Elaboration de nanoparticules fonctionnelles : applications comme agents de contraste en IRM

Lionel Maurizi

▶ **To cite this version:**

Lionel Maurizi. Elaboration de nanoparticules fonctionnelles : applications comme agents de contraste en IRM. Chimie. Université de Bourgogne, 2010. Français. NNT : 2010DIJOS062 . tel-02163222v2

HAL Id: tel-02163222

https://theses.hal.science/tel-02163222v2

Submitted on 5 Jan 2012

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

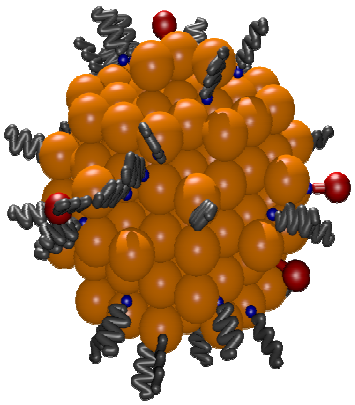
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

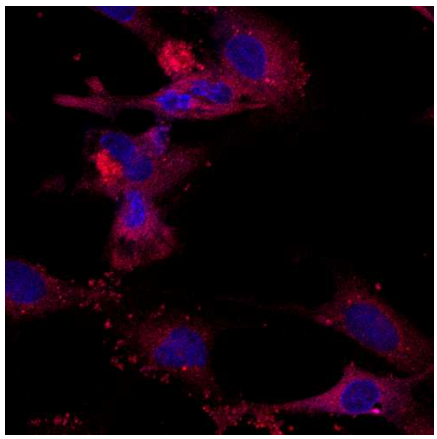
UNIVERSITE DE BOURGOGNE
Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne
UMR 5209 Université de Bourgogne/CNRS
UFR Sciences et Techniques
Ecole Doctorale Carnot

THÈSE
Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline Sciences spécialité Chimie-Physique

par Lionel Maurizi

Elaboration de nanoparticules fonctionnelles : applications comme agents de contraste en IRM





Soutenue le 3 décembre 2010, devant la commission d'examen :

M. G. BERTRAND	Professeur à l'Université de Bourgogne	*Président*
M. I. CHOURPA	Professeur à l'Université François-Rabelais (Tours)	*Rapporteur*
M. H. HOFMANN	Professeur à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne	*Rapporteur*
Mme F. GAZEAU	Directrice de Recherches au Laboratoire MSC de l'Université Paris 7	*Examinatrice*
M. S. ROUX	Professeur à l'Université de Franche-Comté	*Examinateur*
M. D. VANDROUX	DG NVH Medicinal	*Examinateur*
M. P. WALKER	Maître de Conférences Praticien Hospitalier à l'Université de Bourgogne	*Examinateur*
M. F. BOUYER	Maître de Conférences à l'Université de Bourgogne	*Co-encadrant de thèse*
Mme N. MILLOT	Professeur à l'Université de Bourgogne	*Directrice de thèse*

Remerciements

Trois années de thèse peuvent sembler être une épreuve difficilement surmontable dans l'imaginaire collectif mais en étant bien entouré, comme ce fut mon cas, cette période m'a paru trop courte tant les interactions avec de nombreux collègues que je peux aujourd'hui appeler des « amis » furent riches.

Comme la tradition l'exige, et parce que ce sera sans doute une des parties de ce manuscrit la plus plaisante à lire et également à rédiger, je tiens donc à remercier toutes les personnes qui m'ont apporté leur appui et leur soutien durant mon passage en Bourgogne.

En premier lieu, que Monsieur le Professeur Gilles Bertrand, Directeur du Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne trouve ici l'expression de ma gratitude pour m'avoir, tout d'abord, accueilli au sein du laboratoire mais également pour avoir su trouver un financement pour notre projet de recherche quand celui-ci semblait des plus compromis. Je le remercie également d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je tiens à remercier également les membres de mon jury de thèse qui n'ont pas hésité à braver les intempéries pour assister à ma soutenance.

Je suis, en premier lieu, très reconnaissant à Monsieur le Professeur Igor Chourpa de l'Université François Rabelais de Tours pour avoir rapporté mon travail et pour ses judicieux conseils.

J'adresse également mes plus sincères remerciements à Monsieur le Professeur Heinrich Hofmann de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne pour avoir accepté de juger mon travail en qualité de rapporteur mais aussi pour avoir su patienter quand mon manuscrit était retenu par quelques problèmes logistiques bien français.

Je remercie également très sincèrement Madame Florence Gazeau, Directrice de Recherches au Laboratoire MSC de l'Université de Paris 7 pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Mes plus sincères remerciements vont également à Monsieur le Professeur Stéphane Roux de l'Université de Franche-Comté pour avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Je tenais à adresser mes plus sincères remerciements à Monsieur Frédéric Bernard, Professeur de l'Université de Bourgogne pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe Matériaux Nanostructurés Phénomènes à l'Interface (MaNaPI). Je le remercie pour son aide, toujours disponible malgré ses nombreuses obligations, et pour nous avoir permis de mener à bien ce travail sans limite.

Ce travail de thèse n'aurait, bien sûr, pas pu aboutir sans l'aide précieuse de mes deux encadrants de thèse. Décrire en seulement quelques lignes ce qu'ils m'ont apporté n'est pas chose aisée. J'ai eu la chance de pouvoir puiser dans leurs différentes compétences et ainsi m'améliorer chaque jour.

Merci donc à Monsieur Frédéric Bouyer, Maître de Conférences de l'Université de Bourgogne pour nos longues discussions et ton esprit toujours critique qui faisait qu'un résultat obtenu était toujours un résultat sûr. Merci aussi pour tes conseils de toutes heures sur, entre autres, les problèmes d'interactions physico-chimiques avec le vivant qui sont apparus durant notre étude.

Merci également à Madame la Professeur Nadine Millot de l'Université de Bourgogne pour, tout d'abord, m'avoir fait confiance à travers ce projet. Tu as su me laisser une grande autonomie tout en me donnant un appui sans borne pour mener à terme cette étude. Merci aussi pour ton optimisme quotidien qui me permet aujourd'hui d'être fier de nos résultats.

Merci à vous deux pour avoir encadré mon travail tous les jours, à toutes heures et de m'avoir laissé m'épanouir et découvrir la recherche dans les nombreuses conférences où vous avez accepté de m'envoyer ou avec les nombreuses relations que vous m'avez présentées.

Je tenais à remercier toute l'équipe de NVH Medicinal pour m'avoir accueilli dans leurs locaux pour tous les essais biologiques. Je souhaiterais remercier particulièrement les docteurs Madame Laure Dumont et Monsieur David Vandroux pour leurs aides et leurs conseils sans faille. Merci de m'avoir initié à cette science complexe qu'est la biologie sans jamais vous décourager devant nos interrogations et les problèmes rencontrés. Merci également à David Vandroux d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci à Monsieur Paul Walker, Maître de Conférences de l'Université de Bourgogne pour, en premier lieu, avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Je tenais également à te remercier pour tous les conseils que tu m'as prodigués lors de nos séances matinales ou tardives en IRM. J'en profite également pour remercier tout le service imagerie du CHU de Dijon et plus particulièrement le Professeur François Brunotte.

Moreover I am very grateful to you : Dr. Harender Bisht. You teached me everything you know regarding organic chemistry for nanoparticles surface modification with a lot of fun and patience. You were like a brother for me and I was very happy to meet you and to visit your marvelous country. Thank you for all.

Merci aux membres de l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne et de l'Ecole Supérieure de Recherche en Matériaux pour leurs compétences indispensables dans la caractérisation, particulièrement organique, et pour m'avoir permis d'utiliser leurs outils d'analyses.

Merci également aux membres du service analyses, au centre de ressources mécaniques et au service informatique et électronique du laboratoire ICB pour leurs aides tant techniques qu'humaines qu'ils m'ont apportées lors de cette étude. Je tenais à remercier plus particulièrement Monsieur Stéphane Maître pour sa bonne humeur et sa patience… Merci également à Messieurs Rémi Chassagnon, Nicolas Geoffroy et Olivier Heintz pour leurs disponibilités sans faille et pour les bons moments passés ensemble.

En parallèle de mon travail de thèse, je tenais à remercier les IUT de Mesures Physiques du Creusot et le Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires d'Agrosup Dijon pour m'avoir accueilli comme enseignant durant ces trois années. Je souhaiterais particulièrement remercier Mesdames Patricia Colinot et Laurence Pottier, Maître de Conférences de l'Université de Bourgogne pour leurs aides lors de mes enseignements et les conseils qu'elles m'ont prodigués et qui m'ont permis d'améliorer mon approche pédagogique.

Enfin, après ces remerciements pour les côtés plus scientifiques de mon travail, je tenais à remercier toute l'équipe MaNaPI pour la bonne humeur et les bons moments que j'ai passés avec vous.

Merci en premier lieu à tous les permanents de l'équipe pour leurs patiences et les bons instants lors de pauses que l'on s'accordait. Je remercie donc Daniel Aymes pour ses conseils supercritiques, Olivier Bidault, Jean Claude Nièpce de toujours s'inquiéter du devenir de ses « bébés thésards », Nicole Rouget et Elisabeth Sciora. Des mercis un peu plus particuliers sont tournés vers Florence Baras pour ses petites blagues belges, Frédéric Demoisson pour ses superbes voitures, Isabelle Gallet pour le courage qu'elle a eu de (re)prendre tout l'aspect sécurité du labo (dont le LCP), Sophie Le Gallet pour son empathie et sa patience maintes et maintes fois éprouvée, Cécéline Riffault pour son aide administrative indispensable en fin de thèse et Lucien Saviot pour m'avoir accueilli dans son bureau pendant quelques temps et surtout pour être un peu comme moi ;-).

Merci à tous les doctorants croisés devenus (ou allant devenir) grands ou les jeunes docteurs qui ont croisé ma route. Merci aux docteurs Julien Boudon pour sa gentillesse et ses conseils helvétiques, à Antoine Leybros pour être là, à Julien PanPansiot pour sa bonne humeur et bon courage pour tes nouvelles responsabilités, et un petit merci particulier à Sébastien Paris qui m'avait encadré alors que je n'étais qu'un « bébé bachelier » et qui, à l'époque, faisait déjà preuve d'un grand altruisme et qui m'avait donné envie de plonger dans le bain.

Merci aux jeunes doctorants qui vont découvrir les « joies » de la thèse. Merci à Jérémy Paris pour ton aide lors de ma dernière ligne droite et pour tes conseils culinaires asiatiques, à Romain Piolet pour ta serviabilité et tes gâteaux (sans banane la prochaine fois) et à Mathieu Varache pour ta ponctualité légendaire.

Merci à tous ceux qui ont partagé notre bureau.
Merci à Roy Roukos pour tes questions toujours pertinentes.
Merci à Moustapha Ariane pour nos longues discussions « scientifiques » et mangastiques, n'oublie surtout pas de regarder la page.
Merci à Jean-Philippe Goudon pour ton soutien en tant que conscrit de la thèse. Finalement c'est nous les docteurs maintenant ! Ne change rien mais soit moins tactile…
Merci à Cédric Morin pour les nombreux moments partagés. Désolé pour les nombreux Régis qui exercent encore mais merci pour m'avoir accueilli et supporté lors de nombreuses journées et soirées partagées.
Merci à Foad Naimi pour ton accueil lors de mon arrivée à MaNaPI. Merci pour nos soirées relativement mémorables, pour les petits Mac Do à Marsannay, pour les raclettes d'avant Noël, pour les couscous (ah non je les ai pas eu ceux là) et enfin merci pour mes dix kilos de plus…

Enfin merci aux trois filles de MaNaPI qu'on aurait pu appeler il y a quelques années « les fouines ».
Merci à ma petite louloute Vanessa Bellat pour ta gentillesse, ta loyauté et nos nombreuses soirées et rendez-vous gourmands à Mac Do. Merci de m'avoir trimbalé dans ta « voiture » (paix à son âme), de m'avoir remonté le moral de temps en temps et pour nos looongues discussions dans le bureau ou ailleurs… Merci également pour ton vocabulaire très soutenu et toujours à propos.
Merci à Luludivine Minier, membre officiel du trouple pour nos trois années partagées sans relâche. Merci pour notre magnifique voyage dans les terres d'Harender, pour ton écoute attentive de tous les instants et pour nos soirées à dormir sur le canapé (ah ça c'est pas moi). Merci enfin pour m'avoir initié au foie gras…
Merci à Anne-Laure Papa (ALP pour les amis) pour me secouer quand je le mérite et pour notre projet professionnel que nous mènerons, j'espère, ensemble. Merci pour nos longs débats philosophiques, scientifiques et tardifs quand certaine dormait sur le canapé. Merci enfin pour m'avoir initié au Champagne…
Merci à vous deux pour votre relecture des derniers instants et votre soutien qui m'a réconforté quand il le fallait. Je serai toujours là pour vous comme l'avez toujours été pour moi.

Merci aussi à toute la Degling Team pour les soirées et les weekends passés ensemble. Les MarioKart et les Time's up remplis de « bonne foie » et de « mérité » résonnent encore dans ma tête.

Pour terminer ces remerciements, merci à toute ma famille pour leur soutien quotidien.
Merci à mes parents pour leur aide, notamment le jour de ma soutenance. Merci à mon frère Quentin et à ma sœur Isabelle pour leurs appuis.
Merci à mes beaux parents qui le sont réellement devenus durant ma thèse pour leurs encouragements et leur écoute. Merci à Céline et Stéphane mes beaux frère et sœur pour les bons moments passés permettant de décompresser et merci à Fabien et Chloé pour leurs bonnes humeurs réconfortantes.
Merci également à la famille Popiel pour leurs petits mots d'encouragements distillés au court de ces trois années.
Enfin, merci à toi Carole ma copine devenue mon épouse durant cette étude. Tu m'as inculqué ta passion de la recherche en biologie et tu as su me corriger quand je partais sur une fausse piste. Merci pour ta patience et pour ton soutien inaltérable. Nous en sommes finalement venus à bout et c'est grâce à toi !

Et enfin, parce que l'addition vient toujours à la fin, je tenais à remercier très sincèrement le CNRS et le Conseil Régional de Bourgogne d'avoir financé cette thèse nous permettant de mener à bien ce projet.

Sommaire

INTRODUCTION **1**

CHAPITRE I CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE DE L'ETUDE **5**

I.1 GENERALITES SUR LES NANOPARTICULES EN BIOLOGIE **5**

I.1.1 L'IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE (IRM) 5

I.1.2 SEPARATION DE MATERIEL BIOLOGIQUE A L'AIDE DE NANOPARTICULES D'OXYDE DE FER 5

I.1.3 CIBLAGE SPECIFIQUE DE PATHOLOGIES 6

I.1.4 L'HYPERTHERMIE 9

I.2 L'IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE **10**

I.2.1 LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE 10

I.2.1.1 Principe (Doyon et al. 2004) *10*
I.2.1.2 Les temps de relaxation *12*

I.2.2 LE CONTRASTE INTRINSEQUE EN IRM 12

I.2.2.1 Les facteurs influençant le contraste en IRM *12*
I.2.2.2 Les séquences d'acquisition en IRM *13*

I.2.3 LES AGENTS DE CONTRASTE 14

I.2.3.1 Les agents paramagnétiques (effet T_1) *14*
I.2.3.2 Les agents superparamagnétiques (effet T_2) *16*

I.3 LES INTERACTIONS DES (U)SPIO AVEC LE VIVANT : DE LA BIODISTRIBUTION A LA DETECTION SPECIFIQUE **19**

I.3.1 LA BIODISTRIBUTION DES NANOPARTICULES D'OXYDE DE FER : CAS DU CIBLAGE PASSIF 19

I.3.2 LES NOUVEAUX AGENTS DE CONTRASTE : VERS UN CIBLAGE SPECIFIQUE 20

I.3.2.1 Ciblage par imagerie moléculaire *20*
I.3.2.2 Ciblage par cellules circulantes marquées par des agents de contraste *21*

I.3.3 OBJECTIFS DE L'ETUDE 22

CHAPITRE II NANOPARTICULES D'OXYDES DE FER : SYNTHESES, MODIFICATIONS DE SURFACE ET FONCTIONNALISATIONS **23**

II.1 SYNTHESES D'OXYDES DE FER NANOSTRUCTURES **23**

II.1.1 GENERALITES SUR LES OXYDES DE FER 23

II.1.1.1 Mécanismes de formation *23*
II.1.1.2 Les oxydes de fer *25*

II.1.2 SYNTHESE BATCH DE NANOPARTICULES D'OXYDE DE FER DE STRUCTURE SPINELLE 27

II.1.2.1 Différentes méthodes de synthèse de ferrofluides *27*
II.1.2.2 Nos synthèses de ferrofluide *27*
II.1.2.3 Stabilité des nanoparticules de magnétite *39*

II.1.3 CONCLUSION SUR LES NANOPARTICULES SYNTHETISEES 47

II.2 MODIFICATION DE SURFACE ET FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES 48

II.2.1 STABILISATIONS ELECTROSTATIQUES DES OXYDES DE FER 48

II.2.1.1 Stabilisation par l'acide citrique (AC) 49
II.2.1.2 Stabilisation par l'acide 2,3-dimercapto-succinique (DMSA) 62
II.2.1.3 Conclusions sur les stabilisations électrostatiques 70

II.2.2 STABILISATION STERIQUE DES OXYDES DE FER PAR DES POLYETHYLENES GLYCOLS SILANISES (PEG-SI) 70

II.2.2.1 Les alkoxysilanes 70
II.2.2.2 Stabilisation des nanoparticules par des PEG silanisés 72
II.2.2.3 Conclusion générale sur la modification de surface par le mPEG-Si 84

II.2.3 FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES DE MAGNETITE 85

II.2.3.1 Fonctionnalisation par de la rhodamine silanisée 86
II.2.3.2 La combinaison PEG-DMSA, un outil pour la post-fonctionnalisation 92

II.2.4 CONCLUSION SUR LES MODIFICATIONS DE SURFACE 102

II.3 UNE NOUVELLE APPROCHE DE SYNTHESE ET DE MODIFICATION DE SURFACE : UN PROCEDE DE SYNTHESE HYDROTHERMALE EN CONTINU 105

II.3.1 POURQUOI SYNTHETISER EN CONTINU ET EN MILIEU EAU SUPERCRITIQUE ? 105

II.3.1.1 Le domaine supercritique de l'eau 105
II.3.1.2 Avantages attendus d'une synthèse en continu et en milieu eau supercritique 106

II.3.2 LE DISPOSITIF DE SYNTHESE HYDROTHERMALE EN CONTINU 107

II.3.2.1 Quelques synthèses d'oxyde de fer en continu et/ou en domaine supercritique : approche bibliographique 107
II.3.2.2 Description du dispositif de cette étude 107
II.3.2.3 Objectifs attendus pour des synthèses avec le procédé hydrothermal en continu et en milieu supercritique 109

II.3.3 SYNTHESE DE MAGNETITE EN MILIEU HYDROTHERMAL CONTINU 110

II.3.3.1 Synthèse de nanoparticules de magnétite nues 110
II.3.3.2 Synthèses de nanoparticules citratées 112
II.3.3.3 Premiers essais de greffage de PEG en continu 116
II.3.3.4 Conclusions générales sur la synthèse hydrothermale en continue 121

II.3.4 SYNTHESE DE MAGNETITE EN MILIEU SUPERCRITIQUE 122

II.3.4.1 Synthèses en conditions supercritiques en présence de base : influence du ratio fer (II) et fer (III) .. 122
II.3.4.2 Synthèses en conditions supercritiques en absence de base : influence du ratio fer (II), fer (III) et des citrates 125

II.3.5 CONCLUSION SUR LES SYNTHESES HYDROTHERMALES EN CONTINU 129

II.4 CONCLUSION GENERALE SUR LA SYNTHESE, LA MODIFICATION DE SURFACE ET LA FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES 131

CHAPITRE III CYTOTOXICITE, INTERNALISATION ET EFFICACITE EN TANT QU'AGENTS DE CONTRASTE EN IRM DES NANOPARTICULES D'OXYDE DE FER SUPERPARAMAGNETIQUES (USPIO) 134

III.1 LA CYTOTOXICITE DES NANOPARTICULES SYNTHETISEES 135

III.1.1 LES MODELES CELLULAIRES ETUDIES 135

III.1.1.1 Les macrophages RAW (TIB-71) 135
III.1.1.2 Les cellules hépatiques HePG2 (HP-8065) 137
III.1.1.3 Les cardiomyocytes 137

III.1.1.4 Conclusion sur les modèles cellulaires étudiés *138*
III.1.2 COMPARAISON AVEC UN AGENT COMMERCIAL : LE CLIAVIST® 138
III.1.3 LA MESURE DE LA VIABILITE CELLULAIRE (LE TEST MTT) 139
III.1.3.1 Principe du test MTT et conditions opératoires *140*
III.1.3.2 Etude de la cytotoxicité induite par les oxydes de fer seuls et les polymères seuls *140*
III.1.3.3 Etude de la cytotoxicité induite par les oxydes de fer modifiés par du PEG et/ou du DMSA *145*
III.1.3.4 Conclusions sur la toxicité des USPIO *148*
III.1.4 OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE DES USPIO INCUBES DANS LES TROIS TYPES CELLULAIRES DE L'ETUDE 148
III.1.4.1 Détection des USPIO dans des cellules en microscopie optique par révélation au bleu de Prusse .. *148*
III.1.4.2 Détection des USPIO dans des cellules en microscopie électronique en transmission *151*
III.1.4.3 Détection de l'internalisation d'USPIO par les cardiomyocytes grâce à un fluorophore *154*
III.1.4.4 Conclusion sur la présence d'USPIO dans les cellules *156*
III.1.5 CONCLUSIONS SUR LA TOXICITE DES NANOPARTICULES D'OXYDE DE FER SYNTHETISEES 156
III.2 LES USPIO COMME AGENTS DE CONTRASTE EN IRM 158
III.2.1 MESURES MAGNETIQUES SUR POUDRES ET SUR GELS 158
III.2.1.1 Hystérésimétrie *158*
III.2.1.2 Mesures magnétiques sur gel *159*
III.2.2 LES MESURES IRM IN VIVO CHEZ LA SOURIS 166
III.2.2.1 Conditions opératoires des mesures IRM chez la souris *166*
III.2.2.2 Mesures des contrastes IRM obtenus chez les souris *168*
III.2.2.3 La biodistribution du fer dans les organes *173*
III.2.2.4 Conclusion sur l'imagerie in vivo *178*
III.3 CONCLUSION GENERALE SUR LES ESSAIS BIOLOGIQUES 178
CONCLUSION GENERALE 179
PERSPECTIVES DE CE TRAVAIL 183
ANNEXES 187
A.1. Récapitulatif des techniques utilisées *187*
A.2. Informations obtenues par diffraction des rayons X *188*
A.3. Bilan sur les notions de grains et de taille de grains *192*
A.4. Analyses XPS des nanoparticules *195*
A.5. Estimation du nombre de rhodamine par unité de surface en UV-Visible *211*
A.6. Calcul de la proportion d'hématite et de magnétite dans un diffractogramme possédant les deux phases *213*
A.7. Mesure de la fonction mitochondriale par le MTT *214*
A.8. Protocole de préparation d'échantillons pour Microscopie Electronique en Transmission (Suspensions bactériennes, levures ou cellulaires) *215*
A.9. Les mesures magnétiques *216*
A.10. Valorisations des travaux de thèse *217*
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 219

Liste des abréviations

APTES	(3-AminoPropyl)TriEthoxy-Silane
ATG	Analyse ThermoGravimétrique
BET	Brunauer Emmett Teller
citraté	modifié en surface par des citrates
CM	Cardiomyocytes
DBTL	DiButyl Tin diLaurate
DLS	Dynamic Light Scattering
DMSA	DiMercapto-Succinic Acid
HePG2	Cellules hépatiques
ICP	Inductively Coupled Plasma
ICPTES	(3-IsoCyanatoPropyl)TriEthoxy-Silane
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
MET	Microscope Electronique en Transmission
$mPEG_x$	méthoxy-PEG de longueur de chaîne x
$mPEG_x$-Si	méthoxy-PEG de longueur de chaîne x greffé à une fonction silane
NP	Nanoparticules d'oxyde de fer
$NP_{0,5RITC}$	Nanoparticules d'oxyde de fer greffées par du $mPEG_{2000}$-Si et fonctionalisées par 0,5 µmole de RITC-Si
NP_{5RITC}	Nanoparticules d'oxyde de fer greffées par du $mPEG_{2000}$-Si et fonctionalisées par 5 µmoles de RITC-Si
NP_{acide}	Nanoparticules d'oxyde de fer greffées par du $mPEG_x$-Si et du DMSA lavées par décantation à pH acide
NP_{acide}-TMRM	Nanoparticules d'oxyde de fer greffées par du mPEGx-Si et du DMSA lavées par décantation à pH acide et fonctionalisées par du TMRM
$NP_{dialyse}$	Nanoparticules d'oxyde de fer greffées par du $mPEG_x$-Si et du DMSA lavées par dialyse
NP_{DMSA}-TMRM	Nanoparticules d'oxyde de fer greffées par du DMSA et fonctionalisées par du TMRM
NP-$mPEG_x$	Nanoparticules d'oxyde de fer greffées par du $mPEG_x$-Si
NP-$mPEG_x$ + DMSA	Nanoparticules d'oxyde de fer greffées par du $mPEG_x$-Si et du DMSA
PCS	Photon Correlation Spectroscopy
PEG	PolyEthylène Glycol
pegylé	modifié en surface par du mPEG-Si
PIE	Point isoélectrique
RAW	Cellules macrophages
RITC	Rhodamine IsoThioCyanate
RITC-Si	Rhodamine IsoThioCyanate greffée à une fonction silane
THF	TetraHydroFuran
TMRM	Rhodamine avec une fonction maléimide
USPIO	Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide
USPIO-$mPEG_x$	Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide greffés par du $mPEG_x$-Si
USPIO-$mPEG_{2000}$ + DMSA	Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide greffés par du $mPEG_{2000}$-Si et du DMSA
XPS	Spectrocopie de Photoélectrons X

« La chimie est à la biologie ce que le solfège est à la musique »

Professeur Pierre Potier

Directeur de l'institut des substances naturelles et Professeur au Muséum national d'histoire naturelle
Membre de l'Académie des Sciences, de l'Académie nationale de Pharmacie, de l'Académie nationale de chirurgie dentaire et de l'Academia Europa.

Introduction

Contexte de l'étude

Les nanoparticules sont des objets dont la taille est normalement comprise entre 1 et 10 nm. Il est cependant plus souvent admis que, pour parler de nanomatériau, au moins une de ses dimensions doit être inférieure à 100 nm (Huber 2005). Ce domaine de taille confère aux objets des propriétés spécifiques qu'ils ne possèdent pas dans le domaine micrométrique. A ces très faibles tailles, par exemple, le rapport surface sur volume augmente quand la taille de la particule diminue permettant une meilleure réactivité de ces nano-objets (Millot 2005).

Il existe aujourd'hui des nanoparticules de compositions variées. Parmi elles, notre étude s'est intéressée aux **oxydes de fer**. Leurs faibles tailles leurs confèrent des propriétés intéressantes, notamment **magnétiques** (Wang *et al.* 2001), les rendant utilisables dans de nombreuses applications. Ainsi, dans le domaine nanométrique, certaines structures d'oxyde de fer comme la magnétite (Fe_3O_4) ou la maghémite (γ-Fe_2O_3) possèdent des propriétés **superparamagnétiques**. Dans cet état, l'aimantation peut se renverser spontanément sous l'effet de la température. Un champ extérieur peut facilement aimanter ces nanoparticules mais elles perdent cette aimantation une fois le champ extérieur arrêté. Sans être exhaustif, ces matériaux peuvent servir de catalyseur (Van der Laan *et al.* 1999) ou entrer dans la fabrication de disques de stockages magnétiques en les assemblant en films (Lim *et al.* 2004).

Un nouveau champ applicatif des oxydes de fer s'est développé il y a une vingtaine d'années : les **applications biomédicales** (Halbreich *et al.* 1998). La possibilité de contrôler les tailles de ces nano-objets ainsi que de modifier leur surface (fonctionnalisation) peuvent les rendre utilisables dans ce domaine. De plus, leur utilisation à faible dose dans l'organisme induit peu de toxicité, le fer étant déjà présent dans l'organisme (Godin *et al.* 2010).
Parmi les nombreuses applications possibles, les propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer permettent de les utiliser comme **agents de contraste en IRM** (Imagerie par Résonance Magnétique) (Jung 1995; Sun *et al.* 2008). Une fois injectés, ils vont se distribuer dans l'organisme et générer un contraste en IRM dans les zones où ils sont localisés.
Cependant, d'autres caractéristiques de ces oxydes de fer empêchent leur utilisation telle quelle en biologie. En effet, une modification de surface préalable de ces nano-objets par des molécules biocompatibles est nécessaire pour éviter leur agglomération et leur sédimentation en conditions physiologiques (Gupta *et al.* 2004). Le type de molécule utilisé peut permettre de contrôler la taille ou la biodistribution des nano-objets à base d'oxyde de fer (Mornet *et al.* 2004).

Il est également possible de diriger ces nanoparticules vers des organes ou des pathologies spécifiques en leur greffant des molécules, des anticorps ou des principes actifs permettant également, dans ce dernier cas, de traiter une maladie.

A Dijon, un consortium sur l'imagerie médicale s'est mis en place en 2007 : Pharmimage®[1]. Dans ce contexte, une des thématiques de ce projet, axée sur le développement des applications biomédicales des nanoparticules, a généré des échanges entre le laboratoire

[1] Pharmimage® est un projet transversal et multidisciplinaire axé sur l'utilisation, la mise au point de traceurs et la détermination de biomarqueurs capables de permettre le suivi de l'efficacité des traitements et la sélection de molécules actives : http://www.pharmimage.fr/ (consulté en septembre 2010)

Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB) plus particulièrement l'équipe MaNaPI (Matériaux Nanostructurés Phénomènes à l'Interface : mon équipe d'accueil), le LE2I (Laboratoire Electronique, Informatique et Image) et la société NVH Medicinal, société de biotechnologie spécialisée dans le développement de produits à base de protéines recombinantes ciblant certaines pathologies cardiovasculaires. C'est cette collaboration qui a initié mon travail de thèse fin 2007. L'objectif de cette thématique est de travailler sur l'élaboration de nanoparticules d'oxydes de fer pour les utiliser comme agents de contraste en IRM avec comme second objectif de détecter plus spécifiquement certains processus biologiques à l'origine des pathologies cardiovasculaires. Fort de plus de 30 ans d'expérience de l'équipe MaNaPI sur les ferrites nanostructurées (Gillot 1994; Perriat *et al.* 1996), il était naturel de développer cette voie d'application au sein de cette équipe. Par ailleurs, dans cette dynamique Pharmimage®, trois unités mixtes de recherche de Dijon (le laboratoire ICB, le LE2I et l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne) se sont engagées par la signature en 2010 de la convention 3 MIM (Marquage des Molécules par des Métaux pour l'Imagerie Médicale) avec le CNRS, l'Université de Bourgogne et le Conseil Régional pour une durée de 7 ans.

Les objectifs de la thèse

Le but de cette thèse était donc de synthétiser des nanoparticules d'oxyde de fer biocompatibles pour des applications biomédicales plus particulièrement pour l'IRM. Ces oxydes de fer nanostructurés doivent s'associer en agrégats de faibles tailles (inférieures à 50 nm) pour se disperser plus facilement dans l'organisme (Okuhata 1999) et ainsi être utilisables pour la détection des pathologies cardiovasculaires visées. Les agrégats superparamagnétiques obtenus doivent ensuite être stabilisés par des molécules organiques n'augmentant pas leur toxicité et leur agglomération et les stabilisant en conditions physiologiques. Enfin le couplage de molécules fluorescentes doit permettre une détection de ces nanoparticules en microscopie optique, facilitant leur étude par des techniques classiques de biologie (microscopie, cytométrie, …).

Pour cette étude, ces agents de contraste sont composés des éléments suivants (Figure 1) :

1) Des **cœurs magnétiques** composés d'oxydes de fer nanostructurés apportant les propriétés superparamagnétiques recherchées pour la détection en IRM.
2) Des **molécules organiques** apportant une stabilisation aux cœurs magnétiques et permettant également une biodistribution différentes de ces nano-objets tout en évitant leur toxicité.
3) Eventuellement une **molécule fluorescente** permettant une détection plus aisée de ces nanoparticules par microscopie optique.

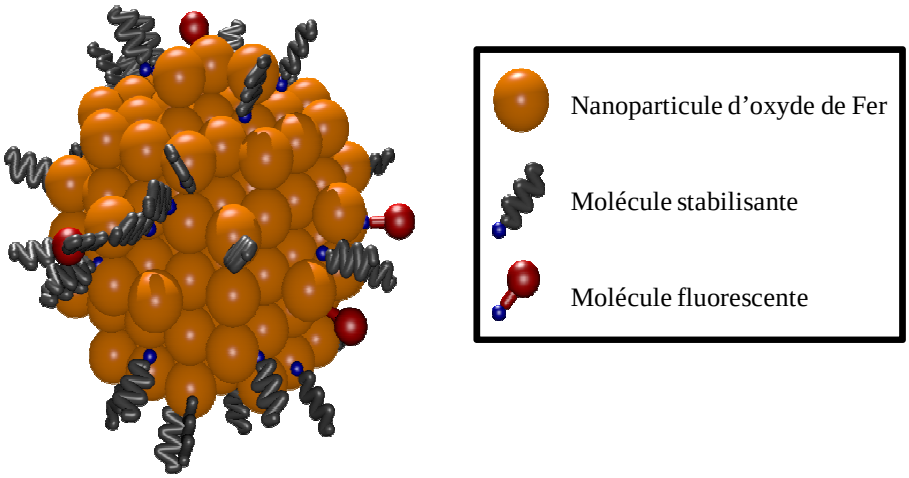


Figure 1 : Représentation d'un agent de contraste pour utilisation en IRM composé d'un cœur magnétique stabilisé par des molécules organiques et couplé à une molécule fluorescente pour la détection in vitro.

La toxicité et l'efficacité en IRM de ces potentiels agents de contraste doivent ensuite être évaluées.

Pour répondre à ce cahier des charges, ce travail s'est divisé en quatre objectifs principaux :

1) **Optimiser** la synthèse d'oxydes de fer nanostructurés par la voie classique de co-précipitation afin d'obtenir des nanoparticules de faibles tailles permettant la circulation assez longue de ces agents de contraste dans l'organisme pour cibler les pathologies cardiovasculaires. Les suspensions obtenues doivent être stables dans les conditions de stockage pour éviter une altération et être conservées avant modification de surface. Pour connaître la phase obtenue et leurs morphologies, les nanoparticules seront analysées en diffraction des rayons X et en microscopie électronique en transmission. Pour les couplages des oxydes de fer avec des molécules organiques, la surface de ces particules sera analysée par mesure de surface spécifique (BET), spectroscopie infrarouge, diffusion dynamique de la lumière, zêtamétrie, XPS et analyse thermogravimétrique.
2) **Stabiliser** les nanoparticules d'oxyde de fer par répulsion électrostatique ou stérique à l'aide respectivement d'acides carboxyliques ou de polyéthylènes glycols. La présence d'agents greffés à la surface sera mesurée par analyses thermogravimétriques, par spectroscopie infrarouge, par XPS, par microscopie électronique, par diffusion dynamique de la lumière et zêtamétrie. Les molécules fonctionnalisantes doivent pouvoir être couplées à un agent fluorescent ou ultérieurement à des protéines ou des anticorps pour la détection de pathologies spécifiques.
3) **Industrialiser** ces deux premières étapes en synthétisant et en greffant avec des agents stabilisants en une seule étape des nanoparticules d'oxyde de fer. Le dispositif de synthèse hydrothermale pouvant s'étendre au domaine eau supercritique développé au sein de l'équipe MaNaPI sera utilisé pour synthétiser de grandes quantités de nanopoudres. L'influence des réactifs et des paramètres de réaction sera étudiée pour comprendre et améliorer les synthèses (contrôle de la taille de grains, de leur état de dispersion et d'oxydation et des phases obtenues).
4) **Valider** les compatibilités biologiques et les efficacités en tant qu'agents de contraste en IRM de ces nanoparticules d'oxyde de fer. Des tests de cytotoxicité réalisés sur différents modèles cellulaires fournis par la société NVH Medicinal devront permettre d'estimer l'impact de nos nano-objets *in vitro*. En collaboration avec le Le2I, NVH Medicinal (modèles animaux) et le CHU de Dijon, plus particulièrement le service

d'imagerie, des mesures sur une IRM clinique sur gels et *in vivo* après injection à des souris permettront d'estimer l'efficacité et la biodistribution de ces nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisés.

Plan du manuscrit

Ce manuscrit est divisé en trois parties :

1) Dans le premier chapitre, les applications biologiques des nanoparticules sont brièvement présentées. Des détails sur l'imagerie par résonance magnétique et sur le ciblage de pathologies spécifiques sont explicités.
2) Le deuxième chapitre est scindé en 3 parties. La première partie détaille l'obtention et la caractérisation de nanoparticules d'oxyde de fer. Puis s'en suit des tests de couplage des nanoparticules par des molécules stabilisantes et des agents fluorescents ainsi que les caractérisations morphologiques et chimiques qui ont découlées de ces essais. Enfin, l'influence des réactifs et des conditions de synthèse dans le procédé de synthèse hydrothermal en continu est étudiée.
3) Le dernier chapitre est consacré aux essais biologiques réalisés avec les nanoparticules obtenues. Une première partie traite des tests de cytotoxicité et une autre partie étudie l'efficacité en tant qu'agent de contraste intrinsèque des nanoparticules et la biodistribution de ces nano-objets.

Chapitre I Contexte et problématique de l'étude

I.1 Généralités sur les nanoparticules en biologie

La possibilité de contrôler la taille des nanoparticules d'oxyde de fer (de quelques nanomètres à plusieurs centaines de nanomètres) permet de les situer dans des dimensions comparables aux cellules (10 à 100 µm), aux virus (20 à 450 nm) ou aux protéines (5 à 50 nm) (Pankhurst *et al.* 2003). De plus, leurs propriétés magnétiques particulières à faibles tailles, leur permet de réagir sous l'action d'un champ magnétique extérieur. Enfin, la possibilité de coupler ces oxydes de fer avec des molécules ou des protéines ouvre la voie à de nombreux champs applicatifs dans le domaine biomédical. Les exemples présentés ne sont qu'un panel du nombre important d'applications biologiques offertes par ces nanomatériaux.

I.1.1 L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

Les propriétés magnétiques particulières des oxydes de fer nanostructurés les rendent utilisables en imagerie médicale. Cette partie étant l'objectif de ce travail, la partie I.2 de ce chapitre lui est consacrée.

I.1.2 Séparation de matériel biologique à l'aide de nanoparticules d'oxyde de fer

La capacité qu'ont les nanoparticules d'oxyde de fer à s'aimanter sous un champ magnétique extérieur permet de les utiliser pour séparer du matériel biologique ou des macromolécules (Corchero *et al.* 2009).

Avant de les séparer, il est nécessaire de marquer ces cellules par des oxydes de fer et ce, de deux manières différentes en utilisant les propriétés réactives de ces nanoparticules :

- Par **ciblage**. Des nanoparticules sont couplées à des ligands spécifiques à des récepteurs de certaines cellules et peuvent se lier exclusivement sur ces cellules (Figure I.1.1). Par ce moyen, il est possible de distinguer des cellules possédant un récepteur spécifique (comme des cellules cancéreuses par exemple) de cellules ne le possédant pas (cellules saines).

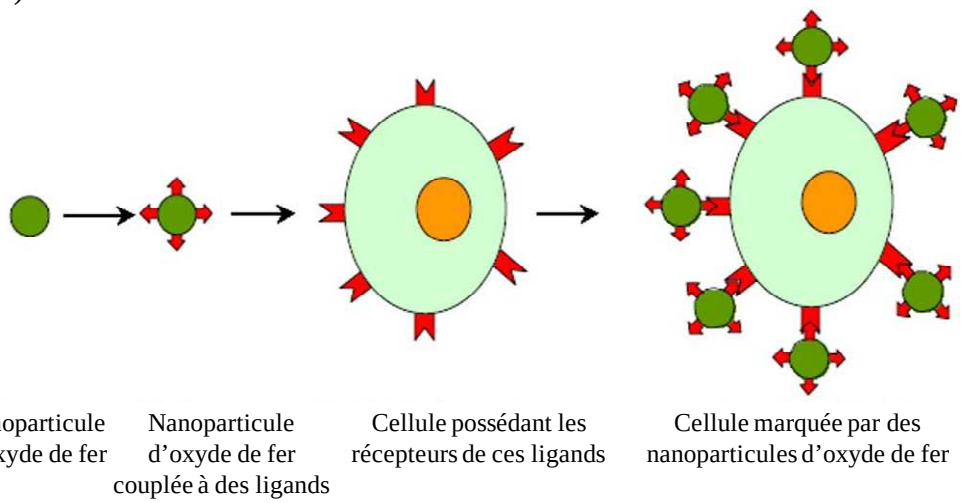


Figure I.1.1 : Schéma de marquage d'une cellule possédant des récepteurs spécifiques à des ligands couplés sur des nanoparticules d'oxyde de fer d'après (Gupta et al. 2005)

- Par **internalisation** de ces nano-objets par des cellules (Wilhelm *et al.* 2009).

Dans ces deux cas, les cellules se retrouvent marquées par des oxydes de fer et peuvent être séparées des cellules non marquées sous l'action d'un champ magnétique, à l'aide d'un aimant par exemple (Figure I.1.2).

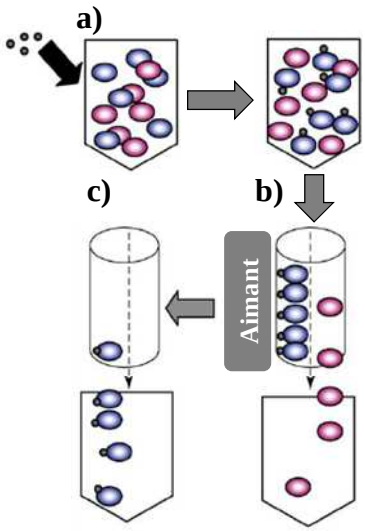


Figure I.1.2 : Exemple de séparation cellulaire par marquage de cellules. (a) Les cellules bleues sont marquées par des nanoparticules d'oxyde de fer possédant des ligands spécifiques (sphères grises). (b) Toutes les cellules passent dans une colonne de chromatographie avec un aimant. Les cellules marquées sont retenues par le champ magnétique et les non-marquées (en rose) sont éliminées. (c) En enlevant l'aimant, seules les cellules marquées sont récupérées en fin de séparation d'après (Corchero et al. 2009).

I.1.3 Ciblage spécifique de pathologies

La possibilité d'attirer les nanoparticules d'oxyde de fer avec un champ magnétique extérieur ainsi que la possibilité de leur greffer des molécules ou des protéines, les rendent utilisables pour délivrer des principes actifs (Kohler *et al.* 2006; Laurent *et al.* 2008).
Des nanoparticules d'oxyde de fer sont greffées à des principes actifs, principalement des anticancéreux. Une fois injectés, ces principes actifs vont pouvoir être concentrés dans l'organe grâce à l'application d'un champ magnétique à proximité du lieu de ciblage (Figure I.1.3).

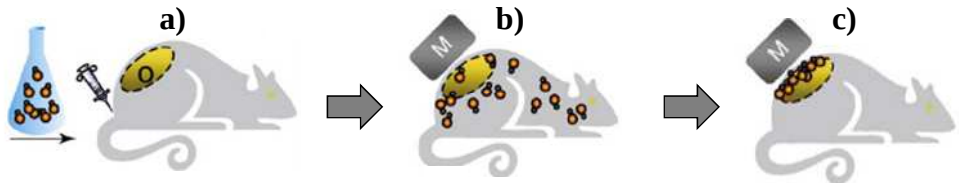


Figure I.1.3 : Ciblage de principes actifs (sphères oranges) couplés à des nanoparticules d'oxyde de fer (petites sphères grises) chez la souris. (a) On injecte les oxydes de fer associés à un principe actif à la souris. (b) Les oxydes de fer sont attirés vers l'organe grâce à un champ magnétique placé à son voisinage (M). (c) Les nanoparticules sont concentrées dans l'organe ciblé d'après (Corchero et al. 2009).

L'intérêt du ciblage de principe actif est double (Pankhurst *et al.* 2003) :

- En ciblant spécifiquement les sites malades, la toxicité du principe actif sur d'autres parties de l'organisme est limitée.

- La quantité de principe actif à utiliser pour être efficace est diminuée car la majorité de la molécule utilisée est concentrée vers le site ciblé.

La difficulté principale de cette technique est de conserver l'efficacité du principe actif présent sur les nanoparticules.

Pour cibler les tumeurs, il est également possible de jouer sur les pH. En effet, le pH physiologique est aux alentours de 7,4 quand celui des tissus tumoraux est plutôt de 5,7. Munnier *et al* (Munnier *et al.* 2008) ont utilisé un anticancéreux : la Doxorubucine liée aux nanoparticules par une liaison permettant une désorption plus facile à pH acides. Cette technique permet d'éviter le relargage aléatoire de drogue dans l'organisme et montre ainsi l'intérêt du couplage de principe actif à des oxydes de fer nanostructurés.

Chorny *et al* (Chorny *et al.* 2010) ont utilisé les propriétés des nanoparticules magnétiques (MNP) de manière assez originale pour délivrer un principe actif devant empêcher la ré-obstruction des artères après la pose d'un stent (ou resténose). Cette équipe a posé à des souris un stent en acier magnétique. Les animaux sont ensuite soumis à un champ magnétique (Figure I.1.4-A). Des nanoparticules magnétiques couplées à un agent antimitotique (inhibiteur de la prolifération cellulaire) le Paclitaxel (PTX) sont dirigées, après injection, vers le stent magnétique (Figure I.1.4-B).

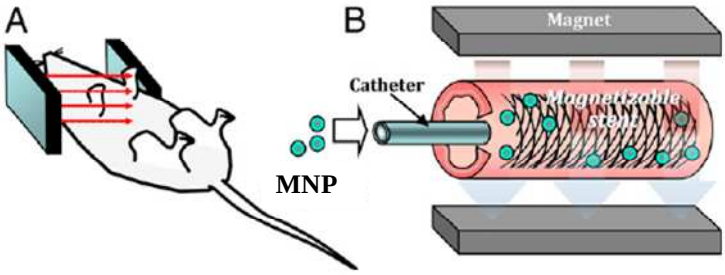


Figure I.1.4 : (A) Schéma d'une souris possédant un stent magnétique placée dans un champ magnétique uniforme entre deux électro-aimants, (B) des nanoparticules couplées à un agent anti-inflammatoire (PTX) sont attirées vers le stent grâce au champ magnétique d'après (Chorny et al. 2010).

Les nanoparticules couplées au PTX se retrouvent préférentiellement vers la zone inflammatoire de l'artère possédant le stent et permettent de délivrer une plus grande quantité de principe actif et donc d'éviter la prolifération cellulaire et donc la ré-obstruction de l'artère (Figure I.1.5).

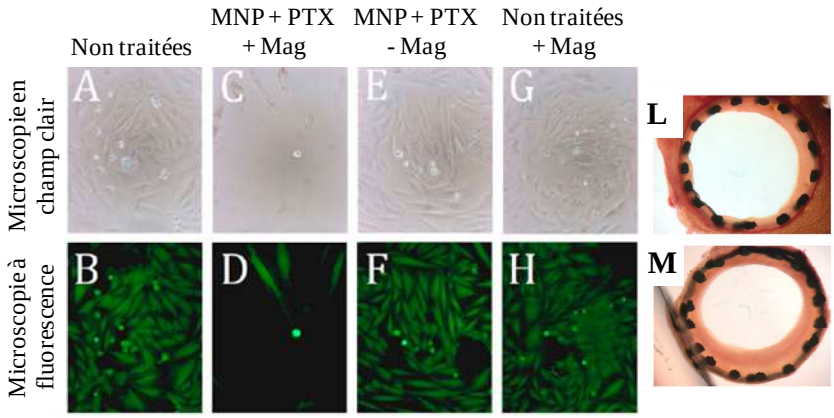


Figure I.1.5 : Effet des nanoparticules couplées au PTX sur la prolifération de cellules de muscle aortique de rats (A10). (A,C,E,G) en microscopie à champ clair et (B,D,F,H) en microscopie à fluorescence. (L) Artère de souris possédant un stent et traitée par les nanoparticules couplées au PTX et (M) artère de souris avec un stent sans traitement d'après (Chorny et al. 2010).

Les cellules A10 non traitées avec ou sans présence de champ magnétique ou traitées sans l'application de ce champ (Figure I.1.5-A-B-E-F-G-H) n'ont pas été détruites, de même que la ré-obstruction de l'artère sans traitement est observée (Figure I.1.5-M). En revanche, l'application d'un champ magnétique couplée à l'utilisation des nanoparticules avec du PTX ont montré leur effet sur la destruction des cellules d'artère *in vitro* (Figure I.1.5-C-D) ainsi que *in vivo* (Figure I.1.5-L), montrant l'intérêt du ciblage spécifique de pathologie à l'aide de nanoparticules magnétiques couplées à des principes actifs.

En plus du ciblage de pathologies oncologiques ou cardiovasculaires, les nanoparticules magnétiques peuvent servir à la transfection d'ADN dans les noyaux pour, notamment la thérapie génique (Steitz *et al.* 2007). Pan *et al* (Pan *et al.* 2007), par exemple, ont utilisé des nanoparticules d'oxyde de fer stabilisées par des dendrimères qui se sont couplées à un oligodésoxynucléotide antisens (asODN) qui est un brin d'ADN. En contact avec des cellules cancéreuses, ces particules ont été internalisées (on parle d'endocytose) *in vitro*. Ce phénomène est facilité par l'application d'un champ magnétique d'où l'intérêt des nanoparticules superparamagnétiques. Ces nanomatériaux se sont retrouvés dans des endosomes proches du noyau qui ont libéré l'ADN et les nanoparticules magnétiques dans le cytoplasme de la cellule (Figure I.1.6).

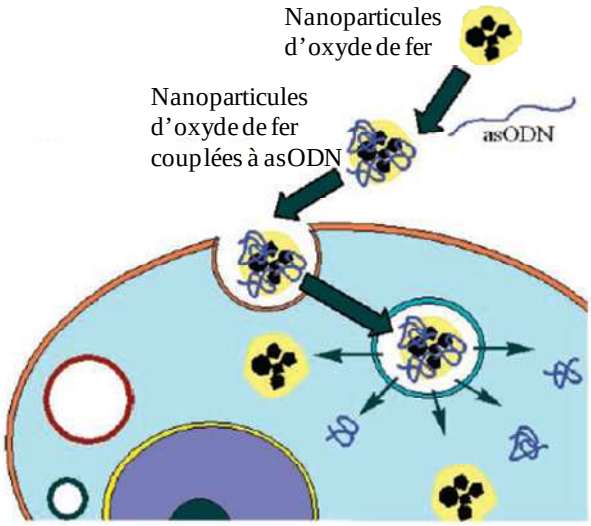


Figure I.1.6 : Nanoparticules d'oxyde de fer se couplant à de l'asODN puis étant internalisées par une cellule cancéreuse. Après ingestion dans des endosomes, les nanoparticules et l'asODN sont largués dans le cytosol d'après (Pan et al. 2007)

I.1.4 L'hyperthermie

Une autre application possible des nanoparticules d'oxyde de fer est l'hyperthermie. Il est connu (Dennis *et al.* 2008) qu'au-delà de 42-43°C, les tissus malins sont détruits. En présence de champ magnétique de hautes fréquences (10^5 à 10^6 Hz) les nanoparticules d'oxydes de fer s'échauffent localement (Kallumadil *et al.* 2009). Les oxydes de fer nanostructurés sont injectés directement dans l'organe ou ciblés vers ce dernier ; puis un champ radio-fréquencé est ensuite appliqué et les cellules de ce site sont localement détruites (Wilhelm *et al.* 2007).

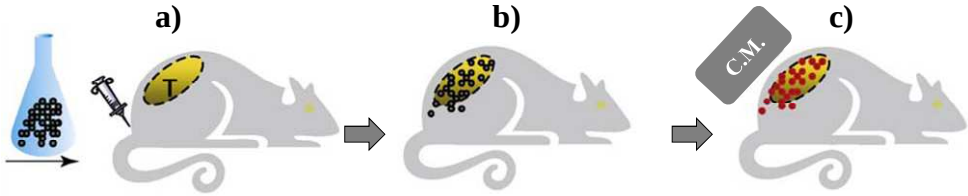


Figure I.1.7 : Mécanisme d'hyperthermie à base de nanoparticules d'oxyde de fer (cercles gris) chez la souris. (a) Les oxydes de fer sont injectés à la souris. (b) Ces nanoparticules sont concentrées dans l'organe ciblé. (c) Un champ magnétique (C.M.) est appliqué et échauffe les nanoparticules (cercles rouges) d'après (Corchero et al. 2009).

Pour les pathologies permettant l'injection directe des nanoparticules dans l'organe malin, cette application prometteuse des oxydes de fer nanostructurés a pu être développée au stade clinique par l'équipe de Jordan *et al* (Johannsen *et al.* 2007) notamment dans la thérapie de tumeur de la prostate. Cette équipe travaille depuis plus de 20 ans sur ce mécanisme et a obtenu fin 2008 l'autorisation d'utilisation d'un appareil d'hyperthermie pour le traitement des tumeurs au cerveau chez l'être humain.

I.2 L'Imagerie par Résonance Magnétique

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique d'imagerie médicale utilisée dans le diagnostic qui est basée sur la mesure de certaines propriétés magnétiques des noyaux d'hydrogènes (protons) dans l'eau et les graisses des tissus biologiques. Le développement des nanomatériaux (super)-paramagnétiques a ouvert la voie à de nouvelles applications dans le domaine de l'IRM. Dans le cadre de ce travail, ce sont les nanoparticules d'oxyde de fer qui nous ont intéressés. Des nanoparticules d'oxyde de gadolinium (Gd_2O_3) enrobée dans de la silice encapsulant également des molécules fluorescentes sont également développées aujourd'hui pour des applications biomédicales notamment en IRM et en microscopie à fluorescence (Bridot *et al.* 2007).

I.2.1 La Résonance Magnétique Nucléaire

I.2.1.1 Principe (Doyon et al. 2004)

Les atomes ont tous des propriétés magnétiques plus ou moins importantes définies par un moment magnétique μ.

En IRM, le magnétisme mesuré est nucléaire et ne peut être détectable que pour des noyaux possédant un nombre impair de protons ou de neutrons. Un des éléments possédant cette qualité est l'hydrogène (^1H) ou le proton. L'hydrogène est un élément abondant dans le vivant, tant au niveau de l'eau des liquides organiques que des graisses.

En absence d'un champ magnétique statique puissant, ces noyaux d'hydrogènes possèdent tous des moments magnétiques μ individuels orientés au hasard qui s'ajoutent en une aimantation totale M_0 nulle (Figure I.2.1).

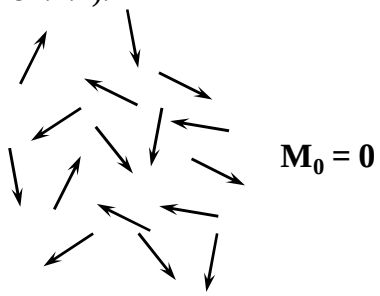


Figure I.2.1 : Moments magnétiques μ de différents noyaux d'atomes d'hydrogène présents dans un volume de tissu placé à l'état naturel. Les moments magnétiques sont orientés au hasard et leur somme donne une aimantation M_0 nulle.

Cependant, en présence d'un champ magnétique uniforme B_0 dirigé arbitrairement selon un axe Oz, les moments magnétiques des protons vont adopter une des deux orientations, soit alignés dans le sens de B_0, soit dans le sens opposé. En s'orientant, les moments magnétiques décrivent également un mouvement de précession[2] autour de B_0 à un angle de 54,7° (angle magique) par rapport à ce dernier (Figure I.2.2-a). Les noyaux ^1H vont alors se distribuer sur deux niveaux d'énergie correspondant aux deux spins +1/2 et -1/2, respectivement dans le sens du champ B_0 (spin parallèle ou fondamental) et dans le sens opposé (antiparallèle ou excité). Du fait de la meilleure stabilité du niveau fondamental, les spins parallèles se retrouvent en léger excès, créant une aimantation nucléaire détectable en RMN : M_0 (Figure I.2.2-b).

[2] Mouvement de précession : les spins ont un mouvement de rotation et décrivent un cône autour de l'axe de B_0.

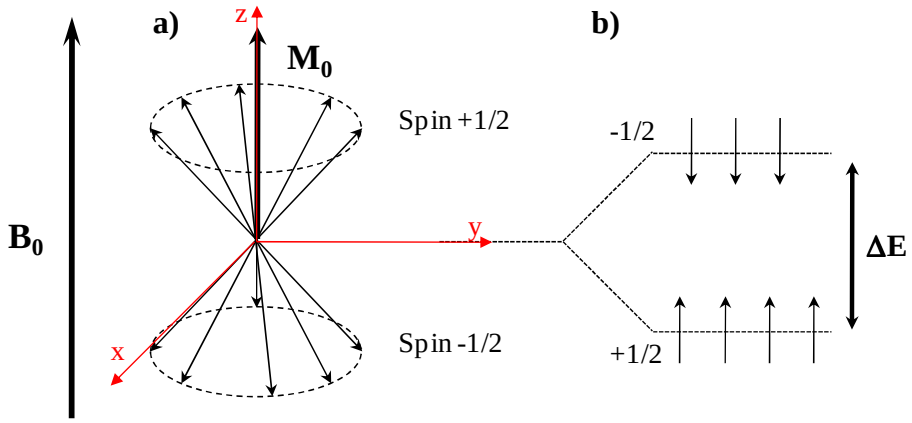


Figure I.2.2: (a) Moments magnétiques (μ) des protons d'un volume de tissu placé dans un champ magnétique B_0. A l'équilibre, l'aimantation totale M_0 est parallèle à B_0. (b) Distribution des niveaux d'énergie de protons à l'équilibre placés dans un champ magnétique B_0.

L'aimantation nucléaire totale M_0, correspondant à la somme des moments magnétiques μ de tous les protons, est définie par deux composantes : l'aimantation longitudinale (M_L) correspondant à la projection de M_0 sur l'axe Oz et l'aimantation transversale (M_T) qui est la projection de M_0 sur le plan xy perpendiculaire à B_0.
A l'équilibre (Figure I.2.2-a), M_L est maximale et M_T est nulle. Pour pouvoir détecter les signaux de ces deux composantes, il est nécessaire de briser cet équilibre.

En appliquant un second champ magnétique très bref B_1 (champ radiofréquence) perpendiculairement à B_0 (dans le plan xy), on peut déséquilibrer l'aimantation M_0 de manière à ce que M_0 se retrouve dans le plan xy où elle va être mesurée : le nouveau champ est appelé M (Figure I.2.3-a). Il faut pour cela que la fréquence de l'onde radio soit telle que l'énergie apportée soit équivalente à la différence entre les deux états d'énergie des noyaux d'hydrogène (ΔE : Figure I.2.2-b), on parle alors de fréquence de résonance.
Après l'arrêt du champ B_1, l'aimantation M va revenir à son état fondamental. Elle va rejoindre son état d'équilibre suivant l'axe Oz en décrivant une hélice de rayon décroissant (Figure I.2.3-b). Les valeurs des composantes de M vont varier en fonction du temps et, à l'équilibre, la composante longitudinale M_L va revenir à sa valeur initiale (c'est-à-dire égale à M_0) et celle de sa composante transversale M_T va redevenir nulle.
Bien que simultanées, on peut considérer ces deux composantes de relaxation (temps de retour à l'équilibre de ces deux composantes) de manières séparées. On parle de **temps de relaxation**.

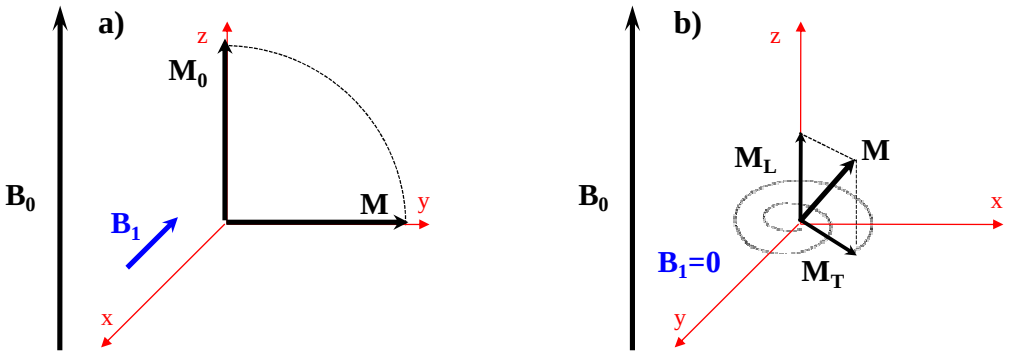


Figure I.2.3 : (a) Déplacement du champ M_0 en M perpendiculairement à B_0 sous l'action d'un champ magnétique radiofréquence B_1. (b) A l'arrêt de B_1, le champ M va rejoindre sa position d'équilibre en retrouvant sa composante longitudinale M_L maximale et sa composante transversale M_T nulle.

I.2.1.2 Les temps de relaxation

Après excitation de l'aimantation M_0 par un champ perpendiculaire radiofréquence B_1, ses composantes longitudinale et transversale vont retrouver leurs valeurs d'équilibre (respectivement $M_L=M_0$ et $M_T=0$). Les temps de relaxations sont les temps que vont mettre ces composantes à atteindre un certain pourcentage de leurs valeurs à l'équilibre.

I.2.1.2.1 La relaxation longitudinale T_1

Le temps de relaxation longitudinale T_1 ou relaxation spin-réseau est le temps théorique au bout duquel, après une impulsion B_1 de 90° par rapport à l'axe Oz, l'aimantation longitudinale (M_L) met pour rejoindre 63% de sa valeur initiale (M_0) (Figure I.2.4-a) selon l'équation :

$$M_L = M_0(1-e^{-\frac{t}{T_1}})$$

I.2.1.2.2 La relaxation transversale T_2

La relaxation transversale T_2 ou relaxation spin-spin est le temps théorique au bout duquel, après une impulsion B_1 de 90° par rapport à l'axe Oz, l'aimantation transversale (M_T) diminue jusqu'à 37% de sa valeur maximale (M_0) (Figure I.2.4-b) selon l'équation :

$$M_T = M_0 \cdot e^{-\frac{t}{T_2}}$$

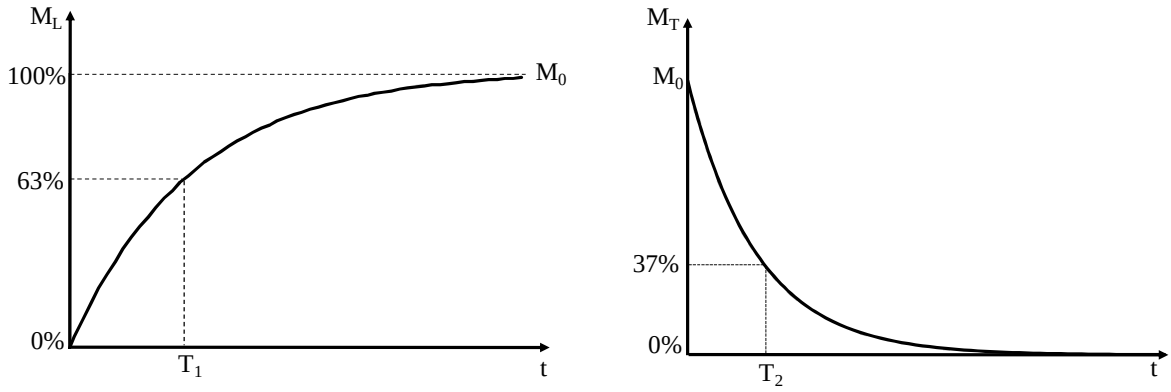


Figure I.2.4 : (a) Evolution en fonction du temps de l'aimantation longitudinale (M_L) après une impulsion B_1 (b) Evolution en fonction du temps de l'aimantation transversale (M_T) après une impulsion B_1. Les temps T_1 et T_2 sont respectivement le temps que va mettre M_L à atteindre 63% de sa valeur à l'équilibre et le temps que M_T va mettre à diminuer jusqu'à 37% de sa valeur maximale sous excitation.

Les temps de relaxation T_1 et T_2 dépendent de nombreux paramètres. Dans les tissus biologiques, en général, les valeurs numériques de T_2 sont inférieures à celles de T_1.
Ces différences sont à l'origine du **contraste intrinsèque** des tissus.

I.2.2 Le contraste intrinsèque en IRM

Le contraste en IRM peut varier en fonction de différents paramètres ou changer en fonction des séquences utilisées.

I.2.2.1 Les facteurs influençant le contraste en IRM

L'IRM étant une technique basée sur les temps de relaxation du proton, la nature du tissu peut jouer sur ces temps. Les paramètres pouvant différer sont, entre autres :

- Les temps de relaxations T_1, T_2 et T_2^*[3]
- La densité de noyaux d'hydrogène
- La vitesse de flux des liquides
- Les paramètres diffusionels comme la température ou la viscosité du milieu.

Le contraste en IRM est également influencé par les paramètres instrumentaux. Ainsi, plus l'intensité du champ B_0 est élevée, plus le rapport signal sur bruit est augmenté. Un autre élément propre à l'instrument peut jouer sur le contraste : **les séquences utilisées**.

I.2.2.2 Les séquences d'acquisition en IRM

Dans notre étude, deux séquences d'acquisition en IRM ont été utilisées.

I.2.2.2.1 La séquence d'écho de spin

Cette séquence élémentaire est constituée de deux impulsions radiofréquences séparées par un intervalle de temps. La première impulsion à 90° bascule l'aimantation M_0 dans le plan de mesure (M_L=0). La deuxième impulsion de 180° permet la remise en phase progressive des différents moments magnétiques. Il est alors possible d'enregistrer un signal sur un temps d'écho (T_E) donné. Chaque séquence est répétée sur un intervalle de temps de répétition (T_R). Les paramètres T_E et T_R permettent de privilégier un signal dépendant soit de T_1, soit de T_2, on parle alors de **pondération**. Pour un T_R et un T_E longs ($T_E \approx T_2$), l'intensité du signal dépend de T_2, on dit qu'il est pondéré en T_2. Si T_E est nettement inférieur à T_2, l'intensité du signal ne dépend pratiquement plus de T_2 et en utilisant des T_R courts, le signal est dit **pondéré en T_1**.

