouvant se greffer en surface de la lécithine des LNP et ayant une forte affinité pour l'or.

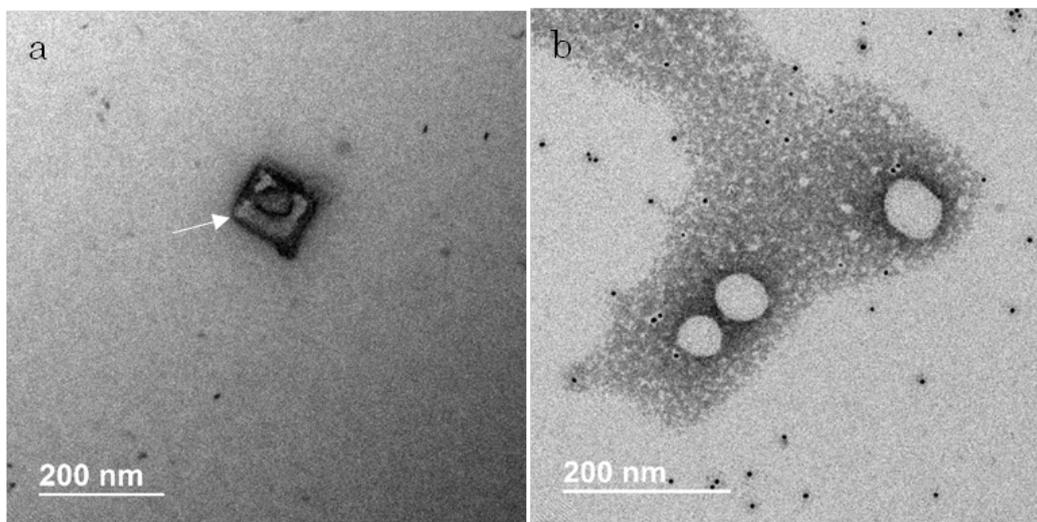


Figure 3.48 – Images MET de LNP F80 NC75 mises en présence de nanoparticules d'or, observées à l'aide du porte-objet *in-situ* liquide Poséidon (a) et après coloration négative (b). La flèche blanche indique une impureté.

Actuellement, afin de pouvoir mettre en place un ciblage actif, des ligands thiolés (SH) sont ajoutés lors de la synthèse des LNP. Présents en surface de ceux-ci, ils servent de site d'accroche à des anticorps, par exemple, pour améliorer le ciblage de cellules malades (Chapitre 3.1.3,

Figure 3.4). L'or ayant une forte affinité pour le soufre, il est possible que des nanoparticules d'or puissent venir se greffer sur les groupements thiolés [304]. Dans cette optique, il a été synthétisé un lot de F80-S-S-Pyr NC75.

Une caractérisation de ce lot par DLS en mode on-line et par coloration négative a montré que les tailles obtenues pour ce lot, récapitulées dans le tableau ci-dessous, sont légèrement plus petites que celles des LNP ne comportant pas de groupements thiols (Tableau 3.6) (Figures 3.49 et 3.50) (Chapitre 3.2.2.1.2, Tableau 3.5). Cette différence est donc à prendre en compte dans le cas d'une comparaison des techniques d'analyse.

Tableau 3.6 – Récapitulatif des diamètres moyens, écarts-types, modes, médianes et tailles minimales et maximales (nm) des LNP F80 avec et sans groupement thiol, obtenus par DLS en mode on-line.

Échantillon	\bar{X}	s	x_m	d_{50}	$D_{min} - D_{max}$
F80 sans thiol	45	9	47	40	24 - 71
F80 avec thiols	43	7	49	43	27 - 57

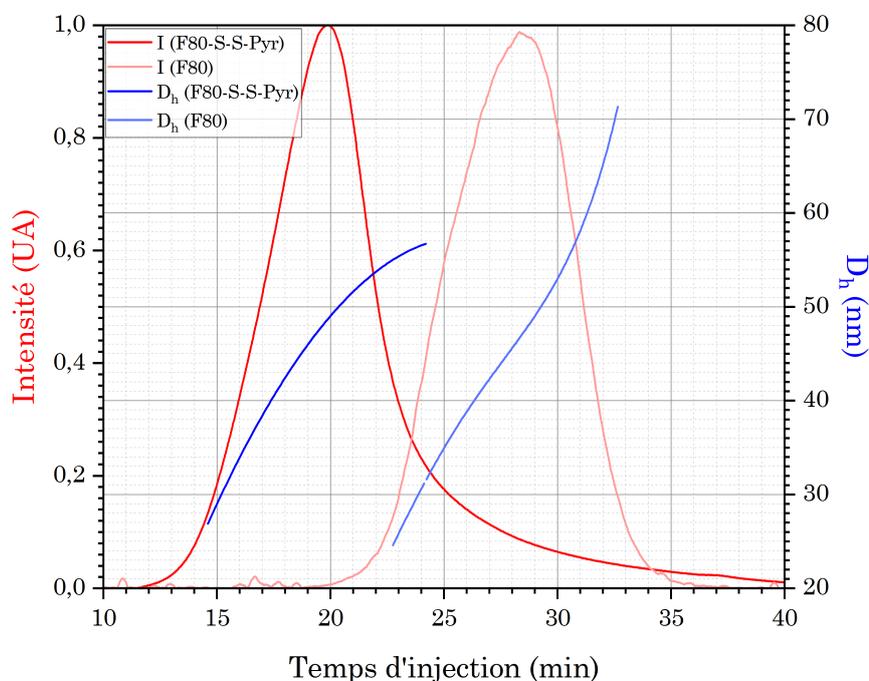


Figure 3.49 – Comparaison des diamètres hydrodynamiques obtenus par DLS en mode on-line pour des LNP F80 NC75 avec et sans groupements thiol.

3.2. Caractérisation

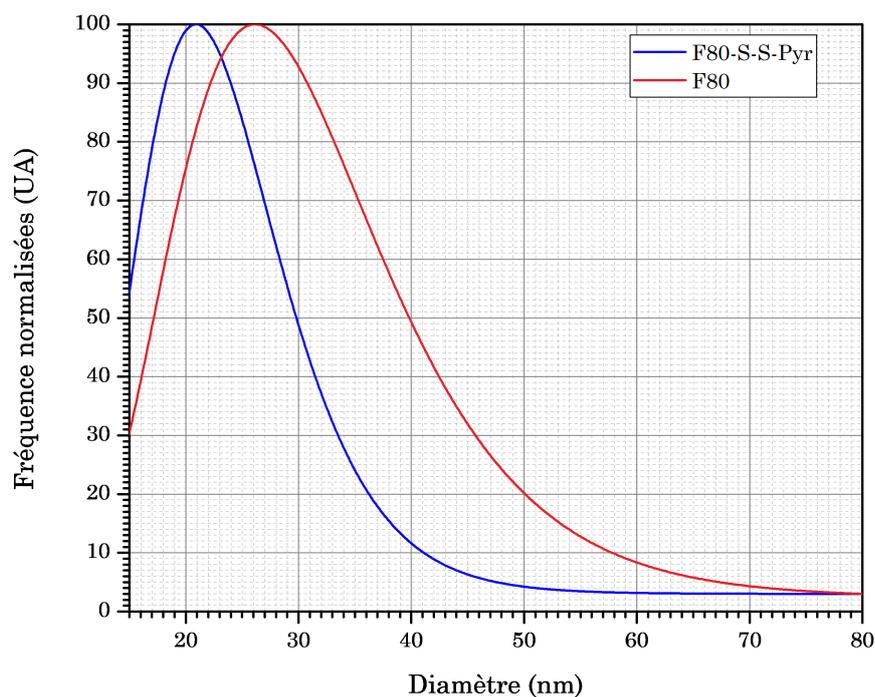


Figure 3.50 – Comparaison des diamètres équivalents obtenus par MET via une préparation par coloration négative de LNP F80 NC75 avec (bleu) et sans groupements thiol (rouge), après interpolation des données par une loi log-normale.

Les LNP F80-S-S-Pyr comprennent environ 1300 ligands thiolés par LNP situés en surface de la lécithine et protégés par de la pyridine (C_5H_5N), communément utilisée pour ce type de protection [305]. Avant de pouvoir réaliser un quelconque greffage, il est indispensable d'activer les sites thiols des LNP en les déprotégeant de leur pyridine. Pour cela, du dithiothréitol (DTT) a été utilisé à hauteur de 20 équivalences et ajouté aux LNP. Le tout a ensuite été mis à dialyser (pores de la membrane : 12 000 à 14 000 Da (SpectraPor)) pendant 24h minimum dans de l'eau ultra-pure en changeant l'eau régulièrement (toutes les deux heures environ) (Figure 3.51). Une fois la déprotection terminée, les nanoparticules d'or ont été incorporées dans la suspension de LNP avec un ratio de 15 particules d'or pour 1 LNP. Une nouvelle dialyse a été mise en place afin de filtrer les nanoparticules d'or qui ne se seraient pas greffées.

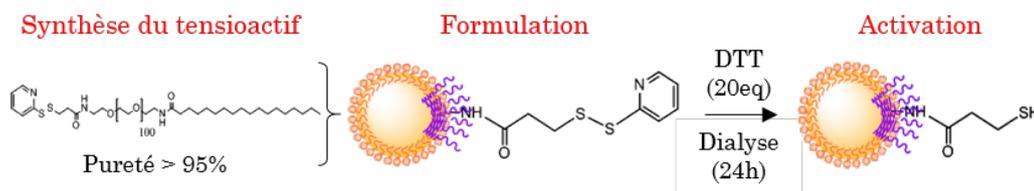


Figure 3.51 – Schéma de l'activation d'un site thiol d'un LNP par du DTT.

Les LNP sont bien visibles et apparaissent bien dispersées. Elles présentent un meilleur contraste que lors de leur observation sans greffage (Figure 3.52). Plusieurs nanoparticules d'or sont regroupées autour des LNP mais ce ne sont pas ces dernières qui permettent de mieux

visualiser les LNP. Il est possible que des ions auriques (Au^{3+}) présents dans la solution de citrate se soient greffés en surface des LNP, améliorant ainsi leur contraste. Afin de s'assurer que le contraste obtenu ne provenait pas des groupements thiols, les LNP F80-S-S-Pyr NC75, avant activation par le DTT, ont été observées. Aucune particule n'était contrastée comme le sont les LNP une fois greffées.

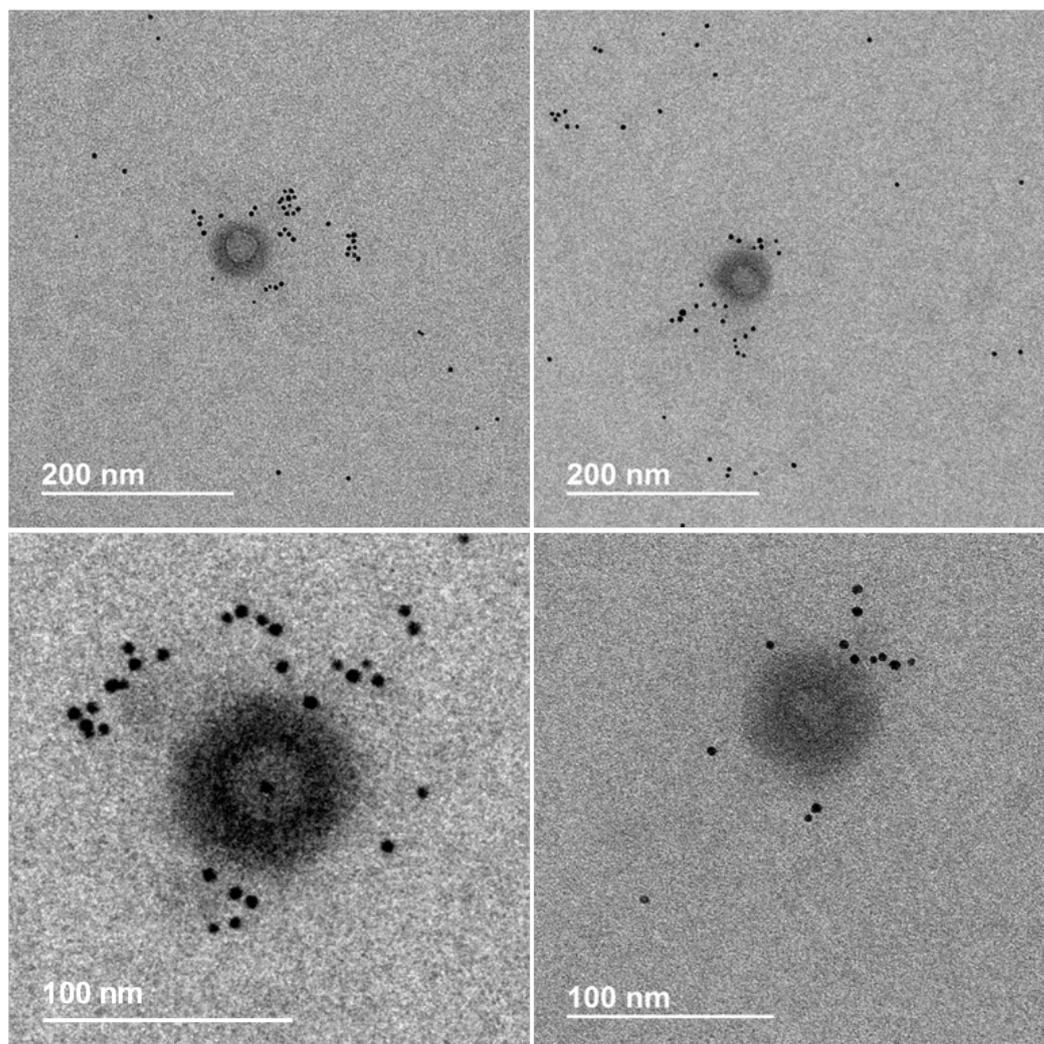


Figure 3.52 – Images MET de LNP F80 NC75 avec ligands thiolés greffées par des nanoparticules d'or, observées à l'aide du porte-objet *in-situ* liquide Poséidon.

Deux contrastes se distinguent à l'intérieur des LNP. Il semblerait qu'il soit possible de distinguer la coquille, comprenant les chaînes de PEG, du cœur des particules. Les LNP apparaissent bien rondes, ce qui est confirmé par leur coefficient de rotondité de l'ordre de 0,9. Les tailles du cœur et de la coquille des LNP ont été mesurées, mais avec une statistique moindre comparée à la coloration négative car seules une dizaine de particules étaient visibles. Ainsi, les LNP F80-S-S-Pyr après greffage ont un **diamètre total de 58 ± 2 nm** avec un **écart-type de 9 ± 2 nm** et des **tailles comprises entre 43 nm et 75 nm** environ. La coquille formée par les **chaînes de PEG** a elle une épaisseur d'environ **15 nm**, soit une taille

3.2. Caractérisation

de cœur d'environ 28 nm. Sachant que le PEG utilisé possède une masse moléculaire de 2044 Da, sa longueur maximale en extension est d'environ 12,7 nm, ce qui est cohérent avec la valeur mesurée par MET [306].

Les tailles de LNP ici mesurées ne peuvent être comparées à celles obtenues précédemment par coloration négative car les lots de LNP observés n'ont pas exactement la même composition, du fait de la présence des groupements thiolés. C'est pourquoi le lot F80-S-S-Pyr a été observé en coloration négative, avant et après greffage, afin d'observer un éventuel changement de taille ou de forme des LNP (Figure 3.53). Certaines LNP, après greffage par les nanoparticules d'or et coloration négative, se sont agrégées entre elles, créant des particules beaucoup plus larges, ce qui expliquerait que le diamètre moyen des particules ainsi que l'écart-type de la distribution soient plus grands que ceux des LNP non greffées (Figure 3.54) (Tableau 3.7). Toutefois, après greffage, les diamètres mesurés en *in-situ* liquide (55 nm) et après préparation par coloration négative (38 nm) sont assez éloignés. Ceci vient du fait que les chaînes de PEG ont tendance à s'enchevêtrer en séchant tandis qu'en milieu liquide elles sont allongées.

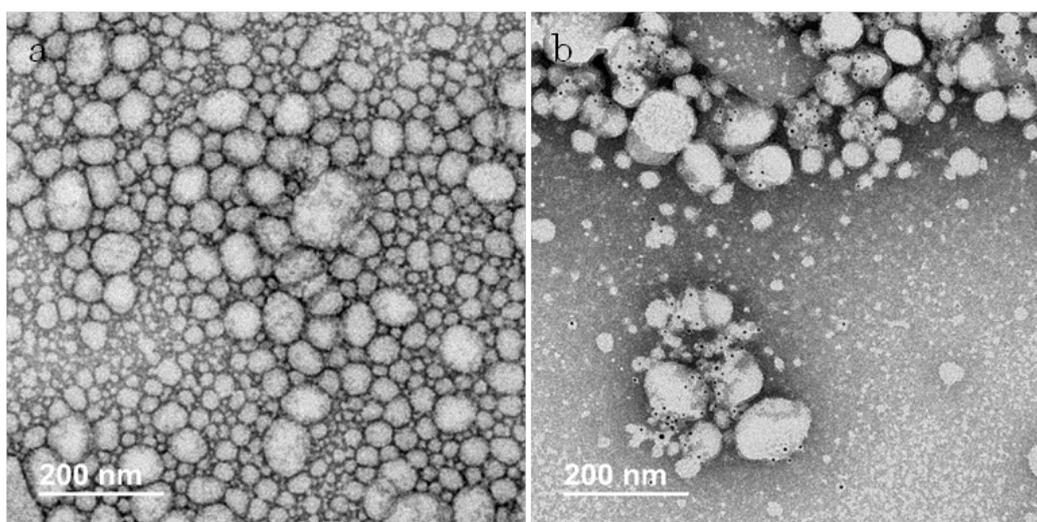


Figure 3.53 – Images MET en coloration négative de LNP F80 F80-S-S-Pyr NC75 avant (a) et après (b) greffage par des nanoparticules d'or.

Tableau 3.7 – Comparaison des diamètres moyens, écarts-types, modes, médianes et tailles minimales et maximales (nm) des LNP avant et après greffage par des nanoparticules d'or, après interpolation des données de MET (coloration négative).

Échantillon	\bar{X}	s	x_m	d_{50}	$D_{min} - D_{max}$
F80-S-S-Pyr avant greffage	24	7	21	25	15 - 60
F80-S-S-Pyr après greffage	38	22	25	35	15 - 115

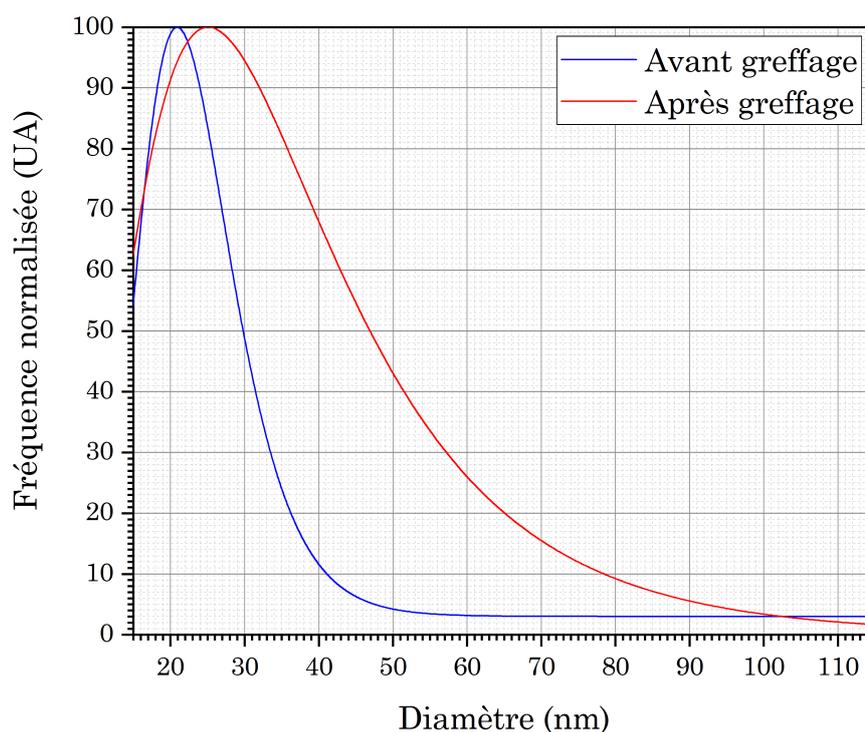


Figure 3.54 – Comparaison des diamètres des LNP F80-S-S-Pyr avant (bleu) et après (rouge) greffage après interpolation de la distribution de taille par une loi log-normale (intervalle de 5 nm).

Afin de tester l'hypothèse de greffage des LNP par des ions auriques, un greffage via un sel d'or a été mis en place.

3.2.2.3.2.2 Sel de chlorure d'or

Il a été vu précédemment que l'amélioration du contraste des LNP lors de leur greffage par des nanoparticules d'or était sans aucun doute liée à la présence d'ions auriques dans la solution de citrate, qui se seraient greffés sur les sites thiols des LNP (Figure 3.55). C'est pourquoi, un greffage à partir de cristaux de chlorure d'or trihydratés (HAuCl_4) a été envisagé. Comme précédemment, des LNP présentant des sites thiols activés en surface ont été utilisées.

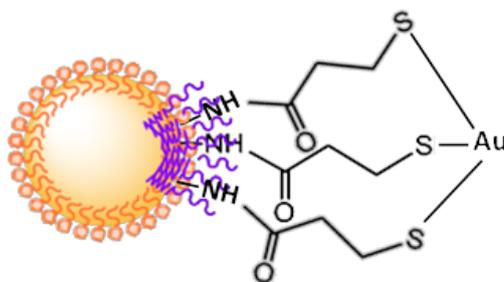


Figure 3.55 – Schéma du greffage d'ions Au^{3+} sur les groupements thiolés des LNP.

3.2. Caractérisation

Afin de se placer dans des conditions où les ions auriques sont en excès, il a été calculé le nombre de moles d'ions Au^{3+} , n_{Au} , pour un nombre de moles de thiol, n_{SH} , équivalent. Ainsi, la masse de chlorure d'or, m_{Au} , à prélever a pu être déduite des données et formules classiques de quantité de matière ci-dessous (Équations 3.4 à 3.7) (Tableau 3.8) :

$$N_{SH} = N_{SH/LNP} \cdot C_{LNP} \cdot V_{LNP} \quad (3.4)$$

$$n_{Au} = \frac{1}{3} \frac{N_{SH}}{N_A} \quad (3.5)$$

$$m_{Au} = n_{Au} \cdot M_{Au} \quad (3.6)$$

$$m_{HAuCl_4} = \frac{m_{Au} \cdot M_{HAuCl_4}}{M_{Au}} \quad (3.7)$$

où N_{SH} est le nombre total de sites thiol pour la quantité V_{LNP} de LNP prélevée.

Tableau 3.8 – Données nécessaires au calcul de la masse de chlorure d'or à peser.

Abréviation	Quantité	Définition
V_{LNP}	0,4 mL	Volume de LNP à prélever
C_{LNP}	$3,55 \cdot 10^{14}$ part/mL	Concentration du lot de LNP
$N_{SH/LNP}$	1300 thiols	Nombre de sites thiol par LNP
M_{Au}	196,97 g/mol	Masse molaire de l'or
M_{HAuCl_4}	393,83 g/mol	Masse molaire du sel de HAuCl_4
N_A	$6,02 \cdot 10^{23}$ mol ⁻¹	Nombre d'Avogadro

La masse de chlorure d'or, m_{Au} , à prélever pour être en excès par rapport aux thiols doit donc être supérieure à 0,04 mg ; 2,6 mg de sel de chlorure d'or ont donc été ajoutés à la suspension de LNP activées (soit 65 équivalents). La solution a été dialysée 48h en changeant régulièrement l'eau de dialyse, afin d'éliminer les ions n'ayant pas réagi avec les LNP.

Une dizaine de particules rondes (coefficient de rotundité de 0,8) et dispersées ont été observées en MET via le porte-objet *in-situ* liquide (Figure 3.56). La **taille moyenne** de ces particules est de **115 ± 2 nm** avec un **écart-type de 16 nm** et des tailles s'étalant de **92 à 148 nm**. Ces particules sont des LNP présentant des ions Au^{3+} à leur surface, greffés de manière covalente et s'étant liés les uns aux autres formant une coquille métallique (Figure 3.57). Ceci explique la différence de diamètre obtenue avec le greffage par des nanoparticules d'or. Afin de mettre en évidence l'effet de la quantité de sel d'or sur le diamètre des LNP, des échantillons ont été préparés à l'équivalence et à la demie équivalence. Cependant, aucun LNP n'a pu être observé malgré plusieurs tentatives.

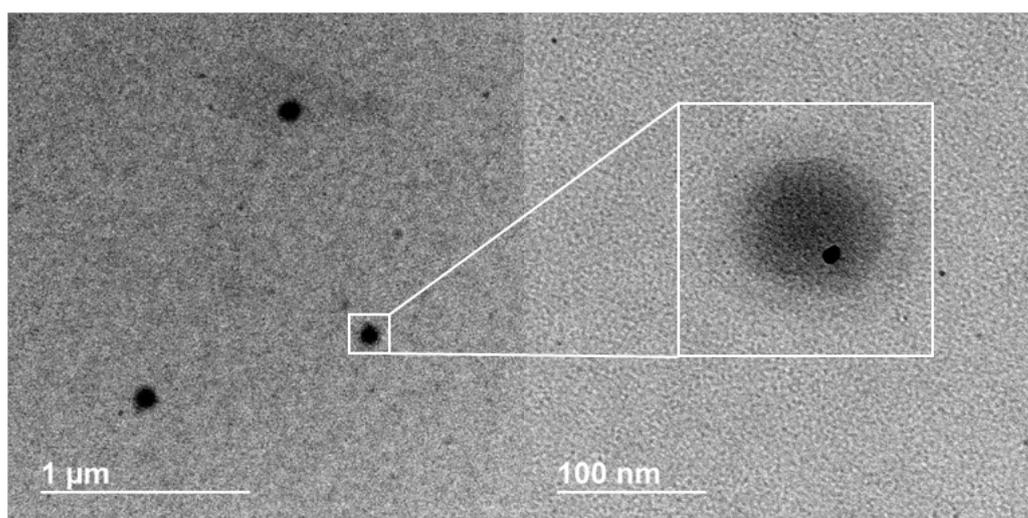


Figure 3.56 – Images MET de LNP F80 NC75 avec ligands thiolés greffées par des ions auriques, observées à l'aide du porte-objet *in-situ* liquide Poséidon.

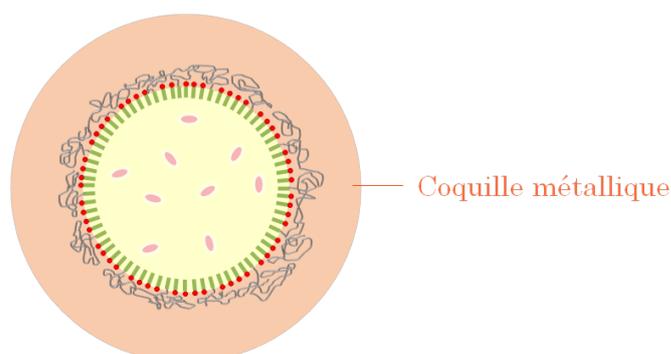


Figure 3.57 – Schéma de la coquille métallique formée autour des LNP après greffage par des ions métalliques.

3.2.2.3.2.3 Sel de nitrate d'argent

Afin de tester la faisabilité du greffage des LNP avec d'autres ions métalliques, le protocole établi précédemment a été testé à partir d'un sel de nitrate d'argent AgNO_3 , connaissant les données ci-dessous (Tableau 3.9).

Tableau 3.9 – Données nécessaires au calcul de la masse de nitrate d'argent à peser.

Abréviation	Quantité	Définition
M_{Ag}	107,87 g/mol	Masse molaire de l'argent
M_{AgNO_3}	169,87 g/mol	Masse molaire du sel de AgNO_3

3.2. Caractérisation

La masse de nitrate d'argent, m_{Ag} , à prélever pour être en excès par rapport aux thiols doit donc être supérieure à 0,05 mg ; 1,6 mg de sel de nitrate d'argent (soit 27 équivalents) ont ainsi été ajoutés à la suspension de LNP activées puis mis à dialyser. Elles ont ensuite été observées via le porte-objet *in-situ* liquide (Figure 3.58).

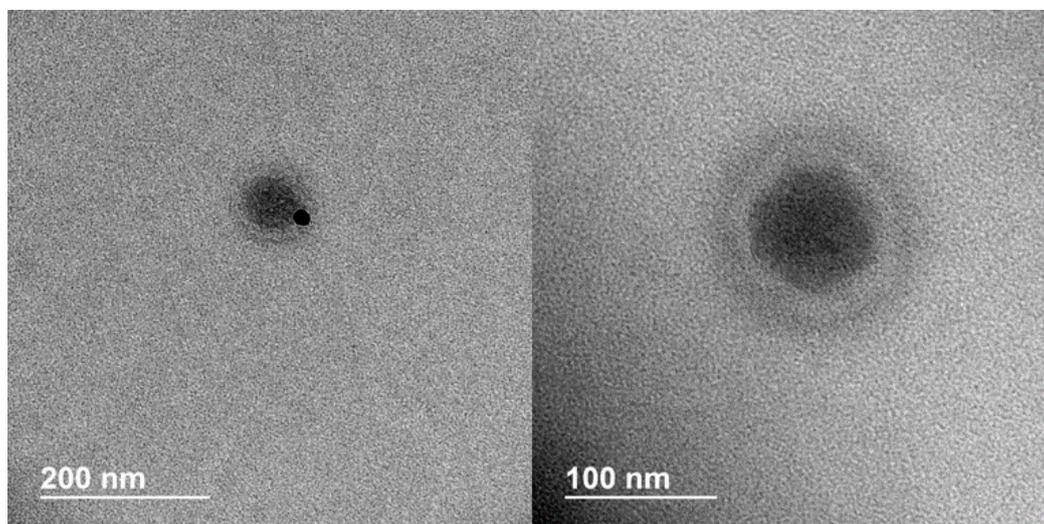


Figure 3.58 – Images MET de LNP F80 NC75 avec ligands thiolés greffées par des ions argent, observées à l'aide du porte-objet *in-situ* liquide Poséidon.

Leur observation montre le même type de particules dispersées et rondes que pour le greffage avec les ions auriques (Figure 3.56). Toutefois, celles-ci apparaissent plus petites avec un **diamètre moyen de 104 ± 2 nm**, un **écart-type de 15 nm** et des **tailles s'étalant de 78 à 127 nm**. Ceci peut être lié aux nombre d'équivalents ajoutés qui est plus faible que dans le cas du sel de chlorure d'or. Le greffage par les ions argent est donc aussi efficace que celui par les ions auriques.

3.2.2.3.3 LNP chargées avec un agent de contraste

Plutôt que de greffer des éléments métalliques à la surface des LNP, une autre solution consistant à ajouter un agent de contraste directement lors de la synthèse de celles-ci a été envisagée.

La molécule retenue pour cette étude est le iopentol ($C_{20}H_{28}I_3N_3O_9$), utilisé en imagerie médicale comme produit de contraste pour les tissus biologiques, les organes ou encore les tumeurs [307]. Un lot de LNP F80-iopentol NC75 a donc été synthétisé à cet effet et ensuite observé à l'aide du porte-objet liquide Poséidon. La dizaine de LNP observées apparaît bien contrastée et dispersée. Il est possible de distinguer le cœur de la coquille, ce qui supposerait que le iopentol s'insérerait préférentiellement dans la membrane des LNP lors de la synthèse (Figure 3.59). Pour ce qui est de la taille des particules, leur cœur a un diamètre de 23 ± 2 nm et la coquille une épaisseur de l'ordre de 10 nm, soit une **taille moyenne de particule de 42 ± 2 nm**. Pour ce qui est de l'**écart-type**, il est de l'ordre de **7 nm** et les **diamètres minimal et maximal** de LNP chargées sont respectivement de **38 nm et 51 nm**.

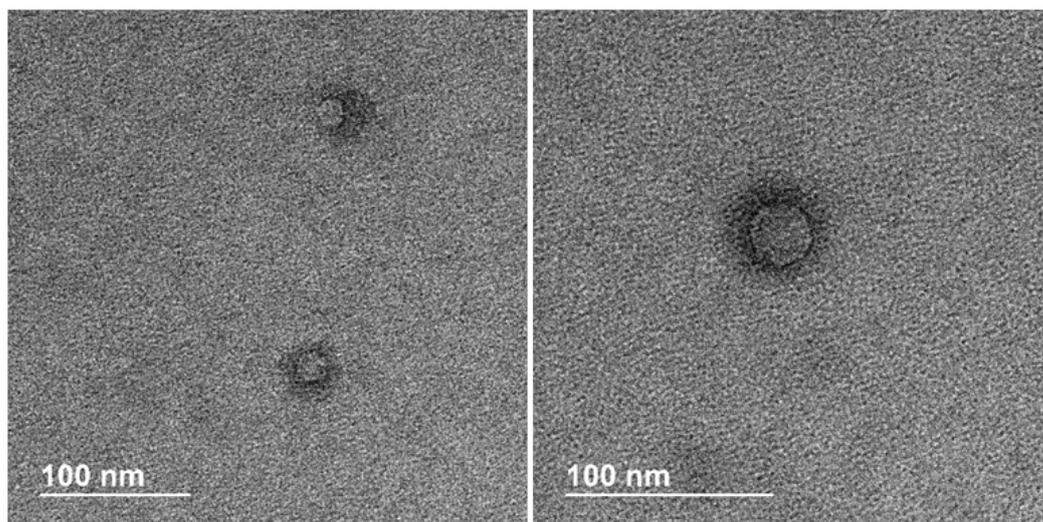


Figure 3.59 – Images MET de LNP F80 contenant du iopentol, observées à l’aide du porte-objet *in-situ* liquide Poséidon.

3.2.2.3.4 Bilan : amélioration de contraste en *in-situ* liquide

Afin d’améliorer le contraste des LNP pour leur observation en *in-situ* liquide, deux solutions ont été mises en place. La première consistait à greffer sur la surface des LNP, grâce à la présence de groupements thiols (SH), soit des nanoparticules d’or soit des ions auriques (Au^{3+}) ou argent (Ag^+), ces derniers se greffant de manière covalente. La deuxième, quant à elle, utilisait des LNP chargées avec du iopentol ($\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{I}_3\text{N}_3\text{O}_9$). Un résumé des diamètres de cœur et des épaisseurs de coquilles obtenus est réalisé dans le tableau ci-après (Tableau 3.10).

Le greffage de nanoparticules d’or sur les LNP et leur chargement avec du iopentol ont mis en évidence la structure cœur/coquille des LNP qui est identique pour ces deux techniques d’amélioration du contraste (Figures 3.52 et 3.59). Toutefois, une légère différence au niveau de la taille du cœur et de la coquille est observée. Ceci peut venir de la composition des particules qui est différente, l’une portant des groupements thiols à sa surface et l’autre intégrant l’iopentol dans sa synthèse. Pour ce qui est des greffages à l’aide de sels ioniques, les diamètres des LNP mesurés sont largement supérieurs à ce qui est obtenu par les deux autres méthodes. Cela vient tout d’abord du fait que les LNP du lot utilisé pour le greffage ionique possèdent des tailles légèrement supérieures à celles utilisées pour le greffage à partir des nanoparticules d’or (Annexe B.2). De plus, il est fortement probable qu’une coquille métallique se soit formée autour des LNP, masquant le cœur huileux de celles-ci, et augmentant ainsi leur diamètre.

Ainsi, les deux techniques qui semblent les plus adaptées et ayant été retenues pour l’observation de particules lipidiques en MET *in-situ* liquide sont le greffage de nanoparticules d’or ainsi que l’encapsulation d’un agent de contraste, le iopentol.

1. Pas de différenciation cœur/coquille

3.2. Caractérisation

Tableau 3.10 – Diamètre des LNP et taille de leur cœur mesurés en MET *in-situ* liquide pour différentes techniques d'amélioration du contraste.

Technique	Diamètre des LNP (nm)	Taille du cœur (nm)
Nanoparticules d'or	58 ± 2	28 ± 2
Ions auriques	115 ± 2	N/A ¹
Ions argent	104 ± 2	N/A ¹
Iopentol	42 ± 2	23 ± 2

Une autre technique d'amélioration du contraste de particules organiques observées par MET liquide existe. Elle consiste à réaliser directement à l'intérieur du porte-objet *in-situ* liquide un greffage de nanoparticules d'or sur la double membrane de liposomes ou de vésicules, à l'aide du faisceau d'électrons du MET comme catalyseur (Figure 3.60) [308]. Cette technique récente est très efficace et permet de réaliser des distributions de taille de particules, corrélées avec celles obtenues par cryo-MET et par Analyse du suivi Individuel de Particules (NTA).

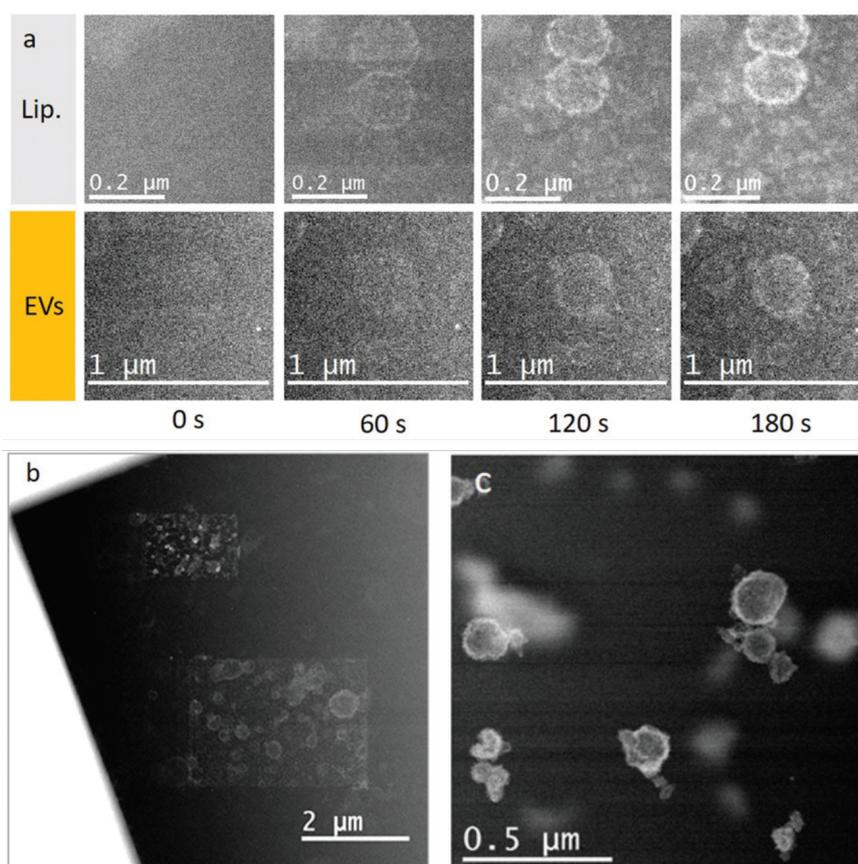


Figure 3.60 – (a) Greffage en MET *in-situ* par des nanoparticules d'or de liposomes (haut) et de vésicules (bas) entre 0 et 180s d'irradiation. (b) Image de deux zones d'interaction du faisceau d'électron avec l'échantillon en MET *in-situ*. (c) Image STEM-HAADF *in-situ* de vésicules greffées [308].

3.2.2.4 Bilan intermédiaire MET

Les différentes études menées par microscopie électronique en transmission en voie sèche, cryogénie et *in-situ* liquide montrent que la préparation d'échantillons est une étape non négligeable et qu'il est important de les comparer afin d'être certain que ce qui est observé n'est pas un artéfact lié à celle-ci.

Ainsi, il a été montré que la cryo-fixation rapide déforme les LNP lors de l'étape d'absorption par les papiers filtres, et ces dernières se retrouvent repliées sur elles-mêmes. La préparation par cryo-fixation rapide n'est donc pas adaptée à l'étude des LNP au regard des artéfacts de préparation qu'elle engendre.

Pour ce qui est de la voie sèche, il a été mis en évidence que les LNP ne peuvent être observées sans utiliser un contrastant, l'acétate d'uranyle est celui qui a ici été retenu. La phase de séchage ayant tendance à agglomérer les LNP, il est préférable de diluer celles-ci à hauteur de 2 mg/mL avant leur coloration, soit 5 fois plus diluées qu'en cryo-MET. Le masque créé par le contrastant n'a pas permis de mettre en évidence la structure cœur/coquille des LNP mais a montré que celles-ci avaient une forme ronde. L'analyse de leur diamètre a validé l'utilisation de la loi log-normale pour représenter leur distribution de tailles. Toutefois, la coloration négative étant ici utilisée en voie sèche, il est possible que les tailles mesurées ne correspondent pas à la taille des particules lorsqu'elles sont en suspension dans un liquide. En effet, les chaînes de PEG présentes autour des LNP ont tendance à s'enchevêtrer, ce qui tend à réduire la taille des particules. C'est pourquoi, il est attendu des tailles plus petites en MET avec coloration négative que par diffusion de la lumière, cette dernière utilisant directement la suspension dans son état liquide.