I.2.2.2.2 La séquence d'écho de gradient

Cette séquence est différente de l'écho de spin car elle possède une seule impulsion d'un angle bien inférieur à 90°. Par cette impulsion, la composante M_L de l'aimantation M_0 ne s'annule pas et permet un retour plus rapide à l'équilibre et donc une diminution du T_R entre chaque impulsion. Il est alors possible de diminuer le T_R et le T_E et donc de manière plus générale le temps d'acquisition autorisant la réalisation d'image dynamique. En diminuant T_E et T_R le signal devient **pondéré en T_2^*** et reste **pondéré en T_1**. Il est plus sensible aux hétérogénéités du champ magnétique mais permet des images avec des temps d'écho très faibles.

I.2.2.2.3 Les avantages et les inconvénients des séquences dans notre étude

Les séquences décrites présentent toutes deux des avantages et des inconvénients :

- Dans le cas de séquences **écho de spin**, les mesures sont moins sensibles à la variation du champ magnétique mais la nécessité d'utiliser des longs temps d'acquisition peut être un handicap pour des mesures *in vivo*.
- Les séquences d'**écho de gradient** sont plus rapides et donc plus adaptées à de l'imagerie *in vivo* car moins sensibles, par exemple, à la respiration. Cependant, elles sont **pondérées en T_2^*** et sont donc plus sensibles aux artéfacts de mesures.

I.2.2.2.4 Les pondérations des temps de relaxation

Le choix des séquences dépend de la pathologie à diagnostiquer. Sans entrer dans les détails, choisir une pondération T_1, T_2 ou T_2^* donnera un contraste sur les images des tissus totalement différent. En pondération T_1 par exemple, les tissus avec des faibles T_1 apparaissent en hypersignal (blanc) et des tissus avec de longs T_2 en pondération T_2 apparaissent aussi en

[3] T_2^* est une fonction de T_2 suivant l'équation $\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma \cdot \Delta\omega$ avec $\Delta\omega$ l'hétérogénéité du champ magnétique.

hypersignal. Ainsi, un liquide en hyposignal (vide de signal donc noir), sortira en hypersignal en pondération T_2. Dans la Figure I.2.5 le liquide céphalorachidien est sombre en T_1 alors qu'il apparaît en hypersignal en pondération T_2.

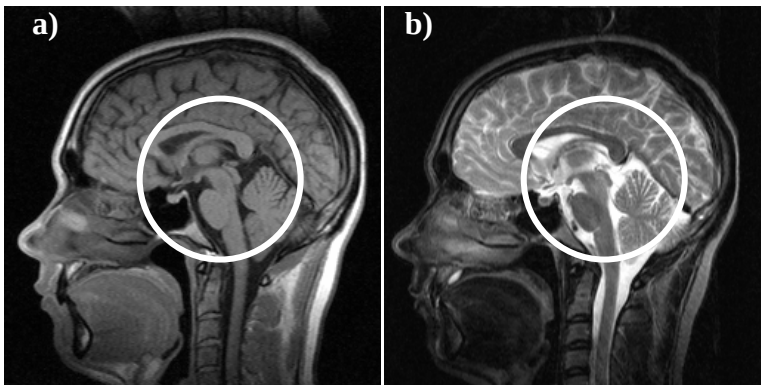


Figure I.2.5 : Images IRM en écho de spin d'un cerveau humain pondérées (a) en T_1 et (b) en T_2 obtenues à 0,2 T. Le cercle représente le liquide céphalorachidien en noir en (a) et en blanc en (b) d'après (Miraux 2004).

Les choix de la séquence et de la pondération permettent d'augmenter le contraste mais sont insuffisants. Ainsi l'utilisation d'**agents de contraste** est indispensable pour augmenter le contraste et également diminuer les temps d'acquisition (HeywangKobrunner *et al.* 1997; Bartolozzi *et al.* 1999).

I.2.3 Les agents de contraste

Les agents de contraste en IRM vont interagir sur les protons de leur environnement et modifier ainsi localement le contraste. Ainsi, ce n'est pas l'agent lui-même qui est détecté mais l'effet qu'il a conféré à son entourage.
Il existe deux types d'agents de contraste :

- **Les agents paramagnétiques**
- **Les agents superparamagnétiques**

Avant de les présenter tous les deux, il est nécessaire de définir quelques termes qui seront utilisés dans ce manuscrit. On parle d'**effet T_1** quand un agent de contraste augmente le signal et d'**effet T_2** quand il le diminue. Un effet T_1 est mieux détectable dans une séquence en pondération T_1 et avec une pondération T_2 c'est l'effet T_2 qui est mieux révélé.

Le **taux de relaxation** (R) est également une notion importante. Elle est l'inverse des temps de relaxation (1/T en s^{-1}).

Pour évaluer l'efficacité d'un agent de contraste à un champ et à une température donnés, on mesure un paramètre appelé la **relaxivité** (r_1 ou r_2 en $mM.s^{-1}$) qui est l'efficacité d'un produit de contraste sur respectivement le temps de relaxation T_1 et/ou T_2.

I.2.3.1 Les agents paramagnétiques (effet T_1)

Les électrons possèdent, comme les protons, un moment magnétique μ nommé spin électronique. Le déplacement des électrons autour du noyau génère un moment magnétique non nul si une partie des électrons est non-appariée comme c'est le cas de certains ions métalliques (Fe^{2+}, Fe^{3+}, Mg^{2+}, Ni^{2+}, Gd^{3+}) ou des molécules **paramagnétiques**. A l'état fondamental, les moments magnétiques de ces ions vont être globalement nuls mais en appliquant un champ magnétique, ces moments vont s'orienter et une aimantation va apparaître.
Au voisinage de ces produits paramagnétiques, leurs moments magnétiques électroniques vont influencer les moments nucléaires de chaque proton et changer par la même occasion leurs

temps de relaxation. Cette interaction est dépendante du champ appliqué et de la concentration locale du produit.

Cet effet paramagnétique est utilisé pour augmenter le contraste en IRM et ainsi améliorer la détection de certaines zones comme les vaisseaux ou les tumeurs tout en diminuant le temps d'analyse.

Les agents de contraste paramagnétiques les plus utilisés sont des complexes de gadolinium (Figure I.2.6). Ce sont des molécules organiques chélatant un ion Gd^{3+}.

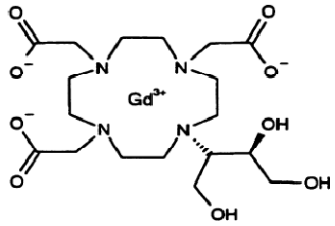


Figure I.2.6 : Structure chimique d'un agent de contraste paramagnétique à base de Gadolinium : le Gadobuterol® de la société Bayer-Schering

Pour la détection de tumeur, une séquence en pondération T_2, sans agent de contraste, permet de les faire apparaître en hypersignal (Figure I.2.7-a). Cependant, la recherche de petites zones tumorales nécessite un allongement significatif des temps d'acquisition (plus de 45 minutes dans la Figure I.2.7-A). Les complexes de gadolinium assurent également un contraste suffisant entre tissus sains et tumeurs en pondération T_1 réduisant ces temps de relaxation T_1 et créant un rehaussement du contraste comme le montre la tumeur de la Figure I.2.7-B tout en diminuant le temps d'acquisition (12 minutes).

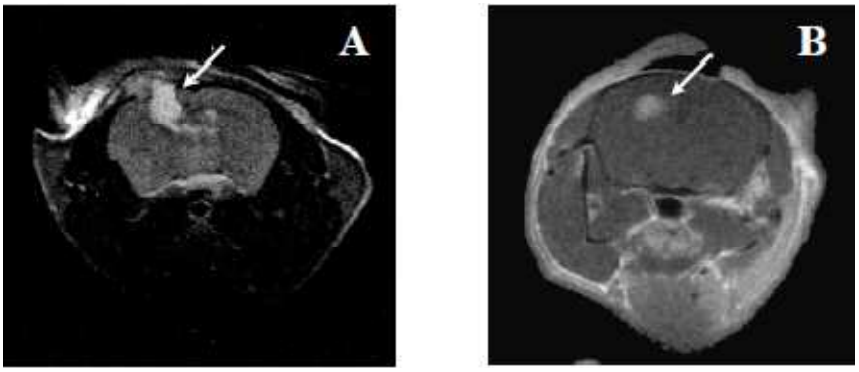


Figure I.2.7 : Détection de tumeurs cérébrales indiquées par des flèches chez la souris à 4,7 T. (A) Image en pondération T_2 acquise pendant 48 min (B) Image en pondération T_1 avec injection d'un produit de contraste à base de Gadolinium acquise pendant 12 min d'après (Miraux 2004)

Il existe de nombreux agents de contraste à base de gadolinium dont les relaxivités r_1 sont données dans le Tableau I.2.1.

Nom de marque	Nom de marque européen	Relaxivité r_1 à 0,47 T ($L.mmol^{-1}.s^{-1}$)	Société / pays
Gadobutrol	Gadovist®	3,7	Bayer-Schering / Allemagne
Gadoteridol	Prohance®	3,7	Bracco / Italie
Gadopentetate dimeglumine	Magnevist®	3,8	Bayer-Schering / Allemagne
Gadoterate meglumine	Dotarem®	3,5	Guerbet / France
Gadodiamide	Omniscan®	3,8	Nycodem / Norvège
Gadobenate dimeglumine	Multihance®	4,8	Bracco / Italie

Tableau I.2.1 : Relaxivités r_1 mesurées à 0,47 T de certains agents de contraste commerciaux à base de gadolinium d'après (Tombach et al. 2002; Villaraza et al. 2010)

Les complexes de gadolinium de petites tailles (inférieures à 2 nm) ont une **clairance rénale** rapide (Villaraza *et al.* 2010) (90% de la dose injectée est éliminée en moins d'une heure). Cette élimination rapide nécessite leur utilisation dans un faible intervalle de temps post-injection. Quand les tailles des agents de contrastes à base de gadolinium dépassent les 8 nm, la clairance hépatique commence à prédominer sur celle rénale (Venditto *et al.* 2005). Ainsi, pour cibler cet organe, des complexes de gadolinium de tailles importantes peuvent être utilisés.

Les agents de contrastes à base de gadolinium sont couramment utilisés en imagerie médicale mais, si le patient possède une insuffisance rénale, il s'avérerait que l'augmentation du temps de clairance permettrait à l'ion Gd^{3+} de se libérer de son chélate, causant ainsi des pathologies rénales (Agarwal *et al.* 2009; Goulle *et al.* 2009) notamment une fibrose systémique néphrogénique (FSN).

I.2.3.2 Les agents superparamagnétiques (effet T_2)

I.2.3.2.1 Le superparamagnétisme

Les nanoparticules d'oxydes métalliques de structure spinelle possèdent des propriétés **superparamagnétiques** qui vont accroître le contraste T_2 (diminution plus importante du signal en IRM).

Les cristaux d'oxyde de fer comme la magnétite (Fe_3O_4) ou la maghémite (γ-Fe_2O_3) sont composés d'ions paramagnétiques (Fe^{2+}, Fe^{3+}). Dans le cas de particules relativement grosses (tailles supérieures à 20-30 nm), ce matériau est composé de plusieurs domaines magnétiques. Comme pour les protons en IRM, en absence de champ magnétique, les moments magnétiques de ces domaines sont orientés aléatoirement avec une aimantation totale nulle (Figure I.2.8-a). En appliquant un champ magnétique, tous ces moments vont s'orienter dans sa direction de la même manière que les produits paramagnétiques (Figure I.2.8-b). Cependant, si le champ est trop important, en l'arrêtant, le matériau va conserver son aimantation à saturation (Figure I.2.8-c) : on parle alors de **ferromagnétisme**.

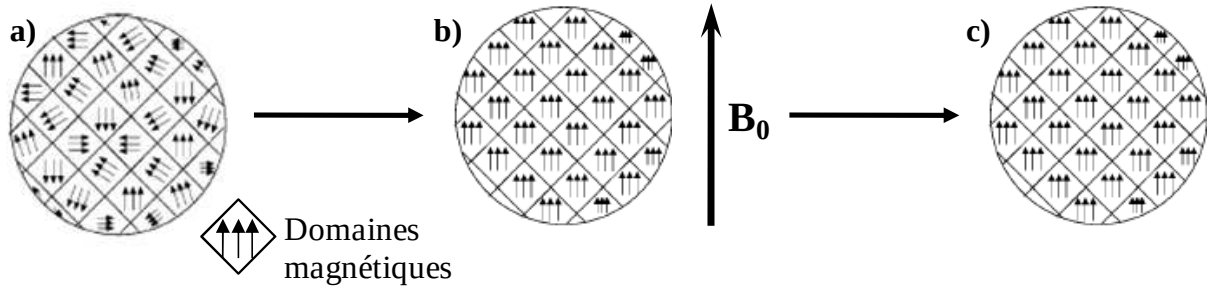


Figure I.2.8 : Nanoparticules d'oxyde multidomaines (a) en absence de champ magnétique, (b) sous application d'un champ magnétique B_0 et (c) après l'arrêt de B_0 à saturation d'après (Wang et al. 2001).

Dans le cas des nanoparticules de tailles inférieures à 20-30 nm, chaque particule est assimilée à un mono-domaine magnétique (Figure I.2.9). Sous l'action d'un champ magnétique B_0, leurs aimantations aléatoires vont s'orienter mais vont retourner à leur état initial après l'arrêt de B_0. Cette propriété est appelée **superparamagnétisme**. Les nanoparticules d'oxyde de fer ne peuvent donc pas s'agglomérer par attraction magnétique. L'obtention de petites tailles de cristaux est nécessaire pour les propriétés superparamagnétiques recherchées.

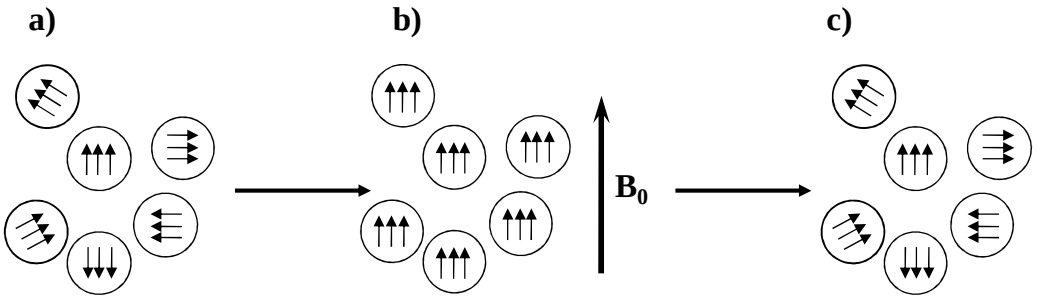


Figure I.2.9 : Nanoparticules d'oxyde de fer de taille inférieure à 20 nm assimilées à des mono-domaines magnétiques (a) en absence de champ magnétique, (b) passées dans un champ magnétique B_0 et (c) après l'arrêt de B_0

Les particules superparamagnétiques ont une **susceptibilité[4] magnétique** supérieure aux composés paramagnétiques. Par ailleurs, les nanoparticules superparamagnétiques étant plus grandes que les chélates de gadolinium (de 5 à 20 nm contre 1 ou 2 nm), elles possèdent des moments magnétiques plus élevés en raison du nombre d'ions paramagnétiques qui les composent et de leur effet de coopérativité magnétique. Ces propriétés rendent les agents **superparamagnétiques** plus efficaces que les agents **paramagnétiques** (Jung *et al.* 1995).

I.2.3.2.2 Les oxydes de fer nanostructurés comme agents de contraste en IRM

Des agents de contraste à base de nanoparticules peuvent être utilisés en imagerie médicale. Dans le cas de l'IRM, ils sont couramment constitués de monocristaux de tailles inférieures à 20 nm (appelés cristallites) d'oxydes de fer de phase magnétite (Fe_3O_4) ou maghémite (γ-Fe_2O_3) de structure spinelle inverse qui leur confère des propriétés superparamagnétiques (Laurent *et al.* 2008).

Pour les stabiliser dans les milieux biologiques, ces nanoparticules doivent être modifiées en surface le plus souvent avec des molécules organiques. Sans entrer dans une liste totalement exhaustive, plusieurs types de stabilisants sont couramment utilisés : des dendrimères phosphatés (Basly *et al.* 2010), des acides carboxyliques (acide citrique (Racuciu *et al.* 2006), acide dimercapto-succinique (Lee *et al.* 2006)) , des amines en surface (NH_2/NH^{3+}) (Shieh *et al.* 2005), des polymères comme le polyéthylène glycol (Barrera *et al.* 2009), le polyacétate de vinyle (Petri-Fink *et al.* 2005) ou le dextran (Mornet *et al.* 2005).

Il existe depuis une dizaine d'années quelques agents de contrastes commerciaux à base d'oxyde de fer (Bonnemain 2008). Ils sont dispersés par du dextran et sont séparés en deux groupes suivant leurs tailles :

- Les **SPIO** (SuperParamagnetic Iron Oxide) qui sont des nanoparticules d'oxyde de fer de diamètres d'agrégats supérieurs à 50 nm (Zhang *et al.* 2009). Pour les agrégats de tailles inférieures à 150 nm, ces agents sont injectés au patient et pour des tailles plus grosses, ils peuvent être administrés par voie orale et servir pour l'imagerie gastro-intestinale (Wang *et al.* 2001).
- Les **USPIO** (Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide) qui sont, soit des cristallites élémentaires ou des très petits agrégats de tailles inférieures à 50 nm (Mornet *et al.* 2004).

Les agents de contraste à base d'oxyde de fer nanostructurés sont de type T_2 et ont donc des relaxivités r_2 élevées (Tableau I.2.2). Il faut tout de même noter que si les nanoparticules

[4] La susceptibilité magnétique est la faculté qu'a un matériau à s'aimanter sous un champ magnétique.

sont très petites (Tromsdorf *et al.* 2009) ou éventuellement à cause du polymère choisi à la surface, les USPIO ou SPIO peuvent également avoir un effet T_1 (Mornet *et al.* 2004).

Nom de marque européen	Diamètre hydrodynamique (nm)	Voie d'administration	Dose	Relaxivité r_2 à 0,47 T ($L.mmol^{-1}.s^{-1}$)
[a]Lumirem®	300	Orale	1,5-3,9 mM^{-1} (400-600 mL)	72
[a]Endorem®	80-150	SPIO injecté	15 $\mu mol_{Fe}.kg^{-1}$	98-107
[b]Resovist® ou Cliavist®	62	SPIO injecté	8 $\mu mol_{Fe}.kg^{-1}$	151-188
[a]Sinerem® (abandonné en 2007)	20-40	USPIO injecté	14-30 $\mu mol_{Fe}.kg^{-1}$	35-53

Tableau I.2.2 : Diamètre moyen, voie d'administration, dose prescrite et relaxivités r_2 mesurées à 0,47 T de certains agents de contraste commerciaux à base de nanoparticules d'oxyde de fer d'après (Wang et al. 2001; Mornet et al. 2004). Produits provenant de : (a) la société Guerbet en France, (b) la société Bayer-Schering en Allemagne.

L'effet T_2 d'USPIO commerciaux (Resovist®) est observable sur la Figure I.2.10 avec un effondrement du contraste hépatique. En utilisant ces agents de contraste, on permet dans ce cas un rehaussement de la tumeur hépatique.

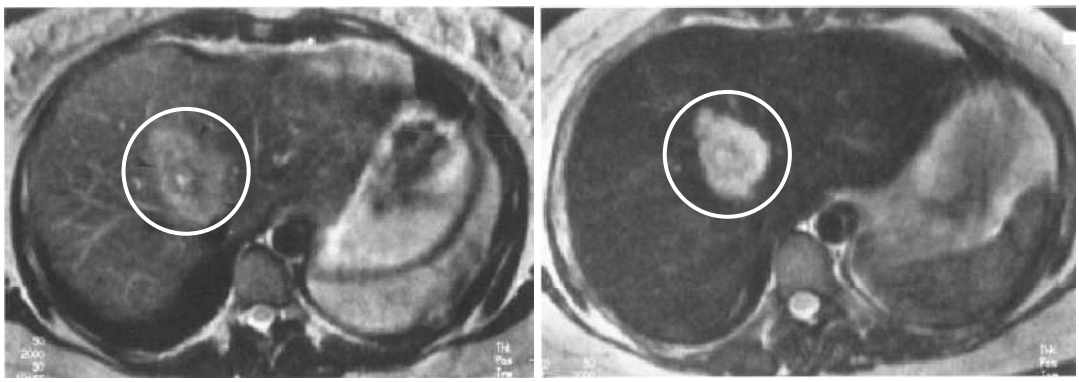


Figure I.2.10 : Détection de tumeurs hépatiques (cercles blancs) chez l'homme en IRM à 1 T. (a) Image en pondération T_2 acquise sans utilisation d'USPIO (b) Image en pondération T_2 acquise avec utilisation d'USPIO (Sinerem®) d'après (Mergo et al. 1998)

La taille plus imposante des USPIO ou des SPIO par rapport à celle des chélates de gadolinium rend leur demi-vie dans l'organisme plus longue que celle des agents paramagnétiques (Sun *et al.* 2008). Ils deviennent alors utilisables pour des détections plus furtives de pathologies notamment grâce à leur internalisation possible par le système immunitaire (Dousset *et al.* 1999).

Les agents superparamagnétiques peuvent être des produits de choix pour les pathologies cardiovasculaires pour essentiellement deux raisons :

- En premier lieu, s'ils n'ont pas d'effet T_1, ils pourront être détectés en cas d'anomalie dans le système circulatoire sans être masqués par l'effet T_1 du sang.
- En seconde approche comme ils sont internalisés par les macrophages, ils seront majoritairement localisés près des zones inflammatoires (Bjornerud *et al.* 2004).

Ces interactions entre les nanoparticules et l'organisme posent des questions sur leur **toxicologie** et leur biodistribution mais ouvrent aussi la voie à des **marquages spécifiques** soit par **reconnaissance cellulaire**, soit en modifiant la surface des USPIO par des molécules pour des **reconnaissances de la surface** et feront l'objet du paragraphe I.3.

I.3 Les interactions des (U)SPIO avec le vivant : de la biodistribution à la détection spécifique

I.3.1 La biodistribution des nanoparticules d'oxyde de fer : cas du ciblage passif

Si les nanoparticules d'oxyde de fer ne sont pas modifiées pour détecter une pathologie spécifique, ces nanohybrides ont une biodistribution propre qui dépend de leur taille et de leur modification de surface : on parle alors de **ciblage passif**.

Quand ils sont injectés dans l'organisme, les nanohybrides sont captés par le système réticulo-endothélial (SRE). Le SRE constitue la première ligne de défense immunitaire et est composé de macrophages qui sont majoritairement localisés dans le foie. La captation plus ou moins rapide des nanohybrides par le SRE influence leur biodistribution.

La taille des oxydes de fer nanostructurés influence la vitesse d'internalisation de ces agents de contraste par les macrophages. Ainsi, les SPIO de diamètres supérieurs à 40 nm sont communément captés en moins de 10 minutes (demi-vies plasmatiques) par le SRE et ont donc une biodistribution hépatique (Okuhata 1999), ils conduisent donc à un contraste hépatique. Les nanoparticules de diamètres plus petits ont un temps de circulation plus long, permettant d'imager le foie mais également d'autres organes comme les ganglions lymphatiques (Mornet *et al.* 2004).

La taille des (U)SPIO a aussi une influence sur la détection de tumeurs. Les vaisseaux capillaires de ces dernières sont plus perméables que les tissus sains et elles sont plus vascularisées. Certains travaux ont montré une plus grande accumulation d'USPIO que de SPIO dans des tumeurs hépatiques, grâce à leurs plus petites tailles permettant de mieux passer dans les tissus tumoraux (Larsen *et al.* 2009).

Les agents de contraste à base d'oxyde de fer sont aujourd'hui majoritairement à biodistribution hépatique ou gastro-intestinale dans le cas d'administration orale (Tableau I.3.1).

Nom de marque européen	Diamètre hydrodynamique (nm)	Type d'agents de contraste	Temps de ½ vie plasmatique	Biodistribution
[a]Lumirem®	300	Orale	nd	Gastro-intestinale
[a]Endorem®	80-150	SPIO injecté	10 min	SRE et foie
[b]Resovist® ou Cliavist®	62	SPIO injecté	10 min	SRE et foie[1]
[a]Sinerem® (abandonné en 2007)	20-40	USPIO injecté	200 min	SRE et ganglions lymphatiques

Tableau I.3.1 : Diamètre moyen, voie d'injection, temps de demie vie plasmatique et biodistribution de certains agents de contraste commerciaux à base de nanoparticules d'oxyde de fer d'après (Wang et al. 2001; Reimer et al. 2003; Mornet et al. 2004). Produits provenant de : (a) la société Guerbet en France, (b) la société Bayer-Schering en Allemagne. nd : non déterminé

En plus de la taille, la surface des nanoparticules influencent leur biodistribution. Ainsi, les agents de contraste commerciaux sont fonctionnalisés par du dextran et ont un contraste majoritairement hépatique. Quand ces nanohybrides sont injectés dans l'organisme, les protéines plasmatiques vont s'adsorber à leur surface et ainsi les rendre capable de réagir avec certains récepteurs membranaires ou être internalisés plus rapidement par les macrophages en augmentant significativement la taille de ces nanoparticules (Moghimi *et al.* 2001). Ce

phénomène d'**opsonisation** est influencé par la taille et par la surface des nanoparticules (Duguet *et al.* 2006). Plus l'opsonisation est lente, plus la demi-vie plasmatique sera longue. Dans le cas de particules chargées à pH physiologique (pH = 7,4) ce phénomène est plus rapide que dans le cas de nano-objets neutres (Faure *et al.* 2009). L'utilisation de polymères comme les polyéthylènes glycol augmente également le temps de circulation des nanoparticules en retardant le phénomène d'opsonisation grâce aux chaînes hydrophiles (Duguet *et al.* 2006).

Le contrôle de la taille et de la modification de surface des nanoparticules d'oxyde de fer change leur biodistribution et permet déjà de détecter des tissus différents sans utiliser des outils pour un **marquage spécifique**.

Pour finir ce paragraphe, quelques mots sur l'élimination de ces nanoparticules d'oxyde de fer. La société Guerbet a étudié (Corot *et al.* 2006) le devenir d'agents de contraste à base d'oxyde de fer et de dextran en les marquant respectivement au ^{59}Fe et au ^{14}C. Ils ont ainsi démontré que le dextran est éliminé par l'urine en 2 mois quand les nanoparticules le sont en 3 mois par les *faeces*.

I.3.2 Les nouveaux agents de contraste : vers un ciblage spécifique

Les agents de contraste utilisés aujourd'hui en IRM, qu'ils soient de type T_1 ou T_2, n'apportent pas de ciblage spécifique d'un organe ou d'une pathologie (à part le foie, les reins ou la vessie (Villaraza *et al.* 2010)). Bien que l'on puisse jouer sur la taille ou la surface pour changer la biodistribution, l'enjeu actuel du développement de nouvelles nanoparticules est le **ciblage spécifique** d'un type de pathologie soit par **imagerie moléculaire,** soit par **imagerie cellulaire** (cellules préalablement chargées en particules *ex vivo* puis réinjectés dans l'organisme).

I.3.2.1 Ciblage par imagerie moléculaire

Les nanoparticules d'oxydes de fer ont une surface réactive qui peut être modifiée par greffage de molécules organiques pour leur stabilisation en conditions physiologiques ou par couplage avec des biomolécules comme les protéines permettant une détection spécifique de certaines pathologies.
Il n'existe à ce jour aucun agent de contraste commercial à base d'oxyde qui cible spécifiquement des pathologies. Cependant, de nombreuses équipes travaillent sur la fonctionnalisation des (U)SPIO par des agents ciblants qui peuvent être séparés en plusieurs catégories :

- **Les anticorps**. Par exemple, les nanoparticules peuvent être fonctionnalisées pour greffer de l'herceptine (Chen *et al.* 2009) : anticorps monoclonal permettant la détection des récepteurs HER2/neu des cellules cancéreuses du sein (Funovics *et al.* 2004). Les USPIO peuvent également être couplés à l'anticorps SM5-1 qui sert à la détection du cancer du foie (Kou *et al.* 2008).
- **Les protéines**. Il existe une très grande quantité de protéines pouvant permettre des détections spécifiques. Parmi elles, la synaptogamine est utilisée pour détecter la mort cellulaire cardiovasculaire (Brauer 2003) ou l'albumine permet le ciblage des dystrophies musculaires (Straub *et al.* 2000).
- **Les acides carboxyliques**. Les nanoparticules couplées à l'acide folique peuvent cibler les cellules tumorales exprimant des récepteurs de folates (Sonvico *et al.* 2005).

Cette liste non exhaustive montre le développement important d'agents de contraste en IRM, spécifiques à certaines pathologies, grâce au greffage d'agents ciblants.

I.3.2.2 Ciblage par cellules circulantes marquées par des agents de contraste

Pour cibler des pathologies spécifiques, une autre technique consiste à injecter des cellules ayant préalablement internalisées des (U)SPIO et qui vont se localiser aux alentours d'une zone atteinte et modifier, à l'aide des oxydes de fer, son contraste permettant ainsi sa détection.

Dans le cas de l'inflammation, par exemple du système nerveux périphérique, des nanoparticules sont préalablement internalisées par des macrophages *ex vivo* (Stoll *et al.* 2009). Une fois injectées, ces cellules marquées se dirigent vers la zone inflammatoire et permettent sa détection en IRM.

Un autre exemple est le marquage de lymphocytes T par des SPIO couplés à une molécule fluorescente (fluorescéine) pour leur détection au préalable dans les cellules avant injection (Figure I.3.1).

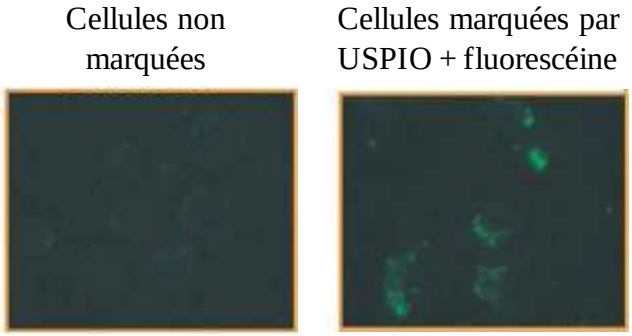


Figure I.3.1 : Localisation de nanoparticules d'oxyde de fer marquées à la fluorescéine dans des lymphocytes T observée en microscopie confocale d'après (Dodd et al. 2001).

Les lymphocytes T marqués se localisent dans la rate et créent un contraste négatif dans cet organe par rapport aux cellules T injectées n'ayant pas internalisé d'USPIO (contrôle) (Figure I.3.2).

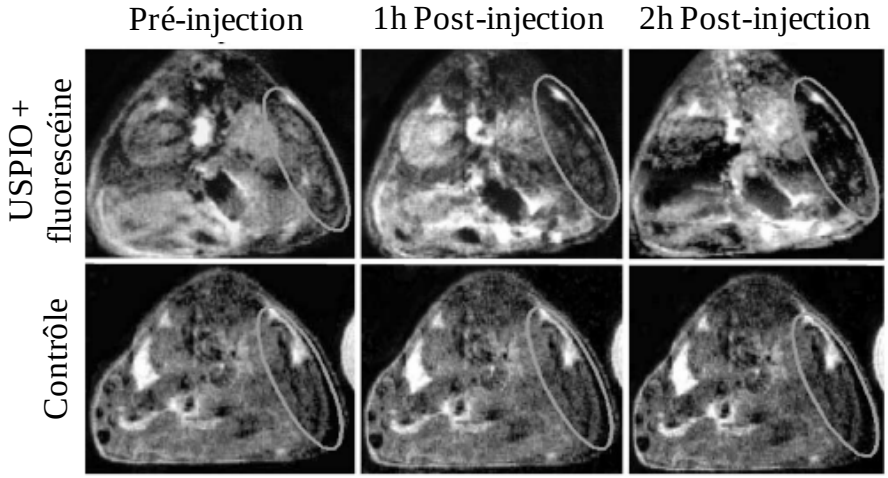


Figure I.3.2 : Imagerie IRM in vivo de souris incubées par des lymphocytes T marqués par des USPIO et des lymphocytes T non marqués (contrôle). Le cercle indique la rate montrant l'influence des oxydes de fer internalisés par les cellules sur le contraste de cet organe d'après (Dodd et al. 2001).

I.3.3 Objectifs de l'étude

Ce travail s'inscrit dans une thématique initiée en 2007 consistant en la détection de pathologies cardiovasculaires en Imagerie par Résonance Magnétique. Dans cette optique, il a fallu synthétiser des nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer présentant des demi-vies plasmatiques assez élevées pour ne pas être captées directement par le RES et ne pas se retrouver trop rapidement dans le foie.

De plus, ces nanohybrides doivent pouvoir être spécifiques pour des détections cardiovasculaires ultérieures soit par imagerie moléculaire en permettant leur couplage avec une protéine ou une molécule spécifique, soit par imagerie cellulaire. Il serait envisagé de coupler nos agents de contraste avec des agents à base de gadolinium pour pouvoir détecter conjointement des zones infarcies (gadolinium) et des zones de fibrose (riche en macrophage : (U)SPIO). Pour répondre à cet objectif, ces (U)SPIO ne doivent posséder que des effets T_2 ou T_2^* pour les séquences IRM utilisées pour éviter de masquer le signal des zones de fibrose (contraste blanc sur blanc).

Chapitre II Nanoparticules d'oxydes de fer : synthèses, modifications de surface et fonctionnalisations

II.1 Synthèses d'oxydes de fer nanostructurés

Dans cette partie, la synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer en suspension aqueuse sera décrite après une brève introduction sur les oxydes de fer.

II.1.1 Généralités sur les oxydes de fer

Avant de présenter les synthèses et caractérisations des oxydes de fer nanostructurés, il est nécessaire de formuler quelques rappels sur les mécanismes de formation et sur les phases d'oxydes de fer communément rencontrées lors de cette étude.

II.1.1.1 Mécanismes de formation

Les mécanismes de synthèse des oxydes de fer ont déjà été beaucoup étudiés au sein de mon laboratoire d'accueil (Guigue-Millot 1998; Belin 2002; Caillot 2002) ou dans d'autres équipes notamment celle de J-P. Jolivet (Jolivet 1994; Tronc *et al.* 2000; Jolivet *et al.* 2002; Jolivet *et al.* 2004). Pour comprendre les phases rencontrées lors des différentes voies de synthèse, un résumé des mécanismes sera détaillé dans cette partie.

II.1.1.1.1 Phénomènes d'hydrolyse

Un solide de type ionique se dissout dans l'eau en libérant en solution des cations et des anions. Dans le cas des sels de métaux alcalins (de type MX), la dissolution revient à une simple redispersion des ions solvatés sous la forme :

M^+, n H_2O avec $4 \leq n \leq 8$ $\quad\quad$ X^-, m H_2O avec $m \approx 6$

En revanche, les métaux de transition comme le fer conduisent à des cations de plus forte charge qui vont retenir les molécules d'eau et former des aqua-complexes. Les cations fer forment ainsi, dans l'eau, des complexes octaédriques avec les molécules d'eau du type $[Fe(OH_2)_6]^{z+}$, z+ représentant la charge de l'ion fer (2+ ou 3+). Ce phénomène apparaît entre pH = 1 et pH = 5 pour les ions ferriques (Fe^{3+}) et plus tard entre pH = 7 et pH = 9 pour les ions ferreux (Fe^{2+}). Ces complexes ne sont pas stables tels quels et une réaction d'hydrolyse a lieu par substitution de ligands aqua par des ligands hydroxo. L'hydrolyse est un phénomène acido-basique qui suit l'équilibre suivant :

$$\left[Fe(OH_2)_6\right]^{z+} \overset{H_2O}{\Leftrightarrow} \left[Fe(OH)_h(OH_2)_{6-h}\right]^{(z-h)+} + hH^+$$

Après formation des complexes aqua-hydroxo, deux réactions de nucléation ont lieu : l'olation et l'oxolation.

Le phénomène d'olation élimine une molécule d'eau tout en formant des ponts hydroxo :

$$H_2O\text{-}Fe\text{-}OH + Fe\text{-}OH_2 \rightarrow Fe\text{-}OH\text{-}Fe + 2\ H_2O$$

Le phénomène d'oxolation crée des ponts oxo :

$$Fe\text{-}OH + Fe\text{-}OH \rightarrow Fe\text{-}OH\text{-}Fe\text{-}OH \rightarrow Fe\text{-}O\text{-}Fe + H_2O$$

Pour que la précipitation d'un solide ait lieu, les précurseurs aqua-hydroxo doivent être de charge nulle. Dans le cas du fer, ces deux précurseurs sont l'hydroxyde ferreux $[Fe(OH)_2(OH_2)_4]$ et l'hydroxyde ferrique $[Fe(OH)_3(OH_2)_3]$.

Dans le cas de co-précipitation simultanée d'ions ferreux et ferriques, un motif tétraédrique se forme $[Fe_4(OH)_{10}(OH_2)_6]^0$ (Jolivet 1994). C'est ce précurseur qui semble être responsable de la formation de la structure spinelle de la magnétite (Fe_3O_4).

II.1.1.1.2 Nucléation, croissance et vieillissement des germes

Les hydroxydes de fer de charge nulle en solution se condensent par phénomènes d'olation et d'oxolation pour former des germes. Ces germes croissent par apport de matière provenant des précurseurs de charge nulle jusqu'à l'obtention de particules colloïdales. La croissance a également lieu par olation et oxolation.

Après nucléation, la croissance peut continuer pendant un temps plus ou moins long (allant de quelques dizaines de minutes à quelques mois). On parle alors de vieillissement. Durant cette étape, deux effets ont lieu :

1) **L'augmentation de la taille des particules** : les germes primaires vont continuer à croître par réaction d'olation oxolation ou par coalescence de particules élémentaires jusqu'à l'arrêt de la réaction. Ce phénomène, appelé **mûrissement d'Ostwald**, est à maîtriser pour l'obtention de nanoparticules de tailles monodisperses. En effet, J-P. Jolivet (Jolivet 1994) a montré, dans le cas de la magnétite, que le temps de vieillissement augmente la taille moyenne et la distribution de taille des particules de magnétite (Fe_3O_4) de 7,7 nm en moyenne pour une heure de réaction, à 8,4 nm après quatre heures et à 10,6 nm après cinq jours de réaction.
2) **Le changement de type cristallin et de morphologie** : les réactions de précipitation forment une phase métastable (souvent un oxo-hydroxyde) qui va se transformer au cours du vieillissement en une phase thermodynamiquement plus stable (dans ce cas souvent un oxyde) par phénomène de recristallisation reprécipitation (Jolivet *et al.* 2006). En changeant les conditions de réaction, des phases métastables de géométries différentes peuvent être obtenues préférentiellement tout en donnant la même phase stable à la fin. Une même phase obtenue après vieillissement peut ainsi être de formes différentes. L'exemple le plus connu dans le cas des oxydes de fer est l'hématite (α-Fe_2O_3). Sans rentrer dans les détails, l'hématite peut être en forme d'aiguilles ou cubiques suivant l'oxo-hydroxyde ferrique synthétisé auparavant (Diamandescu *et al.* 1999; Perez-Maqueda *et al.* 1999; Adair *et al.* 2000; Chen *et al.* 2001; Raming *et al.* 2002; Shao *et al.* 2005; Liu *et al.* 2007).

II.1.1.1.3 Les conditions nécessaires à l'hydrolyse

Pour précipiter un solide, il est nécessaire d'avoir hydrolysé au préalable les ions ferreux et ferriques. Deux paramètres principaux permettent l'hydrolyse des cations fer : le pH et la température.

1) **Le pH** : Comme vu précédemment, la réaction d'hydrolyse est un phénomène acido-basique. Ainsi, en augmentant la concentration d'hydroxydes en solution, les aqua-complexes vont se déprotonner en partie et donner des aqua-hydroxo ou des oxo-hydroxo selon l'équilibre suivant :

$$[Fe-OH_2]^{z+} \overset{H_2O}{\Leftrightarrow} [Fe-OH]^{(z-1)+} + H^+ \overset{H_2O}{\Leftrightarrow} [Fe-O]^{(z-2)+} + 2\cdot H^+$$

Plus le cation est acide, plus sa forme complexée sera hydroxo voire oxo à de faibles pH. L'acidité d'un cation dépend de sa charge (plus celle-ci est élevée plus il est acide), de sa taille et de son électronégativité. Pour notre étude, l'hydroxyde ferrique ($Fe(OH)_3$) apparaît à température ambiante vers pH = 3 quand l'hydroxyde ferreux ($Fe(OH)_2$) est formé à pH supérieur à 6-7 (Jolivet *et al.* 2004).
2) **La température** : En augmentant sa température, la dissociation de l'eau augmente permettant la formation de complexes oxo-hydroxo à des pH plus bas qu'à température

ambiante. Là encore, la charge du cation joue un rôle et il faut augmenter la température pour hydrolyser un cation de charge inférieure à 4. Par exemple, vers 100°C les hydroxydes de fer 3 apparaissent à pH très acide (pH < 1).

II.1.1.1.4 Conclusion sur la formation des oxydes

Les ions ferriques et ferreux s'hydrolysent en fonction du pH et/ou de la température pour former par des mécanismes d'olation-oxolation des nanoparticules de différentes phases suivant les conditions de réaction. Dans la partie suivante, seules les phases rencontrées lors de cette étude seront présentées.

II.1.1.2 Les oxydes de fer

II.1.1.2.1 L'hématite (α–Fe_2O_3)

Parmi les oxydes de fer, l'hématite (α-Fe_2O_3) est la phase thermodynamiquement stable pour les gros grains (ϕ > 20 nm). De structure rhomboédrique de paramètres de maille a = 5,038 Å et c = 13,776 Å, elle est majoritairement synthétisée à partir d'ions ferriques (Fe^{3+}). Sa morphologie a été beaucoup étudiée et dépend de nombreux paramètres comme le pH, la température, le contre-ion et le temps de réaction (Music *et al.* 1997; Adair *et al.* 2000; Iwasaki *et al.* 2000; Chen *et al.* 2001; Jing *et al.* 2004). Ainsi, bien que l'hématite soit la phase stable, les intermédiaires de réaction (souvent des oxo-hydroxydes) peuvent rester en suspension pendant plusieurs semaines avant dissolution reprécipitation. C'est le cas de la goethite (α-FeOOH) (Kosmulski *et al.* 2003; Lemaire *et al.* 2004; Liu *et al.* 2007; Bashir *et al.* 2009), hydroxyde de fer métastable également observé lors de nos synthèses.

L'hématite est également formée par grossissement de grains d'oxyde de fer (Fe_3O_4 ou γ-Fe_2O_3) lors de traitements thermiques (aux alentours de 400-450°C à pression ambiante) (Gnanaprakash *et al.* 2006; Belin *et al.* 2007) ou de hautes pressions (Clark *et al.* 2005). Elle ne possède pas de propriété paramagnétique et n'est donc pas utilisable pour des applications d'agents de contraste en IRM. L'hématite a donc été la phase à éviter durant les synthèses.

II.1.1.2.2 La structure spinelle : la magnétite (Fe_3O_4) et la maghémite (γ–Fe_2O_3)

II.1.1.2.2.1 Généralités sur les oxydes de fer de structure spinelle

En mettant simultanément des ions ferreux et ferriques en solution, le phénomène de condensation mène à des phases spécifiques (Jolivet *et al.* 2006). Par exemple, au ratio Fer (II) / Fer (III) = 0,5, le précurseur tétraédrique $[Fe_4(OH)_{10}(OH_2)_6]^0$ va se condenser par olation avec l'excès d'hydroxyde ferrique $[Fe(OH)_3(OH_2)_3]$ en solution et probablement de manière très rapide grâce à la délocalisation électronique entre les ions fer (II) et fer (III)[5].

La phase obtenue est la magnétite (Fe_3O_4) précipitant selon l'équation suivante :

$$1\ Fe^{2+} + 2\ Fe^{3+} + 8\ OH^- \rightarrow Fe_3O_4 + 4\ H_2O$$

La magnétite cristallise dans le groupe d'espace Fd3m de système cubique. Elle est construite à partir de l'arrangement cubique faces centrées des anions oxygène O^{2-}. La magnétite est de structure dite spinelle AB_2O_4 (Figure II.1.1) avec A les atomes en sites tétraédriques entourés de quatre ions O^{2-} et B les atomes en sites octaédriques entourés de six ions O^{2-}. Les ions ferriques sont distribués dans les sites tétraédriques et octaédriques quand les ions ferreux sont seulement dans les sites octaédriques : on parle alors de structure spinelle inverse. Son paramètre de maille est a = 8,396 Å.

[5] Cette hypothèse sur la catalyse de la condensation de magnétite grâce à la délocalisation électronique des ions ferreux et ferriques a été formulée par Jolivet mais n'est toujours pas complètement comprise à ce jour.

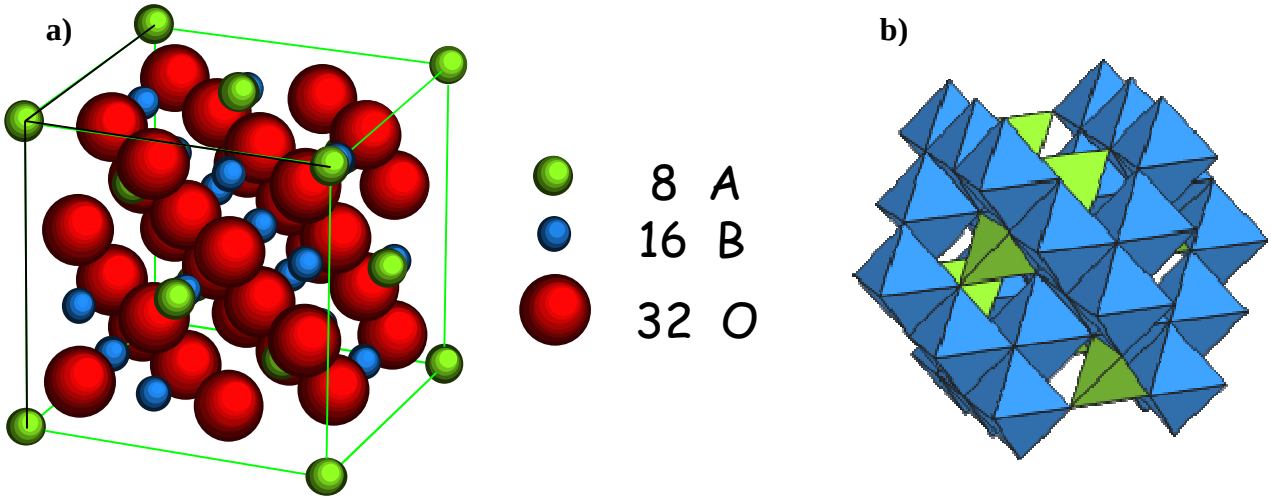


Figure II.1.1 : (a) Représentation de la structure cristallographique d'une structure spinelle AB_2O_4 avec une origine prise sur un site tétraédrique. (b) Sites octaédriques (bleu) et sites tétraédriques (vert) de cette structure.

Pour représenter la position des ions dans sa structure, la magnétite peut alors s'écrire :

$$[Fe^{3+}]_A[Fe^{3+}Fe^{2+}]_BO_4 \qquad \text{Eq. II.1.1}$$

avec A les sites tétraédriques et B les sites octaédriques.

La magnétite s'oxyde facilement par oxydation des ions fer (II) la rendant ainsi sous stœchiométrique en ions ferreux. La phase la plus oxydée est la maghémite (γ-Fe_2O_3) de même structure spinelle mais de formule :

$$[Fe^{3+}]_A[Fe_{5/3}{}^{3+}\square_{1/3}]_BO_4 \qquad \text{Eq. II.1.2}$$

où les ions ferreux ont totalement été oxydés et où $\square$ représente les lacunes cationiques alors formées au sein du sous réseau cationique.

Le paramètre de maille de la maghémite est a = 8,345 Å. Cependant, sous l'oxydation partielle des ions ferreux, la magnétite se transforme en un oxyde sous stœchiométrique en fer (II). Cet oxyde cristallise dans la même structure spinelle mais de formule $Fe_{3(1-\delta)}O_4$, avec δ la déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène. Le paramètre de maille de cette magnétite partiellement oxydée est donc compris entre celui de la magnétite (8,396 Å) pour $\delta = 0$ et celui de la maghémite (8,345 Å) pour $\delta = 1/9 = 0{,}111$. Par diffraction des rayons X, il est donc possible de calculer le taux d'oxydation de la magnétite en mesurant le paramètre de maille des cristallites. Cette méthode, appelée méthode de Poix, est détaillée dans l'annexe A.2. Il est également possible de donner le paramètre η : proportion de fer (II) par rapport aux cations fer totaux ($\eta = 33\%$ pour la magnétite et $\eta = 0\%$ pour la maghémite).

II.1.1.2.2.2 Propriétés de la structure spinelle

La magnétite et la maghémite ont des propriétés magnétiques intéressantes pour des applications en imagerie par résonance magnétique (IRM). Les deux phases sont **ferrimagnétiques** à température ambiante, c'est-à-dire qu'elles possèdent une aimantation rémanente quand elles sont soumises à un champ magnétique. Cependant, en passant à des tailles de cristallites inférieures à 20 nm (Chatterjee *et al.* 2003; Teja *et al.* 2009), les particules deviennent **superparamagnétiques** à température ambiante, c'est-à-dire que leur aimantation disparaît en absence de champ d'excitation. Cette propriété intéressante permet d'utiliser les nanoparticules d'oxyde de fer de structure spinelle dans le domaine de l'imagerie par résonance magnétique (IRM dont le principe est décrit en partie I.2).

La magnétite et/ou la maghémite sont les phases recherchées pour des applications biomédicales au détriment de la phase hématite qui pourrait apparaître durant les synthèses et qu'il faudra donc éviter.

II.1.2 Synthèse batch de nanoparticules d'oxyde de fer de structure spinelle

Dans cette partie, après un bref aperçu sur les méthodes de synthèses de nanoparticules d'oxyde de fer, la synthèse de nos ferrofluides sera détaillée.

II.1.2.1 Différentes méthodes de synthèse de ferrofluides

Les synthèses de nanoparticules de magnétite ont été très largement étudiées dans la littérature (Huber 2005). De nombreuses voies existent comme la décomposition thermique d'organométalliques comme l'acetylacétonate de fer (III) ($Fe(acac)_3$) (Pinna *et al.* 2005) ou le pentacarbonyle de fer ($Fe(CO)_5$) (Lee *et al.* 2006) dans des solvants organiques (Hyeon *et al.* 2001), par traitements thermiques (Lee *et al.* 2006) ou par sonication (Pinkas *et al.* 2008). Pour des raisons de compatibilité biologique, et bien que ces synthèses permettent d'obtenir des nanoparticules de taille monodisperse, les synthèses par voies organiques ont été proscrites pour éviter de retrouver des traces de solvants ou des résidus de synthèses pouvant influer sur la toxicité des matériaux.

Des synthèses par voie microémulsion eau dans huile sont également développées. Brièvement, une microémulsion d'ions ferreux est mélangée à une microémulsion de soude. Les réactions ont lieu aux interfaces des gouttelettes et permettent la précipitation de l'oxyde de fer (Chin *et al.* 2007) dans des nanoréacteurs contrôlant ainsi la taille et la distribution de taille des nanoparticules. Cette méthode permet d'obtenir des nanoparticules monodisperses dont les diamètres peuvent être calibrés par les tailles des gouttelettes de l'émulsion. En revanche, les produits généralement utilisés pour former la microémulsion sont toxiques et donc peu utilisable pour des applications biologiques.

La méthode de synthèse la plus communément utilisée est celle proposée par Massart (Massart 1981). L'idée de Massart a été de synthétiser une suspension aqueuse stable de nanoparticules d'oxydes de fer pour modification de surface et essais biologiques ultérieurs. Cette suspension stabilisée par répulsion électrostatique est appelée **ferrofluide**.
Cette synthèse consiste à co-précipiter des sels ferreux et ferriques (souvent des chlorures ou des sulfates) respectivement en rapport molaire de (1:2) dans une base aqueuse. Les nanoparticules en suspension sont ensuite lavées en milieu acide ou basique pour assurer leur stabilité (Kim *et al.* 2001; Berret *et al.* 2006) ou sont centrifugées (Martinez-Mera *et al.* 2007; Sun *et al.* 2007) pour éliminer les ions résiduels de la suspension.

II.1.2.2 Nos synthèses de ferrofluide

II.1.2.2.1 Premières étapes : la co-précipitation et le lavage des oxydes synthétisés

La Figure II.1.2 résume les étapes nécessaires pour la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer.

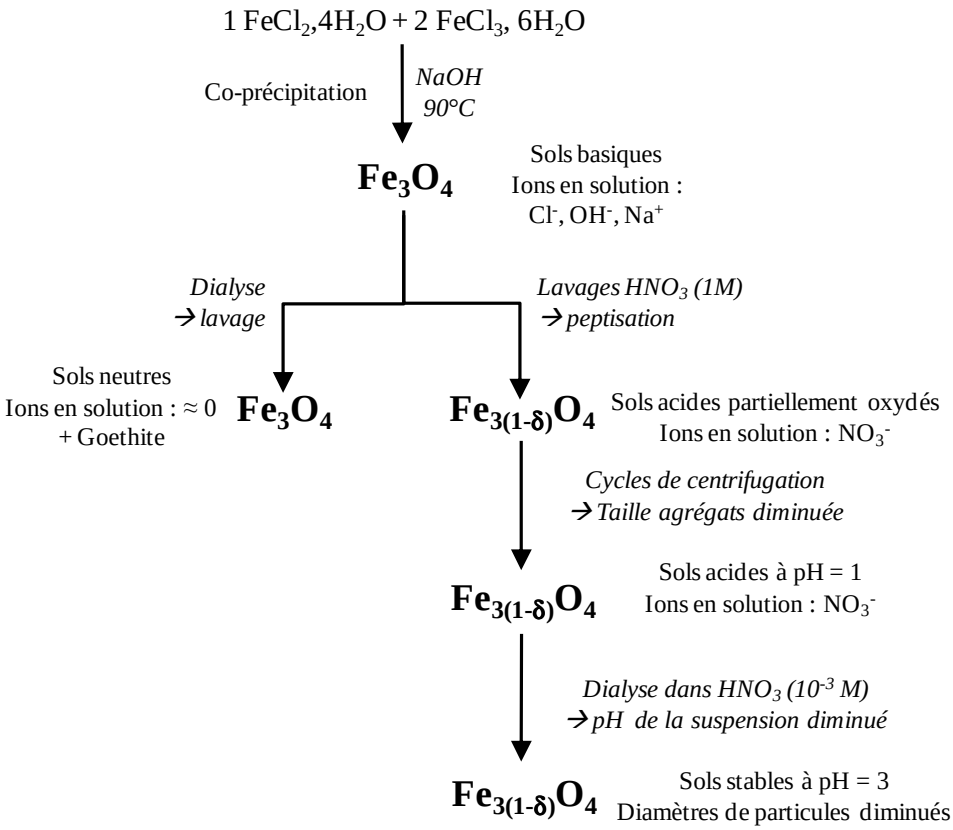


Figure II.1.2 : Schéma réactionnel de synthèse d'oxydes de fer

II.1.2.2.1.1 Synthèse

Pour les applications biologiques visées, les nanoparticules doivent répondre à certains critères du cahier des charges définis dans le Chapitre I. Ainsi, il est nécessaire, dans un premier temps, de synthétiser des oxydes de fer de tailles de cristallites contrôlées. Elles doivent, par ailleurs, être sous forme d'agrégats élémentaires stables en milieu aqueux.

Le choix de la synthèse s'est porté sur un protocole de type Massart car connu pour sa reproductibilité et sa grande quantité de matière synthétisée en une étape (Sun *et al.* 2004; Chin *et al.* 2007; Teodor *et al.* 2009). Par ailleurs, la méthode d'élimination des contre-ions de réaction utilisée (peptisation en milieu acide couplée à des cycles de centrifugation ou décantation) permet d'obtenir des sols de nanoparticules stabilisés.

Dans un premier temps, 20 mL de chlorure de fer (II) à 2M dans de l'acide chlorhydrique à 2M ont été mélangés à 80 mL de chlorure de fer (III) à 1M (ratio molaire Fe^{II}/Fe^{III}=0,5). Les précurseurs de fer sont placés en milieu très acide afin de limiter le phénomène d'oxydation des ions ferreux en ions ferriques (Figure II.1.3).
Les cations métalliques ont ensuite été co-précipités goutte à goutte dans 800 mL de soude à 0,75 M à 90°C. La solution est ensuite agitée pendant 15 minutes soit un temps de réaction de trente minutes environ. La suspension obtenue est à pH = 14 et décante très rapidement.

Le ratio molaire étant stœchiométrique, la quantité de poudre attendue, au vu des réactifs utilisés, est de 9,3 g.

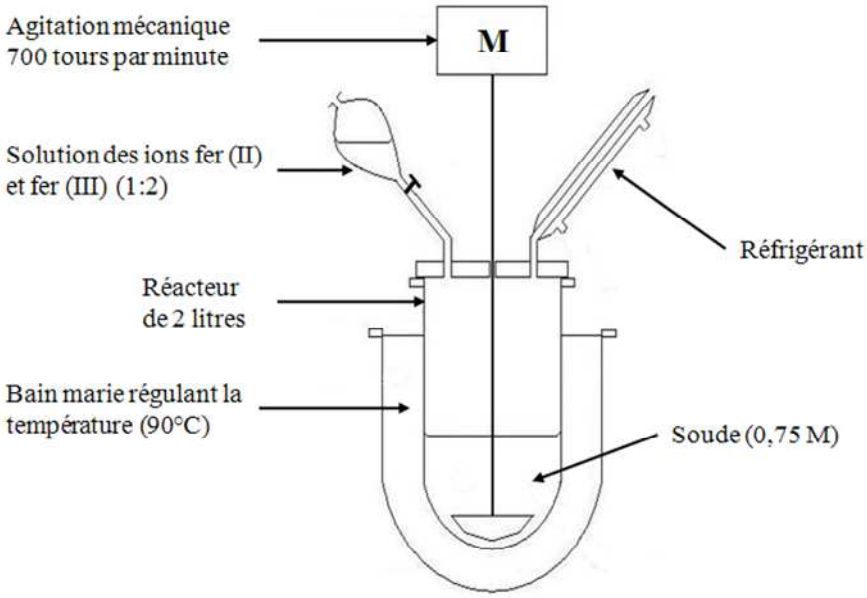


Figure II.1.3 : Schéma du réacteur de synthèse. Les ions métalliques sont ajoutés par ampoule de coulée dans le réacteur contenant de la soude chauffée à 90°C par bain marie. L'ensemble est agité mécaniquement à 700 tours.min^{-1}. Un système de réfrigération est utilisé pour récupérer l'eau qui s'évapore pendant la synthèse

II.1.2.2.1.2 Lavage des suspensions d'oxyde de fer

II.1.2.2.1.2.1 Lavage par dialyse des nanoparticules

Après synthèse, la suspension contient en plus des nanoparticules, des contre-ions chlorures issus de la réaction, une grande quantité d'ions hydroxydes (OH^-) et une partie d'ions ferriques en excès (quelques ions ferreux s'étant oxydés lors de la réaction).

Dans le but d'obtenir un ferrofluide débarrassé de ces ions parasites, des étapes de purification sont nécessaires.

Dans un premier temps, pour éviter les lavages par centrifugation, étape pouvant agglomérer les nanoparticules, les sols ont été dialysés. La suspension basique est placée tout de suite après réaction de trente minutes dans une membrane de dialyse de seuil de coupure de 3,5 kDa puis plongée dans de l'eau distillée. Par effet de diffusion, les ions présents dans le dialysat traversent la membrane contrairement aux nanoparticules (Figure II.1.4). Ce phénomène se stabilise quand les potentiels chimiques des ions de part et d'autre de la membrane sont identiques. L'eau de dialyse doit ainsi être renouvelée plusieurs fois jusqu'à ce que la conductivité du dialysat soit proche de celle de l'eau distillée.

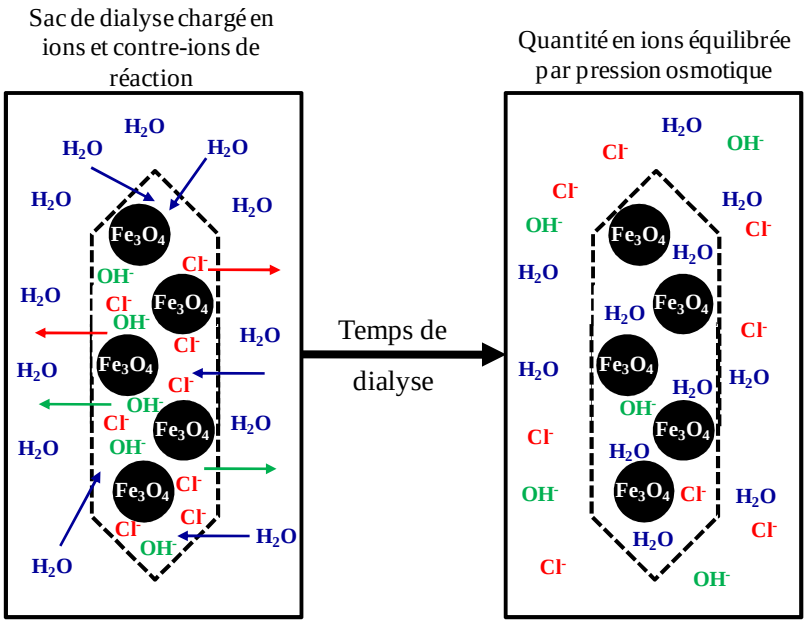


Figure II.1.4 : Schéma de dialyse. Les ions de la solution après synthèse vont être éliminés par les pores de la membrane de dialyse et de l'eau va rentrer dans le sac de dialyse. Les concentrations en ions des solutions à l'intérieur et à l'extérieur de la membrane vont s'équilibrer. Plusieurs changements d'eau de dialyse sont nécessaires pour éliminer la majorité des contre-ions de réaction.

Pour optimiser le temps de lavage, la conductivité et le pH ont été mesurés sur l'eau de dialyse pour différents temps de dialyse (Figure II.1.5). L'eau distillée a une conductivité de 1,31 µS à 16,9°C et un pH de 6.

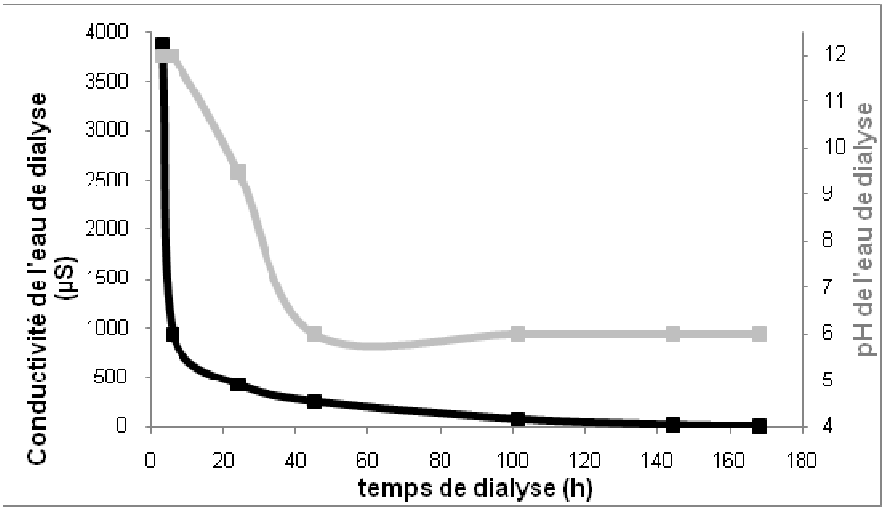


Figure II.1.5 : Evolution en fonction du temps de la conductivité (noir) et du pH (gris) de l'eau de dialyse. L'eau de dialyse est changée toutes les trois heures dans les premières six heures, puis toutes les vingt-quatre heures pendant les deux jours suivants et enfin environ toutes les quarante-huit heures le reste du temps. Temps totale de dialyse : une semaine.

Comme la diffusion est un phénomène dépendant des différences de concentrations de part et d'autre de la membrane, l'équilibre est d'autant plus vite atteint que cette différence est élevée. La conductivité baisse drastiquement en dix heures environ quand le pH passe en dessous de 10. Par différents changements d'eau de dialyse, ces valeurs s'équilibrent entre 2 et 5 jours. Pour estimer la concentration ionique dans l'eau, des mesures de conductivités ont été réalisées pour des solutions de chlorure de sodium (concentrations : 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} ; 10^{-2} ; 10^{-1} ; 0,15 M) (Figure II.1.6).

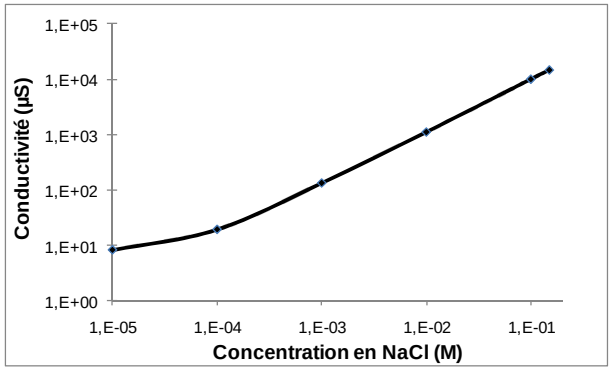


Figure II.1.6 : Evolution de la conductivité à 24°C en µS en fonction de la concentration en NaCl en mol.L^{-1}

Quand la conductivité est inférieure à 10 µS en 150 heures, la concentration ionique est inférieure à 10^{-4} M en équivalent NaCl donc diluée plus de 10000 fois par rapport à la concentration initiale mesurée dans l'eau de dialyse.

La suspension est donc lavée en 150 heures avec une demi-douzaine de changements d'eau de dialyse (d'abord toutes les trois heures, puis toutes les vingt-quatre heures et toutes les quarante-huit heures). Ce temps a été retenu pour tous les lavages dans le reste de ce document. Ce type de lavage semble présenter des intérêts certains face aux centrifugations. Le sol ainsi purifié n'est jamais soumis à des contraintes physiques dues à l'accélération de la centrifugeuse, son utilisation est moins laborieuse et moins de matière est perdue lors de cette étape.

Cette méthode n'a cependant pas été retenue pour la suite des synthèses mais uniquement pour les greffages de polymères (partie II.2.2) pour deux principales raisons :

1) Les suspensions ainsi débarrassées de leurs ions parasites se retrouvent vers pH = 6, pH proche du point isoélectrique (partie II.1.2.3). Dans ces conditions, les suspensions sédimentent très rapidement. Il n'est donc pas envisageable de fonctionnaliser par la suite ces nanoparticules.
2) Il apparaît également en observant les oxydes de fer au Microscope Electronique en Transmission (MET) des oxydes de fer en forme de nano-bâtonnets (Figure II.1.7).

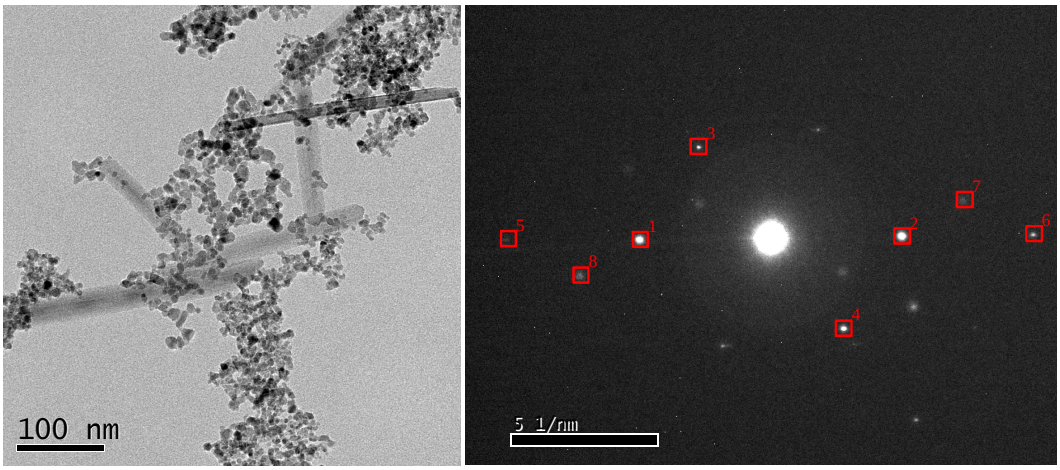


Figure II.1.7 : Cliché MET et cliché de diffraction de nano-bâtonnets d'oxyde de fer

Après analyse des clichés de diffraction électronique sur ces particules, la phase retenue pour ces nano-bâtonnets est la goethite (α-FeOOH). Le Tableau II.1.1 résume les distances interréticulaires trouvées par diffraction électronique et leurs correspondances avec les distances des plans de la goethite.

					Correspondance Goethite		
N° spot	Distance (nm)	Moyenne (Å)	Amplitude (U.A)	Moyenne (U.A)	d Goethite (Å)	Intensité Goethite (%)	Plan Goethite
1	0,22	2,2	921	1009	2,190	100	(140)
2	0,22		1098				
3	0,25	2,5	112	220	2,527	32	(101)
4	0,25		329				
5	0,11	1,1	73	47	1,095	5	(280)
6	0,11		21				
7	0,15	1,5	33	35,5	1,506	37	(250)
8	0,15		38				

Tableau II.1.1 : Distances interréticulaires de la Figure II.1.7 des nano-bâtonnets d'oxyde de fer et comparaison avec celles de la goethite (Fiche ICDD 01-081-0464)

La distance interréticulaire donnant les tâches de diffraction les plus intenses est 2,2 Å est proche de la distance 2,19 Å la plus intense de la goethite correspondant au plan (140). Ces nano-bâtonnets sont donc vraisemblablement de la goethite (γ-FeOOH).

La goethite est un oxo-hydroxyde de fer qui se forme à partir d'ions ferriques dans des temps assez longs (équivalents à ceux de la dialyse : sur plusieurs jours) et qui reste présente en suspension au détriment de l'hématite (α-Fe_2O_3) à un pH basique compris entre 10 et 14 (Jolivet *et al.* 2004; Lemaire *et al.* 2004; Thies-Weesie *et al.* 2007) qui est le pH le plus approprié pour la formation de la goethite (Schwertmann *et al.* 1983).

L'apparition de goethite pourrait s'expliquer par la durée de l'étape de dialyse. En effet, la diffusion étant un processus lent, une partie des ions ferriques en excès dans la suspension est restée dans le dialysat pendant près de 12 heures (Figure II.1.6). Par ailleurs, le pH dans cet intervalle de temps reste compris entre 10 et 14 permettant la croissance de ces oxo-hydroxydes.

Cette phase, bien que minoritaire, n'étant pas aisée à éliminer et la suspension lavée n'étant pas facilement redispersable même à pH acide, une autre méthode de lavage a été retenue : la **peptisation** avec l'acide nitrique (HNO_3).

II.1.2.2.1.2.2 La peptisation des nanoparticules d'oxyde de fer

La dialyse des suspensions basiques étant trop lente pour éviter la synthèse de phases secondaires, une autre approche de lavage a été choisie.

Le sol basique a été lavé sept fois par cycles successifs de décantation magnétique et d'élimination du surnageant et d'ajout d'un volume constant d'acide nitrique à 1M (400 mL). Les ions ferriques et les hydroxydes ont été éliminés et les ions chlorures remplacés par des ions nitrates (NO_3^-) au cours de ces étapes. Les oxydes de fer ont ainsi été chargés positivement en milieu acide et ont donc été stabilisés par répulsion électrostatique (partie II.2). Ainsi, le temps total de contact des précurseurs de fer avec la base est d'environ une heure en comptant la décantation du sol en milieu basique avant l'ajout d'acide.

L'acide nitrique étant en large excès, un cycle de centrifugation d'une heure a été effectué pour éliminer une partie des ions nitrates, puis le sol a été dialysé dans l'acide nitrique à pH = 3 pour augmenter son pH pour des essais de modification de surface ultérieurs(Massart 1981). La concentration de la suspension finale à pH = 3 est de 36 mg d'oxydes de fer par mL.

II.1.2.2.2 Caractérisation structurale des nanoparticules d'oxyde de fer

Les nanoparticules synthétisées ont été analysées par diffraction des rayons X pour connaître la phase présente et le degré d'oxydation des ions fer présents dans les cristallites (Figure II.1.8).

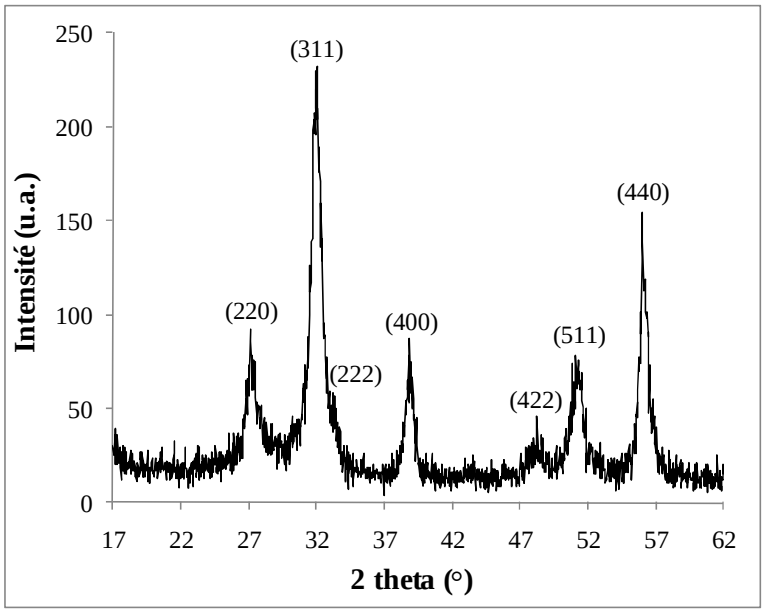


Figure II.1.8 : Diffractogramme des nanoparticules synthétisées par la méthode Massart, λ = 1,3922 Å

Par reconnaissance de phases sur ce diffractogramme, la phase spinelle d'oxyde de fer est majoritaire mais il n'est pas possible de conclure, par cette méthode, quant à la présence de maghémite (γ-Fe_2O_3) ou de magnétite (Fe_3O_4). Pour avoir une information plus précise sur la structure, le paramètre de maille (a) est calculé en tenant compte du décentrage de l'échantillon, *via* le logiciel Topas[6].

Le paramètre de maille trouvé par cette méthode est a = 8,363 ± 0,003 Å. Cette valeur doit être comparée aux paramètres de maille de Fe_3O_4 (δ=0, ηFe^{2+} = 33%) et γ-Fe_2O_3 (δ=1/9, ηFe^{2+} = 0%) qui sont respectivement de 8,396 Å et 8,345 Å. Par application de la méthode de Poix (Annexe A.2), il est possible à partir du paramètre de maille, de trouver la déviation par rapport à la stœchiométrie de l'oxygène (δ), les proportions des Fe^{II}, Fe^{III} et des lacunes cationiques ainsi que le paramètre η. Plus δ est faible, moins l'oxyde de fer est oxydé et plus η sera proche de la valeur de la magnétite (33%).
Dans notre cas, la déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène est de 0,077 et η = 13,3%. Notre magnétite peut donc s'écrire $Fe_{3(1-0,077)}O_4$.

Le temps de mûrissement et le lavage acide des oxydes de fer sont des étapes qui favorisent l'oxydation (Jolivet *et al.* 2004) des ions ferreux des nanoparticules. Le taux de fer (II) dans la structure n'est pas en quantité stœchiométrique pour assimiler les oxydes de fer à de la magnétite pure (Fe_3O_4) mais est trop présent pour parler de maghémite (γ-Fe_2O_3).

L'oxyde de fer synthétisé s'écrira pour la suite de ce manuscrit **$Fe_{3(1-\delta)}O_4$** et sera appelé **magnétite** par abus de langage et parce que la phase possède toujours des ions ferreux.

[6] Ce logiciel commercialisé par la société Bruker-AXS permet d'effectuer l'analyse microstructurale d'une poudre passée en diffraction des rayons X.

II.1.2.2.3 Détermination de la tailles des particules et de leur surface spécifique

Il est important pour tout le reste du manuscrit de différencier deux types de tailles. La taille des cristallites et la taille des agrégats élémentaires (annexe A.3).

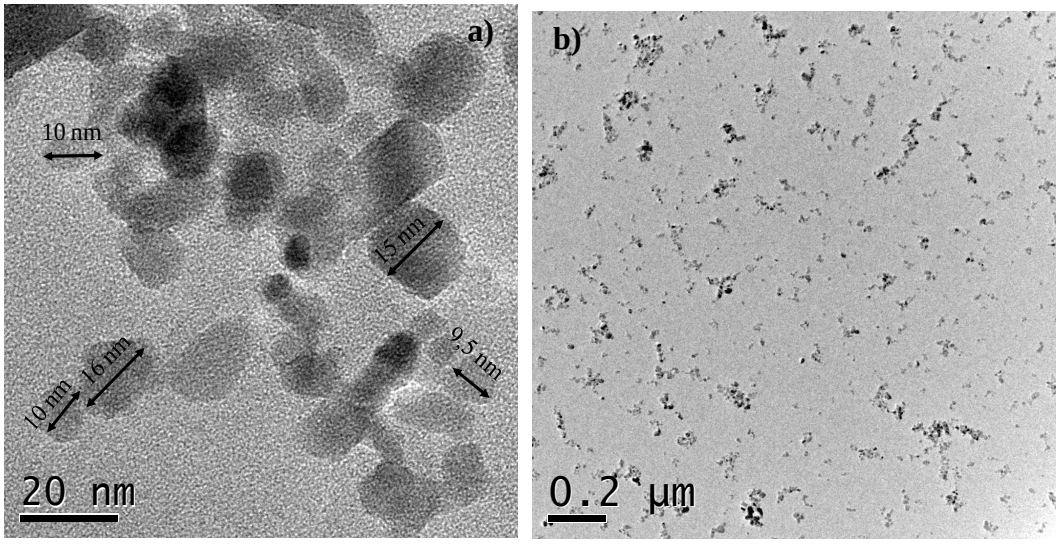


Figure II.1.9 : (a) Clichés MET de cristallites et (b) d'agrégats de cristallites.

II.1.2.2.3.1 Taille des cristallites

Dans un premier cas, le diamètre du cristal élémentaire de $Fe_{3(1-\delta)}O_4$ est calculé à l'aide du diffractogramme des rayons X *via* la largeur à mi-hauteur des raies de diffraction grâce à la méthode de Le Bail sur le logiciel Topas. Les nanoparticules de magnétite étant monocristallines, la taille trouvée est celle d'une cristallite. Le diamètre calculé par cette méthode est de (9,8 ± 0,2) nm mais ne donne pas de renseignement sur la distribution en taille.

La taille des cristallites a également été mesurée par comptage de 100 cristallites en microscopie électronique en transmission (Figure II.1.9). Pour estimer au mieux leur taille, les cristallites ont été considérées comme des sphères avec comme diamètre, la taille maximale mesurée (Figure II.1.10).

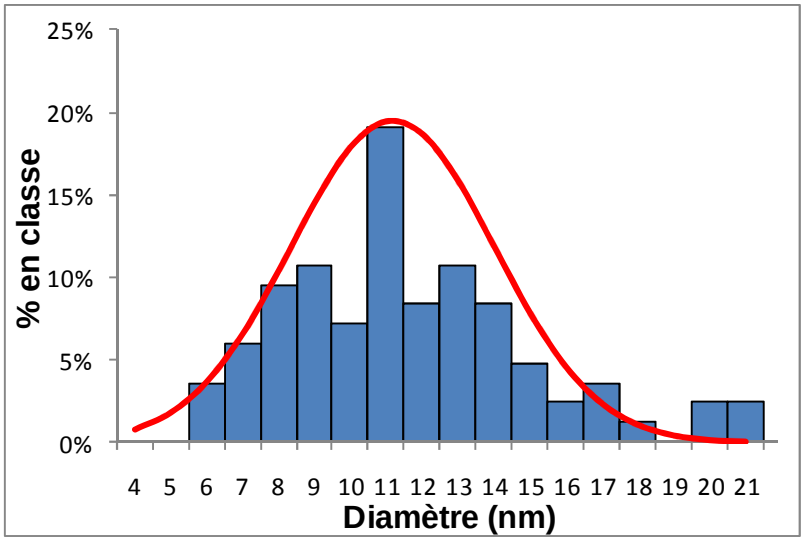


Figure II.1.10 : Comptage en MET des cristallites des oxydes de fer et distribution de type log-normale corrélée

La distribution en taille peut être décrite par une loi statistique log-normale (Eq II.I.3).

$$P(d) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \cdot \sigma \cdot d} \exp\left[- \frac{\ln^2(d / d_0)}{2\sigma^2} \right] \qquad \text{Eq. II.1.3}$$

où d_0 est le diamètre médian (ou moyenne géométrique) et σ l'écart type des logarithmes des diamètres.

La distribution des diamètres est large et sa moyenne est de (11,1 ± 2,6) nm.
Pour corréler ces résultats, le diamètre est également calculé par la méthode BET :

$$S_{BET} = \frac{6000}{\rho \cdot d} \qquad \text{Eq. II.1.4}$$

avec ρ la masse volumique du matériau ($g.cm^{-3}$), S_{BET} la surface spécifique des nanoparticules ($m^2.g^{-1}$) synthétisées et d leur diamètre en nm.

Bien que les nanoparticules seront nommées magnétite dans le rapport, leur masse volumique s'approche plus de celle de la maghémite, la plupart des ions ferreux étant oxydés. La masse volumique retenue pour le calcul du diamètre est celle de la maghémite (4,857 $g.cm^{-3}$).

La surface spécifique calculée par la méthode BET après un dégazage à 150°C est de (90 ± 1) $m^2.g^{-1}$ ce qui donne, dans l'hypothèse d'un grain sphérique et sans porosité, un diamètre de cristallite de (13,7 ± 0,2) nm. Le diamètre d'une cristallite calculé en BET est un peu plus grand que les valeurs en DRX et en comptage MET car le calcul est effectué à partir du volume adsorbé par une particule élémentaire mais si des cristallites sont agrégées, une partie de leur surface n'est pas accessible au gaz diminuant la surface spécifique et augmentant ainsi le diamètre calculé des particules.

Les tailles mesurées par ces différentes techniques sont résumées dans le Tableau II.1.2.

Méthode	diamètre (nm)	± Δd
DRX	9,8	0,2
MET	11	3
BET	13,7	0,2

Tableau II.1.2 : Résumé des tailles de cristallites obtenues par différentes méthodes.

En moyennant les résultats obtenus par ces différentes méthodes de calcul, la taille de cristallites moyenne est de (11,5 ± 1,0) nm, taille compatible avec les caractéristiques superparamagnétiques recherchées.

II.1.2.2.3.2 Taille des agrégats élémentaires

La taille des cristallites permet d'obtenir des propriétés magnétiques intéressantes (partie I.2) mais quand on parle de tailles de particules, il faut également s'intéresser au diamètre des agrégats élémentaires. En effet, les cristaux de magnétite s'agrègent en grains de plusieurs dizaines de nanomètres.

Pour mesurer ces tailles en solution, la technique de prédilection est la diffusion dynamique de la lumière (DLS) également appelée la spectroscopie à corrélation de photon (PCS). Cette technique est basée sur la mesure du mouvement brownien des particules (interaction entre les molécules de solvant et les particules créant un mouvement aléatoire) et permet de mesurer des particules de un nanomètre à quelques micromètres.

La vitesse de déplacement des particules est définie par le coefficient de diffusion translationnel D qui d'après l'équation de Stokes-Einstein (équation II.1.5) est proportionnel au diamètre hydrodynamique d'un grain sphérique :

$$d_H = \frac{k \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D}$$ Eq. II.1.5

avec d_H le diamètre hydrodynamique (en nm), T la température (en K), k la constante de Boltzmann, η la viscosité dynamique (en cP) et D le coefficient de diffusion translationnel.

Le diamètre hydrodynamique est le diamètre de la particule seule entourée de sa double couche ionique. Plus le milieu a une force ionique importante, plus cette couche est petite. Les mesures ont été effectuées dans une solution de sel (NaCl) à 10^{-2}M pour garder la force ionique constante pour les mesures de la partie suivante (partie II.1.2.3).

Les diamètres sont mesurés en intensité. La taille moyenne obtenue est toujours beaucoup plus grande que celle observée en « réalité » car d'après Rayleigh, l'intensité diffusée est fonction du diamètre à la puissance 6 (d^6). Ainsi, une particule dix fois plus grosse qu'une autre donnera une intensité un million de fois supérieure à celle-ci. Les logiciels de diffusion de lumière peuvent cependant donner par calcul des valeurs en volume (soit en diamètre au cube : d^3) et en nombre (d^1) pour des particules quasi-sphériques.

Pour comparer la précision du calcul de taille en nombre par DLS, ces tailles ont été comparées aux tailles obtenues par comptage MET. Les mesures en DLS (Figure II.1.11) et au MET (Figure II.1.12) ont été réalisées à partir de suspensions acides de magnétite diluées mille fois à pH= 4. Ces particules peuvent être considérées comme sphériques d'après les premiers clichés MET obtenus.

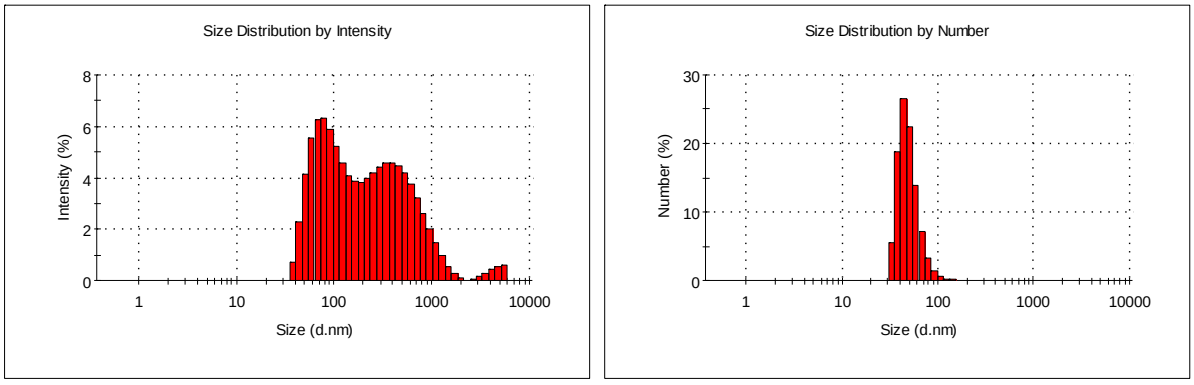


Figure II.1.11 : A gauche taille en intensité des nanoparticules par DLS; à droite taille en nombre. Les diamètres au-delà de 2 µm sont des pollutions non éliminées car les suspensions n'ont pas été filtrées avant analyse.

Les diamètres s'échelonnent de 30 à 2000 nm (Figure II.1.11), les particules micrométriques (supérieures à 2 µm) étant des pollutions de l'environnement de mesure. Deux populations apparaissent, une centrée sur 60-70 nm et une autre aux alentours de 500 nm. La représentation de la distribution de taille en nombre ne fait plus qu'apparaître un pic centré autour de 50 nm.

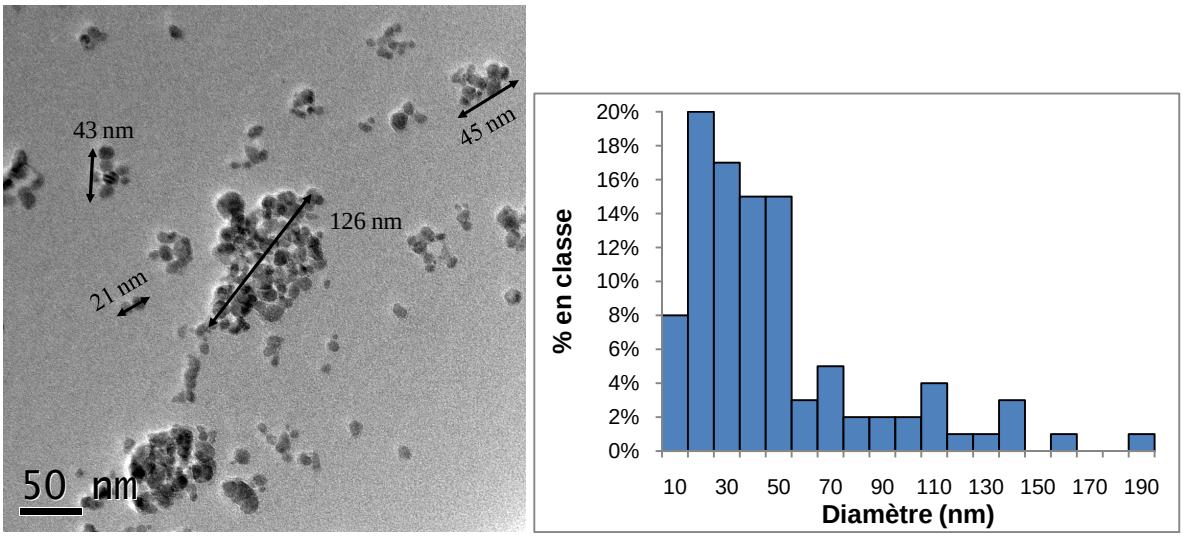


Figure II.1.12 : Cliché MET d'agrégats de magnétite et comptage des agrégats de magnétite

Par comptage en microscopie électronique en transmission, le diamètre moyen de ces nanoparticules est d'environ (44 ± 27) nm corrélant bien le résultat en nombre de la PCS. Il est à noter que les tailles des agrégats sont très polydisperses avec une population majoritaire centrée autour de 30-40 nm qui semble bien corrélée avec les diamètres en nombre obtenus en PCS.

Dans le cas d'agrégats quasi-sphériques, la taille PCS corrélée en nombre peut être une première approximation et sera utilisée tout au long de l'étude.

Cependant, de grosses particules de plus de 200 nm existent et ont dû être formées lors de l'étape de centrifugation après peptisation de la suspension (partie peptisation). La synthèse telle quelle nécessite donc une optimisation pour éliminer ces grosses particules et ainsi respecter le cahier des charges défini. Par ailleurs, le sol obtenu est stable en partie mais les grosses particules qui décantent les rendent inutilisables pour les applications biologiques visées.

II.1.2.2.4 Optimisation de la synthèse des nanoparticules

Pour éliminer les gros agrégats formés probablement pendant la synthèse ou l'étape de centrifugation et pour optimiser la stabilité de la suspension, de nouveaux cycles de centrifugation ont été réalisés lors d'une nouvelle synthèse suivant le même protocole. Dans cette partie, quatre cycles de centrifugation avec des vitesses différentes (respectivement 1000, 2000, 5000 et 10000 tours.min^{-1}) ont été réalisés. Cette nouvelle suspension a été alors caractérisée.

Pour les essais ultérieurs, les nanoparticules peptisées à pH = 1 ont été dialysées dans l'acide nitrique dilué jusqu'à pH = 3 pour ne pas acidifier le milieu réactionnel lors d'essais ultérieurs de greffages de polymères à leur surface et éviter la dissolution des particules dans ces conditions.

Par diffraction des rayons X, la phase présente est toujours une phase spinelle de même paramètre de maille que précédemment : a = 8,363 ± 0,003 Å mais avec une taille moyenne de cristallites plus faible de (7,7 ± 0,1) nm.

La surface spécifique obtenue en BET est de (110 ± 1) m².g^{-1} conduisant à une taille de grain de (11,2 ± 0,2) nm.

Par comptage MET, la tendance à la diminution de la taille des cristallites est également confirmée avec une taille moyenne de (9 ± 2) nm.

Dans cette nouvelle synthèse, la taille moyenne est plus faible. Les nouvelles tailles de cristallites obtenues sont résumées dans le Tableau II.1.3.

	Avec les cycles		Sans les cycles	
Méthode	diamètre (nm)	± Δd	diamètre (nm)	± Δd
DRX	7,7	0,1	9,8	0,2
MET	9	2	11	3
BET	11,2	0,2	13,7	0,2

Tableau II.1.3 : Comparaison des tailles de cristallites obtenues pour des synthèses d'oxyde de fer avec et sans cycle de centrifugation.

Par PCS, les populations de diamètres hydrodynamiques supérieurs à 200 nm ont été drastiquement diminuées au détriment de deux nouvelles populations de respectivement 25 et 100 nm donnant ainsi une taille en nombre de (23 ± 1) nm (Figure II.1.13).

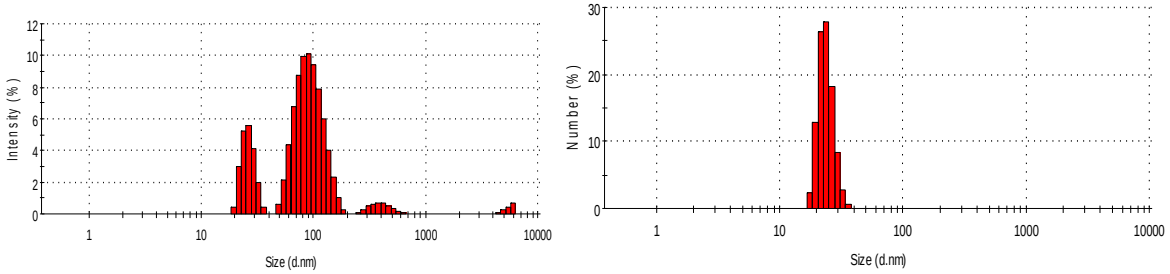


Figure II.1.13 : Taille PCS en intensité à gauche et en nombre à droite des nanoparticules de magnétite (NaCl 10^{-2}M). Les diamètres au-delà de 2 µm sont des pollutions non éliminées car les suspensions n'ont pas été filtrées avant analyse.

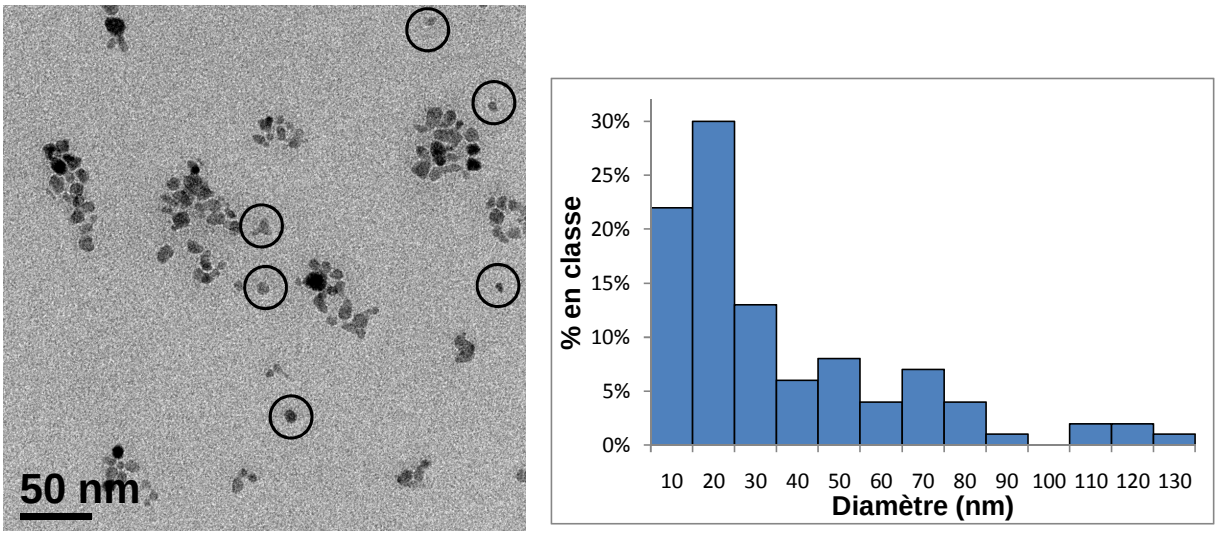


Figure II.1.14 : Cliché MET d'agrégats de magnétite optimisés et comptage des agrégats de magnétite optimisés. Les cercles représentent particules élémentaires présentent dans la suspension.

Ces résultats ont été corrélés par comptage MET (Figure II.1.14). La taille moyenne des agrégats est de (20 ± 11) nm. Elle est, là aussi, bien corrélée au diamètre hydrodynamique. Les nanoparticules sont en moyenne plus petites avec une proportion plus importante de cristallites élémentaires présentes en suspension, les gros agglomérats ayant été éliminés dans les résidus de centrifugation.

II.1.2.2.5 Conclusion sur la synthèse d'oxydes de fer

Les nanoparticules synthétisées sont de phase spinelle avec une composition $Fe_{3(1-\delta)}O_4$ de paramètre de maille a = 8,363 ± 0,003 Å compris entre celui de la magnétite (Fe_3O_4) et de la maghémite (γ-Fe_2O_3). Ces oxydes de fer seront cependant appelés magnétite dans le reste du manuscrit.
La taille moyenne des cristallites est d'environ 9 nm et la surface spécifique de 110 $m^2.g^{-1}$.
La taille des agrégats est d'environ 23 nm et la concentration du sol, déterminée en lyophilisant 10 mL de la suspension, est de 22 mg de Fe_3O_4/mL. Par des cycles de centrifugation successifs et les lavages acides (pH = 1), près de 70% des 9 g de magnétite synthétisés ont été éliminés ou dissous. Le rendement de la synthèse optimisée est donc d'environ 30% avec 2,6 g de nanoparticules.

La taille PCS en nombre sera utilisée dans le reste du manuscrit comme mesure de taille car très comparable à la taille obtenue lors d'un comptage MET.

Les particules de magnétite sont stables à pH = 3 sans aucune sédimentation observée sur plusieurs mois (Figure II.1.15)

Figure II.1.15 : Suspension de magnétite obtenue après synthèse et optimisation

II.1.2.3 Stabilité des nanoparticules de magnétite

Les nanoparticules synthétisées sont de tailles nanométriques (agrégats d'environ 20 nm) et ont une grande surface spécifique (110 $m^2.g^{-1}$). La suspension optimisée est stable à pH acide (pH = 3) mais lors des premiers essais de lavage (essais de dialyse), les nanoparticules décantent et s'agglomèrent vers pH = 7. Pour comprendre le comportement des oxydes de fer nanométriques, il est nécessaire d'étudier leur chimie de surface pour optimiser les étapes suivantes de greffage et de fonctionnalisation.

II.1.2.3.1 La surface des nanoparticules

Les oxydes de fer mis en suspension créent un système bi-phasique avec une interface solide/liquide. C'est à cette interface que vont apparaître des phénomènes influençant la stabilité des nanoparticules. Les cations en surface vont pouvoir compléter leurs charges avec les molécules d'eau environnantes et ainsi être hydratés. Une couche d'eau sera ainsi chimisorbée formant des groupements hydroxyles (OH) à la surface. D'autres molécules d'eau seront physisorbées et entrainées avec la nanoparticule dans son mouvement. Ces molécules, immobilisées par un réseau de liaisons hydrogène, vont former la couche compacte de Stern. (Figure II.1.16)

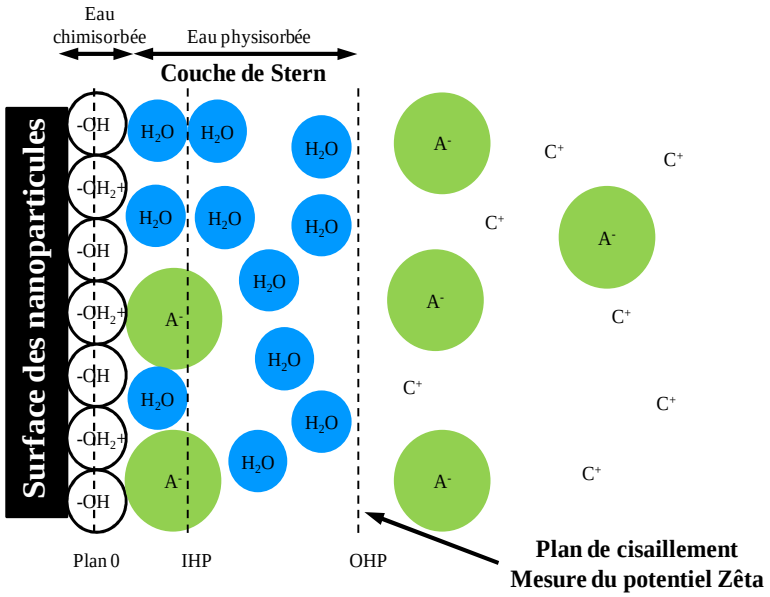


Figure II.1.16 : Représentation schématique de l'adsorption de l'eau sur une surface d'oxyde de fer d'après (Pringuet 2010). A^- représentent les anions et C^+ les cations en solution. IHP : plan interne de Helmholtz et OHP : plan externe de Helmholtz.

Les groupements hydroxyles formés en surface présentent des propriétés acido-basiques qui vont charger les particules. Ils peuvent également jouer un rôle de groupements réactifs pour le greffage de molécules.

Suivant les conditions de pH, les équilibres suivants interviennent :

$$Fe-OH_2^+ \Leftrightarrow Fe-OH+H^+ \text{ avec } Ka^+ = \frac{[Fe-OH]\cdot[H^+]}{[Fe-OH_2^+]} \quad \text{Eq. II.1.6}$$

$$Fe-OH \Leftrightarrow Fe-O^- + H^+ \text{ avec } Ka^- = \frac{[Fe-O^-]\cdot[H^+]}{[Fe-OH]} \quad \text{Eq. II.1.7}$$

La charge électrique superficielle (σ_0) peut être, suivant le pH et la force ionique, positive, négative ou nulle. Elle peut s'écrire :

$$\sigma_0 = \frac{F}{A}\left([Fe-OH_2^+]+[Fe-OH_2^+A^-]-[Fe-O^-]-[Fe-O^-C^+]\right) \quad \text{Eq. II.1.8}$$

où A est l'aire des nanoparticules ($m^2.L^{-1}$), F la constante de Faraday (96500 $C.mol^{-1}$). Les termes encadrés représentent la concentration en site chargés avec A^- des anions en solution et C^+ des cations en solution.

La charge électrique s'annule donc à un pH caractéristique du matériau donné : le point de charge nulle (**PCN**).
A pH < PCN, les sites hydroxyles adsorbent les protons et deviennent positifs par le biais des groupements $Fe-OH_2^+$ créés. A pH > PCN, les protons sont désorbés et les groupements $Fe-O^-$ formés créent une charge négative sur les nanoparticules.
Le point de charge nulle peut s'écrire :

$$PCN = \frac{1}{2}\left(pKa^- + pKa^+\right) \quad \text{Eq. II.1.9}$$

Le point de charge nulle de la magnétite est, d'après la littérature, d'environ pH = 6,5 (Tewari *et al.* 1971; Jarlbring *et al.* 2005; Barale *et al.* 2008; Kosmulski 2009).
A cette grandeur, il faut distinguer le point isoélectrique (**PIE**) qui est une notion différente. Quand la charge de surface s'annule par l'absence de charge on parle de PCN et quand elle s'annule par compensation des charges on parle de PIE.

La couche de Stern se sépare en double couche (Figure II.1.16 et Figure II.1.17):

1) une première couche est composée d'ions ayant une affinité particulière pour la surface. Parce qu'ils sont fortement hydratés, ils préservent l'ordre local du milieu et peuvent donc s'approcher davantage de la surface jusqu'au niveau de la surface (on dit qu'ils sont spécifiquement adsorbés). Ces ions neutralisent partiellement la charge de surface des particules par interactions électrostatiques (un cation s'adsorbe sur une surface négative et un anion sur une positive). Ces ions sont éloignés de la surface jusqu'à un plan interne de Helmholtz (IHP) (distance de l'ordre de l'Angström).
2) La deuxième partie de la couche de Stern est une couche de diffusion. Une partie de cette couche suit le mouvement de la nanoparticule. Elle est incluse dans la couche de Stern jusqu'au plan de cisaillement nommé plan externe de Helmholtz (OHP). Son épaisseur appelée longueur de Debye (κ^{-1}) est de l'ordre de la dizaine d'Angströms (Jolivet 1994) et peut être calculée par l'équation suivante :

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\delta \cdot R \cdot T}{2000 \cdot I \cdot e^2 \cdot N}} \qquad \text{Eq. II.1.10}$$

avec : δ la permittivité relative, R la constante des gaz parfaits, T la température absolue en Kelvin, N le nombre d'Avogadro, e la charge électrique en C et I la force ionique définit par : $I = \frac{1}{2}\sum C_i z_i^2$ avec z_i la charge de l'espèce i et C_i sa concentration.

L'épaisseur de la couche diffuse de Stern dépend de la force ionique. Plus le milieu est concentré en sel, plus la couche diffuse est faible (force ionique élevée) et plus la taille hydrodynamique de la particule est proche de la taille « réelle ».
La couche de Stern augmente ainsi la taille de la particule nue expliquant la différence entre la mesure d'un diamètre MET et celle d'un diamètre hydrodynamique qui prend en compte la double couche ionique qui est souvent de l'ordre de plusieurs dizaines d'Angströms.

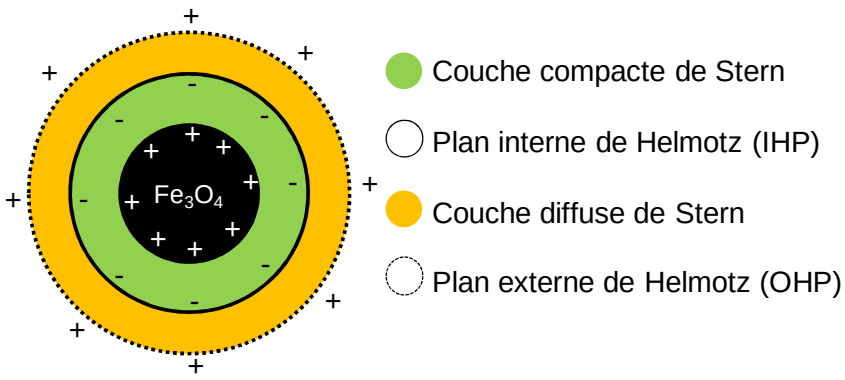


Figure II.1.17 : Représentation de la double couche électronique entourant une nanoparticule

II.1.2.3.2 Analyse de la surface des nanoparticules

La surface des oxydes de fer a été analysée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), en XPS et indirectement par analyse thermogravimétrique (ATG).

Les nanoparticules ont été caractérisées par spectroscopie infrarouge en transmission dans des pastilles de KBr (Figure II.1.18).
L'eau adsorbée possède deux pics, un à 3400 cm^{-1} correspondant à l'eau chimisorbée (ou hydroxyles de surface) et un à 1600 cm^{-1} pour l'eau physisorbée (Belin *et al.* 2004). Les pics caractéristiques de la vibration Fe-O de la phase spinelle de la magnétite se trouvent vers 585 et 635 cm^{-1}. Enfin, le pic vers 1340 cm^{-1} correspond à la vibration des nitrates utilisé lors de la peptisation des nanoparticules.

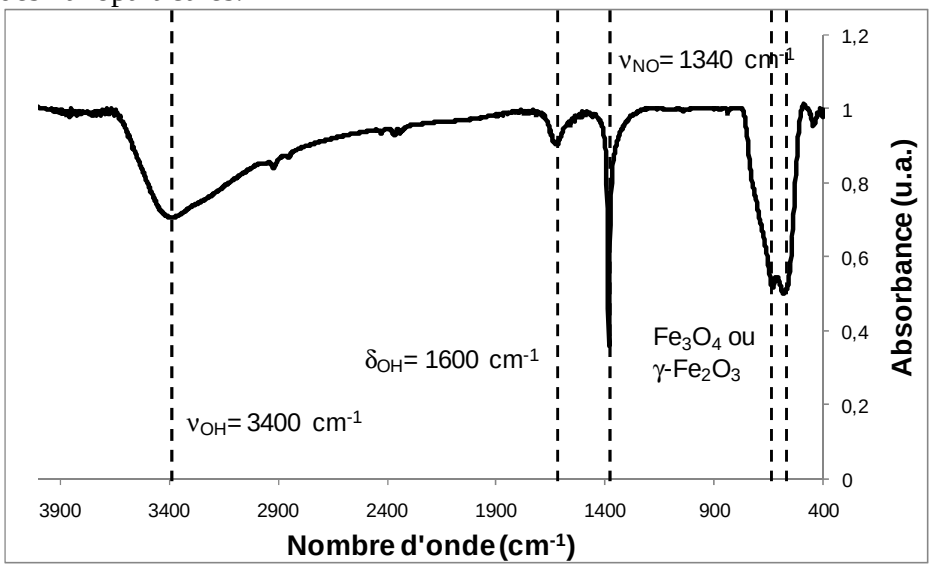


Figure II.1.18 : Spectre infrarouge de la magnétite

Cette technique n'est que qualitative mais permet de donner un aperçu sur la composition des oxydes de fer. Les hydroxyles, l'eau physisorbée ainsi que les nitrates semblent être les seules espèces présentes.

Une quantification des composés présents a également été effectuée par XPS (Figure II.1.19).

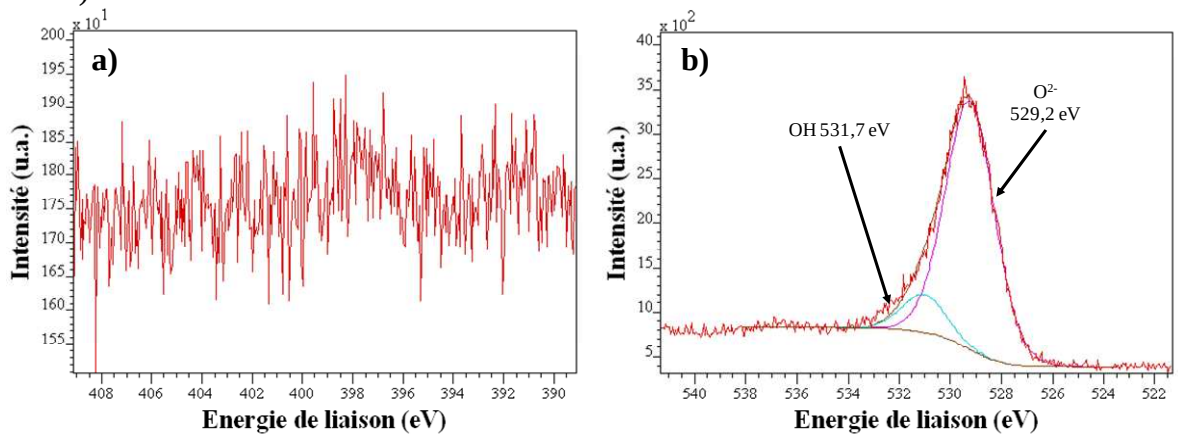


Figure II.1.19 : Spectres XPS (a) de l'azote et (b) de l'oxygène présents en surface des nanoparticules

Les azotes sont ici très minoritaires par rapport à l'oxygène de surface. Ils seront donc négligés comme espèce adsorbée. En revanche, une quantité non négligeable de carbone a été trouvée. Ce carbone de pollution est souvent observé en XPS et doit être pris en compte lors

des analyses de nanoparticules modifiées en surface par des composés carbonés (parties et II.2 et II.3). Il sert également d'étalon pour calibrer les énergies de liaisons des autres atomes (l'énergie du carbone de pollution est fixée à **284,5 eV**). Les quantifications en analyses XPS sont données en annexe A.4.1.

Il est possible de désommer le pic de l'oxygène et ainsi trouver la contribution des différents types d'oxygène présents dans la magnétite, en respectant des paramètres précis.
Les largeurs à mi-hauteurs du pic de O1s ont été fixées à 1,6 eV pour O^{2-}, 1,8 eV pour OH.

On observe seulement deux contributions à ce pic correspondant à O^{2-} de l'oxygène de structure de la magnétite à 529,2 eV et à OH des hydroxyles de surface à 531,7 eV. Ainsi, 88% de l'oxygène est de l'oxygène de structure et 12% est dû aux hydroxyles de surface. En ramenant les taux de fer de surface (Fer 2p), des deux contributions de l'oxygène et du carbone de pollution, on trouve les proportions du Tableau II.1.4.

Synthèse	Proportion Fe 2p (%)	Proportion O^{2-} (%)	Proportion OH (%)	Proportion C pollution (%)
Magnétite $Fe_{3(1-\delta)}O_4$	40	49	7	4

Tableau II.1.4 : Proportions de différentes espèces en surface de la magnétite observées en XPS.

Pour corréler ces résultats, la poudre de magnétite a été caractérisée par analyse thermogravimétrique (ATG) de 20 à 800°C pour observer également les espèces adsorbées à sa surface (Figure II.1.20).

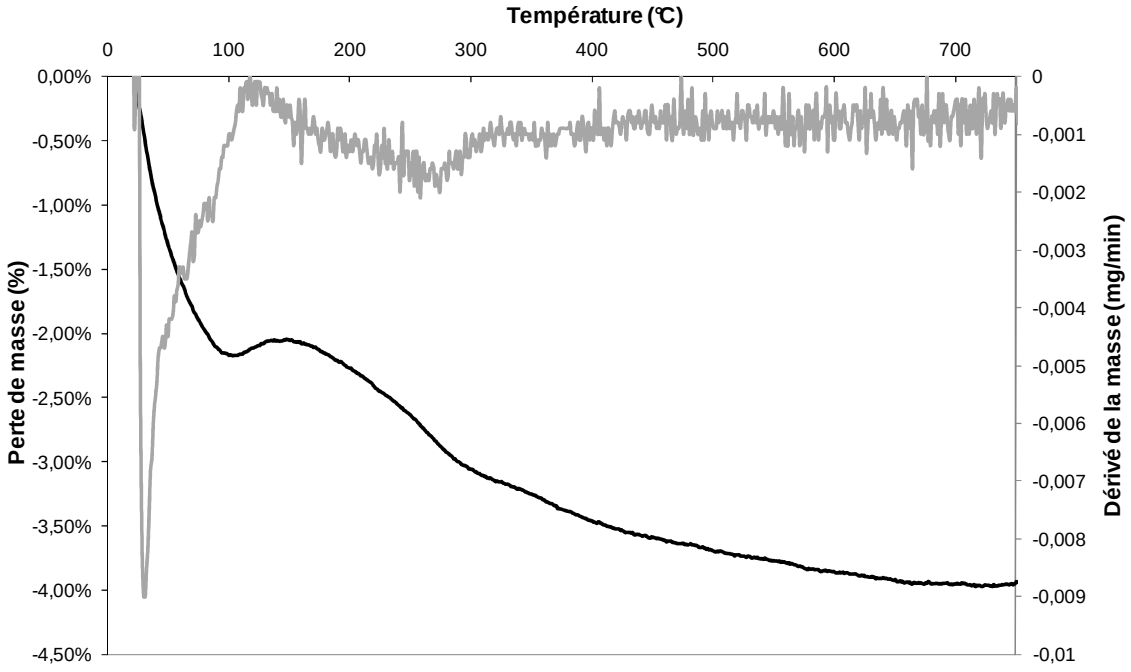


Figure II.1.20 : Courbe ATG (noire) de nanoparticules de magnétite et courbe dérivée de la masse (gris). Les mesures ont été réalisées sous un mélange N_2/O_2 à respectivement 0,12 et 0,04 mL.min^{-1} avec une rampe de montée en température de 2°C.min^{-1}. La dérive de la balance a été enlevée.

Grâce aux analyses en spectroscopie XPS, la perte de masse de la poudre de magnétite a été estimée comme seulement due au départ de l'eau et des hydroxyles (les nitrates ont donc été négligés).

La perte de masse située avant 100°C est le départ de l'eau physisorbée. Au-delà, l'eau chimisorbée est éliminée et cette perte continue lors de la réorganisation de la magnétite en hématite vers 450°C (Belin 2002).

La masse se stabilisant au-delà de 700°C, il est possible d'estimer le nombre d'hydroxyles présents en surface en supposant que la condensation d'une molécule d'eau implique deux hydroxyles. L'équation pour trouver le nombre d'hydroxyles est la suivante (Ek *et al.* 2001) :

$$nOH = 2n \cdot H_2O = \frac{2 \cdot (\Delta m)}{M_{H_2O}} \qquad \text{Eq. II.1.11}$$

où Δm est la perte de masse (en %) entre 200 et 700°C et M_{H_2O} la masse molaire de l'eau.

Le nombre de moles d'OH trouvé est alors donné pour un gramme de magnétite. En ramenant à la surface spécifique de la magnétite (110 $m^2.g^{-1}$), on trouve environ 7 hydroxyles par nm^2, résultat en accord avec la littérature (Watanabe *et al.* 1993).

II.1.2.3.3 Mesure de la stabilité des particules de magnétite en suspension

La stabilité d'une particule nanométrique est influencée par deux paramètres :

1) Les forces attractives de type van der Waals qui favorisent l'agglomération des nanoparticules.
2) Les forces électrostatiques qui sont de type répulsives. Quand elles sont majoritaires, les nanoparticules se repoussent, on parle alors de répulsion électrostatique.

Comme vu dans les parties précédentes (parties II.1.2.3.1 et II.1.2.3.2), les nanoparticules d'oxyde de fer possèdent des groupements ionisables de surface qui vont leur conférer une charge « de surface » en fonction. Pour connaître leurs domaines de stabilité électrostatique, une technique de mesure par zêtamétrie est utilisée. Le potentiel Zêta (ζ) a été mesuré sur les particules de magnétite synthétisées pour une gamme de pH allant de 3 à 11.

Une particule chargée mise dans un champ électrique se déplace et a donc une mobilité électrophorétique μ (μm.cm.V^1.s^{-1}) donnée par :

$$\mu = \frac{V}{E} \qquad \text{Eq. II.1.12}$$

où V est la vitesse de la particule (μm.s^{-1}) et E le champ électrique appliqué (V.cm^{-1}).

Le potentiel Zêta (z) se mesure à l'aide de cette mobilité électrophorétique (μ) d'après la loi de Henry :

$$\zeta = \frac{3 \cdot \mu \cdot \eta}{2 \cdot \varepsilon \cdot f(\kappa \cdot r)} \qquad \text{Eq. II.1.13}$$

avec ε la constante diélectrique, η la viscosité, μ la mobilité électrophorétique, f(κ.r) la fonction de Henry, r le rayon de la particule, κ le paramètre de Debye et ζ le potentiel Zêta (mV).

Cette méthode mesure la charge au niveau du plan de cisaillement c'est-à-dire à la frontière entre la double couche ionique et la couche diffuse (plan OHP) : on parle alors de **charge nette** (Figure II.1.16).

Pour s'affranchir du problème de variation de la taille de la couche diffuse (κ^{-1}), la force ionique doit être maintenue constante. Les pH s'échelonnant de pH = 3 à pH = 11, la concentration maximale en H^+ ou en OH^- ne dépasse pas 10^{-3} M.
En mesurant les potentiels Zêta dans une solution de sel (NaCl) de 10^{-2} M, on évite le changement de force ionique pour cette gamme de pH dans l'eau distillée (Figure II.1.21).

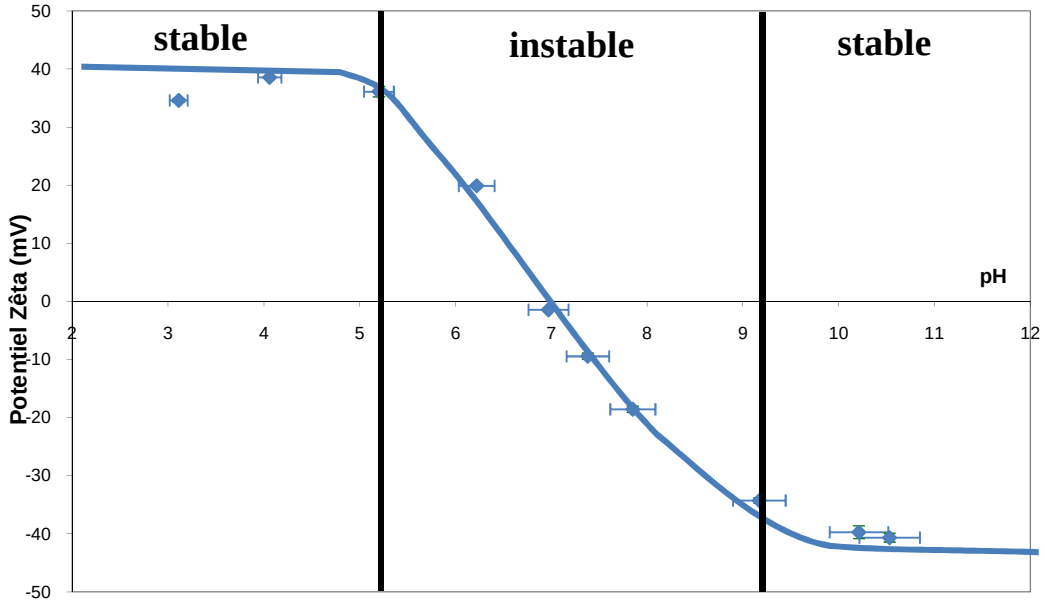


Figure II.1.21 : Potentiel Zêta des nanoparticules de magnétite en fonction du pH dans NaCl 10^{-2}M. La ligne est un guide.

Dans le cas de la magnétite, le potentiel Zêta s'annule vers pH = 7, qui est donc le point isoélectrique.
Entre pH = 5 et pH = 9, les forces électrostatiques sont trop faibles pour contrecarrer les forces de van der Waals et la magnétite s'agrège et se déstabilise. Au delà de pH = 9, les particules sont de nouveau peptisées mais négativement en déprotonant la surface et sont de nouveau stables.
Il faut noter également, qu'en augmentant la force ionique du milieu, la couche diffuse autour de la particule va diminuer et ne plus pouvoir s'opposer au forces de van der Waals entraînant également une agglomération et ce même dans le cas de particules à pH très acide ou basique.
La déstabilisation des nanoparticules est également observée par mesure de taille en PCS (Figure II.1.22). De même que pour le potentiel Zêta, entre pH = 5 et pH = 9, les forces de van der Waals sont majoritaires et les particules s'agglomèrent jusqu'au micromètre et sédimentent. En dessous de pH = 5 et au-delà de pH = 9 les diamètres sont de l'ordre des agrégats élémentaires de quelques dizaines de nanomètres mesurés en PCS (partie II.1.2.2.4).

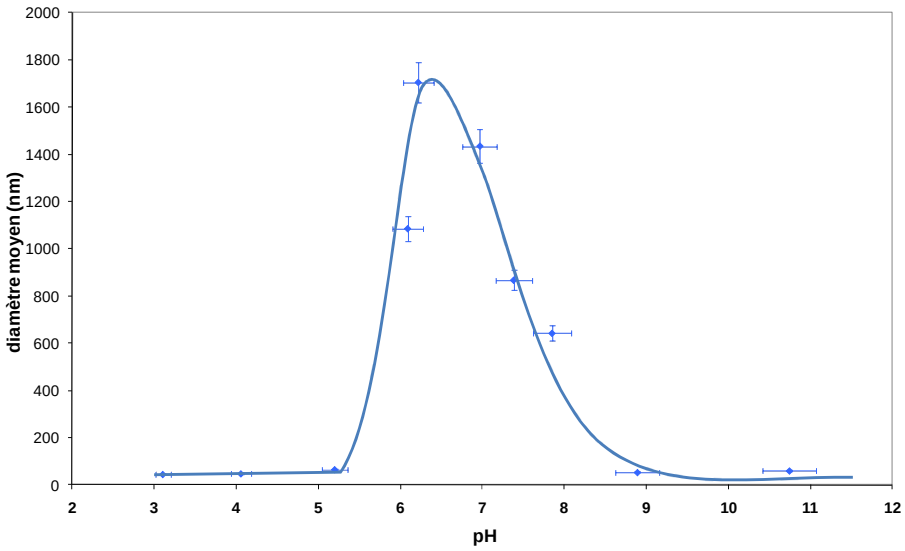


Figure II.1.22 : Evolution du diamètre hydrodynamique (en nombre) de nanoparticules de magnétite en fonction du pH

II.1.2.3.4 Solutions pour stabiliser les particules de magnétite

Les ferrofluides synthétisés sont stables dans les domaines de pH acide et basique mais sédimentent en cas de force ionique élevée ou vers des pH aux alentours de 7 les rendant inutilisables tels quels pour des applications biologiques. Des agents stabilisants peuvent être utilisés pour améliorer leur dispersion à pH physiologique (pH = 7,4).

1) Les agents électrostatiques. Ils peuvent s'adsorber à la surface de la magnétite et changer sa charge nette pour un pH donné. Les acides carboxyliques sont couramment utilisés en chargeant négativement les nanoparticules vers pH = 7 (Cheng *et al.* 2009).
2) Les agents de stabilisation à effet stérique. Ils vont s'adsorber ou même se greffer à la surface de la magnétite et créer un encombrement stérique empêchant les nanoparticules de s'attirer sous l'effet des forces de van der Waals. Les surfaces des nanoparticules doivent être entièrement recouvertes pour que la dispersion ait lieu.
3) Les agents qui stabilisent par répulsion stérique et électrostatique (stabilisation électrostérique). Ces agents sont des polymères ionisables (polyélectriques).

Ces deux premiers modes de stabilisation ont été étudiés dans la partie II.2.

II.1.3 Conclusion sur les nanoparticules synthétisées

La méthode de synthèse retenue a permis d'obtenir, après optimisation, des nanoparticules en quantité suffisante et de composition et caractéristiques reproductibles. Toutes les caractéristiques du ferrofluide sont reportées dans le Tableau II.1.5.

	Caractéristiques	Techniques d'analyse	Résultats
Structure	Paramètre de maille	DRX	a = 8,363 ± 0,003 Å
	Degré d'oxydation		$Fe_{3(1-\delta)}O_4$ $\delta = 0,077$
Morphologie	Taille de cristallite	DRX	7,7 ± 0,1 nm
		MET	9 ± 2 nm
		BET	11,2 ± 0,2 nm
	Taille d'agrégats	PCS (en nombre)	23 ± 1 nm
		MET	20 ± 11 nm
Analyse de surface	Hydroxyles en surface	ATG	7 OH / nm²
	Surface spécifique	BET	110 ± 1 $m^2.g^{-1}$
Stabilité des sols	Point isoélectrique	Zêtamétrie	pH = 7
	Domaine de floculation	PCS	5 < pH < 9
Suspension	Quantité	Lyophilisation	22 mg Fe_3O_4 / mL
	pH		pH = 3

Tableau II.1.5 : Caractéristiques du ferrofluide synthétisé

Les nanoparticules ne présentent pas de stabilité dans des conditions proches de celles du milieu physiologique. A faible force ionique ($I = 10^{-2}$ M), elles s'agglomèrent et décantent entre pH = 5 et pH = 9. Par ailleurs, à force ionique plus élevée (I = 0,15 M) élevée, elle sédimentent également quel que soit le pH les rendant inutilisables pour des études en milieu physiologique ([NaCl] = 0,15 M à pH = 7,4).

Dans la deuxième partie de ce travail, des méthodes de stabilisation des ferrofluides par des agents, premièrement électrostatiques, puis stériques ont été testées. La voie majoritairement retenue a été le greffage *via* une fonction silane. Enfin, parce que les nanoparticules pouvaient être utilisées dans le cas de détection spécifique ou bimodale, une première approche de couplage d'une molécule fluorescente (la rhodamine) sur la surface de la magnétite a également été entreprise.

II.2 Modification de surface et fonctionnalisation des nanoparticules

Les ferrofluides ont été synthétisés en grande quantité et de manière reproductible. Cependant, au vu des propriétés des oxydes de fer, les nanoparticules nues ne sont pas stables pour les applications biologiques visées. En effet, aux alentours de leur point isoélectrique (vers pH = 7), les nanoparticules ne sont pas assez chargées et sédimentent (Jarlbring *et al.* 2005). De plus, en présence de solutions à fortes forces ioniques, le sol de magnétite est également déstabilisé. Pour stabiliser ces nanoparticules, des modifications de surface sont nécessaires.

Dans cette partie, différentes voies de stabilisation ont été abordées, notamment des stabilisations électrostatiques par deux acides carboxyliques : l'acide citrique (AC) et l'acide dimercapto-succinique (DMSA). Des modifications de surface par greffage de polymères hydrophiles couplés à des fonctions silanes (des polyéthylènes glycol silanisés : mPEG-Si) ont également été étudiées. Enfin, des premiers essais de fonctionnalisation de la surface de la magnétite pour des applications biologiques ont été réalisés (notamment le greffage d'un fluorophore).

II.2.1 Stabilisations électrostatiques des oxydes de fer

Comme vu dans la partie II.1, la surface des oxydes de fer en solution aqueuse possède des groupements FeOH se chargeant positivement ou négativement en fonction du pH (partie II.1.2.3). Cette charge est à l'origine d'interactions entre la surface des grains et des espèces présentes en solution que ce soit des cations, des anions ou des polymères (Jolivet 1994). Ces espèces vont s'adsorber sur les oxydes de fer et modifier la surface des nanoparticules. Dans notre étude, seules les interactions avec des anions et des polymères (notamment les polyéthylènes glycol) nous ont intéressés.

L'adsorption spécifique d'anions ou d'acides faibles à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer conduit à la condensation des groupements hydroxyles primaires sur les hydroxyles de surface (Figure II.2.1). Elle dépend du pH de la solution, de la concentration et de la température ; le pH imposant le taux de protonation de l'anion et la charge de surface de l'oxyde.

Cette adsorption est une réaction de complexation qui est d'autant plus importante que le pouvoir complexant (ou chélatant) de l'anion est grand. Quand le composé utilisé est suffisamment chélatant, les complexes formés peuvent stabiliser l'oxyde en modifiant la charge de sa surface. C'est cet effet qui a été recherché pour stabiliser nos nanoparticules lors de cette étude.

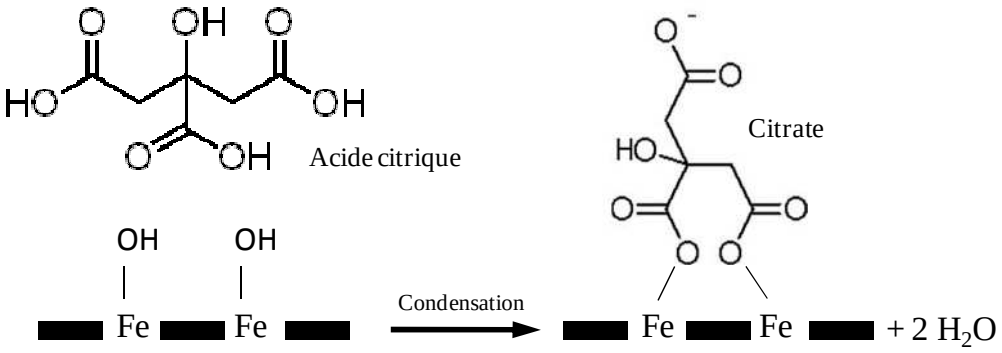


Figure II.2.1 : Adsorption d'anions citrates à la surface de la magnétite d'après (Jolivet 1994)

Une autre méthode de stabilisation par adsorption est possible. Sans entrer dans les détails, car nous nous sommes plus intéressés à leur greffage, des polymères non chargés peuvent s'adsorber de manière non spécifique à la surface des oxydes de fer. Bien que la charge de ces polymères soit globalement nulle, les hydrogènes de ces groupes fonctionnels polaires vont créer des liaisons avec les sites hydroxylés ou protonés de la surface. L'énergie d'interaction entre un monomère et la surface est très faible mais grâce au nombre important de segments, de nombreux points d'ancrage permettent une adsorption efficace des polymères d'autant meilleure que sa masse moléculaire est grande. Il faut cependant noter que cette interaction reste assez faible et le polymère peut se désorber facilement par modification de pH ou de la force ionique du milieu.

II.2.1.1 Stabilisation par l'acide citrique (AC)

II.2.1.1.1 Propriétés et caractéristiques de l'acide citrique

II.2.1.1.1.1 Propriétés acido-basique de l'acide citrique

L'acide citrique est un acide carboxylique de formule $C_6H_8O_7$ (M = 192 g.mol^{-1}) qui, sous ses différentes formes, n'est pas toxique pour l'homme. Il est couramment utilisé dans l'industrie alimentaire (E330) et est même synthétisé par le corps humain lors du cycle de Krebs. Ces différents atouts, en plus de son faible coût, en font un composé intéressant pour une utilisation en biologie.