Afin de pouvoir observer les LNP dans leur milieu natif, un porte-objet *in-situ* liquide a été utilisé. À cet effet, un lot de LNP F80-S-S-Pyr NC75, comprenant des groupements thiolés sur leur surface, a été synthétisé afin de réaliser des greffages de nanoparticules d'or et d'ions métalliques, ceci dans le but d'améliorer leur contraste. En effet, ces derniers ne se greffent pas directement dans les chaînes de PEG des LNP, un ligand ayant une forte affinité pour les métaux est donc nécessaire. Le contraste a également pu être amélioré en ajoutant un principe actif utilisé en imagerie médicale, le iopentol, lors de la synthèse des LNP. Grâce à ces techniques, la structure cœur/coquille des LNP a pu être mise en évidence. Elle a également permis de confirmer les formes rondes observées en coloration négative. Selon la quantité de sel ou de nanoparticules d'or ajoutée, la formation d'une coquille métallique plus ou moins épaisse était espérée, ce qui a été confirmé par les observations des LNP une fois greffées (Tableau 3.11). Toutefois, la microscopie *in-situ* liquide est plutôt envisagée ici comme une technique d'analyse qualitative et semi-quantitative. En effet, seules une dizaine de particules ont pu être mesurées, contrairement à la coloration négative qui elle permet d'en mesurer jusqu'à plusieurs milliers. Le regret concernant le greffage ici effectué est que la quantité d'ions auriques ajoutée de manière équivalente au nombre de sites thiol des LNP n'a pas donné de résultat concluant (aucune particule observée) malgré plusieurs tentatives.

3.2. Caractérisation

Ainsi, il n'est pas possible au travers de l'étude menée ici de connaître la taille réelle des LNP en suspension, en se basant uniquement sur les résultats obtenus par microscopie électronique. Seule une comparaison des résultats obtenus par MET et diffusion de la lumière pourra permettre de conclure sur ce sujet.

Tableau 3.11 – Comparaison des diamètres moyens, écarts-types, modes, médianes et tailles minimale et maximale (valeurs pour le cœur) en nanomètres des LNP F80 greffées par des nanoparticules d'or, pour différentes techniques de préparation MET.

Technique	Contraste	\bar{X}	s	x_m	d_{50}	$D_{min} - D_{max}$
Coloration négative	∅	24	7	21	25	15 - 60
	NP d'or	38	22	25	35	15 - 115
<i>In-situ</i> liquide	NP d'or	58 (28)	9 (5)	N/A ²	N/A ²	43 - 75 (21 - 39)
	Sel d'or	115	16	N/A ²	N/A ²	92 - 148
	Sel d'argent	104	15	N/A ²	N/A ²	78 - 127
	Iopentol	42 (23)	7 (5)	N/A ²	N/A ²	38 - 51 (19 - 29)

3.2.3 Discussion

3.2.3.1 Comparaison des techniques de caractérisation

Il est rappelé que la caractérisation d'un nanomatériau ici recherchée repose sur trois critères morphologiques, à savoir sa dimensionnalité, sa structure/forme et son état de dispersion.

3.2.3.1.1 Dimensionnalité

Afin de comparer ces techniques, il est important de rappeler que les paramètres mesurés en ce qui concerne la taille des LNP ne sont pas identiques (Chapitre 2) :

- DLS : diamètre hydrodynamique ;
- MALS : diamètre géométrique (modèle sphérique) ;
- MET : diamètre équivalent à celui d'une particule ronde.

L'interprétation et la corrélation des différents résultats obtenus doivent donc se faire de manière très critique [309].

L'appellation de « nanoparticules » pour les LNP ici étudiées est validée. En effet, cette dénomination ne peut être utilisée que si 50% minimum de la population de particules composant la matière est de taille nanométrique, dans les trois dimensions de l'espace [22]. La valeur

2. Statistique trop faible pour obtenir le mode ou la médiane

médiane d'une distribution de taille représentant la taille centrale pour laquelle la population est partagée en deux sous-ensembles de même effectif, elle est cruciale pour attester de la dimension nanométrique des particules analysées. Ainsi, les différentes médianes relevées pour chaque technique de caractérisation ayant des valeurs inférieures à 100 nm, les LNP ici étudiées peuvent être considérées comme étant des nanoparticules. Toutefois, en nanomédecine la définition de « nano » est plus large que celle établie par la Commission Européenne vis à vis des nanoparticules en général et comprend des particules pouvant aller jusqu'au micromètre [310].

L'observation de LNP colorées négativement au MET a démontré que leur distribution de taille suivait bien une loi log-normale comme attendue pour des nanoparticules en général [139, 140]. Ainsi, un moyen de comparer les tailles obtenues pour toutes les techniques utilisées est de représenter leur densité de probabilité pour une loi log-normale à partir des diamètres moyens et écarts-types relevés ainsi que leur distributions de tailles cumulatives (Tableau 3.12) (Figures 3.61 et 3.62). Il ne faut toutefois pas essayer de comparer les modes obtenus ainsi que les valeurs minimales et maximales, comme il s'agit ici d'une approximation qualitative des distributions qui pourraient être obtenues.

Au travers de cette représentation, il apparait clairement que la DLS en mode batch ne convient pas pour caractériser la taille des LNP. En effet, la distribution obtenue pour celle-ci est beaucoup plus étalée que pour celles des mode on-line de la DLS et du MALS et que celle du MET. Les tailles mesurées en coloration négative sont plus petites que celles obtenues par DLS et MALS en mode on-line, toutes deux très similaires, ce qui confirme les suppositions faites précédemment (Chapitre 3.2.2.4). Ainsi, la différence de tailles obtenue entre ces techniques d'analyses vient bien de la morphologie des chaînes de PEG selon leur environnement direct : en milieu liquide, les chaînes de PEG sont en extension tandis qu'en voie sèche elles ont tendance à se contracter et s'enchevêtrer. La longueur des chaînes de PEG a pu être mesurée en *in-situ* liquide avec l'observation des LNP greffées par des nanoparticules d'or et est en adéquation avec la bibliographie.

Tableau 3.12 – Comparaison des diamètres moyens hydrodynamiques, géométriques ou équivalents et écarts-types (en nm) des LNP F80 NC75 obtenus par DLS et MALS en mode batch et/ou en mode on-line et par MET (coloration négative).

Technique	\bar{X}	s
DLS mode batch	101	57
DLS mode on-line	45	9
MALS mode on-line	46	8
MET coloration négative	31	11

3.2. Caractérisation

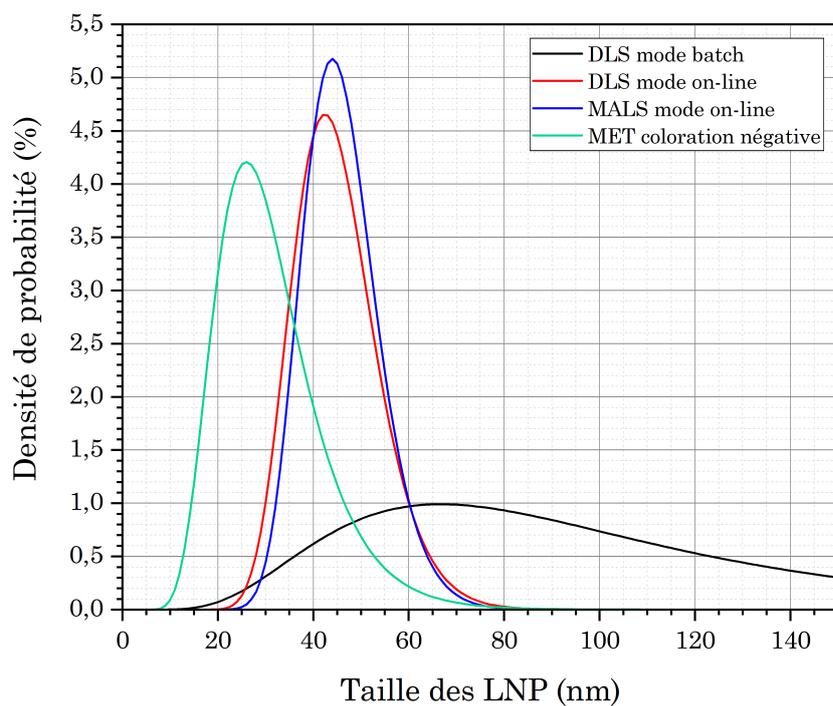


Figure 3.61 – Modélisation de la densité de probabilité obtenue à partir des valeurs moyennes et écarts-types, extraits de la DLS en mode batch, de l'AF4-DLS-MALS et du MET avec préparation par coloration négative.

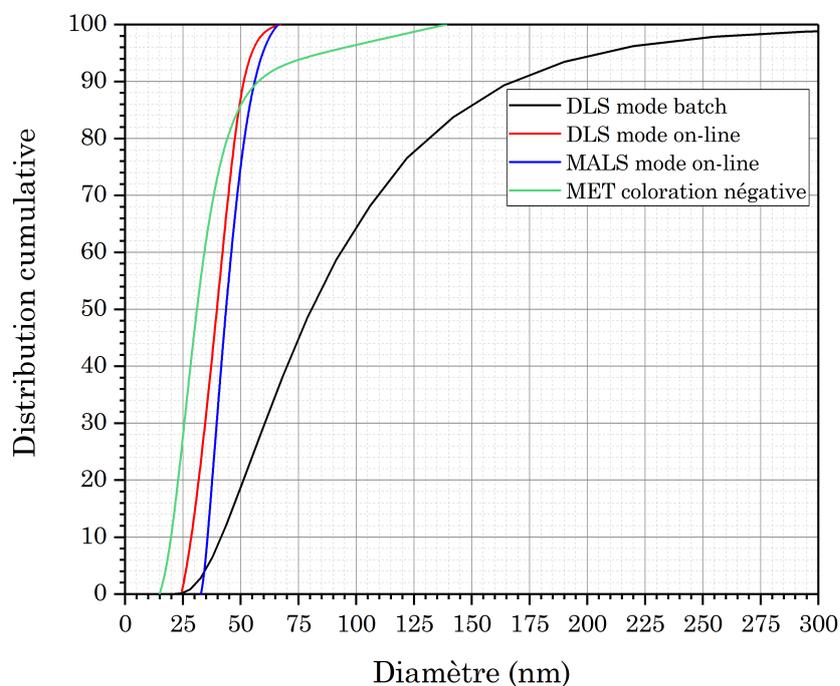


Figure 3.62 – Distributions de tailles cumulatives, obtenues par AF4-DLS, AF4-MALS et MET avec préparation par coloration négative.

L'amélioration de contraste développée au cours de cette thèse avait pour but de rendre possible l'observation en *in-situ* liquide des LNP. Ceci a été rendu possible par le greffage d'ions métalliques en surface des LNP, et notamment sur des groupements thiol ajoutés à cet effet lors de la synthèse des LNP. Afin de pouvoir conclure quant aux résultats obtenus avec cette technique sur la formation d'une coquille métallique, notamment sur une éventuelle augmentation du diamètre des LNP après greffage, les particules ont été analysées avant et après greffage en coloration négative. Il est alors apparu que le diamètre des LNP avait bien augmenté (Tableau 3.11). Ceci est validé par une analyse en DLS en mode on-line réalisée en parallèle qui montre des diamètres plus importants après greffage (Figure 3.63).

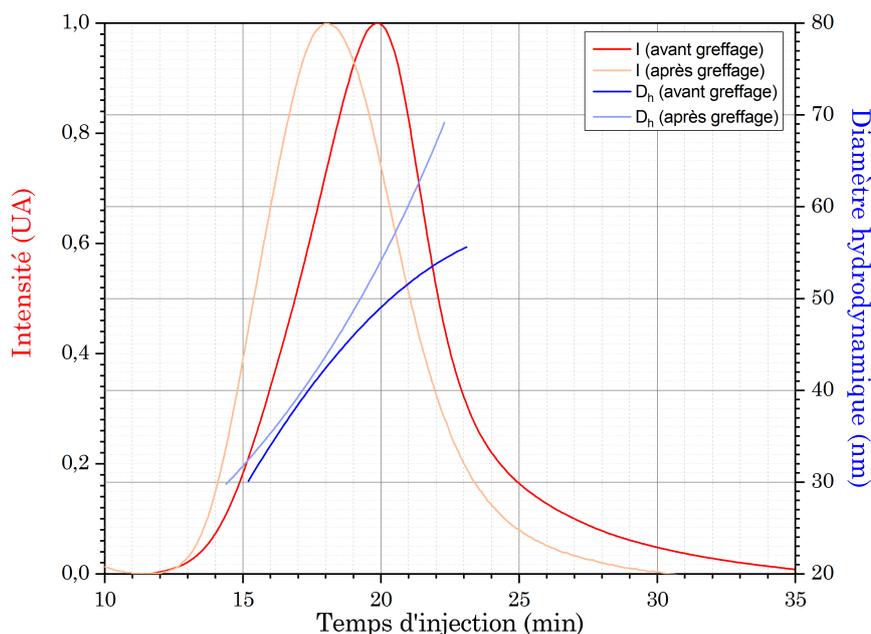


Figure 3.63 – Comparaison des diamètres hydrodynamiques obtenus par DLS en mode on-line de LNP F80 avant et après greffage.

3.2.3.1.2 Structure/forme

Il a été démontré que le cryo-MET n'était pas adapté pour l'observation des LNP, du fait des artefacts entraînés par la préparation à l'aide de l'automate de congélation rapide. En effet, il a été constaté une déformation de celles-ci lors de l'étape d'absorption de l'excès de liquide sur la grille d'observation, ceci malgré les différentes optimisations réalisées. C'est pourquoi les LNP ont ensuite été observées en coloration négative, ce qui a permis de mettre en évidence la forme ronde de celles-ci, avec un coefficient de rotundité de 0,8. Cependant, le masque créé autour des particules par le contrastant ne permet pas de conclure quant à la structure cœur/coquille des LNP. Leur forme ronde est confirmée au travers du facteur de forme obtenu grâce à la DLS et au MALS en mode on-line avec une valeur de 1 qui correspondrait à des sphères molles.

Le greffage d'ions métalliques a quant à lui permis de révéler cette structure cœur/coquille des LNP après leur observation à l'aide du porte-objet *in-situ* liquide. Ceci a également confirmé leur forme ronde, le coefficient de rotundité étant de 0,8 à 0,9. La comparaison des

3.2. Caractérisation

greffages par des nanoparticules d'or et par du chlorure d'or a montré la formation d'une coquille métallique d'autant plus épaisse que le nombre d'ions ajoutés aux LNP une fois déprotégées de la pyridine est grand. Cependant, cette coquille d'or ne permet pas de protéger la forme des LNP qui restent fragiles lors de leur cryo-fixation pour une observation cryo-MET (Figure 3.64).

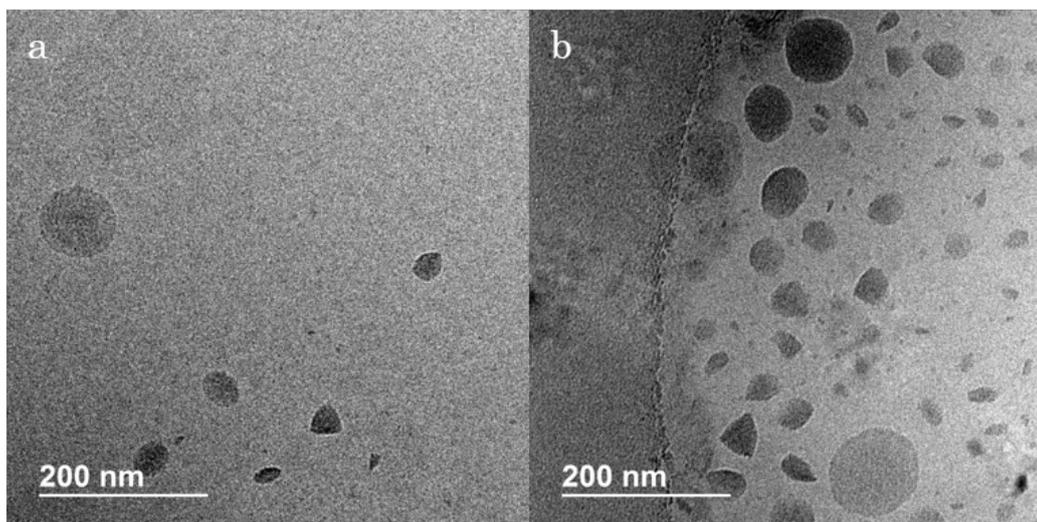


Figure 3.64 – Images cryo-MET des LNP F80 NC75 avec ligands thiolés avant (a) et après greffage par un sel d'or (b).

3.2.3.1.3 État de dispersion

Les LNP semblent bien dispersées dans leur solvant au vu des observations par cryo-MET, malgré la déformation des particules. Ceci est confirmé par les différentes observations en *in-situ* liquide. Au regard des diamètres mesurés par DLS et MALS en mode batch et/ou on-line, aucun agglomérat ou agrégat n'est mesuré.

3.2.3.1.4 Récapitulatif

Pour ce qui est de la caractérisation des LNP, il semble que la meilleure technique d'analyse soit le MET en voie sèche avec coloration négative (acétate d'uranyle) et en *in-situ* liquide (greffage d'ions métalliques) car elle permet de rendre compte des trois critères morphologiques définis précédemment [311]. La distribution log-normale des LNP a ainsi pu être confirmée. Cependant, les diamètres obtenus sont légèrement biaisés du fait du séchage des chaînes de PEG ou de la coquille métallique formée entraînant respectivement une sous-évaluation et une surévaluation de la taille des LNP. Ainsi, il est préférable de compléter cette caractérisation par de la DLS ou du MALS en mode on-line, celles-ci donnant des résultats très similaires. Le mode batch n'est quant à lui pas adapté à la caractérisation des LNP du fait de la polydispersité de celles-ci (Tableau 3.4 - valeurs min et max) [312].

Il est à noter que le marquage métallique ici effectué, en plus de faciliter la caractérisation des LNP, pourrait également trouver des applications thérapeutiques et plus particulièrement dans la destruction de cellules tumorales par photo-thermie. En effet, une fois injectées dans l'organisme, une irradiation des particules permettrait de détruire les cellules cancéreuses dans lesquelles les LNP se seraient internalisées. La longueur d'onde d'irradiation dépendrait de l'épaisseur de la coquille métallique autour des LNP, il suffirait donc de connaître cette dernière pour améliorer l'efficacité du traitement.

3.2.3.2 Confrontation avec la bibliographie

La détermination de la forme et de la taille de particules lipidiques destinées à être injectées revêt une importance primordiale en pharmacologie, afin d'obtenir les autorisations nécessaires aux tests cliniques puis à la commercialisation du nanomédicament [107]. Il a été démontré précédemment l'importance de coupler plusieurs techniques de caractérisation afin de s'assurer des résultats obtenus quant aux caractères morphologiques de ces particules. La DLS, aussi appelée PCS, est toutefois la technique la plus couramment utilisée.

Très peu d'études comparent à la fois la DLS (en mode batch et/ou en mode on-line), le MALS (mode on-line) et le MET pour l'étude de particules lipidiques, au nombre de trois à ce jour³ [313, 289, 291]. Les résultats obtenus concernant la mesure de tailles de particules lipidiques par ces trois techniques sont récapitulés dans le tableau ci-dessous (Tableau 3.13).

Tableau 3.13 – Comparaison de tailles moyennes et/ou minimales et maximales (nm) mesurées par DLS en mode batch, MALS en mode on-line et cryo-MET dans la littérature.

Échantillon	DLS	AF4-MALS	Cryo-MET
Liposomes [313]	45 - 110	40 - 90	30 - 80
LNP A [289]	67 (60 - 90)	47 (35 - 100)	49 (25 - 100)
NLC [291]	276	320	N/A ⁴

Il apparait dans le cas de l'étude de liposomes que les trois techniques donnent des résultats assez similaires et seule la DLS aurait pu servir à caractériser ces particules (Figure 3.65) [313]. Il est cependant mentionné qu'il s'agit d'un cas idéal et que dans le cas de populations ayant des tailles hétérogènes, comme les LNP F80 étudiées, la DLS en mode batch ne soit pas suffisante. Pour ce qui est de l'étude de LNP A, composées notamment de petits ARN interférents (siRNA, small interfering RNA) utilisés pour empêcher l'expression d'un gène dans

3. Source *Scopus* pour une recherche : "lipid nanoparticles" AND ("light scattering" OR "DLS" OR "PCS" OR "photon correlation spectroscopy") AND ("FFF" OR "fractionation") AND "multi-angle" AND ("TEM" OR "transmission electron")

4. Donnée non disponible

3.2. Caractérisation

une cellule malade, les résultats obtenus par MET et AF4-MALS sont très semblables [289]. Ces résultats diffèrent de ce qui est obtenu par DLS en mode batch, ce dernier mesurant des tailles de particules plus grandes. Cela est interprété comme une différence de définition entre les différents diamètres analysés. En effet, la DLS mesurant un diamètre hydrodynamique incluant la couche de solvatation du solvant autour des particules, les diamètres mesurés peuvent être légèrement plus grands que ceux obtenus par d'autres méthodes. Toutefois, la différence de 20 nm observée entre la DLS et l'AF4-MALS dans ce cas semble élevée pour ne résulter que de la couche de solvatation. De plus, la taille minimale étant de l'ordre de 60 nm par DLS contrairement aux 25 nm et 35 nm pour le MALS et le MET, il semblerait que les plus petites particules soient masquées par les plus grandes. Ainsi, la DLS en mode batch ne semble pas la méthode la plus précise dans ce cas pour analyser les LNP A. Enfin, en ce qui concerne la 3^{ème} étude sur les NLC, les particules ont des tailles beaucoup plus importantes et ne sont pas de taille nanométrique à proprement parler au regard de la définition d'une nanoparticule [291]. Les NLC présentent des tailles plus importantes en AF4-MALS qu'en DLS, les données de MET n'étant pas disponibles. Ceci est interprété comme pouvant être lié à la coalescence des NLC à l'intérieur de l'AF4 sur la membrane de celui-ci. Le MET serait donc un bon moyen de vérifier les tailles obtenues par DLS et MALS dans ce dernier cas.

Les trois cas d'étude présentés ci-dessus montrent l'importance de comparer plusieurs techniques de caractérisation afin d'attester de l'exactitude des résultats obtenus concernant des particules lipidiques. Le même type de conclusion est obtenu si l'on étend la recherche à des nanoparticules organiques en général, avec seulement 11 articles comparant les techniques de caractérisation citées précédemment⁵. D'autres techniques sont également utilisées pour la caractérisation morphologique de particules organiques, et plus particulièrement des nanoparticules lipidiques, telles la microscopie à force atomique (AFM), le MEB ou encore la NTA [276, 308, 314].

En plus des paramètres morphologiques, il est nécessaire de caractériser d'autres critères comme l'efficacité d'encapsulation du principe actif afin de s'assurer qu'il a bien été internalisé dans les nanoparticules et ne se retrouve pas dans le surfactant [315]. Pour cela, connaissant la quantité totale de principe actif ajoutée lors de la synthèse ainsi que la quantité qui n'a pas été internalisée, déduite par spectrophotométrie, il est aisé de remonter à la quantité de principe actif à l'intérieur des particules. Le degré de cristallinité du/des lipide(s) composant les nanotransporteurs est également important car de lui dépendra une bonne encapsulation et un relargage contrôlé du principe actif [276]. Ce dernier peut être déterminé par Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC, Differential Scanning Calorimetry ou par Diffraction des Rayons X (XRD, X-Ray Diffraction).

5. Source *Scopus* pour une recherche : nanoparticles AND "light scattering" AND ("FFF" OR "fractionation") AND "multi-angle" AND ("TEM" OR "transmission electron")

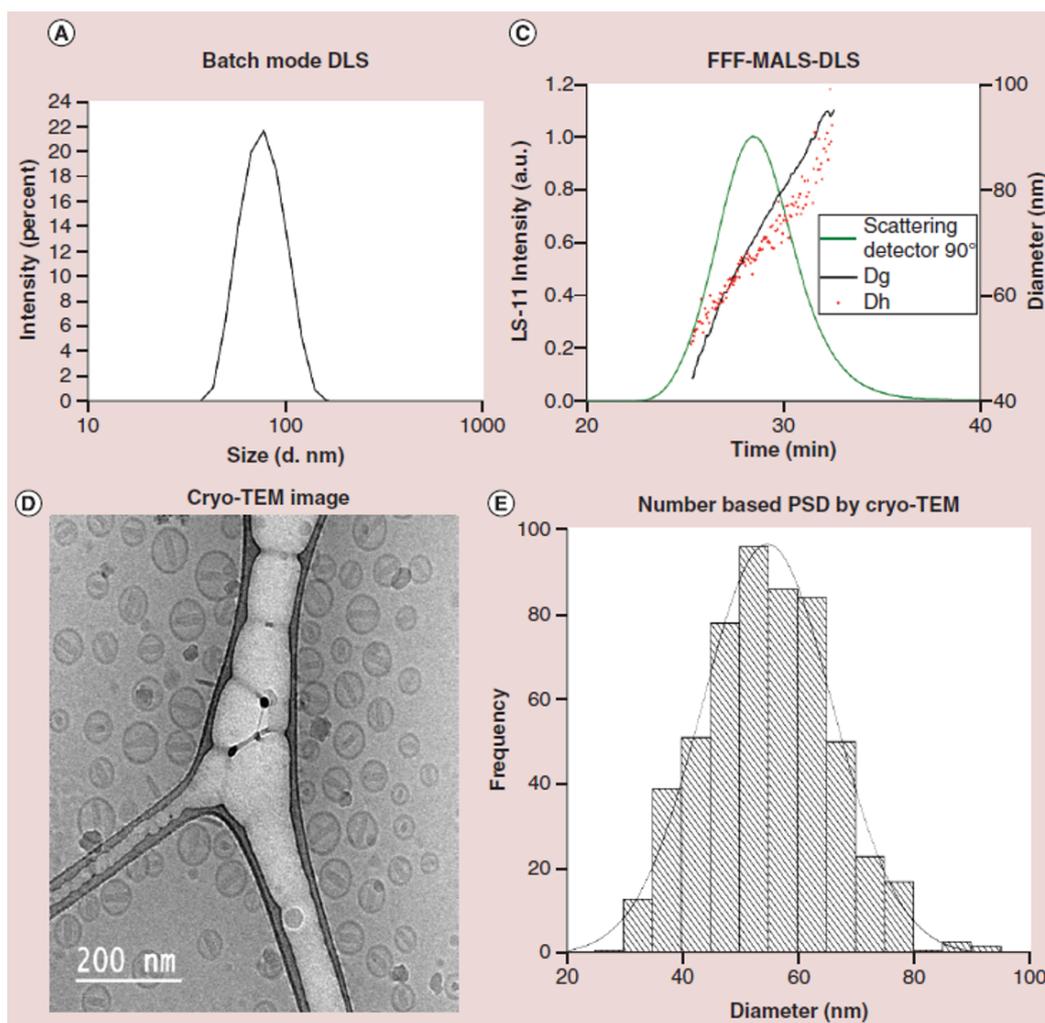


Figure 3.65 – Caractérisation de liposomes par DLS en mode batch, AF4-MALS-DLS et par cryo-MET [313].

3.3 Applications : étude de la stabilité des LNP

Afin d'éprouver les techniques de caractérisation utilisées ci-dessus, des cas concrets d'application des LNP ont été étudiés, à savoir l'influence du ratio cire/huile, l'incidence du type de synthèse (ultrasons et homogénéisation haute pression) et enfin leur interaction avec des protéines.

3.3.1 Influence du ratio cire/huile

Il a été vu précédemment que des LNP dont le cœur est composé de 100% de cire cristallisent sous forme hexagonale (Chapitre 3.2.2.2.2). Mais qu'en est-il de la forme et de la taille des LNP pour d'autres ratios cire/huile ? Ainsi, 4 lots de LNP F80 possédant différents ratios ont été comparés à savoir :

- NC0 (0% de cire) ;
- NC25 (25% de cire) ;
- NC75 (75% de cire) ;
- NC100 (100% de cire).

Les observations MET des trois premiers échantillons colorés négativement montrent des particules rondes, ce qui est confirmé par leur coefficient de rotondité de l'ordre de 0,8 (Figure 3.66.a, b et c). Pour ce qui est des LNP F80 NC100, des particules rondes coexistent avec des bâtonnets, ce qui implique une cristallisation du cœur des LNP à température ambiante (Figure 3.66.d) (Chapitre 3.2.2.2.2). Ainsi, les analyses MALS ont été réalisées en choisissant un modèle « bâtonnet » afin d'être cohérent avec la forme des particules observée, ce qui n'est pas possible en DLS.

Pour ce qui est de leur taille, les distributions différentielles et cumulées ont été tracées à partir des données de MET brutes, interpolées par une loi log-normale, seulement pour les échantillons NC0, NC25 et NC75, le lot NC100 ayant une trop importante dispersion de tailles (Figure 3.67). Toutefois, la taille moyenne, l'écart-type et les tailles minimale et maximale de ce dernier ont tout de même pu être extraits des valeurs brutes obtenues par MET (Tableau 3.14). Les distributions des LNP NC25 et NC75 sont très similaires, ce qui est confirmé par les données obtenues par AF4-MALS-DLS. Les LNP NC25 possèdent toutefois une distribution de tailles légèrement plus large que les NC75. Pour ce qui est des LNP NC0, la différence avec les LNP NC25 et NC75 est sans équivoque. En effet, elles ont une taille moyenne et un écart-type beaucoup plus grands que les deux autres compositions de cœur, ce qui est confirmé par DLS et MALS en mode on-line (Tableau 3.14). Toutefois, les tailles maximales mesurées en diffusion de la lumière sont plus petites qu'en MET, ce qui pourrait venir du fait que les plus grosses particules soient restées coincées dans le canal de l'AF4.

La ratio cire/huile dans le cœur des LNP n'a pas d'influence sur leur forme, qui reste bien ronde tant que la quantité d'huile n'est pas nulle. En effet, avec un cœur composé de 100% de cire, les particules apparaissent cristallisées sous la forme d'hexagones. Pour ce qui est de leur taille, l'influence du ratio cire/huile est non négligeable. En effet, plus ce dernier diminue et plus la taille des particules rondes augmente. Une analyse par Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC, Differential Scanning Calorimetry) pourrait permettre de

comprendre les phénomènes ici mis en jeu. Au regard de ces observations, il est important de respecter scrupuleusement les quantités de cire et d'huile à ajouter lors de la synthèse des LNP, à défaut de quoi la taille des particules pourrait s'en trouver modifiée par rapport à ce qui est attendu. De plus, le principe actif est difficilement encapsulable dans le cœur des LNP lorsque celui-ci est cristallisé, il est donc préférable de ne pas utiliser les LNP NC100.

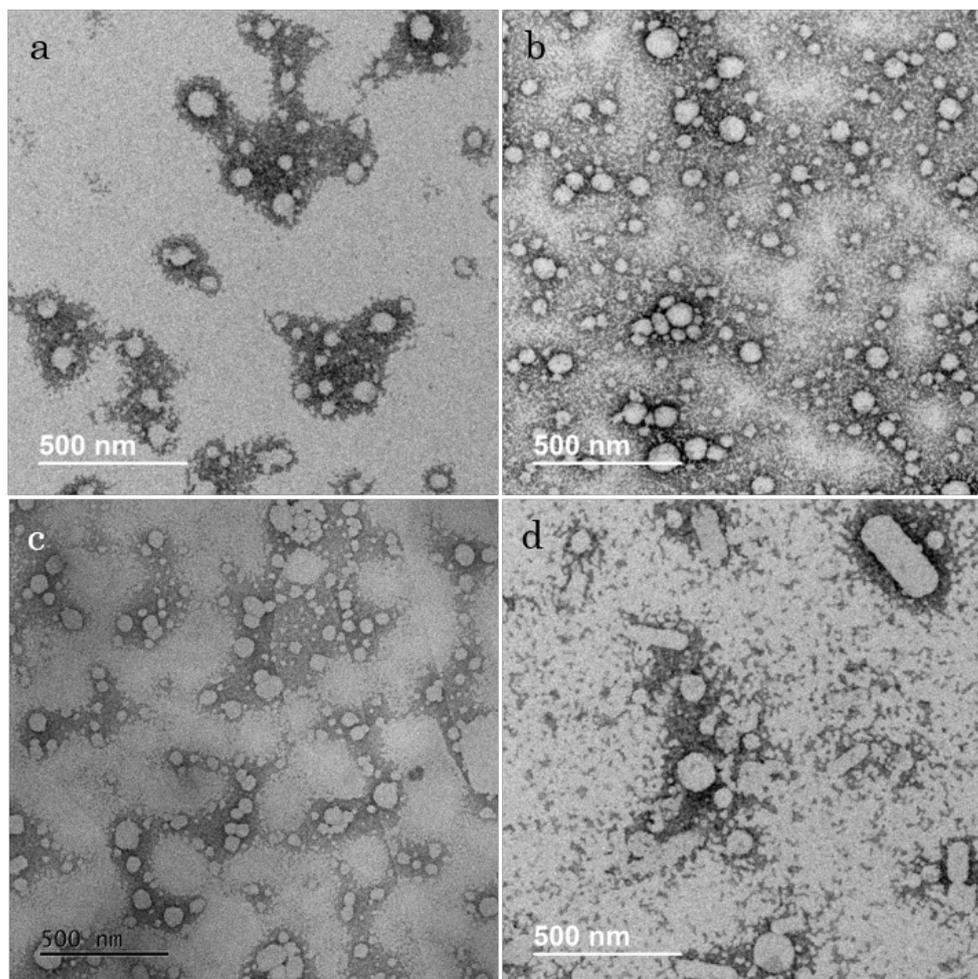


Figure 3.66 – Images MET avec préparation par coloration négative (AcUr) de LNP F80 NC0 (a), NC25 (b), NC75 (c) et NC100 (d).

6. Mesure de la longueur des particules
7. Donnée non disponible
8. Application du modèle bâtonnet (rod)

3.3. Applications : étude de la stabilité des LNP

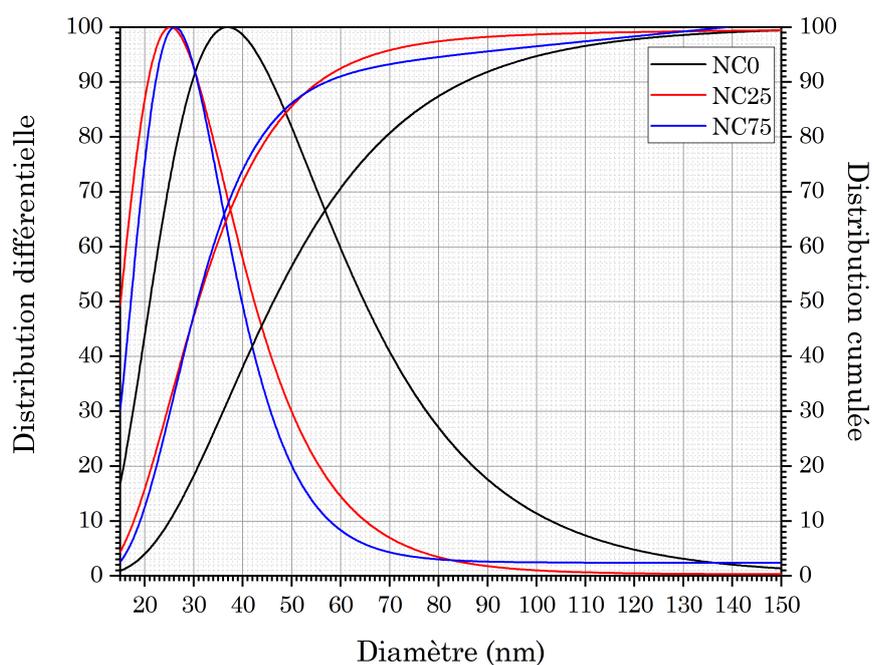


Figure 3.67 – Distributions de tailles différentielles et cumulatives obtenues par MET de LNP F80 NC0, NC25 et NC75 colorés négativement.

Tableau 3.14 – Récapitulatif des tailles moyennes, écarts-types, modes, médianes et tailles minimale et maximale (nm) des LNP F80 NC0, NC25, NC75 et NC100.

Échantillon	Technique	\bar{X}	s	x_m	d_{50}	$D_{min} - D_{max}$
NC0	MET	52	26	37	46	15 - 180
	AF4-DLS	55	12	58	54	36 - 91
	AF4-MALS	58	9	56	57	33 - 76
NC25	MET	34	16	25	31	15 - 110
	AF4-DLS	53	11	58	50	36 - 82
	AF4-MALS	60	8	58	56	40 - 82
NC75	MET	31	11	26	31	16 - 80
	AF4-DLS	45	9	47	40	24 - 71
	AF4-MALS	46	8	46	44	33 - 69
NC100	MET ⁶	119	132	N/A ⁷	N/A ⁷	16 - 750
	AF4-DLS	77	28	74	72	50 - 230
	AF4-MALS ⁸	128	N/A ⁷	120	N/A ⁷	94 - 268

3.3.2 Procédés de synthèse

Les LNP peuvent être synthétisées selon deux voies de synthèse : soit par ultrasons (US), soit par homogénéisation haute pression (HPH) (Chapitre 3.1.4). Les ultrasons sont utilisés pour synthétiser de petites quantités, notamment pour les tests en laboratoire, contrairement à l'HPH qui est quant à elle plutôt utilisé pour synthétiser de grosses quantités pour l'industrie pharmaceutique. Il est donc d'une importance fondamentale que les particules synthétisées à l'échelle industrielle aient des caractéristiques identiques à celles synthétisées en laboratoire.

Les particules analysées ici sont des LNP F80 NC25. Que ce soit par US ou par HPH, les LNP apparaissent bien rondes, ce qui est confirmé par leur coefficient de rotondité de l'ordre de 0,8 dans les deux cas (Figure 3.68).

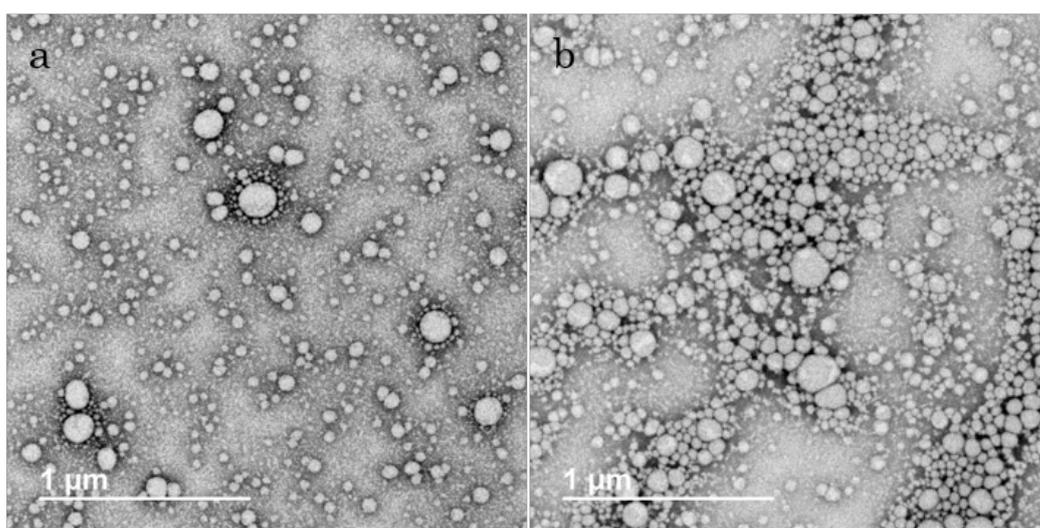


Figure 3.68 – Images MET avec préparation par coloration négative de LNP F80 NC25 synthétisées par ultrasons (a) et homogénéisation haute pression (b).

Il apparaît que les LNP synthétisées par HPH sont légèrement plus grosses que celles synthétisées par US, bien que les compositions soient identiques (Tableau 3.15) (Figure 3.69). Des phénomènes similaires et contradictoires ont été observés pour des particules lipidiques dans la littérature [316, 317, 276]. Ceci pourrait venir du fait que les échantillons préparés par US possèdent une légère variabilité de taille d'un lot à un autre due à l'opérateur, ce qui n'est pas le cas en HPH où ce dernier n'intervient pas. En effet, selon la position de la sonde, des particules plus ou moins grosses d'un lot à un autre peuvent être obtenues. Ces variations restant très minimes, elles ne sont pas visibles par DLS en mode batch mais le sont après une étape de fractionnement avant leur détection [318].