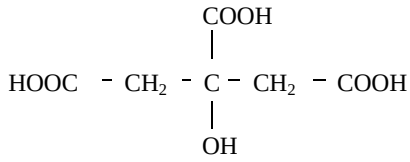


Figure II.2.2 : Formule semi-développée de l'acide citrique

L'acide citrique possède trois fonctions carboxyliques (COOH) qui se transforment en ions carboxylates (COO^-) à différents pH en fonction des pKa de l'acide citrique selon les équilibres suivants:

$$R(COOH)_3 \xleftarrow[pKa1]{3,13} R(COOH)_2(COO^-) \xleftarrow[pKa2]{4,76} R(COOH)(COO^-)_2 \xleftarrow[pKa3]{6,40} R(COO^-)_3 \quad \text{Eq. II.2.1}$$

$$R = C_3H_4OH$$

En dessous de pH = 3,13, l'acide citrique est l'espèce prédominante en solution. En augmentant le pH, les fonctions carboxyliques vont se transformer en carboxylates pour donner, au delà de pH = 6,40, le composé le plus ionisé : l'ion citrate ($C_6H_5O_7^{3-}$). Les citrates sont donc chargés négativement au pH physiologique. A pH = pKa_2, le nombre de groupements carboxylates est égal au nombre de groupements acides carboxyliques.

II.2.1.1.1.2 Caractéristiques de l'acide citrique

Avant d'évaluer la chimie de surface des nanoparticules en présence d'acide citrique, il a été nécessaire de caractériser dans un premier temps l'acide citrique seul.
En premier lieu, une analyse thermogravimétrique a été réalisée sur ce composé (ATG : Figure II.2.3).

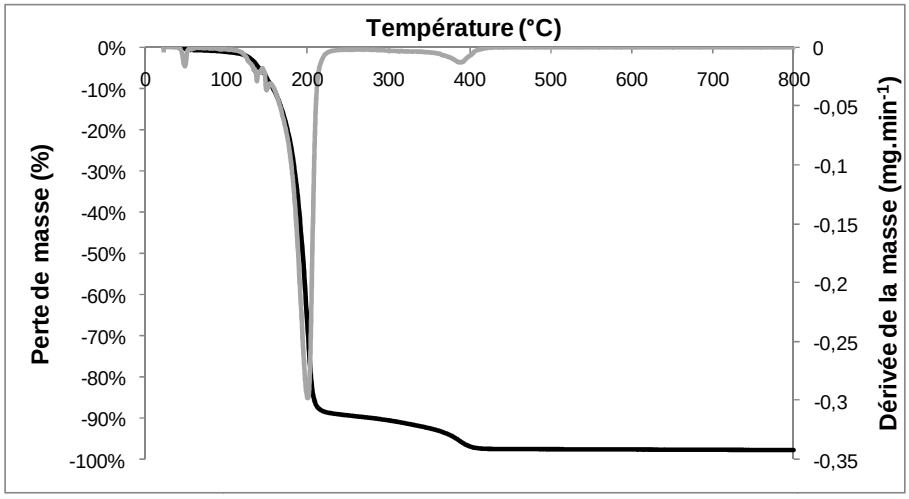


Figure II.2.3 : Analyse thermogravimétrique de l'acide citrique (noir) et dérivée de la masse (gris). Les mesures ont été effectuées sous flux de N_2/O_2 (0,12/0,04 mL.min^{-1}) avec une rampe de montée en température de 2°C.min^{-1}

Près de 98% de sa masse est éliminée entre 150 et 450°C. C'est à cette température que les mesures de perte de masse seront effectuées.

Ce même échantillon sous forme basique (ion citrate) a été caractérisé par spectroscopie infrarouge (Figure II.2.4). Pour cela, de la soude a été ajoutée jusqu'à pH = 10 à une solution d'acide citrique pour obtenir du citrate de sodium qui a ensuite été lyophilisé pour être analysé.

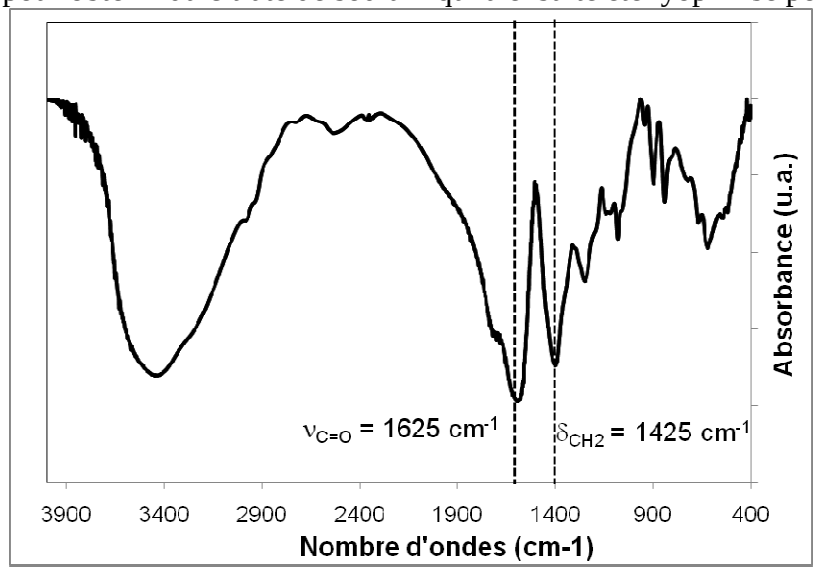


Figure II.2.4 : Spectre infrarouge du citrate de sodium obtenu dans des pastilles de KBr.

Le citrate est un composé organique donnant de nombreuses bandes d'adsorption en spectroscopie infrarouge. La plus importante est celle correspondant à l'énergie de vibration de la fonction carbonyle (C=O) qui apparaît à **1625 cm^{-1}** (Pretsch *et al.* 2000; Montemayor *et al.* 2008). Sa présence à des nombres d'onde plus faibles que dans le cas de l'acide citrique (aux alentours de 1700 cm^{-1} (Racuciu *et al.* 2006)) est due à l'environnement électronique qui affecte sa vibration (COO^- au lieu de COOH). Les modes de vibration des méthyles (CH_2) couplés à cette fonction apparaissent vers **1425 cm^{-1}** (Cheng *et al.* 2009) mais cette vibration pourrait également être due à la fonction C-O (Racuciu *et al.* 2006). Entre 2500 et 3600 cm^{-1}, on trouve les modes de vibration des hydroxydes de l'eau adsorbée (Grzeta *et al.* 2002). Le pic caractéristique de l'acide citrique qui a été retenu est le pic de la fonction carbonyle (C=O) qui, par son intensité importante et sa position, ne peut pas être confondue avec les pics

caractéristiques de la magnétite (entre 550 et 650 cm^{-1} pour les modes de vibration de la structure spinelle et vers 1340 cm^{-1} pour la vibration des ions nitrates ajoutés lors la peptisation).

II.2.1.1.1.3 L'acide citrique utilisé sur des nanoparticules de magnétite

La forme citrate de l'acide citrique est connue pour ses propriétés chélatantes et antioxydantes grâce à ses trois fonctions carboxylate (Plonski 1997; Gromovaya *et al.* 2002; Xue *et al.* 2009). Une ou deux des trois fonctions chargées négativement vont s'adsorber à la surface des nanoparticules de magnétite (initialement chargées positivement) laissant les fonctions restantes modifier négativement la charge nette de surface de l'oxyde de fer (Ma *et al.* 2009).

L'ion citrate est souvent utilisé pour stabiliser et disperser des nanoparticules d'oxyde de fer à pH neutre (Racuciu *et al.* 2007; Cheng *et al.* 2009). De l'acide citrique est mélangé à une base pour obtenir la forme citrate recherchée. Après synthèse et lavage de la magnétite, la solution de citrates est ajoutée au sol. Les nanoparticules ainsi fonctionnalisées sont stables à pH physiologique avec des tailles d'agrégats compatibles avec des applications biologiques.

Bee *et al* (Bee *et al.* 1995) ont étudié une autre utilité des molécules de citrates. Lors de cette étude, ils ont montré que si des citrates sont mélangés, avant synthèse, à des ions ferreux et ferriques (ratio 1:2) dans des ratios molaires allant de 0 à 10% (citrates/fer), la taille des cristallites d'oxyde de fer diminue lorsque le ratio citrate/fer augmente. Les ions citrates ont bloqué la croissance des grains, les faisant passer de 8 nm avec 0% de citrates à moins de 2 nm avec seulement 3%. L'élargissement des pics diffraction des rayons X est tel que l'existence de particules est difficile à prouver (Figure II.2.5).

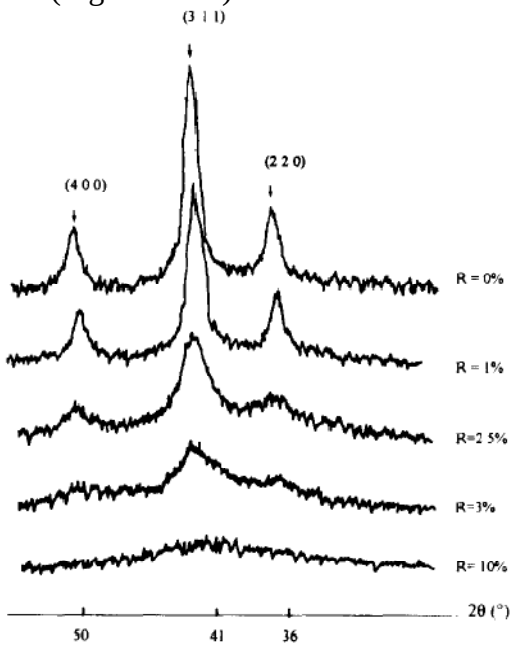


Figure II.2.5 : Diffractogrammes des rayons X de poudre de magnétite synthétisées avec des ratios de citrates R différents (λ = 1,7905 Å) d'après (Bee et al. 1995)

Deux mécanismes ont été avancés pour expliquer cet effet sur la croissance des particules.

1) L'effet chélatant des ions citrates sur les cations fer empêche la nucléation des germes,
2) L'effet chélatant des ions citrates à la surface des cristallites formées limite leur croissance. Ce deuxième mécanisme semble être prédominant.

Les ions citrates peuvent donc modifier la surface des nanoparticules et les disperser à pH = 7 mais également diminuer la taille des cristallites par chélation diminuant le phénomène de croissance des grains. Ils sont donc intéressants pour la modification morphologique et de surface de la magnétite pour des applications biomédicales.

II.2.1.1.2 Conditions de fonctionnalisation des nanoparticules par l'acide citrique

Pour étudier l'effet dispersant et l'effet chélatant des citrates, deux campagnes de modification de surface de la magnétite par l'acide citrique ont été réalisées.

Les nanoparticules ont été synthétisées selon le même protocole que lors de la partie II.1.2.2.1. Un ratio d'ions ferreux et ferriques (1:2) a été ajouté goutte-à-goutte à de la soude [0,75 M] à 90°C. De l'acide citrique a été mélangé au préalable à différents pH et/ou dans des ratios molaires différents.

Après trente minutes, la réaction a été arrêtée et après 10 à 30 minutes de décantation sous aimants pour éliminer la soude[7], les sols ont été lavés par trois lavages à l'acide nitrique jusqu'à pH = 3 (de la même manière que lors de la peptisation des nanoparticules de la partie II.1.2). Une partie a ensuite été lyophilisée pour être caractérisée (Paris 2010).

Dans un premier temps, un ratio molaire de 5% d'acide citrique a été mélangé à différents pH. En fonction du pH, l'espèce présente au départ peut chélater ou non les cations fer et ainsi influencer la croissance des cristallites de la magnétite. Trois conditions ont été étudiées :

1) L'acide citrique a été ajouté au mélange fer (II) / fer (III) à pH = 1. L'espèce présente est de l'acide citrique qui ne possède pas de fonctions carboxylates
2) L'acide citrique a été ajouté au mélange fer (II) / fer (III) à pH = 5. L'espèce présente possède une ou deux fonctions carboxylates.
3) L'acide citrique a été mélangé à la soude à pH = 12 avant ajout des réactifs ferreux et ferriques. Dans cette configuration, l'espèce présente est le citrate possédant trois fonctions carboxylates.

Des synthèses ont également été effectuées avec différents ratios d'acide citrique directement mélangés à la soude à pH = 12 avant co-précipitation. Les taux choisis ont été 5, 20 et 100%. La stabilité et la taille des cristallites ont été étudiées avec ces différents ratios.

Toutes ces synthèses ont été comparées à la synthèse de référence sans cycle de centrifugation pour optimiser sa taille moyenne, évitant la diminution artificielle des diamètres de cristallites et ainsi pour bien comparer l'effet des citrates sur la morphologie.

II.2.1.1.3 Influence du pH de l'acide citrique sur la morphologie et la stabilité des nanoparticules

II.2.1.1.3.1 Analyses morphologiques et structurales des nanoparticules

Les différentes poudres ont été analysées par diffraction des rayons X et par mesures de surfaces spécifiques. Pour les trois synthèses, l'unique phase présente est la structure spinelle sans hématite.

Les tailles et les paramètres de maille des cristallites sont donnés dans le Tableau II.2.1.

[7] L'étape de décantation n'a pas été optimisée et les temps avant élimination de la soude et ajout de l'acide nitrique ont été différents ce qui a pu influencer la croissance des cristallites.

Conditions de synthèse	Temps mûrissement (min)	Paramètre de maille a (Å)	δ Poix	Diamètre DRX (nm)	Diamètre BET (nm)	Surface spécifique ($m^2.g^{-1}$)
Référence	90	8,363 ± 0,003	0,077	9,8 ± 0,2	13,7 ± 0,2	90 ± 1
5% citrates pH 1	155	8,364 ± 0,001	0,075	6,4 ± 0,2	8,3 ± 0,1	149 ± 2
5% citrates pH 5	135	8,367 ± 0,001	0,070	7,8 ± 0,3	11,2 ± 0,2	106 ± 2
5% citrates pH 12	62	8,364 ± 0,001	0,075	7,6 ± 0,2	9,4 ± 0,1	132 ± 2

Tableau II.2.1 : Paramètres de maille et diamètres de cristallites (calculés par la méthode de Le Bail) des nanoparticules modifiées par de l'acide citrique à différents pH par rapport à une synthèse de référence sans acide citrique. Les temps de synthèse avant acidification sont également donnés.

D'après le Tableau II.2.1, les citrates utilisés ont un effet chélatant qui réduit la taille moyenne des cristallites comme observé par Bee *et al (Bee et al. 1995).* Les cristallites sont plus petites que lors d'une synthèse classique mais la forme acido-basique de l'acide citrique ne semble pas avoir d'influence significative sur leurs tailles. Il semblerait donc que, quelles que soit les conditions utilisées, une fois en milieu basique, les citrates réduisent la croissance des grains. Par ailleurs, les tailles de ces particules sont très nettement supérieures à celles observées lors de la publication de Bee *et al*.

Le temps de réaction joue donc toujours un rôle prépondérant dans l'augmentation de la taille des cristallites. Les temps de mûrissement des nanoparticules citratées ont par ailleurs varié (entre 1 heure et 2 heures 30) mais ils ne semblent pas avoir affecté la taille moyenne des particules par le phénomène de mûrissement d'Ostwald (partie II.1.1.1.2), le temps le plus long ayant conduit aux nanoparticules les plus petites. Cependant, pour conclure sur l'effet du pH lors de l'ajout de citrates, les carboxylates jouent bien le rôle de chélatant à la surface des particules, réduisant la taille des cristallites élémentaires.

En utilisant la méthode de Poix (Annexe A.2.2), il a été possible de mesurer la déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène (δ) en fonction des paramètres de maille mesurés.

Bien que l'acide citrique ait des propriétés antioxydantes (Xue *et al.* 2009), il ne semble pas avoir d'influence sur le paramètre de maille pour deux raisons probables pouvant être interconnectées.

1) Il faut tout d'abord noter que toutes les nanoparticules ont été lavées un grand nombre de fois à l'acide nitrique en sortie de synthèse, annulant probablement l'effet antioxydant attendu. Cet effet sera tout de même observé dans la troisième partie de ce chapitre lors de synthèses en conditions hydrothermales et continues (partie II.3.3.2).
2) Il est également possible que le taux de citrates utilisé ne soit pas suffisant pour modifier significativement le degré d'oxydation de la magnétite.

II.2.1.1.3.2 Analyses de la stabilité des nanoparticules synthétisées

Des mesures de potentiels Zêta (dans NaCl 10^{-2}M) ont été effectuées sur les nanoparticules synthétisées précédemment avec de l'acide citrique à différents pH et comparées avec le potentiel Zêta de la synthèse de référence (Figure II.2.6).

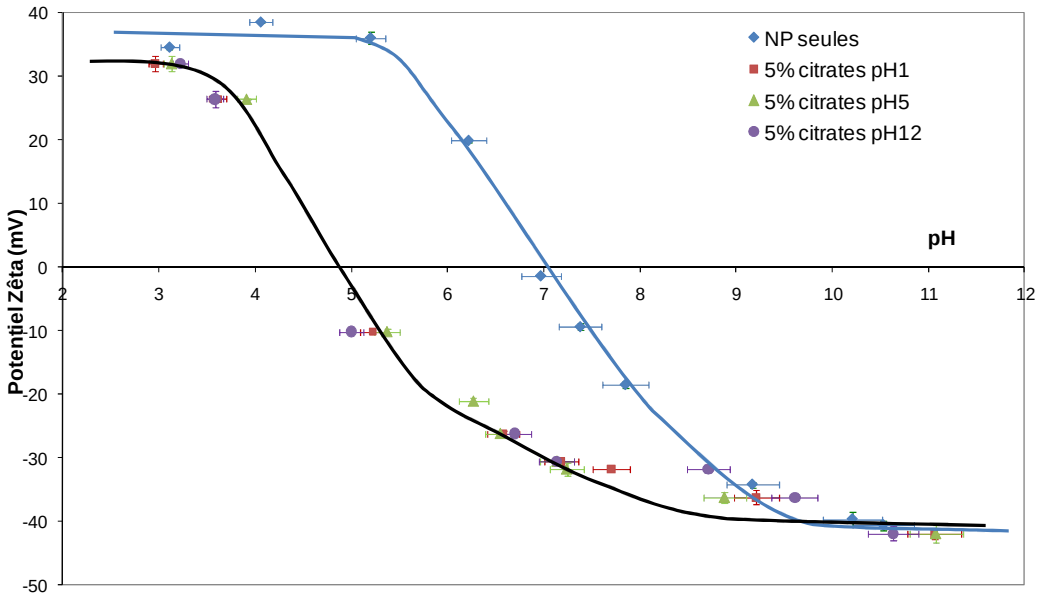


Figure II.2.6 : Potentiels Zêta en fonction du pH dans NaCl 10^{-2}M des nanoparticules de magnétite de référence et modifiées avec 5% d'acide citrique à pH = 1, pH = 5 et pH = 12

Les trois méthodes de synthèse ne montrent pas de différence significative. Le point isoélectrique de la magnétite citratée passe de pH = 7 à pH = 5. Les nanoparticules citratées sont donc chargées négativement à pH = 7 et possèdent, à ce pH, des tailles moyennes en nombre bien plus faibles que celle de la synthèse de référence (Tableau II.2.2).

Conditions de synthèse	Tailles PCS en nombre à pH = 7 (nm)	Tailles PCS en nombre à pH = 11 (nm)
Référence	instable	54 ± 5
5% citrates pH 1	75 ± 10	65 ± 5
5% citrates pH 5	103 ± 15	62 ± 5
5% citrates pH 12	65 ± 10	55 ± 5

Tableau II.2.2 : Tailles moyennes en nombre à pH = 7 et à pH = 11 des particules de magnétite citratées comparées aux particules nues.

Dans la partie précédente (partie II.1.2.2.3), nous avons vu que la taille des agrégats en nombre mesurée en PCS était à peu près équivalente à une moyenne des tailles en microscopie électronique. Cette taille est très approximative mais on peut donc dire que pour les trois méthodes de synthèse avec citrates, les tailles des agrégats sont similaires à pH = 7.

Les citrates dispersent bien les nanoparticules à pH physiologique mais pas de manière optimale. En effet, en regardant les courbes de potentiel Zêta et les tailles PCS à pH =11 qui sont légèrement inférieures qu'à pH = 7, on peut voir que la zone de stabilité n'est pas tout à fait atteinte. On peut supposer qu'avec un ratio molaire de 5%, les molécules de citrate ne couvrent pas complètement la surface des nanoparticules laissant des hydroxyles libres pouvant continuer à charger différemment les nanoparticules.

II.2.1.1.3.3 Analyses de la surface des nanoparticules synthétisées

L'analyse thermogravimétrique des nanoparticules citratées à 5% a été comparée à celle de la magnétite nue et donnée dans la Figure II.2.7. Pour des raisons de lisibilité, une seule ATG est représentée pour les trois conditions de mélange des citrates (celle de la synthèse avec le citrate déjà mélangé à la soude) bien que les trois analyses aient le même comportement. Il

en sera de même pour les graphiques des mesures effectuées en spectroscopie infrarouge et en XPS.

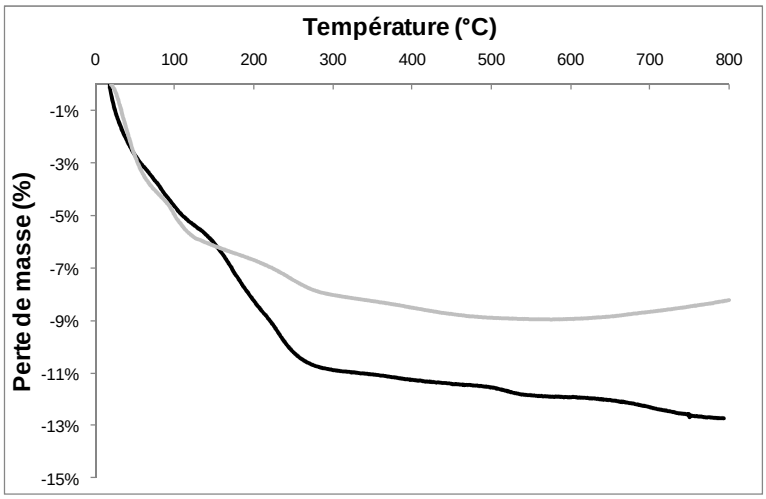


Figure II.2.7 : Analyse thermogravimétrique des nanoparticules citratées à 5% dans la soude (noir) et des nanoparticules nues (gris). Les mesures ont été effectuées sous flux de N_2/O_2 (0,12/0,04 mL.min^{-1}) avec une rampe de montée en température de 2°C.min^{-1}. La dérive de la balance a été corrigée.

L'analyse thermogravimétrique avec 5% de citrates montre une perte de masse au-delà de 150°C d'environ 4% supérieure à celle obtenue avec la magnétite non citratée.
En effet, ce nombre est égal à :

$$n_{citrates}(molécule/nm^2_{magnétite}) = \frac{\frac{x}{M_{citrate}} \cdot N_A}{(100-x) \cdot S_{magnétite} \cdot 10^{18}}$$

avec x est la perte de masse différentielle entre les nanoparticules citratées et non citratées (en %), N_A la constante d'Avogadro, $S_{magnétite}$ la surface spécifique de la magnétite citratée (132 m².g^{-1} dans l'exemple).

D'après la Figure II.2.7, x = 4% ce qui correspond à $n_{citrates}$ = 1 molécule/nm². Cette valeur ne représente que 14% des sites FeOH disponibles en surface des nanoparticules (en théorie 7 sites / nm² calculés par ATG dans la partie II.1.2).

Le Tableau II.2.3 résume les résultats pour les trois conditions.

Conditions de synthèse	**Perte de masse par rapport à la référence**	**Surface spécifique (m².g^{-1})**	**Acide citrique / nm²**
5% citrates pH 1	4,3%	149 ± 2	0,94
5% citrates pH 5	4,3%	106 ± 2	1,3
5% citrates pH 12	4%	132 ± 2	0,99

Tableau II.2.3 : Calculs du nombre d'acide citrique en surface pour les trois conditions de synthèses de magnétite citratée à 5%

Pour compléter cette mesure, les nanoparticules avec et sans ions citrate ont été analysées par spectroscopie infrarouge (Figure II.2.8).

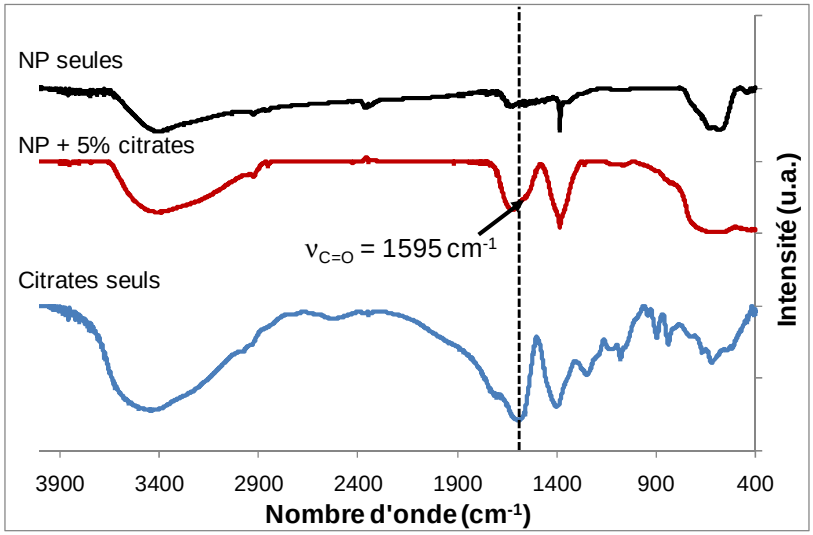


Figure II.2.8 : Spectres infrarouges des nanoparticules seules, des nanoparticules citratées à 5% dans la soude et du citrate de sodium seul. Spectres obtenus dans des pastilles de KBr.

Un déplacement du pic de vibration de la fonction carbonyle de 1625 cm^{-1} pour le citrate pur à 1595 cm^{-1} pour le citrate complexé avec la magnétite (épaulement indiqué par une flèche) est observé. Ce déplacement est sans doute dû à la formation de la liaison Fe-O-C=O qui perturbe la vibration du carbonyle (Racuciu *et al.* 2006). La large bande vers 500-700 cm^{-1} correspondant aux modes de vibrations de la structure spinelle se trouve bien dans les spectres des magnétites citratées ou non. Il y a bien des citrates en surface de la magnétite mais il est cependant difficile d'estimer leur quantité.

Des analyses XPS ont été réalisées sur les différents échantillons pour quantifier la proportion de fer, d'oxygène et de carbone.
En comparant les analyses XPS du carbone et de l'oxygène des nanoparticles seules et citratées, la présence de citrates en surface a été confirmée (Tableau II.2.4).

Synthèse	Proportion Fe 2p (%)	Proportion O (%)	Proportion C pollution (%)
Référence	40	56	4
5% de citrates	30	56,5	13,5

Tableau II.2.4 : Proportions, obtenues par XPS, de fer, d'oxygène et de carbone sur la synthèse de référence et la magnétite citratée à 5% dans la soude.

En premier lieu, une plus grande quantité de carbone est présente avec la magnétite. En désommant le pic du carbone, trois contributions provenant des ions citrates ont été trouvées respectivement C-C ou C-H à 284,5 eV, C-O vers 286,3 eV et O-C=O vers 288,2 eV, dont les proportions ont pu être estimées par leurs aires respectives. La première contribution du carbone est située au même endroit que le pic du carbone de pollution. Il est cependant possible d'évaluer l'apport du carbone des citrates sur ce pic grâce notamment au pic relatif à la liaison O-C=O qui doit représenter 50% de la vibration totale du carbone des citrates (3 des 6 carbones de l'acide citrique donnent des liaisons O-C=O : Figure II.2.2). Plus de détails sur ces calculs sont donnés en annexe A.4.2.

L'oxygène est également présent et en désommant son pic deux contributions ont été trouvées (Figure II.2.9). Le pic caractéristique de la structure spinelle (O^{2-}) se situe vers 530 eV et un pic caractéristique de l'oxygène des citrates et des hydroxyles de surface est vers 513,8 eV.

En calculant la proportion de ce dernier pic dû aux citrates, il est possible de trouver si une quantité importante des hydroxyles en surface était éliminée par ce ratio utilisé (Tableau II.2.5).

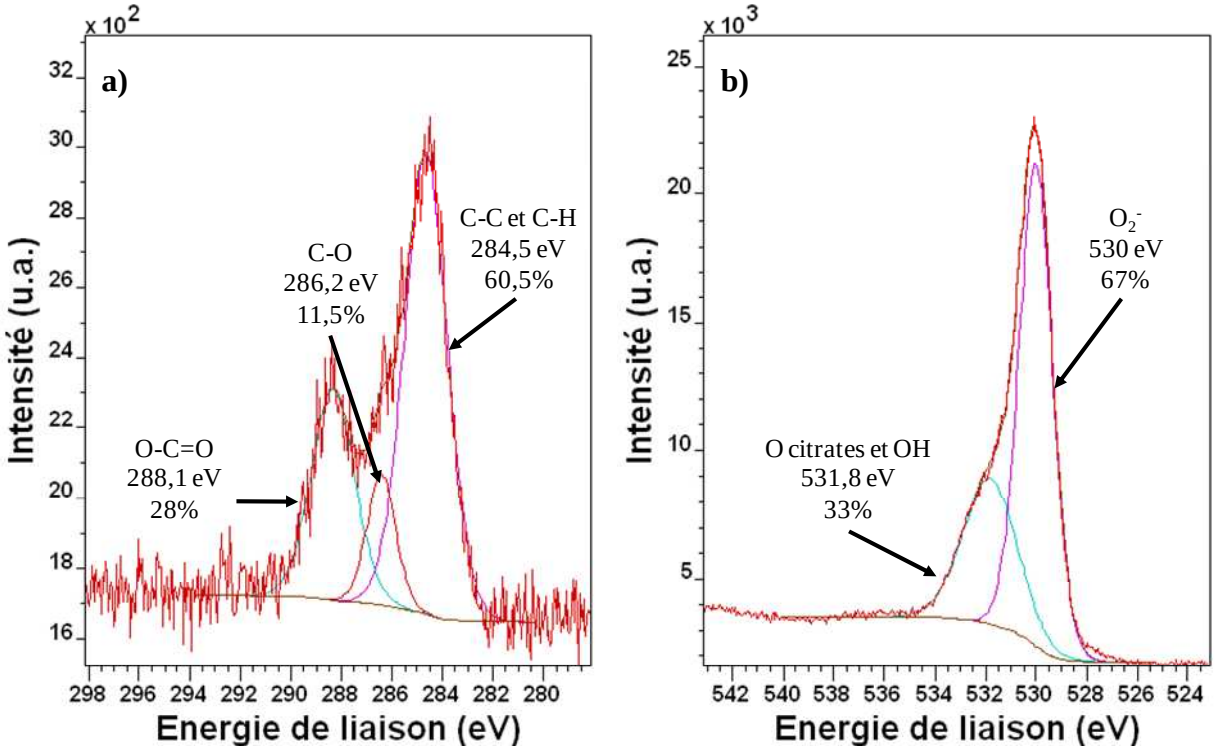


Figure II.2.9 : Désommation de pics XPS (a) du carbone et (b) de l'oxygène de la magnétite citratée à 5% dans la soude

En prenant en compte les éléments composant soit la magnétite, soit le citrate, le Tableau II.2.4 peut donc s'écrire :

Synthèse	Proportion Fe 2p (%)	Proportion O^{2-} (%)	Proportion OH (%)	Proportion C pollution (%)
Référence	40	49	7	4
5% citrates	30	38	9,5	6

Synthèse	Proportion C citrates (%)	Proportion O citrates (%)
Référence	0	0
5% citrates	7,5	9

Tableau II.2.5 : Proportions, obtenues par XPS, du fer et de l'oxygène de la structure spinelle, du carbone et de l'oxygène du citrate et du carbone de pollution sur la synthèse de référence et la magnétite citratée à 5% dans la soude

Par analyses en spectroscopie XPS, le pic du carbone et la nouvelle contribution au pic de l'oxygène confirment la présence de citrate à la surface des nanoparticules. Dans le cas du ratio de 5%, le nombre d'hydroxyles en surface n'a pas diminué montrant que les citrates ne remplacent pas tous les OH.

II.2.1.1.3.4 Conclusion sur les 5% de citrates utilisés à différents pH

Pour cette première approche, les citrates semblent jouer un rôle stabilisant sur les nanoparticules de magnétite en se condensant à leur surface par leurs fonctions carboxylates.

Par mesures de potentiels Zêta, il a été possible d'observer la modification de surface de la magnétite par des charges négatives dès pH = 5. Les analyses infrarouges, thermogravimétriques et XPS ont permis d'observer la présence de citrates en surface.

Par effet chélatant, la croissance des grains est ralentie permettant d'obtenir des cristallites plus petites. En revanche, leur effet antioxydant n'a pas été prouvé, sans doute à cause des lavages acides post synthèse très oxydant. Néanmoins, le taux de citrates n'était peut-être pas suffisant et l'augmentation du ratio a été envisagée pour mieux étudier son influence sur la stabilité et sur la morphologie des nanoparticules de magnétite.

II.2.1.1.4 Influence du ratio d'acide citrique sur la morphologie et la stabilité des nanoparticules

Dans cette partie, l'influence des ratios molaires (acide citrique/fer) de 5, 20 et 100% mélangés à la soude [0,75 M] avant co-précipitation a été étudiée.

II.2.1.1.4.1 Analyses morphologiques et structurales des nanoparticules synthétisées avec différents ratios molaires de citrates

Les données structurales des divers oxydes sont résumées dans le Tableau II.2.6. La structure spinelle a été systématiquement obtenue.

Conditions de synthèse	Paramètre de maille : a (Å)	δ Poix	Diamètre DRX (nm)	Diamètre BET (nm)	Surface spécifique ($m^2.g^{-1}$)
Référence	8,363 ± 0,003	0,077	9,8 ± 0,2	13,7 ± 0,2	90 ± 1
5% citrates	8,364 ± 0,001	0,075	7,6 ± 0,2	9,4 ± 0,1	132 ± 2
20% citrates	8,363 ± 0,003	0,077	7,6 ± 0,2	10,0 ± 0,2	123 ± 2
100% citrates	8,373 ± 0,003	0,057	5,5 ± 0,1	7,9 ± 0,1	156 ± 2

Tableau II.2.6 : Paramètres de maille et diamètres de cristallites (mesurés par la méthode de Le Bail) des nanoparticules modifiées par de l'acide citrique à différents ratios par rapport à une synthèse de référence sans acide citrique

La taille des cristallites a diminué avec les trois ratios de citrates. Pour 5 et 20%, les tailles sont relativement identiques mais pour 100%, elle a chuté drastiquement. Le paramètre de maille de la magnétite synthétisée avec 100% de citrates est plus proche de celui de la magnétite (a = 8,396 Å). Ainsi δ est plus faible laissant supposer que les citrates ont joué un rôle antioxydant protégeant ainsi de l'oxydation une partie des ions fer (II) de la magnétite malgré les lavages à l'acide nitrique.
L'effet chélatant des citrates est donc d'autant plus prononcé que sa concentration est élevée.

II.2.1.1.4.2 Analyses de la stabilité des nanoparticules synthétisées avec différents ratios molaires de citrates

Les potentiels Zêta (dans NaCl 10^{-2} M) des nanoparticules citratées en fonction du pH ont été comparés à ceux de la magnétite nue.

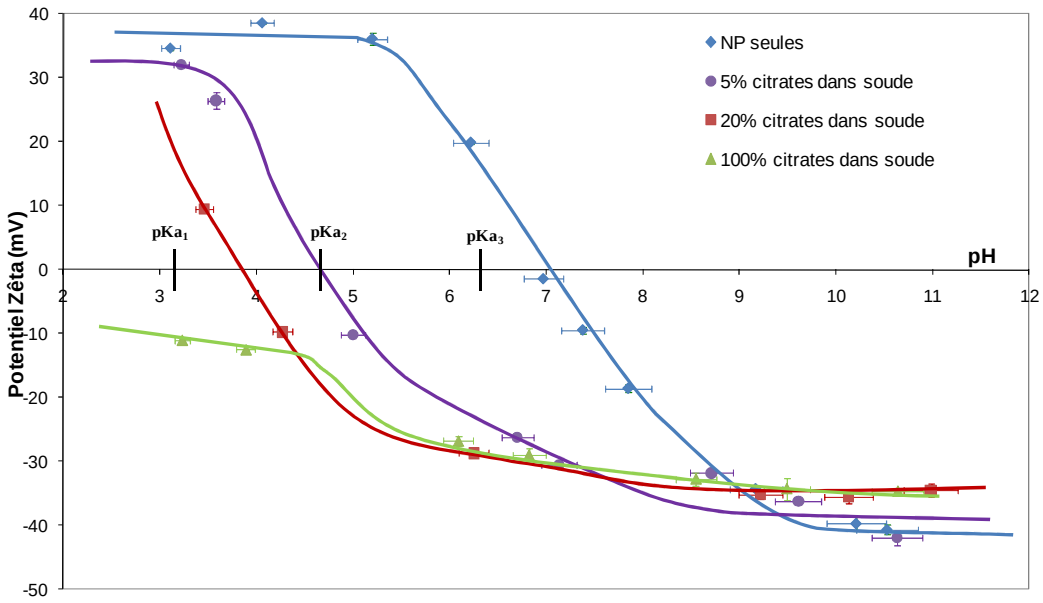


Figure II.2.10 : Potentiels Zêta en fonction du pH dans NaCl 10^{-2}M des nanoparticules de magnétite de référence et modifiées avec 5%, 20% et 100% d'acide citrique préparés dans la soude.

Le potentiel Zêta évolue en fonction de la concentration en citrates. Plus le ratio augmente, plus le point isoélectrique se décale vers les pH acides. Ainsi, pour 5% de citrates, le point isoélectrique est entre pH = 4,5 et 5, à 20% il est vers pH = 4 et à 100% le point isoélectrique n'est pas mesurable. L'acide citrique possède 3 pKa (3,13 ; 4,76 ; 6,40) avec des fonctions carboxylates en équilibre en fonction du pH. Ainsi pour pH < 3,13, l'espèce ne devrait posséder que très peu de charges négatives. Entre pH = 3,13 et 4,76 il devrait en posséder entre une et deux ; entre 4,76 et 6,40 entre deux et trois puis au-delà de 6,40 trois fonctions COO^-. Il faut rappeler qu'au moins une fonction carboxylate des citrates est nécessaire à l'adsorption à la surface de la magnétite ne laissant au maximum que deux COO^- pour charger la surface.

Ces propriétés sont effectivement observées pour les différents ratios étudiés. Plus le ratio citrates/fer augmente, plus le taux de complexation (ou taux de couverture des nanoparticules) augmente et plus on se rapproche de « nanoparticules de citrates » qui sont chargées négativement.

Les mesures de tailles des nanoparticules indiquent que la dispersion des nanoagrégats augmente avec le taux de complexation (Tableau II.2.7).

Conditions de synthèse	**Tailles PCS en nombre à pH = 7 (nm)**
Référence	Instable
Référence à pH = 3	23 ± 1
5% citrates dans la soude	65 ± 5
20% citrates dans la soude	55 ± 5
100% citrates sans la soude	33 ± 4

Tableau II.2.7 : Tailles moyennes en nombre des particules de magnétite citratées à 5, 20 et 100% comparées aux particules nues. Sauf mention contraire les mesures ont été effectuées à pH = 7.

Les ratios de 5 et 20% ne montrent pas de différence de tailles sur les nanoparticules de magnétite. En revanche, pour un ratio de 100%, la taille des agrégats diminue fortement.

II.2.1.1.4.3 Analyses de la surface des nanoparticules synthétisées à différents ratios de citrates

Par analyses thermogravimétriques, les nombres de citrates par nm² ont été calculés (Tableau II.2.8).

Conditions de synthèse	Perte de masse par rapport à la référence	Surface spécifique ($m^2.g^{-1}$)	Citrates / nm²
5% citrates mis dans la soude	4%	132 ± 2	**0,99**
20% citrates mis dans la soude	4,3%	123 ± 2	**1,06**
100% citrates mis dans la soude	4%	156 ± 2	**0,92**

Tableau II.2.8 : Calculs du nombre de citrates en surface pour les magnétites citratées à 5%, 20% et 100%

Les pertes de masses sont relativement identiques quel que soit le ratio de citrates utilisé. Il ne semble donc ne pas y avoir de différence de taux de greffage, par ATG, sur les nanoparticules citratées quand une différence est observée en mesure de potentiel Zêta.

Les différents échantillons ont été caractérisés par spectroscopie infrarouge. Le déplacement du pic de la fonction carbonyle de 1625 cm^{-1} vers 1595 cm^{-1} (épaulement du pic indiqué par une flèche) indique que les ions citrates ont bien complexé la surface des nanoparticules (Figure II.2.11).

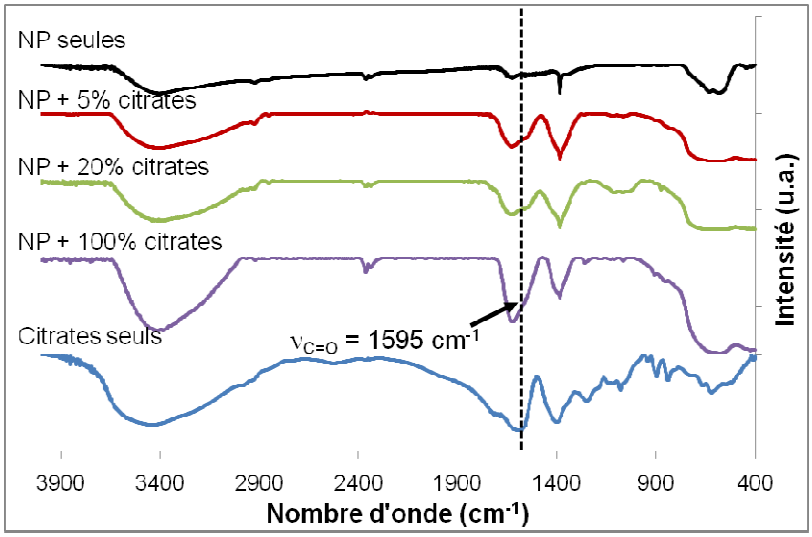


Figure II.2.11 : Spectres infrarouges des nanoparticules seules, des nanoparticules citratées à 5%, 20% et 100% et du citrate de sodium seul. Analyses préparées dans des pastilles de KBr.

Par analyses XPS, une quantité plus importante de carbone est également observée sur les nanoparticules citratées. Le taux d'oxygène est également supérieur à celui de la magnétite seul ce qui est vraisemblablement dû à la présence de citrates à la surface. Pour les nanoparticules avec 20 et 100% de citrates, la désommation du pic de l'oxygène a fait apparaître un taux d'hydroxyles en surface plus faible que dans le cas des nanoparticules nues ou citratées à 5%.
Ces résultats sont résumés dans le Tableau II.2.9.

Synthèse	Proportion Fe 2p (%)	Proportion O^{2-} (%)	Proportion OH (%)	Proportion C pollution (%)
Référence	40	49	7	4
5% citrates	30	38	9,5	6
20% citrates	26	55	1	3
100% citrates	35	42	2,5	2

Synthèse	Proportion C citrates (%)	Proportion O citrates (%)
Référence	0	0
5% citrates	7,5	9
20% citrates	7	8
100% citrates	8,5	10%

Tableau II.2.9 : Proportions, obtenues par XPS, du fer et de l'oxygène de la structure spinelle, du carbone et de l'oxygène des citrates et du carbone de pollution sur la synthèse de référence et les magnétites citratées à 5%, 20% et 100% à pH = 12.

Le pic de l'oxygène correspondant aux fonctions hydroxyles semble être masqué par l'oxygène des citrates quand leurs ratios dépassent 20% montrant que la surface de la magnétite est sans doute beaucoup plus « recouverte » à partir de ce ratio.

II.2.1.1.4.4 Conclusion sur les taux de citrates utilisés

Il n'a pas été possible par ATG de voir une différence sur le taux de fonctionnalisation en fonction du ratio utilisé. Cependant, par d'autres méthodes d'analyses, l'influence du ratio de citrates a bien été démontrée. En effet, par diffraction des rayons X et par mesure de surface spécifique, la taille des cristallites diminue pour le ratio citrates/fer de 100%. Avec ce même ratio, un léger effet antioxydant a été observé avec le paramètre de maille de la structure spinelle plus proche de celui de la magnétite.

Par zêtamétrie, le point isoélectrique diminue quand le ratio citrates/fer augmente traduisant une augmentation de sa complexation. Pour le ratio 100%, une brusque augmentation de la charge négative apparaît aux alentours du pKa_2 de l'acide citrique. Cet épaulement de la charge de surface a également été observé par Hadju *et al* (Hajdu *et al.* 2009). Dans cette étude, il a également été montré que l'augmentation du taux d'acide citrique augmente la charge négative en surface.

II.2.1.1.5 Conclusion sur la stabilisation des nanoparticules par l'acide citrique

L'acide citrique est un agent très intéressant pour de nombreux aspects. Il stabilise les nanoparticules à pH = 7 dès un ratio molaire de 5%. Par ailleurs, en utilisant l'acide citrique comme réactif lors de la co-précipitation, les cristallites de phase spinelle « pure » sont plus petites que lors des synthèses classiques.

En augmentant le taux de citrates de 5 à 100%, la taille des grains diminue et l'effet antioxydant de l'acide citrique a limité l'oxydation des fer (II) en fer (III). De plus, plus le ratio augmente, plus le point isoélectrique des nanoparticules se déplace vers les pH acides. Par analyses XPS, il a également été montré que les citrates remplacent les hydroxyles de surface.

Cependant, la stabilisation électrostatique n'a pas permis de garder un état de dispersion satisfaisant pour des forces ioniques importantes. Hadju *et al* ont en effet montré que les citrates sont stables jusqu'à 90 mM (Hajdu *et al.* 2009). Or le pH physiologique étant équivalent à 150 mM en NaCl, la stabilisation à l'acide citrique n'est pas suffisante pour des essais en milieu biologique.

Néanmoins par ses avantages sur la stabilisation et sur la morphologie des particules de magnétite, l'acide citrique a aussi été utilisé lors de synthèses en conditions continues et

hydrothermales pouvant s'étendre au domaine eau supercritique. Les ratios retenus ont été de 5 et 100% et les résultats seront présentés dans la partie II.3.

II.2.1.2 Stabilisation par l'acide 2,3-dimercapto-succinique (DMSA)

II.2.1.2.1 Caractéristiques et propriétés du DMSA

II.2.1.2.1.1 Propriétés chimiques du DMSA

Le DMSA ($C_4H_6O_4S_2$, M= 182,22 g.mol^{-1}) est un acide qui comporte deux fonctions carboxyliques (COOH) et deux fonctions thiols (SH).

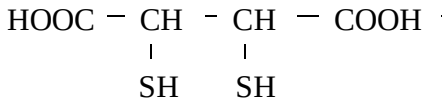


Figure II.2.12 : Formule semi-développée de l'acide 2,3 dimercapto-succinique

C'est un produit peu toxique utilisé en médecine comme chélatant de métaux lourds (Miller 1998) en cas d'empoisonnement par exemple au plomb (Cremin *et al.* 1999). Les équilibres acido-basiques des deux fonctions carboxyliques ainsi que des deux fonctions thiols sont les suivants (Fauconnier *et al.* 1999) (Eq. II.2.2.) :

$$R(COOH)_2(SH)_2 \xleftrightarrow[pKa1]{2,7} R(COOH)(SH)_2COO^- \xleftrightarrow[pKa2]{3,5} R(COO^-)_2(SH)_2$$

$$R(COO^-)_2(SH)_2 \xleftrightarrow[pKa3]{8,9} R(COO^-)_2(SH)S^- \xleftrightarrow[pKa4]{10,8} R(COO^-)_2(S^-)_2 \qquad \text{Eq. II.2.2}$$

$$R = C_2H_2$$

Pour des pH supérieurs à 3,5, les acides carboxyliques donnent des fonctions carboxylates (COO^-) puis au-delà de pH = 8,9 les fonctions thiols (SH) se déprotonent. A pH = 7 le DMSA est donc chargé négativement.

Le comportement thermique du DMSA a été évalué par analyse thermogravimétrique (Figure II.2.13).

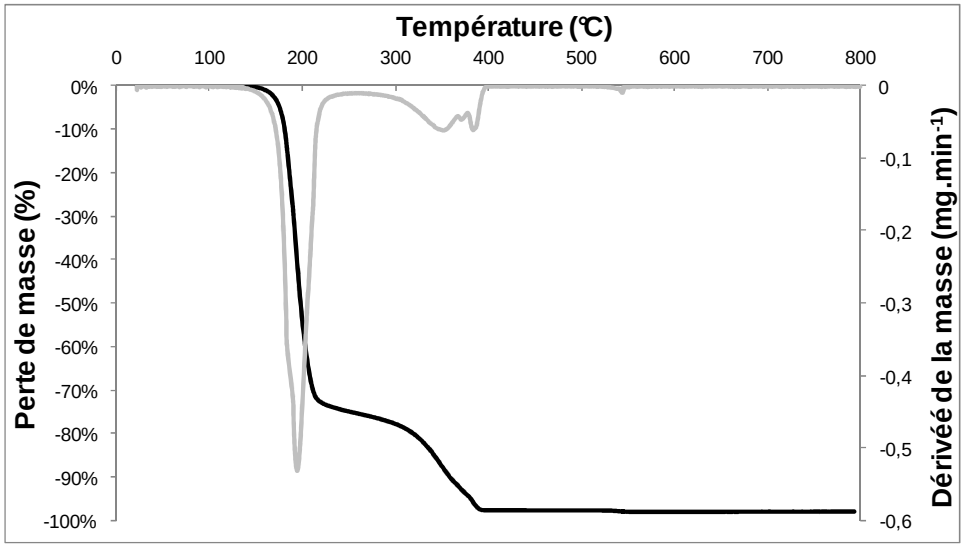


Figure II.2.13 : Analyse thermogravimétrique du DMSA (noir) et dérivée de la masse (gris). Les mesures ont été effectuées sous flux de N_2/O_2 (0,12/0,04 mL.min^{-1}) avec une rampe de montée en température de 2°C.min^{-1}.

Comme pour l'acide citrique, 98% de la masse est perdue entre 150 et 450°C.

Par spectroscopie infrarouge, trois fonctions caractéristiques sont détectables (Figure II.2.14).

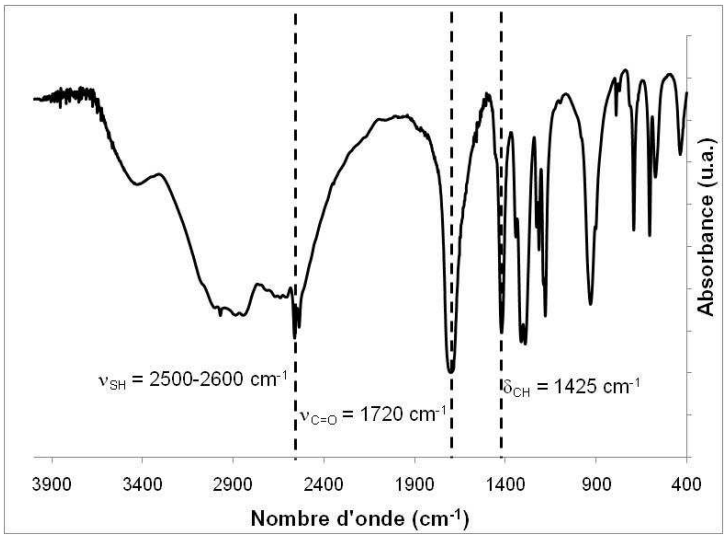


Figure II.2.14 : Analyse infrarouge du DMSA sous forme de poudre préparée dans des pastilles de KBr.

La bande étroite à 1720 cm^{-1} correspond au mode de vibration de la fonction carbonyle (C=O) et celle à 1425 cm^{-1} à la vibration des méthyles (CH_2). Le doublet vers 2500-2600 cm^{-1} est dû aux modes de vibration des fonctions thiols (SH) du DMSA (Pretsch *et al.* 2000; Chen *et al.* 2008).

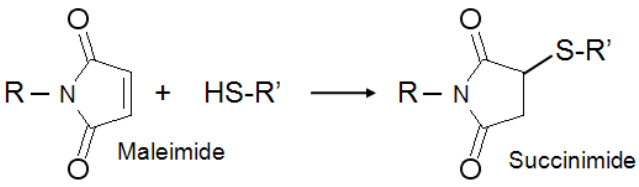
II.2.1.2.1.2 Le DMSA comme agent stabilisateur et comme outil pour la fonctionnalisation

Le DMSA est couramment utilisé comme modificateur de surface des nanoparticules. De la même manière que l'acide citrique, le DMSA va charger négativement la magnétite à des pH supérieurs à ses pKa. Il est ajouté à pH = 7 après synthèse et lavage des nanoparticules (Roger *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2007; Chen *et al.* 2008). Comme pour l'acide citrique, le DMSA est chélatant et se lie donc à la surface par ses deux fonctions COO^-. Les nanoparticules une fois modifiées en surface sont peptisées vers pH 10-11 pour déprotoner les fonctions thiols et carboxyliques.

Fauconnier *et al* (Fauconnier *et al.* 1997) ont montré que lorsque le pH dépasse 8-9, il y a compétition entre les COO^- et les groupes thiolates (S^-) pour se lier à la surface des nanoparticules. Le fait d'avoir, quel que soit le pH inférieur à 9 soit des fonctions thiols libres, soit des fonctions carboxylates, permet d'envisager le greffage de molécule active à la surface des nanoparticules.

Ainsi, par exemple, dans une partie de leurs travaux, Bertorelle *et al* (Bertorelle *et al.* 2006) ont utilisé les fonctions thiols du DMSA pour greffer une sonde fluorescente de la manière suivante :

1) De la fluorescéine (-R) couplée à une fonction maléimide ($C_4H_3NO_2$) est dissoute dans de l'acétone puis est mélangée à une solution aqueuse de DMSA (R'-SH) à pH = 7. La fonction maléimide va se coupler aux fonctions thiols de DMSA d'après la réaction :



Eq. II.2.3

2) La solution de fluorescéine couplée au DMSA est ensuite alcalinisée à pH =11.

3) Une suspension acide de ferrofluide (pH = 1) est ajoutée et le pH est ajusté à 4. Les nanoparticules modifiées par le DMSA floculant à ce pH, des lavages à l'eau sont réalisés.
4) La suspension est ensuite peptisée à pH = 9 pour être redispersée.
5) Le pH de la suspension est ajusté à pH = 7 puis par précipitations successives en présence de solutions concentrées en sel (NaCl ~ 0,17M), l'excès de fluorescéine est éliminé.

Cette expérience est schématisée par la Figure II.2.15.

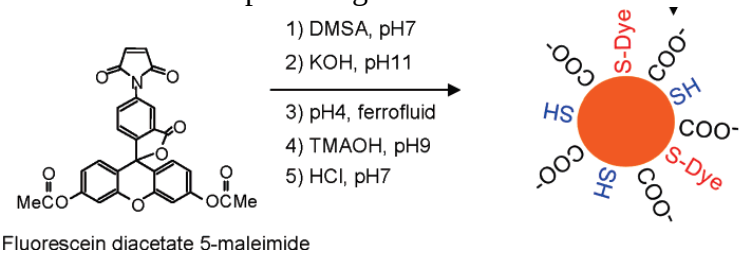


Figure II.2.15 : Procédé de couplage d'un fluorophore par le biais des fonctions thiols à des nanoparticules d'oxyde de fer d'après (Bertorelle et al. 2006).

Cet exemple permet de comprendre l'intérêt des thiols pour fonctionnaliser les nanoparticules. Par ailleurs, à pH inférieur à 4 (inférieur au pKa_2 du DMSA), les charges du DMSA ne sont pas assez nombreuses pour stabiliser les oxydes de fer qui décantent. Cette floculation permet l'élimination de l'excès de molécules plus rapidement que lors de dialyses ou de cycles de centrifugation.

Au niveau de la fonctionnalisation par les fonctions thiols, Bertorelle *et al* ont couplé les nanoparticules à un fluorophore, directement après ajout du DMSA en utilisant un grand excès de fluorophore qui a ensuite été éliminé. Pour d'autres molécules organiques, cette méthode sera plus problématique vu le coût élevé de certaines protéines. Une modification de surface préalable de la magnétite par le DMSA suivie du couplage d'une molécule sur les fonctions thiols libres a également été envisagée dans cette étude (Bertorelle *et al.* 2006).

Cependant, Roger *et al* ont montré dans une étude sur des nanoparticules modifiées par du DMSA que les fonctions thiols avaient tendance à s'oxyder rapidement en ponts disulfures (S-S) à cause de la présence d'ions ferriques en surface (Roger *et al.* 1999). Ainsi, un très grand nombre de fonctions thiols sont inactivées par cette formation de ponts disulfures (Figure II.2.16). Dans la suite de ce travail, nous avons essayé d'éviter ce problème.

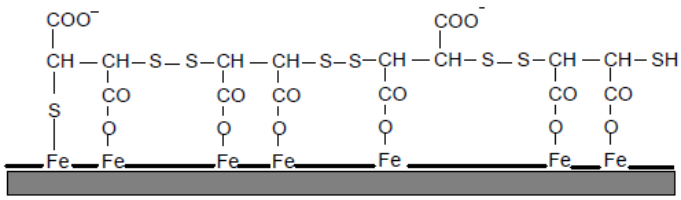


Figure II.2.16 : Représentation schématique des ponts disulfures formés à la surface de particules de magnétite modifiées en surface par du DMSA d'après (Roger et al. 1999).

II.2.1.2.2 Conditions de fonctionnalisation des nanoparticules par le DMSA

Dans cette partie, les nanoparticules ont été modifiées en surface post-synthèse. La magnétite utilisée est celle optimisée lors de l'étape de synthèse de la partie II.1.2.2.4.
Différentes concentrations de DMSA ont été utilisées. Une réaction typique s'est déroulée de la manière suivante :

1) 100 mg de suspension acide à pH = 3 de magnétite (environ 2,5 mL) ont été mélangés dans 40 mL d'eau sous atmosphère inerte (N_2).

2) 0,0439 mmol et 0,132 mmol de DMSA (respectivement 8 et 24 mg correspondant à des proportions massiques de 8% et 23%) ont été ajoutés à la suspension sous azote. Le mélange, vers pH = 3-4, a été agité pendant deux heures.
3) Le sol obtenu décantait rapidement sous aimant et le surnageant a été enlevé. 30 mL d'eau à pH = 3 ont été ajoutés et la suspension fut agitée sous ultrasons. Le ferrofluide décantait de nouveau et l'opération fut ainsi répétée trois fois.
4) La suspension a ensuite été redispersée dans l'eau distillée puis peptisée vers pH = 10. Les nanoparticules ont été lyophilisées en partie pour caractérisation.

II.2.1.2.3 Influence du DMSA sur la stabilité des nanoparticules

II.2.1.2.3.1 Analyses de stabilité des nanoparticules modifiées avec le DMSA

Des mesures de potentiels Zêta en fonction du pH (NaCl 10^{-2}M) ont été effectuées sur les suspensions modifiées par le DMSA et comparées à celles de la magnétite nue.

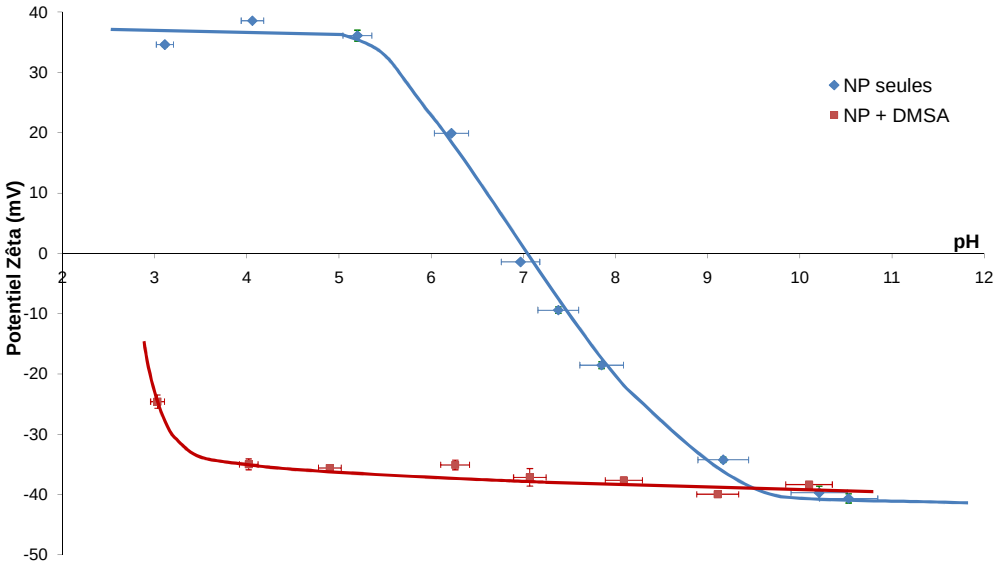


Figure II.2.17 : Potentiels Zêta en fonction du pH dans NaCl 10^{-2}M des nanoparticules de magnétite de référence et modifiées avec du DMSA.

En comparant les deux types de nanoparticules, on remarque que la magnétite avec le DMSA ne possède pas de point isoélectrique dans le domaine de pH de mesures. A pH inférieur à 4, le potentiel Zêta est tout de même plus faible en valeur absolue que pour tous les autres pH confirmant bien, comme dans le cas de l'acide citrique, l'influence des pKa sur la charge nette de surface. En effet, à pH = 2,7 et 3,5, seulement une fonction carboxylate est présente chargeant moins négativement la magnétite ce qui conduit même à leur décantation à ce pH ou en dessous. En revanche, au-delà de pH = 4, la charge nette négative est toujours constante stabilisant ainsi la magnétite à pH = 7. On peut également remarquer que la déprotonation des thiols n'influe pas sur la charge nette des nanoparticules laissant supposer, comme démontré par Roger *et al (Roger et al. 1999)*, que la majorité des thiols ont déjà formé des ponts disulfures.

Les nanoparticules de magnétite sont bien chargées négativement par le DMSA dans un domaine de pH allant de 4 à 12 et sont donc dispersées dans cet intervalle de pH.

Par mesure de taille en nombre par PCS, cette dispersion est confirmée de même que l'agglomération à pH inférieur à 4.

Conditions de synthèse	Tailles PCS en nombre à pH 3 (nm)	Tailles PCS en nombre à pH 7 (nm)	Tailles PCS en nombre à pH 11 (nm)
Référence	23 ± 1	instable	27 ± 5
DMSA	530 ± 50	51 ± 4	61 ± 4

Tableau II.2.10 : Tailles moyennes en nombre à pH = 3, 7 et 11 des particules de magnétite nue et modifiée par le DMSA (préparation à 8% massique de DMSA par rapport à la magnétite). [NaCl] = 10^{-2}M

Les tailles des nanoparticules couplées au DMSA sont de l'ordre de 50 nm pour tous les pH supérieurs à 4. En dessous, l'agglomération des particules commence et la taille augmente en même temps que leur sédimentation. La taille des agrégats de la magnétite à pH physiologique est dans un domaine acceptable pour les applications biologiques visées.

Par microscopie électronique en transmission (Figure II.2.18), l'état de dispersion est confirmé. Cependant, une légère agglomération de certaines particules apparaît, peut être due à la préparation de la grille MET.

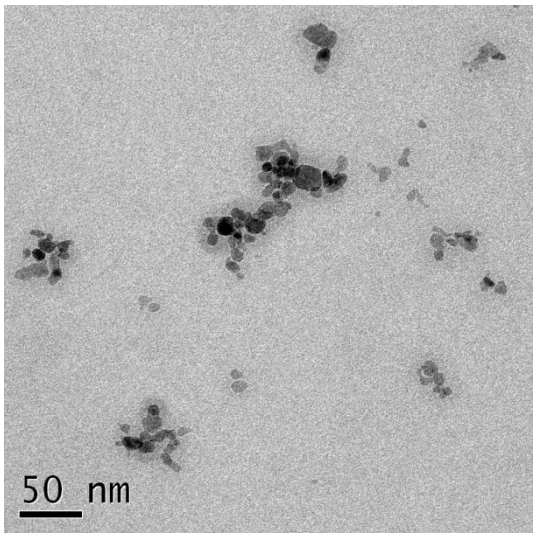


Figure II.2.18 : Cliché MET de nanoparticules modifiées par le DMSA à pH = 7 (préparation à 8% massique de DMSA par rapport à la magnétite)

Le DMSA disperse donc bien la magnétite à pH = 7 par répulsion électrostatique. Une légère agglomération a cependant eu lieu dans le milieu salin avant les clichés en microscopie.

II.2.1.2.3.2 Analyses de la surface des nanoparticules synthétisées

Par analyse thermogravimétrique, les pertes de masse entre 150 et 500°C par rapport à la synthèse de référence ont permis de déterminer le nombre de DMSA par unité de surface d'oxyde de fer.

Conditions de synthèse (% massique)	Perte de masse par rapport à la référence	S_{BET} ($m^2.g^{-1}$)	DMSA / nm^2
8% DMSA	1%	110 ± 2	0,3
23% DMSA	8%	110 ± 2	2,6

Tableau II.2.11 : Nombre de DMSA en surface des nanoparticules déterminé par ATG en fonction de la concentration en DMSA lors de la réaction.

Contrairement aux résultats obtenus avec l'acide citrique, l'augmentation du nombre de DMSA lors de la modification de surface semble bien augmenter le nombre de molécules présentes sur la magnétite.

Par analyses en spectroscopie infrarouge (Figure II.2.19), la vibration caractéristique des groupements CH_2 du DMSA est toujours présente à 1420 cm^{-1} et se voit par un épaulement à côté du pic caractéristique de la vibration des nitrates de la magnétite située vers 1340 cm^{-1}. Le mode de vibration de la fonction carbonyle est toujours présent mais passe de 1720 cm^{-1} à 1620 cm^{-1} montrant une complexation des COO^- avec les fers de la magnétite (Racuciu *et al.* 2006). Le doublet de la vibration des thiols a disparu semblant confirmer la formation de ponts disulfures à la surface de la magnétite. La large bande entre 500 et 700 cm^{-1} correspondant aux modes de vibration de la structure spinelle est aussi présente.

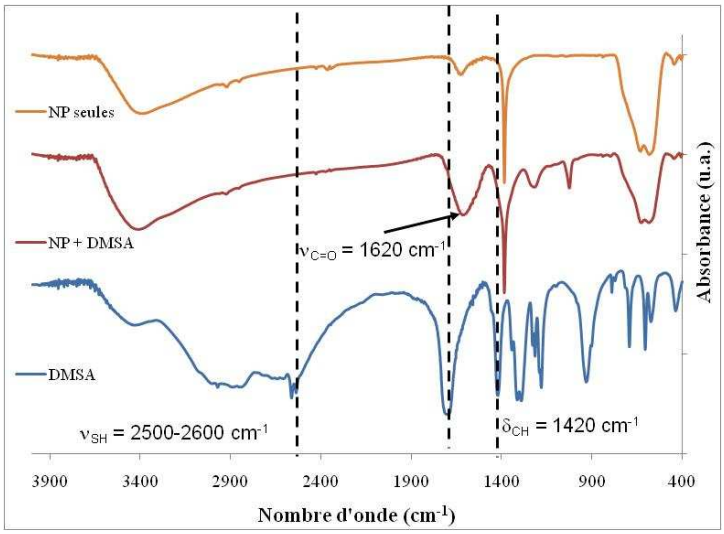


Figure II.2.19 : Spectres infrarouge des nanoparticules seules, modifiées par du DMSA à 8% massique et du DMSA seul. La flèche indique le déplacement du pic correspondant au mode de vibration de la fonction carbonyle (C=O).

Par désommation de spectres XPS, les éléments propres à la magnétite (fer, oxygène O^{2-} et oxygène OH) et au DMSA (carbone, oxygène et soufre) sont analysés à la surface des nanoparticules modifiées par le DMSA (Tableau II.2.12). Plus de détails sont donnés en annexe A.4.3.

Synthèse	**Proportion Fe 2p (%)**	**Proportion O^{2-} (%)**	**Proportion OH (%)**	**Proportion C pollution (%)**
Référence	40	49	7	4
NP-DMSA	14	19,5	10,5	14

Synthèse	**Proportion C DMSA(%)**	**Proportion O DMSA (%)**	**Proportion S DMSA (%)**
Référence	0	0	0
NP-DMSA	16	19	7

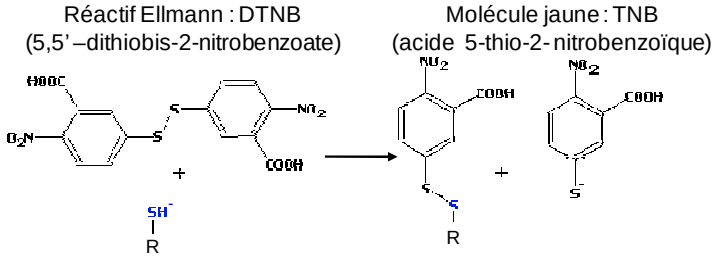
Tableau II.2.12 : Proportions, obtenues par XPS, du fer et de l'oxygène de la structure spinelle, du carbone, de l'oxygène et du soufre du DMSA et du carbone de pollution sur la synthèse de référence et sur de la magnétite modifiée par du DMSA à 8% massique.

Les plus grandes quantités de carbone et de soufre confirment la présence de DMSA à la surface de la magnétite après modification par cette molécule. Cependant, la proportion d'hydroxyles semble être identique laissant supposer que le signal du DMSA n'a pas substitué tous ces groupements à la surface.

II.2.1.2.4 Détection des fonctions thiols libres : un outil pour la post-fonctionnalisation

Comme vu lors de l'introduction de cette partie, les fonctions thiols du DMSA peuvent être utilisées pour greffer des molécules à la surface des nanoparticules. Cependant, il a été montré que la plupart des fonctions thiols forment des ponts disulfures très rapidement. Il a donc fallu essayer de quantifier le nombre de thiols toujours libres à la surface des nanoparticules.

La détection des thiols libres peut se faire à l'aide du réactif Ellman (Ellman reagent ou E/R) (Eyer *et al.* 2003). Ce réactif DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoate) incolore se transforme en une molécule jaune le TNB (l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque) en présence de groupements SH.



Eq. II.2.4

Pour effectuer les mesures dans des conditions reproductibles et pour que la réaction ait lieu, les suspensions doivent être diluées dans du milieu phosphate (PBS 20 mM) à pH = 8,2. La suspension sans réactif Ellman est ensuite caractérisée par spectroscopie UV visible à 412 nm. Puis après ajout de DTNB, s'il y a présence de thiols, l'absorbance sera supérieure.
Le protocole est résumé dans le Tableau II.2.13 :

Absorbance	Volume de PBS pH = 8,2 (µL)	Volume de suspension (µL)	Volume E/R (µL)
Sans E/R	2800	200	0
Avec E/R	2800	200	75

Tableau II.2.13 : Conditions récapitulatives des mesures en spectroscopie UV-visible avec le réactif Ellman (E/R) pour la détection de thiols libres.

L'oxydation du DTNB est une réaction dépendante du temps, il a été nécessaire de trouver le temps optimal pour effectuer nos mesures.

Ainsi, 80 µL d'une solution de DMSA de concentration 2 mM a été ajoutée à 3 mL de PBS et 75 µL d'E/R. Des mesures d'absorbance ont été effectuées en fonction du temps sur plus de trois heures. Le maximum d'absorbance obtenu l'a été pour quinze minutes de réaction (Figure II.2.20 a). Après ces résultats, une courbe de calibration de l'absorbance à quinze minutes du réactif Ellman en fonction de la concentration en DMSA a été réalisée. Le DTNB étant un réactif qui s'oxyde naturellement, il a été nécessaire de soustraire l'absorbance naturelle des 75 µL de ce réactif avant de tracer la courbe de calibration (Figure II.2.20 b) : valeur à **0,0855**. L'absorbance croît bien de manière linéaire en passant par l'origine. Il faut noter pour calcul, qu'une molécule de DMSA donne deux fonctions thiols.

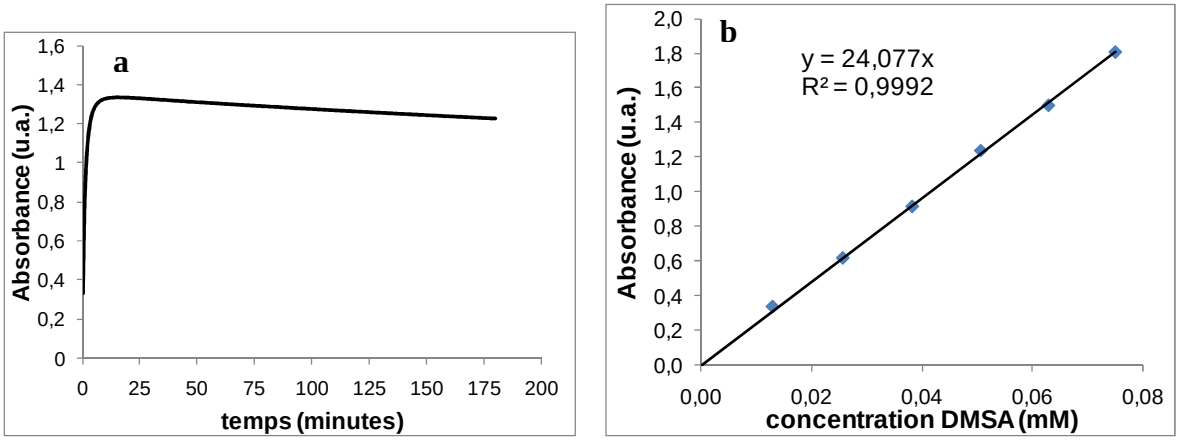


Figure II.2.20 : Cinétique de réaction du réactif Ellman avec le DMSA (a) et courbe de calibration de l'absorbance à 15 minutes de solutions de DMSA de concentrations différentes (b).

Les absorbances de 100 et 200µL de suspension de nanoparticules modifiées par du DMSA ont été mesurées avec et sans réactif Ellman. Les résultats sont donnés dans le Tableau II.2.14.

Volume de NP+DMSA (µL)	Absorbance avec E/R (A_0)	Absorbance E/R seul (A_1)	Différence (A_0-A_1)
100	0,0751	0,0855	-0,01
200	0,0667	0,0855	-0,02

Tableau II.2.14 : Mesures des thiols libres sur les nanoparticules modifiées par le DMSA. E/R : Réactif Ellman.

Ces mesures, réalisées quelques heures après la modification de surface, ne laissent pas apparaître de thiol libre comme l'avaient déjà démontré Roger *et al (Roger et al. 1999)*. Le DMSA ne permet donc pas de garder longtemps des fonctions thiols libres en surface des nanoparticules de magnétite.
Cette méthode de détection sera de nouveau utilisée lors de nouveaux essais de modification de surface et de post-fonctionnalisation des nanoparticules (partie II.2.3.2).

II.2.1.2.5 Conclusion sur les nanoparticules et le DMSA

Le DMSA permet de stabiliser des nanoparticules par répulsion électrostatique comme l'acide citrique. Contrairement à la modification effectuée avec l'acide citrique, le fait d'ajouter post-synthèse différents taux de DMSA et surtout de ne pas laver à l'acide nitrique, permet de trouver des proportions de molécules en surface différentes en fonction de la quantité ajoutée.
La floculation de la magnétite couverte de DMSA avant pH = 4 est un outil intéressant pour des méthodes de lavage alternatives pour éliminer l'excès de molécules.
L'oxydation des fonctions thiols et la formation de ponts disulfures à cause des fers (III) en surface ne permettent pas, pour l'instant, d'utiliser le DMSA comme un outil de fonctionnalisation stable dans le temps.

En milieu physiologique, les nanoparticules s'agglomèrent tout de même et leur stabilité à long terme est incertaine. De nouveaux agents de dispersion stériques ont donc été envisagés ainsi que des essais pour combiner les agents de dispersion stérique aux agents de dispersion électrostatique. Ces expériences seront détaillées dans les parties II.2.2 et II.2.3.2.

II.2.1.3 Conclusions sur les stabilisations électrostatiques

La modification de surface de la magnétite par des agents de dispersion électrostatique a permis de les stabiliser à pH physiologique. Les charges des acides carboxyliques utilisés ont décalé vers les pH acides les points isoélectriques des nanoparticules ainsi modifiées.

Les citrates ont été utilisés directement lors de la co-précipitation et ont diminué la taille des grains quelle que soit la condition d'ajout des molécules choisies (pH acide, pH = 5 ou pH = 12). L'augmentation du taux molaire de citrates (5, 20 et 100%) a permis le déplacement du point isoélectrique des suspensions, une diminution de la taille des cristallites et un léger effet antioxydant pour un ratio de 100%. En revanche, il n'a pas été possible de voir une différence entre le nombre de citrates ajoutés et le nombre de citrates en surface. Les lavages acides (HNO_3) directement après synthèse ont sans doute éliminé une quantité importante de ces molécules par désorption et remplacement par les nitrates. Néanmoins, ces particules ont été stabilisées à pH = 7 par répulsion électrostatique due aux charges négatives des citrates.

La modification par le DMSA a également permis la stabilisation électrostatique de la magnétite. Les analyses de surface ont bien confirmé la présence de DMSA à la surface des nanoparticules. Dans ce cas, sans doute en l'absence de lavage acide post synthèse, l'augmentation de la quantité de DMSA allait de paire avec le taux de molécules utilisé lors des essais. Compte tenu des pKa du DMSA, il a été possible de séparer les nanoparticules fonctionnalisées de l'excès de DMSA vers pH 3-4. Enfin, les fonctions thiols apportées par le DMSA ne semblent pas stables dans le temps empêchant de les utiliser pour des fonctionnalisations ultérieures de nos nanoparticules.

II.2.2 Stabilisation stérique des oxydes de fer par des polyéthylènes glycols silanisés (PEG-Si)

Une des voies utilisées pour modifier la surface des nanoparticules est la condensation de ligands carboxylates sur les sites de surface comme l'acide citrique ou le DMSA. Une autre approche consiste à utiliser un agent de couplage de type silane couplé soit à un groupement ionisable soit à des polymères de longueur de chaînes suffisante pour stabiliser stériquement les nanoparticules. Les groupements silane sont du type $\mathbf{R_nSiX_{4-n}}$ avec R des groupements ionisables ou polymériques et X des fonctions hydrolysables Cl, OR, …

II.2.2.1 Les alkoxysilanes

II.2.2.1.1 Mécanismes de réaction des alkoxysilanes sur une surface

Les groupements silanes les plus communément utilisés sont les alkoxysilanes de formules $RSiOR'_3$ qui se greffent de manière covalente à la surface d'un substrat grâce à ses hydroxyles de surface. La réaction est schématisée sur la Figure II.2.21 d'après les travaux de Arkles *et al* (Arkles 1977) portant sur le R-triméthoxysilane : $RSi(OCH_3)_3$.

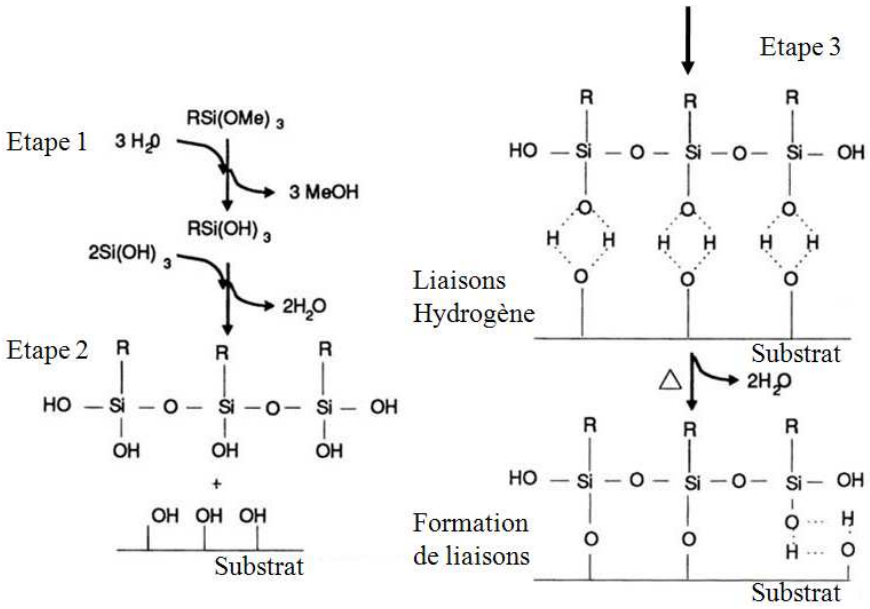


Figure II.2.21 : Mécanismes de greffage d'alkoxysilanes sur des surfaces d'après (Arkles 1977).

1) L'étape 1 correspond à la réaction d'hydrolyse qui s'effectue en solution aqueuse. La réaction donne un silanol avec le départ d'un alcool de longueur de chaînes correspondant à la longueur des chaînes d'éther de l'alkoxysilane. Dans l'exemple ci-dessus, le méthoxy silane va donner, après hydrolyse, trois méthanols.
2) La deuxième étape est la réaction de condensation intermoléculaire des silanols en siloxanols. Cette condensation peut se poursuivre, telle une réaction de polymérisation, si l'alkoxysilane possède plusieurs fonctions hydrolysables.
3) La dernière étape est la réaction de condensation des silanols libres sur les hydroxyles de surface du substrat, formant ainsi des liaisons covalentes. On parle alors de greffage covalent.

Pour greffer les nanoparticules par des groupements silanes, il faut au préalable trouver les conditions pour obtenir un nombre suffisant de silanols libres qui vont pouvoir réagir avec les hydroxyles de surface de la magnétite. L'optimisation de ces conditions vient d'un compromis à trouver entre une hydrolyse rapide et une condensation intermoléculaire retardée permettant la conservation sur un temps assez long des silanols libres.

II.2.2.1.2 Facteurs influençant l'hydrolyse et la condensation

Les facteurs influençant l'hydrolyse

L'hydrolyse peut avoir lieu en solution aqueuse très acide ou très basique et est maximale pour pH = 2 (Figure II.2.22). L'hydrolyse à pH acide évite la formation de liaisons carbone sur l'alkoxysilane et est précédée d'une protonation des groupes ester. Il a été montré que le taux d'hydrolyse était inversement proportionnel à la longueur de chaîne et au nombre de fonctions ester sur le silane. Ainsi, un triméthoxysilane s'hydrolyse plus lentement qu'un méthoxysilane. La vitesse d'hydrolyse est aussi fonction de la concentration en molécule et en eau (Arkles *et al.* 1992).

Les facteurs influençant la condensation

La condensation est également catalysée en conditions basiques mais est plus lente en milieu acide. Pour coupler les alkoxysilanes à la surface de substrat, il faut trouver un compromis entre une hydrolyse pas trop rapide et une condensation assez lente. D'après les courbes de vitesse d'hydrolyse et de condensation en fonction du pH, le pH optimum se situe aux alentours de 4 (Figure II.2.22).

A ce pH, l'hydrolyse est rapide et la condensation est assez lente pour que les groupes silanols formés soient stables suffisamment longtemps pour se greffer plus facilement à la surface des nanoparticules.

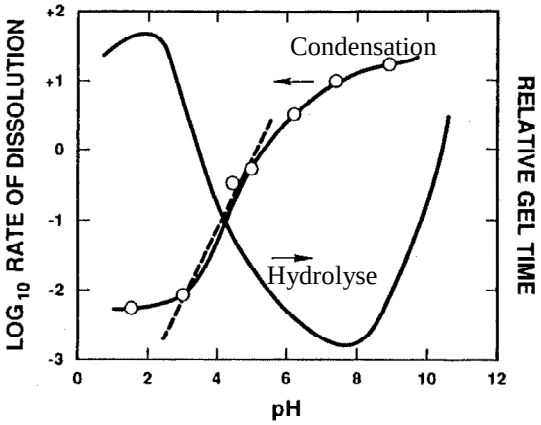


Figure II.2.22 : Evolution de la vitesse d'hydrolyse et de condensation d'hydroxysilane en fonction du pH d'après (Brinker et al. 1990)

II.2.2.1.3 Les alkoxysilanes choisis : le (3-isocyanatopropyl)triéthoxy-silane (ICPTES) et le (3-aminopropyl)triéthoxy-silane (APTES).

L'APTES (M = 221 $g.mol^{-1}$) et l'ICPTES (M = 247 $g.mol^{-1}$) retenus sont des alkoxysilanes composés de trois fonctions éthoxy qui sont plus lentes à s'hydrolyser que les groupements méthoxy. Cependant, la fonction éthoxy a été préférée à la méthoxy pour éviter la formation de méthanol, alcool toxique, lors de l'hydrolyse.

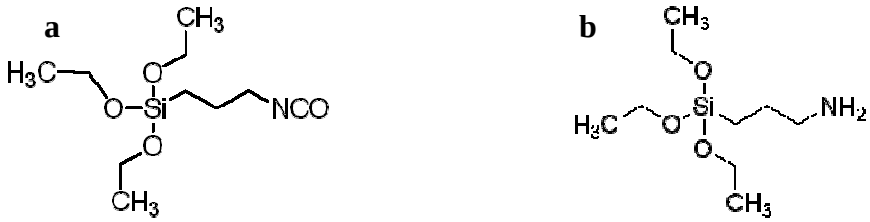


Figure II.2.23 : Formules semi-développées de l'ICPTES (a) et de l'APTES (b)

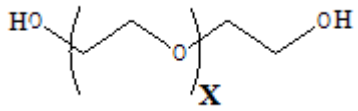
Les fonctions cyanate (NCO) et amine (NH_2) peuvent être utilisées pour le greffage des alkoxysilanes sur des polymères ou des molécules organiques.
Ces éthoxysilanes ont été utilisés pour être greffés à la surface des nanoparticules après fonctionnalisation par des polyéthylènes glycol dans le cas de l'ICPTES et par de la rhodamine dans le cas de l'APTES. Les PEG greffés servent à stabiliser la magnétite et la rhodamine à en faire un agent de détection en spectroscopie UV-visible et microscopie optique.

L'APTES n'a donc pas été utilisé directement sur la surface des nanoparticules comme il peut l'être pour charger sa surface par la fonction amine. Cette même fonction peut servir pour la fonctionnalisation ultérieure de la magnétite par des molécules ou des protéines (Flesch *et al.* 2005).

II.2.2.2 Stabilisation des nanoparticules par des PEG silanisés

Comme vu lors de l'introduction de ce travail, les nanoparticules d'oxydes de fer doivent être modifiées en surface pour être utilisées en biologie. Les premiers essais de stabilisation électrostatique ont permis de disperser la magnétite et d'influencer la morphologie des cristallites. Une autre méthode de stabilisation a été étudiée, le greffage covalent d'un polymère à la surface des nanoparticules : le polyéthylène glycol (PEG). C'est un polymère

composé d'un nombre donné de monomères d'éthylènes glycols (CH_2-CH_2-O). Sa formule s'écrit :



avec X : le nombre de monomères.

Les terminaisons du polyéthylène glycol simple sont deux fonctions hydroxyles potentiellement réactives et donc utilisables pour des fonctionnalisations.
Le PEG permet la dispersion par encombrement stérique des nanoparticules empêchant leur agglomération (Barrera *et al.* 2009; Shkilnyy *et al.* 2010).

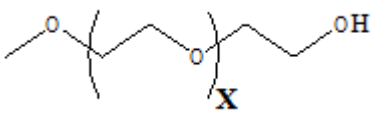
Le PEG couplé aux nanoparticules d'oxydes de fer est largement utilisé pour ses propriétés hydrophiles. Il a en effet été prouvé que greffer du PEG à la surface de nanoparticules diminue leur toxicité (des Rieux *et al.* 2006), augmente leur temps de circulation dans l'organisme en évitant leur internalisation par le système immunitaire (Xie *et al.* 2007). De plus, une fois accrochées à la surface, les chaînes de polymères vont empêcher l'adsorption de protéines plasmatiques sur les nanoparticules (on parle d'opsonisation) et retarder leur élimination par le système réticulo-endothélial (SRE) (Berry *et al.* 2003; Mornet *et al.* 2004).
De nombreuses méthodes sont utilisées pour greffer du PEG à la surface des particules comme par exemple la modification préalable de la surface par des carboxylates puis le greffage d'un PEG couplé à une fonction amine (Lattuada *et al.* 2007). Le greffage d'un alkoxysilane couplé à un PEG a été la technique retenue au vu de la réactivité des silanols avec les hydroxyles de surface de la magnétite. Le greffage de PEG sur la surface peut se faire soit en une seule étape soit en deux étapes :

1) Le couplage en une seule étape nécessite la synthèse préalable d'une PEG greffé à une fonction silane : on parle de PEG silanisé ou PEG-Si (Jo *et al.* 2000; Barrera *et al.* 2009; Oh *et al.* 2009). Le PEG-Si sera ensuite greffé à la surface des nanoparticules en une seule étape par les fonctions hydroxyles.
2) Le couplage en deux étapes est effectué en greffant au préalable sur la magnétite un amino silane qui pourra réagir ensuite sur une des fonctions alcool du PEG (Flesch *et al.* 2005).

La première méthode a été retenue pour cette étude. Il a fallu synthétiser en grande quantité des PEG silanisés et les greffer sur les ferrofluides élaborés au préalable. Ces nanoparticules fonctionnalisées ont ensuite été testées pour des applications biologiques.
Le (3-isocyanatopropyl)triéthoxy-silane a ainsi été couplé à des polyéthylènes glycol de longueurs de chaînes différentes : le PEG_{550} ($M \approx 550$ g.mol^{-1}), le PEG_{2000} ($M \approx 2000$ g.mol^{-1}) et le PEG_{5000} ($M \approx 5000$ g.mol^{-1}).

II.2.2.2.1 Synthèse des Si-PEG

Notre choix s'est porté sur des méthoxy-PEG (noté mPEG par la suite), c'est-à-dire des PEG ne possédant qu'une terminaison potentiellement réactive avec l'ICPTES pour éviter d'obtenir des polymères avec deux fonctions réactives en bout de chaîne. Les mPEG choisis ont la formule suivante :



avec X : respectivement de 12 pour le $mPEG_{550}$, 44 pour le $mPEG_{2000}$ et 112 pour le $mPEG_{5000}$.

II.2.2.2.1.1 Procédure de greffage de l'ICPTES sur le mPEG

Cette synthèse nous a permis d'obtenir des polymères silanisés de longueurs de chaînes différentes. Les conditions optimales de greffage de l'ICPTES sur les mPEG ont été choisies en accord avec la littérature (Jo *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2002).

Lors de l'introduction sur les alkoxysilanes, nous avons vu que les groupements éthoxy peuvent s'hydrolyser assez facilement en présence d'eau. Pour éviter l'hydrolyse et la condensation des silanols avant mise en présence avec les nanoparticules à modifier, les greffages de l'ICPTES sur les mPEG ont été réalisés dans un solvant anhydre : le tétrahydrofuran (THF) distillé. Une réaction classique avec du $mPEG_{2000}$ par exemple, s'effectuait de la manière suivante :

1) 50 grammes de mPEG (0,025 mole) ont été chauffés et séchés toute une nuit sous vide à 60°C.
2) Après cette étape, le mPEG a été dissous dans 40 mL de THF. 8 grammes d'ICPTES ont été ajoutés (0,032 moles) pour la réaction et 3 grammes de DBTL[8] (dibutil tin dilaurate $M = 631,5$ $g.mol^{-1}$ soit 0,005 moles) ont également été utilisés comme catalyseur de réaction. La réaction a été maintenue sous vide à 60°C pendant 48 heures. La réaction de couplage de l'ICPTES et du mPEG est réussie si la formation d'une fonction carbamate (R- HN-(C=O)O-R) est observée. Le mPEG est alors dit « silanisé » (ou mPEG-Si).
3) Le mPEG silanisé a ensuite été précipité dans le n-hexane et le solvant a été éliminé par évaporateur rotatif. Le produit est une poudre blanche gardée scellée sous atmosphère inerte pour éviter l'hydrolyse de sa fonction silane.

La réaction est résumée Figure II.2.24 :

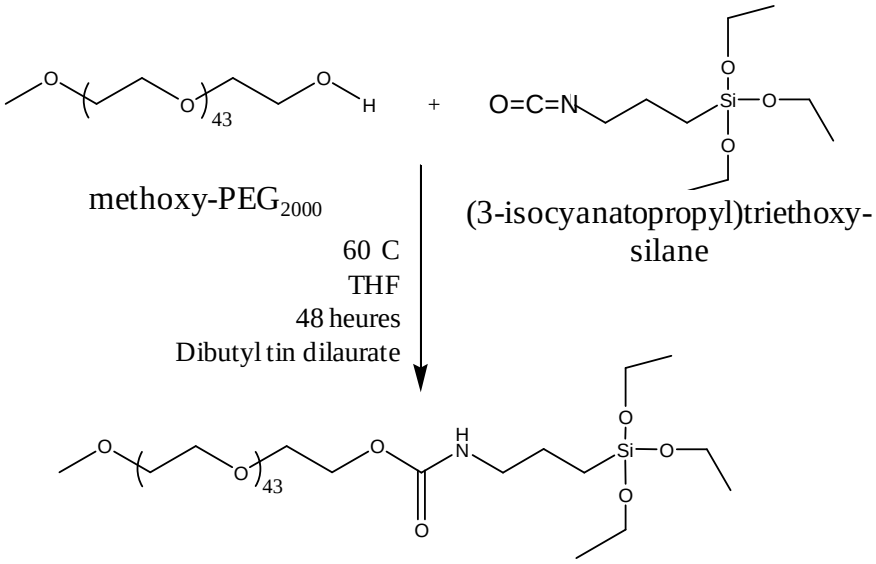


Figure II.2.24 : Réaction de l'ICPTES sur le $mPEG_{2000}$ pour obtenir du $mPEG_{2000}$ silanisé

[8] Un aparté sur le DBTL est nécessaire au vu des résultats obtenus lors des essais biologiques. Le DBTL est un produit extrêmement toxique (de risques T^+ : très toxique, R26 : très toxique en cas d'inhalation, d'ingestion, etc.) qui peut provoquer des toxicités sur le milieu biologique d'étude ou sur l'utilisateur. Il est nécessaire de bien l'éliminer lors des étapes suivantes de purification du mPEG-Si ce qui n'a pas été bien réalisé lors de la synthèse du $Si\text{-}mPEG_{5000}$. A partir de ces observations, la synthèse de mPEG-Si a récemment été réalisée sans DBTL. Les résultats semblent identiques aux synthèses effectuées avec catalyseur.

II.2.2.2.1.2 Caractérisations des mPEG silanisés

Pour confirmer le couplage de la fonction ICPTES sur le mPEG, des mesures en RMN du proton ont été effectuées. La Figure II.2.25 présente les 9 pics obtenus en RMN avec l'intensité relative de chacun d'entre eux, ainsi que leurs indexations.

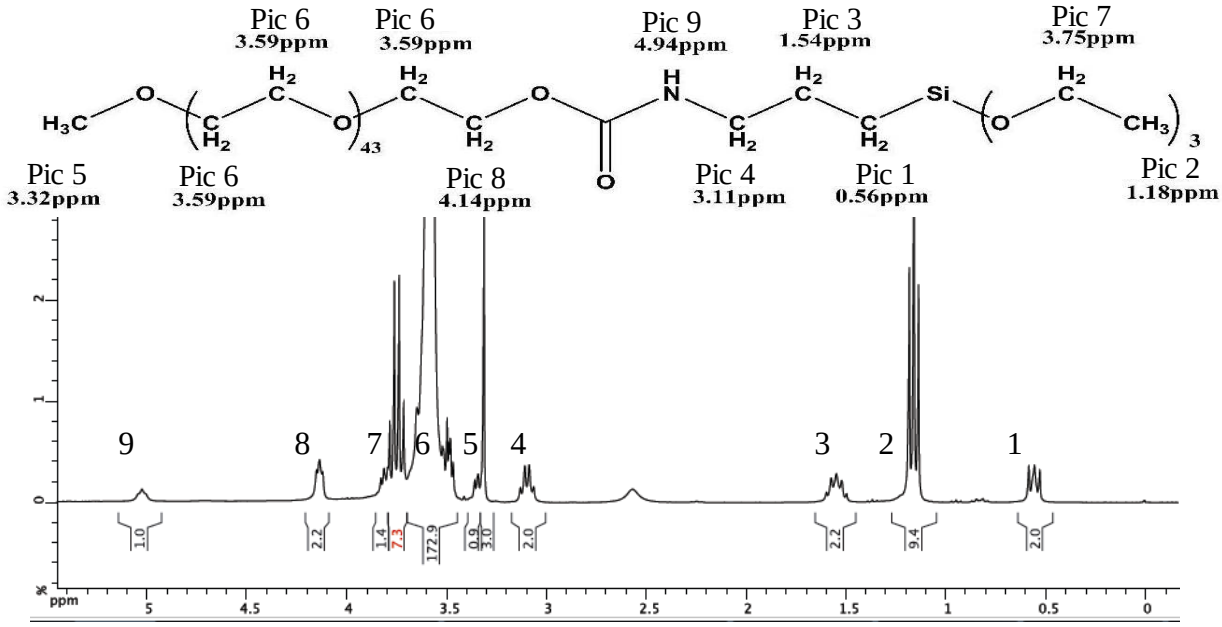


Figure II.2.25 : RMN du proton du mPEG$_{2000}$ silanisé et correspondance de chaque pic au-dessus. Mesure effectuée dans du chloroforme à 300,13 MHz à 22°C.

Le Tableau II.2.15 récapitule les intensités théoriques des pics de chaque proton en RMN et l'intensité réelle obtenue.

	Pic 1	**Pic 2**	**Pic 3**	**Pic 4**	**Pic 5**	**Pic 6**	**Pic 7**	**Pic 8**	**Pic 9**
ppm	0,56	1,18	1,54	3,11	3,32	3,59	3,75	4,14	4,94
Intensité théorique	2	9	2	2	3	174	6	2	1
Intensité réelle	2,0	9,4	2,2	2,0	1,2	172,9	8,6	2,2	1,0

Tableau II.2.15 : Intensités théoriques et réelles des protons présents sur le mPEG$_{2000}$-Si.

Le pic le plus important, caractéristique du couplage de l'ICPTES et du mPEG$_{2000}$ est le pic n°9 situé à 4,94 ppm correspondant au proton du NH de la liaison carbamate (R-HN-(C=O)O-R) qui n'existerait pas si la liaison silane-PEG n'était pas formée. Sa proportion stœchiométrique laisse supposer que la majorité de l'ICPTES s'est greffée sur le mPEG$_{2000}$. On peut également remarquer sur les pics 2 et 7, correspondant aux protons des fonctions éthoxy du silane, que la proportionnalité est bien conservée montrant que le silane ne s'est pas hydrolysé durant la réaction de greffage. La petite différence pour le pic n°7 est peut être due à sa proximité du pic n°6, pic très large et très important car correspondant aux protons des éthylènes glycols du polymère.

Cette procédure de greffage de l'ICPTES sur le mPEG$_{2000}$ est donc efficace et les résultats pour le mPEG$_{550}$-Si et le mPEG$_{5000}$-Si ont été identiques. Il faut noter que la liaison carbamate est instable pour des pH inférieurs à 3, donnée à prendre en compte lors des greffages sur les nanoparticules.

Les mPEG-Si ont également été analysés par spectroscopie infrarouge et par analyses thermogravimétriques.

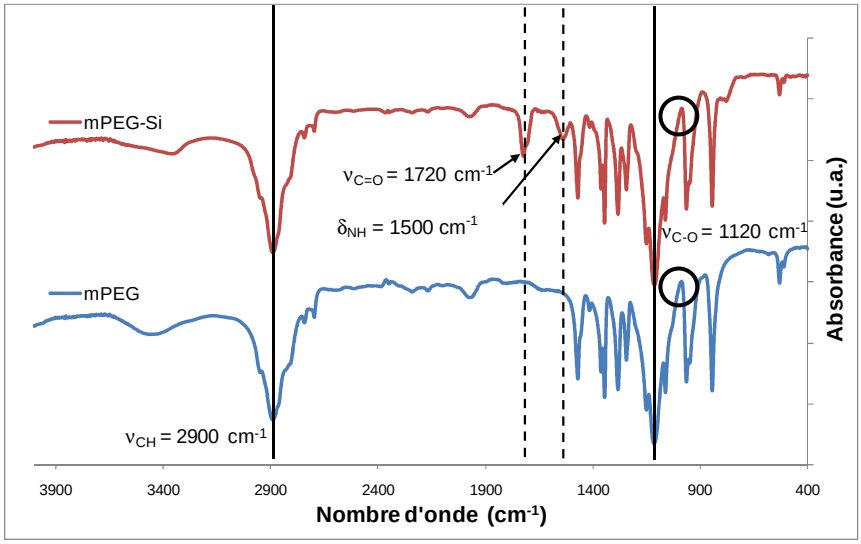


Figure II.2.26 : Spectres infrarouges du mPEG et du mPEG-Si. Les pics caractéristiques du mPEG et du mPEG-Si sont indiqués par des flèches. Les cercles représentent la valeur où devrait se trouver la bande de vibration de la liaison Si-O-Si. Les mesures ont été réalisées dans des pastilles de KBr.

Les deux principaux pics, présents dans les deux types de polymère, sont situés vers 1120 cm^{-1} et 2900 cm^{-1} et correspondent, respectivement, à la vibration de la fonction ester (CH_2-O-CH_2) et à la vibration des groupements CH_2. Au niveau du mPEG-Si, deux autres pics apparaissent : le pic caractéristique de la fonction carbonyle (1720 cm^{-1}) et le pic de la fonction amine secondaire (NH à 1550 cm^{-1}) (Pretsch *et al*. 2000; Zhang *et al.* 2002). Le couplage de la fonction ICPTES sur le mPEG est de nouveau confirmé. Il faut noter que la bande entre 1040 et 1110 cm^{-1} caractéristique de la liaison Si-O-Si (Mornet *et al.* 2005) est difficilement détectable car une bande est également présente à ce nombre d'onde sur du mPEG sans fonction silane. Si ce pic ne sort pas mieux dans le cas du mPEG-Si, on peut penser que notre méthode de fonctionnalisation a évité une condensation intermoléculaire importante des éthoxysilanes entre eux.

Les PEG synthétisés sont donc des mPEG-Si de masse moléculaire respectivement : 800 g.mol^{-1} pour $mPEG_{550}$-Si, 2250 g.mol^{-1} pour le $mPEG_{2000}$-Si et 5250 g.mol^{-1} pour le $mPEG_{5000}$-Si. Les nomenclatures des mPEG-Si utilisés sont résumées dans le Tableau II.2.16.

Polymère $mPEG_x$	x = 550 g.mol^{-1}	x = 2000 g.mol^{-1}	x = 5000 g.mol^{-1}
M après silanisation (g.mol^{-1})	800	2250	5250
Nom de l'échantillon	$mPEG_{550}$-Si	$mPEG_{2000}$-Si	$mPEG_{5000}$-Si

Tableau II.2.16 : Nomenclature de mPEG silanisés synthétisés

En analyse thermogravimétrique (Figure II.2.27) la perte de masse est majoritairement située entre 150 et 450°C, due au départ des chaînes carbonées et oxygénées.

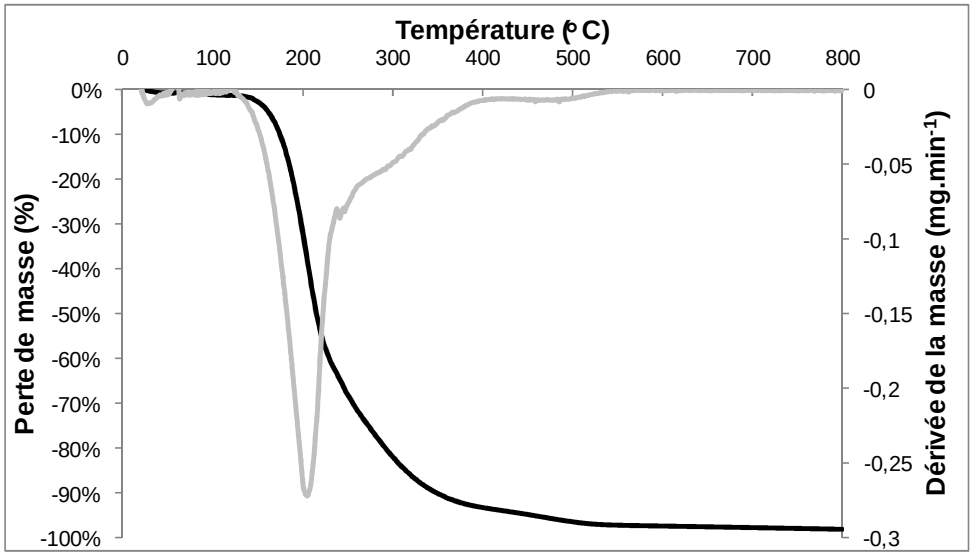


Figure II.2.27 : Analyse thermogravimétrique du $mPEG_{2000}$-Si (noir) et dérivée de la masse (gris). Les mesures ont été effectuées sous flux de N_2/O_2 (0,12/0,04 $mL.min^{-1}$) avec une rampe de montée en température de 2°$C.min^{-1}$.

La perte de masse est de 98% pour le $mPEG_{2000}$-Si, elle est de 92% pour le $mPEG_{550}$-Si et de 96% pour le $mPEG_{5000}$-Si. En considérant SiO_2 le seul résidu possible après traitement thermique, la perte de masse du mPEG-Si devrait augmenter en fonction de la longueur de chaîne. Le Tableau II.2.17 résume les pertes de masses théoriques avec le dioxyde de silicium (SiO_2 ; M = 60 $g.mol^{-1}$) comme seul résidu et les pertes de masse trouvées par ATG.

mPEG-Si ($g.mol^{-1}$)	Perte de masse réelle (%)	Perte de masse théorique (%)
800	92	92,5
2250	98	97,4
5250	96	98,9

Tableau II.2.17 : Pertes de masses en ATG réelles et théoriques des mPEG silanisés synthétisés.

La perte de masse des mPEG-Si de longueur de chaînes 800 et 2250 $g.mol^{-1}$ sont proches de la valeur théorique. Le $mPEG_{5000}$-Si en revanche voit sa perte de masse inférieure à celle du $mPEG_{2000}$-Si. Cette différence est peut être due à d'autres éléments présents avec ce polymère qui n'ont pas pu être éliminés par traitement thermique (comme le catalyseur de la réaction DBTL : partie II.2.2.2.4.3).

II.2.2.2.2 Conditions de greffage des Si-PEG

Une fois les mPEG silanisés, des greffages ont été effectués sur les nanoparticules de magnétite. Le fait de coupler des mPEG silanisés à la surface de nanoparticules peut s'appeler la pegylation.

Dans les études bibliographiques, un mélange eau/alcool (Jo *et al.* 2000; Ma *et al.* 2003; Flesch *et al.* 2005; Shen *et al.* 2008) entre 5/95 et 50/50 (en volume) ou des solvants organiques auxquels une petite quantité d'eau est ajoutée (le toluène par exemple (Kohler *et al.* 2006; Larsen *et al.* 2009)) sont fréquemment utilisés dans la réaction de couplage du mPEG-Si et de la magnétite pour éviter l'hydrolyse trop rapide des fonctions éthoxy. L'alcool retenu a été l'éthanol car l'ICPTES devait libérer des fonctions éthanol après hydrolyse. Comme vu lors de l'introduction sur les silanes, le pH optimal choisi pour conserver suffisamment longtemps les silanols et pour éviter la condensation intermoléculaire est pH = 4. Nous avons donc choisi un milieu eau/éthanol (50/50) à pH = 4, pH intéressant car ne risquant pas, par ailleurs, de détruire la liaison carbamate.

Dans la partie II.1.2.3.2, nous avions estimé le nombre d'hydroxyles libres à la surface de la magnétite à 7 OH/nm². En supposant qu'un mPEG silanisé n'allait se greffer que sur une fonction hydroxyle, nous avons travaillé en léger excès de mPEG-Si par unité de surface de nanoparticule soit : 7 mPEG-Si / nm². Le temps de réaction choisi a été de 48 heures.

Pour éviter de détruire la fonction carbamate, la suspension de nanoparticules avait été dispersée à pH = 3 (partie II.1.2.3.4).

Une synthèse type se déroulait de la manière suivante :

1) Environ 0,13 mmol de mPEG-Si a été ajouté dans 40 mL d'un mélange eau/éthanol à pH = 4.
2) Environ 2,5 mL de suspension de Fe_3O_4 soit 100 mg de nanoparticules (11 m²) ont ensuite été ajoutés au mPEG-Si. L'ensemble a ensuite été mis sous atmosphère d'azote et agité pendant 48 heures.
3) La suspension obtenue a été dialysée dans l'eau avec des membranes de 12 à 14 kDa pendant une semaine en changeant l'eau tous les jours.
4) Après dialyse, la majorité des nanoparticules pegylées ont été lyophilisées pour être stockées avant les tests biologiques. Des analyses ont été effectuées pour estimer leur état de dispersion et leur taux de greffage.

Les nanoparticules ainsi pegylées seront appelées par la suite nanohybrides.

II.2.2.2.3 Etat de dispersion des nanoparticules pegylées : influence de la longueur de chaîne

En première observation, les nanoparticules greffées avec du mPEG-Si semblent stables à pH proche de 7. Par microscopie électronique en transmission, cette dispersion est confirmée et beaucoup de cristallites seules sont observées (Figure II.2.28).

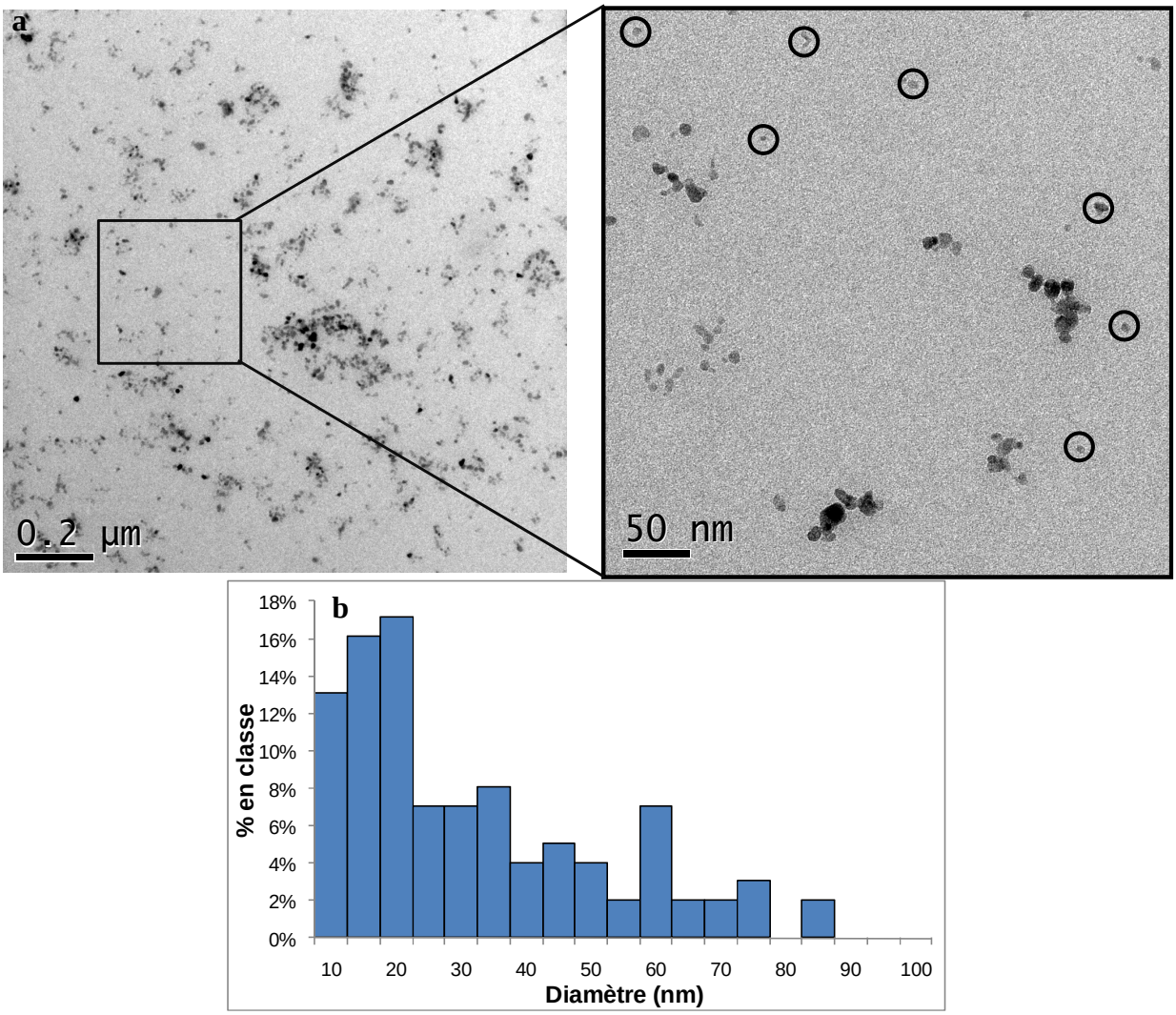


Figure II.2.28 : Clichés MET (a) de nanoparticules greffées par du mPEG$_{2000}$-Si. La zone encadrée est la partie zoomée du cliché suivant. Comptage MET sur 100 nanoparticules greffées par du mPEG$_{2000}$-Si (b)

Les tailles hydrodynamiques des nanoparticules ont été évaluées à pH = 7 par PCS et comparées à une valeur moyenne de comptage en microscopie électronique (Tableau II.2.18).

Conditions de synthèse	**Tailles PCS en nombre (nm)**	**Tailles MET (nm) moyenne arithmétique**
Référence	instable	nd
Référence à pH = 3	23 ± 1	20 ± 11
mPEG$_{550}$-Si	30 ± 4	29 ± 8
mPEG$_{2000}$-Si	38 ± 5	30 ± 8
mPEG$_{5000}$-Si	45 ± 4	25 ± 6

Tableau II.2.18 : Tailles en nombre obtenues en PCS dans NaCl à 10^{-2}M et tailles obtenues en comptage par microscopie électronique pour les nanoparticules seules et greffées avec du mPEG-Si. Sauf mention contraire les mesures ont été effectuées à pH = 7 (nd : non déterminé).

La taille des nanoparticules pegylées est plus grande en PCS que celle de la magnétite nue. Cette différence dans le diamètre pourrait être due à la couche de polymère à la surface qui augmenterait significativement la taille. La mesure de taille en PCS est la mesure de la couche de Stern autour de la nanoparticule (partie II.1.2.2.3). En ajoutant du mPEG-Si, cette couche

augmente proportionnellement avec la longueur de polymère utilisée et par conséquent le diamètre hydrodynamique augmente également. En revanche, en MET les tailles sont relativement identiques quel que soit le mPEG-Si utilisé sans doute dû au fait qu'il n'a jamais été possible de voir de polymère autour des nanoparticules greffées[9]. En revanche, les tailles sont toutes légèrement supérieures à celle de la magnétite nue (même en MET) induisant une légère agrégation des oxydes de fer greffés avec du mPEG-Si.

Comme vu dans la littérature (Xie *et al.* 2007), la taille hydrodynamique des nanoparticules a augmenté en fonction de la longueur de chaîne du PEG. Des mesures de potentiels Zêta ont été effectuées sur les suspensions pegylées et comparées avec celles de la magnétite nue.

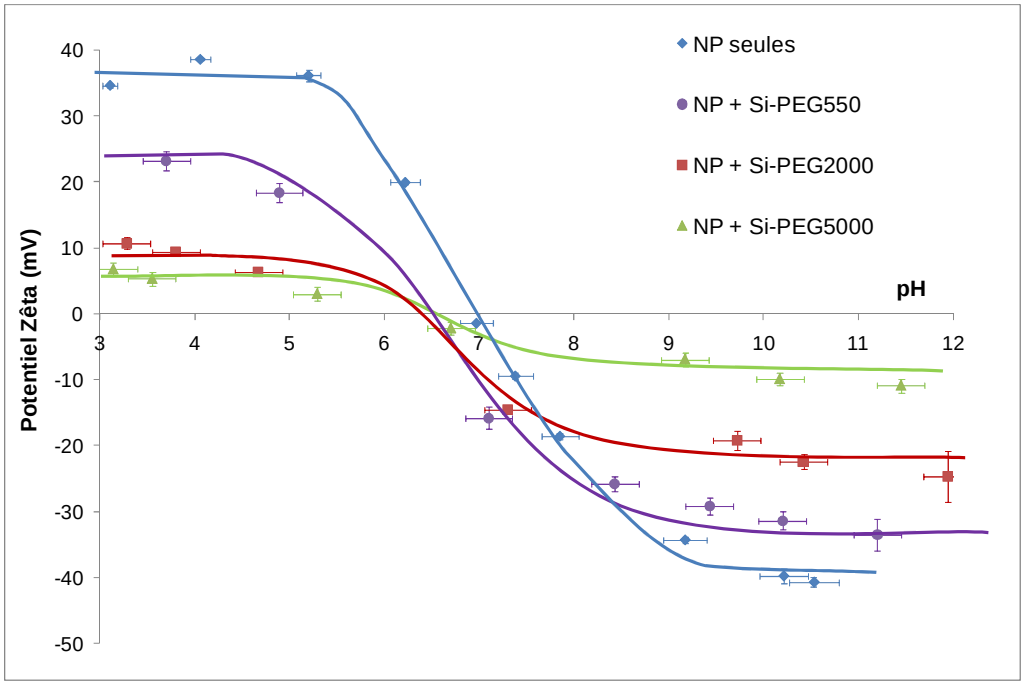


Figure II.2.29 : Potentiels Zêta dans NaCl 10^{-2}M en fonction du pH pour les nanoparticules seules et modifiées avec du PEG silanisé de longueur de chaînes de 550, 2000 et 5000 g.mol^{-1}

Le point isoélectrique des magnétites est toujours aux alentours de pH = 7. En revanche, la charge des nanoparticules diminue en fonction de la longueur du PEG. Cet écrantage des charges peut empêcher l'agglomération importante des nanoparticules. Cependant, pour les nanoparticules modifiées par du $mPEG_{550}$-Si après lyophilisation, leur redispersion n'a pas été possible ce qui nous a fait pencher pour l'utilisation prioritaire des $mPEG_{2000}$-Si et $mPEG_{5000}$-Si pour les applications biologiques visées.

II.2.2.2.4 Le PEG est-il greffé ou adsorbé?

Nos résultats ainsi que ceux de la littérature laissent penser que le greffage du mPEG silanisé à la surface des nanoparticules est effectif ; ceci en particulier grâce aux résultats obtenus par mesures de tailles hydrodynamiques en nombre par PCS ou par mesures de potentiels Zêta. Cependant, les tailles mesurées sont majoritairement données en nombre et nous avons vu que la réalité physique de la taille en PCS se donne en intensité fonction du diamètre à la puissance 6. Ainsi, le fait de passer en nombre induit une forte approximation et ne devrait pas être une méthode infaillible pour estimer si le PEG est à la surface des

[9] Il aurait été nécessaire de jouer sur les contrastes en MET pour voir le polymère à la surface des nanoparticules.

nanoparticules. Dans notre cas, la microscopie électronique n'a pas permis de mettre en évidence une couche de polymère sur la magnétite.

L'unique moyen de confirmer le greffage du mPEG-Si à la surface de l'oxyde de fer est de prouver l'existence d'une liaison Si-O-Fe. Une différence entre les diamètres hydrodynamiques obtenus et ceux par comptage MET a tout de même montré la présence de mPEG-Si à la surface des nanoparticules mais sans prouver l'existence d'une liaison covalente.

II.2.2.2.4.1 Analyses par infrarouge des nanoparticules pegylées

Une première idée a été de regarder si la liaison Si-O-Fe pouvait être mise en évidence par spectroscopie infrarouge (Figure II.2.30).

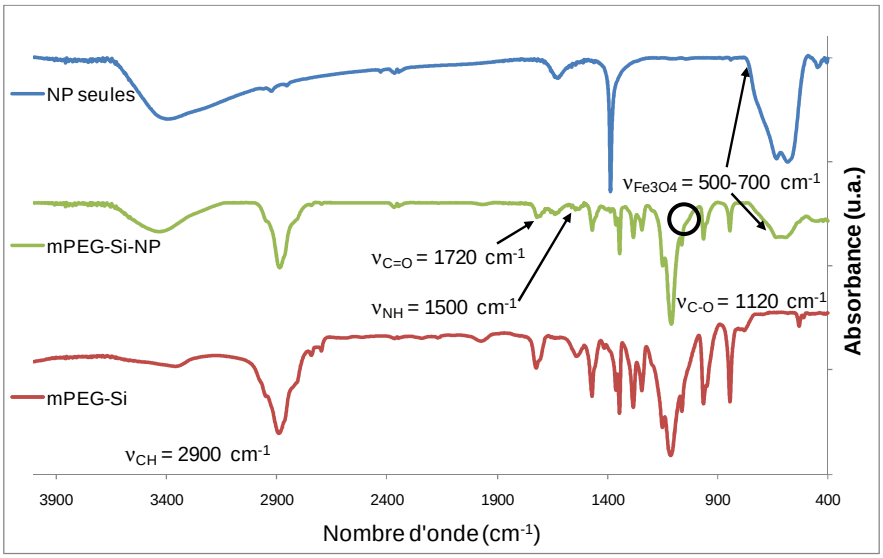


Figure II.2.30 : Spectres infrarouges des nanoparticules seules, pegylées avec du PEG_{2000} et du $mPEG_{2000}$-Si seul. Les pics de vibration caractéristiques du mPEG-Si et de la structure spinelle sont indiqués par des flèches. Le cercle représente la valeur où devrait se trouver la bande de vibration de la liaison Si-O-Fe. Les mesures ont été effectuées dans des pastilles de KBr.

Pour les nanoparticules greffées avec du $mPEG_{2000}$ silanisé, les pics caractéristiques de l'éthylène glycol vers 1120 et 2900 cm^{-1} sont présents. De même, les pics de l'amine secondaire et du carbonyle de la fonction carbamate (respectivement 1550 et 1720 cm^{-1}) sont également présents. L'étape de greffage n'a donc pas détruit cette fonction et la fonction silane est donc toujours sur la chaîne de mPEG. Par ailleurs, les bandes caractéristiques de la structure spinelle (entre 500 et 700 cm^{-1}) sont bien présentes aussi. Il n'a cependant pas été possible de trouver un pic caractéristique de la vibration de la liaison Si-O-Fe (située aux alentours de 986 cm^{-1}) et les données de la littérature sont contradictoires à ce sujet (Flesch *et al.* 2005; Mornet *et al.* 2005). Le pic caractéristique de la vibration de la liaison Si-O-Si (entre 1040 et 1110 cm^{-1}) n'est pas plus important après greffage laissant supposer, comme dans le cas de la partie II.2.2.2.1.2, que la technique de greffage de mPEG-Si sur les nanoparticules conduit à très peu de liaisons intermoléculaires entre les fonctions éthoxysilanes.
Cependant, la spectrométrie infrarouge n'a pas validé de manière certaine le greffage de la fonction silane à la surface des nanoparticules.

II.2.2.2.4.2 Analyse thermogravimétrique des nanoparticules pegylées

Par analyses thermogravimétriques après lavages et séchage des suspensions, des pertes de masse importantes ont permis d'estimer un taux de greffage par nm^2. En estimant la perte de masse des nanohybrides entre 150 et 500°C exclusivement due aux polymères (les pertes en eau chimisorbée ont été négligées) on peut arriver à un calcul du type :

$$PEG/_{nm^2} = \frac{\frac{\Delta m \cdot N}{M_{PEG}}}{(1-\Delta m) \cdot S_{BET} \cdot 10^{18}} \qquad \text{Eq. II.2.5}$$

avec : Δm la perte de masse de l'échantillon entre 150 et 500°C en %, N le nombre d'Avogadro, M_{PEG} la masse moléculaire du mPEG silanisé utilisé et S_{BET} la surface spécifique (110 $m^2.g^{-1}$) ramené en $nm^2.g^{-1}$ (avec le coefficient 10^{18}).

Ce calcul est basé sur l'hypothèse que la surface spécifique développée par les agrégats est identique à celle des cristallites lors de l'adsorption de N_2 (en mesure BET). En observation en microscopie électronique en transmission (partie II.2.2.2.3) la majorité des nanoparticules étant effectivement des grains élémentaires, cette première approximation a permis de comparer les taux de greffage des différents polymères (Tableau II.2.19).

Polymère greffé	Perte de masse entre 150 et 500°C (%)	mPEG-Si / nm²
Si-PEG_{550}	40	4,5
Si-PEG_{2000}	60	3,7
Si-PEG_{5000}	85	5,9

Tableau II.2.19 : Pertes de masses et estimation du nombre de mPEG-Si par nm² à la surface des nanoparticules de magnétite pour les trois mPEG-Si utilisés.

Bien que les taux de greffage calculés soient tous inférieurs aux nombres théoriques d'hydroxyles en surface (environ 7 OH/nm²), ces valeurs semblent un peu élevées notamment pour les nanoparticules greffées par du $mPEG_{5000}$-Si. En effet, Butterworth *et al* (Butterworth *et al.* 2001) ont montré que le nombre de chaînes de polymères était plutôt de l'ordre de 0,3 à 1 PEG par nm². Par ailleurs, cette même étude a montré que la proportion de PEG en surface était inversement proportionnelle à la longueur de chaîne, ce que nous observons dans notre cas. Le nombre important de polymères que nous avons obtenu par unité de surface peut mettre en évidence deux phénomènes. Le premier serait un phénomène de condensation intermoléculaire des silanols des mPEG silanisés bien que la bande caractéristique de la liaison Si-O-Si soit difficilement détectable en spectroscopie infrarouge. L'autre explication possible pourrait être que le lavage par dialyse n'ait pas été assez efficace et qu'une certaine quantité de PEG n'ait pas été éliminée en restant « enchevêtrée » entre les chaînes de mPEG-Si greffées à la surface. Des essais de décantation par ultracentrifugation jusqu'à 100000 G ont été entrepris mais n'ont pas permis de séparer les nanoparticules de la solution. Une autre méthode a dû être trouvée pour éliminer cet excès de polymère. Les nanoparticules ont été chargées par du DMSA après greffage de mPEG-Si (charge du DMSA partie II.2.1.2). La décantation à pH acide a permis d'éliminer plus facilement l'excès de mPEG-Si. Cette méthode est développée dans la partie II.2.3.2.

L'analyse thermogravimétrique n'a pas permis de conclure quant au greffage covalent de la fonction silane sur la surface de la magnétite. Néanmoins, la présence de PEG a été confirmée et un taux de polymère par nm² a pu être calculé.

II.2.2.2.4.3 Analyses XPS des nanoparticules pegylées

Pour prouver que le polymère a bien été greffé, la surface de la magnétite a été analysée par XPS. En plus du fer et de l'oxygène de la structure spinelle, les atomes caractéristiques du PEG ont également été analysés (le carbone, l'oxygène, le silicium et l'azote). De la même manière qu'avec le citrate, par désommation des pics de l'oxygène, deux contributions ont pu être trouvées. De l'oxygène correspondant aux O^{2-} de la structure spinelle et de l'oxygène de

l'éthylène glycol, l'oxygène des hydroxyles étant sans doute soit masqué par le pic de l'oxygène des mPEG-Si soit la totalité des hydroxyles a été greffée avec ce polymère. Au vu de la grande proportion de carbone dans le mPEG-Si, la contribution du carbone de pollution a été négligée et tout le carbone trouvé a donc été considéré comme provenant de ce polymère. Il en sera de même pour l'azote et le silicium. Plus de détails sont donnés en annexe A.4.4.

Synthèse	**Proportion Fe 2p (%)**	**Proportion O^{2-} (%)**	**Proportion OH (%)**	**Proportion C pollution (%)**
Référence	40	49	7	4
$mPEG_{550}$-Si	3,5	7,5	0	
$mPEG_{2000}$-Si	2	4,5	0	
$mPEG_{5000}$-Si	1,5	2,5	0	
Synthèse	**Proportion C PEG (%)**	**Proportion O PEG (%)**	**Proportion Si PEG (%)**	**Proportion N PEG (%)**
Référence	0	0	0	0
$mPEG_{550}$-Si	54,5	27,5	5	2
$mPEG_{2000}$-Si	60,5	29,5	3	0,5
$mPEG_{5000}$-Si	62,5	30,5	2,5	0,5

Tableau II.2.20 : Proportions, obtenues par XPS, du fer et de l'oxygène de la structure spinelle ; du carbone, de l'oxygène, du silicium et de l'azote du mPEG silanisé et du carbone de pollution sur la synthèse de référence et la magnétite pegylée par $mPEG_{550}$-Si, $mPEG_{2000}$-Si et $mPEG_{5000}$-Si.

La première observation est la chute drastique de la proportion de fer et d'oxygène de réseau de la magnétite dans le cas des nanoparticules pegylées par rapport à l'oxyde de fer seul. Cette diminution est compensée par l'augmentation de la proportion d'atomes provenant des mPEG-Si notamment le carbone et l'oxygène. L'XPS étant une analyse de surface, la diminution du signal du fer et l'augmentation des signaux du mPEG-Si prouvent la présence de polymère en surface des nanoparticules.

La présence de silicium en surface pourrait confirmer le greffage du silane sur la surface de la magnétite mais la petite proportion de ce composé n'a pas permis de voir une éventuelle différence énergétique pouvant être la signature d'une liaison Fe-O-Si. En revanche, la disparition des hydroxyles de surface peut laisser penser que les mPEG-Si se sont greffés avec la majorité de ces groupements couvrant ainsi la surface de magnétite.

Une autre différence observée est la proportion de ces atomes qui change de manière qualitative en fonction de la longueur de chaîne du polymère. En effet, plus la chaîne de PEG est longue, plus les taux de carbone et d'oxygène augmentent quand les taux d'azote et de silicium diminuent ce qui est en corrélation avec les formules des mPEG silanisés. De plus, le ratio carbone/oxygène provenant du mPEG-Si est proche de 2 comme dans la formule de ce polymère (Figure II.2.24).

Il faut noter qu'une très faible proportion d'étain (inférieure à 0,05%) a été trouvée dans l'échantillon de magnétite greffée avec de $mPEG_{5000}$-Si ce qui laisse penser qu'une partie du catalyseur DBTL est restée dans le mPEG synthétisé ce qui a posé ensuite des problèmes de toxicité lors des essais biologiques. Cette présence de catalyseur peut être également responsable de la différence entre la perte de masse mesurée en ATG et attendue.

Quoi qu'il en soit, les analyses XPS ont montré la présence de mPEG silanisés en surface de la magnétite après greffage avec des proportions de composés proportionnelles à la longueur des chaînes de polymères utilisés. Cependant par cette technique, la liaison Si-O-Fe n'a pu être mise en évidence. En revanche, le signal du fer étant presque totalement masqué au détriment du carbone du mPEG-Si (Tableau II.2.20), et en considérant la profondeur d'analyses en XPS d'environ 3 nm, nous avons pu estimer la couche de mPEG-Si de l'ordre de 3 nm. Par ailleurs,

en augmentant la longueur de chaîne du PEG, le fer était de plus en plus masqué ce qui prouve que l'épaisseur de PEG augmente.

II.2.2.2.4.4 Mélange physique de mPEG-Si et de magnétite

Toutes les analyses physico-chimiques utilisées ont prouvé la présence de polymère à la surface des nanoparticules après dialyse. Cependant, pour savoir si le polymère est adsorbé ou greffé, aucune technique n'a clairement mis en évidence la présence de la fonction Si-O-Fe caractéristique d'un couplage polymère-nanoparticule.

Un dernier essai a donc consisté à mélanger dans l'eau, pendant deux heures, la même quantité de mPEG non silanisé (0,13 mmol pour 100 mg de magnétite) et des nanoparticules pour laisser le polymère s'adsorber à la surface, et voir s'il stabilise la magnétite sans greffage covalent. Après la réaction, la suspension a été mise dans une solution de chlorure de sodium à 0,15 M. Il en a été de même pour une suspension de nanoparticules pegylées. Les deux suspensions ont été laissées quelques heures dans ce milieu et, après ce temps de contact, une sédimentation a été observée pour l'adsorption de mPEG par rapport au greffage covalent qui, lui, a stabilisé la magnétite dans les conditions du sérum physiologique (pH = 7,4 et force ionique = 0,15 M).

Figure II.2.31 : Photographie dans une solution de NaCl à 0,15M et à pH = 7,4 de magnétite ayant adsorbée du $mPEG_{2000}$ ou étant greffée par $mPEG_{2000}$-Si.

Par cette méthode, on remarque que l'adsorption physique ne suffit pas à stabiliser les nanoparticules de magnétite car (comme vu dans la partie II.2.1) les interactions de ce polymère avec la surface sont assez faibles. Seul le greffage de mPEG-Si permet une liaison stable et efficace permettant une meilleure stabilité de la magnétite.