Une certaine différence est observée entre les tailles de particules synthétisées par HPH et US. Cette dernière est donc à prendre en compte dans le cas où les paramètres physico-chimiques déterminés en amont en laboratoire doivent être conservés pour la production à l'échelle industrielle.

3.3. Applications : étude de la stabilité des LNP

Tableau 3.15 – Comparaison des diamètres moyens, écarts-types, modes, médianes et tailles minimales et maximales (nm) des LNP F80 NC25 synthétisées par US et HPH, par AF4-DLS et après interpolation des données de MET (coloration négative).

Préparation	Technique	\bar{X}	s	x_m	d_{50}	$D_{min} - D_{max}$
US	MET	36	15	25	31	15 - 110
	AF4-DLS	53	11	58	50	36 - 82
HPH	MET	44	22	31	39	15 - 150
	AF4-DLS	60	6	60	55	50 - 77

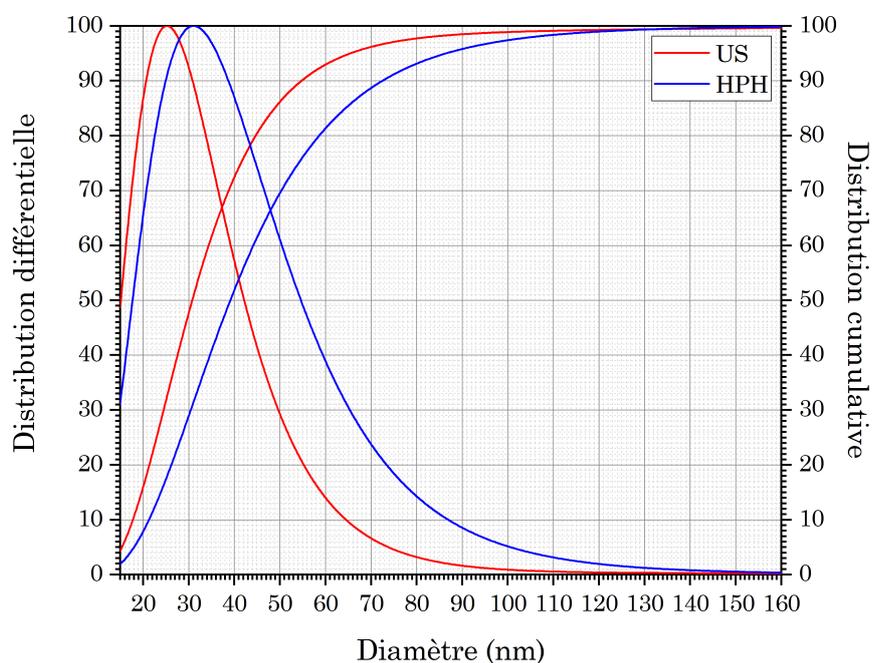


Figure 3.69 – Distributions de tailles différentielles et cumulatives obtenues par MET de LNP F80 NC25 synthétisées par ultrasons (rouge) et homogénéisation haute pression (bleu).

3.3.3 Interaction avec des protéines

Les particules ici étudiées étant amenées à être injectées dans le corps humain une fois chargées avec un principe actif, il est nécessaire que les protéines présentes dans le système sanguin n'interagissent pas avec les LNP. En effet, les particules ne doivent pas être dégradées avant d'atteindre leur site d'action afin de ne pas libérer le principe actif trop tôt limitant alors son efficacité.

Deux types de LNP F50 NC25, avec et sans principe actif, ont ainsi été étudiés avant et après interaction avec des protéines. Les LNP chargées, appelées LipImageTM, ont pour principe actif l'IR-780 iodide. Ce dernier est utilisé en imagerie de fluorescence proche infra-rouge pour la détection de tumeur [319].

Afin de reproduire au mieux les conditions d'interaction des particules avec les protéines du sang, du sérum de veau foetal (FBS, Foetal Bovine Serum) a été utilisé. Le protocole établi pour l'incubation est le suivant :

- dilution par 2,5 des LNP dans du FBS pur ;
- incubation à 37°C pendant 1h ;
- dilution par 20 des LNP + FBS dans du PBS.

Les LipImages et LNP F50 NC25 ont ensuite été analysées par MET après coloration négative et par AF4-DLS, les différents paramètres mesurés étant récapitulés dans le tableau ci-dessous (Tableau 3.16) (Figures 3.70 à 3.73).

Tableau 3.16 – Comparaison des diamètres moyens, écarts-types, modes, médianes et tailles minimales et maximales (nm) des LNP F50 et LipImages avant et après interaction avec du FBS, par AF4-DLS et MET avec préparation par coloration négative (interpolation des données).

Préparation	Technique	\bar{X}	s	x_m	d_{50}	$D_{min} - D_{max}$
LNP F50 w/o	MET	30	14	23	27	10 - 93
	AF4-DLS	N/A ⁹	N/A ⁹	45	N/A ⁹	25 - 77
LNP F50 w/	MET	29	9	24	27	10 - 74
	AF4-DLS	N/A ⁹	N/A ⁹	44	N/A ⁹	37 - 62
LipImage w/o	MET	31	15	23	28	10 - 96
	AF4-DLS	N/A ⁹	N/A ⁹	42	N/A ⁹	25 - 86
LipImage w/	MET	28	10	23	27	10 - 77
	AF4-DLS	N/A ⁹	N/A ⁹	45	N/A ⁹	37 - 65

9. Donnée non pertinente du fait de la présence des protéines

3.3. Applications : étude de la stabilité des LNP

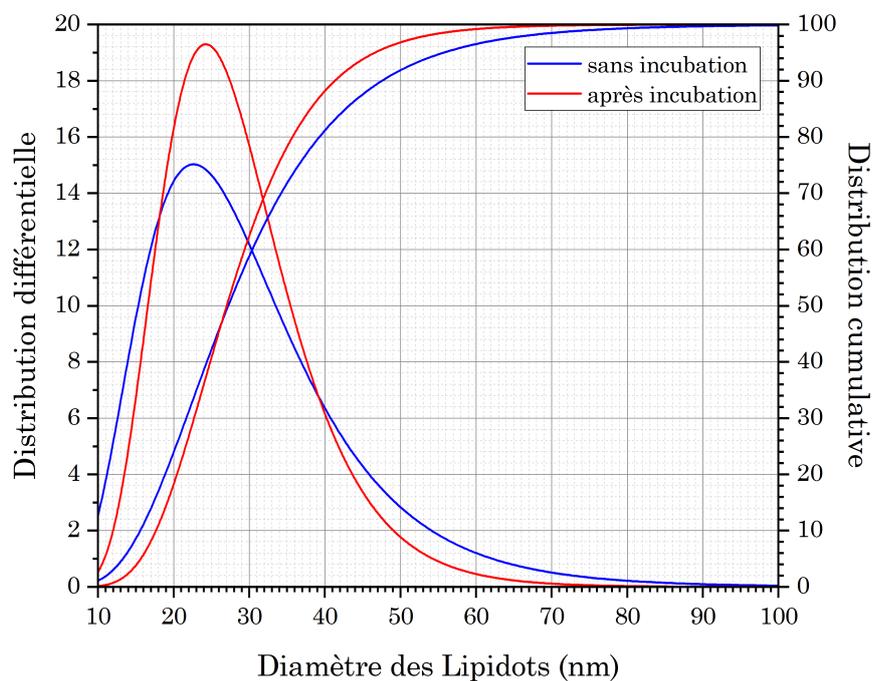


Figure 3.70 – Distributions de tailles différentielles et cumulatives obtenues par MET de LNP F50 avant (bleu) et après (rouge) incubation dans du FBS.

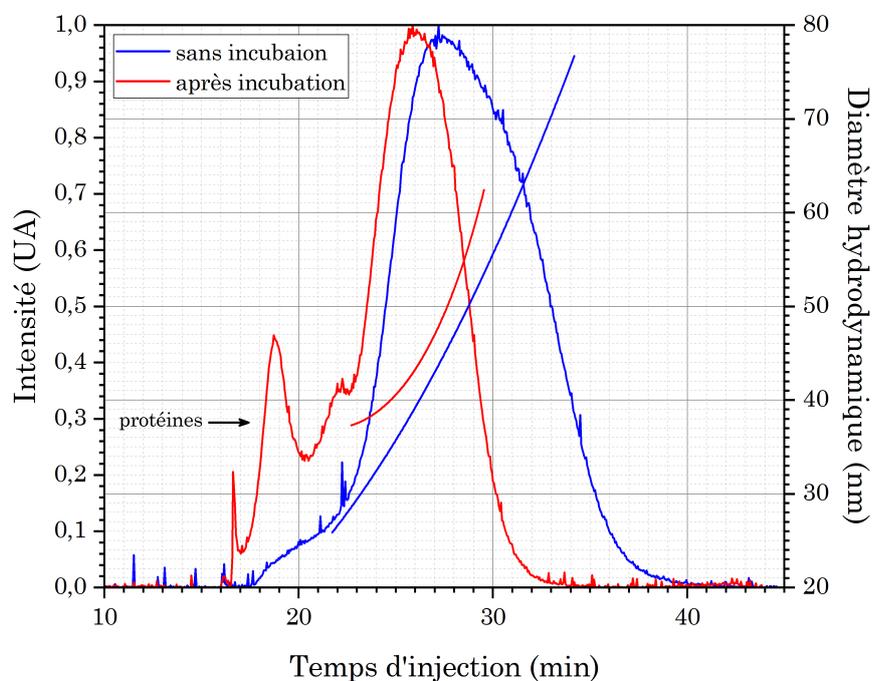


Figure 3.71 – Comparaison des diamètres hydrodynamiques de LNP F50 avant (bleu) et après (rouge) interaction avec du FBS.

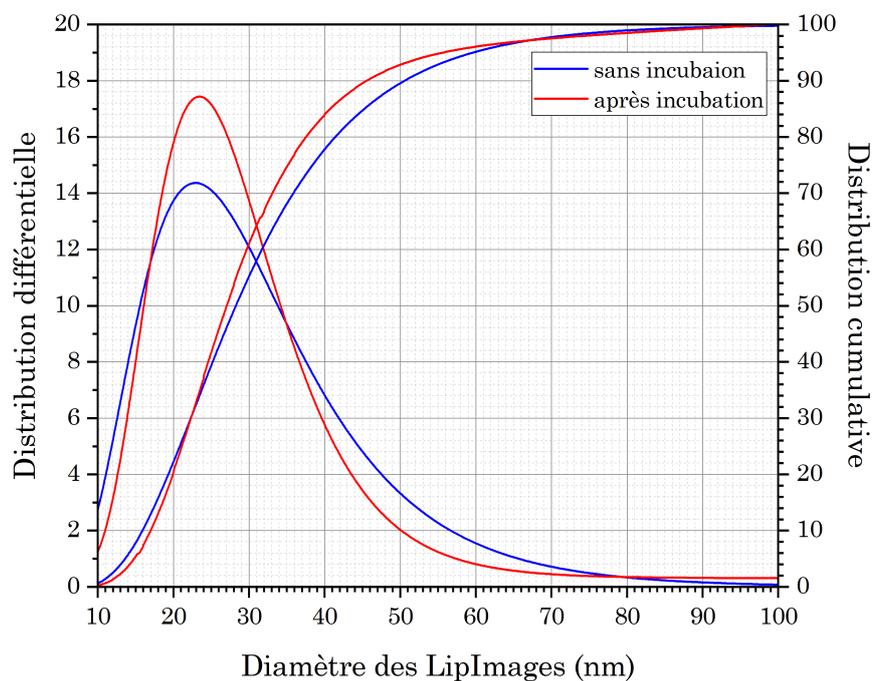


Figure 3.72 – Distributions de tailles différentielles et cumulatives obtenues par MET de LipImage avant (bleu) et après (rouge) incubation dans du FBS.

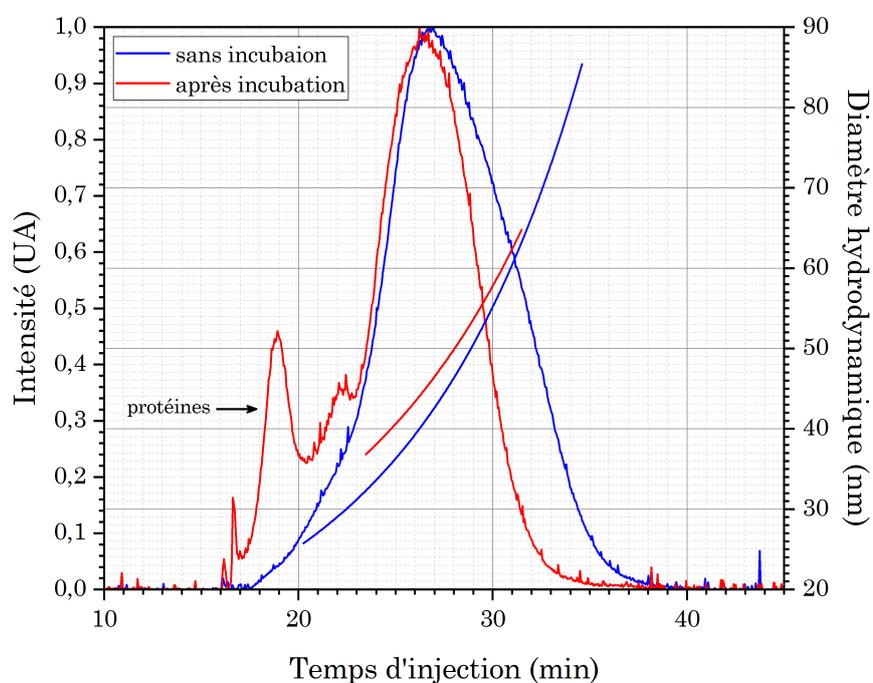


Figure 3.73 – Comparaison des diamètres hydrodynamiques de LipImages avant (bleu) et après (rouge) interaction avec du FBS.

3.3. Applications : étude de la stabilité des LNP

Les tailles inférieures à 10 nm n'ont pas été prises en compte en MET, pouvant s'agir de protéines, ce qui est confirmé par les analyses AF4-DLS où la présence des protéines est clairement visible. Il apparaît que les particules après interaction avec des protéines ont des distributions de tailles légèrement plus étroites qu'avant interaction. Ceci est particulièrement visible pour les LNP F50 sans principe actif. Cette différence de taille pourrait être liée à un relargage partiel de chaînes de PEG et de lécithine de l'extrême surface des LNP. Ce comportement est contraire à celui observé dans la littérature pour des liposomes chargés (Doxil) [313]. Cela peut venir du fait que ces derniers sont plus stables que les LNP.

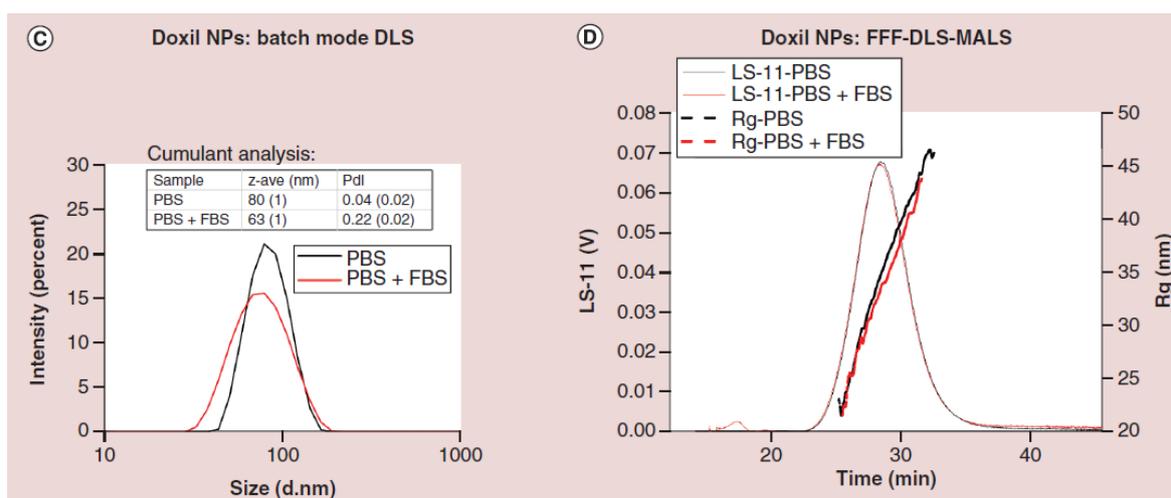


Figure 3.74 – Comparaison des diamètres de liposomes chargés (Doxil) par DLS en mode batch et AF4-DLS-MALS, après interaction avec du FBS [313].

3.3.4 Bilan

Ces trois cas d'application ont permis de montrer que la microscopie électronique en transmission ainsi que la diffusion de la lumière en aval d'une technique de fractionnement sont des techniques fiables pour caractériser physiquement des particules lipidiques. Il a ainsi été démontré que le ratio cire/huile influence de manière non négligeable la taille ainsi que la forme des particules. Les deux procédés utilisés pour la synthèse montrent quelques variabilités de l'un par rapport à l'autre. Enfin, l'interaction avec des protéines et des LNP chargées et non chargées a pu mettre en évidence un éventuel relargage de chaînes de PEG et de lécithine de la surface des LNP.

Caractérisation d'oxydes métalliques nanométriques utilisés dans les crèmes solaires

Sommaire

4.1	Nanoparticules d'oxydes métalliques et cosmétologie	139
4.1.1	Cosmétiques et nanotechnologies	139
4.1.2	Photoprotection et filtres UV	140
4.1.3	Nanoparticules de TiO ₂ type cœur/coquille	141
4.1.4	Bilan	143
4.2	Caractérisation	144
4.2.1	Diffusion de la lumière	145
4.2.1.1	Mode batch (DLS)	145
4.2.1.2	Mode on-line (AF4-MALS)	146
4.2.1.3	Bilan intermédiaire LS	148
4.2.2	Microscopie Électronique en Transmission (MET)	149
4.2.2.1	Voie sèche	149
4.2.2.2	Cryogénie	155
4.2.2.3	<i>In-situ</i> liquide	156
4.2.2.4	Bilan intermédiaire MET	157
4.2.3	Discussion	157
4.2.3.1	Comparaison des techniques de caractérisation	157
4.2.3.2	Confrontation avec la bibliographie	159
4.3	Application : vieillissement sous UV de nanoparticules de TiO₂ . . .	161
4.3.1	Paramètres de l'enceinte climatique	161
4.3.2	Analyse du vieillissement du T-AVO	163
4.3.3	Analyse du vieillissement du T-S	165
4.3.4	Analyse du vieillissement du T-2000	168
4.3.5	Bilan	171

Ce chapitre a pour but d'appliquer la routine de caractérisation précédemment mise au point. Le matériau sur lequel s'est concentré cette analyse est une poudre de nanoparticules d'oxyde de titane enrobées dans du dioxyde de silicium. Elles sont typiquement utilisées en tant que filtres UV dans les crèmes solaires. Dans un premier temps, un bref état de l'art concernant les cosmétiques et l'utilisation de ces nanoparticules a été réalisé. Les différentes caractérisations physico-chimiques effectuées sur celles-ci sont ensuite présentées. Enfin, une étude du vieillissement a été mise en place sur ces particules et d'autres comportant un enrobage différent.

4.1 Nanoparticules d'oxydes métalliques et cosmétologie

4.1.1 Cosmétiques et nanotechnologies

Les cosmétiques, regroupant tous les produits mis en contact avec le corps humain à des fins non thérapeutiques, sont regroupés en trois grandes catégories :

- les produits d'**hygiène** : savon, shampoing, dentifrice, déodorant, ... ;
- les produits de **soin** : crème hydratante, crème solaire, soin capillaire, ... ;
- les produits d'**esthétique** : maquillage, parfum,

Afin de répondre aux problématiques d'**efficacité**, de **stabilité** et de **texture** de ces préparations cosmétiques, des particules de taille nanométrique ont été introduites lors de leur formulation. En effet, elles sont plus à même de passer les barrières de la peau et donc d'agir sur les couches les plus profondes de l'épiderme et du cuir chevelu [320]. En ce qui concerne la stabilité, cette dernière est grandement améliorée en passant d'un état micro à un état nanoparticulaire, notamment dans le cas de microémulsions¹, ce qui peut améliorer la durée de vie du produit. Enfin, le passage à l'échelle nanométrique, pour certains constituants, peut permettre de changer l'aspect d'une crème en la rendant transparente une fois étalée sur la peau. En effet, les propriétés optiques des nanomatériaux sont différentes de celles des matériaux massifs correspondants [322].

Les nanoparticules utilisées dans les cosmétiques peuvent être regroupées en deux grandes catégories : les particules dites "**labiles**" et les particules "**stables**" [323]. Les particules labiles, c'est-à-dire peu stables, fragiles et donc sujettes à désintégration, regroupent l'ensemble des nanotransporteurs de principe actif comme les nanoémulsions (NLC, SLN), les nanocapsules ou encore les liposomes (Chapitre 3.1.3) [324]. Il s'agit donc majoritairement de particules organiques, utilisées pour le relargage progressif de principe actif.

En ce qui concerne les particules stables, celles-ci ne font pas référence à la stabilité colloïdale mais caractérisent l'insolubilité des particules ou leur non désintégration. Ainsi, les particules métalliques (nanoparticules d'or, d'argent, ...), les oxydes métalliques (dioxyde de titane, oxyde de zinc, ...), les quantum dots ou encore les fullerènes sont classés dans cette catégorie [325, 326, 327]. Elles sont plus particulièrement utilisées dans les crèmes en tant qu'anti-radicaux libres afin de protéger la peau de la pollution, des effets de l'âge ou bien des UV. C'est cette dernière catégorie de nanoparticules qui a ici été étudiée et plus particulièrement des oxydes métalliques utilisés en tant que filtres UV dans des crèmes solaires.

4.1.2 Photoprotection et filtres UV

Les rayonnements ultraviolets (UV) émis par le Soleil et arrivant sur Terre après avoir traversé la couche d'ozone sont décomposés en deux types : les **UVA** et les **UVB**, ayant respectivement des longueurs d'onde comprises entre 320 - 400 nm et 280 - 320 nm [328]. Les UVB, ayant une longueur d'onde plus faible que les UVA, pénètrent seulement la couche supérieure de l'épiderme tandis que ces derniers pénètrent plus profondément jusqu'à la couche basale (jonction dermo-épidermique) (Figure 4.1). Ils interagissent alors au niveau moléculaire sur les brins d'ADN, ce qui peut entraîner des mutations et donc des lésions cancéreuses.

1. attention, le préfixe "micro" pour une émulsion ne fait pas ici référence à la taille des particules [321]

4.1. Nanoparticules d'oxydes métalliques et cosmétologie

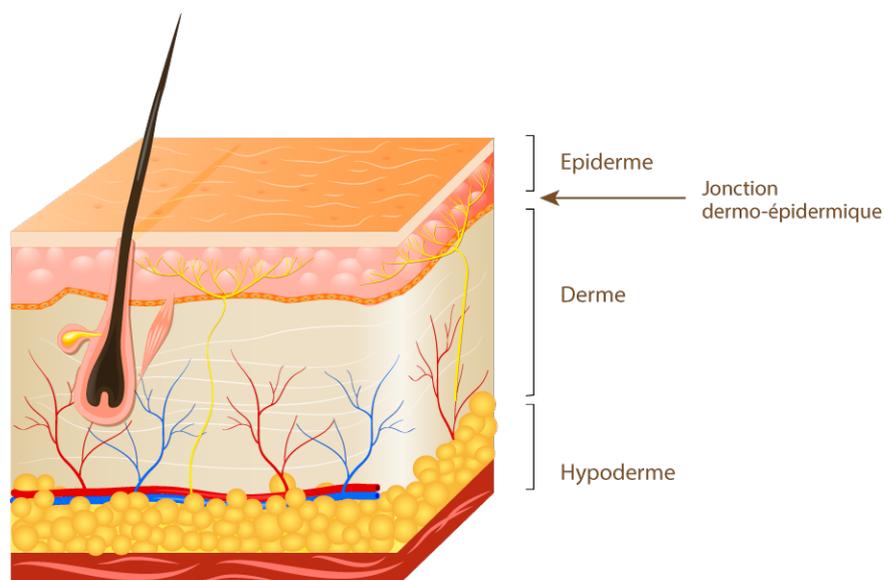


Figure 4.1 – Plan en coupe des trois couches de la peau [329].

Du fait de cette interaction avec les cellules de l'épiderme, les UVA et UVB sont « *en partie responsables des 80 000 cancers de la peau diagnostiqués chaque année en France* » selon l'INPES (Institut National de Prévention et d'Éducation pour la Santé). C'est pourquoi les protections solaires ne sont pas à négliger lors d'une exposition, même courte, aux UV. Ces dernières doivent ainsi remplir trois grandes spécificités [326] :

- être photostables afin de ne pas se dégrader lors de leur exposition aux UV ;
- dissiper l'énergie absorbée afin d'empêcher ou de limiter les dégâts sur la peau suite à l'irradiation UV ;
- ne pas pénétrer la barrière de la peau afin de pas interagir avec les cellules de l'épiderme, ce qui pourrait entraîner des lésions au niveau de leur ADN.

Afin de répondre à ces critères, deux types de filtres UV existent : des **filtres chimiques** majoritairement composés de molécules organiques et des **filtres physiques** composés de particules minérales comme du TiO_2 ou du ZnO . Les filtres UV chimiques, comme le benzo-phénone ou le salicylate, **absorbent** les UV, ainsi leur énergie est atténuée lorsqu'ils atteignent l'épiderme. Toutefois, ils ne sont efficaces que contre un type d'UV (UVA ou UVB) et ont une durée d'action limitée. De plus, ils peuvent être allergisants ou irritants. Il a, en outre, été démontré que ces derniers sont nocifs pour l'environnement et notamment pour les coraux qui finissent par blanchir voire mourir [330]. Ceci peut avoir des conséquences désastreuses à grande échelle sur la faune marine. C'est pourquoi les filtres minéraux sont désormais préférés par les industries cosmétiques (Figure 4.2) [331].

Les filtres UV minéraux sont bien souvent composés de particules de TiO_2 ou de ZnO [332, 331]. Les UV (UVA et UVB) sont arrêtés par les particules grâce à leur **absorption**, **réflexion** et **diffusion**. Ces propriétés sont gouvernées par la taille des particules d'oxydes et leur dispersion dans la crème de base, ainsi que par leur indice de réfraction et l'épaisseur de la couche de crème étalée sur la zone à protéger [326]. En effet, plus les particules sont dispersées

Chapitre 4. Caractérisation d'oxydes métalliques nanométriques utilisés dans les crèmes solaires

et petites, plus l'efficacité contre les UV est améliorée. Lorsque les particules sont de taille nanométrique, il est possible de créer des produits solaires transparents, ce qui est apprécié pour des raisons esthétiques. Cependant, du fait de cette taille, il est nécessaire de s'assurer que les particules ne puissent pas passer la barrière de la peau et donc causer plus de dommages que le soleil lui-même. Ainsi, diverses études toxicologiques ont été réalisées et ont montré que le TiO_2 et le ZnO sous forme nanoparticulaire ne traversaient pas l'épiderme [333, 332]. Ceci peut ne pas être le cas pour une peau endommagée (coupure, eczéma, ...) . Cependant, leur toxicité serait plus à même de provenir de la libération et de la pénétration dans les couches supérieures de l'épiderme de Dérivés Réactifs de l'Oxygène (DRO ou ROS, Reactive Oxygen Species) lors de l'exposition aux UV de ces particules (Figure 4.3). C'est pourquoi elles sont souvent enrobées d'un composant non réactif. En ce qui concerne leur efficacité, il a été montré que les particules de TiO_2 possèdent un meilleur indice de protection solaire (SPF, Solar Protection Factor) comparées aux ZnO , pour une même concentration de 25% (valeur maximale autorisée) [334]. Ces dernières ont donc été étudiées dans la suite de ce chapitre.

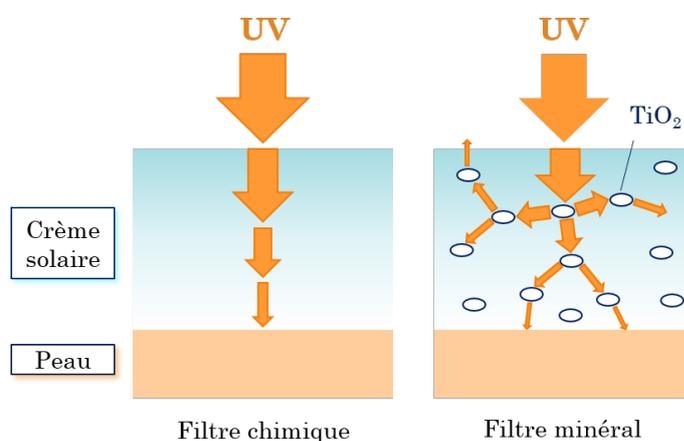


Figure 4.2 – Principe(s) d'action des filtres UV chimiques et minéraux (adapté de Stream2Sea).

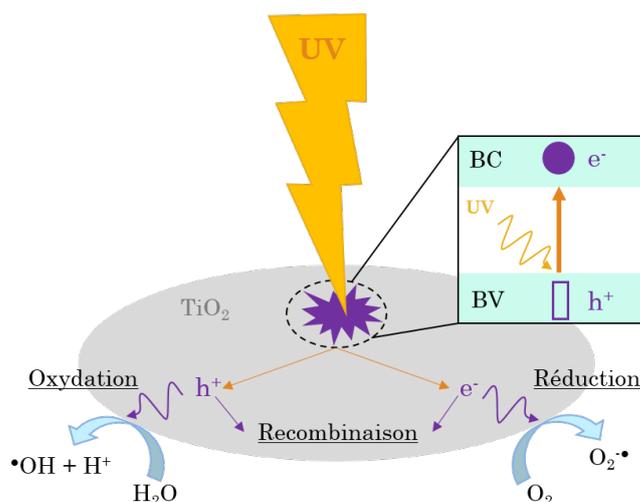


Figure 4.3 – Mécanisme de la formation de dérivés réactifs de l'oxygène sous UV (adapté de [68]).

4.1.3 Nanoparticules de TiO_2 type cœur/coquille

Les filtres UV sur lesquels s'est concentrée la deuxième partie de cette thèse sont des nanoparticules commerciales de TiO_2 , sous forme de poudre, appelées **Eusolex[®] T-AVO** (Merck Group). Il s'agit de nanoparticules **rutile** de forme **oblongue**, ayant une taille de $26 \pm 2 \text{ nm}$ [335]. Elles sont de type **cœur/coquille**, composée d'un cœur de TiO_2 et d'un enrobage de SiO_2 . L'enrobage revêt une importance capitale puisqu'il permet d'isoler le TiO_2 du reste de la formulation et empêche ses interactions avec la peau [331]. De plus, il ne réduit pas les performances de protection solaire de ce dernier et aurait même tendance à les améliorer [334]. Un autre avantage de cet enrobage est qu'il permet de piéger les radicaux réactifs qui se sont formés après interaction du dioxyde de titane avec l'eau ou l'oxygène de l'air, et même d'empêcher leur formation.

Étant sous forme de poudre, les nanoparticules ont été remises en **suspension** dans de l'eau et du FL-70 (Sigma-Aldrich), tampon améliorant la dispersion des particules et notamment celles de SiO_2 , afin de pouvoir les analyser par MET et par DLS-MALS avec et sans fractionnement [336]. Pouvant être directement utilisées en tant que filtres UV dans des cosmétiques, il est important de caractériser leur **taille** et leur **état de dispersion** afin de vérifier si elles sont agglomérées ou non, puisque cela peut avoir un impact sur leur efficacité. De même, il est important de mesurer l'**épaisseur de l'enrobage** de SiO_2 afin de déterminer si celui-ci reste intact après exposition aux UV. Une analyse de leur composition chimique permet également de vérifier la pureté des particules.

4.1.4 Bilan

Au cours de cette section, il a été vu l'importance que revêt désormais l'introduction de nanoparticules dans les formulations cosmétiques afin d'améliorer leur efficacité, leur stabilité mais aussi leur texture. Des particules d'oxyde de titane enrobées d'oxyde de silicium et commercialisées par Merck ont été étudiées. Ces nanoparticules sont utilisées en tant que filtres UV dans les crèmes solaires. Une caractérisation physico-chimique a été mise en place afin d'étudier leur taille, leur forme, leur état d'agglomération, leur composition chimique et enfin l'épaisseur de l'enrobage de SiO_2 . Enfin, une analyse de ces particules après vieillissement en enceinte climatique UV a été réalisée.

4.2 Caractérisation

Cette section présente les différentes caractérisations physico-chimiques effectuées sur la poudre Eusolex[®] T-AVO par DLS en mode batch, MALS en mode on-line puis par MET avec les préparations d'échantillons qui lui sont associées.

Les particules de T-AVO ont tout d'abord été remises en suspension dans de l'eau et du FL-70 (50% de la concentration micellaire critique (CMC)) à hauteur de 50 ppm, soit 50 µg/mL, afin de vérifier que le FL-70 est le plus adapté à leur dispersion. Les résultats obtenus par DLS montrent que les diamètres hydrodynamiques moyens, déterminés à partir du z-average, sont plus faibles lorsque le T-AVO est dispersé dans le FL-70 (Figure 4.4). Ainsi, ce dernier serait le plus à même de disperser les particules, c'est pourquoi il a été choisi comme solvant dans le reste de cette étude dans le but de limiter leur agglomération. Afin de respecter l'équilibre de la peau, il est préférable de concevoir des crèmes de pH neutre, c'est pourquoi le pH doit être ajusté à 7.

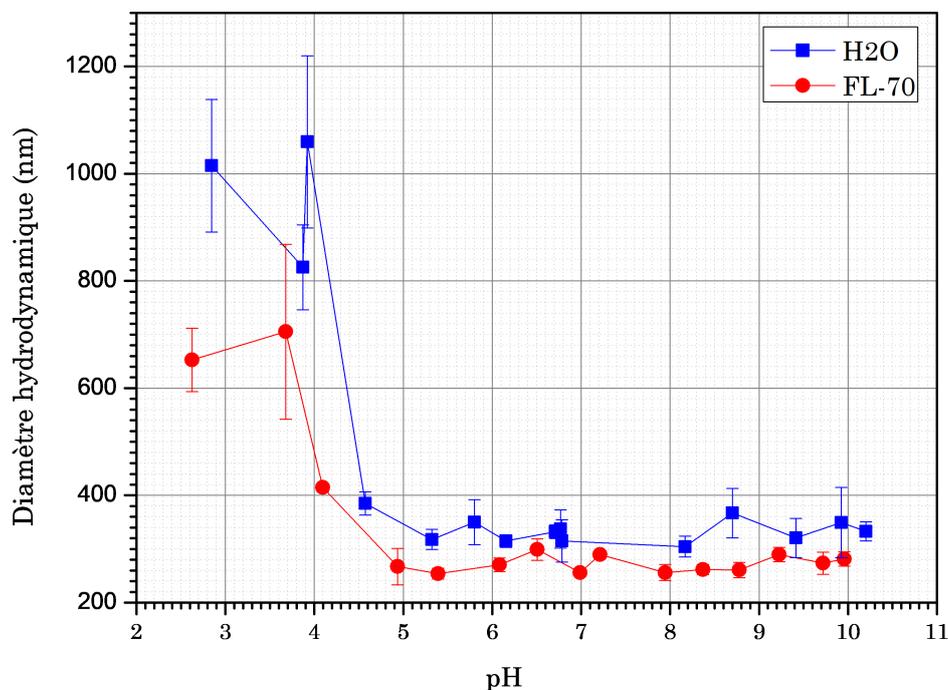


Figure 4.4 – Influence de l'eau (bleu) et du FL-70 (rouge) selon leur pH sur la dispersion des particules de TiO₂ composant la poudre Eusolex[®] T-AVO.

De même que dans le cas d'étude de LNP, seuls le diamètre moyen \bar{X} , le mode x_m , l'écart-type s , la médiane d_{50} et les valeurs minimales et maximales des tailles des particules ou amas ont été relevés, dans la mesure du possible, pour chaque technique de caractérisation.

4.2. Caractérisation

4.2.1 Diffusion de la lumière

4.2.1.1 Mode batch (DLS)

La concentration des particules a été diminuée à 10 ppm afin de limiter leur éventuelle agglomération. Les distributions de tailles différentielle et cumulée en intensité ont permis d'obtenir le diamètre hydrodynamique moyen des particules ou amas composant le T-AVO, leur écart-type, le mode, la médiane ainsi que les valeurs minimales et maximales, récapitulés dans le tableau ci-dessous (Tableau 4.1) (Figure 4.5). Au vu de son écart-type et des valeurs minimale et maximale mesurées, les particules composant le T-AVO sont agglomérées. En effet, la taille d'une particule primaire étant de l'ordre de 26 ± 2 nm, il s'agit ici d'**amas de particules** qui sont mesurés par DLS [335].

Tableau 4.1 – Taille moyenne, écart-type, mode, médiane et tailles minimale et maximale (en nm) d'amas de particules de T-AVO, mesurés par DLS en mode batch.

Échantillon	\bar{X}	s	x_m	d_{50}	$D_{min} - D_{max}$
T-AVO	184	88	164	149	40 - 1000

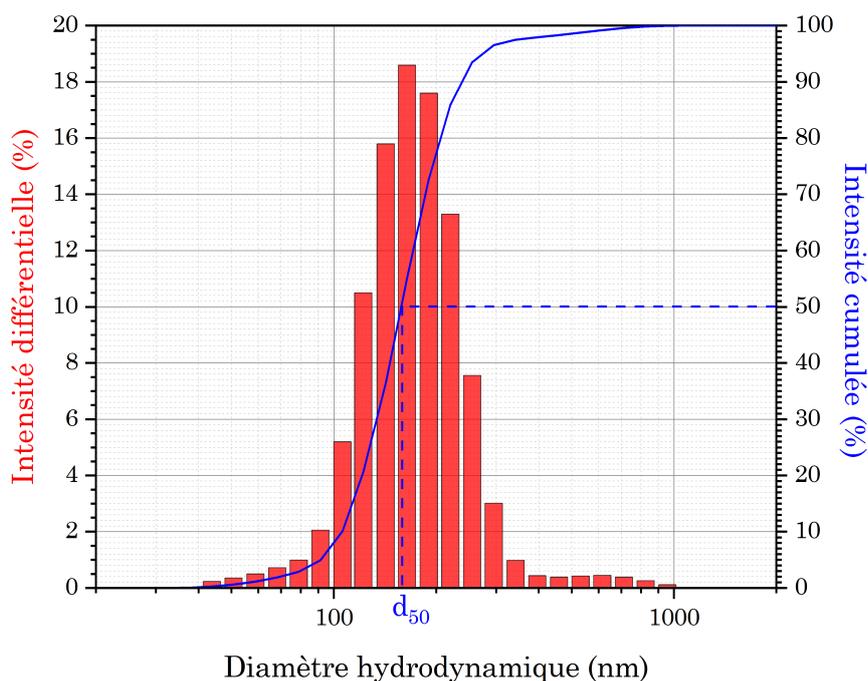


Figure 4.5 – Distributions de taille différentielle (rouge) et cumulée (bleu) en intensité de particules/amas de T-AVO, obtenues par DLS en mode batch.

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus par DLS avec la littérature, le **z-average** de la suspension de particules de T-AVO à 10 ppm a été relevé ainsi que son **indice de polydispersité**. Ceux-ci sont respectivement de 160 ± 2 nm et **0,16** à pH 7 dans le FL-70. Ces valeurs sont plus faibles que ce qui est obtenu dans un **tampon phosphate salin** (PBS) où le z-average est de 310 ± 36 et le PDI de **0,29** [335]. Ainsi, le FL-70 semble améliorer la

dispersion des particules de TiO_2 , contrairement au PBS, mais reste toutefois inefficace pour les disperser correctement.

4.2.1.2 Mode on-line (AF4-MALS)

Le détecteur de la DLS en mode on-line ne donnant pas de résultats probant pour des particules dont la taille est supérieure à 200 nm, seule l'AF4-MALS a été utilisée pour cette étude.