II.2.2.3 Conclusion générale sur la modification de surface par le mPEG-Si

L'utilisation d'alkoxysilanes a permis la modification de la surface de la magnétite par greffage covalent. Ainsi, le couplage d'un triéthoxy-silane à des polyéthylènes glycols de longueurs de chaînes différentes (550, 2000 et 5000), ont rendu possible le couplage de ces polymères sur les nanoparticules d'oxyde de fer. Les nanohybrides ainsi synthétisés sont stables en conditions physiologiques avec un écrantage des charges de la surface des nanoparticules d'autant plus marqué que la longueur de chaine mPEG-Si est importante, justifiant ainsi son rôle de stabilisant stérique. Par ailleurs, la taille hydrodynamique de ces nano-objets augmente avec la longueur de chaîne du polymère ; alors que grâce aux mesures effectuées en XPS, l'épaisseur de mPEG-Si à la surface des poudres sèches a été estimée à environ 3 nm.

Les différents outils d'analyses ont permis d'évaluer la présence de chaînes carbonées en surface mais n'ont jamais démontré clairement l'existence d'une liaison entre le silicium et le fer. Cependant, par adsorption physique, les nanoparticules n'étaient pas stabilisées.

A partir de toutes ces observations, nous avons considéré que les mPEG silanisés étaient bien greffés à la surface de la magnétite et ainsi stabilisaient bien les nanoparticules de manière stérique. La difficulté à redisperser la magnétite pegylée avec le $mPEG_{550}$ nous a fait éliminer cette molécule pour certains essais biologiques.

II.2.3 Fonctionnalisation des nanoparticules de magnétite

Dans la dernière étape de cette partie, des premiers essais de fonctionnalisation des nanoparticules par des molécules fluorescentes ont été effectués. Cette étude devait ouvrir la voie au greffage de molécules thérapeutiques ou ciblantes sur les nanoparticules d'oxydes de fer.

Les fluorophores sont utilisés pour détecter *in vitro* par fluorescence la co-localisation de protéines ou de nanoparticules dans des cellules. Par exemple (Panchuk-Voloshina *et al.* 1999), dans la Figure II.2.32, des fluorophores Alexa couplés à des fonctions chimiques ou des anticorps sont utilisés sur des cellules épithéliales de l'artère pulmonaire bovine (BPAE). Les lysosomes sont colorés en rouge par l'Alexa 594-hydrazide (fluorophore avec une fonction possédant un groupement hydrazide N-N qui peut se coupler au formaldéhyde), les filaments d'actine sont colorés en vert par de l'Alexa 488-phalloïdine et la mitochondrie en bleu par l'Alexa 350-GAM (fluorophore couplé à un anticorps). Il en résulte une image en microscopie à fluorescence contrastée des différentes parties de la cellule.

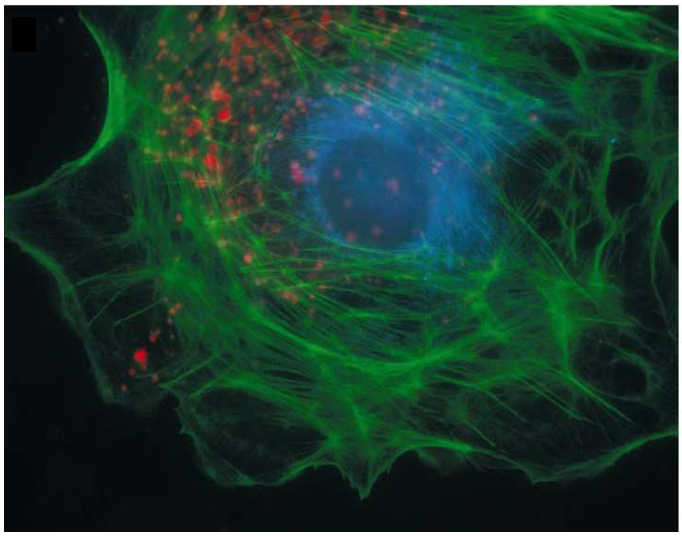


Figure II.2.32 : Image en microscopie à fluorescence d'une cellule épithéliale de l'artère pulmonaire bovine contrastée par différents fluorophores de la gamme Alexa, d'après (Panchuk-Voloshina et al. 1999).

Les nanoparticules d'oxydes de fer marquées par un fluorophore peuvent être utilisées pour faire apparaître des cellules les ayant internalisées ou étant co-localisées avec ces nano-objets. Il existe de nombreuses voies permettant de fonctionnaliser la magnétite nanométrique par une sonde fluorescente. Une première méthode consiste à greffer sur la magnétite des polymères couplés à un fluorophore (Zhang *et al.* 2002; Cinteza *et al.* 2006). Une autre méthode, retenue pour notre étude, consiste à coupler directement un fluorophore à la surface des nanoparticules. Cette voie utilise encore les fonctions silanes soit en greffant un amino-silane et en ajoutant après un fluorophore se couplant à la fonction amine (Steitz *et al.* 2007), soit en synthétisant un amino-fluorophore et en le greffant directement sur les

nanoparticules (Verhaegh *et al.* 1994). Des fluorophores réagissant avec des fonctions thiols sont également utilisés (Bertorelle *et al.* 2006).
Lors de cette première approche, la molécule fluorescente retenue, la rhodamine B, a été couplée à la magnétite pegylée de deux manières différentes :

1) Soit en silanisant la rhodamine et en la greffant comme lors de l'étude sur le PEG (partie II.2.2)
2) Soit en utilisant les fonctions thiols libres du DMSA à la surface des nanoparticules, et en les faisant réagir avec la fonction maléimide d'une rhodamine. On parle alors dans ce cas de post-fonctionnalisation, les nanohybrides pouvant être fonctionnalisés plusieurs jours après synthèse.

II.2.3.1 Fonctionnalisation par de la rhodamine silanisée

Dans cette partie, la rhodamine a été silanisée par le (3-aminopropyl)triéthoxy-silane (APTES).

II.2.3.1.1 Synthèse de RITC-APTES

II.2.3.1.1.1 Procédure de greffage de l'APTES sur la rhodamine

La rhodamine isothiocyanate (536 $g.mol^{-1}$) fut choisie pour réagir avec la fonction amine de l'APTES (221 $g.mol^{-1}$) et former ainsi une liaison de type thiocarbamide (NH-CS-NH) (Ohishi 2004; Shi *et al.* 2007; Steitz *et al.* 2007).
La réaction s'est déroulée de la manière suivante (Figure II.2.33) :

1) L'APTES (0,373 mol) est mélangé avec de la RITC (0,365 mol) dans du THF anhydre à température ambiante là encore pour éviter la formation de silanols.
2) Le milieu réactionnel est agité 3 jours.
3) Le THF est éliminé par évaporation rotative et 140 mg de RITC-APTES solide ($M = 757,5\ g.mol^{-1}$) sont récupérés.
4) La rhodamine est ensuite mise en solution dans de l'éthanol à 2 mg par mL dans des récipients opaques à la lumière pour éviter l'altération du fluorophore et stockée à -18°C.

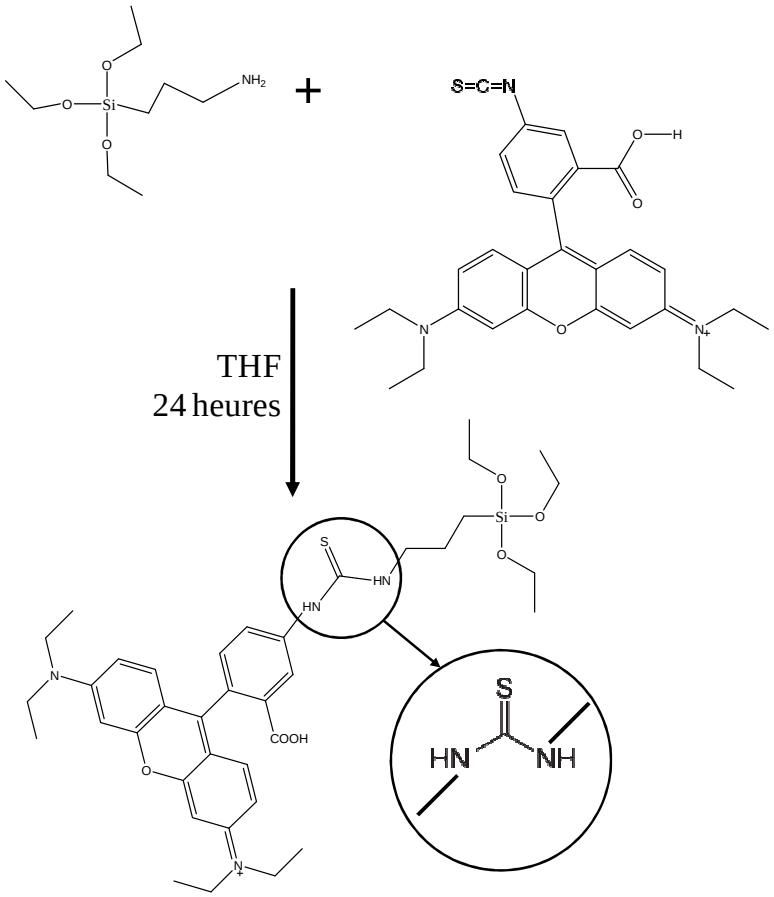


Figure II.2.33 : Schéma réactionnel du couplage de l'APTES sur la rhodamine isothiocyanate donnant de la RITC-APTES.

II.2.3.1.1.2 Caractérisations de la rhodamine-APTES

Pour quantifier le nombre de rhodamines greffées par nanoparticule, des mesures d'absorbance par UV-visible ont été effectuées. Pour connaître le maximum d'absorbance de cette molécule, des mesures ont été réalisées sur le domaine visible et proche ultra-violet.

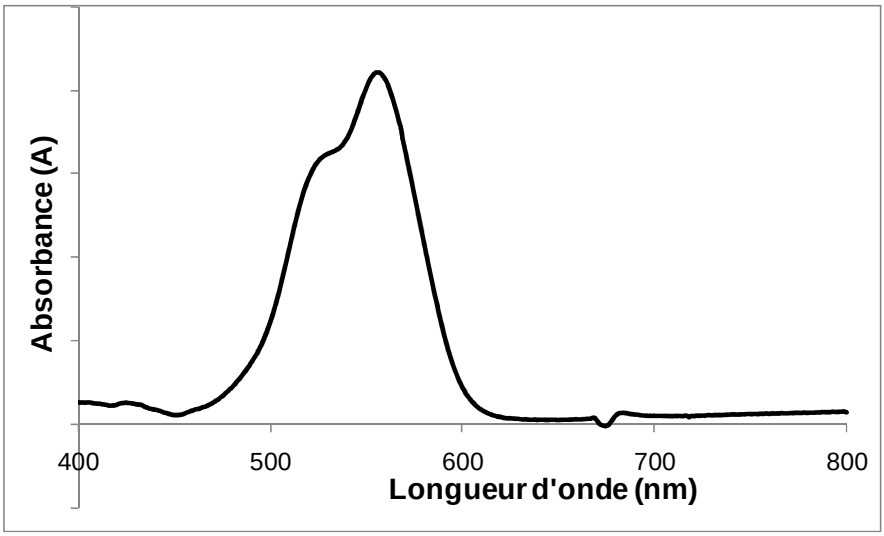


Figure II.2.34 : Absorbance de la rhodamine-APTES en fonction de la longueur d'onde.

Le maximum d'absorbance, de cette molécule est observé à 555 nm et c'est à cette longueur d'onde que toutes les mesures ont été effectuées.

II.2.3.1.2 Conditions de greffage de RITC-APTS sur les nanoparticules pegylées

La procédure de greffage de la rhodamine est semblable à celle de la fonctionnalisation des nanoparticules par le PEG :

1) 0,13 mmol de $mPEG_{2000}$-Si est dissous dans un mélange eau/éthanol à pH = 4 et maintenus sous atmosphère inerte (azote).
2) 100 mg (11 m²) de nanoparticules ont été ajoutés à la solution.
3) 0,5 µmole ($NP_{0,5RITC}$) ou 5 µmoles (NP_{5RITC}) (soit 0,38 et 3,8 mg) de RITC-APTES sont ajoutés à la suspension qui a été remise sous azote et à l'abri de la lumière.
4) La réaction est maintenue 48 heures puis le milieu réactionnel est mis en dialyse (seuil de coupure 12-14 kDa) pendant une semaine en changeant l'eau tous les jours et en évitant tout contact avec la lumière. 30 mL de chaque dialysat ont été gardés pour analyse par spectroscopie UV-visible.

Des nanoparticules stabilisées par des chaînes de PEG et fonctionnalisées par des molécules fluorescentes sont ainsi obtenues. Leurs concentrations sont respectivement de 4,90 $mg.mL^{-1}$ pour $NP_{0,5RITC}$ et 4,40 $mg.mL^{-1}$ pour NP_{5RITC}.
La réaction peut se résumer de la manière suivante (Figure II.2.35).

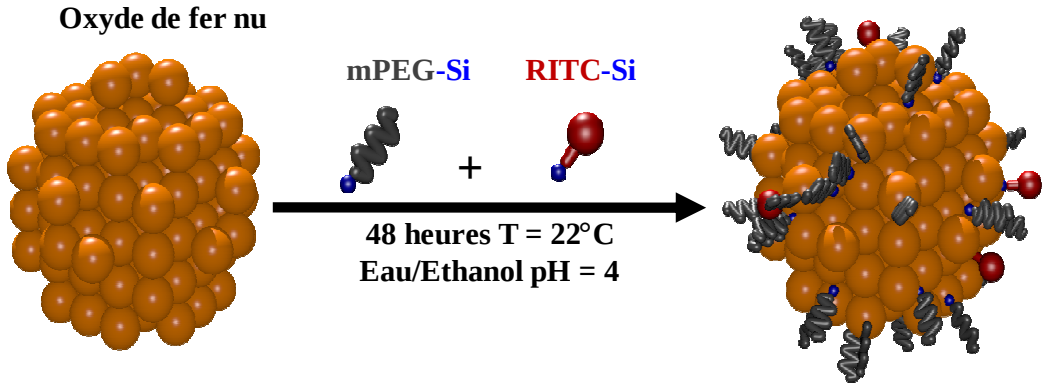


Figure II.2.35 : Schéma de la réaction du mPEG-Si et de la RITC-APTES sur les nanoparticules d'oxyde de fer nues.

II.2.3.1.3 Caractérisations des nanoparticules fonctionnalisées

II.2.3.1.3.1 Etat de dispersion des nanoparticules pegylées et fonctionnalisées par la rhodamine

En microcopie électronique en transmission (Figure II.2.36), comme dans le cas des magnétites pegylées, la dispersion est confirmée.

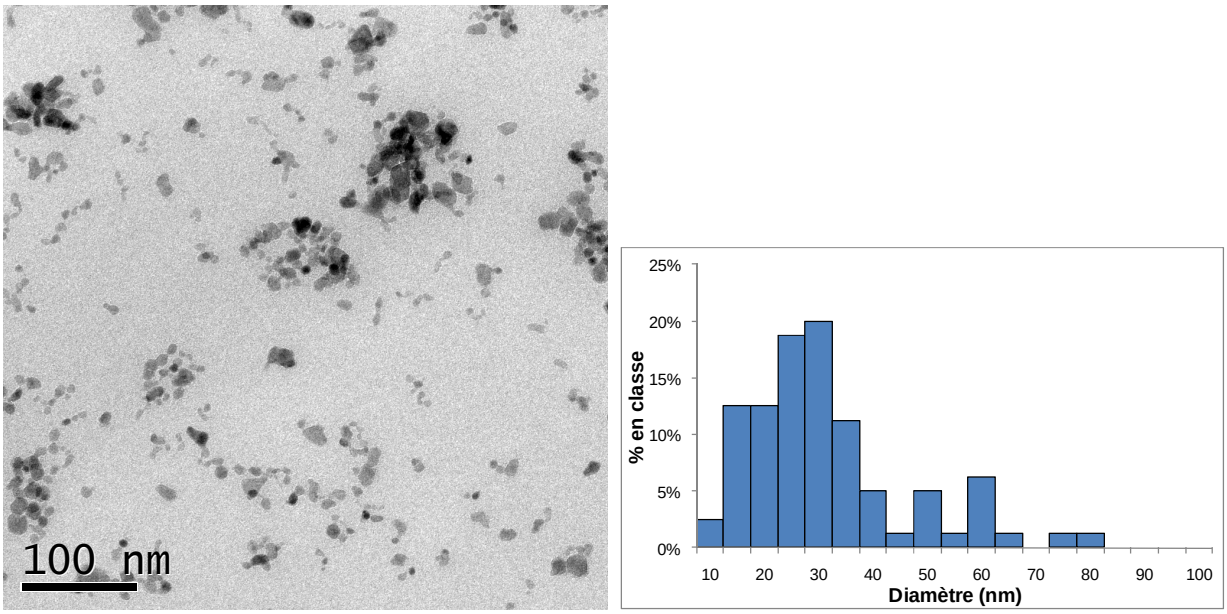


Figure II.2.36 : Cliché MET et comptage MET sur une centaine d'agrégats de nanoparticules greffées par du mPEG$_{2000}$-Si et fonctionnalisées par de la Rhodamine-APTES (NP$_{0,5RITC}$)

Les tailles hydrodynamiques de ces nanohybrides sont proches de celles pegylées sans fonctionnalisation (Tableau II.2.21).

Conditions de synthèse	**Tailles PCS en nombre (nm)**	**Tailles MET (nm) moyenne arithmétique**
Référence	instable	nd
Référence à pH = 3	23 ± 1	20 ± 11
NP-mPEG$_{2000}$	38 ± 5	30 ± 8
NP$_{0,5RITC}$	40 ± 5	29 ± 11
NP$_{5RITC}$	41 ± 4	**nd**

Tableau II.2.21 : Tailles obtenues en PCS dans NaCl à 10^{-2}M et tailles obtenues en comptage par microscopie électronique sur une centaine d'agrégats pour les nanoparticules seules et greffées avec du Si-mPEG$_{2000}$ et avec du Si- mPEG$_{2000}$ ainsi que fonctionnalisées avec de la RITC-APTES. Sauf mention contraire les mesures ont été effectuées à pH = 7 (nd : non déterminé).

Le greffage de rhodamine sur les nanoparticules ne semble pas influencer leurs tailles.

II.2.3.1.3.2 Caractérisations de la quantité de mPEG-Si et de rhodamine à la surface des nanoparticules

Les nanoparticules ont été analysées par analyse thermogravimétrique et par spectroscopie infrarouge pour voir si la rhodamine était détectable par ces deux méthodes.
En ATG (Tableau II.2.22), les pertes de masse sont semblables à celles des greffages seuls de la partie II.2.2. L'impossibilité de dissocier le départ de la rhodamine de celui du mPEG-Si nous a fait négliger l'influence de cette molécule sur la perte de masse totale de nos nanoparticules.

Méthodes	Δm entre 150 et 500°C (%)	mPEG-Si / nm²
Si-PEG_{2000}	60	3,7
Si-PEG_{2000} + 0,5 µmoles RITC	58	3,4
Si-PEG_{2000} + 5 µmoles RITC	58	3,4

Tableau II.2.22 : Pertes de masses (Δm) et estimation du nombre de mPEG-Si par nm² pour les nanoparticules pegylées et fonctionnalisées par de la rhodamine

Les taux de greffage sont comparables à ceux des nanoparticules pegylées seules.

En analyse par spectroscopie infrarouge (Figure II.2.37), les pics caractéristiques du mPEG-Si et de la magnétite sont également retrouvés. La bande de vibration de la fonction carbonyle est toujours observée vers **1720 cm^{-1}**, les vibrations de l'éthylène glycol sortent toujours vers 1120 et 2900 cm^{-1} et la structure spinelle est présente entre 500 et 700 cm^{-1}.

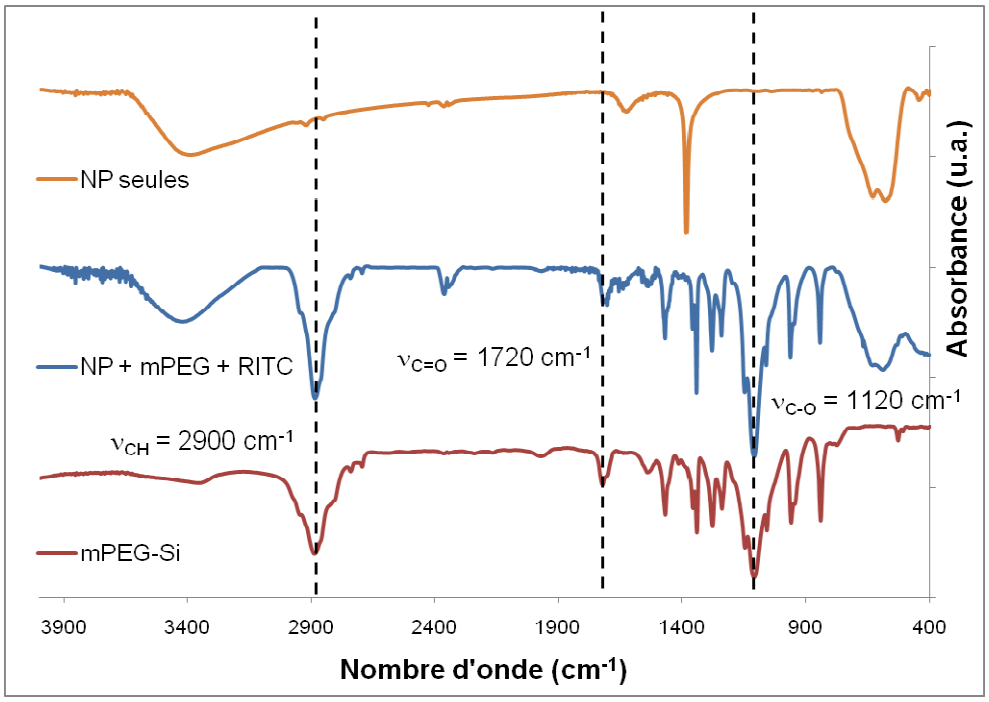


Figure II.2.37 : Analyses infrarouges de la magnétite seule, modifiée avec le mPEG-Si et de la rhodamine et du mPEG-Si seul. Les mesures ont été effectuées dans des pastilles de KBr.

Ces deux analyses ont bien montré la présence de polymère à la surface de la magnétite mais n'ont pas mis en évidence la présence de fluorophore.

II.2.3.1.3.3 Détermination par UV-visible de la rhodamine présente sur la magnétite

La rhodamine fluoresçant dans le visible (maximum à 555 nm), des mesures par spectroscopie UV-visible ont été effectuées pour déterminer le nombre de molécules par nm².

Cette quantification a été faite de deux manières différentes.

1) La première méthode a consisté à soustraire l'absorbance d'un oxyde de fer greffé à du mPEG$_{2000}$-Si non fonctionnalisé à la rhodamine à celle de la magnétite pegylée couplée à la rhodamine.
2) Dans une deuxième méthode, les absorbances des eaux de dialyse ont été mesurées pour trouver une quantité de rhodamine qui a ensuite été soustraite à la masse de rhodamine

ajoutée lors de la réaction. Le résultat de cette opération a donné le nombre de rhodamine ayant réagi avec 100 mg de nanoparticules.

Les deux méthodes ont été comparées pour ensuite mesurer les taux de fluorophore sur les magnétites pegylées (PEG_{2000}) fonctionnalisées par 0,5 et 5 µmoles de rhodamine.

Les absorbances étant différentes en fonction de la concentration en fluorophore, il a été nécessaire de réaliser deux courbes d'étalonnage de l'absorbance de la rhodamine en fonction de sa concentration (en µg/mL) (Figure II.2.38). Les pentes des équations des courbes de tendance ne sont pas tout à fait les mêmes pour les deux intervalles de concentration. Pour les très faibles absorbances, l'équation de la droite est meilleure avec une ordonnée à l'origine qui peut donner une idée sur l'erreur d'absorbance mesurée (0,0019). Ainsi, les très faibles concentrations de rhodamine sont difficiles à appréhender car leurs valeurs d'absorbance sont inférieures à la précision de la machine (inférieures à 0,02).

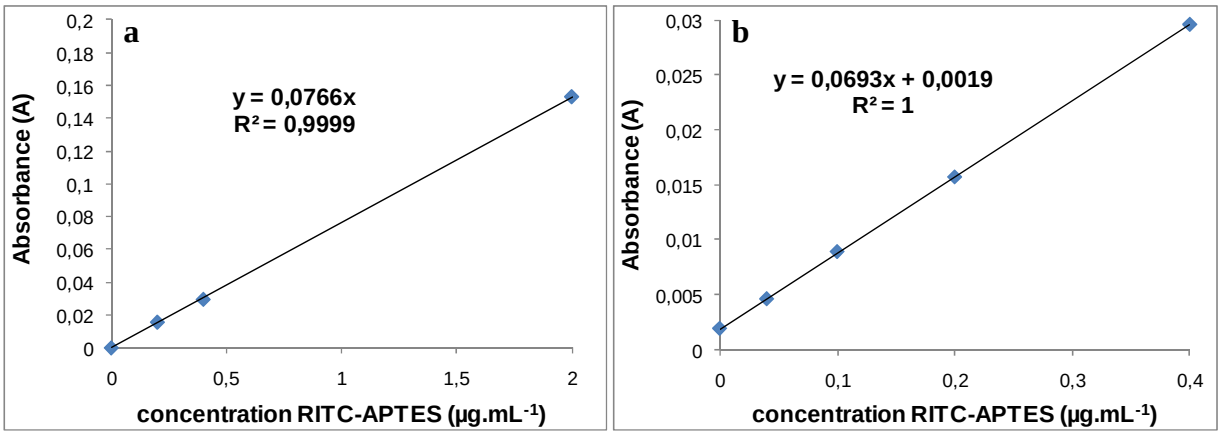


Figure II.2.38 : Courbes de calibration pour différentes concentrations de l'absorbance de la rhodamine (RITC) en fonction de sa concentration en µg.mL^{-1} en (a) pour les fortes concentrations et en (b) pour les faibles concentrations.

Le Tableau II.2.23 résume le taux de rhodamine trouvé pour les deux magnétites fonctionnalisées en caractérisant directement les suspensions en UV-visible à 555 nm. Le détail de ces calculs est donné en annexe A.5.

Conditions RITC	Volume échantillon (µL)	Absorbance	Masse de rhodamine (µg)	Rhodamine par nm²	Moyenne écart type
0,5 µmol	100	0,049	0,193	0,007	**0,008 ± 0,002**
	200	0,149	0,577	0,010	
5 µmol	100	0,0731	2,86	0,11	**0,110 ± 0,001**
	200	0,1422	5,56	0,11	

Tableau II.2.23 : Calcul du nombre de molécules par unité de surface sur les nanoparticules fonctionnalisées par 0,5 et 5 µmoles de rhodamine

La précision pour les faibles concentrations de rhodamine est relativement mauvaise à cause de la précision de l'appareil d'analyse. Quoi qu'il en soit, le nombre de molécules par unité de surface semble avoir augmenté relativement proportionnellement avec la concentration de rhodamine.

La deuxième méthode de détermination du taux de rhodamine a été mise en œuvre en mesurant les absorbances des eaux de dialyse. Après chaque dialyse, 30 mL des 1,8 litres utilisés sont prélevés et gardés à l'abri de la lumière pour ensuite mesurer leur absorbance. On

trouve ainsi une masse de rhodamine et la masse restante est sensée avoir réagi avec les 100 mg de magnétite introduits (Tableau II.2.24). Ce calcul est également détaillé en annexe A.5.

Conditions RITC	Numéro Dialyse	Absorbance	Masse de rhodamine (µg)	Masse totale (µg)	Rhodamine par nm²
0,5 µmoles	1	0,0117	254,55	**296,1**	**0,006 ± 0,002**
	2	0,0035	41,56		
	3	0,0019	0		
5 µmoles	1	0,098	2303	**2643**	**0,084± 0,02**
	2	0,0118	257		
	3	0,0051	83		
	4	0,0019	0		

Tableau II.2.24 : Calcul de la masse de molécule présente dans les eaux de dialyse et déduction du nombre de rhodamine par unité de surface sur les nanoparticules fonctionnalisées par 380 et 3800 µg de rhodamine

L'estimation de la proportion de rhodamine par dosage de cette dernière dans les eaux de lavage est assez imprécise. En effet, il faut connaître le volume exact d'eau de dialyse utilisé à chaque étape. De plus, la rhodamine étant diluée, son absorbance est très faible parfois même en-dessous du seuil de détection de l'appareil d'analyses. Ainsi, pour les absorbances inférieures à 0,0020, il est difficile de conclure quant à la présence ou non de rhodamine dans l'eau. Cependant, le taux de rhodamine par unité de surface est sensiblement identique à celui mesuré sur les suspensions de magnétite fonctionnalisée. On peut également remarquer que trois lavages suffisent à éliminer la majorité de la rhodamine quelle que soit la concentration utilisée dans notre étude.

Pour finir on peut donc estimer la concentration de rhodamine à environ 0,010 molécules par nm² pour $NP_{0,5RITC}$ et 0,10 molécules par nm² pour NP_{5RITC}. Ainsi, si on considère nos nanoparticules composées de cristallites élémentaires de 8 nm relativement sphérique, alors la surface d'un grain serait d'environ 200 nm². Ainsi, il y aurait en moyenne :

1) Dans le cas des $NP_{0,5RITC}$, environ 2 molécules de fluorophore par cristallite.
2) Dans les cas des NP_{5RITC}, environ 20 molécules de fluorophore par cristallite.

II.2.3.1.4 Conclusions sur les nanoparticules couplées à un fluorophore

Le couplage de la rhodamine à la surface de la magnétite en même temps que le greffage de mPEG-Si a été démontré. Les caractéristiques de ces nanohybrides sont identiques à ceux qui sont pegylés mais ils peuvent en plus être détectés par spectroscopie UV-visible grâce au fluorophore. En décuplant la masse de rhodamine à coupler, le taux de greffage est lui aussi multiplié par dix. Il a été possible de quantifier le nombre de molécules couplées par UV-visible, soit par mesures directes d'absorbance sur la suspension, soit en estimant la masse du fluorophore « perdue » dans les eaux de dialyse. Dans ce cas, la précision est moindre mais la mise en place est plus aisée et les valeurs sont relativement identiques. De plus, cette méthode nous a permis de voir que trois lavages par dialyse suffisent à éliminer l'excès de rhodamine.

Ces nanoparticules fonctionnalisées ont été utilisées en microscopie à fluorescence pour détecter leurs interactions avec les cellules vivantes notamment lors d'étude avec l'école d'ingénieurs agroalimentaire AgrosSup Dijon (Cunault 2009) et dans la partie III.1.4.3.

II.2.3.2 La combinaison PEG-DMSA, un outil pour la post-fonctionnalisation

Durant ce chapitre, nous avons pu greffer du mPEG-Si à la surface des nanoparticules et ainsi les stabiliser. La rhodamine a été couplée à la magnétite par des fonctions silanes pour

détecter ces nanoparticules en fluorescence. Par ailleurs, le DMSA peut également être utilisé pour fonctionnaliser les nanoparticules en greffant une molécule sur ses fonctions thiols. L'idée dans cette partie a été de combiner le DMSA pour ses propriétés de fonctionnalisation et le PEG pour son effet stabilisant.

II.2.3.2.1 Avantages attendus : combiner les propriétés des deux molécules

Dans les parties précédentes, nous avons vu que l'acide dimercapto-succinique (DMSA) pouvait stabiliser les nanoparticules mais surtout être utilisable comme outil pour greffer des molécules ou des protéines sur ses fonctions thiols (SH). Cependant, il a été prouvé lors de cette étude, que la majorité des fonctions thiols formaient rapidement, par oxydation, des ponts disulfures (S-S) empêchant l'utilisation de telles fonctions pour le greffage.

Par ailleurs, le polyéthylène glycol couplé à une fonction silane (mPEG-Si) a été utilisé pour stabiliser les nanoparticules par répulsion stérique et pour éviter leur déstabilisation en milieu salin de concentrations élevées.

Nous avons imaginé que si nous greffions du mPEG-Si sur des nanoparticules et qu'après nous ajoutions du DMSA pour qu'il s'adsorbe, le fait qu'une grande partie de la surface soit déjà couverte par des chaînes de polymère limiterait la formation de ponts disulfures entre les molécules de DMSA qui seraient séparées par des chaînes de PEG.

II.2.3.2.2 Conditions d'élaboration des nanoparticules pegylées couplées à du DMSA

La réaction s'est effectuée de la manière suivante (Figure II.2.39).

1) 0,13 mmol de mPEG-Si (550, 2000 et 5000) a été ajouté dans 40 mL d'un mélange eau/éthanol à pH = 4.
2) 2,5 mL de suspension de Fe_3O_4 soit 100 mg de nanoparticules ($11m^2$) ont ensuite été mélangés au mPEG-Si. L'ensemble est ensuite mis sous atmosphère d'azote et agité 48 heures.
3) Après ce temps de réaction, $4{,}39\ 10^{-2}$ mmol de DMSA (soit 8 mg) a été ajoutée et l'agitation a repris pendant deux heures sous atmosphère inerte.

Après ces étapes, le sol est lavé de deux manières différentes :

4) Soit la suspension obtenue a été dialysée dans l'eau avec des membranes de 12 à 14 kDa pendant une semaine en changeant l'eau tous les jours. Les nanoparticules dialysées seront appelées $NP_{dialyse}$.
5) Soit les propriétés de sédimentation du DMSA à pH inférieur à 4 ont été utilisées et la suspension a été lavée trois fois par sédimentation dans l'eau acide (pH = 3-4) puis a été peptisée à pH = 10 avec de la soude pour être stabilisée de nouveau. Les nanoparticules ainsi lavées seront nommées NP_{acide}.
6) Après lavages, la majorité des nanoparticules ont été gardées en suspension pour analyses et études de stabilité. Une partie a été lyophilisée pour d'autres caractérisations.

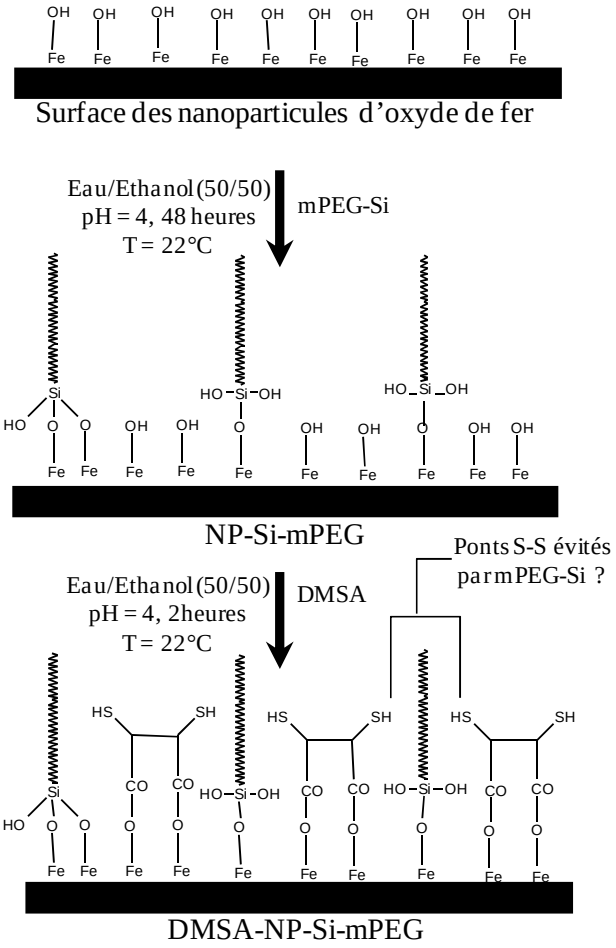


Figure II.2.39 : Schéma réactionnel du couplage des nanoparticules par du mPEG-Si et du DMSA dans un mélange volumique eau/éthanol (50/50).

II.2.3.2.3 Caractérisations de nanoparticules fonctionnalisées

II.2.3.2.3.1 Etat de dispersion des nanohybrides

Les nanoparticules synthétisées sont stabilisées à pH = 7 comme en atteste le cliché MET de la Figure II.2.40.

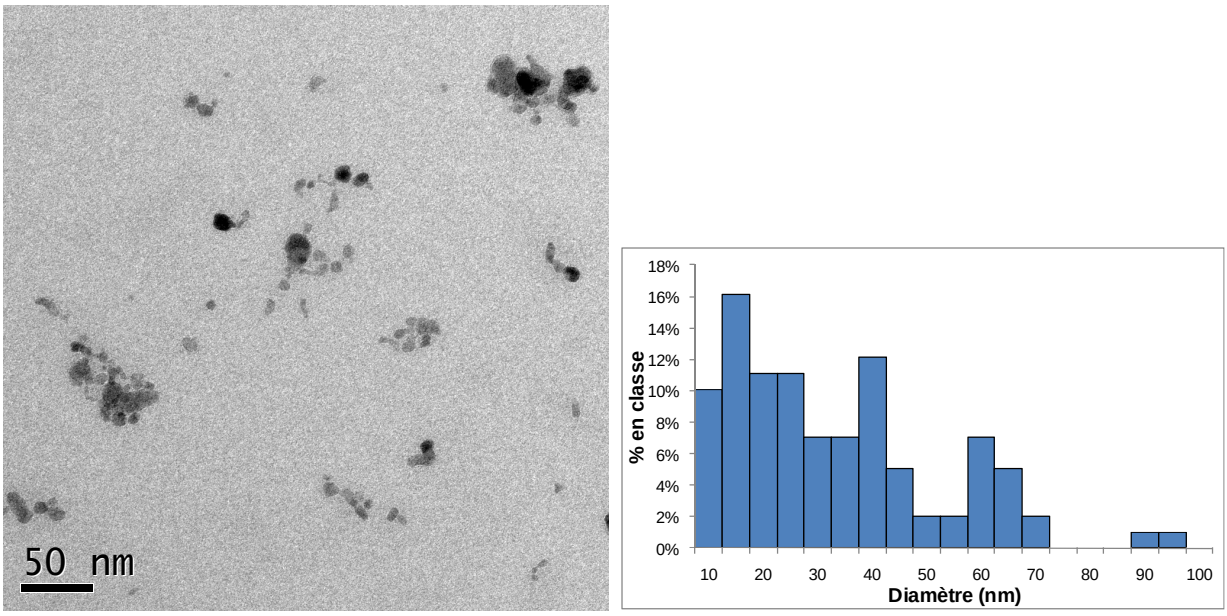


Figure II.2.40 : Cliché MET et comptage MET sur une centaine d'agrégats de nanoparticules greffées par du mPEG$_{2000}$-Si et du DMSA et lavées à pH acide (pH 3-4)

Par mesures en PCS et par comptage MET, les tailles moyennes des nanoparticules sont les suivantes (Tableau II.2.25).

Conditions de synthèse	**Tailles PCS en nombre (nm)**	**Tailles MET (nm) Moyenne arithmétique**
Référence	instable	nd
Référence à pH = 3	23 ± 1	20 ± 11
mPEG$_{2000}$-Si + DMSA	36 ± 4	31 ± 8

Tableau II.2.25 : Tailles obtenues en PCS dans NaCl à 10^{-2}M et tailles obtenues en comptage par microscopie électronique sur une centaine d'agrégats pour les nanoparticules seules et greffées avec du mPEG-Si et du DMSA et lavées à pH acide (pH 3-4). Sauf mention contraire les mesures ont été effectuées à pH = 7 (nd : non déterminé).

Le potentiel Zêta de ces suspensions est rendu négatif entre pH = 3 et pH = 11 par les charges des carboxylates du DMSA (Figure II.2.41).

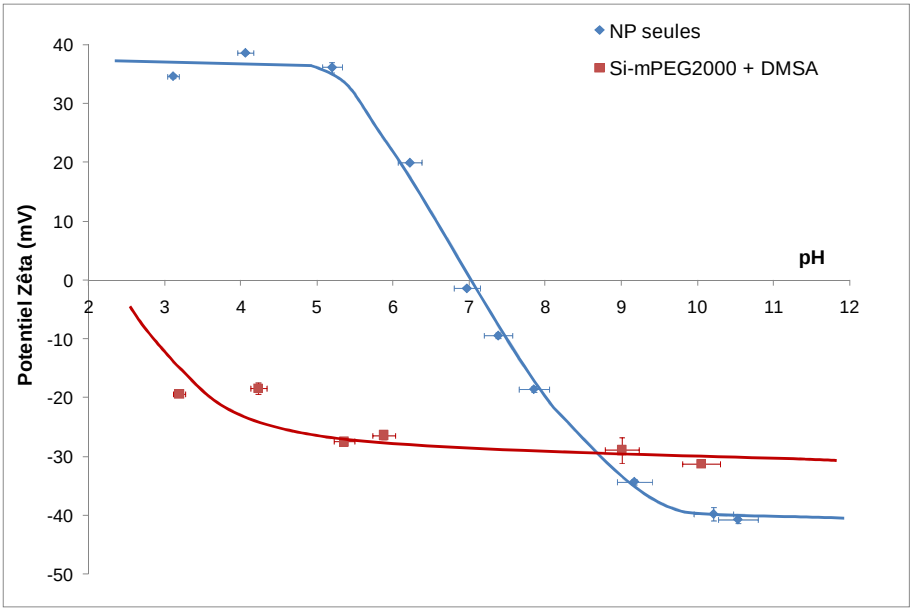


Figure II.2.41 : Potentiels Zêta dans NaCl 10^{-2}M des nanoparticules nues et fonctionnalisées par du $mPEG_{2000}$-Si et du DMSA et lavées à pH acide (pH 3-4)

Le DMSA change donc la charge des particules et le mPEG apporte une stabilisation stérique.

II.2.3.2.3.2 Différence entre les deux types de lavage

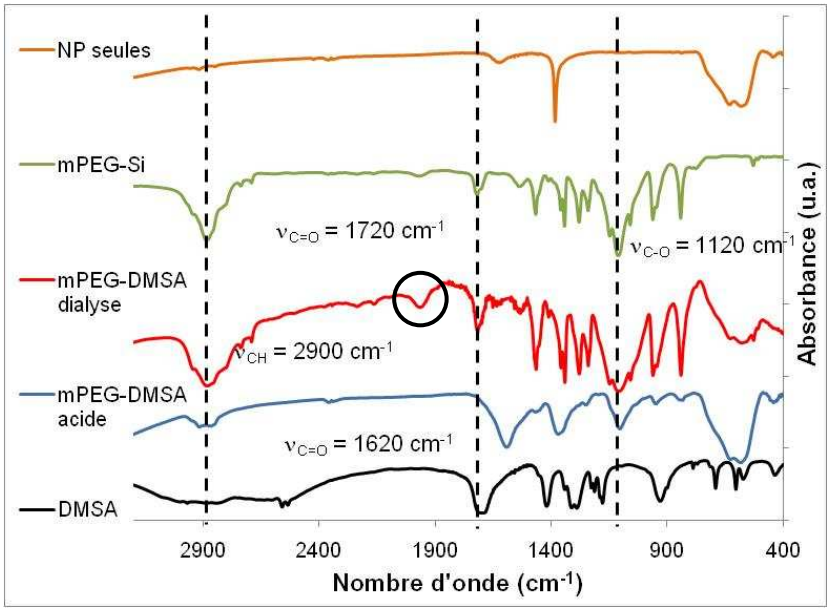


Figure II.2.42 : Spectres infrarouges des nanoparticules modifiées par le $mPEG_{2000}$-Si et le DMSA et lavées par dialyse ou décantation acide (à pH 3-4) et spectres du $mPEG_{2000}$-Si seul, du DMSA seul et des nanoparticules seules. Des pics de vibration caractéristiques du mPEG-Si et du DMSA sont indiqués par des flèches et le cercle indique une valeur de vibration inconnue. Les mesures ont été effectuées dans des pastilles de KBr et ont été zoomées pour une meilleure lisibilité.

Les bandes de vibrations caractéristiques du mPEG-Si, notamment celles de la liaison C-O (1120 cm^{-1}) apparaissent pour les nanoparticules pegylées avec du DMSA (Figure II.2.42). En revanche, pour la magnétite modifiée lavée par décantation acide (pH 3-4), l'intensité du pic semble être inférieure à celui de la magnétite modifiée et lavée par dialyse. Cette observation

est identique dans le cas de la bande de vibration de la fonction méthyle (2900 cm^{-1}) et laisse supposer que moins de mPEG-Si sont présents à la surface des NP_{acide} que des $NP_{dialyse}$.
Cette hypothèse est confirmée par la bande de vibration de la fonction carbonyle (C=O à 1720 cm^{-1}). En effet, dans le cas des NP_{acide}, ce pic est déplacé vers 1620 cm^{-1} indiquant probablement la fonction C=O du DMSA qui s'est complexée avec le fer (liaison Fe-O-C=O comme vu dans la partie II.2.1) alors que dans le cas des $NP_{dialyse}$, le pic de la fonction carbonyle n'est pas déplacé car vraisemblablement majoritairement dû au mPEG-Si, cette fonction ne réagissant pas avec les oxydes de fer.

Avec les deux méthodes de lavage, les analyses en spectroscopie infrarouge des nanohybrides ont montré la bande large de la vibration de la magnétite vers 500-700 cm^{-1} ainsi que les pics caractéristiques du mPEG-Si et du DMSA. Une prédominance des vibrations correspondant au mPEG-Si dans le cas de NPdialyse laisse supposer que la quantité de polymère est plus importante avec cette méthode de lavage.

Pour estimer la quantité de polymère présente par unité de surface, les nanoparticules lavées des deux manières différentes ont été analysées par ATG. Dans la partie sur le DMSA, nous avons vu que pour une quantité de 8 mg de DMSA ajoutée sur 100 mg de nanoparticules, la perte de masse due à cette molécule (après les opérations de lavages et de séchage) était de l'ordre de 1% et nous l'avons donc négligée. Ainsi, nous avons considéré la perte de masse des nanohybrides due exclusivement au mPEG-Si (Tableau II.2.26).

Conditions	Lavage	Perte de masse entre 150 et 500°C (%)	mPEG-Si / nm²
$mPEG_{550}$-Si	dialyse	31	3,07
	acide	7	0,51
$mPEG_{2000}$-Si	dialyse	56	3,10
	acide	13	0,36
$mPEG_{5000}$-Si	dialyse	80	4,17
	acide	23	0,31

Tableau II.2.26 : Comparaison des pertes de masse en ATG des nanoparticules modifiées par le mPEG-Si et le DMSA lavées par dialyse ou par décantation acide (à pH 3-4)

Comme énoncé lors de la partie sur le greffage du mPEG-Si (partie II.2.2.2.4.2), le taux de polymère par nm² paraît trop élevé pour que tous les PEG soient tous greffés à la surface de la magnétite. Par lavage acide, le taux de greffage obtenu paraît plus cohérent avec les données de la littérature ((Butterworth *et al.* 2001)). De plus, le nombre de polymères par nm² augmente quand la longueur de chaînes diminue (Butterworth *et al.* 2001). En conclusion, le DMSA permet donc de décanter les nanoparticules pegylées et ainsi de mieux éliminer le PEG en excès que la dialyse.

En revanche, les nanohybrides lavés par décantation acide nécessitent d'être peptisés et sont difficilement redispersables dans les conditions biologiques (pH = 7,4 et [NaCl] = 0,15M) après lyophilisation. Pour étayer cette hypothèse, des analyses XPS ont été réalisées sur les 6 échantillons de nanoparticules pegylées + DMSA (Tableau II.2.27).

Synthèse	Proportion Fe 2p (%)	Proportion O^{2-} (%)	Proportion OH (%)	Proportion C pollution (%)
Référence	40	49	7	4
$NP_{550acide}$	23	32,5	9,5	7
$NP_{550dialyse}$	8	14,5	4,5	12
$NP_{2000acide}$	19	31	7,5	2,5
$NP_{2000dialyse}$	1,5	3	0	4
$NP_{5000acide}$	14	23	5,5	6
$NP_{5000dialyse}$	1	2	0	11

Synthèse	Proportion C DMSA (%)	Proportion O DMSA (%)	Proportion S DMSA (%)
Référence	0	0	0
$NP_{550acide}$	4	4	2
$NP_{550dialyse}$	3	3	1,5
$NP_{2000acide}$	3	3	1,5
$NP_{2000dialyse}$	0	0	~0
$NP_{5000acide}$	6	6	2
$NP_{5000dialyse}$	0	0	~0

Synthèse	Proportion C PEG (%)	Proportion O PEG (%)	Proportion Si PEG (%)	Proportion N PEG (%)
Référence	0	0	0	0
$NP_{550acide}$	10	5	2,5	0,5
$NP_{550dialyse}$	33	16,5	2,5	1,5
$NP_{2000acide}$	20	10	2,5	0
$NP_{2000dialyse}$	60	29,5	1	1
$NP_{5000acide}$	24	12	1,5	0
$NP_{5000acide}$	57	28,5	0,5	0

Tableau II.2.27 : Proportions, obtenues par XPS, du fer et de l'oxygène de la structure spinelle ; du carbone, de l'oxygène et du soufre du DMSA, du carbone, de l'oxygène, du silicium et de l'azote du mPEG silanisé et du carbone de pollution sur la synthèse de référence et des nanoparticules pegylées avec des mPEG-Si (M = 800, 2250 et 5250 $g.mol^{-1}$) et du DMSA lavées par décantation acide à pH = 3-4 ou par dialyse.

Les désommations des pics de l'oxygène et du carbone permettent d'estimer les proportions d'hydroxyles libres, de mPEG-Si et de DMSA à la surface. Les calculs utilisés sont détaillés dans l'annexe A.4.5. En première observation, on peut voir que le taux de carbone lié au PEG augmente avec la taille du polymère et est plus prononcé pour une masse moléculaire donnée dans le cas du lavage par dialyse que dans le cas d'une décantation acide.

Pour les lavages par dialyses, la proportion de fer est inférieure à celle obtenue lors des lavages par décantation acides laissant supposer une présence plus importante de mPEG-Si sur les nanoparticules. Cette observation est confirmée par la diminution du signal des énergies de liaisons caractéristiques du DMSA et des hydroxyles libres. Dans le cas des $mPEG_{2000}$-Si et $mPEG_{5000}$-Si, les signaux des hydroxyles et du DMSA sont même totalement masqués.

Pour les NP_{acide}, la proportion de DMSA semble nettement inférieure à celle du mPEG-Si (notamment pour les masses moléculaires de 2250 et 5250 $g.mol^{-1}$). L'hypothèse de négliger la perte de masse du DMSA est validée pour les lavages par dialyse mais dans le cas des décantations acides, les énergies de liaisons du DMSA apparaissent dans des proportions assez importantes (entre 16 et 28% du carbone des molécules de surface proviennent du DMSA). La première hypothèse de l'élimination du mPEG-Si semble bien confirmée par ces premières observations, les analyses en spectroscopie XPS montrant, comme lors des observations en ATG, une plus grande présence de polymère sur les $NP_{dialyse}$ que sur les NP_{acide}.

En revanche, alors que les taux de carbone dus au mPEG-Si diminuent quand il y aurait moins de ce polymère en surface, le taux de silicium augmente. Au vu de cette observation, les rapports silicium/carbone du mPEG-Si ont été calculés et comparés aux rapports théoriques (Tableau II.2.28).

Synthèse	Ratio Si/C (%)
$mPEG_{500}$-Si	2,85
$NP_{550acide}$	25
$NP_{550dialyse}$	7,5
$mPEG_{2000}$-Si	1
$NP_{2000acide}$	14
$NP_{2000dialyse}$	1,5
$mPEG_{5000}$-Si	0,4
$NP_{5000acide}$	7
$NP_{5000dialyse}$	0,9

Tableau II.2.28 : Ratio molaire du silicium des mPEG-Si sur les carbones des mPEG-Si mesurés en XPS pour des nanoparticules pegylées avec des mPEG-Si (M = 800, 2250 et 5250 g.mol^{-1}) et du DMSA lavées par décantation acide à pH = 3-4 ou par dialyse. Ces ratios sont comparés aux ratios théoriques de ces 3 polymères.

La proportion de silicium par rapport au carbone est anormalement élevée pour les trois masses moléculaires dans le cas des NP_{acide}. Cette observation remet en cause l'hypothèse d'une meilleure élimination des polymères par décantation acide.

Il serait maintenant plus logique de penser que lors de l'ajout d'acide pour faire floculer les suspensions d'oxyde de fer, la liaison carbamate (O=C-NH) ait pu se rompre dans ce domaine de pH (pH ≈ 3). Ainsi, une grande partie des chaînes de mPEG auraient pu être éliminée ce qui pourrait expliquer la grande proportion de silicium par rapport au carbone. Cette hypothèse pourrait être corroborée par l'agglomération de ces nanoparticules dans les milieux salins comme si elles n'étaient stabilisées majoritairement que par des répulsions électrostatiques (dues au DMSA et aux nouvelles fonctions amines) et peu par effet stérique (du au mPEG).

Le lavage par décantation en milieu acide ne semble pas être une technique optimale car l'élimination de l'excès de polymère semble se faire plus par rupture d'un groupement reliant le mPEG à la fonction silane. La dialyse devra donc être conservée lors de futurs essais. Cependant, bien que la quantité de mPEG-Si soit insuffisante pour stabiliser les suspensions à force ionique élevée (I = 0,15 M), le nombre de polymères par unité de surface des oxydes de fera été suffisant pour limiter la formation des ponts disulfures et permettre des essais de post-fonctionnalisation sur des fonctions thiols du DMSA.

II.2.3.2.4 Les fonctions thiols ont-elles été protégées?

L'hypothèse de cette partie (voir Figure II.2.39) est que l'utilisation d'un polymère sur les nanoparticules avec du DMSA empêcherait la formation de ponts disulfures (vu dans la partie II.2.1.2.4) qui rendent les fonctions thiols inutilisables pour des fonctionnalisations ultérieures. Pour confirmer cette supposition, des mesures en spectroscopie UV-visible avec du réactif Ellman ont été réalisées ainsi que des greffages de rhodamine possédant une fonction maléimide réactive avec les thiols.

II.2.3.2.4.1 Validation par mesure en spectroscopie UV-visible

24 à 48 heures après leurs modifications de surface par du $mPEG_{2000}$-Si et du DMSA, les nanohybrides (NP_{acide}) ont été analysés en spectroscopie UV-visible avec du réactif Ellman pour révéler la présence de thiols (même protocole que lors de la partie sur la détection des

thiols libres par réactif Ellman : II.2.1.2.4). Les valeurs d'absorbance trouvées sont soustraites à la valeur de l'absorbance du réactif Ellman (**0,0855**). A l'aide de la courbe de calibration de la partie II.2.1.2.4 (Figure II.2.20 b), une quantité de DMSA est trouvée. En connaissant la concentration en nanoparticules nues dans la suspension et en supposant la surface des agrégats accessible aux molécules (110 $m^2.g^{-1}$), il a été possible de trouver un nombre de fonction thiols par nm^2 (Tableau II.2.29):

$$SH/_{nm^2} = 2 \cdot \frac{\frac{Abs_{DMSA}}{24{,}077} \cdot V_{mesure} \cdot N}{m_{NP} \cdot S_{BET} \cdot 10^{18}} \qquad \text{Eq. II.2.6}$$

avec Abs_{DMSA} l'absorbance mesurée ; 24,077 la pente de la courbe (Abs_{DMSA} = f([DMSA] : Figure II.2.20 b) ; V_{mesure} le volume total de solution dans la cellule de mesure (3,075 mL dans notre cas : Tableau II.2.29) ; N le nombre d'Avogadro ; m_{NP} la masse de nanoparticules nues présentes dans les 3,075 mL de solution[10] , S_{BET} la surface spécifique des nanoparticules nues ramenée en $nm^2.g^{-1}$ (avec le coefficient 10^{18}) et 2 car un DMSA possède 2 fonctions thiols libres.

Produits	Volume (µL)	Absorbance avec E/R (A_0)	Absorbance E/R seul (A_1)	Différence (A_0-A_1)	SH / nm^2
NP-DMSA	100	0,0751	0,0855	-0,01	0
NP-DMSA	200	0,0667	0,0855	-0,02	0
NP_{acide}	100	0,2006	0,0855	0,1151	0,42
NP_{acide}	200	0,325	0,0855	0,2395	0,48

Tableau II.2.29 : Mesures des thiols libres sur les nanoparticules modifiées soit par du DMSA seul ou soit par du $mPEG_{2000}$-Si couplé au DMSA (NP_{acide}). E/R : réactif Ellman.

Par cette méthode, des fonctions thiols ont été détectées deux jours après modification de surface pouvant ainsi être utilisées pour des essais de fonctionnalisation.

II.2.3.2.4.2 Validation de la protection des thiols par greffage d'une molécule réactive : la rhodamine-maléimide

La rhodamine (appelée TMRM) couplée à une fonction maléimide pouvant réagir avec des fonctions thiols (de la même manière que présenté dans la partie II.2.1.2.1.2 sur l'utilité des SH pour la fonctionnalisation) a été utilisée pour prouver que les fonctions thiols détectées par réactif Ellman étaient toujours réactives pour des fonctionnalisations ultérieures de nos nanohybrides.

Deux réactions ont eu lieu pour comparer le greffage de la rhodamine maléimide des nanoparticules avec seulement du DMSA ou avec du $mPEG_{2000}$-Si et du DMSA

1) 24 heures après synthèse (sans lyophilisation) 14,5 mg (1,6 m²) d'une suspension de nanoparticules modifiées seulement avec du DMSA a été mélangée à 2,6 µmoles de TMRM (M = 481,5 $g.mol^{-1}$) pendant 24 heures à pH = 7 et 22°C. L'excès de fluorophore a été éliminé par des cycles de décantation à pH 3-4 jusqu'à ce que la solution ne soit plus colorée en rose. Les nanoparticules seront nommées NP_{DMSA}-TMRM.
2) 6 semaines après synthèse, 14,5 mg (1,6 m²) des nanoparticules pegylées et modifiées avec du DMSA (NP_{acide} lyophilisées 24 heures après leur élaboration) ont été redispersées dans de l'eau. 2,6 µmoles de TMRM ont été ajoutés à la suspension

[10] Cette valeur est différente entre 100 µL et 200 µL de solution mère, respectivement du simple au double.

pendant 24 heures à pH = 7 et à 22°C. L'excès de fluorophore a été éliminé par des cycles de décantation à pH 3-4 jusqu'à ce que la rhodamine ne soit plus détectée dans les eaux de lavage (3 cycles ont été effectués). Les nanoparticules seront nommées NP_{acide}-TMRM.

Les deux types de nanohybrides ont ensuite été caractérisés par spectroscopie UV-visible (λ_{TMRM} = 550 nm).

La droite de calibration de l'absorbance de la rhodamine maléimide en fonction de sa concentration en mM est donnée en Figure II.2.43.

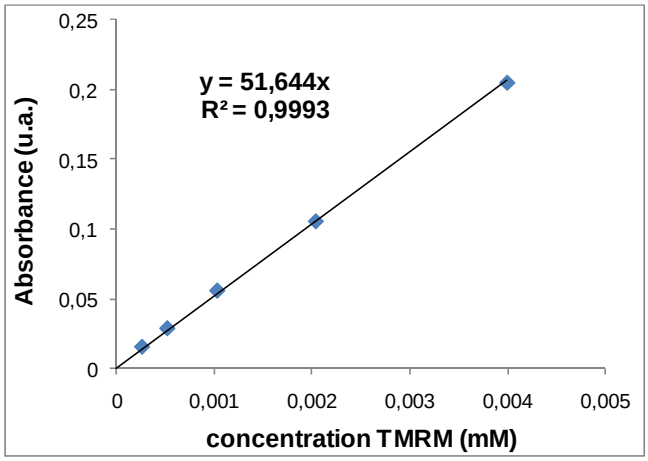


Figure II.2.43 : Courbe de calibration pour différentes concentrations de l'absorbance de la rhodamine maléimide en fonction de sa concentration en mM.

En suivant le même protocole qu'en annexe A.5 mais avec la nouvelle courbe de calibration (Figure II.2.43) le Tableau II.2.30 donne les résultats obtenus à l'aide de cette méthode.

Nanohybrides	Volume échantillon (µL)	Absorbance (u.a.)	Rhodamine par nm²	Moyenne écart type
NP_{DMSA}-TMRM	100	-0,009	0	**0**
	200	-0,008	0	
NP_{acide}-TMRM	50	0,0304	0,48	**0,43 ± 0,01**
	100	0,0525	0,42	
	150	0,0802	0,42	
	200	0,1043	0,41	

Tableau II.2.30 : Calcul du nombre de molécules par unité de surface sur les nanoparticules fonctionnalisées par de la rhodamine

Aucune rhodamine n'a pu se coupler aux oxydes de fer uniquement modifiées avec du DMSA (48 heures après ajout de DMSA) quand 0,43 TMRM par nm² a été greffé à la surface des NP_{acide} (6 semaines après synthèse).

Par ce calcul, les taux de rhodamine maléimide trouvés sont du même ordre de grandeur que celui des thiols mesurés avec le réactif Ellman en spectroscopie UV-visible (0,43 rhodamine pour 0,45 SH potentiellement libres). Les fonctions SH sont donc bien accessibles sur des nanoparticules greffées par du $mPEG_{2000}$-Si et modifiées par du DMSA 6 semaines après synthèse et stockage sous forme de poudre. Le polymère semble bien protéger les DMSA de la formation de ponts disulfures. Sur la Figure II.2.44, l'organisation des différentes molécules à la surface des NP_{acide} est proposée.

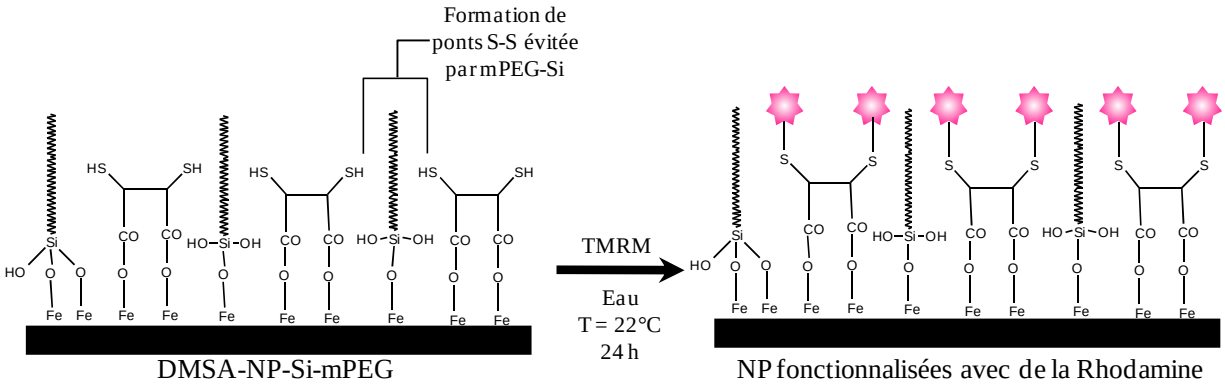


Figure II.2.44 : Schéma réactionnel du couplage de la rhodamine maléimide (TMRM) sur les fonctions thiols libres protégées par l'ajout de $mPEG_{2000}$-Si sur les nanoparticules.

II.2.3.2.5 Conclusion sur les nanoparticules PEG-DMSA

Les nanoparticules modifiées conjointement avec du mPEG-Si et du DMSA ont permis d'obtenir des nanohybrides chargés négativement en conditions physiologique également stabilisés stériquement par le polymère à sa surface. Nous pensions que l'utilisation du DMSA pouvait servir à une meilleure élimination de l'excès de PEG grâce à la floculation des nanoparticules à pH inférieur à 3-4, hypothèse qui semblait corrélée par les analyses thermogravimétriques. Cependant, avec les analyses XPS, il semblerait que le mPEG se soit « détaché » en conditions acides par l'hydrolyse de la fonction carbamate (O=C-NH) dans ce domaine de pH. Pour de futurs essais, il serait judicieux de proscrire la décantation en conditions acides et de privilégier les dialyses, qui bien que plus longues à mettre en place, ont permis d'obtenir des nanoparticules stables à pH physiologique alors que les NP_{acide}, notamment celles avec du $mPEG_{2000}$-Si, s'agglomèrent légèrement dans ces conditions. Durant les essais biologiques avec les $NP_{2000acide}$, cet effet d'agglomération a été confirmé (parties III.1.3. et III.1.4).

Cependant, avec ces deux molécules à la surface, il a tout de même été possible d'obtenir des nanohybrides post-fonctionnalisables grâce à des fonctions thiols stabilisées dans le temps, vraisemblablement protégées par les chaînes du $mPEG_{2000}$-Si. Cet outil pourrait permettre de greffer n'importe quelle molécule thio-réactive comme des maléimides ou des protéines couplées à de cystéines[11] appariées et ouvrir la voie à des détections ou des ciblages spécifiques dans des cas d'injection *in vivo*. Cette partie de ce travail a fait l'objet d'une publication (Maurizi *et al.* 2009) et des essais plus approfondis sont prévus pour développer ces premiers résultats.

II.2.4 Conclusion sur les modifications de surface

Lors de la première partie de ce chapitre, des nanoparticules d'oxydes de fer ont été synthétisées par une méthode dérivée du protocole Massart. Ces sols obtenus ont été peptisés à pH acide (pH = 3) mais étaient instable à pH = 7 proche de leur point isoélectrique. Des études sur la modification de leur surface ont donc été entreprises et sont divisées en quatre étapes :

1) La stabilisation électrostatique par adsorption d'acides carboxyliques à la surface (acide citrique et DMSA).
2) La stabilisation stérique par couplage d'un polymère hydrophile à la surface (mPEG-Si).

[11] La cystéine est un acide aminé qui possède une fonction thiol pouvant donc réagir avec les SH libres du DMSA.

3) La fonctionnalisation des nanoparticules par des molécules fluorescentes (rhodamine).
4) La combinaison des propriétés du DMSA et du mPEG-Si.

L'ensemble des résultats est résumé dans le Tableau II.2.31.

Dans un premier temps, l'acide citrique a été utilisé directement en co-précipitation pour stabiliser et influencer la morphologie de la magnétite. Vraisemblablement à cause des lavages acides post-synthèse, l'effet antioxydant escompté n'a pas été aussi marqué que prévu. Cependant, des conclusions ont tout de même pu être avancées. En augmentant le ratio de citrates en solution (5, 20 et 100%), la taille des particules a diminué. Avec 100% de citrates, un paramètre de maille plus proche de celui de la magnétite que lors des autres synthèses a été observé montrant que les citrates ont empêché l'oxydation d'une partie des ions ferreux en ions ferriques. Dans tous les cas, l'ajout de citrates a chargé négativement les nanoparticules à pH = 7 (quand elles étaient neutres à ce pH avant), avec un déplacement du point isoélectrique vers les pH acides quand le ratio augmente. Il n'a cependant pas été possible de voir une augmentation du nombre de citrates en surface de la magnétite en fonction du ratio utilisé.

Pour stabiliser de manière électrostatique, l'acide dimercapto-succinique (DMSA) a également été utilisé mais post-synthèse. Là aussi, les nanoparticules ont été stabilisées à pH = 7 par répulsion électrostatique. De plus, les pKa du DMSA ont permis la floculation de la magnétite vers pH 3-4 et ainsi un meilleur lavage de l'excès de molécules. Le DMSA possède des fonctions thiols mais il a été prouvé que seule leur utilisation immédiatement après synthèse peut être envisagée pour les coupler à une molécule. En effet, les thiols ont tendance à former des ponts disulfures par oxydation à la surface de la magnétite.

La deuxième approche étudiée fut la stabilisation des nanoparticules par un agent hydrophile le polyéthylène glycol (PEG). Des mPEG de longueurs de chaînes différentes (550, 2000, 5000) ont été couplés à des fonctions silanes pour être ensuite greffés de manière covalente à la surface des nanoparticules. Le taux de PEG par unité de surface est cependant un peu élevé par rapport aux études existantes (≈ 4 - 6/nm²). Grâce à ce mécanisme, les nanoparticules ont cependant été stabilisées par effet stérique et l'effet de la longueur du polymère a été observé sur la taille hydrodynamique et la charge des nanoparticules. Par de nombreuses techniques d'analyses, l'existence de la liaison entre le silicium et le fer n'a pas été réellement prouvée mais par ces nombreux essais, il apparaît cohérent de penser que le PEG se soit réellement greffé à la surface des nanoparticules.

Des molécules fluorescentes associées à des fonctions silanes ont ensuite été couplées à des nanoparticules d'oxyde de fer. Des taux de deux à vingt molécules par nm² ont été obtenus pour des essais biologiques ultérieurs.

Enfin, des nanoparticules ont été greffées par du mPEG-Si puis du DMSA a été adsorbé en surface. L'effet floculant du DMSA en dessous de pH = 4 escompté pour réduire le nombre de polymère par unité de surface a en fait conduit à la rupture des chaînes du mPEG qui se sont en fait détachées du groupement éthoxysilane à ce pH sans doute par destruction de la fonction carbamate. Les polymères ont semblé protéger de l'oxydation les fonctions thiols du DMSA à la surface de la magnétite plusieurs jours post-synthèse. Cette observation a été confirmée par analyses en spectroscopie UV-visible grâce au réactif Ellman et par greffages de fluorophores thio-réactifs : la rhodamine-maléimide. Ces nanohybrides ouvrent la voie à l'élaboration d'agents spécifiques pour des détections ou des ciblages spécifiques de pathologies.

Modifications de surface	Conditions	Tailles PCS agrégats (nm)	Domaines de stabilité	PIE	Molécules par nm²	Influences sur la morphologie	Remarques
Magnétite référence	Peptisation à pH = 3	50 ± 3*	pH 3-5 pH 9-11	pH ≈ 7	7 OH	ϕ_{DRX} = 9,8 ± 0,2 nm a = 8,363 ± 0,003 Å S_{BET} = 90 ± 1 m².g^{-1}	
Citrates	5% molaire/fer avant synthèse	55 ± 5	pH 5-11	pH ≈ 5	0,99 citrate	ϕ_{DRX} = 7,6 ± 0,2 nm a = 8,364 ± 0,001 Å S_{BET} = 132 m².g^{-1}	Citrates mélangés à la soude (pH = 12) avant réaction de co-précipitation
	20% molaire/fer avant synthèse	55 ± 5	pH 4-11	pH ≈ 4	1,06 citrate	ϕ_{DRX} = 7,6 ± 0,2 nm a = 8,363 ± 0,003 Å S_{BET} = 123 m².g^{-1}	
	100% molaire/fer avant synthèse	33± 4	pH 3-11	pH < 3	0,92 citrate	ϕ_{DRX} = 5,5 ± 0,1 nm a = 8,373 ± 0,003 Å S_{BET} = 156 m².g^{-1}	
Magnétite de référence	Peptisation à pH = 3 + Cycles de centrifugation	23 ± 1*	pH 3-5 pH 9-11	pH ≈ 7	7 OH	ϕ_{DRX} = 7,7 ± 0,1 nm a = 8,363± 0,003 Å S_{BET} = 110 ± 1 m².g^{-1}	100 mg de Fe_3O_4 sont utilisés par essai de modification de surface
DMSA	0,0439 mmol 0,132 mmol	51 ± 4 51 ± 4	pH 4-11	pH < 3	0,3 DMSA 2,6 DMSA	Pas d'effet sur la morphologie	Décantation pH = 3 Pas de SH libres
mPEG-Si	0,13 mmol $mPEG_{550}$ 0,13 mmol $mPEG_{2000}$ 0,13 mmol $mPEG_{5000}$	30 ± 4 38 ± 5 45 ± 4	pH 3-11	pH ≈ 7	4,5 PEG 3,7 PEG 5,9 PEG	Pas d'effet sur la morphologie	Non stable Stable Stable (+ DBTL)
mPEG-Si + Rhodamine	0,13 mmol PEG_{2000} 0,5 µmol RITC 0,13 mmol PEG_{2000} 5 µmol RITC	40 ± 5 41 ± 4	pH 3-11	pH ≈ 7	3,4 PEG 0,01 RITC 3,4 PEG 0,1 RITC	Pas d'effet sur la morphologie	Rhodamine détectable par UV-Visible
$mPEG_{2000}$-Si + DMSA (NP_{acide})	0,13 mmol PEG_{2000} 4,39 10^{-2} mol DMSA	36 ± 4	pH 4-11	pH < 3	0,36 PEG nd SH	Pas d'effet sur la morphologie	Stable NaCl 10^{-2}M pH = 7 Instable dans milieu de culture cellulaire
$mPEG_{2000}$-Si + DMSA ($NP_{dialyse}$)	0,13 mmol PEG_{2000} 4,39 10^{-2} mol DMSA	nd	pH 4-11	pH < 3	3,1 PEG 0,5 SH	Pas d'effet sur la morphologie	Stable NaCl 10^{-2}M pH = 7 Non testées dans milieu de culture cellulaire

Tableau II.2.31 : Récapitulatif des résultats obtenus lors des modifications de surface réalisées sur la magnétite.

** : mesure effectuée à pH = 3. nd : non déterminé. PIE : point isoélectrique*

II.3 Une nouvelle approche de synthèse et de modification de surface : un procédé de synthèse hydrothermale en continu

Après avoir synthétisé et modifié des nanoparticules de magnétite par des méthodes classiques, cette partie traitera du développement d'une nouvelle approche : la synthèse et la modification de surface en une seule étape et en continu.
L'élaboration de nanomatériaux, notamment les oxydes de fer, a été largement étudiée dans des conditions batch et à températures et pressions proches des conditions ambiantes (T < 100°C et P < 5 bar). Au vu de la demande croissante en nanomatériaux, leurs synthèses en voie continue vont devenir un enjeu dans les années à venir. Dans cette optique, l'équipe MaNaPI développe depuis 2001 un procédé de synthèse hydrothermale en voie continue pouvant s'étendre au domaine de l'eau supercritique. De nombreux nanomatériaux ont d'ores et déjà été synthétisés avec ce dispositif ($BaZrO_3$ (Xin 2005), TiO_2 (Pighini 2006), $LiFePO_4$ (Aimable 2007),…).

Dans cette partie, des nanoparticules d'oxyde fer modifiées en surface ont été élaborées en continu et en une étape à l'aide de ce procédé. Dans un premier temps, l'influence de citrates sur des particules de magnétite a été étudiée puis le rôle des propriétés de l'eau supercritique sur la taille et la morphologie des cristallites a été appréhendé.

II.3.1 Pourquoi synthétiser en continu et en milieu eau supercritique ?

II.3.1.1 Le domaine supercritique de l'eau

En général, l'état d'un corps pur est défini par une équation d'état où la pression, la température et le volume molaire sont liés. En représentation en deux dimensions dans l'axe du volume molaire, un corps pur existe sous trois états de la matière suivant sa température et sa pression (Figure II.3.1) : gaz, liquide ou solide. Cependant, au-delà de certaines températures et pressions, les corps purs peuvent exister dans un domaine dit supercritique.

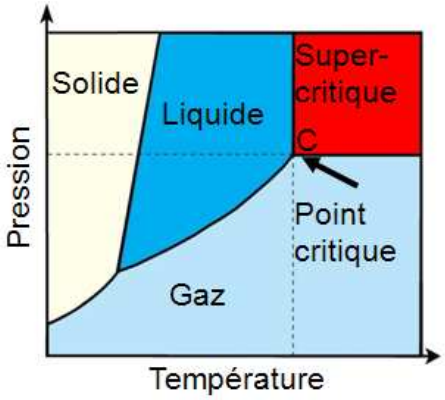


Figure II.3.1 : Diagramme de phase d'un corps pur avec C le point critique

Au-delà du point C (appelé point critique), il n'y a plus de transition entre l'état gazeux et l'état solide : c'est un nouvel état supercritique. Les points critiques de quelques fluides sont regroupés dans le tableau suivant (Tableau II.3.1) :

Composé	**Tc (°C)**	**Pc (MPa)**
Dioxyde de Carbone (CO_2)	31,2	7,4
Ammoniac (NH_3)	132,4	11,4
Eau (H_2O)	374,1	22,1

Tableau II.3.1 : Données des points critiques de quelques fluides

L'eau en état supercritique possède des propriétés physico-chimiques intermédiaires entre celles de la phase liquide et de la phase gazeuse (Figure II.3.2).

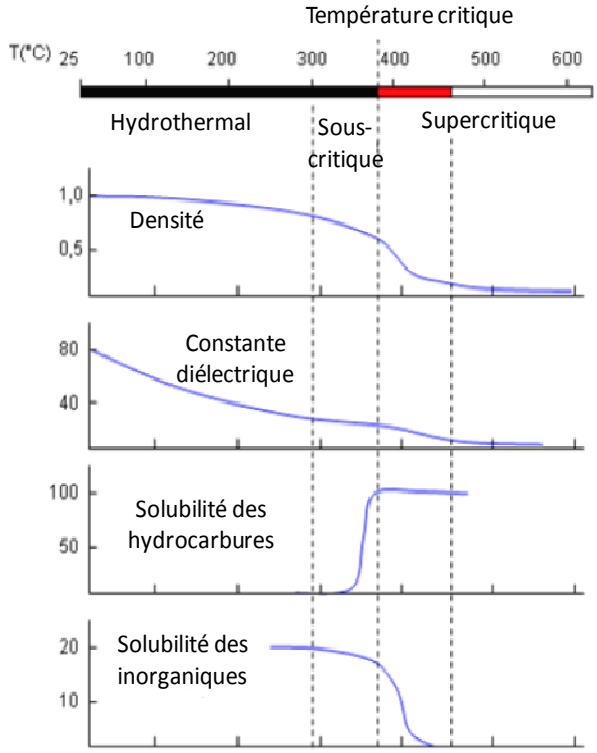


Figure II.3.2 : Evolution des caractéristiques de l'eau en fonction de la température en dessous et au-delà de la température critique

II.3.1.2 Avantages attendus d'une synthèse en continu et en milieu eau supercritique

Quand l'eau passe de conditions sous-critiques aux conditions supercritiques, une de ses propriétés les plus intéressantes est modifiée : sa constante diélectrique. Alors que l'eau dans les conditions « normales » est un solvant polaire, dans le domaine supercritique sa constante diélectrique chute entraînant un changement de solubilité des espèces. Les composés organiques sont alors solubles dans l'eau supercritique quand les composés inorganiques deviennent insolubles. Les sels métalliques forment ainsi des oxydes d'après le mécanisme d'hydrolyse condensation suivant :

$$MX_x + x \cdot H_2O \rightarrow M(OH)_x + x \cdot HX \qquad \text{Eq. II.3.1}$$

$$M(OH)_x \rightarrow MO_{\frac{x}{2}} + \frac{1}{2} x \cdot H_2O \qquad \text{Eq. II.3.2}$$

Avec X le contre-ion de l'ion métallique M.

L'avantage de la synthèse en milieu supercritique serait donc l'élaboration d'oxydes métalliques sans l'utilisation de base (Cansell *et al.* 1999).

La synthèse en continu, quant-à-elle, apporte une production aisée en grande quantité. Par ailleurs, dans les procédés en continu, le temps de réaction est de l'ordre de quelques secondes à une ou deux minutes selon la configuration (Cabanas *et al.* 2001; Lee *et al.* 2005; Sue *et al.* 2006). Ce faible temps de passage dans le réacteur permet de réduire la dispersité en taille des cristallites synthétisées. (Pighini 2006; Xu *et al.* 2006)

II.3.2 Le dispositif de synthèse hydrothermale en continu

II.3.2.1 Quelques synthèses d'oxyde de fer en continu et/ou en domaine supercritique : approche bibliographique

La littérature n'est pas très conséquente concernant les synthèses hydrothermales en continue de magnétite comparée aux synthèses batch. Cependant, plusieurs tendances semblent se dégager pour l'élaboration de ces nanoparticules.
Que l'on soit en domaine sous ou supercritique, les précurseurs utilisés sont souvent à base d'ions ferriques, que ce soient des nitrates ($Fe(NO_3)_3$) (Xu *et al.* 2008; Liang *et al.* 2009) ou des sulfates ($Fe_2(SO_4)_3$) (Lam *et al.* 2008).
La plupart des synthèses en milieu supercritique n'utilisent pas de base pour l'hydrolyse et la condensation des ions ferriques. Cependant, la phase majoritairement obtenue dans ces conditions est la phase rhomboédrique hématite (α-Fe_2O_3) (Sorescu *et al.* 2004; Lee *et al.* 2005; Sue *et al.* 2006; Xu *et al.* 2006; Zhao *et al.* 2007). Pour obtenir la structure spinelle, l'ajout de base (Millot *et al.* 2005) et/ou d'agents réducteurs est nécessaire comme des citrates d'ammonium (Adschiri *et al.* 2000). Il est également possible de travailler avec des ions ferreux comme les acétates de fer (II) (Cabanas *et al.* 2001) ou des ferrocènes (dicyclopentadiényle de fer) décomposés par du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Park *et al.* 2009).

Pour les synthèses continues en domaine sous-critique, des nanoparticules d'oxydes de fer stabilisées ont déjà été élaborées en une étape. Les agents réducteurs utilisés s'adsorbent à la surface des oxydes modifiant par la même occasion leurs surfaces. Quelques publications relatent ce type de synthèse avec, par exemple, de l'alcool polyvinylique (PVA) (Xu *et al.* 2008) ou des acides n-décanoïque et n-décylamine utilisés comme réducteurs (Takami *et al.* 2007).

II.3.2.2 Description du dispositif de cette étude

Le procédé hydrothermal développé au sein de l'équipe MaNaPI au début des années 2000 (Xin 2005) a été modifié lors des travaux de thèse d'Anne Aimable (Aimable 2007; Aimable *et al.* 2009)] avant d'être optimisé de 2008 à aujourd'hui par modélisation numérique pour améliorer le contrôle de la température et du flux de particules. La mise au point de ce dispositif étant en cours de protection par le dépôt d'un brevet, seul le fonctionnement général du dispositif sera décrit (Figure II.3.3).

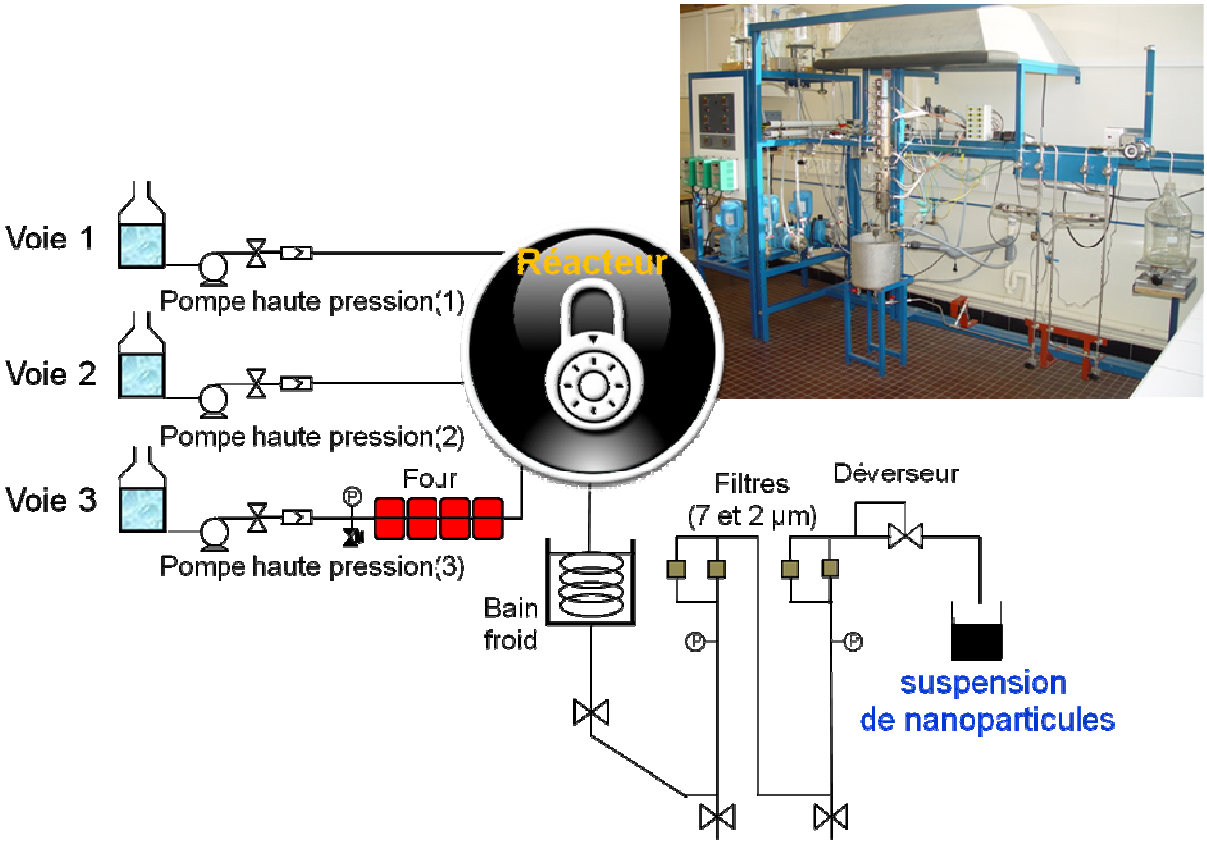


Figure II.3.3 : Schéma et photographie du dispositif de synthèse hydrothermale en continu (version 2009-2010). La pression est régulée par le déverseur en sortie de procédé et les températures du préchauffage et du réacteur sont contrôlées par dix thermocouples.

Des pompes hautes pressions pouvant aller jusqu'à 415 bar sont utilisées avec des débits de solutions variant de 5 à 30 $mL.min^{-1}$. Les travaux précédents sur ce dispositif ont permis de synthétiser entre 10 et 15 $g.h^{-1}$ de nanomatériaux.

Les parties chaudes de ce procédé devant pouvoir résister à la corrosion à haute température, le matériau choisi a été l'Inconel® 625 résistant jusqu'à plus de 800°C. L'Inconel® est cependant oxydable et les sels métalliques chlorés sont à proscrire. Les parties froides sont, quant à elles, en acier inoxydable.

Ce procédé peut fonctionner dans un domaine de pressions de 1 à 400 bar et de la température ambiante à 500°C.

Une synthèse type se déroule selon les étapes suivantes :

1) Mélangeage

Les précurseurs métalliques en solution aqueuse avec ou sans molécules organiques sont stockés et envoyés en voie 1 à température ambiante jusqu'au réacteur. Dans la voie 2, suivant les conditions de synthèse, de l'eau ou de la soude est également envoyée au niveau du réacteur. Enfin, de l'eau est préchauffée dans la voie 3 jusqu'au réacteur où les trois voies se mélangent à la température de réaction désirée. Toutes les voies sont mises à la pression voulue grâce au déverseur.

2) Co-précipitation

Les trois lignes se mélangent à la température fixée par le préchauffage de la voie 3. La réaction de co-précipitation a lieu dans le réacteur pendant moins d'une dizaine de secondes

suivant les débits fixés et toujours à la température désirée. Les suspensions ainsi formées vont ensuite être trempées dans un bain d'eau froide.

3) Filtration

Pour éviter d'endommager le déverseur, les gros agglomérats sont éliminés par une série de filtres (un de 7µm et un de 2µm).

4) Sortie

En sortie du dispositif, les nanoparticules sont récupérées à température ambiante et à un pH dépendant de l'utilisation ou non de soude. Les sols sont souvent récupérés dans une solution d'acide nitrique à 10^{-3}M pour neutraliser l'excès de base et empêcher la croissance des cristallites puis dialysés pour éliminer les ions spectateurs.

II.3.2.3 Objectifs attendus pour des synthèses avec le procédé hydrothermal en continu et en milieu supercritique

Dans la partie précédente, des nanoparticules de magnétite ont été synthétisées et stabilisées en conditions physiologiques par greffage d'un polymère. Par ailleurs, l'acide citrique a montré une influence sur la stabilité électrostatique des particules de magnétite et sur la taille des cristallites. Ces résultats étant intéressants, il est apparu nécessaire de voir l'influence d'un procédé hydrothermal s'étendant au domaine supercritique sur ces synthèses et ces modifications de surface de la magnétite pour essayer, entre autres, de tendre vers des productions de nanoparticules en grande quantité. Ainsi, les objectifs de cette partie ont été multiples :

- Synthétiser de la magnétite en conditions hydrothermales et en continu,
- Synthétiser en continu et en une étape des particules de magnétite stabilisées par de l'acide citrique ou du PEG et étudier l'influence de ces molécules sur la morphologie des cristallites,
- Synthétiser de la magnétite sans base, en continu et en conditions supercritiques,
- Synthétiser en continu des nanoparticules de magnétite stabilisées par de l'acide citrique ou du PEG en milieu supercritique.

Dans un premier temps, les résultats des synthèses hydrothermales en continu en milieu hydrothermal classique (température et pression modérées) seront présentés suivis de ceux obtenus en milieu supercritique[12]. De nombreux paramètres pouvant être modifiés dans ce dispositif (débit, pression, température), l'optimisation des synthèses par ce procédé pourrait faire l'objet d'un travail de recherche à lui tout seul. Ainsi, nous n'avons modifié que la température du point de mélange. Dans les conditions supercritiques, les débits ont dû être divisés par deux pour atteindre le point critique au point de mélange (Tableau II.3.2).

	Température réacteur (°C)	**Pression (MPa)**	**Débit (mL.min^{-1})**
Hydrothermale	150	25	60
Supercritique	400	25	30

Tableau II.3.2 : Conditions récapitulatives des synthèses hydrothermales et supercritiques en continu.

[12] Ce synthèses seront appelées hydrothermales par la suite de ce manuscrit.

II.3.3 Synthèse de magnétite en milieu hydrothermal continu

Dans cette partie, la pression dans le dispositif est fixée à 25 MPa et les débits des trois pompes sont réglés à 20 mL.min^{-1} soit un débit total de 60 mL.min^{-1}. A ce débit, le temps de réaction, c'est-à-dire le temps de passage dans le réacteur avant trempe, est d'environ quatre secondes. La pression choisie est volontairement élevée pour n'avoir qu'à changer la température entre les synthèses hydrothermales et supercritiques.

II.3.3.1 Synthèse de nanoparticules de magnétite nues

II.3.3.1.1 Conditions de synthèse

Un ratio molaire d'un ion ferreux pour deux ions ferriques dans un excès de soude est utilisé pour les synthèses hydrothermales.

Pour éviter l'utilisation des ions chlorures corrosifs pour l'Inconel®, notre choix s'est porté sur des sulfates de fer (II) (sel de Mohr : $FeSO_4(NH_4)_2SO_4$, 6 H_2O) et du sulfate de fer (III) ($Fe_2(SO_4)_3$, 7 H_2O). Les concentrations utilisées furent respectivement de 8.10^{-3} M d'ions ferreux, 16.10^{-3} M d'ions ferriques et 0,33 M de soude. Les conditions de réaction furent fixées à 150°C et 25 MPa.

La réaction s'est déroulée sur vingt minutes, le volume à traiter était de plus d'un litre et la masse de nanopoudre synthétisée attendue était de près de 2 grammes soit 6 grammes de nanoparticules par heure.

La suspension ainsi obtenue a été déversée dans une solution d'acide nitrique à pH = 3 pour neutraliser la soude en excès. Les filtres du dispositif ont piégé une grosse quantité de nanopoudre laissant penser que la suspension était fortement agglomérée, probablement lors de l'étape de trempe du procédé.

Le sol a ensuite été dialysé (seuil de coupure 3,5 kDa) pendant 48 heures, avec changement d'eau de dialyse toutes les douze heures, jusqu'au pH et à la conductivité de l'eau distillée. Une partie fut lyophilisée pour analyse.

II.3.3.1.2 Morphologie et taille des nanoparticules synthétisées

Les nanoparticules ont été analysées par diffraction des rayons X (Figure II.3.4) et microscopie électronique en transmission (Figure II.3.5).

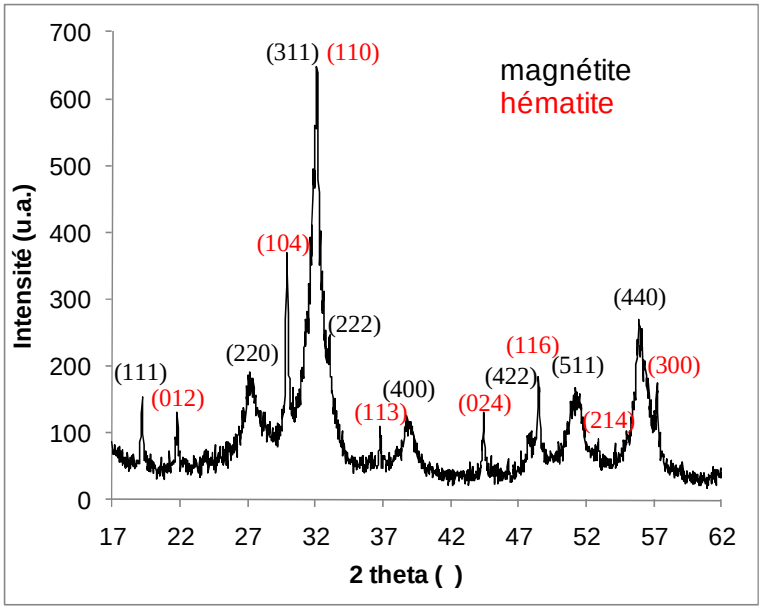


Figure II.3.4 : Diffractogramme des nanoparticules synthétisées par voie hydrothermale à 150°C, 25 MPa et 60 mL.min^{-1} (λ = 1,3922 Å).

Par diffraction des rayons X, la poudre synthétisée est bien cristallisée. La phase spinelle est majoritaire mais la phase rhomboédrique hématite est également présente à environ 12%. Cette quantification est possible grâce au rapport des intensités du pic (104) de l'hématite sur le pic (220) de la magnétite (Annexe A.6 (Belin 2002; Belin *et al.* 2007)). La phase spinelle a un paramètre de maille de a = (8,371 ± 0,005) Å compris entre celui de la magnétite et de la maghémite. Par la méthode de Poix, la déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène est de δ = 0,05 formule de la structure obtenue peut ainsi s'écrire $Fe_{3(1-0,05)}O4$, structure moins oxydée que les particules de magnétite obtenues par la synthèse de type Massart (partie II.1.2.2 : $Fe_{3(1-0,077)}O_4$) : η = 18,7 % avec ce dispositif contre 15,3% en batch.

En diffraction des rayons X, le diamètre des cristallites de magnétite est de (5,4 ± 0,3) nm et celui des particules d'hématite est de (65 ± 1) nm.

En MET, la phase hématite est peu visible et ne ressort pas lors de comptage granulométrique (Figure II.3.5). La taille moyenne des cristallites, par cette méthode, est de (9 ± 2) nm.

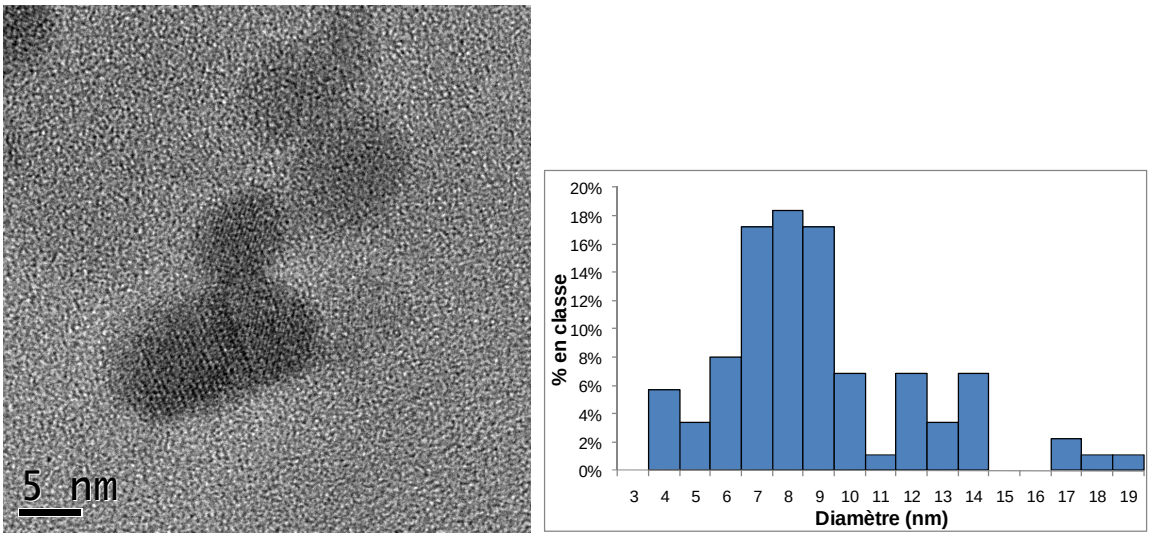


Figure II.3.5 : Cliché MET et comptage granulométrique de nanoparticules d'oxydes de fer synthétisés par voie hydrothermale et continu.

Par la méthode BET, la surface spécifique est de (142 ± 2) $m^2.g^{-1}$. Cette surface élevée est due aux petites nanoparticules de magnétite mais la moyenne finale obtenue prend aussi en compte les grosses particules d'hématite. Ainsi, dans le cas de deux populations de particules, la taille BET n'est pas judicieuse à utiliser.

Comme observé en microscopie électronique en transmission mais également en diffusion de la lumière, les nanoparticules sont très agglomérées en sortie de dispositif et difficilement redispersables comme le laissait supposer la quantité de poudre piégée dans les filtres du dispositif juste après la synthèse. La taille moyenne des nanoparticules, donnée en nombre par PCS à pH = 7, est de plus de 2,5 µm montrant un fort taux d'agglomération. Le point isoélectrique de cette suspension est de pH = 6,5.

II.3.3.1.3 Conclusion sur les nanoparticules synthétisées en voie hydrothermale en continu

Les nanoparticules de magnétite synthétisées ont une taille moyenne de cristallites d'environ (7,2 ± 1,8) nm et sont très agglomérées en sortie du dispositif. Plus de 10% d'hématite est présente diminuant le pouvoir superparamagnétique de la suspension. L'hématite

peut probablement s'être formée suivant deux phénomènes. Le premier serait un grossissement des grains de magnétite au delà de 25 nm (Guigue-Millot 1998) à cause de la température et/ou de la pression. A cette taille, la phase thermodynamiquement stable est l'hématite et une partie des particules de magnétite se serait donc transformée après croissance dans le réacteur à 150°C et 25 MPa. Un autre phénomène pourrait également avoir eu lieu dans le réacteur : le changement du ratio ions ferreux, ions ferriques. En effet, à pression et température élevées, une partie des ions ferreux a pu s'oxyder en ions ferriques. Ainsi, les fer (III) en excès ont pu cristalliser en hématite.

L'hématite étant une phase parasite à notre cahier des charges, il s'est révélé nécessaire de trouver un moyen d'éviter sa formation. Par ailleurs, des essais de synthèses en une étape de nanoparticules modifiées en surface ont également été entrepris.

II.3.3.2 Synthèses de nanoparticules citratées

Comme il a été déjà énoncé lors de la partie II.2, certains composés organiques peuvent être utilisés pour stabiliser les nanoparticules et peuvent avoir un effet sur leurs tailles et leurs degrés d'oxydation. L'acide citrique a été envisagé dans cette étude pour modifier en surface et en morphologie des particules d'oxydes de fer et ce de manière continue. Ses propriétés chélatantes et antioxydantes, sa biocompatibilité ainsi que son faible coût en font un agent intéressant pour des synthèses à l'échelle industrielle.
Des essais en conditions hydrothermale et continue ont été réalisés pour essayer d'éliminer la phase hématite soit en empêchant le grossissement des cristallites soit en empêchant l'oxydation présynthèse d'une partie des ions ferreux en ions ferriques.

II.3.3.2.1 Conditions de synthèse

Comme lors de la modification de surface en mode batch, de l'acide citrique a été mélangé dans une solution d'ions ferreux et ferriques (ratio 2:1). Les concentrations des réactifs sont identiques à celles de la synthèse hydrothermale de référence (8.10^{-3} M de fer (II) : 16.10^{-3} M de fer (III) et 0,33 M de NaOH), seul l'acide citrique est ajouté dans des proportions molaires de 5% ou 100% par rapport aux cations fer (respectivement $1,2.10^{-3}$ M et 24.10^{-3} M). La réaction se déroule de nouveau à 150°C, 25 MPa avec un débit total de 60 $mL.min^{-1}$.
La suspension basique est de nouveau neutralisée en sortie par de l'acide nitrique à 10^{-3} M. Pour les suspensions avec un ratio molaire de 100% de citrates, les filtres semblent avoir moins piégé de particules, probablement en raison d'un état d'agglomération moins prononcé.

II.3.3.2.2 Morphologie, taille et stabilité des nanoparticules citratées synthétisées

L'influence du ratio de citrates sur les phases formées a été étudiée en diffraction des rayons X (Figure II.3.6).

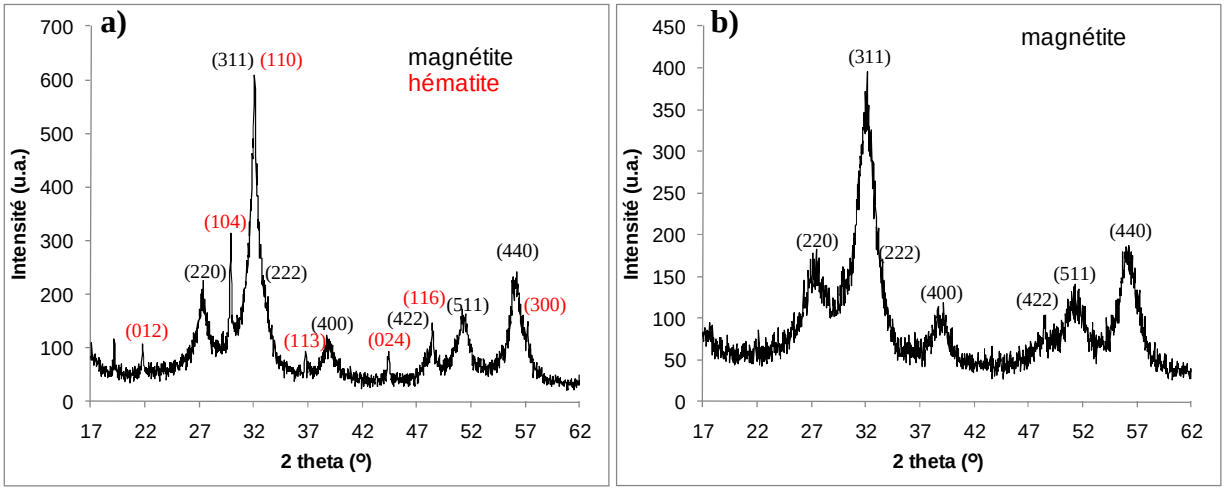


Figure II.3.6 : Diffractogrammes des rayons X de nanoparticules synthétisées en voie hydrothermale continue avec respectivement un ratio molaire en citrates par rapport au fer de, (a) 5% et (b) 100% (λ = 1,3922 Å).

Dans les deux cas, la phase spinelle est majoritairement obtenue. En revanche, la phase hématite est éliminée avec un taux de citrates de 100% quand elle est présente à hauteur de 9% avec 5% de citrates. En regardant les paramètres de maille de la phase magnétite avec 5% et 100% de citrates, respectivement $a_{5\%}$ = (8,366 ± 0,002) Å (soit $Fe_{3(1-0,06)}O_4$) et $a_{100\%}$ = (8,389 ± 0,003) Å ($Fe_{3(1-0,02)}O_4$), on voit qu'avec un rapport molaire de 100% en citrates les ions ferreux sont protégés de l'oxydation. Cependant, pour 5% de citrates, l'oxydation n'est pas évitée de même que la formation d'hématite.
Par ailleurs, la largeur des pics de diffraction de la poudre à 100% de citrates montre que les tailles des cristallites sont plus faibles, sans doute par l'effet chélatant des citrates sur les nanoparticules comme vu lors de la partie II.2.1.

Les tailles des cristallites ont été mesurées par les trois méthodes habituelles (DRX, BET et MET). Le Tableau II.3.3 réunit ces trois diamètres ainsi que la surface spécifique pour les synthèses sans citrate et celles avec un ratio de 5% et 100%.

Conditions de synthèse	**Diamètre DRX (nm)**	**Diamètre MET (nm)**	**Surface spécifique ($m^2.g^{-1}$)**
Sans citrate	5,4 ± 0,3	9 ± 2	142 ± 2
5% de citrates	5,9 ± 0,1	7 ± 2	109 ± 2
100% de citrates	3,8 ± 0,1	6 ± 2	170 ± 2

Tableau II.3.3 : Récapitulatif des tailles et surface spécifiques des nanoparticules de magnétite synthétisées par voie hydrothermale continue avec un ratio molaire de citrates de 0%, 5% et 100%

Le ratio de 5% de citrates ne semble pas diminuer la taille des cristallites. En revanche, le ratio de 100% de citrates diminue assez drastiquement la taille des cristallites.
La microscopie électronique en transmission confirme bien la faible taille des nanoparticules synthétisées en présence de 100% de citrates et atteste d'une distribution de taille plus étroite (Figure II.3.7).

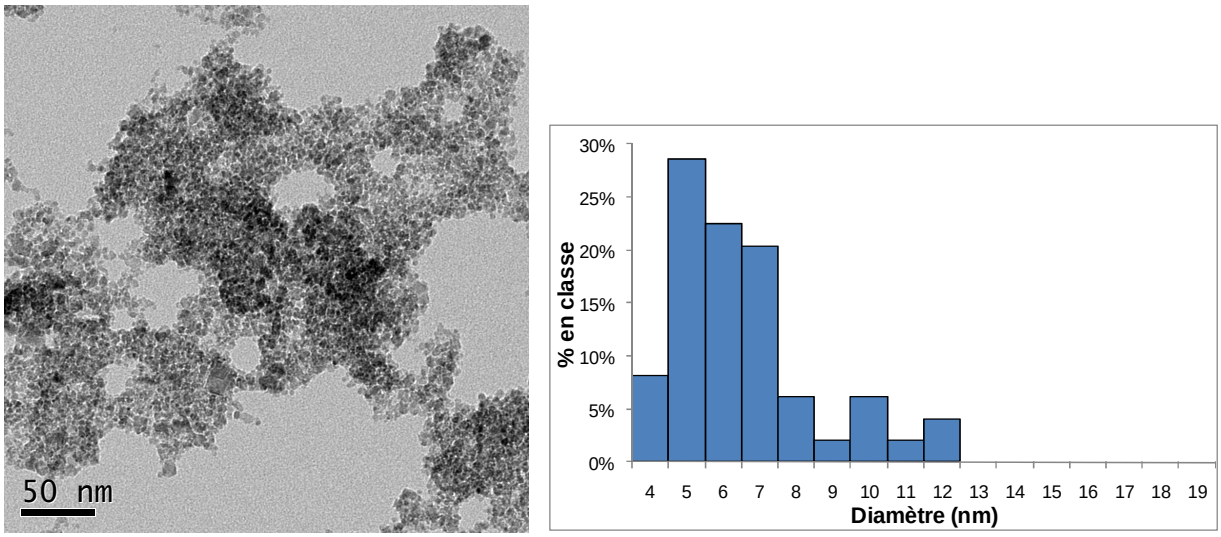


Figure II.3.7 : Cliché et comptage MET de nanoparticules de magnétite synthétisées en continu et par voie hydrothermale avec 100% de citrates en ratio molaire

Un ratio de 5% molaire n'est pas suffisant dans le cas d'une synthèse en continu pour apporter une quelconque modification par rapport aux nanoparticules synthétisées sans citrate. Il est possible que dans ces faibles proportions, dans un domaine de température plus élevé que pour les synthèses en chimie douce (partie II.2.1), la quantité de citrates n'ait pas été suffisante pour modifier la surface de la magnétite. Pour vérifier ceci, il a été nécessaire d'étudier la surface de ces nanoparticules synthétisées par d'autres techniques (Zêtamétrie, XPS).

Les potentiels Zêta ont été mesurés sur les suspensions d'oxydes de fer synthétisés avec respectivement 0%, 5% et 100% de citrates. Les trois courbes sont données sur la Figure II.3.8.

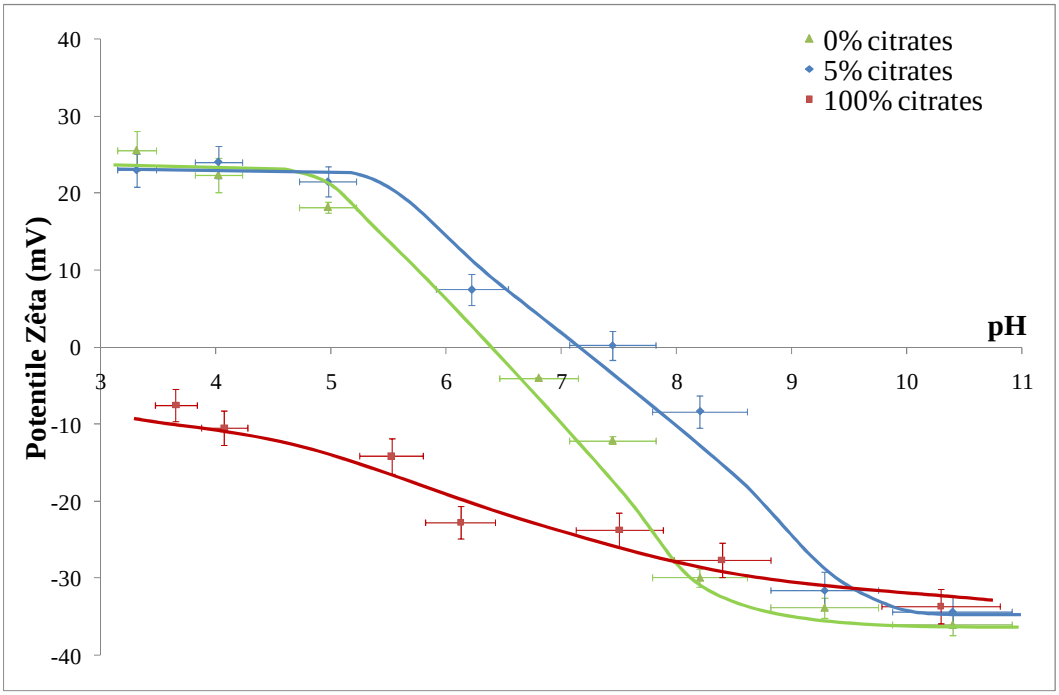


Figure II.3.8 : Courbes de potentiels Zêta en fonction du pH à 10^{-2}M de NaCl pour les nanoparticules de magnétite synthétisées en continu avec respectivement : ▲ 0% de citrates ; ● 5% de citrates et ■ 100% de citrates.

Les nanoparticules synthétisées avec 5% de citrates ne montrent pas de modification significative de leur potentiel Zêta (ni avec des analyses en spectroscopie infrarouge) par rapport à la magnétite seule. En revanche, avec 100% de citrates, les nanoparticules sont chargées négativement sur toute la gamme de pH montrant une modification de la surface de la magnétite.

Les nanoparticules sont par conséquent stabilisées à pH physiologique (pH = 7,4) et donc mieux dispersées dans ces conditions permettant de mesurer un diamètre hydrodynamique en PCS compris entre 30 et 60 nm pour trois synthèses différentes réalisées. Cette taille est corrélée en microscopie électronique en transmission (Figure II.3.9). La taille moyenne trouvée en comptage MET est de 38 ± 15 nm.

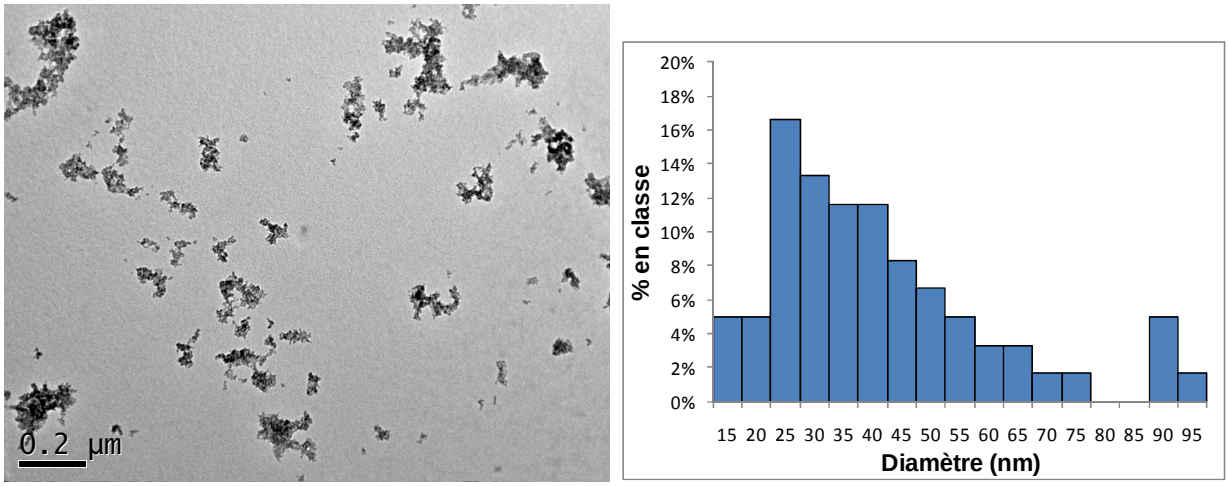


Figure II.3.9 : Cliché et comptage MET sur une centaine d'agrégats des nanoparticules synthétisées en conditions hydrothermale et continue avec 100% de citrates

En analyses par spectroscopie XPS (Tableau II.3.4), les magnétites synthétisées par voies hydrothermale et continue, sans, avec 5% et 100% de citrates ont été analysées avec les mêmes désommations de pics que lors de l'utilisation de l'acide citrique en batch (partie II.2.1 et Annexe A.4.6).

Synthèse	Proportion Fe 2p (%)	Proportion O^{2-} (%)	Proportion OH (%)	Proportion C pollution (%)
Référence	45,5	43	9	2,5
5% citrates	38	45	9	8
100% citrates	35,5	36,5	0	2

Synthèse	Proportion C citrates (%)	Proportion O citrates (%)
Référence	0	0
5% citrates	0	0
100% citrates	12,5	13,5

Tableau II.3.4 : Proportions, obtenues par XPS, du fer et de l'oxygène de la structure spinelle, du carbone et de l'oxygène du citrate et du carbone de pollution sur la synthèse de référence et les magnétites citratées à 5% et 100% en conditions hydrothermale et continue.

Le pic du carbone observé pour 5% de citrate et seulement dû au carbone de pollution car aucun pic vers 288,5 eV caractéristique de l'énergie de liaison du carbone O-C=O du citrate n'a été observé. De même, la contribution de l'oxygène vers 531,5 eV est donc de ce fait seulement due aux hydroxyles de surface (Annexe A.4). Il n'a également pas été possible de détecter de citrates par analyses XPS dans le cas d'un ratio à 5%.

Avec 100% de citrates, les pics propres au carbone et à l'oxygène des citrates confirment la présence de cette molécule en surface. Le nombre d'hydroxyles à la surface semble être nul laissant supposer comme lors des modifications de surface en batch (partie II.2.1.1) que les citrates se sont couplés avec la quasi-totalité de ces groupements.

II.3.3.2.3 Conclusions sur les synthèses hydrothermales en continu de magnétite citratée

La magnétite avec 5% de citrates obtenue *via* les synthèses en continu est en tout point identique à la magnétite sans citrate alors qu'elle était différente en batch. L'acide citrique étant en faible quantité au départ de la réaction, il a pu être détruit en grande majorité lors du chauffage et ainsi ne pas modifier efficacement la surface des nanoparticules.
Dans la partie II.2.1.1, nous avons vu que les citrates étaient dégradés aux alentours de 200°C, on peut donc supposer que l'intégralité des 5% molaires de citrates ont peut-être été détruits dans les conditions hydrothermales (T = 150°C et P = 25 MPa) quand seulement une partie des citrates a été détruite avec le ratio de 100%. Avec cette quantité, ces molécules chélantes sont toujours assez nombreuses pour modifier en continu la surface des nanoparticules, faisant ainsi diminuer la taille des cristallites et empêchant l'oxydation de la magnétite en maghémite et la croissance des grains en hématite. Par ailleurs, les nanoparticules synthétisées sont chargées négativement et ainsi mieux dispersées et mieux stabilisées à pH physiologique. Cependant, comme toute stabilisation électrostatique, ces nanoparticules décantent quand la force ionique augmente et donc en conditions physiologiques.

Des nanoparticules de magnétite pure chargées négativement à pH = 7 ont pu, tout de même, être synthétisées en conditions hydrothermales, en continu et en une seule étape grâce au dispositif de l'équipe MaNaPI.

II.3.3.3 Premiers essais de greffage de PEG en continu

Comme lors des greffages de nanoparticules en batch, le polyéthylène glycol de masse moléculaire 2000 silanisé ($mPEG_{2000}$-Si) utilisé lors de la partie sur la stabilisation stérique de la magnétite (partie II.2.2) a été choisi pour essayer de synthétiser et de greffer en une étape des nanoparticules de magnétite. Cette synthèse n'a été qu'une étude préliminaire et demandera à être optimisée.

II.3.3.3.1 Conditions de synthèse

Comme lors de la modification de surface en continu avec de l'acide citrique, du $mPEG_{2000}$ silanisé a été mélangé à une solution d'ions ferreux et ferriques (ratio 2 :1). Les concentrations des réactifs de la synthèse hydrothermale ont été de 8.10^{-3} M de fer (II), 16.10^{-3} M de fer (III) et 0,33 M de NaOH. Le PEG a été ajouté à la solution d'ions ferreux et ferriques dans une proportion molaire par rapport aux ions fer de 100% soit 24.10^{-3} M de $mPEG_{2000}$-Si (pH de la solution ≈ 4). Les conditions de réaction ont été de 150°C, 25 MPa et 60 $mL.min^{-1}$.

En sortie de dispositif, la suspension a été neutralisée à l'acide nitrique 10^{-3} M puis dialysée 48 heures avec changement d'eau de dialyse toutes les douze heures.

II.3.3.3.2 Morphologie, taille, chimie de surface et stabilité des nanoparticules de magnétite pegylées synthétisées

II.3.3.3.2.1 Phase synthétisée et taille des cristallites

Par diffraction des rayons X (Figure II.3.10), la phase synthétisée est seulement de la magnétite avec un paramètre de maille a = 8,379 ± 0,002 Å. Par la méthode de Poix, la formule de la structure spinelle synthétisée peut s'écrire : $Fe_{3(1-0,043)}O_4$. Les nanoparticules semblent

donc légèrement moins oxydées que lors de la synthèse de référence. De plus, la phase hématite n'a pas été détectée.

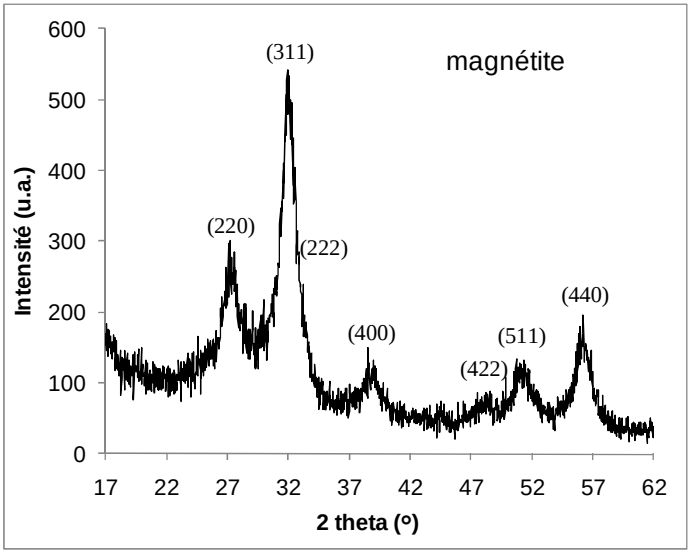


Figure II.3.10 : Diffractogramme des rayons X des nanoparticules de magnétite synthétisées en conditions hydrothermale et continue avec un ratio molaire de Si-PEG$_{2000}$ de 100% (λ = 1,3922 Å)

Les diamètres des cristallites ont été calculés par DRX, par méthode BET et par comptage MET et comparés aux synthèses sans citrate et avec 100% de citrates (Tableau II.3.5).

Conditions de synthèse	**Diamètre DRX (nm)**	**Diamètre MET (nm)**	**Diamètre BET (nm)**	**Surface spécifique ($m^2.g^{-1}$)**
Sans citrate	5,4 ± 0,1	9 ± 2	nd	142 ± 2
100% de citrates	3,8 ± 0,1	6 ± 2	6 ± 1	170 ± 2
100% de mPEG$_{2000}$-Si	4,8 ± 0,1	7 ± 2	9 ± 1	140 ± 2

Tableau II.3.5 : Tailles des cristallites de la magnétite synthétisée en présence de mPEG$_{2000}$-Si en conditions hydrothermale et continue comparées aux nanoparticules seules et citratées à 100%. nd : non déterminé car non pertinent.

La microscopie électronique en transmission confirme la faible taille des cristallites et l'absence d'hématite (Figure II.3.11).

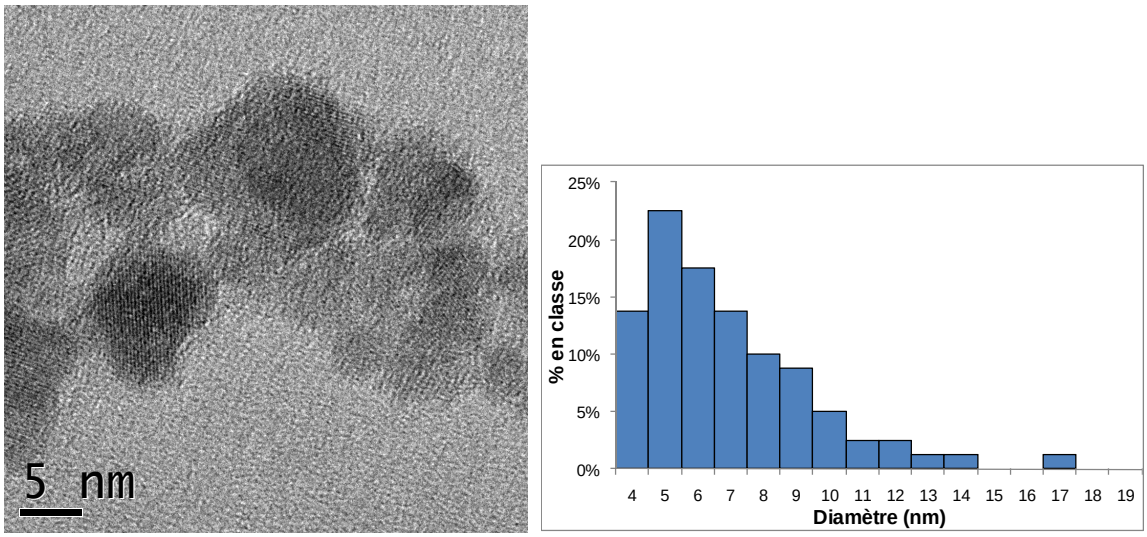


Figure II.3.11 : Cliché et comptage MET sur une centaine d'agrégats des nanoparticules de magnétite pegylées synthétisées par voies hydrothermale et continue

La dispersion des nanoparticules synthétisées est appréhendée par PCS, potentiel Zêta et en microscopie électronique en transmission (Figure II.3.12).

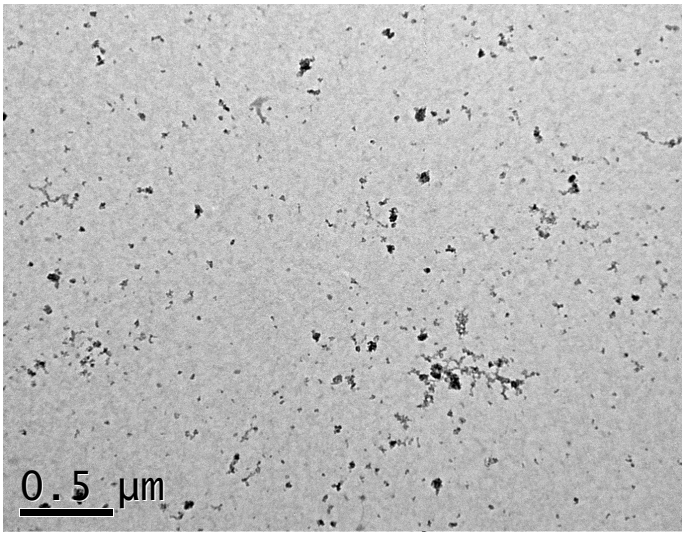


Figure II.3.12 : Cliché MET de l'état de dispersion des nanoparticules pegylées synthétisées par voie hydrothermale continue

Les nanoparticules paraissent mieux dispersées avec le $mPEG_{2000}$-Si en microscopie électronique en transmission. Le fait que les filtres se soient moins colmatés corrobore cette observation. Il reste cependant à savoir si le PEG s'est fixé sur les nanoparticules ou s'il est en solution.

Par mesure de zêtamétrie, la valeur absolue du potentiel Zêta est identique à celle de la magnétite nue ne mettant pas en évidence un phénomène d'écrantage des charges caractéristique d'une stabilisation stérique. La taille n'a pas pu être mesurée en PCS quel que soit le pH car trop grande pour l'appareil (tailles supérieures au micron). Ces mesures ayant été faites longtemps après la synthèse, le polymère ne jouait visiblement plus de rôle stabilisant « à long terme » mais plutôt directement après synthèse. Le $mPEG_{2000}$-Si a pu jouer un rôle de dispersant mais sans réellement stabiliser les nanoparticules.

Pour voir si du $mPEG_{2000}$-Si s'était greffé à la surface de la magnétite, des analyses XPS (Tableau II.3.6), thermogravimétriques et en spectroscopie infrarouge ont été effectuées.

Synthèse	Proportion Fe 2p (%)	Proportion O^{2-} (%)	Proportion OH (%)	Proportion C pollution (%)
Référence	45,5	43	9	2,5
$mPEG_{2000}$-Si	41,5	39,5	10,5	9
Synthèse	**Proportion C PEG (%)**	**Proportion O PEG (%)**	**Proportion Si PEG (%)**	**Proportion N PEG (%)**
Référence	0	0	0	0
$mPEG_{2000}$-Si	0	0	0	0

Tableau II.3.6 : Proportions, obtenues par XPS, du fer et de l'oxygène de la structure spinelle, du carbone, de l'oxygène, de l'azote et du silicium du $mPEG_{2000}$-Si et du carbone de pollution sur la synthèse de référence et la magnétite citratée à 5% et 100% en conditions hydrothermale et continue.

L'analyse XPS montre une présence de carbone de pollution des nanoparticules « pegylées » supérieure au taux observé dans le cas de la magnétite hydrothermale « nue » mais l'absence du pic caractéristique de l'énergie de liaison C-O de ce polymère vers 286 eV (Annexe A.4.6) ne permet pas de conclure quant à la présence de mPEG-Si à la surface de la magnétite. De plus, aucun pic montrant l'énergie de liaison du silicium (nécessaire au greffage du polymère sur la magnétite (partie II.2.2)) n'a été mis en évidence. L'oxygène mesuré n'a donc pas été imputé au mPEG-Si.

Il est difficile de conclure sur la présence réelle de ce polymère à la surface des nanoparticules mais leur dispersion en sortie de synthèse a tout de même pu être observée.
Par analyse thermogravimétrique, la perte de masse entre 150 et 500°C par rapport à la synthèse de référence est de l'ordre de 2%, valeur beaucoup plus faible que lors des greffages par chimie douce (de l'ordre de 50% partie II.2.2.2). Par analyse infrarouge, les pics caractéristiques du mPEG ou du mPEG-Si) sont absents et ne permettent pas de conclure quant à la présence de polymère à la surface.

L'absence de silicium à la surface, de pics caractéristiques du polymère et la faible perte de masse en ATG font penser que les nanoparticules n'ont pas été greffées par du $mPEG_{2000}$-Si et que en cas d'adsorption de cette molécule à la surface, sa proportion est très faible.

Une des hypothèses est la destruction de la fonction éthoxysilane lors de la chauffe et donc l'impossibilité pour le PEG de se greffer sur la surface de la magnétite.
Du polyéthylène glycol a donc été passé dans le dispositif hydrothermal en continu (T = 150°C, P = 25 MPa et débit total = 60 $mL.min^{-1}$) et a été comparé en analyse par spectroscopie infrarouge à du PEG silanisé n'ayant pas subi ce traitement (Figure II.3.13).

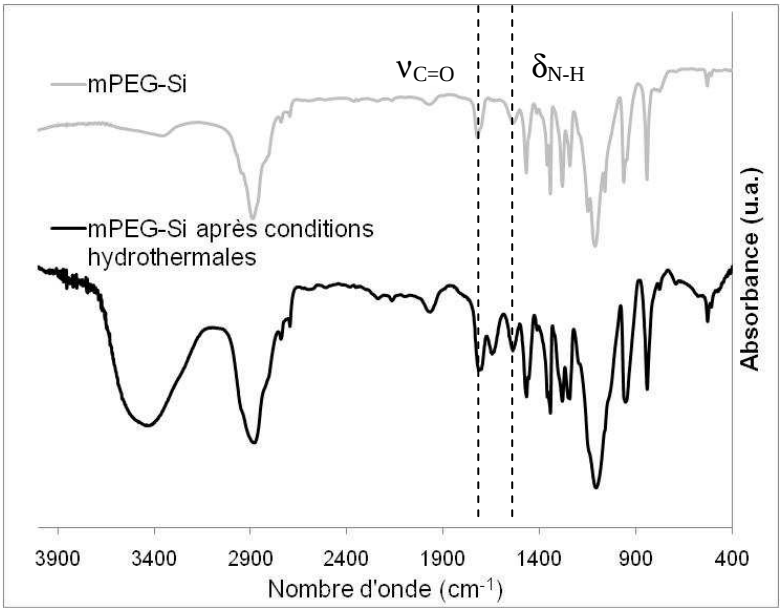


Figure II.3.13 Spectres infrarouges du mPEG-Si et du mPEG-Si passé en conditions hydrothermales (T = 150°C, P = 25 MPa et débit total = 30 mL.min^{-1}).

A l'exception d'un nouveau pic inconnu vers 1600 cm^{-1} probablement dû à la présence d'eau dans ce polymère aucun différence n'est observable entre le PEG ayant subi des conditions hydrothermales et le PEG « classique », notamment le pic caractéristique de la fonction carbonyle (1720 cm^{-1}). Par cette analyse, la fonction carbamate (R-HN-(C=O)O-R) du mPEG-Si ne semble pas avoir été détruite dans ces conditions de synthèse.

Une deuxième hypothèse du non greffage du PEG sur la magnétite pourrait être le faible temps de réaction. En effet, la synthèse ne durant que quatre secondes dans le réacteur et la suspension obtenue étant rapidement neutralisée et lavée (moins d'une heure après le début de la réaction) après synthèse, ce polymère n'a sans doute pas eu le temps de se coupler aux nanoparticules. Dans la partie II.2.2, le temps de réaction pour obtenir des nanoparticules pegylées était de plusieurs heures alors que dans le cas des synthèses en continu et en voie hydrothermale, la réaction ne dépasse pas une heure au maximum.
Le PEG apporte cependant une dispersion, empêchant aux nanoparticules de colmater les filtres.

II.3.3.3.3 Conclusion sur les nanoparticules « pegylées » en continu

Le PEG mélangé aux réactifs de synthèse ne permet pas de greffer ce polymère à la surface des nanoparticules comme espéré. Bien qu'un état de dispersion ait été observé directement après synthèse, les analyses effectuées ne permettent pas de conclure quant à son effet stabilisant à long terme. Par analyse XPS, la présence d'un excès de carbone de pollution par rapport à la synthèse de référence peut laisser supposer que du polymère se trouve à la surface de la magnétite synthétisée mais il est délicat d'affirmer cette hypothèse. Cependant, l'absence de silicium, d'une perte de masse conséquente ou de pic caractéristique du mPEG en analyses infrarouge traduisent une faible proportion de ce polymère en surface ainsi que l'absence de son greffage avec la magnétite. Le faible temps de réaction semble être le facteur ayant empêché le couplage de cette molécule à la surface des nanoparticules.

Cependant, le mPEG$_{2000}$-Si a limité l'oxydation de la magnétite en maghémite et empêché l'obtention d'hématite par l'effet réducteur du carbone des chaînes du polymère. Le PEG permet également d'éviter le colmatage des filtres du dispositif permettant un plus long temps de fonctionnement du dispositif avant nettoyage.

II.3.3.4 Conclusions générales sur la synthèse hydrothermale en continue

Le dispositif de synthèse hydrothermale en continu a permis, comme lors des synthèses en chimie douce, d'élaborer des nanoparticules de magnétite. Sans ajout de molécules réductrices, la phase majoritaire est bien la phase spinelle recherchée mais avec 12% d'hématite.

Avec un ratio de 100% molaire d'acide citrique, l'effet chélatant et réducteur des citrates permet de limiter l'oxydation des cations Fe^{2+} et la taille des cristallites tout en chargeant négativement la surface des nanoparticules. La magnétite ainsi synthétisée n'est plus en présence d'hématite et possède une stœchiométrie en oxygène plus proche de la magnétite pure que de la maghémite. Par ailleurs, elle est stable à pH physiologique et s'agglomère moins dans les filtres du dispositif permettant l'augmentation du temps de fonctionnement.