Contrairement aux LNP où le PBS était utilisé comme éluant, c'est le FL-70 qui a ici été choisi afin de disperser au mieux les particules de TiO_2 dans le canal de l'AF4. Les paramètres du flux transverse, différents de ceux utilisés pour les LNP qui ne sont pas adaptés pour cette analyse, ont fait l'objet de certains développements lors d'une thèse menée en parallèle (Figure 4.6 - courbe rouge) [157]. La suspension de T-AVO de 10 ppm a été injectée entre la 2^{ème} et la 5^{ème} minute à hauteur de 100 μL . Le détecteur commence à enregistrer du signal à partir de la 15^{ème} minute et ce jusqu'à la 33^{ème} minute (Figure 4.6 - courbe bleue). Le pourcentage massique de récupération en sortie de l'AF4 est de l'ordre de 5% ce qui est extrêmement faible, comparé aux LNP. **Les résultats sont donc à interpréter avec une grande précaution.**

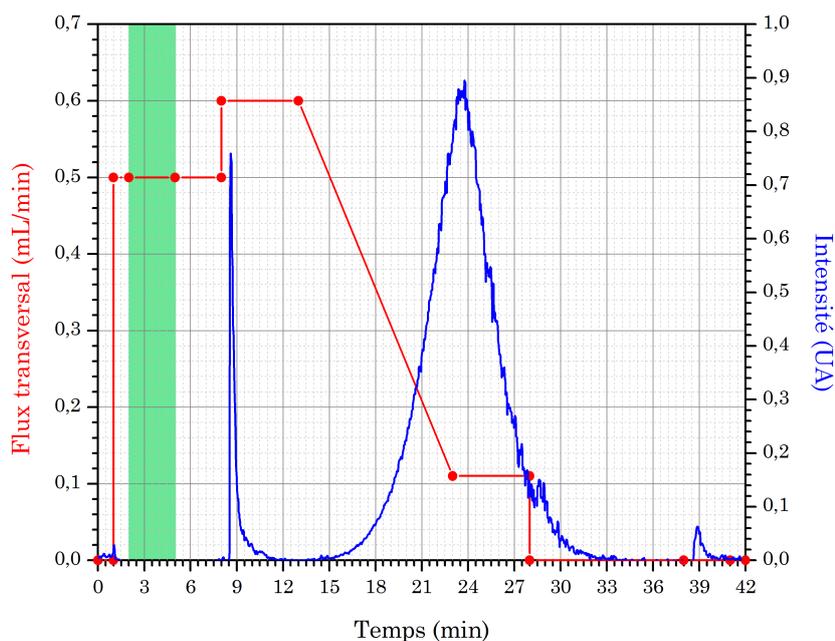


Figure 4.6 – Paramètres du flux transversal (rouge) et durée d'injection (vert) employés pour l'analyse de T-AVO et profil d'élution correspondant (bleu).

Les différents paramètres de tailles obtenus par AF4-MALS, à partir des distributions de taille et du pic d'élution, sont récapitulés ci-après (Figures 4.7 et 4.8) (Tableau 4.2). Aucun modèle morphologique n'a été imposé pour l'interpolation des données, leur taille étant supérieure à 150 nm. De même que pour les LNP, la distribution différentielle de taille obtenue par AF4-MALS est discutable, n'étant pas assimilable à une loi log-normale. Au vu des tailles obtenues par cette technique, le fractionnement des particules avant leur détection n'a pas permis de disperser correctement les agglomérats en suspension lors de leur passage dans le canal de l'AF4.

4.2. Caractérisation

Tableau 4.2 – Taille moyenne, écart-type, mode, médiane et tailles minimale et maximale (en nm) d'amas de particules de T-AVO, obtenus par AF4-MALS.

Échantillon	\bar{X}	s	x_m	d_{50}	$D_{min} - D_{max}$
T-AVO	156	67	255	260	40 - 900

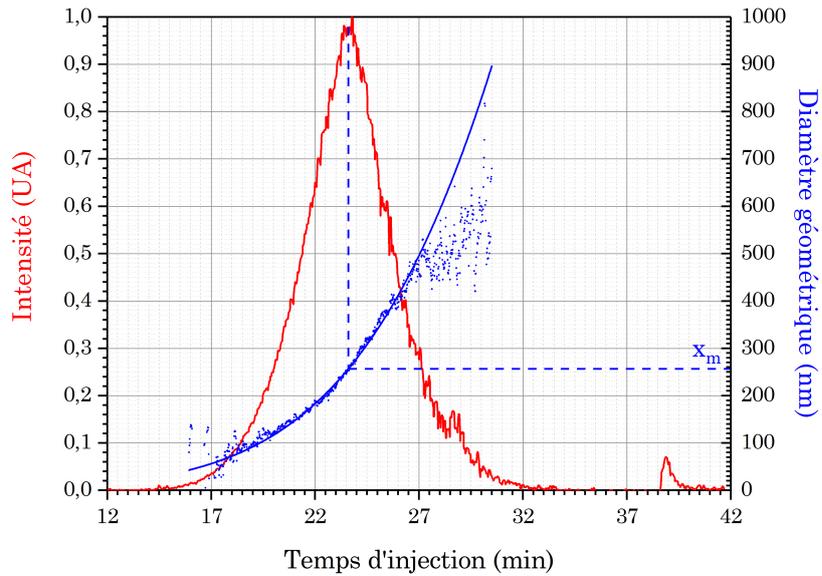


Figure 4.7 – Mesure du diamètre géométrique de particules/amas de T-AVO par AF4-MALS.

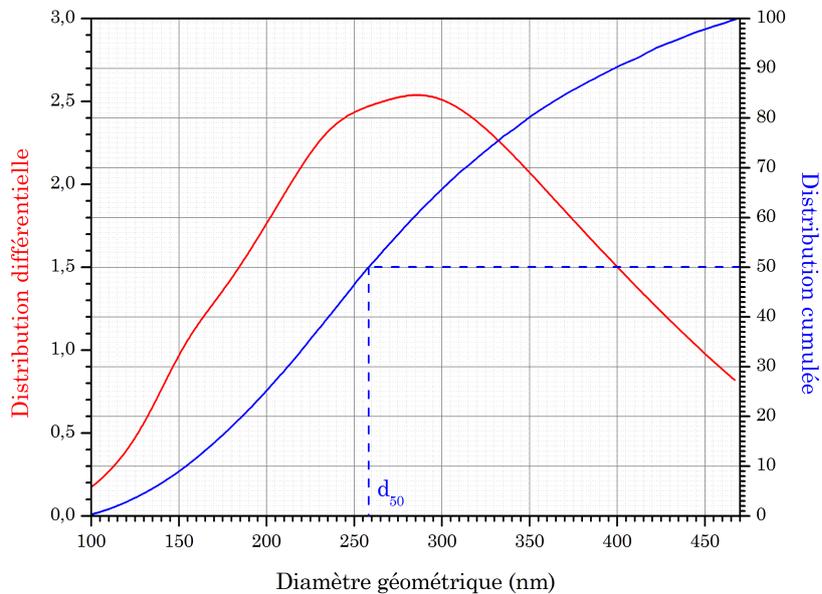


Figure 4.8 – Distributions de taille différentielle (rouge) et cumulée (bleu) en volume des particules/amas de T-AVO, obtenues par AF4-MALS.

Chapitre 4. Caractérisation d'oxydes métalliques nanométriques utilisés dans les crèmes solaires

Il n'existe actuellement aucune étude des poudres de T-AVO par AF4-MALS. La comparaison avec d'autres types de particules de TiO₂ rutile est possible mais à nuancer dans l'interprétation des résultats du fait de l'absence d'un enrobage de SiO₂. Ainsi, pour des particules NM-104 de TiO₂ rutile, les analyses par AF4-MALS montrent des particules polydispersées, de 100 nm à 600 nm de diamètre (Figure 4.9) [337]. Il semble donc difficile de disperser de façon unitaire des particules de TiO₂.

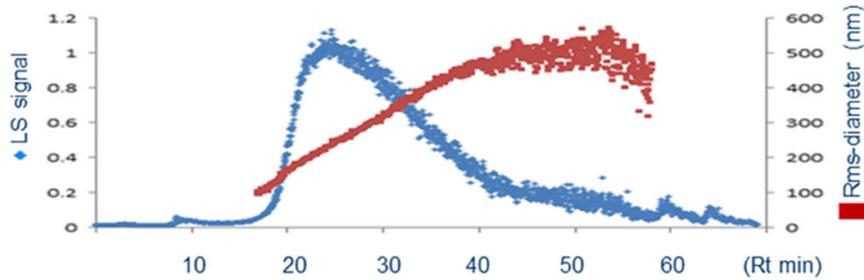


Figure 4.9 – Mesure du diamètre géométrique de particules/amas de TiO₂ rutile selon le temps d'injection par AF4-MALS [337]

4.2.1.3 Bilan intermédiaire LS

Les résultats obtenus par DLS en mode batch ou par AF4-MALS sont très similaires en ce qui concerne les gammes de tailles mesurées (Tableau 4.3). En effet, les particules analysées par ces deux techniques ont des tailles comprises entre **40 nm et 1000 nm** environ. Cette gamme est significative de la présence d'**agglomérats**, la taille d'une particule primaire étant de **26 ± 2 nm** [335]. Toutefois, le diamètre moyen, le mode et la médiane sont plus élevés lorsqu'ils sont mesurés par AF4-MALS que par DLS en mode batch. Ceci pourrait venir du fait que les particules de TiO₂ se sont agglomérées dans le canal de l'AF4. Le pourcentage massique de récupération en sortie de l'AF4 étant très faible, il est possible que de plus gros agglomérats se soient formés dans le canal et y soient restés piégés. Ainsi, aucune de ces deux techniques ne permet d'obtenir des données quant à la taille des particules primaires qui composent ces agglomérats. Seule une étude par microscopie permettrait d'obtenir les informations manquantes. C'est pourquoi les particules de T-AVO ont ensuite été observées par MET.

Tableau 4.3 – Comparaison des tailles moyennes, écarts-types, modes, médianes et tailles minimale et maximale (en nm) d'amas de particules de T-AVO, obtenus par DLS en mode batch et AF4-MALS.

Échantillon	\bar{X}	s	x_m	d_{50}	$D_{min} - D_{max}$
DLS mode batch	184	88	164	149	40 - 1000
AF4-MALS	156	67	255	260	40 - 900

4.2. Caractérisation

4.2.2 Microscopie Électronique en Transmission (MET)

4.2.2.1 Voie sèche

Les particules d'Eusolex[®] T-AVO ont tout d'abord été observées en voie sèche à hauteur de 50 ppm (très peu voire aucune particule n'étant observée pour une suspension à 10 ppm). Elles apparaissent très bien contrastées, contrairement aux LNP, et n'ont donc pas nécessité l'utilisation d'un contrastant (Figure 4.10). Elles sont similaires aux caractérisations MET effectuées par le fabricant (Figure 4.11) [338].

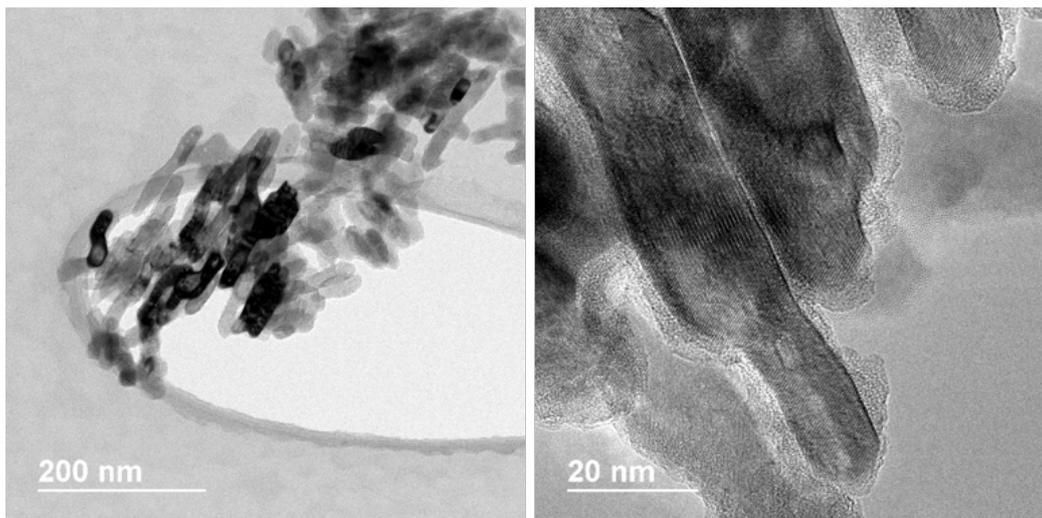


Figure 4.10 – Images MET de particules de T-AVO préparées en voie sèche.

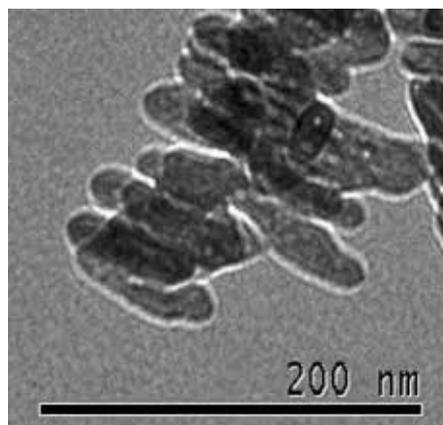


Figure 4.11 – Images MET de particules de T-AVO issue de la littérature [338].

De nombreux agglomérats, dont la taille varie de la dizaine à plusieurs centaines de nanomètres, et quelques rares particules isolées sont observés. Leur agglomération n'a pas permis de réaliser des mesures automatiques de taille de particules et celles-ci ont donc été faites manuellement.

Du fait de la forme oblongue des particules de TiO_2 , leur largeur ainsi que leur longueur ont été relevées puis interpolées par une **loi log-normale**. Toutefois, il est à noter que l'échantillon

de la population analysée est très faible pour une analyse par MET (inférieur à 200 particules). Ceci vient du fait que l'agglomération des particules a rendu difficile leur discernement et donc leur mesure. Cependant, malgré le faible nombre de particules analysées, l'interpolation est cohérente avec les données brutes (Figures 4.12 et 4.13).

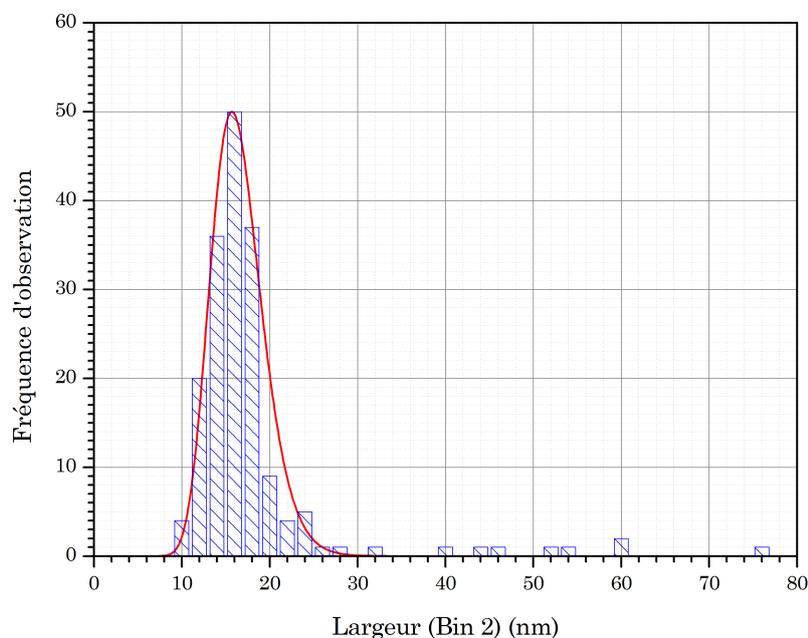


Figure 4.12 – Distribution de taille (largeur) des particules de T-AVO (histogramme bleu) et interpolation des données (courbe rouge), obtenues par MET.

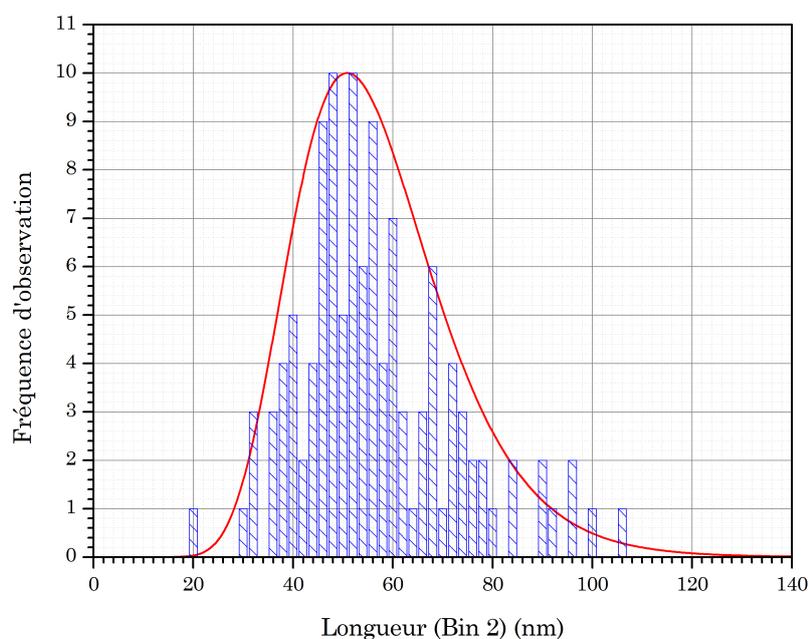


Figure 4.13 – Distribution de taille (longueur) des particules de T-AVO (histogramme bleu) et interpolation des données (courbe rouge), obtenues par MET.

4.2. Caractérisation

Les différents paramètres de taille, à savoir la taille moyenne, l'écart-type, le mode, la médiane et les tailles minimale et maximale, déterminés à partir des distributions différentielles et cumulées pour la largeur et la longueur des particules, sont récapitulés dans le tableau ci-après (Tableau 4.4) (Figure 4.14). La largeur varie très peu d'une particule à une autre, l'écart-type étant assez faible, contrairement à leur longueur qui elle est plus polydispersée. Toutefois, les tailles obtenues par cette étude MET sont cohérentes avec la littérature.

Tableau 4.4 – Tailles moyennes, écarts-types, modes, médianes et tailles minimale et maximale (en nm) des particules de T-AVO obtenus par MET après interpolation des données.

Mesure	\bar{X}	s	x_m	d_{50}	$D_{min} - D_{max}$
Largeur	17	3	16	15	9 - 30
Longueur	57	16	51	55	19 - 130

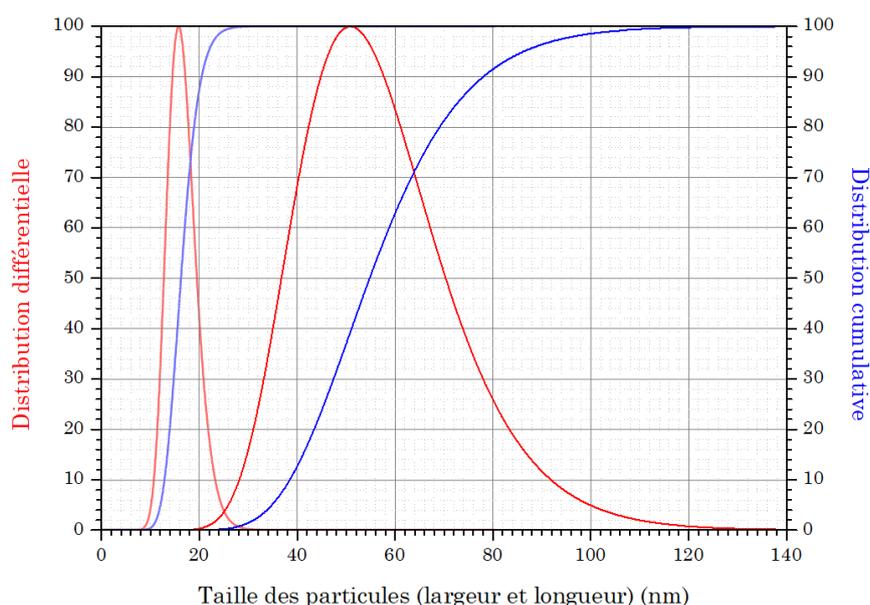


Figure 4.14 – Distributions différentielles et cumulatives de la largeur (à gauche) et de la longueur (à droite) des particules de T-AVO, obtenues par MET.

Il apparaît que les particules de T-AVO sont poreuses, avec des **pores** de l'ordre de **5 nm** (Figure 4.15.a). L'enrobage de SiO₂ quant à lui semble irrégulier et très peu épais, de l'ordre de quelques nanomètres (Figure 4.15.b). Ceci est confirmé par des analyses utilisant la Spectroscopie X à Dispersion d'Énergie (EDS) qui confirme bien la présence de titane et de silicium et un **enrobage de SiO₂ vraisemblablement amorphe de 7 ± 3 nm** (Figures 4.16 et 4.17).

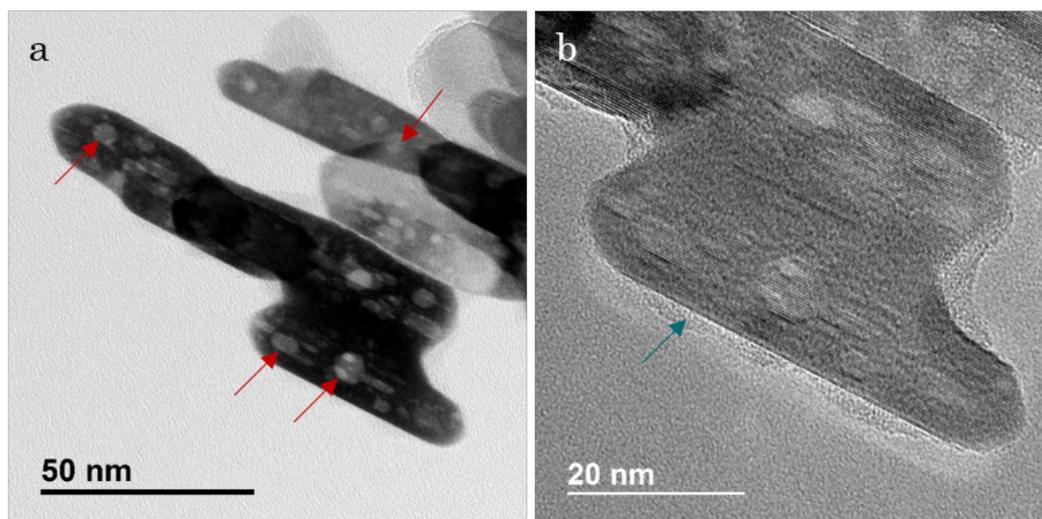


Figure 4.15 – Images MET de particules de T-AVO préparées en voie sèche. Les flèches rouges indiquent des pores présents sur les nanoparticules. La flèche bleu indique l'enrobage de SiO₂.

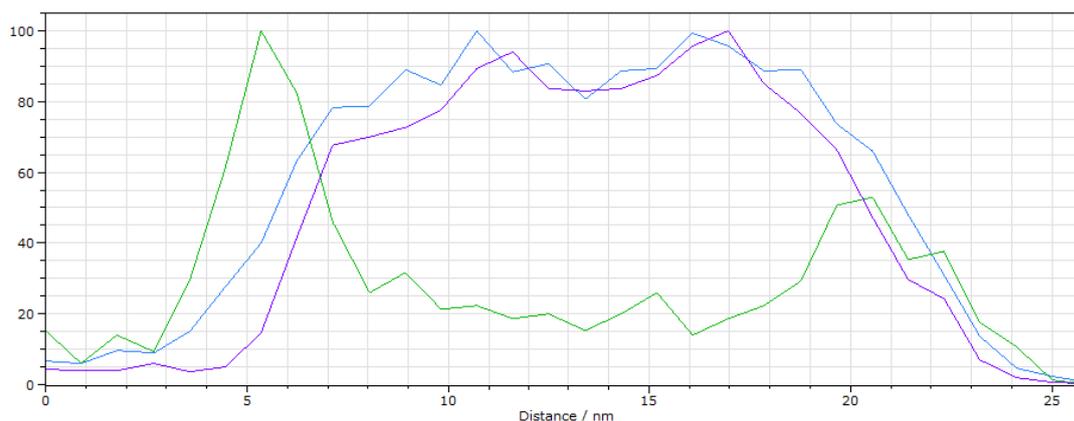
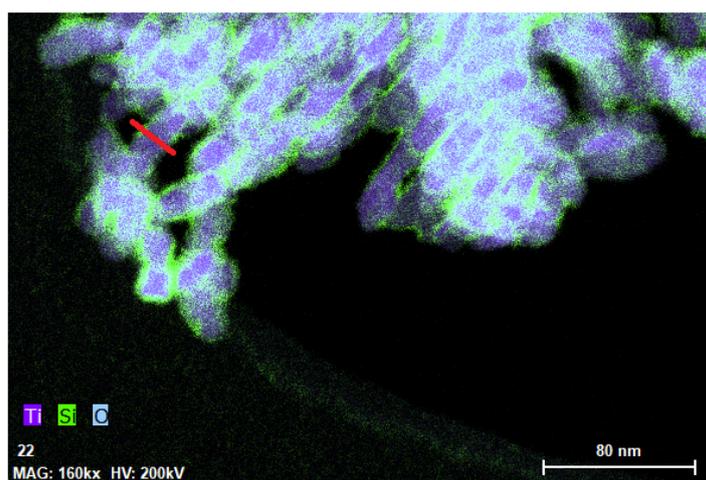


Figure 4.16 – Cartographie (haut) et profil chimique (bas), correspondant à l'interface rouge d'une particule de T-AVO, obtenus par EDS (violet : titane, vert : silicium, bleu : oxygène).

4.2. Caractérisation

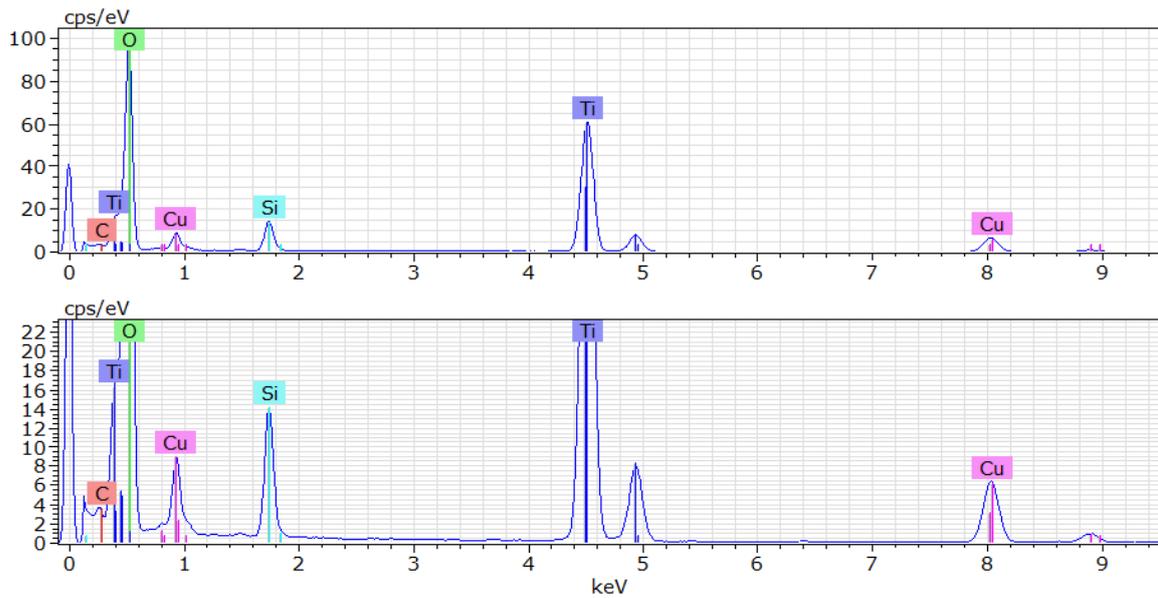


Figure 4.17 – Spectres EDS (échelles différentes) des particules de T-AVO.

Afin d'obtenir de plus amples informations concernant les pores et l'enrobage des particules de T-AVO, des acquisitions en **mode tomographique** ont été effectuées. Elles ont tout d'abord été réalisées en **mode MET**. Pour différents angles de rotation du porte-objet, des contrastes de diffraction apparaissent, ce qui complique la reconstruction du tomogramme (Figure 4.18). En ce qui concerne les pores des particules, la résolution du tomogramme est trop faible pour extraire le volume 3D et obtenir des informations plus précises (Figure 4.19).

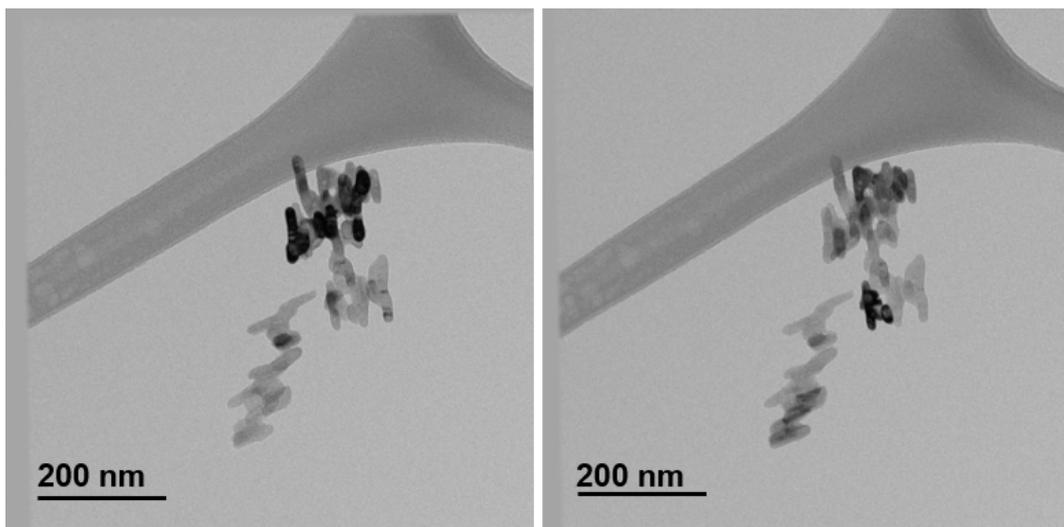


Figure 4.18 – Images MET de particules de T-AVO en voie sèche acquises avec un écart d'angle de rotation du porte-objet de 4° .

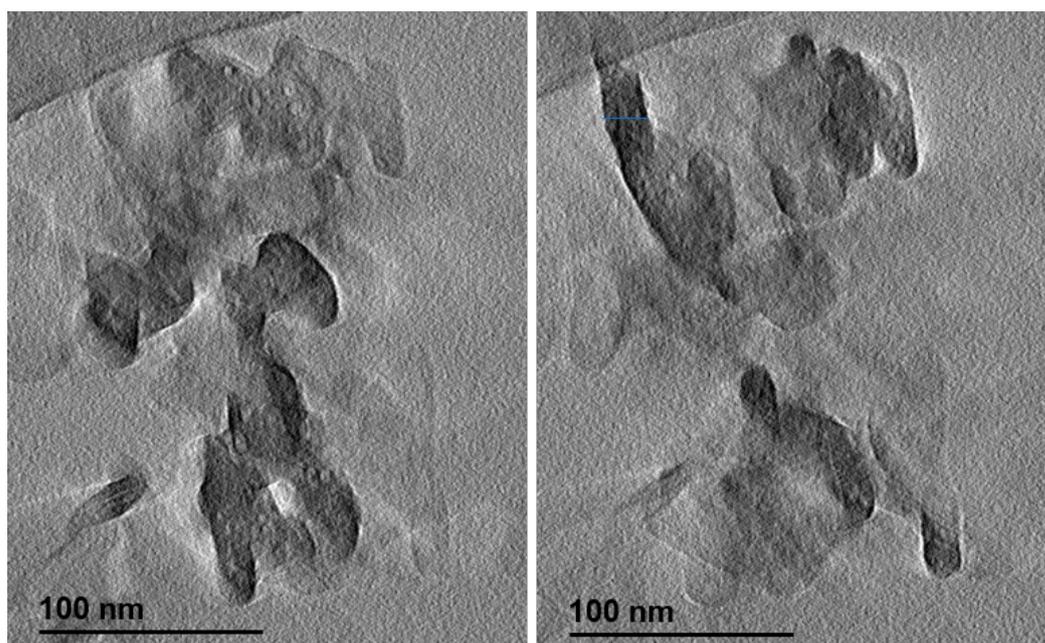


Figure 4.19 – Tomogrammes en mode MET obtenus après reconstruction par rétroprojection sous IMOD [339].

Les contrastes obtenus en **mode MET** proviennent ici principalement de leur **orientation cristalline**, ce qui est atténué en **mode STEM-HAADF**. Quelques contrastes de diffraction restent toutefois toujours présents malgré l'acquisition en mode STEM-HAADF et la résolution est plus faible comparée au mode MET, les pores ne sont donc pas visibles après reconstruction (Figures 4.20 et 4.21)

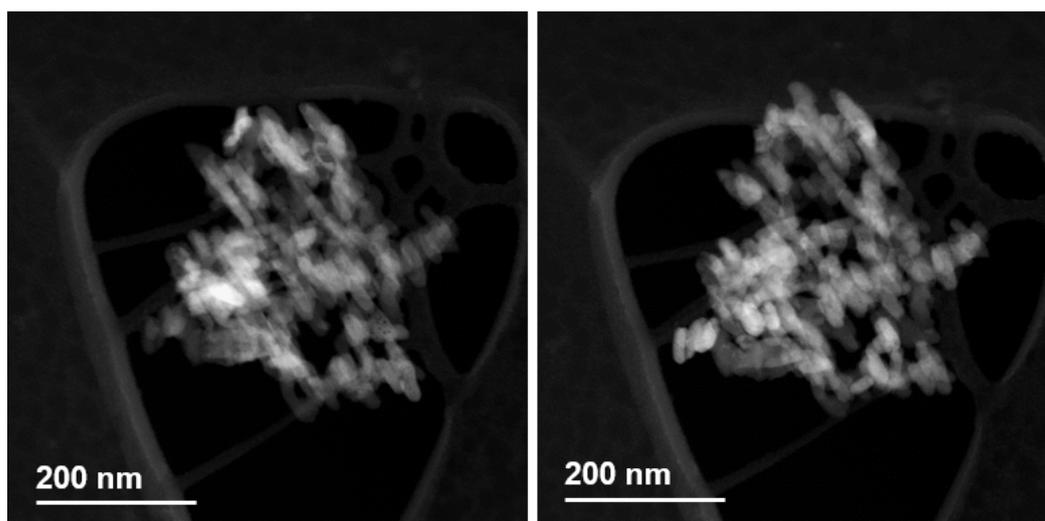


Figure 4.20 – Images STEM-HAADF de particules de T-AVO en voie sèche acquises avec un écart d'angle de rotation du porte-objet de 4°.

4.2. Caractérisation

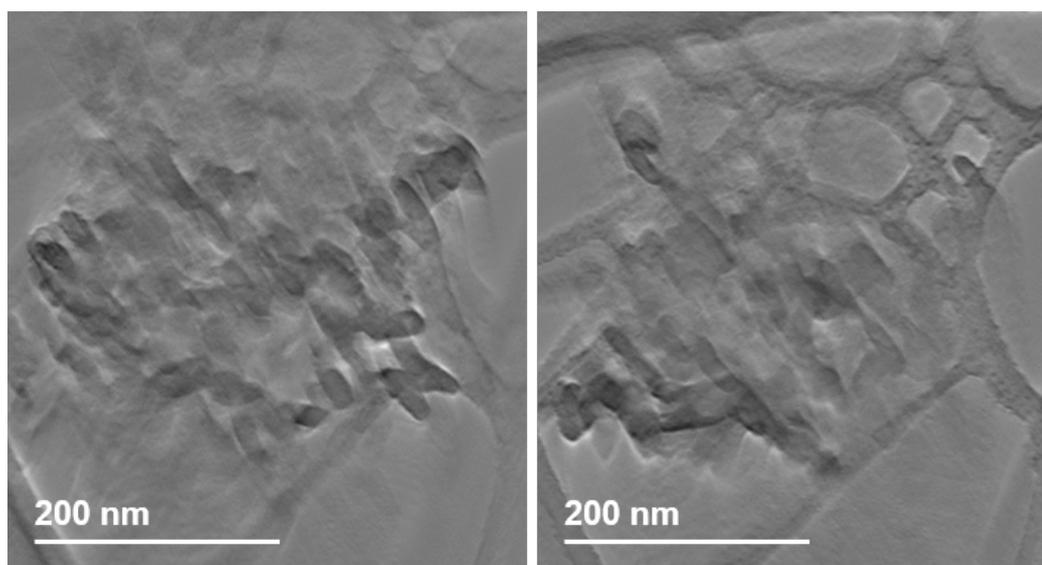


Figure 4.21 – Tomogrammes en mode STEM-HAADF obtenus après reconstruction par rétroprojection sous IMOD [339].

4.2.2.2 Cryogénie

Les gros agglomérats observés pouvant être causés par la phase de séchage, les particules de T-AVO ont ensuite été observées par cryo-MET afin de voir si la statistique, concernant le nombre de particules mesurées, pouvait être améliorée. La préparation pour une observation par cryo-MET a nécessité quelques ajustements par rapport aux paramètres de cryo-fixation initiaux utilisés pour les LNP, développés à la base pour l'observation de nanoparticules d'argent [340]. Ainsi, la durée d'absorption a été réduite de 3s à 2s du fait de la taille des agglomérats observés en voie sèche, afin d'augmenter l'épaisseur de glace sur la grille :

- une température d'enceinte de 20°C ;
- une humidité de 100% ;
- une durée d'absorption de 2s ;
- une force d'absorption de -5 (UA) ;
- une seule absorption ;
- un temps d'attente avant absorption de 0s ;
- un temps d'attente entre l'absorption et la trempe de 0s.

Les particules apparaissent également **poreuses** et **agglomérées** avec des tailles d'amas compris entre **100 nm et 900 nm**, et très peu de particules isolées sont observables (Figure 4.22). Du fait de la **faible résolution** des images et de la **statistique trop petite** des particules et agglomérats présents sur la grille, une distribution de taille n'a pu être mise en place. En effet, il est possible, lors de l'étape d'absorption par les papiers filtres, que les particules soient restées sur ces derniers. En ce qui concerne l'enrobage de SiO₂, celui-ci n'est pas visible dû à un manque de résolution lié au mode cryogénique. Ainsi, cette technique de préparation est limitée pour l'analyse de particules de T-AVO.

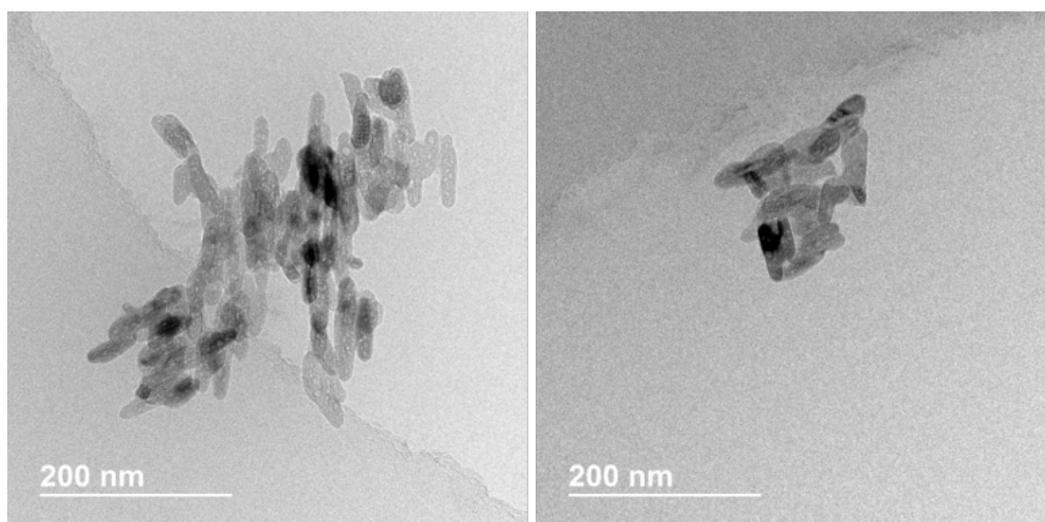


Figure 4.22 – Images cryo-MET de nanoparticules de T-AVO.

4.2.2.3 *In-situ* liquide

Afin de s'affranchir de tout artefact lié à la préparation d'échantillons, les particules de T-AVO ont ensuite été observées via le porte-objet liquide *in-situ* Poséidon. Les particules de TiO_2 apparaissent également **poreuses** et **agglomérées**, avec une tendance à s'agglomérer davantage sous le faisceau d'électrons (Figure 4.23). Les tailles d'agglomérats sont très larges, de quelques **dizaines de nanomètres au micromètre**. Il est difficile d'observer l'enrobage de SiO_2 , dont le contraste se confond avec celui du solvant. Le **manque de résolution** ainsi que le mouvement brownien des particules à fort grandissement n'ont pas permis d'établir une distribution de taille.

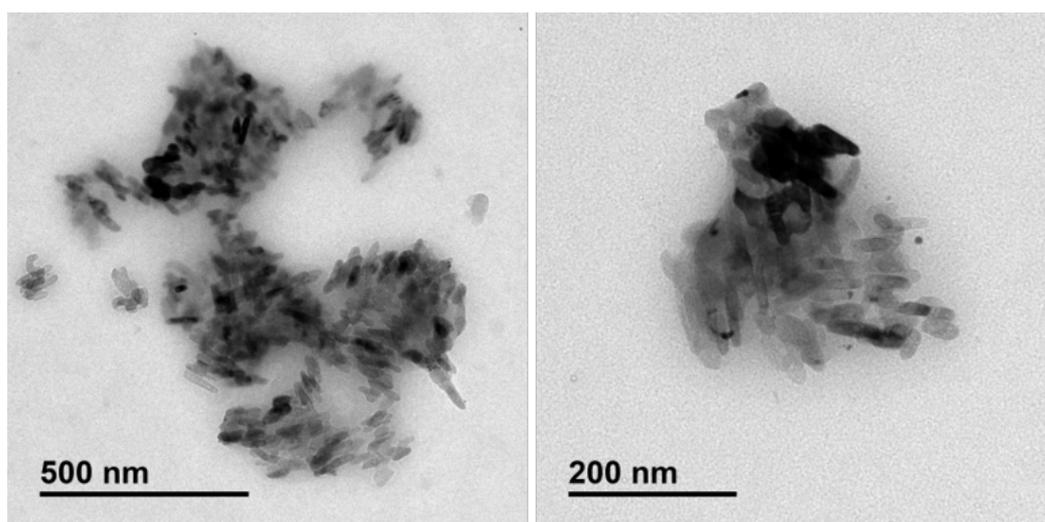


Figure 4.23 – Images MET de nanoparticules de T-AVO observées à l'aide du porte-objet *in-situ* liquide.

4.2. Caractérisation

4.2.2.4 Bilan intermédiaire MET

L'observation des nanoparticules de T-AVO en voie sèche, cryo-MET et en *in-situ* liquide a révélé la présence de particules **poreuses** et **oblongues**, regroupées en **agglomérats** dont la taille s'étale de la dizaine de nanomètres au micromètre. Toutefois, la voie sèche a permis d'obtenir une caractérisation physico-chimique bien plus complète que les deux autres techniques. En effet, il est plus aisé de distinguer les particules lorsqu'elles sont agglomérées en voie sèche du fait d'une résolution bien meilleure qu'en cryo-MET ou en *in-situ* liquide. La **largeur** et la **longueur** moyenne des particules sont respectivement de 17 ± 2 nm et 57 ± 2 nm, ce qui est cohérent avec la littérature [335].

Des analyses chimiques ont également été mises en place en parallèle afin de déterminer la composition des particules ainsi que l'épaisseur de l'enrobage de SiO₂ présent en surface. Les éléments **titane**, **silicium** et **oxygène** apparaissent clairement sur les particules de T-AVO, et aucune contamination par un autre élément n'est observée. Pour ce qui est de l'**épaisseur de l'enrobage**, de l'ordre de **7 nm**, celle-ci a pu être déterminée en réalisant des profils chimiques transverses aux particules.

Des acquisitions en mode tomographique ont été mis en place afin de pouvoir visualiser les particules, et notamment les pores et l'enrobage, en 3D. Les acquisitions tomographiques en mode MET n'ont pas permis de résoudre correctement les pores des particules et les contrastes de diffraction étaient trop importants pour pouvoir obtenir une reconstruction correcte. C'est pourquoi les acquisitions tomographiques ont ensuite été réalisées en mode STEM-HAADF afin de limiter ces contrastes de diffraction. Malheureusement, la résolution était dégradée par rapport au mode MET, ce qui n'a pas permis d'obtenir des volumes 3D satisfaisants.

Ainsi, la préparation par voie sèche semble la plus adaptée parmi ces trois techniques pour observer des nanoparticules de T-AVO.

4.2.3 Discussion

4.2.3.1 Comparaison des techniques de caractérisation

L'objectif de ce chapitre est de déterminer la technique de caractérisation la plus adaptée parmi la DLS, l'AF4-MALS et le MET pour l'observation et l'identification de nanoparticules d'Eusolex[®] T-AVO en suspension.

4.2.3.1.1 Dimensionnalité et état de dispersion

Les paramètres ici mesurés pour l'étude de nanoparticules de TiO₂ sont légèrement différents de ceux obtenus pour l'étude des LNP par MALS et MET (Chapitre 3.2.3.1.1) :

- DLS : diamètre hydrodynamique ;
- MALS : diamètre géométrique (pas de modèle morphologique) ;
- MET : largeur et longueur des particules.

Chapitre 4. Caractérisation d'oxydes métalliques nanométriques utilisés dans les crèmes solaires

De même que pour les LNP, l'appellation de « nanoparticules » est validée au vu des tailles de particules primaires obtenues (Tableau 4.5). Toutefois, la définition du terme « nano » en cosmétique n'est pas identique à celle préconisée par la Commission Européenne et n'impose pas de pourcentage minimal en nombre de particule inférieure à 100 nm [341].

Tableau 4.5 – Comparaison des tailles moyennes, écarts-types, modes, médianes et tailles minimale et maximale (en nm) des particules/agglomérats de T-AVO obtenus par DLS, AF4-MALS et MET (VS : voie sèche).

Technique	\bar{X}	s	x_m	d_{50}	$D_{min} - D_{max}$
DLS (batch) agglomérat	184	88	164	149	40 - 1000
AF4-MALS agglomérats	156	67	255	260	40 - 900
MET cryo agglomérats	N/A ²	N/A ²	N/A ²	N/A ²	100 - 900
MET liquide agglomérats	N/A ²	N/A ²	N/A ²	N/A ²	50 - 1000
MET VS largeur	17	3	16	15	9 - 30
MET VS longueur	57	16	51	55	19 - 130

Les tailles mesurées par DLS et AF4-MALS ont montré des tailles trop élevées pour que les particules en suspension soient dispersées, avec des tailles encore plus importantes par AF4-MALS ce qui pourrait provenir d'une agglomération dans le canal de fractionnement. Ceci est confirmé par les observations par cryo-MET et *in-situ* liquide qui confirme la présence de ces agglomérats de plusieurs centaines de nanomètres. En effet, il n'est pas possible de déterminer si les particules sont dispersées ou agglomérées en suspension en se basant uniquement sur la voie sèche, celle-ci ayant tendance à agglomérer les particules suite à l'évaporation du solvant.

Seule la voie sèche a permis d'obtenir une résolution suffisante pour mesurer manuellement et distinctement la largeur et la longueur des particules. Elles suivent toutes les deux une loi log-normale et leur valeur moyenne respective sont de 17 ± 2 nm et 57 ± 2 nm. Ainsi, la DLS et l'AF4-MALS ne sont pas adaptées pour réaliser une étude fine des nanoparticules, de même que le cryo-MET et l'*in-situ* liquide, ces deux derniers ayant une résolution moindre comparée à l'observation en voie sèche.

4.2.3.1.2 Structure physico-chimique

Quelle que soit la préparation d'échantillons utilisée, le MET a révélé la présence de particules oblongues comportant des pores d'environ 5 nm de diamètre, également visibles sur le cliché du fabricant [338].

4.2. Caractérisation

Afin de vérifier la composition chimique des particules, des spectres EDS ont été acquis en voie sèche sur un agglomérat. Il apparaît que les éléments titane, silicium et oxygène sont bien présents et aucune contamination n'est observée. En réalisant des profils chimiques sur des particules, l'épaisseur de l'enrobage de SiO₂ a pu être déterminée. Cette dernière est ainsi de l'ordre de 7 nm.

4.2.3.1.3 Récapitulatif

Pour ce qui est de la caractérisation physico-chimique des nanoparticules de T-AVO, il semble que la meilleure technique parmi les trois étudiées soit la **Microscopie Électronique en Transmission** avec une **préparation en voie sèche** car elle permet de rendre compte des différents paramètres de taille avec la possibilité de mesurer les tailles des particules primaires et des agglomérats.

La caractérisation par MET en voie sèche est d'autant plus complète qu'il a été possible de mettre en place des **analyses chimiques** afin de déterminer la composition des particules et la taille de l'enrobage de SiO₂.

4.2.3.2 Confrontation avec la bibliographie

La législation européenne impose désormais le signalement sur l'emballage d'un cosmétique de tout nanomatériau entrant dans sa composition [341]. Ainsi, une caractérisation physico-chimique de ce dernier est donc nécessaire. Il a été démontré précédemment l'intérêt de comparer plusieurs techniques d'analyse car certaines peuvent ne pas être représentatives de la sous-dimensionnalité du matériau. Par exemple, si seule la DLS avait été utilisée précédemment, la poudre de T-AVO aurait alors pu ne pas être considérée comme étant composée de particules nanométriques, les amas mesurés étant supérieurs à 100 nm.

Il existe à ce jour seulement une publication évoquant la caractérisation physico-chimique de particules de titane utilisées en tant que filtres UV par DLS, MALS et MET [342]. Une quatrième technique, la SP-ICPMS a également été utilisée pour caractériser ces particules (Chapitre 1.2.2.4). Elles sont issues d'une crème solaire commerciale et ont nécessité une certaine préparation avant de pouvoir être analysées, étant sous la forme d'une crème et non d'une suspension aqueuse. Les résultats concernant la taille des particules obtenues par ces différentes techniques sont récapitulés dans le tableau ci-dessous (Tableau 4.6). Ils semblent cohérents pour l'AF4-MALS, le MET et la SP-ICPMS, la DLS surestimant la taille des particules. Ceci peut être lié au fait que les grosses particules masquent les plus petites en DLS.

Tableau 4.6 – Comparaison des tailles moyennes ou minimale et maximale (en nm) des particules de titane issues d'une crème solaire commerciale, caractérisées par DLS, AF4-MALS, MET et SP-ICPMS [342].

Échantillon	DLS	AF4-MALS	MET	SP-ICPMS
TiO ₂	101 ± 5	79 ± 7 60 - 180	60 - 180	80 ± 10

Chapitre 4. Caractérisation d'oxydes métalliques nanométriques utilisés dans les crèmes solaires

Le champ de recherche dans la littérature, en ce qui concerne la comparaison des techniques de caractérisation utilisées tout au long de ce manuscrit, a ensuite été étendue à d'autres types de particules inorganiques. Parmi elle, une étude analyse différentes encres de tatouage, dont les résultats obtenus pour des encres noire et violette sont récapitulées ci-dessous (Tableau 4.7) [343]. Elles sont respectivement composées de TiO₂ et de noir de carbone. Il a été démontré que certaines d'entre elles possèdent des nanoparticules et doivent donc faire l'objet d'une étude plus approfondie afin de déterminer si ces nanoparticules peuvent interagir avec les cellules de la peau ou même pénétrer celle-ci jusque dans le système sanguin. Il semble que, comme pour les particules de T-AVO, le MET en voie sèche soit ici la plus à même de résoudre la taille des particules primaires (Figure 4.24).

Tableau 4.7 – Comparaison de tailles moyennes et minimales et maximales (nm) d'encres de tatouage, mesurées par DLS en mode batch, AF4-MALS et MET (voie sèche) [343].

Encre	DLS	AF4-MALS	MET
Violette	31 (19 - 52) 137 (60 - 281)	56 (11 - 100) 271 (100 - 490)	39 ± 10 (31 - 48)
Noire	152 (49 - 450)	137 (21 - 330)	19 ± 11 (12 - 29)

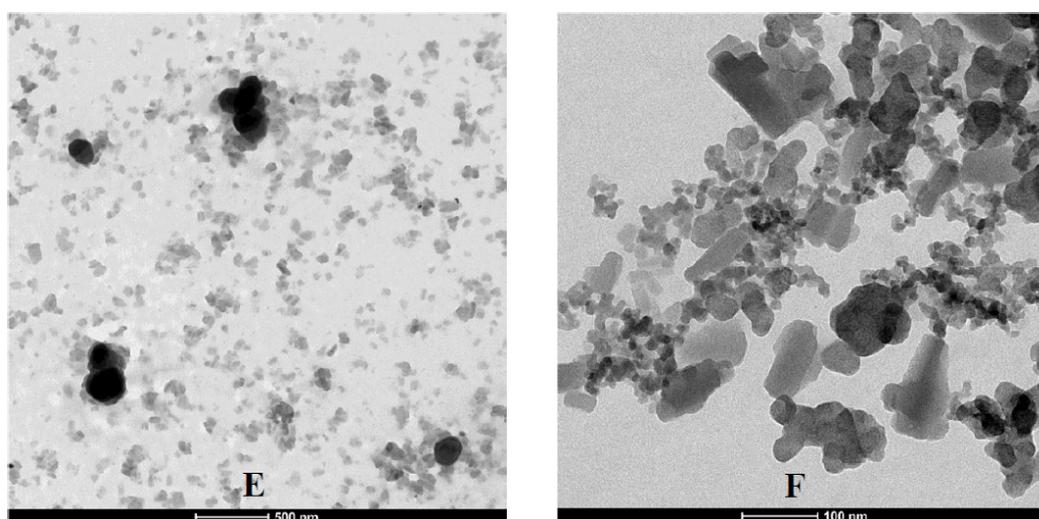


Figure 4.24 – Images MET d'encre de tatouage préparées en voie sèche. E. Encre violette. F. Encre noire [343].

4.3. Application : vieillissement sous UV de nanoparticules de TiO₂

4.3 Application : vieillissement sous UV de nanoparticules de TiO₂

Des vieillissements sous UV ont été mis en place afin de déterminer si l'enrobage de particules, destinées à être incorporées dans des crèmes solaires en tant que filtres UV, était stable. Pour cela, trois types de poudre de TiO₂ (Merck), qui diffèrent par leur enrobage, ont été étudiées (Tableau 4.8) :

- l'Eusolex[®] T-AVO, étudiée précédemment ;
- l'Eusolex[®] T-S ;
- l'Eusolex[®] T-2000.

De même que précédemment, les poudres ont été remises en suspension dans du FL-70 à hauteur de 50 ppm.

Tableau 4.8 – Informations concernant les particules étudiées.

Poudre	Pourcentage de TiO ₂ (%)	Forme cristalline	Enrobage
T-AVO	80	Rutile	SiO ₂
T-S	75	Rutile	Al ₂ O ₃ , CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH (acide stéarique)
T-2000	80	Rutile	Al ₂ O ₃ , C ₆ H ₁₈ O ₄ Si ₃ (siméticone)

4.3.1 Paramètres de l'enceinte climatique

L'enceinte climatique utilisée pour cette étude est le modèle Q-SUN XE-3 (Q-LAB). Elle permet par exemple de reproduire l'ensoleillement lorsque le soleil est au zénith, c'est-à-dire à son intensité maximum, pour une durée déterminée. C'est ce type d'ensoleillement qui a ici voulu être reproduit, à partir des paramètres suivants :

- Puissance surfacique de rayonnement : 1,44 W/m² ;
- Température de l'enceinte : 40°C ;
- Humidité relative : 50% ;
- Durée d'ensoleillement : 8 h (une journée d'exposition) ;
- Fenêtre : Window - Q (coupure des longueurs d'onde en dessous de 310 nm).

Une confusion a été faite entre Window - Q (fenêtre) et Daylight - Q (filtre), ce dernier simulant un ensoleillement direct avec une longueur d'onde de coupure à 295 nm [344]. Ainsi, le vieillissement mis en place représente un ensoleillement au travers d'une vitre. Cette méprise ayant été découverte assez tardivement, les expériences n'ont pu être recommencées. Toutefois, le rayonnement perçu au travers de ce type de fenêtre est proche de celui d'un ensoleillement direct (Figure 4.25). Et bien que la longueur d'onde de coupure soit de 310 nm, les UVA (320 - 400 nm) et certains UVB (310 -320 nm) peuvent tout de même irradier les échantillons.

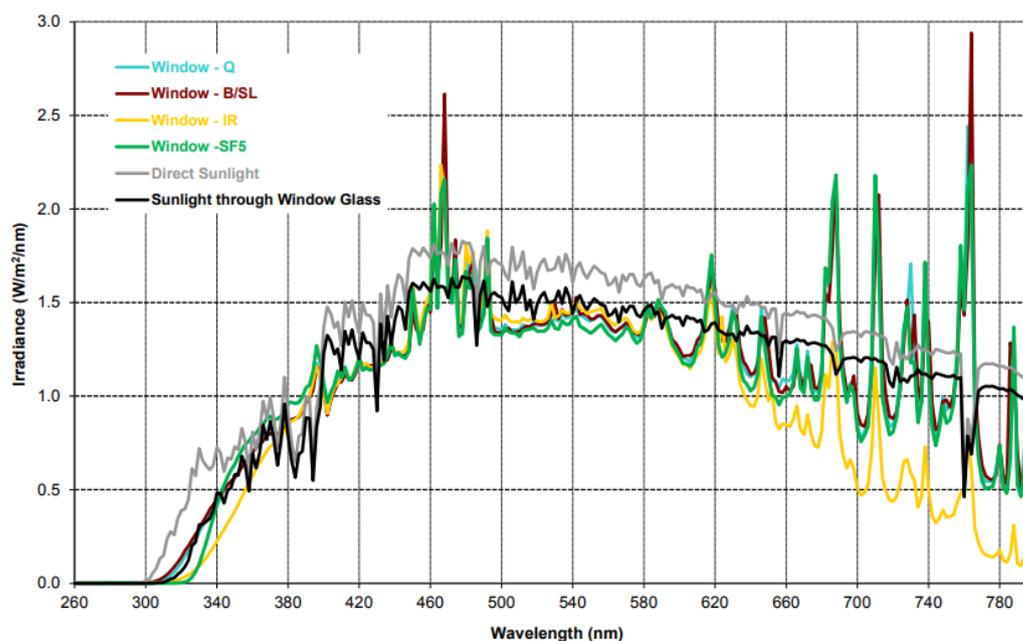


Figure 4.25 – Comparaison de la puissance du rayonnement solaire direct ou au travers d'une vitre avec la puissance de rayonnement perçue par un échantillon au travers de différentes fenêtres dans l'enceinte climatique Q-SUN, pour des longueurs d'onde comprises entre 300 nm et 800 nm.

Afin de caractériser le vieillissement des particules de T-AVO, T-S et T-2000 entre 0 h, 8 h et 16 h d'UV, leur suivi a été réalisé par MET en voie sèche, en conservant la même grille pour chaque condition de vieillissement. Des analyses EDS et EELS ont notamment été effectuées. L'EDS a été retenue pour suivre l'évolution de l'épaisseur de l'enrobage après vieillissement sous UV et l'EELS pour étudier la modification des liaisons chimiques au travers de la raie de l'oxygène.

4.3. Application : vieillissement sous UV de nanoparticules de TiO₂

4.3.2 Analyse du vieillissement du T-AVO

La zone analysée à 0 h d'UV par EDS ayant été repérée lors de son analyse, les mêmes particules ont pu être étudiées pour 8 h et 16 h d'irradiation. Les observations MET montrent que la morphologie n'a pas changé entre ces instants (Figure 4.26.a, c et e).

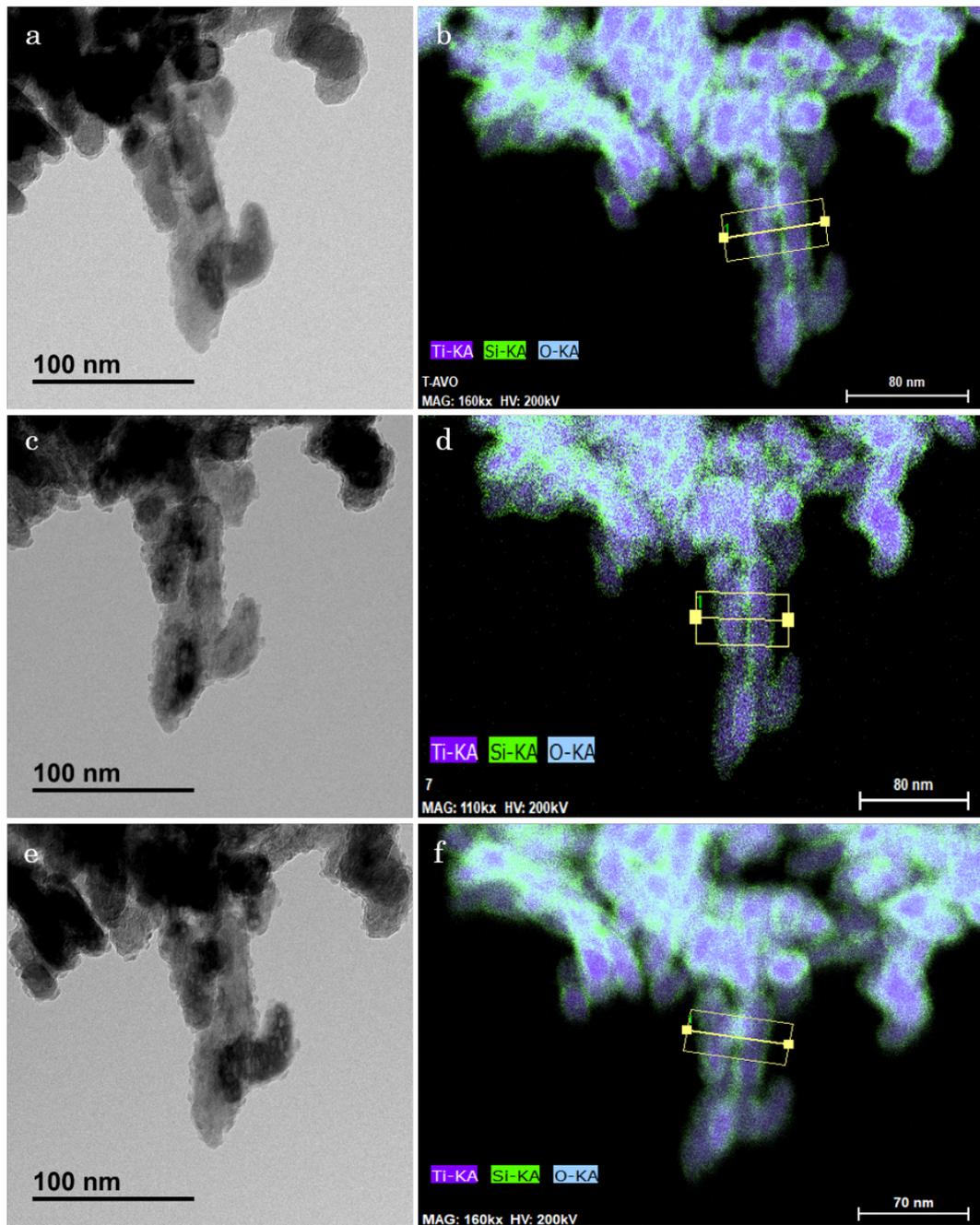


Figure 4.26 – Images MET et cartographies chimiques correspondantes de T-AVO à 0 h (a et b), 8 h (c et d) et 16 h (e et f) de vieillissement sous UV.

Chapitre 4. Caractérisation d'oxydes métalliques nanométriques utilisés dans les crèmes solaires

Pour ce qui est de l'analyse du profil chimique établi à partir des cartographies, aucune différence n'est observée quand à l'enrobage de SiO_2 dont l'épaisseur demeure constante (Figures 4.26 et 4.27). Il en est de même pour les profils du titane qui ne montrent pas de différence significatives entre 0 h, 8 h et 16 h d'UV. Ainsi, les particules de T-AVO semblent stables sous un rayonnement UV.

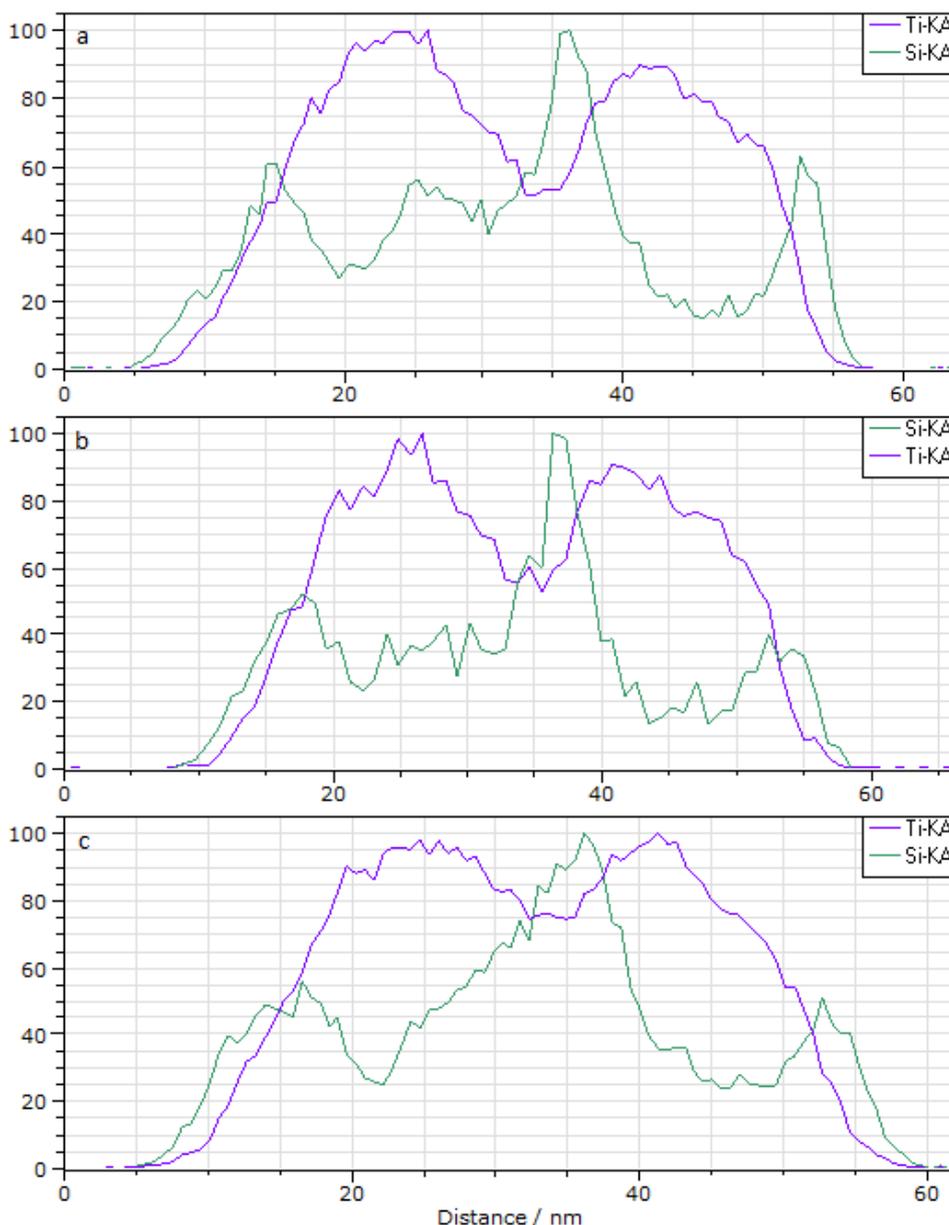


Figure 4.27 – Profils chimiques EDS du titane (violet) et du silicium (vert) du T-AVO à 0 h (a), 8 h (b) et 16 h (c) de vieillissement sous UV.

Afin de vérifier cette stabilité, des analyses EELS ont été menées en parallèle (Figure 4.28). Bien que les acquisitions n'aient pu être réalisées sur des zones identiques, celles-ci ne montrent pas de variation significative de l'analyse de la raie K de l'oxygène. Ceci tendrait à confirmer la stabilité des particules démontrée par EDS.

4.3. Application : vieillissement sous UV de nanoparticules de TiO_2

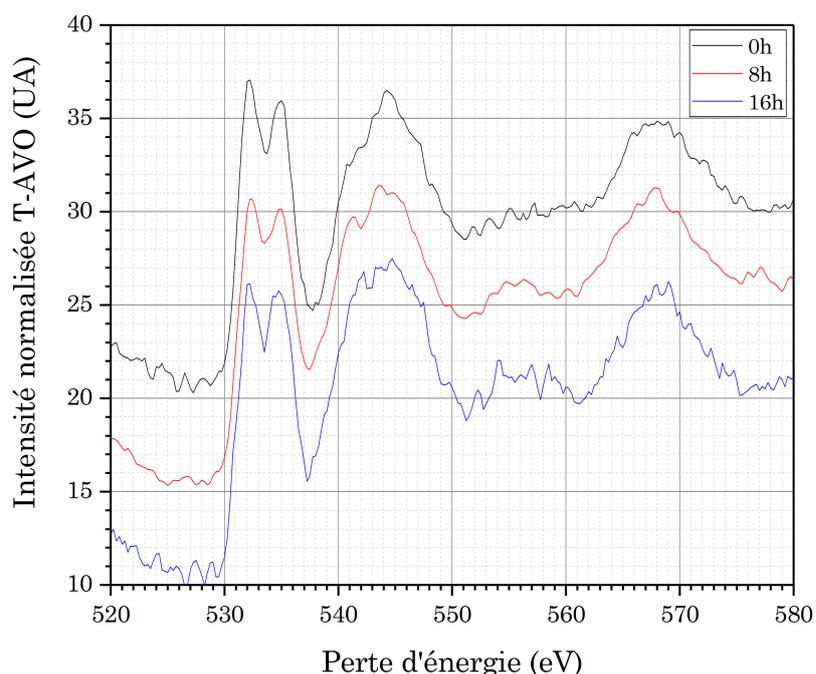


Figure 4.28 – Spectres EELS du T-AVO entre 0 h, 8 h et 16 h d'UV (O-K : 532 eV).

4.3.3 Analyse du vieillissement du T-S

Selon les données du fabricant, les particules de T-S sont composées d'un enrobage d'alumine et d'acide stéarique. Or le spectre EDS de ces particules montrent également la présence de silicium qui pourrait donc provenir d'une contamination lors de la synthèse des particules (Figure 4.29). Les sels minéraux détectés (P, S, Cl, Ca, ...) peuvent quant à eux être issus de l'eau utilisée pour diluer le FL-70.

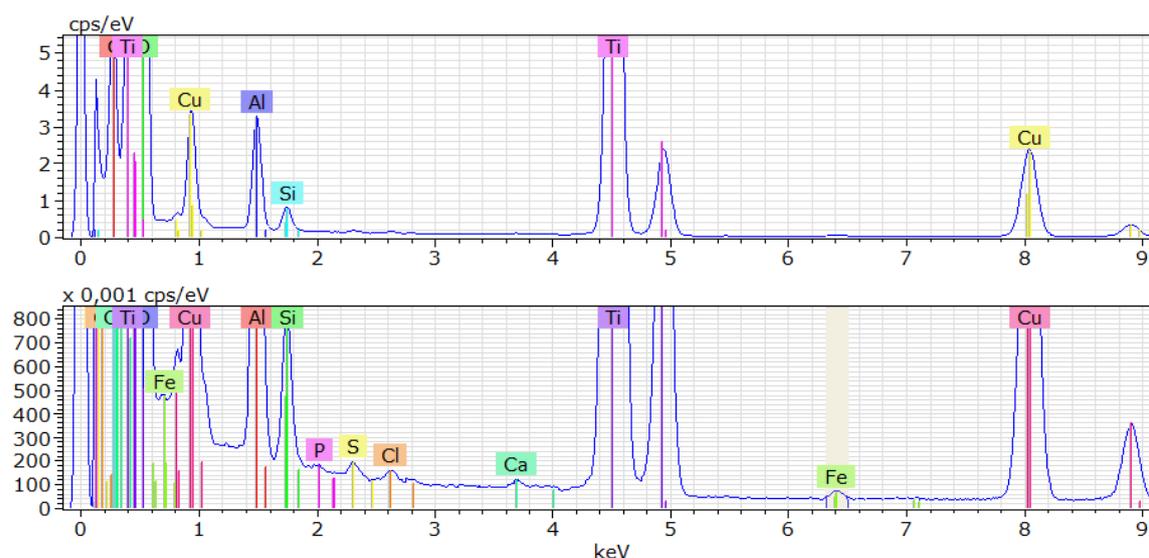


Figure 4.29 – Spectres EDS (échelles différentes) des particules de T-S à 0 h d'UV.

Chapitre 4. Caractérisation d'oxydes métalliques nanométriques utilisés dans les crèmes solaires

Contrairement aux nanoparticules de T-AVO, les particules de T-S ne sont pas poreuses ; elles apparaissent toutefois tout aussi agglomérées. La surface des particules ne semble pas avoir été modifiée par le rayonnement UV (Figures 4.30).

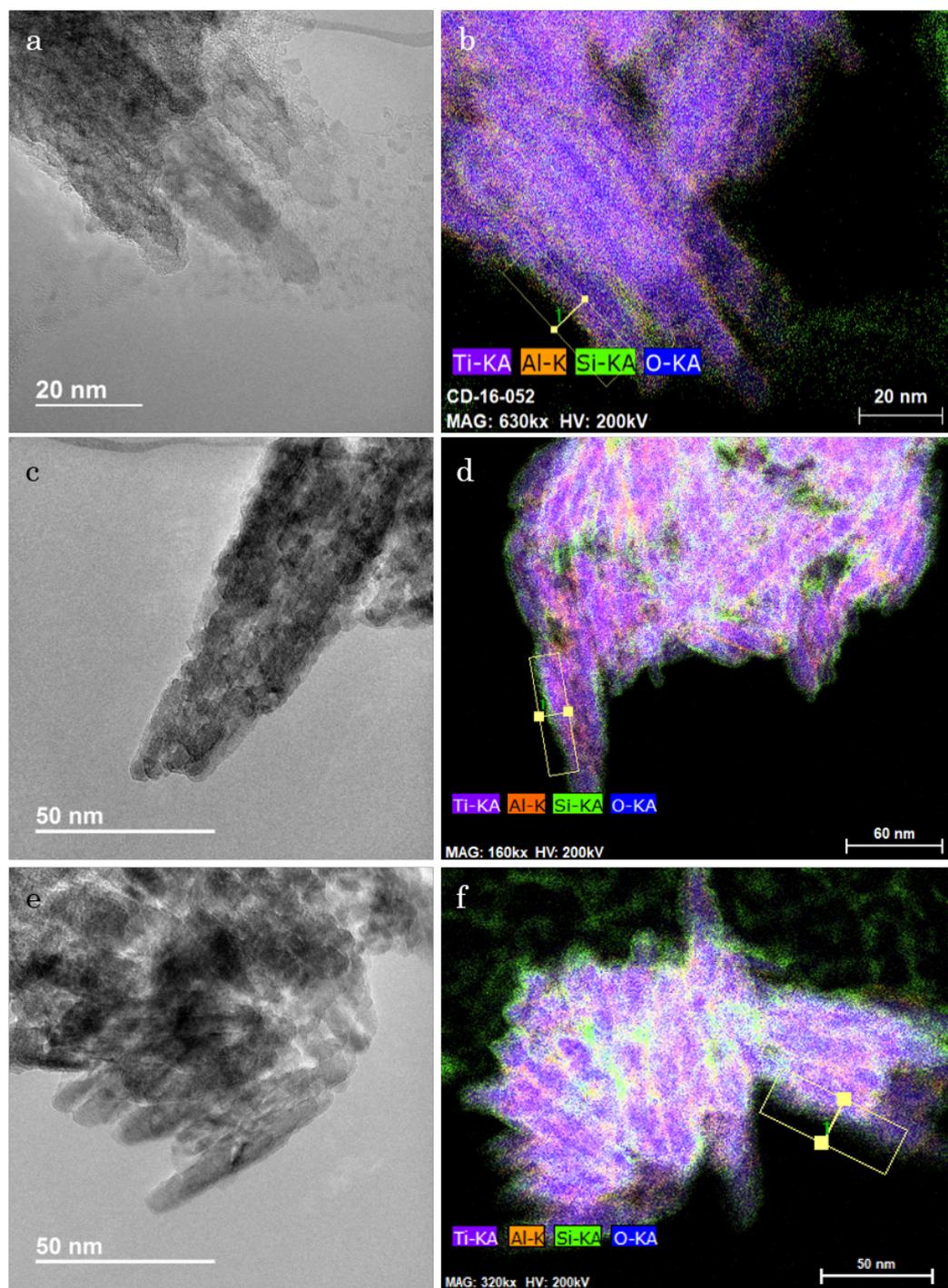


Figure 4.30 – Images MET et cartographie chimique correspondante de T-S à 0 h (a et b), 8 h (c et d) et 16 h (e et f) de vieillissement sous UV.

4.3. Application : vieillissement sous UV de nanoparticules de TiO₂

Pour ce qui est de l'enrobage d'alumine, celui-ci a une épaisseur très fine, de l'ordre du nanomètre (Figure 4.31.a). Il est donc difficile de savoir s'il subit ou non des modifications après vieillissement sous UV (Figures 4.30 et 4.31).

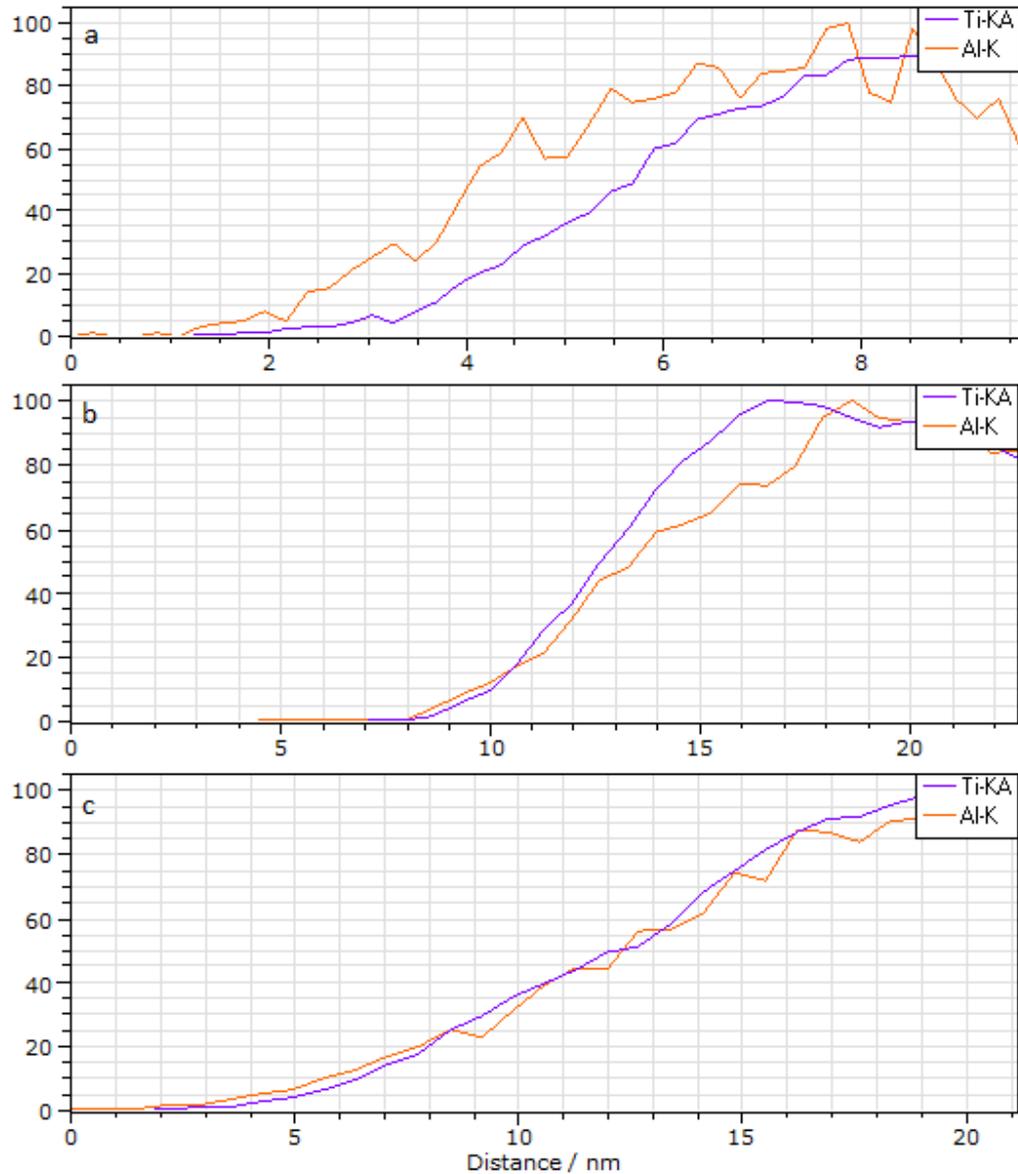


Figure 4.31 – Profils chimiques EDS du titane (violet) et de l'aluminium (orange) du T-S à 0 h (a), 8 h (b) et 16 h (c) de vieillissement sous UV.

Chapitre 4. Caractérisation d'oxydes métalliques nanométriques utilisés dans les crèmes solaires

Les analyses EELS ne montrent pas de différences significatives entre 0 h, 8 h et 16 h d'UV (Figure 4.32). Il semble donc que ces particules soient stables sous UV.

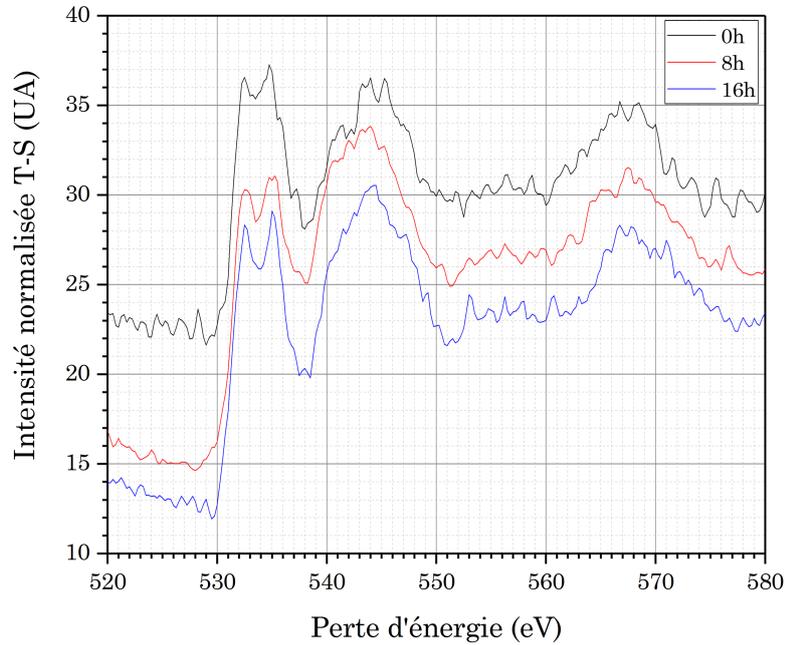


Figure 4.32 – Spectres EELS du T-S entre 0 h, 8 h et 16 h d'UV (O-K : 532 eV).

4.3.4 Analyse du vieillissement du T-2000

Pour ce qui est du T-2000, les particules sont composées d'un enrobage d'alumine et de siméticone, ce qui est confirmé par le spectre EDS (Figure 4.33). De même que précédemment pour le T-S, des sels minéraux sont détectés.

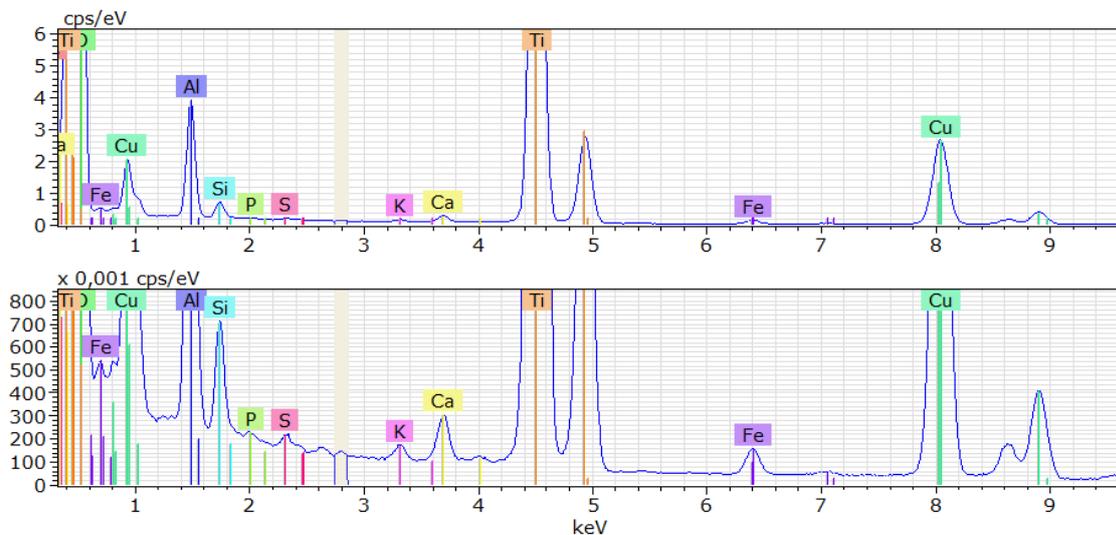


Figure 4.33 – Spectres EDS (échelles différentes) des particules de T-2000 à 0 h d'UV.

4.3. Application : vieillissement sous UV de nanoparticules de TiO₂

Les particules de T-2000 ne montrent pas de porosité et sont agglomérées tout autant que le sont les particules de T-AVO et T-S (Figure 4.34).

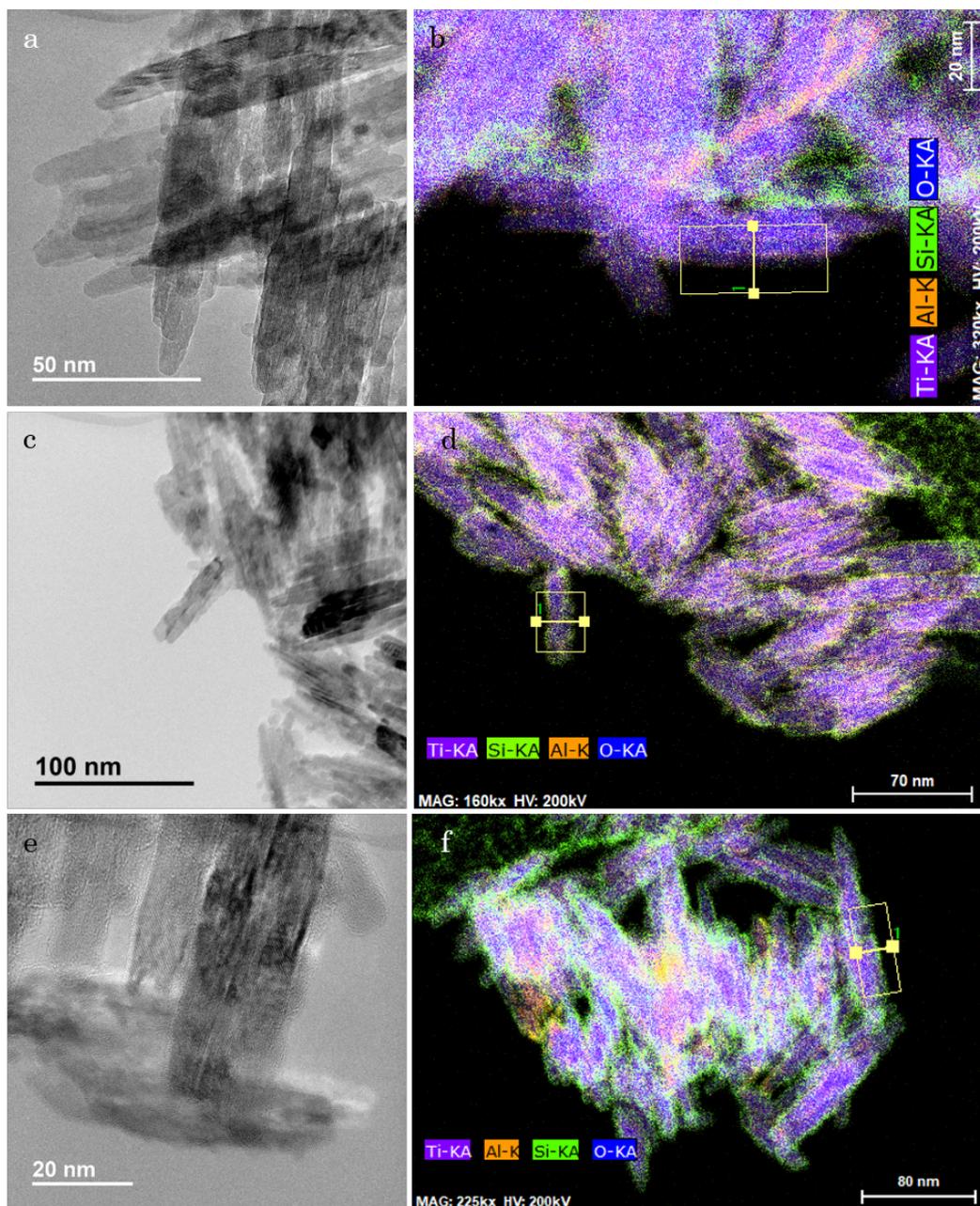


Figure 4.34 – Images MET et cartographie chimique correspondante de T-2000 à 0 h (a et b), 8 h (c et d) et 16 h (e et f) de vieillissement sous UV.

L'analyse de l'enrobage par EDS, et notamment en ce qui concerne le silicium, a montré que ce dernier est très irrégulier que ce soit avant ou après UV, étant compris entre 0 nm et 5 nm (Figures 4.34 et 4.35). Pour ce qui est de l'alumine, sa coquille est légèrement plus marquée que dans le cas du T-S et mesure 2 à 3 nm d'épaisseur.

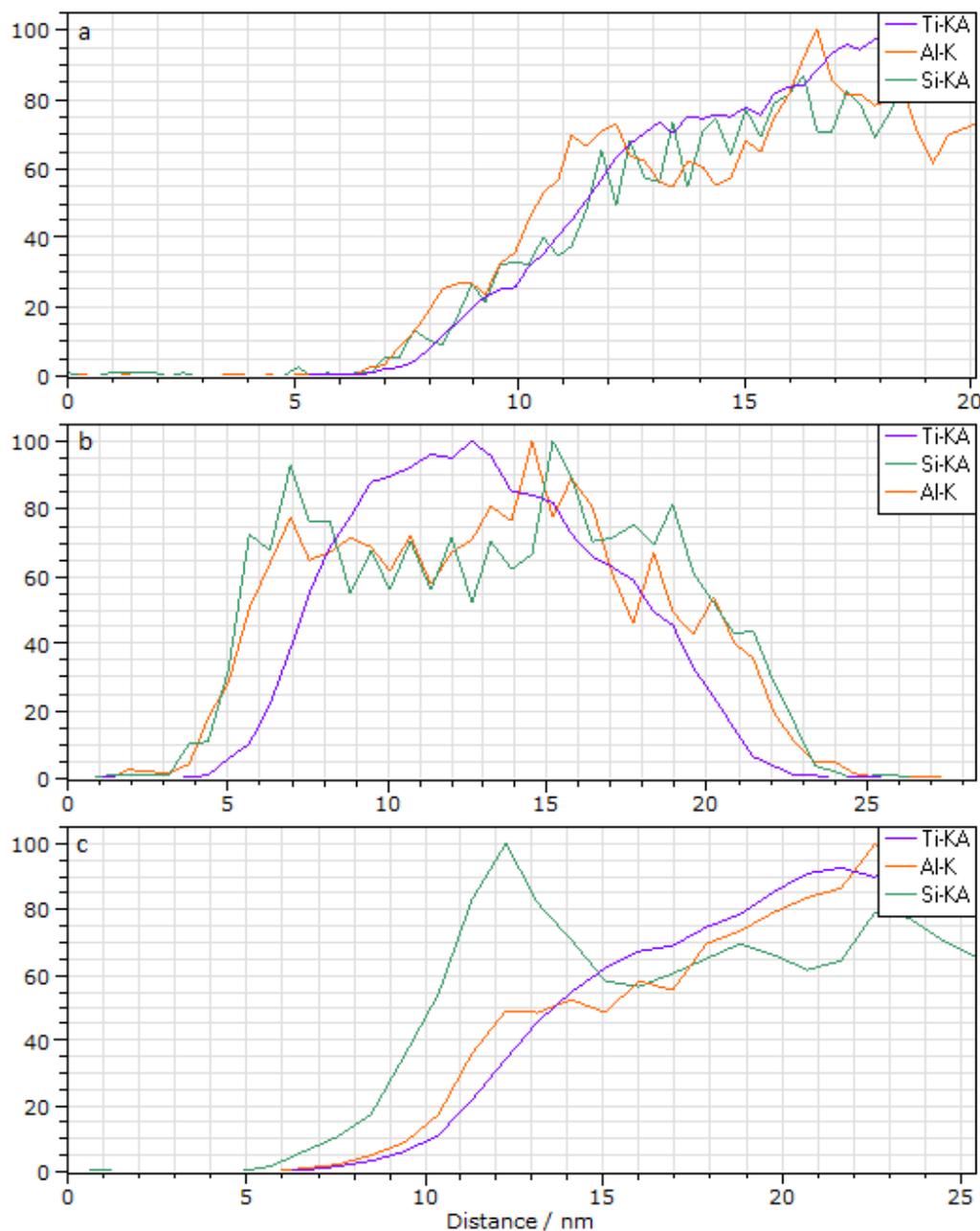


Figure 4.35 – Profils chimiques EDS du titane (violet), du silicium (vert) et de l'aluminium (orange) du T-2000 à 0 h (a), 8 h (b) et 16 h (c) de vieillissement sous UV.

4.3. Application : vieillissement sous UV de nanoparticules de TiO₂

De même que pour le T-AVO et le T-S, les spectres EELS acquis entre 0 h, 8 h et 16 h d'irradiation UV du T-2000 ne montrent pas de différence particulière (Figure 4.36). Ainsi, il semble que ces particules soient également stables.

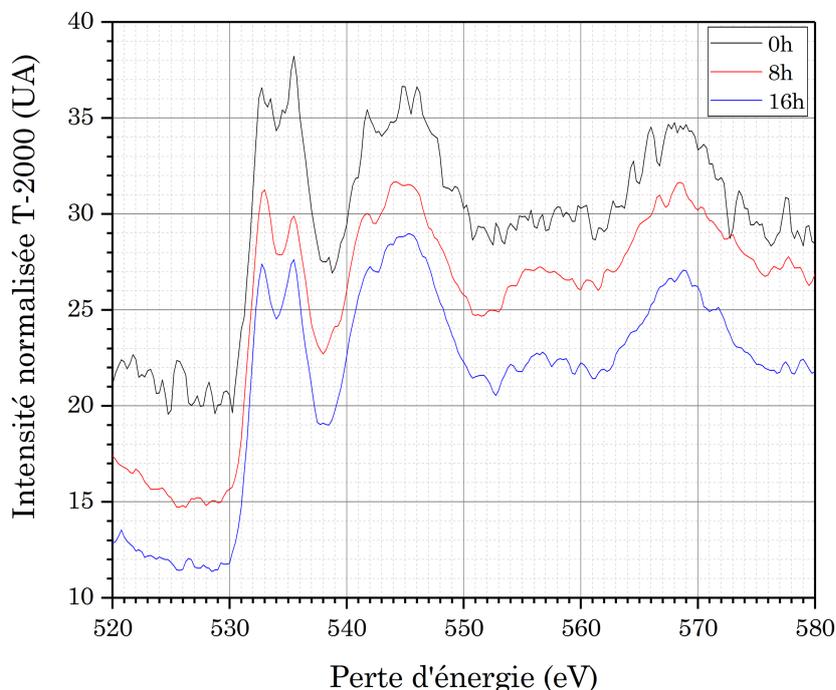


Figure 4.36 – Spectres EELS du T-2000 entre 0 h, 8 h et 16 h d'UV (O-K : 532 eV).

4.3.5 Bilan

L'analyse physico-chimique des particules de T-AVO, T-S et T-2000 par EDS et EELS après vieillissement sous UV en enceinte climatique a montré la stabilité de ces particules, ce qui conforte leur utilisation en tant que filtres UV dans des crèmes solaires. Des vieillissements sur de plus longues durées sont à envisager afin de déterminer le temps d'exposition maximal à partir duquel les particules pourraient ne plus être stables. Il serait également intéressant de pouvoir étudier la crème solaire utilisant ces nanoparticules afin de déterminer si la crème de base n'interagit pas avec les particules. D'autres techniques de caractérisation, comme la Spectrométrie Photoélectronique X (XPS, X-Ray Photoelectron Spectrometry), pourraient permettre de mettre en avant d'éventuelles modifications au niveau des liaisons Ti-O, Si-O et Al-O avant et après irradiations UV.

Conclusions et perspectives

L'objectif de cette thèse était de **caractériser et d'identifier des nanoparticules en milieux sensibles dans une optique de nanosécurité**, ceci dans le cadre de la réglementation mise en place par la Commission Européenne. La législation française impose quant à elle la déclaration de toute substance nanoparticulaire et de ses **caractéristiques physico-chimiques**. Pour répondre à cette problématique, trois outils de caractérisation ont été mis à disposition par l'EquipEx NanoID : un Microscope Électronique en Transmission (**MET**) et deux équipements utilisant respectivement la Diffusion dynamique (**DLS**) et la Diffusion Statique sous Multiples Angles (**MALS**) de la Lumière, ces deux techniques pouvant être couplées à un dispositif de fractionnement par couplage flux force (**AF4**). L'efficacité de chacune de ces techniques a été testée puis comparée les unes aux autres au travers de l'analyse de deux matériaux supports. Le premier est composé de nanoparticules lipidiques (**LNP**), appelées LipidotsTM, synthétisées par le CEA-LETI, et destinées à être injectées à des fins thérapeutiques ou de diagnostic. Le second est une poudre commerciale d'Eusolex[®] T-AVO, composée de **nanoparticules de dioxyde de titane** enrobées dans du dioxyde de silicium. Ces dernières trouvent des applications en tant que filtres UV dans les crèmes solaires.

Les critères retenus pour la caractérisation de ces deux nanomatériaux sont leur **taille**, leur **forme**, leur **état de dispersion** et leur **composition chimique** le cas échéant. Une **étude statistique** a également été mise en place afin de pouvoir comparer les distributions de tailles obtenue par chaque technique, les mesures de tailles n'étant pas tout à fait équivalentes.

Pour ce qui est de l'étude des **nanoparticules lipidiques**, il a été démontré que la DLS en mode batch, c'est-à-dire sans dispositif de fractionnement avant détection, ne permettait pas d'obtenir de résultats concluants. En effet, les particules sont **polydisperses** et les plus grosses masquent les plus petites, ce qui explique les différences obtenues lorsqu'elle est comparée avec l'AF4-DLS-MALS et le MET, qui quant à eux donnent des résultats cohérents. Le dispositif de **fractionnement** avant détection a montré son efficacité et est un élément **indispensable** pour la détection de toutes les tailles de LNP par diffusion de la lumière. Les LNP observées par MET en voie sèche après coloration négative montrent des **particules rondes**, plus ou moins **dispersées**, de tailles plus petites que celles mesurées par MALS. Il a été démontré que cela était dû à la phase d'évaporation du solvant qui a tendance à enchevêtrer les chaînes de PEG présentes à leur surface, ce qui n'est pas le cas en AF4-DLS-MALS où les LNP sont toujours en suspension dans l'eau. Afin de contourner cet artefact lié au séchage, les LNP ont été préparées via un automate de cryo-fixation pour une observation par **cryo-MET**. Cependant, malgré les différentes optimisations réalisées sur celui-ci, les LNP apparaissent toujours déformées sous l'effet d'aspiration créée par le papier filtre lors de la phase d'absorption de l'excès de liquide. Afin de pouvoir observer les LNP sans **artéfact** lié à leur préparation, le porte-objet *in-situ* liquide Poséidon a été utilisé. Un **greffage** de la surface des particules par des éléments métalliques a été mis en place afin d'améliorer leur contraste. Le meilleur résultat a été obtenu par des **nanoparticules d'or** en suspension dans du citrate, qui ont permis de mettre en évidence la structure **cœur/coquille** des LNP, qui apparaissent bien **dispersées**. Il est supposé que cette amélioration de contraste est notamment due à la présence d'ions auriques dans la solution de citrate. C'est pourquoi, des greffages par des ions auriques et argent à partir de sels métalliques ont ensuite été mis en place. Toutefois, ils n'ont pas permis

de conclure quant à la taille réelle des LNP, l'épaisseur de la coquille métallique formée sur leur surface étant trop importante.

Ainsi, pour l'étude de LNP et plus généralement de nanomatériaux organiques possédant une faible tenue mécanique, il est préférable de comparer l'AF4-DLS-MALS et le MET en voie sèche avec coloration négative pour obtenir la taille des particules. Ce dernier permet également de caractériser la forme des particules. Pour des informations plus précises quant à la structure et la dispersion, le porte-objet *in-situ* liquide est le plus adapté. Ces techniques ont fait leur preuve lors de l'analyse de LNP en situation d'application.

L'analyse des nanoparticules d'oxyde de titane a permis de mettre en avant des résultats tout autre quant à la comparaison de ces techniques de caractérisation. En effet, il s'avère que la DLS et l'AF4-MALS n'ont détecté que des **agglomérats** et non pas les particules primaires qui les composent. Cette agglomération a été confirmée par cryo-MET et par *in-situ* liquide. Du fait de la chimie des particules de T-AVO, il n'a pas non plus été nécessaire d'améliorer leur contraste afin de les visualiser en *in-situ* liquide. Les études par MET ont montré des particules primaires **poreuses** et **oblongues** dont la longueur et la largeur ont pu être relevées. Des **analyses chimiques** ont été mises en place afin de déterminer l'**épaisseur de l'enrobage** et d'étudier la **pureté** des particules analysées. Ces dernières n'ont pas montré de contamination par d'autres éléments chimiques. Les analyses en mode tomographique n'ont pas permis d'obtenir les informations recherchées quant à la porosité des particules et à la visualisation de l'enrobage. Enfin, la stabilité sous irradiations UV de ces particules a pu être démontrée après simulation du rayonnement solaire dans une enceinte climatique.

Dans le cas d'étude de particules inorganiques, et plus particulièrement de nanoparticules de dioxyde de titane, il a été démontré que le MET permettait une analyse complète de la physico-chimie du matériau. Afin de vérifier l'état d'agglomération de ce type de particules, le cryo-MET ou l'*in-situ* liquide sont les techniques les plus adaptées.

L'analyse de ces deux matériaux supports a mis en évidence leur caractère nanométrique, comme la législation française l'impose désormais. Leur distribution de tailles respective, obtenue par MET en voie sèche, a été interpolée par une loi log-normale particulièrement adaptée à l'étude de nanoparticules en suspension, ce qui a permis d'établir des données statistiques les concernant. Toutefois, il est important de mesurer un maximum de particules (>1000) afin d'établir une distribution de tailles la plus représentative possible de l'échantillon étudié, ce qui n'est pas toujours réalisable, d'où l'intérêt de coupler les techniques de caractérisation. Il a ainsi été démontré l'importance de comparer plusieurs outils de caractérisation, et même diverses techniques de préparation, afin d'attester de l'interprétation des données qui en est faite.

Il serait intéressant de poursuivre les développements effectués concernant la préparation d'échantillons. Tout d'abord, en ce qui concerne les LNP, l'utilisation d'une autre technique de cryo-fixation, comme la congélation haute pression suivie d'une cryo-substitution avec coloration, pourrait permettre de visualiser les LNP sans artéfact. Pour les observations en *in-situ*

Conclusions et perspectives

liquide, il faudrait persévérer dans le greffage des LNP afin d'obtenir une coquille métallique d'épaisseur contrôlée, d'autant plus qu'elle pourrait trouver des applications en nanomédecine (photo-thermie). Des interactions avec des cellules peuvent également être envisagées directement à l'intérieur du porte-objet *in-situ* liquide, notamment grâce à l'utilisation d'un porte-objet liquide chauffant (incubation à 37°C). En ce qui concerne l'étude des nanoparticules de dioxyde de titane, il faudrait améliorer les acquisitions en mode tomographique et utiliser le mode EFTEM afin de pouvoir réaliser des cartographies chimiques 3D des particules. Il est également envisageable de mettre en place les techniques de caractérisation utilisées pour ce travail de thèse sur d'autres types de matériaux organiques et inorganiques afin de les éprouver, et notamment sur des nanomatériaux 1D (nanofils par exemples). Enfin, l'utilisation d'autres outils de nanocaractérisation indirects ou utilisant la microscopie pourrait être envisagée comme le Microscope à Force Atomique (AFM) ou encore la Diffusion des Rayons X aux Petits Angles (SAXS).

Annexes

Interprétation de la distribution de taille obtenue par DLS

Cette annexe s'est largement inspirée d'une note technique concernant l'analyse des distributions de tailles par DLS [345].

La distribution de tailles (PSD) obtenue par diffusion dynamique de la lumière (DLS) peut être représentée de trois façons différentes :

- en **intensité** ;
- en **volume** ;
- en **nombre**.

Il est possible de passer d'une distribution en intensité à une distribution en volume ou en nombre en réalisant certaines approximations grâce à des relations de proportionnalité de taille à une certaine puissance. Dans le cas d'une distribution bimodale simplifiée représentant l'analyse d'une suspension de particules A et B composée de N_A particules A et N_B particules B ayant respectivement des tailles a et b , les pourcentages relatifs en intensité, volume et nombre des particules A peuvent ainsi s'écrire respectivement (Équations A.1 à A.3) :

$$\%I_A = \frac{100N_A a^6}{N_A a^6 + N_B b^6} \quad (\text{A.1})$$

$$\%V_A = \frac{100N_A a^3}{N_A a^3 + N_B b^3} \quad (\text{A.2})$$

$$\%N_A = \frac{100N_A}{N_A + N_B} \quad (\text{A.3})$$

Afin d'illustrer ces approximations, les distributions de tailles en nombre, volume et intensité d'une suspension de deux populations de nanoparticules ont été représentées ci-dessous (Figure A.1) [346]. La relation de puissance existant entre les différents types de distribution est clairement visible de part le ratio des amplitudes des deux pics obtenus.

Ainsi, dans le cas de suspensions plus représentatives de la réalité, le logiciel d'analyse de la DLS se base sur ces approximations et la théorie de Mie pour générer les distributions en nombre et en volume. La tentation est grande de comparer la distribution en nombre aux résultats obtenus par MET et la distribution en volume à ceux obtenus après fractionnement afin de rester cohérent dans la comparaison des données. Cependant, les approximations engendrées par le logiciel de DLS peuvent induire des erreurs, notamment dans le cas de particules polydisperses comme le sont les LNP étudiées au cours de ce manuscrit [347]. C'est pourquoi la distribution en intensité a été privilégiée au détriment des distributions en nombre et en volume.

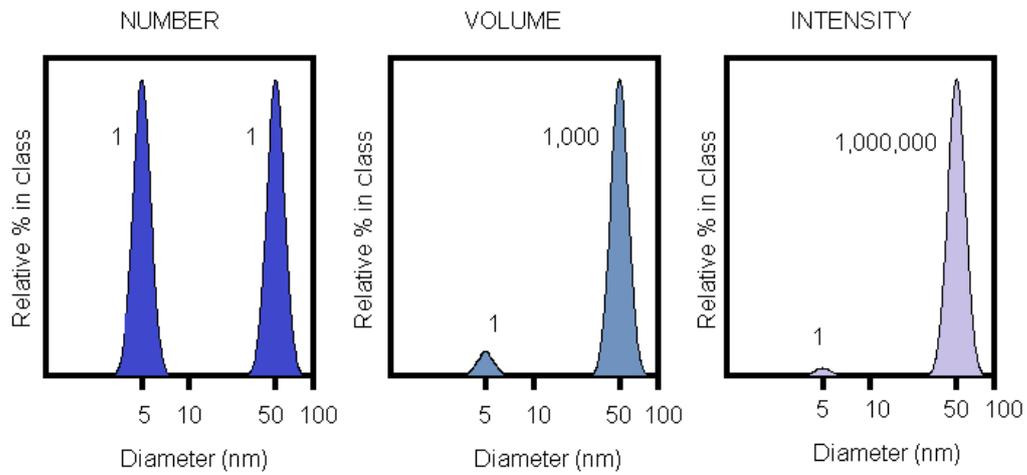


Figure A.1 – Distributions de tailles en nombre, volume et intensité d’une suspension de particules sphériques de 5 nm et 50 nm de diamètre, présentes en quantité égales, obtenues par DLS en mode batch [346].

Stabilité d'une formulation de LNP

Chaque lot de LNP est systématiquement analysé par Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS) en mode batch à l'issue de sa synthèse, après avoir été dilué 100 fois dans de l'eau ultra-pure. Il est ainsi possible d'obtenir le diamètre hydrodynamique D_h des particules ou z-average, leur potentiel zêta ζ ainsi que leur indice de polydispersité PDI . Ici, le z-average a été préféré car il ne s'agit que de confronter des résultats de DLS en mode batch entre eux et non pas avec d'autres techniques de caractérisation. Ces données ont été relevées pour chacun des lots utilisés lors de cette étude, c'est-à-dire pour les LNP F80 NC75 ainsi que pour les LNP F80-S-S-Pyr.

B.1 LNP F80 NC75

Quatre lots de LNP F80 NC75 ont été nécessaires pour réaliser les différentes études mises en place au cours de cette thèse. Il apparaît que le **diamètre hydrodynamique moyen** des particules calculé à partir du z-average varie très légèrement d'un lot à l'autre mais seulement de quelques nanomètres (Figure B.1).

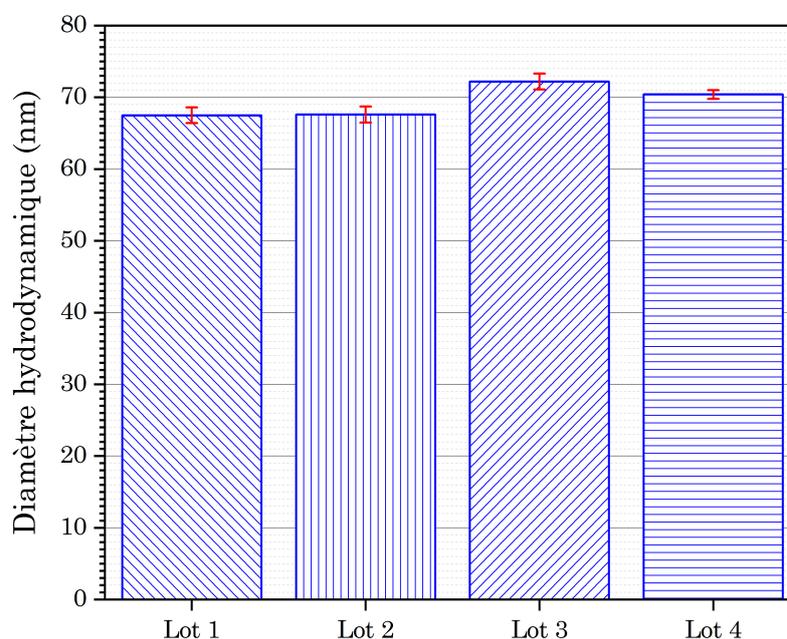


Figure B.1 – Mesure du diamètre hydrodynamique (z-average) de différents lots de F80 NC75 par DLS en mode batch.

En ce qui concerne l'indice de polydispersité des LNP (PDI), aucune disparité de dispersion n'est observée entre les lots, avec des valeurs allant de 0,13 à 0,16 (Figure B.2).

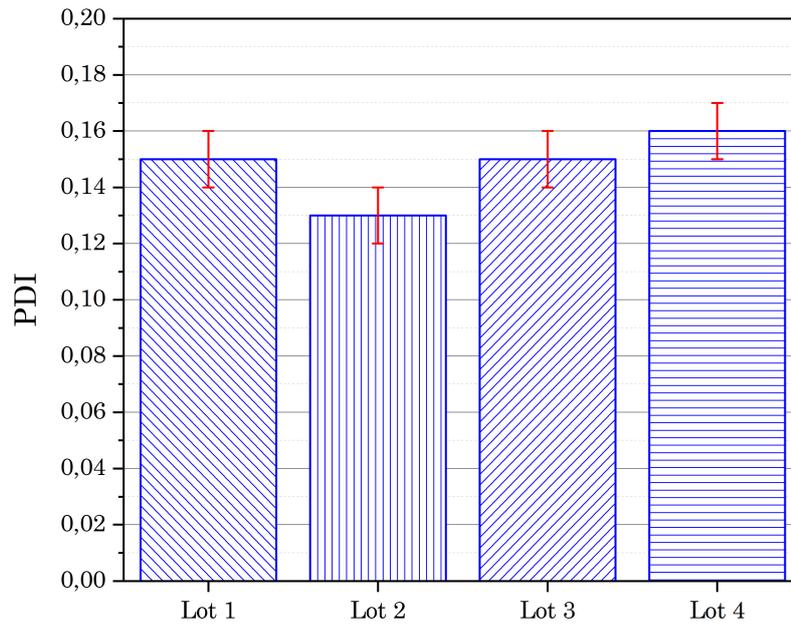


Figure B.2 – Mesure de l'indice de polydispersité de différents lots de F80 NC75 par DLS en mode batch.

Enfin, pour ce qui est du **potentiel zêta**, ses variations ne sont pas significatives et il peut être considéré comme **nul**, la surface des particules n'étant pas chargée (Figure B.3). Bien que ce potentiel soit nul, les particules sont tout de même stables du fait de répulsions non pas électrostatiques mais stériques.

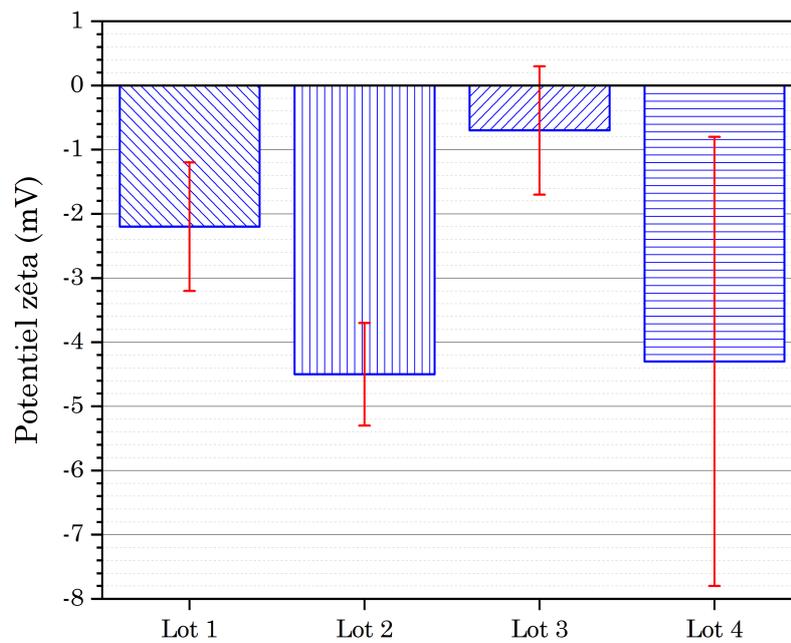


Figure B.3 – Mesure du potentiel zêta de différents lots de F80 NC75 par DLS en mode batch.

B.2. LNP F80-S-S-Pyr

Ainsi, la comparaison de différentes techniques de caractérisation malgré l'utilisation de lots différents reste cohérente.

B.2 LNP F80-S-S-Pyr

Pour ce qui est des LNP F80-S-S-Pyr, cinq lots ont été utilisés. Les différences sont plus marquées entre les lots, notamment entre le lot 2 et 3, avec un écart de 9 nm pour le z-average (Figure B.4). Ce qui peut expliquer en partie que les diamètres mesurés avec le greffage ioniques à partir du lot 2 soient plus important que ceux obtenus via le greffage de nanoparticules d'or qui lui s'est fait à partir du lot 1. Le PDI quant à lui change très peu et est compris entre 0,10 et 0,15 (Figure B.5). La largeur des distributions de tailles en est donc que très peu impactée. Enfin, en ce qui concerne le potentiel zêta, comme pour les lots de F80 NC75 il peut être considéré comme nul et la suspension est définie comme étant stable (Figure B.6).

La variabilité d'un lot à un autre est légèrement plus marquée pour les LNP F80-S-S-Pyr que pour les LNP F80 NC75 et pourrait expliquer les différences de diamètres obtenus après greffage par des nanoparticules d'or et par des ions auriques ou argent.

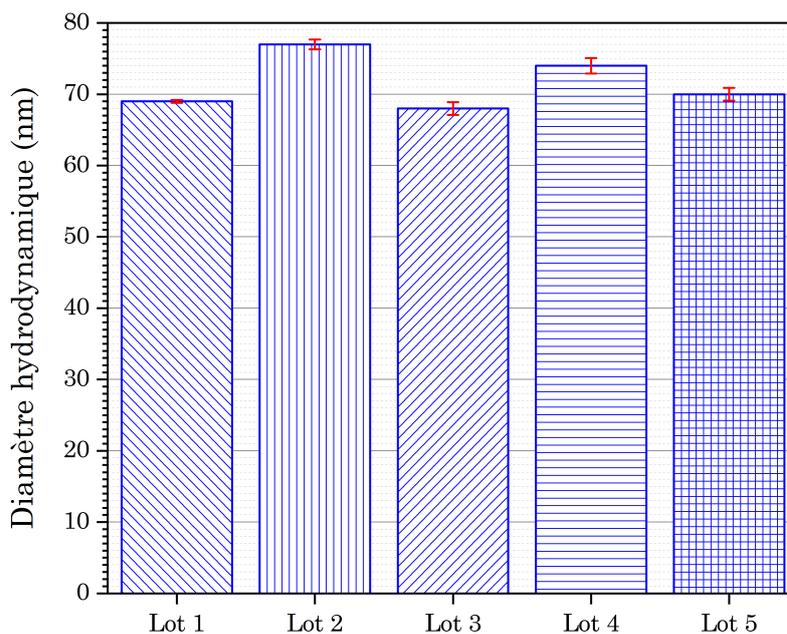


Figure B.4 – Mesure du diamètre hydrodynamique (z-average) de différents lots de F80-S-S-Pyr par DLS en mode batch.

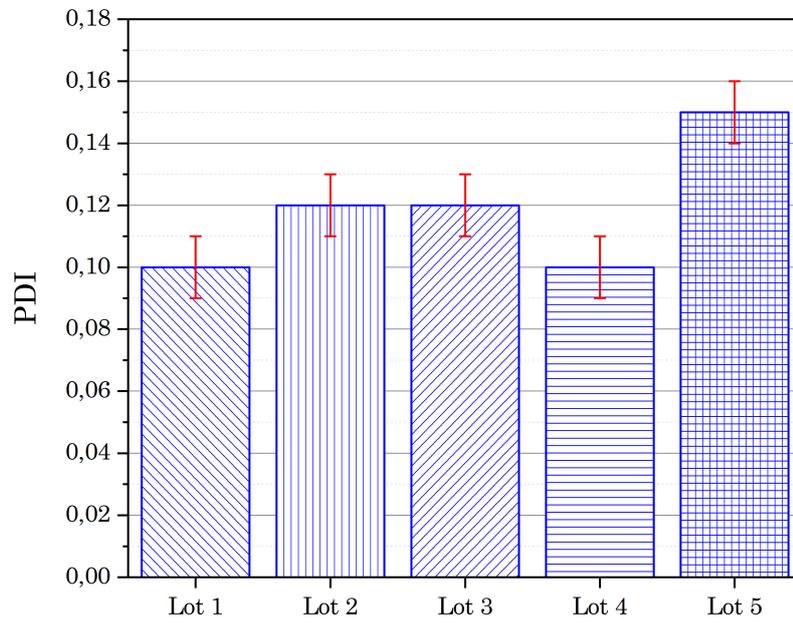


Figure B.5 – Mesure de l'indice de polydispersité de différents lots de F80-S-S-Pyr par DLS en mode batch.

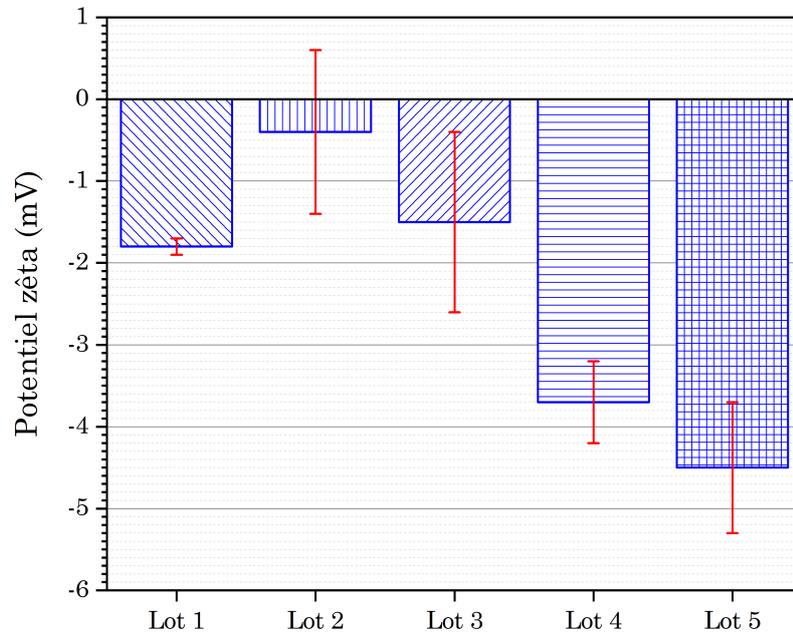


Figure B.6 – Mesure du potentiel zêta de différents lots de F80-S-S-Pyr par DLS en mode batch.

Bibliographie

- [1] National Academy of Sciences, *Characterization of Eyjafjallajökull volcanic ash particles and a protocol for rapid risk assessment*, vol. 108, 2011.
- [2] F. J. Heiligtag and M. Niederberger, “The fascinating world of nanoparticle research,” *Materials Today*, vol. 16, no. 7-8, pp. 262–271, 2013.
- [3] P. Walter, E. Welcomme, P. Hallégot, N. J. Zaluzec, C. Deeb, J. Castaing, P. Veyssière, R. Bréniaux, J. L. Lévêque, and G. Tsoucaris, “Early use of PbS nanotechnology for an ancient hair dyeing formula,” *Nano letters*, vol. 6, no. 10, pp. 2215–2219, 2006.
- [4] P. P. Edwards and J. M. Thomas, “Gold in a metallic divided state - from faraday to present-day nanoscience,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 46, no. 29, pp. 5480–5486, 2007.
- [5] G. D. Zhan, J. D. Kuntz, J. E. Garay, and A. K. Mukherjee, “Electrical properties of nanoceramics reinforced with ropes of single-walled carbon nanotubes,” *Applied physics letters*, vol. 83, no. 6, pp. 1228–1230, 2003.
- [6] R. S. Ruoff and D. C. Lorents, “Mechanical and thermal properties of carbon nanotubes,” *Carbon*, vol. 33, no. 7, pp. 925–930, 1995.
- [7] W. Yan, H. L. Lien, B. E. Koel, and W. X. Zhang, “Iron nanoparticles for environmental clean-up : recent developments and future outlook,” *Environmental Science : Processes & Impacts*, vol. 15, no. 1, pp. 63–77, 2013.
- [8] V. Wagner, A. Dullaart, A. K. Bock, and A. Zweck, “The emerging nanomedicine landscape,” *Nature Biotechnology*, vol. 24, no. 10, pp. 1211–1217, 2006.
- [9] A. Weir, P. Westerhoff, L. Fabricius, K. Hristovski, and N. Von Goetz, “Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products,” *Environmental Science and Technology*, vol. 46, no. 4, pp. 2242–2250, 2012.
- [10] K. Gosser, P. Glosekotter, and J. Dienstuhl, *Nanoelectronics and nanosystems : from transistors to molecular and quantum devices*. Springer Science & Business Media, 2004.
- [11] A. Simon-Deckers, B. Gouget, M. Mayne-L’Hermite, N. Herlin Boime, C. Reynaud, and M. Carriere, “In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes,” *Toxicology*, vol. 253, no. 1, pp. 137–146, 2008.
- [12] R. Ma, C. Levard, S. M. Marinakos, Y. Cheng, J. Liu, F. M. Michel, G. E. J. Brown, and G. V. Lowry, “Size-controlled dissolution of organic-coated silver nanoparticles,” *Environmental Science and Technology*, vol. 46, no. 2, pp. 752–759, 2011.
- [13] J. M. Durand, “Arrêté du 6 août 2012 relatif au contenu et aux conditions de présentation de la déclaration annuelle des substances à l’état nanoparticulaire, pris en application des articles R. 523-12 et R. 523-13 du code de l’environnement.” Ministère de l’écologie, du développement durable et de l’énergie. Journal officiel de la république française, 2012.
- [14] T. Tervonen, I. Linkov, J. R. Figueira, J. Steevens, M. Chappell, and M. Merad, “Risk-based classification system of nanomaterials,” *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 11, no. 4, pp. 757–766, 2009.

-
- [15] B. Moudgil, "Developing experimental approaches for the evaluation of toxicological interactions of nanoscale materials," techreport, University of Florida, Gainesville, 2004.
- [16] S. C. Brown, M. Palazuelos, P. Sharma, K. W. Powers, S. M. Roberts, S. R. Grobmyer, and B. M. Moudgil, *Cancer nanotechnology*, vol. Methods in Molecular Biology 624, ch. 4 - Nanoparticle characterization for cancer nanotechnology and other biological applications, pp. 39–65. Springer Science & Business Media, 2010.
- [17] P. Li, D. E. Miser, S. Rabiei, R. T. Yadav, and M. R. Hajaligol, "The removal of carbon monoxide by iron oxide nanoparticles," *Applied Catalysis B : Environmental*, vol. 43, no. 2, pp. 151–162, 2003.
- [18] S. D. Puckett, J. A. Heuser, J. D. Keith, W. U. Spendel, and G. E. Pacey, "Interaction of ozone with gold nanoparticles," *Talanta*, vol. 66, no. 5, pp. 1242–1246, 2005.
- [19] L. V. Stebounova, E. Guio, and V. H. Grassian, "Silver nanoparticles in simulated biological media : a study of aggregation, sedimentation, and dissolution," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 13, no. 1, pp. 233–244, 2011.
- [20] P. Christian, F. Von der Kammer, M. Baalousha, and T. Hofmann, "Nanoparticles : structure, properties, preparation and behaviour in environmental media," *Ecotoxicology*, vol. 17, no. 5, pp. 326–343, 2008.
- [21] "ISO/TS 80004-4, Nanotechnologies - Vocabulaire - Partie 4 : Matériaux nanostructurés," 2011.
- [22] E. Commission, *What is a "nanomaterial" ? European Commission breaks new ground with a common definition*, press release ed., 2011.
- [23] R. D. Handy, R. Owen, and E. Valsami-Jones, "The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials : current status, knowledge gaps, challenges, and future needs," *Ecotoxicology*, vol. 17, no. 5, pp. 315–325, 2008.
- [24] B. Nowack and T. D. Bucheli, "Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment," *Environmental Pollution*, vol. 150, no. 1, pp. 5–22, 2007.
- [25] N. Tepe and M. Bau, "Importance of nanoparticles and colloids from volcanic ash for riverine transport of trace elements to the ocean : Evidence from glacial-fed rivers after the 2010 eruption of Eyjafjallajokull volcano, Iceland," *Science of the Total Environment*, vol. 488, pp. 243–251, 2014.
- [26] P. Pedata, L. Malorni, N. Sannolo, M. Conturso, S. Scantone, M. Sirignano, A. Ciajolo, and A. D'Anna, "Characterization and inflammatory potential of sub-10nm particles from gas cooking appliances," *Chemical Engineering Transactions*, vol. 47, pp. 433–438, 2016.
- [27] L. A. Sgro, A. D'Anna, and P. Minutolo, "On the characterization of nanoparticles emitted from combustion sources related to understanding their effects on health and climate," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 211, pp. 420–426, 2012.
- [28] S. Hasegawa, M. Hirabayashi, S. Kobayashi, Y. Moriguchi, Y. Kondo, K. Tanabe, and S. Wakamatsu, "Size distribution and characterization of ultrafine particles in roadside atmosphere," *Journal of Environmental Science and Health, Part A Environmental Science*, vol. 39, no. 10, pp. 2671–2690, 2004.
- [29] Z. Guo and L. Tan, *Fundamentals and applications of nanomaterials*. Artech House, 2009.

- [30] P. I. Dolez, ed., *Nanoengineering : global approaches to health and safety issues*. Elsevier, 2015.
- [31] L. Cizaire, B. Vacher, T. Le Mogne, J. M. Martin, L. Rapoport, A. Margolin, and R. Tenne, "Mechanisms of ultra-low friction by hollow inorganic fullerene-like MoS₂ nanoparticles," *Surface and Coatings Technology*, vol. 160, no. 2, pp. 282–287, 2002.
- [32] A. Cabot, V. F. Puentes, E. Shevchenko, Y. Yin, L. Balcells, M. A. Marcus, S. M. Hughes, and A. P. Alivisatos, "Vacancy coalescence during oxidation of iron nanoparticles," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, no. 34, pp. 10358–10360, 2007.
- [33] H. Erikson, A. Sarapuu, K. Tammeveski, J. Solla-Gullón, and J. M. Feliu, "Enhanced electrocatalytic activity of cubic pd nanoparticles towards the oxygen reduction reaction in acid media," *Electrochemistry Communications*, vol. 13, no. 7, pp. 734–737, 2011.
- [34] T. H. Meen, J. K. Tsai, S. M. Chao, Y. C. Lin, T. C. Wu, T. Y. Chang, L. W. Ji, W. W., C. W. R., I. T. Tang, and C. J. Huang, "Surface plasma resonant effect of gold nanoparticles on the photoelectrodes of dye-sensitized solar cells," *Nanoscale research letters*, vol. 8, no. 1, pp. 450–455, 2013.
- [35] D. Melnikau, D. Savateeva, A. L. Sussha, A. and Rogach, and Y. P. Rakovich, "Strong plasmon-exciton coupling in a hybrid system of gold nanostars and J-aggregates," *Nanoscale research letters*, vol. 8, no. 1, pp. 134–139, 2013.
- [36] J. L. Elechiguerra, J. Reyes-Gasga, and M. J. Yacaman, "The role of twinning in shape evolution of anisotropic noble metal nanostructures," *Journal of Materials Chemistry*, vol. 16, no. 40, pp. 3906–3919, 2006.
- [37] N. G. Khlebtsov and L. A. Dykman, "Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles," *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, vol. 111, no. 1, pp. 1–35, 2010.
- [38] J. M. Di Meglio, "Colloïdes et nanosciences," *Techniques de l'Ingénieur*, 2007.
- [39] J. C. Berg, *An introduction to interfaces & colloids : the bridge to nanoscience*. World Scientific, 2010.
- [40] J. A. Matthews, G. E. Wnek, D. G. Simpson, and G. L. Bowlin, "Electrospinning of collagen nanofibers," *Biomacromolecules*, vol. 3, no. 2, pp. 232–238, 2002.
- [41] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W. E. Teo, L. T. C., and Z. Ma, eds., *An introduction to electrospinning and nanofibers*. World Scientific, 2005.
- [42] D. Tománek, A. Jorio, M. S. Dresselhaus, and G. Dresselhaus, *Carbon Nanotubes*, ch. Introduction to the important and exciting aspects of carbon-nanotube science and technology, pp. 1–12. Springer Berlin Heidelberg, 2007.
- [43] A. Zhang, G. Zheng, and C. Lieber, *Nanowires : Building blocks for nanoscience and nanotechnology*. Springer, 2016.
- [44] A. I. Boukai, Y. Bunimovich, J. Tahir-Kheli, J. K. Yu, W. A. Goddard III, and J. R. Heath, "Silicon nanowires as efficient thermoelectric materials," *Nature*, vol. 451, no. 7175, pp. 168–171, 2008.
- [45] J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán, and P. Mulvaney, "Gold nanorods : synthesis, characterization and applications," *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 249, no. 17, pp. 1870–1901, 2005.

-
- [46] J. Yuan and A. H. Müller, "One-dimensional organic-inorganic hybrid nanomaterials," *Polymer*, vol. 51, no. 18, pp. 4015–4036, 2010.
- [47] H. Ferkel and B. L. Mordike, "Magnesium strengthened by sic nanoparticles," *Materials Science and Engineering : A*, vol. 298, no. 1, pp. 193–199, 2001.
- [48] S. Kawashima, P. Hou, D. J. Corr, and S. P. Shah, "Modification of cement-based materials with nanoparticles," *Cement and Concrete Composites*, vol. 36, pp. 8–15, 2013.
- [49] P. Mani, R. Srivastava, and P. Strasser, "Dealloyed Pt-Cu core-shell nanoparticle electrocatalysts for use in PEM fuel cell cathodes," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 112, no. 7, pp. 2770–2778, 2008.
- [50] N. S. Allen, M. Edge, J. Verran, J. Stratton, J. Maltby, and C. Bygott, "Photocatalytic titania based surfaces : environmental benefits," *Polymer degradation and stability*, vol. 93, no. 9, pp. 1632–1646, 2008.
- [51] Y. C. Barenholz, "Doxil - the first FDA-approved nano-drug : Lessons learned," *Journal of Controlled Release*, vol. 160, no. 2, pp. 117–134, 2012.
- [52] F. E. Kruis, H. Fissan, and A. Peled, "Synthesis of nanoparticles in the gas phase for electronic, optical and magnetic applications - a review," *Journal of Aerosol Science*, vol. 29, no. 5, pp. 511–535, 1998.
- [53] L. Mädler and S. K. Friedlander, "Transport of nanoparticles in gases : overview and recent advances," *Aerosol and Air Quality Research*, vol. 7, no. 3, pp. 304–342, 2007.
- [54] A. S. H. Makhlof and I. Tiginyanu, eds., *Nanocoatings and ultra-thin films : technologies and applications*. Woodhead Publishing, 2011.
- [55] B. Díaz, J. Światowska, V. Maurice, A. Seyeux, E. Härkönen, M. Ritala, S. Tervakangas, J. Kolehmainen, and P. Marcus, "Tantalum oxide nanocoatings prepared by atomic layer and filtered cathodic arc deposition for corrosion protection of steel : comparative surface and electrochemical analysis," *Electrochimica Acta*, vol. 90, pp. 232–245, 2013.
- [56] L. Lu, M. L. Sui, and K. Lu, "Superplastic extensibility of nanocrystalline copper at room temperature," *Science*, vol. 287, no. 5457, pp. 1463–1466, 2000.
- [57] N. Ichinose, Y. Ozaki, and S. Kashu, *Superfine particle technology*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [58] W. Haiss, N. T. Thanh, J. Aveyard, and D. G. Fernig, "Determination of size and concentration of gold nanoparticles from uv-vis spectra," *Analytical chemistry*, vol. 78, no. 11, pp. 4215–4221, 2007.
- [59] E. Paparazzo, M. Fanfoni, E. Severini, and S. Priori, "Evidence of si-oh species at the surface of aged silica," *Journal of Vacuum Science & Technology A : Vacuum, Surfaces, and Films*, vol. 10, no. 4, pp. 2892–2896, 1992.
- [60] R. Anthony and U. Kortshagen, "Photoluminescence quantum yields of amorphous and crystalline silicon nanoparticles," *Physical Review B*, vol. 80, no. 11, p. 115407, 2009.
- [61] J. M. Chan, L. Zhang, K. P. Yuet, G. Liao, J. W. Rhee, R. Langer, and O. C. Farokhzad, "PLGA-lecithin-PEG core-shell nanoparticles for controlled drug delivery," *Biomaterials*, vol. 30, no. 8, pp. 1627–1634, 2009.
- [62] L. Su, G. Zhen, L. Zhang, Y. Zhao, D. Niu, and X. Chai, "The use of the core-shell structure of zero-valent iron nanoparticles (nZVI) for long-term removal of sulphide in sludge during anaerobic digestion," *Environmental Science : Processes & Impacts*, vol. 17, no. 12, pp. 2013–2021, 2015.

- [63] A. Henglein and M. Giersig, "Formation of colloidal silver nanoparticles : capping action of citrate," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 103, no. 44, pp. 9533–9539, 1999.
- [64] R. Gref, A. Domb, P. Quellec, T. Blunk, R. H. Müller, J. M. Verbavatz, and R. Langer, "The controlled intravenous delivery of drugs using peg-coated sterically stabilized nanospheres," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 64, pp. 316–326, 2012.
- [65] V. Jennings, K. Mäder, and S. H. Gohla, "Solid lipid nanoparticles (SLNTM) based on binary mixtures of liquid and solid lipids : a ¹H-NMR study," *International journal of pharmaceutics*, vol. 205, no. 1, pp. 15–21, 2000.
- [66] M. Bauer, "Cristallisation et polymorphisme. description du phénomène," *Techniques de l'ingénieur*, no. AF3640, 2004.
- [67] G. Nichols, S. Byard, M. J. Bloxham, J. Botterill, N. J. Dawson, A. Dennis, V. Diart, N. C. North, and J. D. Sherwood, "A review of the terms agglomerate and aggregate with a recommendation for nomenclature used in powder and particle characterization," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 91, no. 10, pp. 2103–2109, 2002.
- [68] B. Faure, G. Salazar-Alvarez, A. Ahniyaz, I. Villaluenga, G. Berriozabal, Y. R. De Miguel, and L. Bergström, "Dispersion and surface functionalization of oxide nanoparticles for transparent photocatalytic and uv-protecting coatings and sunscreens," *Science and technology of advanced materials*, vol. 14, no. 2, pp. 1–23, 2013.
- [69] T. M. Sager, D. W. Porter, V. A. Robinson, W. G. Lindsley, D. E. Schwegler-Berry, and V. Castranova, "Improved method to disperse nanoparticles for in vitro and in vivo investigation of toxicity," *Nanotoxicology*, vol. 1, no. 2, pp. 118–129, 2007.
- [70] D. J. Shaw, *Introduction to colloid and surface chemistry*. Butterworth-Heinemann, 4^{eme} ed., 1992.
- [71] S. A. K. Read, A. Sánchez Jiménez, B. L. Ross, R. J. Aitken, and M. van Tongeren, *Handbook of nanosafety : Measurement, exposure and toxicology*, ch. 2 - Nanotechnology and Exposure Scenarios, pp. 17–58. Elsevier, 2013.
- [72] V. Deepak, K. Kalishwaralal, S. R. K. Pandian, and S. Gurunathan, *Metal nanoparticles in microbiology*, ch. An insight into the bacterial biogenesis of silver nanoparticles, industrial production and scale-up, pp. 17–35. Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [73] D. R. Baer, M. H. Engelhard, G. E. Johnson, J. Laskin, J. Lai, K. Mueller, P. Munusamy, S. Thevuthasan, H. Wang, N. Washton, A. Elder, B. L. Baisch, A. Karakoti, S. V. N. T. Kuchibhatla, and D. Moon, "Surface characterization of nanomaterials and nanoparticles : Important needs and challenging opportunities," *Journal of Vacuum Science & Technology A : Vacuum, Surfaces, and Films*, vol. 31, no. 5, pp. 1–34, 2013.
- [74] N. Hondow, A. Brown, and R. Brydson, *Characterization of Nanomaterials in Complex Environmental and Biological Media*, ch. 6. Nanomaterials : Dispersion, Dissolution and Dose, pp. 183–216. Elsevier, 2015.
- [75] T. L. Faylor and R. W. Martin, "Ultra pure water process and apparatus." Brevet U. S. 3 870 033, 1975.
- [76] V. Y. Rudyak and S. L. Krasnolutsii, "Dependence of the viscosity of nanofluids on nanoparticle size and material," *Physics Letters A*, vol. 378, no. 26, pp. 1845–1849, 2014.
- [77] S. K. Brar, M. Verma, R. D. Tyagi, and R. Y. Surampalli, "Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge - evidence and impacts," *Waste management*, vol. 30, no. 3, pp. 504–520, 2010.

- [78] K. Tiede, A. B. Boxall, S. P. Tear, J. Lewis, H. David, and M. Hassellöv, "Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment," *Food Additives and Contaminants*, vol. 25, no. 7, pp. 795–821, 2008.
- [79] M. Mattarozzi, M. Suman, C. Cascio, D. Calestani, S. Weigel, A. Undas, and R. Peters, "Analytical approaches for the characterization and quantification of nanoparticles in food and beverages," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 409, no. 1, pp. 63–80, 2017.
- [80] M. Joshi, A. Bhattacharyya, and S. W. Ali, "Characterization techniques for nanotechnology applications in textiles," *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, vol. 33, pp. 304–317, 2008.
- [81] T. Krebs, S. Mühlhopt, S. Diabaté, C. Schlager, H. R. Paur, and M. Dilger, *Biomedical applications of nanoparticles*, ch. 9. In Vitro Exposure Systems to Assess the Toxicity of Airborne Substances. CRC Press, 2009.
- [82] A. E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, and M. Thompson, "Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface," *Nature materials*, vol. 8, no. 7, pp. 543–557, 2009.
- [83] O. Zeyons, *Etudes des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement*. phdthesis, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2008.
- [84] Y. Min, M. Akbulut, K. Kristiansen, Y. Golan, and J. Israelachvili, "The role of interparticle and external forces in nanoparticle assembly," *Nature materials*, vol. 7, no. 7, pp. 527–538, 2008.
- [85] S. Elzey and V. H. Grassian, "Agglomeration, isolation and dissolution of commercially manufactured silver nanoparticles in aqueous environments," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 12, no. 5, pp. 1945–1958, 2010.
- [86] B. Trouiller, R. Reliene, A. Westbrook, P. Solaimani, and R. H. Schiestl, "Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice," *Cancer research*, vol. 69, no. 22, pp. 8784–8789, 2009.
- [87] K. Cho, X. U. Wang, S. Nie, and D. M. Shin, "Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 5, pp. 1310–1316, 2008.
- [88] H. Rauscher, K. Rasmussen, and B. Sokull Klüttgen, "Regulatory aspects of nanomaterials in the EU," *Chemie Ingenieur Technik*, vol. 89, no. 3, pp. 224–231, 2017.
- [89] J. M. Gamboa and K. W. Leong, "In vitro and in vivo models for the study of oral delivery of nanoparticles," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 65, no. 6, pp. 800–810, 2013.
- [90] B. Faure, H. Dozol, C. Brouard, A. Guiot, and S. Clavaguera, "Assessment of personal exposure to airborne nanomaterials : Evaluation of a novel sampler," *Journal of Physics : Conference Series*, vol. 838, no. 1, pp. 1–12, 2017.
- [91] T. Thomas, K. Thomas, N. Sadrieh, N. Savage, P. Adair, and R. Bronaugh, "Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VII. Evaluating consumer exposure to nanoscale materials," *Toxicological sciences*, vol. 91, no. 1, pp. 14–19, 2006.
- [92] E. Asmatulu, J. Twomey, and M. Overcash, "Life cycle and nano-products : end-of-life assessment," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 14, no. 3, pp. 720–727, 2012.

Bibliographie

- [93] K. W. Powers, S. C. Brown, V. B. Krishna, S. C. Wasdo, B. M. Moudgil, and S. M. Roberts, "Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation," *Toxicological Sciences*, vol. 90, no. 2, pp. 296–303, 2006.
- [94] S. M. Mukhopadhyay, *Sample preparation techniques in analytical chemistry*, ch. 9. Sample preparation for microscopic and spectroscopic characterization of solid surfaces and films, pp. 377–411. John Wiley & Sons, 2003.
- [95] T. Faunce and B. Kolodziejczyk, "Nanowaste : need for disposal and recycling standards," *G20 Insights*, 2017.
- [96] G. L. Hornyak, J. Dutta, H. F. Tibbals, and A. Rao, *Introduction to nanoscience*. CRC Press, 2008.
- [97] C. Freese, R. E. Unger, R. C. Deller, M. I. Gibson, C. Brochhausen, H. A. Klok, and C. J. Kirkpatrick, "Uptake of poly (2-hydroxypropylmethacrylamide)-coated gold nanoparticles in microvascular endothelial cells and transport across the blood-brain barrier," *Biomaterials Science*, vol. 1, no. 8, pp. 824–833, 2013.
- [98] E. A. Patterson and M. P. Whelan, "Tracking nanoparticles in an optical microscope using caustics," *Nanotechnology*, vol. 19, no. 10, pp. 105502–105509, 2008.
- [99] S. Patskovsky, E. Bergeron, D. Rioux, and M. Meunier, "Wide-field hyperspectral 3D imaging of functionalized gold nanoparticles targeting cancer cells by reflected light microscopy," *Journal of biophotonics*, vol. 8, no. 5, pp. 401–407, 2015.
- [100] R. Attota, P. P. Kavuri, H. Kang, R. Kasica, and L. Chen, "Nanoparticle size determination using optical microscopes," *Applied Physics Letters*, vol. 105, no. 16, pp. 1–4, 2014.
- [101] R. Attota and R. G. Dixson, "Resolving three-dimensional shape of sub-50 nm wide lines with nanometer-scale sensitivity using conventional optical microscopes," *Applied Physics Letters*, vol. 105, no. 4, p. 43101, 2014.
- [102] S. Hell and E. H. Stelzer, "Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation," *Optics Communications*, vol. 93, no. 5-6, pp. 277–282, 1992.
- [103] A. Kasten, C. Grüttner, J. P. Kühn, R. Bader, J. Pasold, and B. Frerich, "Comparative in vitro study on magnetic iron oxide nanoparticles for mri tracking of adipose tissue-derived progenitor cells," *PloS one*, vol. 9, no. 9, pp. 1–13, 2014.
- [104] B. J. Berne and R. Pecora, *Dynamic light scattering : with applications to chemistry, biology, and physics*. Courier Corporation, 2000.
- [105] G. Bryant and J. C. Thomas, "Improved particle size distribution measurements using multiangle dynamic light scattering," *Langmuir*, vol. 11, no. 7, pp. 2480–2485, 1995.
- [106] R. C. Murdock, L. Braydich-Stolle, A. M. Schrand, J. J. Schlager, and S. M. Hussain, "Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique," *Toxicological sciences*, vol. 101, no. 2, pp. 239–253, 2008.
- [107] A. Wei, J. G. Mehtala, and A. K. Patri, "Challenges and opportunities in the advancement of nanomedicines," *Journal of controlled release*, vol. 164, no. 2, pp. 236–246, 2012.

-
- [108] D. B. Williams and C. B. Carter, *Transmission Electron Microscopy*. Springer Science, 1996.
- [109] K. L. Klein, I. M. Anderson, and N. De Jonge, “Transmission electron microscopy with a liquid flow cell,” *Journal of microscopy*, vol. 242, no. 2, pp. 117–123, 2011.
- [110] R. E. Cameron and A. M. Donald, “Minimizing sample evaporation in the environmental scanning electron microscope,” *Journal of Microscopy*, vol. 173, no. 3, pp. 227–237, 1994.
- [111] R. F. Egerton, *Electron energy-loss spectroscopy in the electron microscope*. Springer Science & Business Media, 2011.
- [112] G. Cliff and G. Lorimer, “The quantitative analysis of thin specimens,” *Journal of Microscopy*, vol. 103, no. 2, pp. 203–207, 1975.
- [113] G. Möllenstedt, “My early work on convergent beam electron diffraction,” *Physica Status Solidi*, vol. 116, no. 1, pp. 13–22, 1989.
- [114] B. Michen, C. Geers, D. Vanhecke, C. Endes, B. Rothen-Rutishauser, S. Balog, and A. Petri-Fink, “Avoiding drying-artifacts in transmission electron microscopy : Characterizing the size and colloidal state of nanoparticles,” *Nature - Scientific reports*, vol. 5, no. 9793, pp. 1–7, 2015.
- [115] P. Eaton and P. West, eds., *Atomic force microscopy*. Oxford University Press., 2010.
- [116] A. Dubes, H. Parrot-Lopez, W. Abdelwahed, G. Degobert, H. Fessi, P. Shahgaldian, and A. W. Coleman, “Scanning electron microscopy and atomic force microscopy imaging of solid lipid nanoparticles derived from amphiphilic cyclodextrins,” *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, vol. 55, no. 3, pp. 279–282, 2003.
- [117] Y. Sugimoto, P. Pou, M. Abe, P. Jelinek, R. Pérez, S. Morita, and O. Custance, “Chemical identification of individual surface atoms by atomic force microscopy,” *Nature*, vol. 446, no. 7131, pp. 64–67, 2007.
- [118] N. Sebaihi, B. De Boeck, Y. Yuana, R. Nieuwland, and J. Pétry, “Dimensional characterization of extracellular vesicles using atomic force microscopy,” *Measurement Science and Technology*, vol. 28, no. 3, pp. 1–8, 2017.
- [119] K. Nehru and M. Sivakumar, “Biosynthesis of Ag nanoparticles using *Amaranthus tristis* extract for the fabrication of nanoparticle embedded PVA membrane,” *Current Nanoscience*, vol. 8, no. 5, pp. 703–708, 2012.
- [120] B. Chu and T. Liu, “Characterization of nanoparticles by scattering techniques,” *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 2, no. 1, pp. 29–41, 2000.
- [121] F. Laborda, J. Jiménez-Lamana, E. Bolea, and J. R. Castillo, “Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS,” *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, vol. 28, no. 8, pp. 1220–1232, 2013.
- [122] L. Liu, B. He, Q. Liu, Z. Yun, X. Yan, Y. Long, and G. Jiang, “Identification and accurate size characterization of nanoparticles in complex media,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 53, no. 52, pp. 14476–14479, 2014.
- [123] S. Lee, X. Bi, R. B. Reed, J. F. Ranville, P. Herckes, and P. Westerhoff, “Nanoparticle size detection limits by single particle ICP-MS for 40 elements,” *Environmental science & technology*, vol. 48, no. 17, pp. 10291–10300, 2014.

Bibliographie

- [124] M. L. Rami, *Etude de la stabilité de dispersions colloïdales de zircone yttrée pour la fabrication de céramiques à grains fins*. PhD thesis, Université Paul Sabatier-Toulouse III, 2010.
- [125] S. Agnihotri, S. Mukherji, and S. Mukherji, “Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy,” *Rsc Advances*, vol. 4, no. 8, pp. 3974–3983, 2014.
- [126] L. J. Chen, S. S. Shah, J. Silangcruz, M. J. Eller, S. V. Verkhoturov, A. Revzin, and E. A. Schweikert, “Characterization and quantification of nanoparticle-antibody conjugates on cells using C60 ToF SIMS in the event-by-event bombardment/detection mode,” *International journal of mass spectrometry*, vol. 303, no. 2-3, pp. 97–102, 2011.
- [127] K. Kuroda, T. Fujiwara, T. Imai, R. Takama, K. Saito, Y. Matsushita, and K. Fukushima, “The cryo-TOF-SIMS/SEM system for the analysis of the chemical distribution in freeze-fixed *Cryptomeria japonica* wood,” *Surface and Interface Analysis*, vol. 45, no. 1, pp. 215–219, 2013.
- [128] V. D. Hodoroaba and J. Mielke, “Development of an integrated approach based on validated and standardized methods to support the implementation of the EC recommendation for a definition of nanomaterial,” techreport, EU FP7 NanoDefine Project, 2014.
- [129] L. Calzolari, D. Gilliland, C. P. Garcia, and F. Rossi, “Separation and characterization of gold nanoparticle mixtures by flow-field-flow fractionation,” *Journal of Chromatography A.*, vol. 1218, no. 27, pp. 4234–4239, 2011.
- [130] W. Anderson, D. Kozak, V. A. Coleman, Å. K. Jämting, and M. Trau, “A comparative study of submicron particle sizing platforms : accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size distributions,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 405, pp. 322–330, 2013.
- [131] B. Stolpe, M. Hassellöv, K. Andersson, and D. R. Turner, “High resolution ICPMS as an on-line detector for flow field-flow fractionation ; multi-element determination of colloidal size distributions in a natural water sample,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 535, no. 1, pp. 109–121, 2005.
- [132] D. M. Mitrano, A. Barber, A. Bednar, P. Westerhoff, C. P. Higgins, and J. F. Ranville, “Silver nanoparticle characterization using single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and asymmetrical flow field flow fractionation ICP-MS (AF4-ICP-MS),” *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, vol. 27, no. 7, pp. 1131–1142, 2012.
- [133] Z. Krpetić, A. M. Davidson, M. Volk, R. Leévy, M. Brust, and D. L. Cooper, “High-resolution sizing of monolayer-protected gold clusters by differential centrifugal sedimentation,” *ACS nano*, vol. 7, no. 10, pp. 8881–8890, 2013.
- [134] I. Laidlaw and M. Steinmetz, *Analytical ultracentrifugation : techniques and methods*, ch. 14. Introduction to Differential Sedimentation, pp. 270–290. Royal Society of Chemistry, 2007.
- [135] C. S. Wu, ed., *Handbook of size exclusion chromatography and related techniques : revised and expanded*, vol. 91. Marcel Dekker, 2003.
- [136] A. Thill and O. Spalla, “Aggregation due to capillary forces during drying of particle submonolayers,” *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 217, no. 1-3, pp. 143–151, 2003.

-
- [137] T. Allen, *Particle size measurement*. Springer, 2013.
- [138] N. C. Bell, C. Minelli, J. Tompkins, M. M. Stevens, and A. G. Shard, “Emerging techniques for submicrometer particle sizing applied to stöber silica,” *Langmuir*, vol. 28, no. 29, pp. 10860–10872, 2012.
- [139] “ISO 9276-1, Représentation de données obtenues par analyse granulométrique - Partie 1 : Représentation graphique,” 1998.
- [140] J. Mast, E. Verleysen, and P. J. De Temmerman, *Advanced Transmission Electron Microscopy*, ch. 8. Physical Characterization of Nanomaterials in Dispersion by Transmission Electron Microscopy in a Regulatory Framework, pp. 249–270. Springer, 2015.
- [141] O. G. Raabe, “Particle size analysis utilizing grouped data and the log-normal distribution,” *Journal of Aerosol Science*, vol. 2, no. 3, pp. 289–303, 1971.
- [142] B. B. Weiner, *What is a continuous particle size distribution ?* Brookhaven Instruments, NY, USA., 2011.
- [143] S. Podzimek, *Light scattering, size exclusion chromatography and asymmetric flow field flow fractionation. Powerful tools for the characterization of polymers, proteins and nanoparticles*. John Wiley & Sons, 2012.
- [144] E. Mansfield, D. L. Kaiser, D. Fujita, and M. Van de Voorde, eds., *Metrology and Standardization for Nanotechnology : Protocols and Industrial Innovations*. John Wiley & Sons, 2017.
- [145] W. Hergert and T. Wriedt, eds., *The Mie Theory : basics and applications*, vol. 169. Springer, 2012.
- [146] C. Montet, *Caractérisation de nanoparticules et systèmes nanoparticulaires complexes par analyse de la diffusion multi-angulaire de la lumière*. phdthesis, Aix-Marseille Université (AMU), 2017.
- [147] R. Pecora, “Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids,” *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 2, no. 2, pp. 123–131, 2000.
- [148] M. Rebay, S. Kakaç, and R. M. Cotta, eds., *Microscale and Nanoscale Heat Transfer : Analysis, Design, and Application*, ch. 6. Stability of Nnaofluids : Fundamentals, State-of-the-art, and Potential Applications, pp. 155–182. CRC Press, 2016.
- [149] T. Linsinger, G. Roebben, D. Gilliland, L. Calzolari, F. Rossi, N. Gibson, and C. Klein, “Requirements on measurements for the implementation of the european commission definition of the term nanomaterial,” *JRC Reference Reports*, 2012.
- [150] M. Kaszuba, D. McKnight, M. T. Connah, F. K. McNeil Watson, and U. Nobbmann, “Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering,” *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 10, no. 5, pp. 823–829, 2008.
- [151] R. Shaw, *Dynamic Light Scattering training achieving reliable nano particle sizing*. ATA Scientific, 2013.
- [152] B. N. Khlebtsov and N. G. Khlebtsov, “On the measurement of gold nanoparticle sizes by the dynamic light scattering method,” *Colloid Journal*, vol. 73, no. 1, pp. 118–127, 2011.
- [153] B. H. Zimm, “The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 16, no. 12, pp. 1093–1099, 1948.

Bibliographie

- [154] T. Wyatt, *Understanding Multi-Angle Static Light Scattering*. Wyatt Technology Corporation.
- [155] T. Wyatt, *Dawn[®] HeleosTM II*. Wyatt Technology Corporation.
- [156] T. Wyatt, *Eclipse[®] AF4*. Wyatt Technology Corporation.
- [157] L. Givelet, *Détection et caractérisation de nanoparticules de titane (TiO₂) dans les aliments par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en mode "single particle"*. Thèse de doctorat, I-MEP2 - Grenoble INP, 2019.
- [158] M. Karlík and B. Jouffrey, "Étude des métaux par microscopie électronique en transmission (MET) - microscope, échantillons et diffraction," *Techniques de l'Ingénieur*, 2008.
- [159] N. Mante, *Hétéroépitaxie de GaN sur Si : De la nucléation à la relaxation des contraintes, étude par microscopie électronique en transmission*. PhD thesis, Université Grenoble Alpes, 2016.
- [160] R. A. Grassucci, D. Taylor, and J. Frank, "Visualization of macromolecular complexes using cryo-electron microscopy with FEI Tecnai transmission electron microscopes," *Nature protocols*, vol. 3, no. 2, pp. 330–339, 2008.
- [161] A. R. Barron, ed., *Physical Methods in Chemistry and Nano Science*, ch. 1. Elemental Analysis, pp. 90–97. Rice University, 2012.
- [162] A. Sundar, P. Farzinpour, K. D. Gilroy, T. Tan, R. A. Hughes, and S. Neretina, "Eutectic combinations as a pathway to the formation of substrate-based Au-Ge heterodimers and hollowed Au nanocrescents with tunable optical properties," *Small*, vol. 10, no. 16, pp. 3379–3388, 2014.
- [163] M. Karlík and B. Jouffrey, "Étude des métaux par microscopie électronique en transmission (MET) - analyse chimique locale," *Techniques de l'Ingénieur*, 2008.
- [164] T. Malis, S. C. Cheng, and R. F. Egerton, "EELS log ratio technique for specimen thickness measurement in the TEM," *Journal of Electron Microscopy Technique*, 1988.
- [165] K. Iakoubovskii, K. Mitsuishi, Y. Nakayama, and K. Furuya, "Thickness measurements with electron energy loss spectroscopy," *Microscopy research and technique*, vol. 71, no. 8, pp. 626–631, 2008.
- [166] S. Carencio, S. Moldovan, L. Roiban, I. Florea, D. Portehault, K. Vallé, P. Belleville, C. Boissière, L. Rozes, N. Mézailles, M. Drillon, and O. Sanchez, C. Ersen, "The core contribution of transmission electron microscopy to functional nanomaterials engineering," *Nanoscale*, vol. 8, no. 3, pp. 1260–1279, 2016.
- [167] G. Kothleitner, "Analytical electron microscopy - EDXS, EELS, EFETM," in *QEM - Quantitative Electron Microscopy*, 2017.
- [168] L. I. Florea, *Tomographie électronique de nano-objets*. phdthesis, Université de Strasbourg, 2011.
- [169] B. D. Levin, E. Padgett, C. C. Chen, M. C. Scott, R. Xu, W. Theis, Y. Jiang, Y. Yang, C. Ophus, H. Zhang, D. H. Ha, D. Wang, Y. Yu, H. D. Abruña, R. D. Robinson, P. Ercius, L. F. Kourkoutis, J. Miao, D. A. Muller, and R. Hovden, "Nanomaterial datasets to advance tomography in scanning transmission electron microscopy," *Scientific data*, vol. 3, 2016.
- [170] W. O. Saxton, W. Baumeister, and M. Hahn, "Three-dimensional reconstruction of imperfect two-dimensional crystals," *Ultramicroscopy*, vol. 13, no. 1-2, pp. 57–70, 1984.

- [171] V. D. Tran, *Reconstruction et segmentation d'image 3D de tomographie électronique par approche problème inverse*. PhD thesis, Université Jean Monnet-Saint-Etienne, 2013.
- [172] Y. Talmon, "Transmission electron microscopy of complex fluids : the state of the art," *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, vol. 100, no. 3, pp. 364–372, 1996.
- [173] R. Peters, G. ten Dam, H. Bouwmeester, H. Helsper, G. Allmaier, F. vd Kammer, R. Ramsch, C. Solans, M. Tomaniová, J. Hajslova, and S. Weigel, "Identification and characterization of organic nanoparticles in food," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 30, no. 1, pp. 100–112, 2011.
- [174] J. R. Harris and D. Scheffler, "Routine preparation of air-dried negatively stained and unstained specimens on holey carbon support film : a review of applications," *Micron*, vol. 33, no. 5, pp. 461–480, 2002.
- [175] M. A. Hayat and S. E. Miller, *Negative staining*. McGraw Hill, 1990.
- [176] C. E. Hall, "Electron densitometry of stained virus particles," *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, vol. 1, no. 1, pp. 1–12, 1955.
- [177] J. Dubochet, M. Adrian, J. J. Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A. McDowell, and P. Schultz, "Cryo-electron microscopy of vitrified specimens," *Quarterly Review of Biophysics*, vol. 21, no. 2, pp. 129–228, 1988.
- [178] A. Al-Amoudi, J. J. Chang, A. Leforestier, A. McDowell, L. M. Salamin, L. P. Norlen, K. Richter, N. Sartori Blanc, and J. Dubochet, "Cryo-electron microscopy of vitreous sections," *EMBO Journal*, vol. 23, no. 18, pp. 3583–3588, 2004.
- [179] C. V. Iancu, W. F. Tivol, J. B. Schooler, D. P. Dias, G. P. Henderson, G. E. Murphy, E. R. Wright, Z. Li, Z. Yu, A. Briegel, L. Gan, Y. He, and G. J. Jensen, "Electron cryotomography sample preparation using the vitrobot," *Nature Protocols*, vol. 1, no. 6, pp. 2813–2819, 2007.
- [180] J. Dubochet and J. Lepault, "Cryo-electron microscopy of vitrified water," *Le Journal de Physique Colloques*, vol. 45, no. 7, pp. 85–94, 1984.
- [181] I. Yannas, "Vitrification temperature of water," *Science*, vol. 160, no. 3825, pp. 298–299, 1968.
- [182] M. Cottevieille, *Études structurales de complexes multienzymatiques par cryomicroscopie électronique, reconstructions tridimensionnelles, modélisation moléculaire et recalage de données atomiques*. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, 2007.
- [183] N. R. Silvester, S. Marchese Ragona, and D. N. Johnston, "The relative efficiency of various fluids in the rapid freezing of protozoa," *Journal of Microscopy*, vol. 128, no. 2, pp. 175–186, 1982.
- [184] A. Dubrovsky, S. Sorrentino, J. Harapin, K. T. Sapra, and O. Medalia, "Developments in cryo-electron tomography for in situ structural analysis," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 581, pp. 78–85, 2015.
- [185] Y. Zheng, Z. Lin, J. L. Zakin, Y. Talmon, H. T. Davis, and L. E. Scriven, "Cryo-TEM imaging the flow-induced transition from vesicles to threadlike micelles," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 104, no. 22, pp. 5263–5271, 2000.
- [186] M. Adrian, J. Dubochet, S. D. Fuller, and J. R. Harris, "Cryo-negative staining," *Micron*, vol. 29, no. 2, pp. 145–160, 1998.

Bibliographie

- [187] D. F. Parsons, "Structure of wet specimens in electron microscopy," *Science*, vol. 186, no. 4162, pp. 407–414, 1974.
- [188] M. J. Dukes, R. Thomas, J. Damiano, K. L. Klein, S. Balasubramanian, S. Kayandan, J. S. Riffle, R. M. Davis, S. M. McDonald, and D. F. Kelly, "Improved microchip design and application for in situ transmission electron microscopy of macromolecules," *Microscopy and Microanalysis*, vol. 20, no. 2, pp. 338–345, 2014.
- [189] M. J. Dukes, A. D. Dukes, K. L. Klein, R. Thomas, D. F. Kelly, and J. Damiano, "Applications and design of reinforced silicon nitride windows for in situ liquid transmission electron microscopy," *Microscopy and Microanalysis*, vol. 20, no. 3, pp. 1090–1091, 2014.
- [190] E. A. Ring and N. De Jonge, "Microfluidic system for transmission electron microscopy," *Microscopy and Microanalysis*, vol. 16, no. 5, pp. 622–629, 2010.
- [191] E. A. Lewis, S. J. Haigh, T. J. A. Slater, Z. He, M. A. Kulzick, M. G. Burke, and N. J. Zaluze, "Real-time imaging and local elemental analysis of nanostructures in liquids," *Chemical Communications*, vol. 50, no. 70, pp. 10019–10022, 2014.
- [192] B. L. Gilmore, S. P. Showalter, M. J. Dukes, J. R. Tanner, A. C. Demmert, S. M. McDonald, and D. F. Kelly, "Visualizing viral assemblies in a nanoscale biosphere. lab on a chip," *Lab on a Chip*, vol. 13, no. 2, pp. 216–219, 2013.
- [193] D. Alloyeau, W. Dachraoui, Y. Javed, H. Belkahla, G. Wang, H. Lecoq, S. Ammar, O. Ersen, A. Wisnet, F. Gazeau, and C. Ricolleau, "Unravelling kinetic and thermodynamic effects on the growth of gold nanoplates by liquid transmission electron microscopy," *Nano Letters*, vol. 15, no. 4, pp. 2574–2581, 2015.
- [194] R. A. Freitas, *Nanomedicine, volume I : basic capabilities*. Landes Bioscience, 1999.
- [195] A. Dowling, R. Clift, N. Grobert, D. Hutton, R. Oliver, O. Oneill, and A. Seaton, "Nanoscience and nanotechnologies : opportunities and uncertainties," tech. rep., The Royal Society & The Royal Academy of Engineering, 2004.
- [196] R. Wang, P. S. Billone, and W. M. Mullett, "Nanomedicine in action : An overview of cancer nanomedicine on the market and in clinical trials," *Journal of Nanomaterials*, 2013.
- [197] S. M. Moghimi, A. C. Hunter, and J. C. Murray, "Nanomedicine : current status and future prospects," *FASEB Journal*, vol. 19, no. 3, pp. 311–330, 2005.
- [198] R. Tomellini, U. Faure, and O. Panzer, "Nanotechnology for health : vision paper and basis for a strategic research agenda for nanomedicine," *European Technology Platform on NanoMedicine*, 2005.
- [199] K. K. Jain, "Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics," *Clinica Chimica Acta*, vol. 358, pp. 37–54, 2005.
- [200] T. Kurkina and K. Balasubramanian, "Towards in vitro molecular diagnostics using nanostructures," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 69, no. 3, pp. 373–388, 2012.
- [201] M. A. Syed, "Advances in nanodiagnostic techniques for microbial agents," *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 51, pp. 391–400, 2014.
- [202] Y. Wang, G. Zhu, W. Qi, Y. Li, and Y. Song, "A versatile quantitation platform based on platinum nanoparticles incorporated volumetric bar-chart chip for highly sensitive assays," *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 85, pp. 777–784, 2016.

- [203] M. A. Lifson, M. O. Ozen, F. Inci, S. Wang, H. Inan, M. Baday, T. J. Henrich, and U. Demirci, "Advances in biosensing strategies for HIV detection, diagnosis, and therapeutic monitoring," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 103, pp. 90–104, 2016.
- [204] B. A. Rohrman and R. R. Richards-Kortum, "A paper and plastic device for performing recombinase polymerase amplification of HIV DNA," *Lab on a chip*, vol. 12, pp. 3082–3088, 2012.
- [205] H. Jang, C. Lee, G. E. Nam, B. Quan, H. J. Choi, J. S. Yoo, and Y. Piao, "In vivo magnetic resonance and fluorescence dual imaging of tumor sites by using dye-doped silica-coated iron oxide nanoparticles," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 18, no. 2, pp. 1–11, 2016.
- [206] R. H. Perera, H. Wu, P. Peiris, C. Hernandez, A. Burke, H. Zhang, and A. A. Exner, "Improving performance of nanoscale ultrasound contrast agents using N,N-diethylacrylamide stabilization," *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 13, no. 1, pp. 59–67, 2017.
- [207] A. M. Smith, S. Dave, S. Nie, and X. True, L. and Gao, "Multicolor quantum dots for molecular diagnostics of cancer," *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 6, no. 2, pp. 231–244, 2006.
- [208] C. Kirchner, T. Liedl, S. Kudera, T. Pellegrino, A. Munoz Javier, H. E. Gaub, S. Stolzle, N. Fertig, and W. J. Parak, "Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles," *Nano Letters*, vol. 5, no. 2, pp. 331–338, 2005.
- [209] D. Khang, J. Carpenter, Y. W. Chun, R. Pareta, and T. J. Webster, "Nanotechnology for regenerative medicine," *Biomedical Microdevices*, vol. 12, no. 4, pp. 575–587, 2010.
- [210] P. Arora, A. Sindhu, N. Dilbaghi, A. Chaudhury, G. Rajakumar, and A. A. Rahuman, "Nano-regenerative medicine towards clinical outcome of stem cell and tissue engineering in humans," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 16, no. 9, pp. 1991–2000, 2000.
- [211] M. P. Ferraz, F. J. Monteiro, and C. M. Manuel, "Hydroxyapatite nanoparticles : a review of preparation methodologies," *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, vol. 2, no. 2, pp. 74–80, 2004.
- [212] K. Marycz, M. Maredziak, J. Grzesiak, A. Lis, and A. Smieszek, "Biphasic polyurethane/polylactide sponges doped with nano-hydroxyapatite (nHAp) combined with human adipose-derived mesenchymal stromal stem cells for regenerative medicine applications," *Polymers*, vol. 8, no. 10, pp. 339–363, 2016.
- [213] J. Lu, M. P. Rao, N. C. MacDonald, D. Khang, and T. J. Webster, "Improved endothelial cell adhesion and proliferation on patterned titanium surfaces with rationally designed, micrometer to nanometer features," *Acta Biomaterialia*, vol. 4, no. 1, pp. 192–201, 2008.
- [214] R. Singh and J. W. Lillard, "Nanoparticle-based targeted drug delivery," *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 86, no. 3, pp. 215–223, 2009.
- [215] S. E. McNeil, "Nanoparticle therapeutics : a personal perspective," *Wiley Interdisciplinary Reviews : Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 1, no. 3, pp. 264–271, 2009.
- [216] E. Merisko-Liversidge and G. G. Liversidge, "Nanosizing for oral and parenteral drug delivery : a perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, no. 6, pp. 427–440, 2011.

Bibliographie

- [217] A. Bhargava, J. Cheung, M. M. Eshaghian, W. L. Wilner, K. Ravicz, M. Schlesinger, Y. Shah, and A. Uppal, *Wireless computing in medicine : from nano to cloud with ethical and legal implications*, ch. 10 - An introduction to nanomedicine, pp. 299–317. Wiley, 2016.
- [218] O. C. Farokhzad and R. Langer, “Nanomedicine : developing smarter therapeutic and diagnostic modalities,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 58, no. 14, pp. 1456–1459, 2006.
- [219] E. Y. Lukianova-Hleb and D. O. Lapotko, “Nano-theranostics with plasmonic nanobubbles,” *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 20, no. 3, pp. 163–174, 2014.
- [220] D. F. Williams, “On the mechanisms of biocompatibility,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 20, pp. 2941–2953, 2008.
- [221] B. Y. Kim, J. T. Rutka, and W. C. Chan, “Nanomedicine,” *New England Journal of Medicine*, vol. 363, no. 25, pp. 2434–2443, 2010.
- [222] X. Wen, S. Ding, H. Cai, J. Wang, L. Wen, F. Yang, and G. Chen, “Nanomedicine strategy for optimizing delivery to outer hair cells by surface-modified poly(lactic/glycolic acid) nanoparticles with hydrophilic molecules,” *International Journal of Nanomedicine*, vol. 11, pp. 5959–5969, 2016.
- [223] E. Engel, A. Michiardi, M. Navarro, D. Lacroix, and J. A. Planell, “Nanotechnology in regenerative medicine : the materials side,” *Trends in Biotechnology*, vol. 26, no. 1, pp. 39–47, 2008.
- [224] L. Hespel, *Nouveaux systèmes micellaires intelligents à partir d’huile de lin : synthèse, comportements physico-chimiques et encapsulation*. Thèse de doctorat, INSA Rouen, 2013.
- [225] P. R. Van Tassel, “Nanotechnology in medicine : nanofilm biomaterials,” *Yale Journal of Biology and Medicine*, vol. 86, no. 4, pp. 527–536, 2013.
- [226] A. N. Lukyanov, T. A. Elbayoumi, A. R. Chakilam, and V. P. Torchilin, “Tumor-targeted liposomes : doxorubicin-loaded long-circulating liposomes modified with anti-cancer antibody,” *Journal of Controlled Release*, vol. 100, no. 1, pp. 135–144, 2004.
- [227] F. M. Muggia, J. D. Hainsworth, S. Jeffers, P. Miller, S. Groshen, M. Tan, L. Roman, B. Uziely, L. Muderspach, F. A. Garcia, A. Burnett, A. Greco, C. P. Morrow, and L.-J. Paradiso, L. J. Liang, “Phase II study of liposomal doxorubicin in refractory ovarian cancer : antitumor activity and toxicity modification by liposomal encapsulation,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 15, no. 3, pp. 987–993, 1997.
- [228] M. L. Chen, “Lipid excipients and delivery systems for pharmaceutical development : a regulatory perspective,” *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60, no. 6, pp. 768–777, 2008.
- [229] M. Geetha, A. K. Singh, R. Asokamani, and A. K. Gogia, “Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - a review,” *Progress in Materials Science*, vol. 54, no. 3, pp. 397–425, 2009.
- [230] A. Liberman, N. Mendez, W. C. Trogler, and A. C. Kummel, “Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine,” *Surface Science Reports*, vol. 69, no. 2, pp. 132–158, 2014.

- [231] S. Pruneanu, M. Coroş, and F. Pogacean, *Handbook of nanoparticles*, ch. Bio-Functionalized Metallic Nanoparticles with Applications in Medicine, pp. 803–817. Springer International Publishing, 2015.
- [232] P. V. AshaRani, G. Low Kah Mun, M. P. Hande, and S. Valiyaveetil, “Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells,” *ACS Nano*, vol. 3, no. 2, pp. 279–290, 2008.
- [233] A. Nunes, K. Al-Jamal, T. Nakajima, M. Hariz, and K. Kostarelos, “Application of carbon nanotubes in neurology : clinical perspectives and toxicological risks,” *Archives of Toxicology*, vol. 86, no. 7, pp. 1009–1020, 2012.
- [234] A. Fabbro, M. Prato, and L. Ballerini, “Carbon nanotubes in neuroregeneration and repair,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 65, no. 15, pp. 2034–2044, 2013.
- [235] A. M. Schrand, S. A. C. Hens, and O. A. Shenderova, “Nanodiamond particles : properties and perspectives for bioapplications,” *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, vol. 34, no. 1-2, pp. 18–74, 2009.
- [236] X. Gao, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung, and S. Nie, “In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots,” *Nature Biotechnology*, vol. 22, no. 8, pp. 969–976, 2004.
- [237] M. Ramezanzpour, S. S. W. Leung, K. H. Delgado-Magnero, B. Y. M. Bashe, J. The-walt, and D. P. Tieleman, “Computational and experimental approaches for investigating nanoparticle-based drug delivery systems,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1858, no. 7, pp. 1688–1709, 2016.
- [238] H. P. Rang, J. M. Ritter, R. J. Flower, and G. Henderson, *Rang & Dale’s Pharmacology*, ch. 2 - How drugs act : general principles, pp. 6–21. Elsevier Churchill Livingstone, 2014.
- [239] R. T. Skeel, *Handbook of Cancer Chemotherapy*, ch. 1 - Basic principles and considerations of rational chemotherapy and molecular targeted therapy, pp. 1–68. Lippincott Williams and Wilkins, 2011.
- [240] A. Kumari, S. K. Yadav, and S. C. Yadav, “Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems,” *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, vol. 75, no. 1, pp. 1–18, 2010.
- [241] C. Vauthier and P. Couvreur, “Nanotechnologies pour la thérapeutique et le diagnostic,” *Techniques de l’Ingénieur*, vol. NM 4, no. 10, 2008.
- [242] V. P. Torchilin, *Nanoparticulates as drug carriers*, ch. Introduction - Nanocarriers for drug delivery : needs and requirements, pp. 1–8. Imperial College Press, 2006.
- [243] M. D. Howard, M. Jay, T. D. Dziubla, and X. Lu, “PEGylation of nanocarrier drug delivery systems : state of the art,” *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 4, no. 2, pp. 133–148, 2008.
- [244] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori, “Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics : a review,” *Journal of Controlled Release*, vol. 65, no. 1, pp. 271–284, 2000.
- [245] H. Li, X. Zhao, Y. Ma, G. Zhai, L. Li, and H. Lou, “Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles,” *Journal of Controlled Release*, vol. 133, no. 3, pp. 238–244, 2009.

Bibliographie

- [246] J. Fang, H. Nakamura, and H. Maeda, "The EPR effect : unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, no. 3, pp. 136–151, 2011.
- [247] F. Wang, G. M. Pauletti, J. Wang, J. Zhang, R. C. Ewing, Y. Wang, and D. Shi, "Dual surface-functionalized janus nanocomposites of polystyrene/Fe₃O₄@ SiO₂ for simultaneous tumor cell targeting and stimulus-induced drug release," *Advanced Materials*, vol. 25, no. 25, pp. 3485–3489, 2013.
- [248] T. Jiang, R. Mo, A. Bellotti, J. Zhou, and Z. Gu, "Gel liposome mediated co-delivery of anticancer membrane associated proteins and small-molecule drugs for enhanced therapeutic efficacy," *Advanced Functional Materials*, vol. 24, no. 16, pp. 2295–2304, 2014.
- [249] R. Mo, T. Jiang, and Z. Gu, "Enhanced anticancer efficacy by ATP-mediated liposomal drug delivery," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 53, no. 23, pp. 5815–5820, 2014.
- [250] A. Swami, J. Shi, S. Gadde, A. R. Votruba, N. Kolishetti, and O. C. Farokhzad, *Multi-functional nanoparticles for drug delivery applications : imaging, targeting and delivery*, ch. 2 - Nanoparticles for targeted and temporally controlled drug delivery, pp. 9–29. Springer US, 2012.
- [251] D. B. Vieira and L. F. Gamarra, "Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment," *Einstein*, vol. 14, no. 1, pp. 99–103, 2016.
- [252] P. Ghosh, G. Han, M. De, C. K. Kim, and V. M. Rotello, "Gold nanoparticles in delivery applications," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, no. 11, pp. 1307–1315, 2008.
- [253] C. Loo, A. Lowery, N. Halas, J. West, and R. Drezek, "Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy," *Nano Letters*, vol. 5, no. 4, pp. 709–711, 2005.
- [254] V. Bagalkot, L. Zhang, E. Levy-Nissenbaum, S. Jon, P. W. Kantoff, R. Langer, and O. C. Farokhzad, "Quantum dot-aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bi-fluorescence resonance energy transfer," *Nano Letters*, vol. 7, no. 10, pp. 3065–3070, 2007.
- [255] P. Zrazhevskiy, M. Sena, and X. Gao, "Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery," *Chemical Society Reviews*, vol. 39, no. 11, pp. 4326–4354, 2010.
- [256] A. Sharma and U. S. Sharma, "Liposomes in drug delivery : progress and limitations," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 154, no. 2, pp. 123–140, 1997.
- [257] R. H. Müller, K. Mäder, and S. Gohla, "Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 50, no. 1, pp. 161–177, 2000.
- [258] R. H. Müller, R. Shegokar, and C. M. Keck, "20 years of lipid nanoparticles (SLN & NLC) : present state of development & industrial applications," *Current Drug Discovery Technologies*, vol. 8, no. 3, pp. 207–227, 2011.
- [259] S. E. Samani, N. Amehdi, K. Basu, and J. M. Kinsella, "Multimodal theranostic polymersomes composed of hybrid inorganic nanoparticles," in *10th World Biomaterials Congress*, (Montreal Convention Center, 1001 Place Jean-Paul-Riopelle, Montréal, Canada), 2016.
- [260] J. S. Lee and J. Feijen, "Polymersomes for drug delivery : Design, formation and characterization," *Journal of Controlled Release*, vol. 161, no. 2, pp. 473–483, 2012.

- [261] F. Meng, Z. Zhong, and J. Feijen, "Stimuli-responsive polymersomes for programmed drug delivery," *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 2, pp. 197–209, 2009.
- [262] S. Svenson and D. A. Tomalia, "Dendrimers in biomedical applications - reflections on the field," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, pp. 102–115, 2012.
- [263] G. Birrenbach and P. P. Speiser, "Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 65, no. 12, pp. 1763–1766, 1976.
- [264] J. A. Champion, Y. K. Katare, and S. Mitragotri, "Particle shape : a new design parameter for micro-and nanoscale drug delivery carriers," *Journal of Controlled Release*, vol. 121, no. 1, pp. 3–9, 2007.
- [265] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, and R. Langer, "Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy," *Nature Nanotechnology*, vol. 2, no. 12, pp. 751–760, 2007.
- [266] J. Garcia-Amorós, S. Tang, Y. Zhang, E. R. Thapaliya, and F. M. Raymo, *Light-Responsive Nanostructured Systems for Applications in Nanomedicine*, ch. Self-Assembling Nanoparticles of Amphiphilic Polymers for In Vitro and In Vivo FRET Imaging., pp. 29–59. Springer, 2016.
- [267] P. M. Bummer, "Physical chemical considerations of lipid-based oral drug delivery - solid lipid nanoparticles," *Critical ReviewsTM in Therapeutic Drug Carrier Systems*, vol. 21, no. 1, 2004.
- [268] D. Patel, P. Roohi Kesharwani, and S. Gupta, "Development and screening approach for lipid nanoparticle : a review," *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, vol. 3, no. 6, pp. 1–7, 2015.
- [269] A. Wagner and K. Vorauer-Uhl, "Liposome technology for industrial purposes," *Journal of Drug Delivery*, vol. 2011, 2010.
- [270] A. Rahman, J. Treat, J. K. Roh, L. A. Potkul, W. G. Alvord, D. Forst, and P. V. Woolley, "A phase i clinical trial and pharmacokinetic evaluation of liposome-encapsulated doxorubicin," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 8, no. 6, pp. 1093–1100, 1990.
- [271] D. W. Northfelt, B. J. Dezube, J. A. Thommes, B. J. Miller, M. A. Fischl, A. Friedman-Kien, L. D. Kaplan, C. Du Mond, R. D. Mamelok, and D. H. Henry, "Pegylated-liposomal doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in the treatment of aids-related kaposi's sarcoma : results of a randomized phase iii clinical trial," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 16, no. 7, pp. 2445–2451, 1998.
- [272] X. Huang, R. Caddell, B. Yu, S. Xu, B. Theobald, L. J. Lee, and R. J. Lee, "Ultrasound-enhanced microfluidic synthesis of liposomes," *Anticancer Research*, vol. 30, no. 2, pp. 463–466, 2010.
- [273] A. Lorin, C. Flore, A. Thomas, and R. Brasseur, "Les liposomes : description, fabrication et applications," *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, vol. 8, no. 3, pp. 163–176, 2004.
- [274] B. Sjöström, A. Kaplun, Y. Talmon, and B. Cabane, "Structures of nanoparticles prepared from oil-in-water emulsions," *Pharmaceutical Research*, vol. 12, no. 1, pp. 39–48, 1995.
- [275] L. Battaglia and M. Gallarate, "Lipid nanoparticles : state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery," *Expert opinion on drug delivery*, vol. 9, no. 5, pp. 497–508, 2012.

- [276] W. Mehnert and K. Mader, "Solid lipid nanoparticles : production, characterization and applications," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 47, no. 2, pp. 165–196, 2001.
- [277] C. Olbrich, O. Kayser, and R. H. Müller, "Lipase degradation of Dynasan 114 and 116 solid lipid nanoparticles (SLN) - effect of surfactants, storage time and crystallinity," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 237, no. 1, pp. 119–128, 2002.
- [278] S. A. Wissing, O. Kayser, and R. H. Müller, "Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 56, no. 9, pp. 1257–1272, 2004.
- [279] V. Jenning and S. Gohla, "Comparison of wax and glyceride solid lipid nanoparticles (SLN[®])," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 196, no. 2, pp. 219–222, 2000.
- [280] M. Üner and G. Yener, "Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 2, no. 3, p. 289, 2007.
- [281] R. H. Müller, M. Radtke, and S. A. Wissing, "Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 242, no. 1, pp. 121–128, 2002.
- [282] C. Olbrich, A. Gessner, O. Kayser, and R. H. Müller, "Lipid-drug-conjugate (LDC) nanoparticles as novel carrier system for the hydrophilic antitrypanosomal drug diminazenediacetate," *Journal of Drug Targeting*, vol. 10, no. 5, pp. 387–396, 2002.
- [283] N. T. Huynh, C. Passirani, P. Saulnier, and J. P. Benoît, "Lipid nanocapsules : a new platform for nanomedicine," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 379, no. 2, pp. 201–209, 2009.
- [284] T. Delmas, *Caractérisation physicochimique et compréhension des propriétés de vectorisation des nanoparticules lipidiques pour les applications biomédicales*. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, 2011.
- [285] J. Mérian, *Développement et caractérisation in vivo de nanoparticules lipidiques biocompatibles au moyen des techniques d'imagerie de fluorescence et nucléaire*. Thèse de doctorat, Université René Descartes-Paris V, 2012.
- [286] T. Delmas, A. C. Couffin, P. A. Bayle, F. De Crecy, E. Neumann, F. Vinet, M. Bardet, J. Bibette, and I. Texier, "Preparation and characterization of highly stable lipid nanoparticles with amorphous core of tuneable viscosity," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 360, no. 2, pp. 471–481, 2011.
- [287] J. Gravier, F. P. Navarro, T. Delmas, F. Mittler, A. C. Couffin, F. Vinet, and I. Texier, "Lipidots : competitive organic alternative to quantum dots for in vivo fluorescence imaging," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 16, no. 9, 2011.
- [288] W. Sun, Q. Hu, W. Ji, G. Wright, and Z. Gu, "Leveraging physiology for precision drug delivery," *Physiological Reviews*, vol. 97, no. 1, pp. 189–225, 2017.
- [289] J. Zhang, R. M. Haas, and A. M. Leone, "Polydispersity characterization of lipid nanoparticles for siRNA delivery using multiple detection size-exclusion chromatography," *Analytical chemistry*, vol. 84, no. 14, pp. 6088–6096, 2012.
- [290] N. C. Santos, M. J. Prieto, A. Morna Gomes, D. Betbeder, and M. A. Castanho, "Structural characterization (shape and dimensions) and stability of polysaccharide/lipid nanoparticles," *Biopolymers : Original Research on Biomolecules*, vol. 41, no. 5, pp. 511–520, 1997.

- [291] K. Jores, W. Mehnert, M. Drechsler, H. Bunjes, C. Johann, and K. Mader, "Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy," *Journal of Controlled Release*, vol. 95, no. 2, pp. 217–227, 2004.
- [292] P. Iavicoli, P. Urbán, A. Bella, M. G. Ryadnov, F. Rossi, and L. Calzolari, "Application of asymmetric flow field-flow fractionation hyphenations for liposome - antimicrobial peptide interaction," *Journal of Chromatography A*, vol. 1422, pp. 260–269, 2015.
- [293] A. Zattoni, B. Roda, F. Borghi, V. Marassi, and P. Reschiglian, "Flow field-flow fractionation for the analysis of nanoparticles used in drug delivery," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 87, pp. 53–61, 2014.
- [294] V. Bello, G. Mattei, P. Mazzoldi, N. Vivenza, P. Gasco, J. M. Idee, C. Robic, and E. Borsella, "Transmission electron microscopy of lipid vesicles for drug delivery : comparison between positive and negative staining," *Microscopy and Microanalysis*, vol. 16, no. 4, pp. 456–461, 2010.
- [295] L. Vidlářová, J. Hanuš, M. Veselý, P. Ulbrich, F. Štěpánek, and J. Zbytovská, "Effect of lipid nanoparticle formulations on skin delivery of a lipophilic substance," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 108, pp. 289–296, 2016.
- [296] R. Crawford, B. Dogdas, E. Keough, R. M. Haas, W. Wepukhulu, S. Krotzer, P. A. Burke, L. Sepp Lorenzino, A. Bagchi, and B. J. Howell, "Analysis of lipid nanoparticles by cryo-EM for characterizing siRNA delivery vehicles," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 403, no. 1, pp. 237–244, 2010.
- [297] J. Kuntsche, J. C. Horst, and H. Bunjes, "Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 417, no. 1, pp. 120–137, 2011.
- [298] V. R. Matias, A. Al-Amoudi, J. Dubochet, and T. J. Beveridge, "Cryo-transmission electron microscopy of frozen-hydrated sections of escherichia coli and pseudomonas aeruginosa," *Journal of Bacteriology*, vol. 185, no. 20, pp. 6112–6118, 2003.
- [299] J. R. Harris, "Negative staining across holes : application to fibril and tubular structures," *Micron*, vol. 39, no. 2, pp. 168–176, 2008.
- [300] A. Cavalier, D. Spehner, and B. M. & Humbel, *Handbook of cryo-preparation methods for electron microscopy*. CRC press, 2008.
- [301] K. Ohshima, K. Kaneko, T. Fujita, and Z. Horita, "Determination of absolute thickness and mean free path of thin foil specimen by ζ -factor method," *Journal of electron microscopy*, 2004.
- [302] D. Danino, "Cryo-TEM of soft molecular assemblies," *Current opinion in colloid & interface science*, vol. 17, no. 6, pp. 316–329, 2012.
- [303] E. Nativ-Roth, O. Regev, and R. Yerushalmi-Rozen, "Shear-induced ordering of micellar arrays in the presence of single-walled carbon nanotubes," *Chemical Communications*, no. 17, pp. 2037–2039, 2008.
- [304] J. M. Stouffer and T. J. McCarthy, "Polymer monolayers prepared by the spontaneous adsorption of sulfur-functionalized polystyrene on gold surfaces," *Macromolecules*, vol. 21, no. 5, pp. 1204–1208, 1988.

Bibliographie

- [305] A. Stoppani and C. Milstein, "Specific protection of the thiol groups of aldehyde dehydrogenases by pyridine-nucleotide coenzymes," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 24, no. 3, p. 655, 1957.
- [306] Z. Ma, D. N. LeBard, S. M. Loverde, K. A. Sharp, M. L. Klein, D. E. Discher, and T. H. Finkel, "Tcr triggering by pmhc ligands tethered on surfaces via poly (ethylene glycol) depends on polymer length," *PloS one*, vol. 9, no. 11, pp. 1–10, 2014.
- [307] S. Ross, D. Spendlove, S. Bolliger, A. Christe, L. Oesterhelweg, S. Grabherr, M. J. Thali, and E. Gygax, "Postmortem whole-body ct angiography : evaluation of two contrast media solutions," *American Journal of Roentgenology*, vol. 190, no. 5, pp. 1380–1389, 2008.
- [308] M. Piffoux, N. Ahmad, J. Nelayah, C. Wilhelm, A. Silva, F. Gazeau, and D. Alloyeau, "Monitoring the dynamics of cell-derived extracellular vesicles at the nanoscale by liquid-cell transmission electron microscopy," *Nanoscale*, vol. 10, no. 3, pp. 1234–1244, 2018.
- [309] M. Gaumet, A. Vargas, R. Gurny, and F. Delie, "Nanoparticles for drug delivery : the need for precision in reporting particle size parameters," *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, vol. 69, no. 1, pp. 1–9, 2008.
- [310] L. Quirós Pseudo, A. Balahur, S. Gottardo, K. Rasmussen, G. Wagner, G. Joanny, and S. Bremer Hoffmann, "Mapping nanomedicine terminology in the regulatory landscape," techreport, European Commission, 2018.
- [311] V. Klang, N. B. Matsko, C. Valenta, and F. Hofer, "Electron microscopy of nanoemulsions : an essential tool for characterisation and stability assessment," *Micron*, vol. 43, no. 2, pp. 85–103, 2012.
- [312] E. Tomaszewska, K. Soliwoda, K. Kadziola, B. Tkacz-Szczesna, G. Celichowski, M. Cichomski, W. Szmaja, and J. Grobelny, "Detection limits of DLS and UV-vis spectroscopy in characterization of polydisperse nanoparticles colloids," *Journal of Nanomaterials*, vol. 2013, pp. 60–70, 2013.
- [313] S. Gioria, F. Caputo, P. Urbán, C. M. Maguire, S. Bremer Hoffmann, A. Prina-Mello, L. Calzolari, and D. Mehn, "Are existing standard methods suitable for the evaluation of nanomedicines : some case studies," *Nanomedicine*, vol. 13, no. 5, pp. 539–554, 2018.
- [314] A. Bootz, V. Vogel, D. Schubert, and J. Kreuter, "Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 57, no. 2, pp. 369–375, 2004.
- [315] A. Mishra, S. S. Imam, M. Aqil, A. Ahad, Y. Sultana, A. Meeduzzafar, and A. Ali, "Carvedilol nano lipid carriers : formulation, characterization and in-vivo evaluation," *Drug delivery*, vol. 23, no. 4, pp. 1486–1494, 2016.
- [316] A. C. Silva, E. González Mira, M. L. García, M. A. Egea, J. Fonseca, R. Silva, D. Santos, E. B. Souto, and D. Ferreira, "Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) : high pressure homogenization versus ultrasound," *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, vol. 86, no. 1, pp. 158–165, 2011.
- [317] B. Khameneh, V. Halimi, M. R. Jaafari, and S. Golmohammadzadeh, "Safranal-loaded solid lipid nanoparticles : evaluation of sunscreen and moisturizing potential for topical applications," *Iranian journal of basic medical sciences*, vol. 17, no. 11, pp. 58–63, 2015.

- [318] F. Caputo, A. Arnould, M. Bacia, W. Ling, E. Rustique, I. Texier, and A. C. Couffin, "Measuring particle size distribution by asymmetric flow field flow fractionation : a powerful method for the pre-clinical characterization of lipid-based nanoparticles," *En cours de soumission*, 2018.
- [319] A. Jacquart, M. K eramidas, J. Vollaire, R. Boisgard, G. Pottier, E. Rustique, F. Mittler, F. P. Navarro, J. Boutet, J. L. Coll, and I. Texier, "LipimageTM 815 : novel dye-loaded lipid nanoparticles for long-term and sensitive in vivo near-infrared fluorescence imaging," *Journal of biomedical optics*, vol. 18, no. 10, p. 101311, 2013.
- [320] T. Little, S. Lewis, and P. Lundquist, "Hidden liabilities, market risk and drivers of change in the cosmetics and personal care products industry.," *Beneath the Skin, Investor in Environmental Health Network*, pp. 1–38, 2007.
- [321] D. J. Mc Clements, "Nanoemulsions versus microemulsions : terminology, differences, and similarities," *Soft matter*, vol. 8, no. 6, pp. 1719–1729, 2012.
- [322] A. Ribier, J. T. Simonnet, and S. Legret, "Transparent nanoemulsion less than 100 nm based on fluid non-ionic amphiphilic lipids and use in cosmetic or in dermopharmaceuticals," 1998.
- [323] J. Storsberg, "Nanotechnology in cosmetics - the key to better performance?," *S OFW-Journal*, vol. 135, no. 9, pp. 48–53, 2009.
- [324] R. H. Müller, M. Radtke, and S. A. Wissing, "Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 54, pp. 131–155, 2002.
- [325] M. Rai, A. Yadav, and A. Gade, "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials," *Biotechnology Advances*, vol. 27, no. 1, pp. 76–83, 2009.
- [326] N. Serpone, D. Dondi, and A. Albini, "Inorganic and organic UV filters : Their role and efficacy in sunscreens and suncare products," *Inorganica Chimica Acta*, vol. 360, no. 3, pp. 794–802, 2007.
- [327] M. Lens, "Use of fullerenes in cosmetics," *Recent Patents on Biotechnology*, vol. 3, no. 2, pp. 118–123, 2009.
- [328] R. Beck, S. Guterres, and A. Pohlmann, eds., *Nanocosmetics and nanomedicines : new approaches for skin care*. Springer Science and Business Media, 2011.
- [329] Flamigel, "Structure et rôle de la peau," <https://flamigel.fr/anatomie-de-la-peau/>, 2018.
- [330] R. Danovaro, L. Bongiorno, C. Corinaldesi, D. Giovannelli, E. Damiani, P. Astolfi, L. Greci, and A. Pusceddu, "Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections," *Environmental health perspectives*, vol. 116, no. 4, pp. 441–447, 2008.
- [331] T. G. Smijs and S. Pavel, "Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens : focus on their safety and effectiveness," *Nanotechnology, Science and Applications*, vol. 4, pp. 95–112, 2011.
- [332] M. D. Newman, M. Stotland, and J. I. Ellis, "The safety of nanosized particles in titanium dioxide and zinc oxide based sunscreens," *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 61, no. 4, pp. 685–692, 2009.
- [333] A. O. Gamer, E. V. Leibold, and B. Van Ravenzwaay, "The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin," *Toxicology in vitro*, vol. 20, no. 3, pp. 301–307, 2006.

Bibliographie

- [334] C. Couteau, S. Alami, M. Guitton, E. Papis, and L. J. M. Coiffard, "Mineral filters in sunscreen products - comparison of the efficacy of zinc oxide and titanium dioxide by in vitro method," *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 63, no. 1, pp. 58–60, 2008.
- [335] V. Bolis, C. Busco, M. Ciarletta, C. Distasi, J. Erriquez, I. Fenoglio, S. Livraghi, and S. Morel, "Hydrophilic/hydrophobic features of tio2 nanoparticles as a function of crystal phase, surface area and coating, in relation to their potential toxicity in peripheral nervous system," *Journal of colloid and interface science*, vol. 369, no. 1, pp. 28–39, 2012.
- [336] B. N. Barman and M. H. Moon, *Field-flow fractionation handbook*, ch. 12 - Sample preparation and choice of carrier liquid in Field-Flow Fractionation, pp. 189–198. John Wiley & Sons, 2000.
- [337] J. P. Helsper, R. J. Peters, M. E. van Bommel, Z. E. H. Rivera, S. Wagner, F. von der Kammer, P. C. Tromp, T. Hofmann, and S. Weigel, "Physicochemical characterization of titanium dioxide pigments using various techniques for size determination and asymmetric flow field flow fractionation hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 408, no. 24, pp. 6679–6691, 2016.
- [338] G. J. Nohynek, "Nanoparticles and the skin - a health risk for the consumer?," tech. rep., L'Oréal, 2006.
- [339] E. O'Toole, *ETomo Tutorial for IMOD Version 4.9*. University of Colorado, Boulder, 2017.
- [340] A. Arnould, "Développement de la cryo-microscopie pour l'observation et l'identification de nanoparticules dans des milieux sensibles," Master's thesis, Grenoble-INP PHELMA - CEA, 2015.
- [341] P. européen, *Règlement (CE) No 1223/2009 du parlement européen et du conseil relatif aux produits cosmétiques*, journal officiel de l'union européenne ed., 2009.
- [342] I. de la Calle, M. Menta, M. Klein, B. Maxit, and F. Séby, "Towards routine analysis of tio2 (nano-) particle size in consumer products : Evaluation of potential techniques," *Spectrochimica Acta Part B : Atomic Spectroscopy*, vol. 147, pp. 28–42, 2018.
- [343] B. Bocca, E. Sabbioni, I. Micetić, A. Alimonti, and F. Petrucci, "Size and metal composition characterization of nano-and microparticles in tattoo inks by a combination of analytical techniques," *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, vol. 32, no. 3, pp. 616–628, 2017.
- [344] Q-Lab, *A Choice of Filters for Q-SUN Xenon Test Chambers*, technical bulletin lx-5060 ed.
- [345] Malvern, "Intensity - volume - number : which size is correct?," tech. rep., Malvern Instruments, 2017.
- [346] Malvern, "Dynamic light scattering : an introduction in 30 minutes," Tech. Rep. MRK656-01, Malvern Instruments, 2012.
- [347] D. Gilliland, N. Gibson, and U. Hempelmann, "Basic comparison of particle size distribution measurements of pigments and fillers using commonly available industrial methods," techreport, European Commission, 2014.

Résumé

L'utilisation massive des nanomatériaux pose de réels enjeux sanitaires et environnementaux. C'est pourquoi ils sont désormais soumis à une réglementation qui prévoit une traçabilité de ceux-ci depuis leur fabrication jusqu'à leur distribution et l'établissement d'une fiche d'identité de la substance (composition, taille, état d'agglomération, forme, etc.). Une routine de caractérisation de nanoparticules en suspension a ainsi été développée. La Microscopie Électronique en Transmission (TEM) a permis d'établir une majorité des paramètres de la fiche d'identité, en combinant à la fois imagerie et spectroscopie (analyses chimiques). La préparation, dont dépendra la qualité des observations, nécessite un développement pour chaque matériau analysé. Pour cela, trois techniques ont été mises au point : le dépôt en voie sèche qui permet une observation directe et simple, la cryogénie qui permet de fixer l'état de la suspension et l'*in-situ* liquide qui permet d'observer directement la suspension sans changement d'état. Les analyses TEM étant locales, une comparaison avec des techniques indirectes a été effectuée par Diffusion Statique (MALS) et Dynamique (DLS) de la Lumière avec et sans fractionnement par couplage flux-force (FFF). Deux matériaux modèles ont été choisis. Le premier est une nanoémulsion de lipides stabilisés par des surfactants, servant de vecteurs à des principes actifs. Une étude de vieillissement par interaction avec des protéines a été menée et de légères variations de taille ont été obtenues. Le second matériau sélectionné est une poudre de nanoparticules de dioxyde de titane, remises en suspension, utilisée dans les crèmes solaires en tant que filtres UV. Ces particules ont été observées avant et après passage en enceinte climatique afin d'observer les effets des rayons UV sur celles-ci. Ceci a confirmé la stabilité des particules. Les protocoles de caractérisation développés au cours de cette thèse peuvent ainsi servir de supports à l'étude d'autres nanoparticules en suspension.

Mots-clés : Nanoparticules, MET, DLS, MALS, cryogénie, coloration négative, *in-situ* liquide

Abstract

The extensive use of nanomaterials has raised awareness about health issues and their fate in the environment. That is why they are now subject to regulation that has imposed their traceability from their manufacturing to their distribution as the establishment of their characteristics (chemical composition, size, agglomeration state, shape ...). A characterization routine for nanoparticles in suspension was developed. Transmission Electron Microscopy (TEM) fulfills most of the criteria cited before by combining imaging and spectroscopy techniques. Three sample preparation methods were optimized to ensure high quality results : a dry process, rapid freezing to vitrify the sample and the use of an *in-situ* liquid TEM holder to prevent any preparation artefact (no phase change). To obtain quantitative analysis, a comparison were made between Dynamic Light Scattering (DLS), Multi-Angle Light Scattering (MALS), with and without a fractionation system (AF4), and TEM. To support this work, two nanomaterials were analyzed. The first one is a nanoemulsion composed of lipid nanoparticles stabilized by surfactants used as nanocarriers for drug delivery. Their stability after protein interaction was investigate and some size variations were observed. The second material is a powder composed of titanium dioxide nanoparticles used as UV filters in sunscreens. These nanoparticles were analyzed before and after interaction with UV radiation in a climatic chamber to confirm their stability. The different protocols developed in this PhD may be used for the analysis of other nanomaterials.

Keywords : Nanoparticles, TEM, DLS, MALS, cryo-TEM, negative staining, *in-situ* liquid