Avec un polymère, le greffage en une étape escompté n'a pas été possible pour le moment mais le PEG a montré de nombreux atouts. Il a permis également de limiter l'oxydation des nanoparticules et a évité la formation d'hématite tout en empêchant l'agglomération des nanoparticules dans les filtres.

Il n'est pas possible de comparer les synthèses continues des synthèses batch de cette étude. En effet, les cristallites obtenues en continu sont de tailles plus petites que celles obtenues en chimie douce mais beaucoup trop de paramètres rentrent en ligne de compte pour l'explication de cette différence.

Le faible temps de réaction en continu diminue le diamètre des cristallites quand sa température élevée devrait l'augmenter. Par ailleurs, le contre-ion sulfate ayant un effet chélatant, comme les citrates, la croissance cristalline doit aussi en être affectée.

Quoi qu'il en soit, le dispositif en continu a permis de synthétiser en continu et en une seule étape des nanoparticules de magnétite chargées négativement à pH physiologique ce qui est un résultat encourageant pour la suite des études biologiques et industrielles de ce matériau.

II.3.4 Synthèse de magnétite en milieu supercritique

Après avoir élaboré des nanoparticules de magnétite en conditions hydrothermale et continue, les paramètres du dispositif ont été réglés pour travailler dans le domaine supercritique. La pression a été laissée à 25 MPa et la température montée à 400°C. Le débit total a dû être diminué à 30 mL.min^{-1} pour être en conditions supercritiques dès le point de mélange. En effet, avec un débit de 60 mL.min^{-1}, les conditions au point de mélange étaient sous-critique (température inférieure à 373°C) et la réaction se faisant de manière quasi-instantanée, seule la croissance des grains se déroulait dans les conditions supercritiques. Avec un débit de 30 mL.min^{-1}, le temps de réaction est de l'ordre de huit secondes.

L'objectif de cette partie est de synthétiser de la magnétite ou de la maghémite dans les conditions supercritiques et sans ajout de base. Pour rappel, dans la littérature les synthèses sans base donnent principalement de l'hématite (Cabanas *et al.* 2001) et l'utilisation d'un agent réducteur est donc nécessaire pour palier ce problème.

Dans une première partie, nous regarderons l'influence du degré d'oxydation des ions fer pour la synthèse avec base en milieu supercritique puis l'influence du degré d'oxydation des cations fer et des citrates en conditions supercritiques sans base.

II.3.4.1 Synthèses en conditions supercritiques en présence de base : influence du ratio fer (II) et fer (III)

Dans cette partie, le ratio molaire d'ions ferreux et ferriques a été modifié pour essayer de synthétiser des nanoparticules de magnétite sans hématite avec de la soude. Un ratio molaire ferreux/ferrique de 1:2 a été choisi ainsi qu'un ratio de 100% d'ions fer (II) (3:0).

Avec seulement des ions ferreux, la cristallisation de la phase spinelle doit se faire par oxydation partielle, en température et/ou en pression, des Fe^{II} en Fe^{III} et conduire à la réaction :

$$Fe^{2+} \underset{P}{\overset{T}{\longleftrightarrow}} \delta \cdot Fe^{3+} + (1-\delta) \cdot Fe^{2+} \xrightarrow[ou \cdot SC]{NaOH} \frac{\delta}{2} Fe_3O_4 + (1-\frac{3\delta}{2}) \cdot Fe^{2+} \qquad \text{Eq. II.3.3}$$

II.3.4.1.1 Conditions de synthèse

Dans un premier temps, le ratio molaire (1:2) est gardé et les concentrations de précurseurs et de soude sont les mêmes que lors des synthèses hydrothermales soit respectivement : 8.10^{-3} M de fer (II) ; 16.10^{-3} M de fer (III) et 0,33 M de NaOH. Le deuxième ratio utilisé est le ratio (3:0) soit seulement des ions ferreux avec une concentration de 24.10^{-3} M.

Les suspensions sont très agglomérées et ne se retrouvent pas en sortie du dispositif mais sont piégées dans les filtres. Les poudres ont ensuite été récupérées à ce niveau dans de l'acide nitrique (10^{-3} M) puis ont été dialysées pendant 48 heures en changeant l'eau de dialyse toutes les 12 heures puis ont été lyophilisées pour être analysées.

II.3.4.1.2 Analyses des phases synthétisées : influence du ratio molaire fer (II) / fer (III)

Les deux conditions de synthèses ont mené à des nanoparticules cristallisées de phase magnétite majoritaire avec une proportion d'hématite, respectivement 8% pour le ratio (1:2) et 2,5% pour le (3:0).

Les diffractogrammes des rayons X sont donnés en Figure II.3.14.

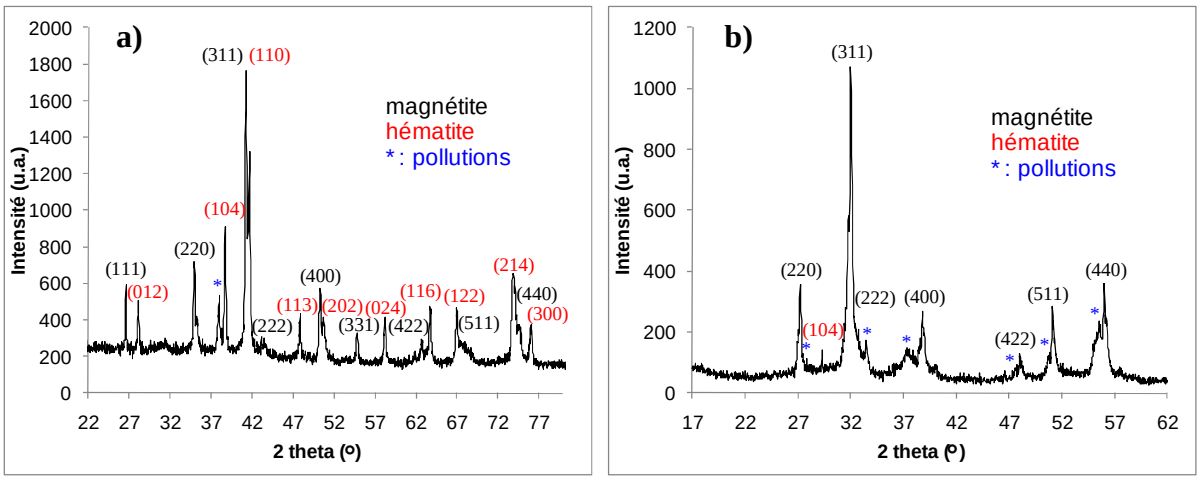


Figure II.3.14 : Diffractogrammes de nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées en continu et en conditions supercritiques avec un ratio fer (II) fer (III) de : (a) (1:2) (λ= 1,78897 Å) et (b) (3:0) (λ = 1,3922 Å)

Le paramètre de maille de la phase spinelle obtenue en domaine supercritique avec soude pour le ratio (3:0) est de a = 8,38 ± 0,01 Å et est de a = 8,35 ± 0,01 pour le ratio (1:2). La phase spinelle obtenue avec uniquement des fer (II) est donc moins oxydée ($Fe_{3(1-0,047)}O_4$) que celle obtenue avec le ratio (1:2) ($Fe_{3(1-0,093)}O_4$) et moins d'hématite est présente.
Les pics inconnus observés sur ces diffractogrammes sont probablement dus à des impuretés détachées du réacteur (en Inconel®) lors des synthèses[13]. Par analyse EDX, sur des grilles en microscopie électronique en transmission, cette phase parasite semble être composée de niobium, élément rentrant dans la composition de l'Inconel®.

Pour de nombreuses conditions de synthèses en supercritique, cette phase parasite a été observée et a empêché un affinement simple des diffractogrammes.
Cependant, par la méthode de Scherrer (Eq. II.3.4), il a tout de même été possible d'estimer une taille de cristallites mais de manière moins précise qu'avec la méthode d'Halder-Wagner.

$$\phi = \frac{180 \cdot \lambda}{\pi \cdot \beta \cdot \cos\theta} \qquad \text{Eq. II.3.4}$$

avec λ la longueur d'onde en Å du rayonnement incident, β la largeur à mi-hauteur corrigée de la largeur instrumentale (en °) du pic de diffraction, θ l'angle de diffraction du pic (en radians) et ϕ la taille des cristallites.

Au vu de la faible largeur des pics de diffraction, les tailles des cristallites doivent être plus importantes que celles de la voie hydrothermale. Les tailles de cristallites de la phase spinelle des deux synthèses ont été déterminées par cette méthode. Il en a été de même pour la phase hématite de la synthèse avec le ratio molaire (1:2).

Les résultats des tailles trouvées sont donnés dans le Tableau II.3.7.

[13] Cette observation est peu fréquente lors de synthèses sur cet appareillage. Cependant, avant notre campagne de synthèse, un réactif trop corrosif et inadapté avait été utilisé, créant des piqures de corrosions sur le réacteur. Cette détérioration partielle du dispositif a sans doute conduit aux impuretés rencontrées lors de nos synthèses.

Conditions de synthèse (ratio)	Diamètre DRX (nm)	Surface spécifique ($m^2.g^{-1}$)
1 Fe^{2+} / 2 Fe^{3+}	13 ± 1 & 39 ± 7	22 ± 2
3 Fe^{2+} / 0 Fe^{3+}	25 ± 2	38 ± 2

Tableau II.3.7 : Tailles des cristallites et surface spécifique de la magnétite synthétisée en continu et en conditions supercritiques, avec de la soude et différents ratio d'ions fer. Les deux tailles obtenues en DRX pour le ratio (1:2) sont respectivement celles de la phase spinelle et de l'hématite.

Ces particules étant toutes piégées par les filtres, elles étaient très agglomérées et aucune mesure d'agrégats n'a pu être réalisée en PCS, laissant penser à des diamètres très importants et donc une faible stabilité en suspension (Figure II.3.15).
Par ailleurs, il a été délicat d'effectuer des comptages de tailles de cristallites en raison de leur forte agglomération et de la présence de particules parasites venant de la pollution observée précédemment.

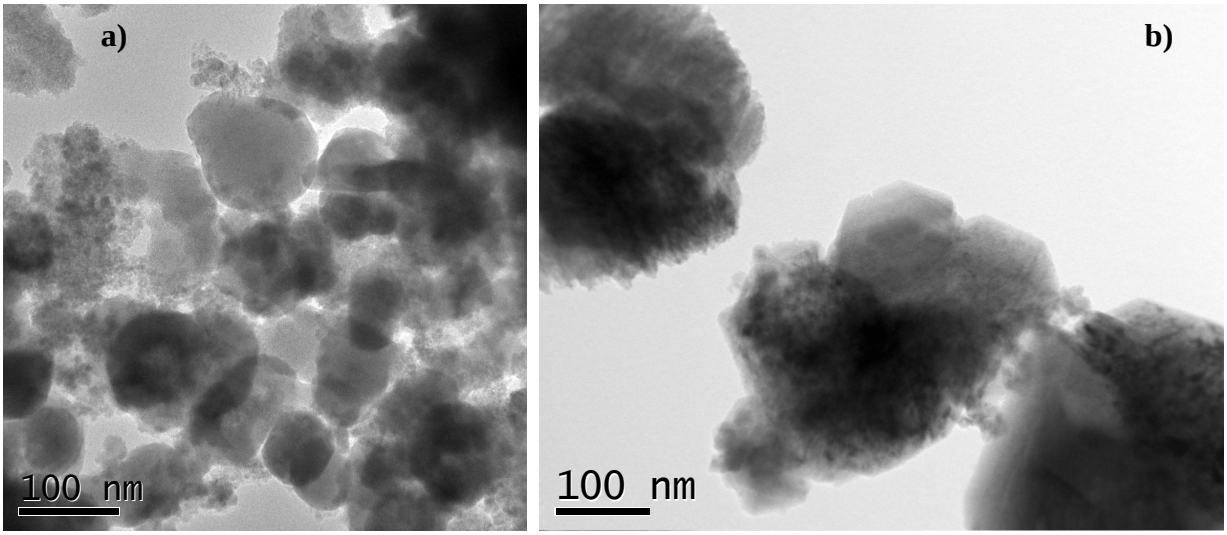


Figure II.3.15 : Clichés MET de nanoparticules synthétisées en continu et en conditions supercritiques avec soude pour un ratio molaire fer (II) / fer (III) de : (a) (1:0) et (b) (3:0).

En regardant les clichés obtenus en microscopie électronique en transmission, deux populations apparaissent. Il est probable que lors de la phase de chauffe, le ratio fer (II) / fer (III) soit devenu sous stœchiométrique permettant la croissance de ces deux populations de structure spinelle :

1) Une structure à petits grains très pauvre en ions ferreux et donc proche de la maghémite
2) Une structure à gros grains proche de la magnétite qui se sont sûrement formés par processus de dissolution-recristallisation.

Ces phénomènes ont déjà été mis en évidence lors d'études de J-P. Jolivet sur des compositions Fe^{II} / Fe^{III} = 0,15 (Jolivet 1994) qui donne des particules de maghémite de quelques nanomètres et des particules de magnétite de 100 à 150 nm après 24 heures environ. Ce qui est nouveau avec le dispositif en eau supercritique est la rapidité d'obtention de ces grosses nanoparticules de structure spinelle.

II.3.4.1.3 Conclusion sur les synthèses supercritiques en présence de base

Le domaine supercritique en continu avec soude a permis de synthétiser des nanoparticules de magnétite avec un taux d'hématite qui a pu être diminué en augmentant le taux d'ions ferreux. Là encore, la formation d'hématite vient probablement de l'oxydation d'une partie des ions ferreux et de l'augmentation de la taille de la magnétite en température

expliquant peut être la différence de tailles entre ces synthèses et celles en conditions hydrothermales.

Des pollutions ont probablement été causées par l'oxydation préalable du réacteur par piqûres. Cette phase parasite ne provient pas de la synthèse mais du dispositif et des nouvelles synthèses devront être effectuées après obtention d'un réacteur exclusivement dédié aux oxydes de fer en 2011.

II.3.4.2 Synthèses en conditions supercritiques en absence de base : influence du ratio fer (II), fer (III) et des citrates

Après des premières synthèses en domaine eau supercritique avec de la soude qui ont permis d'obtenir la phase spinelle recherchée, les conditions ont été changées pour synthétiser de la magnétite sans soude grâce aux propriétés de l'eau supercritique. Les influences du ratio fer (II) / fer (III) ont été étudiées ainsi que celles de l'ajout de citrates dans les réactifs. L'idée de l'utilisation du citrate était d'empêcher, ou au moins de diminuer, l'oxydation des cations Fe^{2+}, et la formation d'hématite comme lors des synthèses hydrothermales.

II.3.4.2.1 Conditions de synthèse

Cette étude s'est déroulée sur trois types de synthèses : une synthèse avec un ratio molaire d'ions fer identique à la littérature (1:2) soit 8.10^{-3} M de fer (II) et 16.10^{-3} M de fer (III), une autre synthèse avec seulement des fer (II) soit une concentration de 24.10^{-3} M, enfin une dernière synthèse avec seulement des ions fer (II) et un ratio de 100% molaire de citrates (concentrations de 24.10^{-3}M).

Là encore, toutes les poudres ont été piégées dans les filtres et ont été récupérées dans l'acide nitrique à 10^{-3}M pour neutraliser la suspension.

II.3.4.2.2 Influence du ratio fer (II) / fer (III)

Pour le ratio fer (II) / fer (III) « classique » la phase obtenue est seulement de l'hématite (100%). Dans le cas des ions ferreux seuls, l'hématite est présente à 41% en proportion molaire et la phase spinelle l'est donc à 59% (Annexe A.6). Ces résultats prouvent déjà la propriété de l'eau supercritique à faire précipiter sans ajout de base des nanoparticules d'oxydes.

Les mesures de tailles des cristallites donnent des valeurs différentes pour le ratio (1:2) et le (3:0) (Tableau II.3.8). Le diffractogramme des nanoparticules synthétisées avec le ratio (3:0) n'a pas pu être affiné à cause des pollutions déjà observées lors de la partie précédente (Partie II.3.4.1) et les tailles des cristallites ont donc été déterminées par la méthode de Scherrer.

Conditions de synthèse (ratio)	Diamètre DRX (nm)	Diamètre MET (nm)	Diamètre BET (nm)	Surface spécifique ($m^2.g^{-1}$)
1 Fe^{2+} / 2 Fe^{3+}	69 ± 1	72 ± 6	100 ± 1	12 ± 2
3 Fe^{2+} / 0 Fe^{3+}	39 ± 2 & 56 ± 2	5 ± 1 & 92 ± 20	nd	157 ± 2

Tableau II.3.8 : Tailles des cristallites de la magnétite synthétisée en continu et en conditions supercritiques sans soude avec différents ratio d'ions fer. Les deux tailles obtenues en DRX pour le ratio (3:0) sont respectivement celles de la phase spinelle et de l'hématite. Les deux tailles obtenues par comptage en microscopie électronique en transmission pour le ratio (3:0) sont les moyennes pour chaque population observée en MET. nd : non déterminé car non pertinent.

En microscopie électronique en transmission, on peut se rendre compte que la distribution de tailles des cristallites d'hématite obtenue avec le ratio (1:2) est très monodisperse. En revanche, pour la synthèse avec les ions ferreux seuls, la distribution est très hétérogène avec deux populations, une centrée sur 5 nm et une seconde centrée sur 90 nm (Figure II.3.16 et Figure II.3.17).

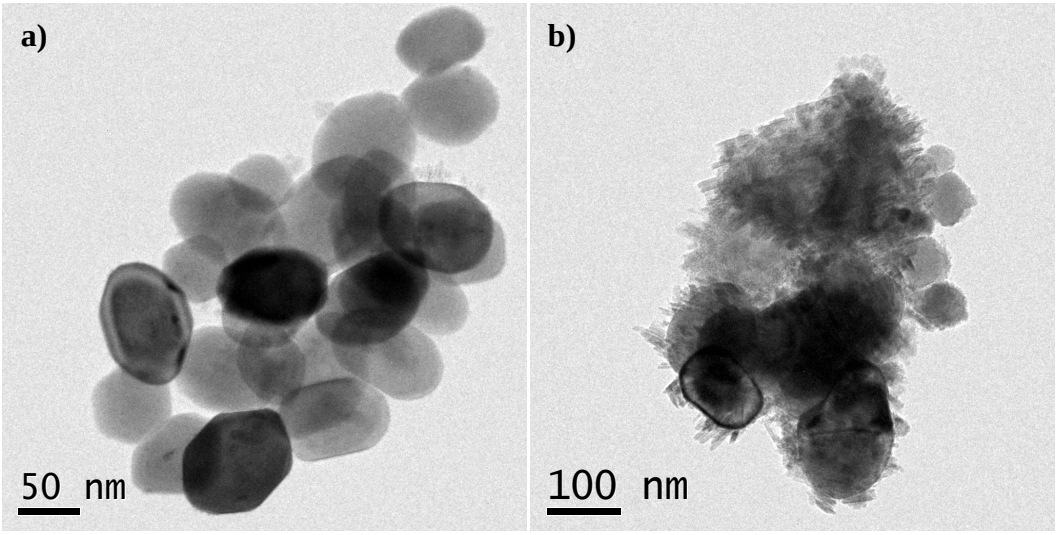


Figure II.3.16 : Clichés MET des nanoparticules obtenues en domaine supercritique avec un ratio molaire fer (II) / fer (III) de : (a) (1:2) et (b) (3:0)

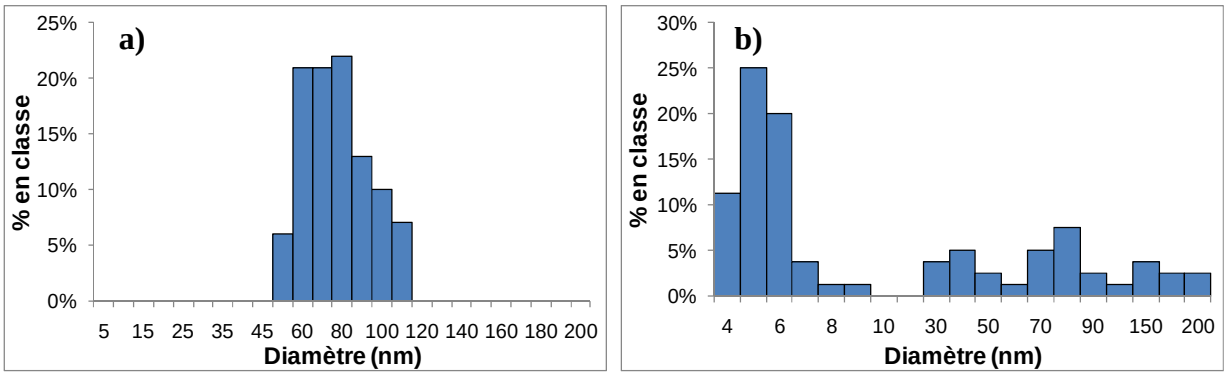


Figure II.3.17 : Comptage en microscopie électronique en transmission des nanoparticules obtenues en domaine supercritique sans soude avec un ratio molaire fer (II) / fer (III) de : (a) (1:2) et (b) (3:0).

Par diffraction des rayons, la taille moyenne de la phase spinelle est plus grande que la plus petite taille observée au MET (39 nm pour 5 nm) laissant supposer qu'une partie des gros grains observée en microscopie électronique en transmission (Figure II.3.16) est de phase spinelle. La surface spécifique élevée dans le cas du ratio (3:0) est due aux petites particules de magnétite mais ne permet pas de donner une taille moyenne à cause de la population de grosses particules d'hématite.

Cependant, cette petite valeur traduit bien la forte proportion en nombre de petites cristallites comme observée en MET (Figure II.3.16). Les clichés par microscopie électronique montrent deux populations pour cette condition de synthèse avec seulement des ions ferreux. Les petites particules étant probablement de la magnétite et les grosses particules de l'hématite. L'hématite s'est sûrement formée, dans ce cas, par grossissement des particules de magnétite en milieu hautes températures et hautes pressions.

On peut remarquer que l'augmentation du ratio d'ions fer (II) permet de synthétiser de la magnétite sans base mais dans des proportions relativement faibles (inférieures à 60%). L'influence des ions citrates sur cette synthèse avec seulement des ions ferreux a donc été étudiée.

II.3.4.2.3 Influence des citrates dans le ratio (3:0)

Par diffraction des rayons X, la phase obtenue est la phase spinelle avec très peu d'hématite (proportion inférieure à 0,5%). Figure II.3.18 on observe un dédoublement des pics de la phase spinelle. Une phase à gros grains existe avec un paramètre de maille (a = 8,394 ± 0,001 Å) soit une déviation par rapport à la stœchiométrie de l'oxygène très faible par rapport à la magnétite $Fe_{3(1-0,005)}O_4$.
Une deuxième phase à petits grains possède un paramètre de maille (a = 8,347 ± 0,001 Å) soit une phase très oxydée $Fe_{3(1-0,105)}O_4$ proche de la maghémite $Fe_{3(1-0,111)}O_4$.
Notre poudre serait donc composée de magnétite à gros grains et de maghémite à petits grains comme lors de la partie II.3.4.1.

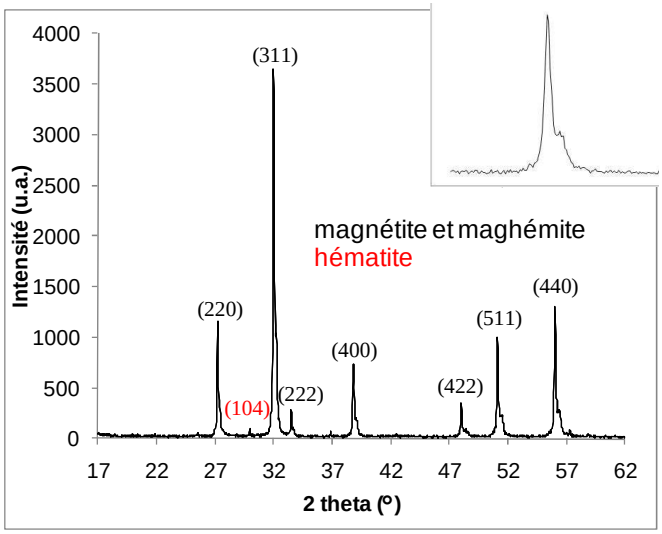


Figure II.3.18 : Diffractogramme des nanoparticules synthétisées en conditions supercritiques en continu avec un ratio de fer (3:0) et 100% de citrates (λ = 1,3922 Å)

Par la méthode de Le Bail, deux tailles moyennes de cristallites ont été trouvées, (17 ± 3) nm pour les petites cristallites qui sont vraisemblablement de la maghémite et (47 ± 4) nm qui sont sûrement de la magnétite.
La microscopie électronique en transmission a fait apparaître deux populations de phases spinelle (Figure II.3.19) :

1) de petites particules de maghémite
2) des grosses particules (supérieures à 100 nm) de magnétite

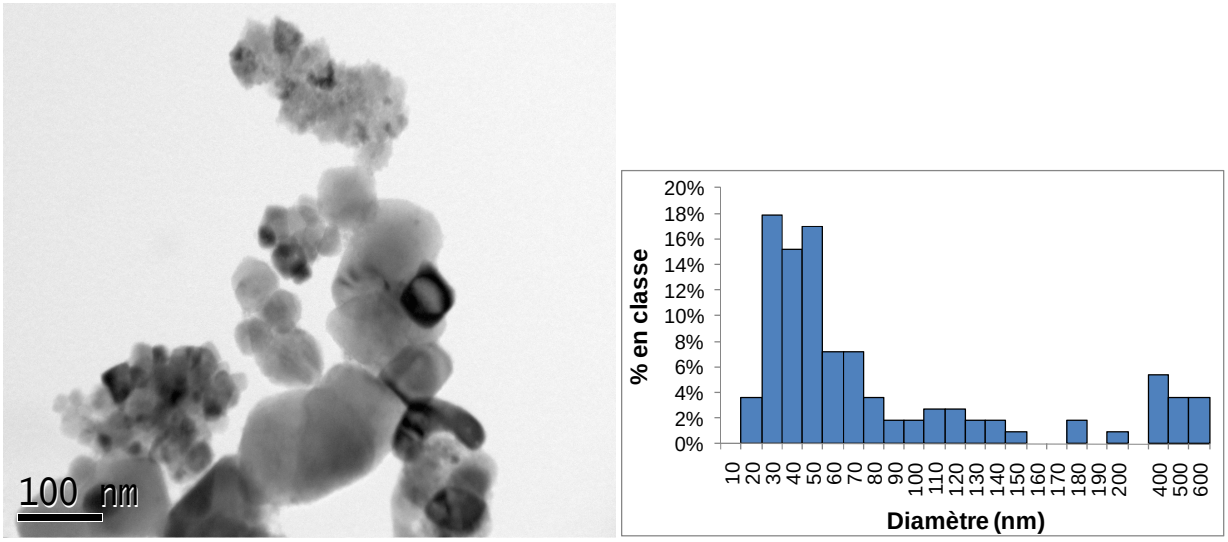


Figure II.3.19 : Cliché et comptage MET de nanoparticules de magnétite et de maghémite obtenues en continu et en conditions supercritiques sans base et avec citrates

Par comptage en microscopie électronique en transmission, il existe une population de nanoparticules majoritaire aux alentours de 30-40 nm. Au-delà, il existe des cristallites de taille polydisperse s'échelonnant de quelques dizaines de nanomètres au-delà du micron.

Par diffraction des rayons X, les phases majoritaires sont la magnétite et la maghémite. Ainsi les citrates semblent avoir protégé de l'oxydation les ions ferreux des nanoparticules et permis la croissance de particules de magnétite de plus de 0,5 µm. Ils n'ont cependant pas permis la dispersion des nanoparticules et n'étaient peut être pas assez nombreux pour influencer la surface des agrégats. Les citrates jouent plus dans ce cas sur la limitation de l'oxydation que sur la diminution de la taille des cristallites.

Les tailles obtenues sont résumées dans le Tableau II.3.9.

Conditions de synthèse (ratio)	**Diamètre DRX (nm)**	**Diamètre MET (nm)**	**Surface spécifique ($m^2.g^{-1}$)**
3 Fe^{2+} / 0 Fe^{3+} 100% citrates	17 ± 3 & 47 ± 4	100 ± 40	7,3 ± 0,5

Tableau II.3.9 : Tailles des cristallites de la magnétite synthétisée en continu, en conditions supercritiques sans soude et avec citrates. Les deux tailles obtenues en DRX sont vraisemblablement respectivement celles de la maghémite et de la magnétite. La taille obtenue par comptage en microscopie électronique en transmission est la moyenne des cristallites observées en MET qui étaient très polydisperses.

II.3.4.2.4 Conclusions sur les synthèses supercritiques en absence de base

Le domaine eau supercritique a permis d'obtenir des nanoparticules bien cristallisées sans utilisation de base. Cependant, sans citrate, la phase majoritaire, quel que soit le ratio fer (II) / fer (III) choisi, est l'hématite bien que l'augmentation du taux d'ions ferreux diminue sa formation.

En utilisant les citrates pour leurs aspects chélatants et réducteurs, de la magnétite et de la maghémite ont pu être synthétisées.

Les cristallites sont cependant très polydisperses en taille et très agglomérées les rendant instables en suspension. Des optimisations seront donc à envisager dans cette voie pour diminuer ces problèmes en utilisant, par exemple, des ratios plus importants de citrates.

II.3.5 Conclusion sur les synthèses hydrothermales en continu

En conclusion sur cette partie et avant de discerner les synthèses réalisées en domaine hydrothermale (T = 150°C et P = 25 MPa) et en domaine supercritique (T = 400°C et P = 25 MPa), il faut noter que le dispositif développé au sein de l'équipe MaNaPI a permis de synthétiser en continu des nanoparticules d'oxydes de fer. L'hématite étant la phase facilement obtenue dans des domaines de pressions et de températures importantes, l'objectif était de réussir à obtenir la phase spinelle de magnétite et/ou de maghémite.

Au niveau du domaine hydrothermal, l'ajout de citrates en proportion de 100% a permis d'obtenir des compositions proches de la magnétite (a = (8,389 ± 0,003) Å) de tailles de cristallites d'environ 5 nm et de diamètre d'agrégats compris entre 30 et 60 nm.
Grâce aux citrates, l'oxydation de la magnétite est limitée même en continu et la formation d'hématite est évitée soit par diminution de l'oxydation de fer (II), soit par chélation des cristallites empêchant leur augmentation de taille et leur changement de phase vers les gros grains.

La charge de surface de ces nanoparticules a également été modifiée permettant la stabilité de la magnétite à pH physiologique.

L'ajout de PEG dans la réaction a également évité la formation d'hématite et diminué la taille des cristallites mais n'a pas permis de stabiliser les nanoparticules par répulsion stérique suite à un greffage covalent qui n'a pas eu lieu. Des améliorations du procédé sont envisagées pour tenter de synthétiser et de greffer en une étape de la magnétite pegylée.

Il a donc été possible de synthétiser en une étape, en continu et en grande quantité (6 $g.h^{-1}$) des nanoparticules superparamagnétiques de tailles et de morphologie compatibles avec le milieu biologique mais qui n'ont pas pu être testées faute de temps. Ces résultats sont cependant prometteurs et de nouvelles campagnes devraient être envisagées pour diminuer, entre autres, la dispersion en taille des nanoparticules.

Dans le domaine supercritique, quelles que soient les conditions choisies, les nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées ont des tailles trop importantes pour le vivant (supérieures à 300 nm) soit au niveau des cristallites, soit parce qu'elles sont trop agglomérées. Cependant, il a été montré l'influence du ratio d'ions ferreux et ferriques pour des synthèses. Quand les ions ferreux sont seuls présents comme précurseurs, la proportion d'hématite diminue que l'on soit avec ou sans base.
Les synthèses avec de la base ont permis d'obtenir majoritairement la phase magnétite quand la phase majoritaire sans base était l'hématite. Il a donc été possible de synthétiser des nanoparticules cristallisées sans l'utilisation de base grâce aux conditions de l'eau supercritique.

Avec les citrates (à 100%) et sans base, la distribution en taille est bimodale avec deux populations de tailles différentes : des gros grains de magnétite et des petits grains de maghémite sans présence d'hématite. Les citrates ont aussi protégé de l'oxydation des particules de magnétite de plus de 200 nm qui ont pu croître en conditions supercritiques sans base sans se transformer en hématite.

La présence de niobium lors d'analyses en rayons X nous laisse supposer l'oxydation probable du réacteur par les réactifs trop acides, ce genre d'oxydation n'ayant jamais été observé lors de synthèses d'autres matériaux sur ce dispositif. Le contrôle du pH des réactifs sera donc à envisager.

S'il ne fallait retenir qu'une condition par domaine de synthèse, il faudrait garder l'utilisation du citrate en proportion molaire de 100% en conditions hydrothermales et

supercritiques car dans les deux cas, il a permis d'obtenir des phases d'oxyde de fer spinelle dépourvues d'hématite.
De plus, dans les conditions hydrothermales, les nanoparticules synthétisées ont été stabilisées à pH physiologique et ont une taille d'agrégats compatibles avec le vivant.

Cette étude n'a été que prospective et au vu des nombreuses inconnues du domaine supercritique, il a été difficile de comparer les synthèses précédentes obtenues en mode batch à ces nouvelles synthèses réalisées sur le dispositif hydrothermal en continu. Par ailleurs, l'obtention d'un réacteur batch pouvant travailler en conditions supercritiques ainsi que la réalisation de nouvelles synthèses en changeant d'autres paramètres (débits, pressions, autres domaines de température) permettront de mieux comprendre les mécanismes de réaction et aussi d'optimiser l'obtention de nanoparticules de taille monodisperse. Enfin, l'évolution en 2011 du dispositif par l'ajout d'une voie pour le greffage de polymère devrait permettre l'ajout d'agents dispersants à différents moments durant la synthèse permettant ainsi d'essayer de mieux stabiliser ou greffer des nanoparticules.

II.4 Conclusion générale sur la synthèse, la modification de surface et la fonctionnalisation des nanoparticules

L'objectif de ce chapitre était de synthétiser des nanoparticules magnétiques pouvant être utilisées comme agents de contraste en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). Ces nanohybrides devaient avoir des tailles d'agrégats inférieurs à 150 nm et être stables dans les conditions physiologiques (pH = 7,4 et force ionique = 0,15 M).
Deux approches d'élaboration ont été étudiées :

- Par méthode classique de co-précipitation, des nanoparticules de magnétite en partie oxydée ont été synthétisées. Leur surface a ensuite été fonctionnalisée par différentes molécules (acide citrique, DMSA, mPEG-Si, rhodamine) pour leur conférer une stabilité dans des solutions chargées en sel. Dans le cas de l'acide citrique, l'impact de cette molécule sur la taille des cristallites a été évalué.
- A l'aide d'un dispositif de synthèse hydrothermale en continu pouvant s'étendre au domaine eau supercritique, des nanoparticules d'oxydes de fer modifiées en surface avec des tailles et des phases diverses ont été réalisées **en une seule étape**.

Avec un mélange stœchiométrique d'un ion ferreux pour deux ions ferriques ($1\ Fe^{II}$ / $2\ Fe^{III}$) dans une solution basique, un oxyde de fer de structure spinelle est obtenu. Des cycles de centrifugation ont permis de diminuer la taille moyenne des agrégats élémentaires (23 nm par PCS) et d'éliminer les « gros » agrégats (tailles supérieures à 150 nm) ne pouvant pas être utilisés dans les applications biologiques visées.

Le lavage choisi pour éliminer l'excès d'ions en solution est la **peptisation** de la suspension à pH acide (pH = 1). A ce pH, les nanoparticules sont stables grâce aux groupements hydroxyles de surface (OH_2^+) mais également oxydées. Ainsi, la formule des oxydes de fer synthétisés peptisés est $Fe_{3(1-\delta)}O_4$ (avec δ la déviation en stœchiométrie de l'oxygène = 0,077) soit une composition entre la magnétite (Fe_3O_4 : $\delta = 0$) et la maghémite (γ-Fe_2O_3 : $\delta = 0{,}111$), deux compositions présentant des propriétés superparamagnétiques recherchées pour les applications en IRM. Les hydroxyles de surface confèrent une stabilité aux nanoparticules dans des domaines de pH acide et basique mais ne permettent pas de les stabiliser dans des conditions physiologiques. Cependant, ces groupements sont réactifs et ont permis le couplage de molécules stabilisantes à la surface de la magnétite.

Pour modifier la surface des nanoparticules en vue de les stabiliser dans des conditions physiologiques, deux types de molécules ont été utilisés : des acides carboxyliques (acide citrique et DMSA) et des polymères non chargés (mPEG-Si).

En premier lieu, l'utilisation d'acide citrique directement en co-précipitation a permis de réduire la taille des cristallites et de charger négativement la magnétite à pH proche de 7. Des ratios acide citrique/fer élevés (supérieures à 20%) ont permis de couvrir une partie importante des hydroxyles de surface et, pour un ratio de 100%, l'oxydation de la magnétite a été moindre ($\delta = 0{,}057$). Le DMSA utilisé post-synthèse a également chargé négativement les oxydes de fer et a permis de les faire floculer à des pH = 3-4. De plus, en théorie, les fonctions thiols de cet acide carboxylique peuvent être utilisées pour le couplage de molécules. Cependant, ceci est rendu difficile de part la formation rapide de ponts disulfures (S-S). Ces stabilisations électrostatiques ont permis de disperser les nanoparticules à pH physiologique mais en cas de forces ioniques élevées, une décantation est tout de même observée.

Dans un second temps, des mPEG-Si de longueurs de chaînes différentes (800, 2250 et 5250 $g.mol^{-1}$) ont été utilisés pour stabiliser stériquement les oxydes de fer. Il n'a pas été possible de prouver l'existence de la liaison Si-O-Fe caractéristique du greffage du mPEG-Si à

la surface des nanoparticules mais par leurs stabilisations en conditions physiologiques, l'hypothèse d'un greffage covalent a été retenue.

Ces chaînes de polymères ont permis de protéger de l'oxydation les fonctions thiols du DMSA greffé conjointement à du mPEG-Si sur des nanoparticules. Par cette nouvelle approche, il a été possible de coupler une molécule thio-réactive (la rhodamine-maléimide) plusieurs jours après synthèse alors que ce n'était pas possible sans utilisation de mPEG-Si. L'effet floculant du DMSA vers pH = 3 avait été choisi pour mieux éliminer l'excès de polymère mais il s'est avéré que l'acidité détruit en fait une grande quantité des chaînes du mPEG-Si, ce qui conduit à la déstabilisation de la suspension en cas de fortes forces ioniques. En utilisant la dialyse, ce problème a été évité.

Enfin, en utilisant des rhodamines couplées à des fonctions silanes, des nanoparticules pegylées ont été élaborées pour être détectables par microscopie à fluorescence.

Avec le dispositif hydrothermal en continu, il a été possible de synthétiser des nanoparticules d'oxydes de fer en conditions hydrothermales (T = 150°C et P = 25 MPa) et en conditions supercritiques (T = 400°C et P = 25 MPa).

En conditions hydrothermale, de la magnétite (δ = 0,02) de taille de cristallites proche de 5 nm et de tailles d'agrégats compris entre 30 et 60 nm a été synthétisée en présence d'un ratio molaire de citrates de 100%. Ces nanoparticules sont, par ailleurs, chargées négativement et donc stabilisées à pH physiologique. Dans cette partie, le citrate a montré une efficacité pour limiter l'oxydation de la magnétite dans ces conditions de hautes températures et de hautes pressions : à la fois par diminution de l'oxydation des ions ferreux mais aussi par chélation empêchant une augmentation de la taille des cristallites et un changement de phase vers l'hématite (α-Fe_2O_3).

Des essais identiques avec du $mPEG_{2000}$-Si n'ont pas permis de stabiliser les nanoparticules d'oxydes de fer mais ont empêché la formation de la phase parasite hématite obtenue sans utilisation de molécule pour modifier la surface.

En conditions supercritiques, les nanoparticules obtenues sans utilisation de base avec un ratio Fe^{II}/Fe^{III} stœchiométrique (1/2) sont majoritairement de l'hématite. Cependant, en augmentant ce ratio (3/0) et en utilisant un ratio citrate/fer de 100% il a été possible d'obtenir majoritairement des grosses particules de magnétite (de tailles supérieures à 300 nm) et des petites de maghémite (de taille proche de 30 nm).

Cette étude a permis de synthétiser en grande quantité des oxydes de fer (6 $g.h^{-1}$) mais les suspensions ne sont pas assez stables pour des études biologiques.

Grâce à la stabilité en conditions physiologiques des nanohybrides synthétisés, principalement ceux obtenus *via* la co-précipitation classique, des essais biologiques ont été réalisés. Dans un premier temps, les interactions de ces nanohybrides avec le vivant ont été évaluées avec des tests de cytotoxicité et d'internalisation. Enfin, les efficacités en tant qu'agents de contraste en IRM i*n vitro* et *in vivo* de ces oxydes de fer ont été mesurées.

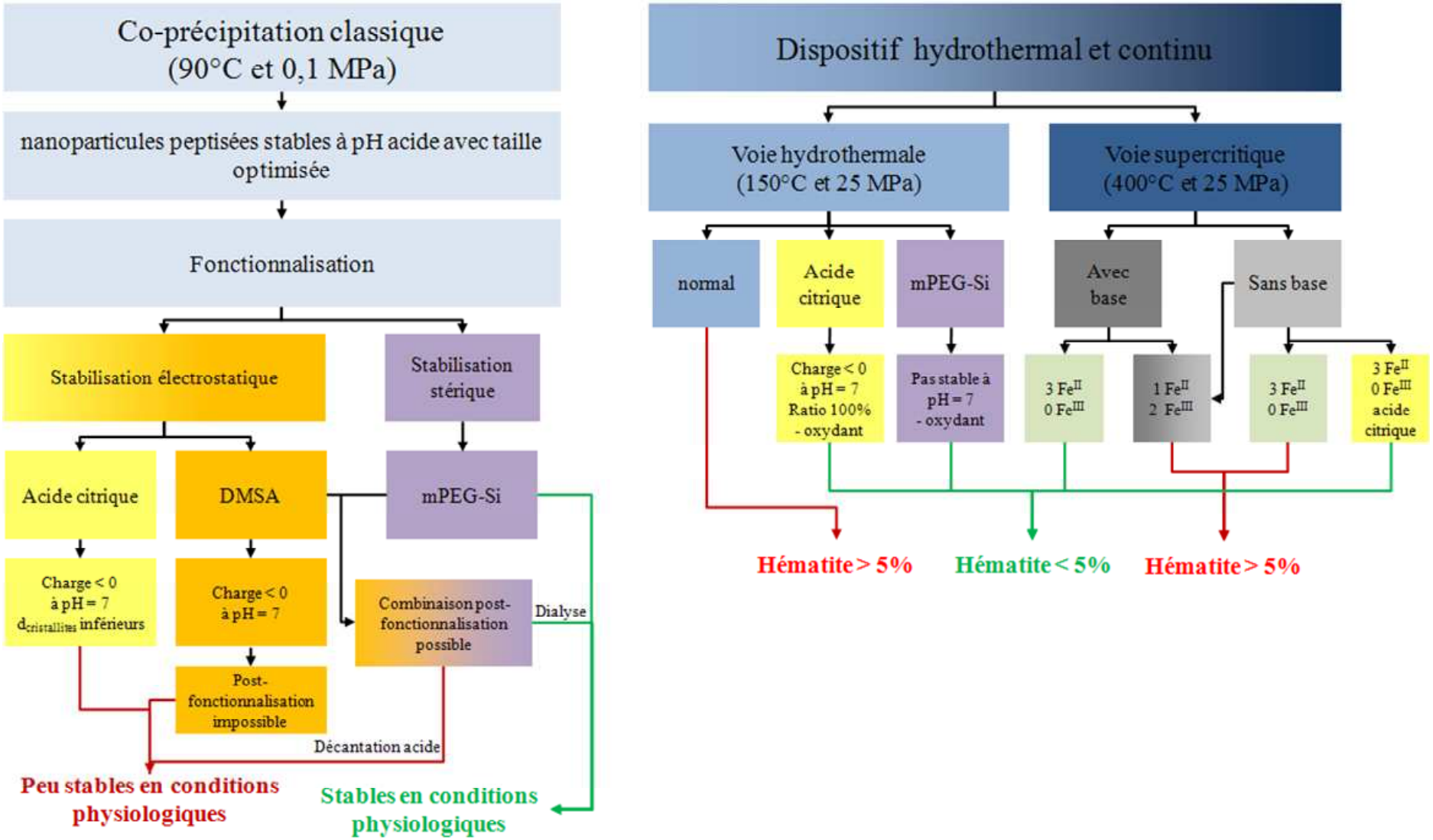


Figure II.4.1 : Schéma récapitulatif des synthèses et des greffages effectués en batch et en voie hydrothermale et continue et résultats obtenus dans ces conditions.

Chapitre III Cytotoxicité, internalisation et efficacité en tant qu'agents de contraste en IRM des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (USPIO)

Les nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées et modifiées en surface par des acides carboxyliques et/ou des polyéthylènes glycol ont été développées comme agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM). A terme, ces particules, après fonctionnalisation par des molécules biologiques ou des protéines, seront utilisées pour le ciblage des pathologies cardiovasculaires. Pour la suite de ce manuscrit, nous utiliserons le terme générique anglo-saxon d'USPIO (Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide) pour désigner nos nanoparticules d'oxyde de fer modifiées en surface. L'USPIO s'oppose au SPIO (SuperParamagnetic Iron Oxide) par des tailles d'agrégats élémentaires inférieures à 50 nm (Zhang *et al.* 2009) comme cela a été le cas dans notre étude. Plus de détails sur les USPIO sont donnés dans la partie I.2.

Pour obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM), les compagnies pharmaceutiques sont soumises à des tests importants sur leurs produits avant d'obtenir ces autorisations[14].

La première étape primordiale après identification d'une nouvelle molécule est son **étude préclinique**. Elle regroupe trois phases consistant à évaluer :

1) La toxicologie (cellulaire, animale et humaine)
2) La pharmacologie expérimentale. Il s'agit d'estimer l'efficacité de la molécule sur des modèles cellulaires puis animaux
3) La pharmacocinétique et le métabolisme. Cette partie porte sur l'évaluation de l'absorption, la biodistribution ou l'élimination des molécules d'intérêts.

Une fois cette étape passée, **la recherche clinique** peut commencer. Il s'agit alors d'étudier l'efficacité, sur des patients, de la molécule ayant été validée lors de la phase préclinique. Elle est divisée en trois phases :

Phase 1. Le médicament est testé sur des patients volontaires et sains avec des doses croissantes pour évaluer le seuil de tolérance de l'organisme à la molécule.

Phase 2. L'efficacité du médicament ainsi que la dose optimale avec le moins d'effets secondaires sont testées sur une petite population de patients hospitalisés.

Phase 3. Cette dernière étape consiste à tester sur une grande population de malades l'efficacité réelle de la molécule et de la comparer aux molécules déjà existantes ou à un placebo.

Une fois toutes ces étapes passées, le médicament obtient son autorisation de mise sur le marché. Le temps minimal pour valider toutes ces étapes est de l'ordre de 10 ans. Ainsi, il est nécessaire de commencer les études précliniques le plus rapidement possible.

Pour répondre à ce cahier des charges, des phases d'évaluation et de pharmacologie expérimentale de nos USPIO ont débuté.

[14] Les phases pour l'accès au marché d'un médicament ont été décrites sur le site Internet de « Les Entreprises du Médicament » LEEM : http://www.leem.org (consulté en août 2010).

Dans ce chapitre, la cytotoxicité des différentes nanoparticules a été estimée sur trois types cellulaires.

Dans un second temps, le pouvoir contrastant de ces nano-objets a été évalué *in vitro* et *in vivo*. L'effet de la modification de surface sur ces résultats a également été étudié.

III.1 La cytotoxicité des nanoparticules synthétisées

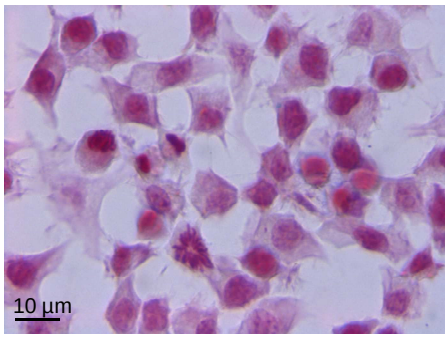
La mise en contact de nanoparticules avec du matériel biologique peut provoquer une toxicité plus ou moins importante. Quand on mesure la toxicité sur des modèles biologiques cellulaires, on parle alors de cytotoxicité. Il est indispensable d'estimer cette cytoxicité sur différents modèles cellulaires avant de passer à l'injection à l'animal (Mahmoudi *et al.* 2009).

III.1.1 Les modèles cellulaires étudiés

L'objectif de ce travail est d'élaborer des agents de contraste en imagerie médicale, principalement en IRM. Ainsi, ces oxydes de fer ne doivent induire qu'une très faible toxicité. Comme vu lors de la partie I.3, les USPIO sont majoritairement des agents de contraste hépatiques. Ils sont également sujets à être internalisés par des cellules du système immunitaire, notamment les macrophages. Des modèles cellulaires, en lien direct avec ces deux phénomènes, ont donc été choisis : des hépatocytes (cellules HepG2) et des macrophages (cellules RAW) auxquels se sont ajoutées des cellules cardiaques (cardiomyocytes) : l'objectif applicatif final de ces nanoparticules étant de cibler des pathologies cardiovasculaires.
Ainsi, trois modèles cellulaires ont été utilisés pour cette étude de toxicité.

III.1.1.1 Les macrophages RAW (TIB-71)

Des macrophages de type RAW 264.7 proviennent de souris leucémiques. Ce sont des cellules adhérentes de lignée établie, c'est-à-dire qu'elles peuvent être cultivées indéfiniment, on parle alors de lignée immortalisée. Elles s'entretiennent deux fois par semaine dans du milieu DMEM[15] à 10% de sérum de veau fœtal avec des antibiotiques. Les cellules RAW ont été utilisées comme modèle *in vitro* pour simuler l'élimination des nanoparticules par le système immunitaire. En effet, les macrophages sont des monocytes dont la fonction est la destruction par ingestion des corps étrangers à l'organisme (communément appelés microorganismes) comme des corps nécrotiques, des bactéries, des poussières ou nos nanoparticules. Ainsi, pour ces cellules en particulier, une recherche d'internalisation des nanoparticules par les macrophages a été effectuée et sera détaillée dans la partie III.1.4.



[15] Le DMEM est un milieu de culture cellulaire composé d'ions minéraux (Na^+,K^+,PO_4^-,Cl^-,Ca^{2+},SO_4^{2-},…) d'acides aminés, de vitamines et de glucose.

Figure III.1.1 : Cliché en microscopie optique de macrophages colorés par du bleu de Prusse Objectif x100

Les macrophages ont donc pour rôle l'élimination des déchets présents dans l'organisme par un procédé de phagocytose, une réponse immunitaire non spécifique[16].
La phagocytose peut être séparée en cinq étapes (Figure III.1.2) :

1) **L'adhésion**. Au cours de cette étape la membrane du macrophage adhère au microorganisme avant ingestion.
2) **L'ingestion**. Le phagocyte émet des pseudopodes qui entourent le microorganisme et forment une vésicule de phagocytose appelée phagosome.
3) **La digestion**. Durant cette étape, des lysosomes[17] fusionnent avec la membrane du phagosome et déversent leurs enzymes qui digèrent le microorganisme. La fusion du lysosome et du phagosome crée un phagolysosome.
4) **L'exocytose**. Les débris sont rejetés en dehors de la cellule.
5) **L'incorporation**. Dans le cas de bactéries, par exemple, le macrophage incorpore à ses molécules CMH[18], des fragments protéiques de l'antigène[19] (appelés déterminants antigéniques). Cette cellule devient alors une cellule présentatrice d'antigènes activant la réponse immunitaire spécifique[20].

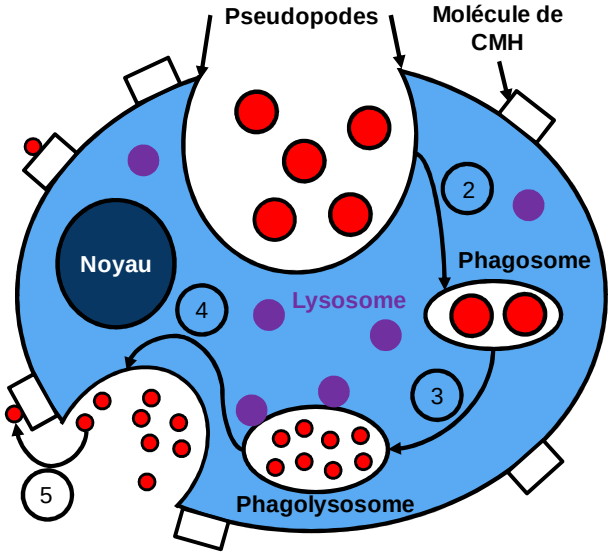


Figure III.1.2 : Schéma des différentes étapes de la phagocytose de corps étrangers (en rouge) dans un macrophage. Après adhésion entre le macrophage et un microorganisme, celui-ci est ingéré par une invagination membranaire dans un phagosome (2). Ce phagosome fusionne ensuite avec des lysosomes (en violet) (3) et les enzymes lysosomales digèrent les microorganismes qui sont rejetés de la cellule par exocytose (4). Une partie des fragments protéiques résidus de digestion est incorporée

[16] La réponse immunitaire non spécifique est la première barrière de défense du corps contre des invasions quelconques. Elle s'attaque à tous les microorganismes sans aucune distinction et est donc rapide et polyvalente.
[17] Les lysosomes sont des organites cellulaires présents dans toutes les cellules eucaryotes animales (sauf chez les hématies) qui comportent des enzymes entrant dans les phénomènes de digestion cellulaire.
[18] De manière très succincte, le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est une molécule présente sur les cellules permettant leur reconnaissance du **soi**. Ce complexe est appelé HLA chez l'être humain.
[19] L'antigène est une macromolécule qui est reconnue par le système immunitaire pour engendrer une réponse immunitaire.
[20] La réponse immunitaire spécifique est basée sur la reconnaissance du non-soi c'est-à-dire des molécules reconnues comme étrangères à l'organisme. Cette réponse est plus lente que la non spécifique et nécessite une reconnaissance préalable de l'agent infectieux mais est spécifique et donc adaptée à chacun et peut devenir plus rapide et plus intense grâce à sa faculté de mémoire.

aux molécules CMH pour créer une cellule présentatrice d'antigènes pour des réponses immunitaires spécifiques (5).

III.1.1.2 Les cellules hépatiques HePG2 (HP-8065)

Les cellules hépatiques de type HepG2 proviennent de carcinomes de foie humain. Comme pour les RAW, ces cellules sont adhérentes et de lignée établie. Leur entretien est identique à celui des macrophages. Ces cellules ont été utilisées comme modèle pour la recherche de toxicité hépatique. Les oxydes de fer nanométriques commerciaux (Bourrinet *et al.* 2006) se dirigent majoritairement vers le foie une fois le produit injecté et créent ainsi un contraste au niveau de cet organe. Avec ce modèle, des études d'internalisation de nos nanoparticules ont également été réalisées.

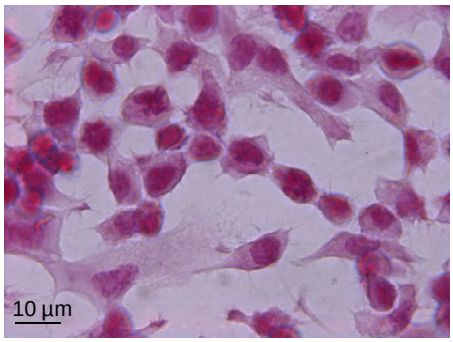


Figure III.1.3 : Cliché en microscopie optique de cellules hépatiques colorées par du bleu de Prusse. Objectif x100

III.1.1.3 Les cardiomyocytes

Les cardiomyocytes (CM) sont des cellules adhérentes de cœur de rats nouveau-nés. Elles sont post-mitotiques différenciées c'est-à-dire qu'elles ne prolifèrent pas de manière infinie. Les CM sont ensemencés dans du milieu HAM[21], avec 20% de sérum de veau fœtal, des antibiotiques et un supplément de chlorure de calcium (0,5% d'une solution à 27 $mg.mL^{-1}$). Ces cellules ont la capacité d'avoir un automatisme propre (battement) permettant de modéliser le comportement d'un cœur de rat adulte. Pour des applications ultérieures dans le domaine cardiovasculaire, les CM sont un bon modèle pour regarder leur comportement vis-à-vis de l'injection d'un corps étranger comme nos nanoparticules. Ainsi, la cytotoxicité des USPIO ainsi que leur internalisation par les CM ont été étudiées.

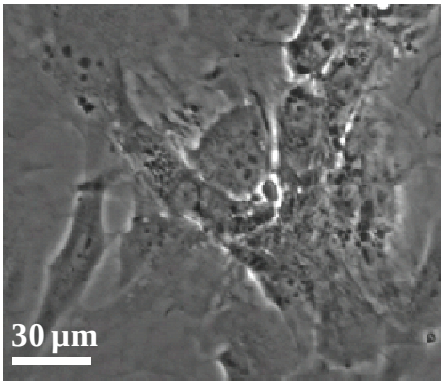


Figure III.1.4 : Cliché par microscopie en contraste de phase d'un cardiomyocyte de rat nouveau-né.

[21] Le HAM est un milieu de culture cellulaire composé comme le DMEM d'ions minéraux (Na^+,K^+,PO_4^-,Cl^-, Ca^{2+},SO_4^{2-+},…) d'acides aminés, de vitamines et de glucose. Le HAM possède plus d'acides aminés non essentiels que le DMEM.

III.1.1.4 Conclusion sur les modèles cellulaires étudiés

Pour tous les essais biologiques *in vitro*, des cellules adhérentes ont été utilisées. Elles présentent l'avantage d'être plus facile à manipuler que les cellules suspensives pour changer les milieux de culture (notamment lors des tests de cytotoxicité) et de reproduire les interactions existantes entre les cellules dans l'organe.

Ces cellules poussant en monocouche, tous les tests ont été réalisés à 70-80 % de confluence[22]. Les doses utilisées lors de l'administration d'agents de contraste ou de médicaments sont classiquement données en quantité de matière par unité de volume ou de masse. Pour nos essais *in vitro*, les cellules étant adhérentes, nous avons ramené ces doses **en quantité de matière par unité de surface**. L'hypothèse principale retenue est que toutes ces cellules croissent en monocouche et ainsi, qu'il est plus judicieux d'exprimer nos résultats (en vue de comparaison avec la littérature) par rapport à la surface de cellules et par rapport au volume total de milieu utilisé. En effet, le volume est fixé par l'utilisateur, il peut donc varier d'une expérience à l'autre et ainsi donner des résultats différents alors que la surface de cellules reste fixe dans des boîtes de culture de même diamètre permettant une meilleure reproductibilité des mesures. En effet, en raisonnant sur une quantité de matière par unité de volume, le nombre réel d'USPIO en contact avec les cellules pourrait énormément changer, les nanoparticules proches de la surface de croissance des cellules pouvant uniquement interagir avec ces dernières.

III.1.2 Comparaison avec un agent commercial : le Cliavist®

Pour tous les essais biologiques réalisés durant cette étude, il a été nécessaire de choisir un produit de contraste comme référence. Notre choix s'est porté sur le Cliavist® (aussi appelé Resovist® ou Ferucarbotran) qui est un agent de contraste pour l'IRM à base d'oxyde de fer enrobé dans du carboxydextran de la société Bayer-Schering. Ce produit a remplacé au sein du CHU de Dijon l'Endorem®, produit de contraste à base d'oxyde de fer de la société Guerbet, utilisé jusqu'à fin 2008. Le Cliavist® est un produit principalement utilisé au sein du service d'imagerie du CHU de Dijon pour le contraste du foie. En effet, l'accumulation de ce produit est majoritairement hépatique (80% de la dose injectée est retrouvée dans cet organe), un peu au niveau de la rate (8 à 9% de la dose injectée) et les 10% restants se répartissent dans divers organes (cœur, poumons, reins,…) (Reimer *et al.* 2003).

Ce produit se rapproche de nos USPIO par sa composition mais également par sa morphologie. En effet, le Cliavist® est composé de nanoparticules d'oxyde de fer de composition comprise entre la magnétite (Fe_3O_4) et la maghémite (γ-Fe_2O_3) de diamètres hydrodynamiques d'environ 62 nm en moyenne. Les cristallites quant à elles sont de 4,2 nm (mesurées par comptage en microscopie électronique (Reimer *et al.* 2003)) et l'ensemble des nanoparticules de ce produit est relativement identique à nos USPIO morphologiquement (Figure III.1.5). La différence principale entre nos produits de contraste et le Cliavist® est donc la modification de surface.

[22] On parle de 100% de confluence quand les cellules ont recouvert entièrement la surface de la boîte de Petri permettant leur culture.

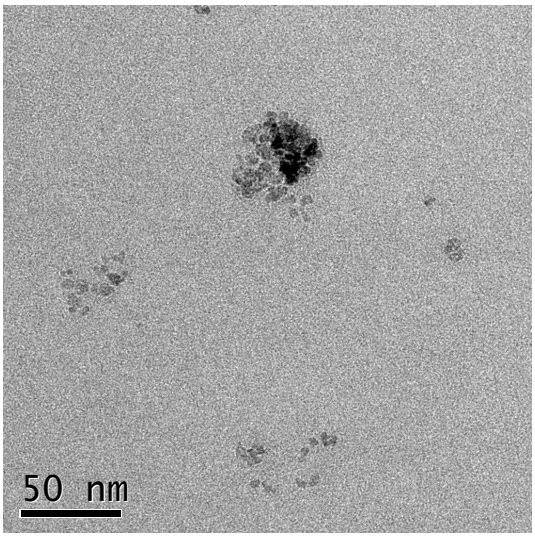


Figure III.1.5 : Cliché MET des nanoparticules de Cliavist®

La modification de surface du Cliavist® est faite à partir de carboxydextran (composé de mannitol et d'acide lactique) dans une proportion massique par rapport au fer de un pour un. Dans notre cas, nous avons utilisé des polymères hydrophiles et/ou des acides carboxyliques. L'enjeu a donc été de voir si cette modification de surface influençait la toxicité et le pouvoir contrastant de nos USPIO.

Pour finir sur les propriétés du Cliavist®, sa concentration est de 0,5 mmol de fer/mL. La posologie recommandée est de 0,45 mmol de fer soit 0,9 mL de produit pour des patients de moins de 60 kg et de 0,7 mmol de produit soit 1,4 mL de Cliavist® pour les patients de plus de 60 kg (Schering 2003). Ainsi, la dose maximale injectée aux patients humains peut être ramenée à **12 µmoles de fer par kg**.
Le Cliavist® a été utilisé comme référence lors de l'étude biologique.

III.1.3 La mesure de la viabilité cellulaire (le test MTT)

En premier lieu dans cette étude biologique, il a été nécessaire d'évaluer la cytotoxicité des nanoparticules synthétisées sur les trois modèles cellulaires décrits.
Le test de mesure de viabilité retenu a été le test MTT.
Les USPIO choisis pour cette étude ont été[23] :

- USPIO seuls
- USPIO fonctionnalisés par du $mPEG_{2000}$-Si
- USPIO fonctionnalisés par du $mPEG_{5000}$-Si
- USPIO fonctionnalisés par du $mPEG_{2000}$-Si et du DMSA
- USPIO fonctionnalisés par du $mPEG_{5000}$-Si et du DMSA

Les cytotoxicités de toutes ces nanoparticules ont été comparées à celle du Cliavist®.

[23] Des essais avec des USPIO fonctionnalisés par l'acide citrique, le DMSA et/ou par le $mPEG_{550}$ ont été également réalisés mais la faible stabilité des ces suspensions n'a pas permis une bonne exploitation de ces résultats. Les USPIO synthétisés dans le dispositif hydrothermal en continu n'ont également pas été testés faute de temps.

III.1.3.1 Principe du test MTT et conditions opératoires

III.1.3.1.1 Principe du test MTT

Le test MTT est un test indirect de la viabilité cellulaire qui mesure l'activité métabolique mitochondriale de la cellule à l'aide d'un produit, le MTT ou bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium). Ce produit jaune est transformé en formazan violet-marron par la chaîne respiratoire des mitochondries. Plus le métabolisme cellulaire est élevé, plus la quantité de MTT métabolisée est importante et donc la coloration marron est intense. Par mesure colorimétrique d'absorbance à 570 nm par rapport à des contrôles, il est possible d'estimer le pourcentage de cellules métaboliquement actives et d'exprimer cette viabilité en pourcentage. La valeur de 100% est prise pour des cellules témoins n'ayant pas été en contact avec des USPIO. Nous avons considéré comme toxiques toutes valeurs inférieures à 80% significativement différentes du contrôle. Pour certaines valeurs supérieures à 120% significativement différentes, des hypothèses ont été avancées.

III.1.3.1.2 Conditions de mesure de la viabilité cellulaire

Cette étude de cytotoxicité a été faite parallèlement à l'estimation du pouvoir contrastant en IRM de ces USPIO *in vivo* chez un modèle animal murin. Les conditions *in vitro* ont donc été déterminées en fonction des paramètres et des conditions de l'étude IRM (partie III.2).

Ainsi, les tests de cytotoxicité ont été réalisés 1 heure, 3 heures et 24 heures après mise en contact avec les cellules. Des mesures à 72 heures ont été réalisées en plus *in vitro* pour évaluer la toxicité à plus long terme.

Les concentrations ont été retenues en fonction de la dose de nanoparticules injectée aux souris lors de l'étude IRM. La dose choisie a été de **100 µmoles de fer par kg de souris**[24] soit huit fois supérieure à la dose maximale recommandée pour l'homme (12 µmoles de fer/kg : partie III.1.2). En considérant la masse d'une souris à 30 grammes et le volume sanguin d'une souris à 2 mL, la concentration totale de fer injectée par souris était de **80 μg_{Fe}/mL de sang**.

Les plaques utilisées pour les tests MTT étaient des plaques 96 puits de surface 0,32 cm². Le volume de mise en contact des USPIO sur les cellules est de 100 µL. Ainsi, pour être identique à la dose injectée à la souris, la concentration de fer à mettre dans chaque puits est de 8 μg_{Fe} soit **25 μg_{Fe}/cm²** dans du sérum physiologique (pH = 7,4 et 0,15 M de NaCl). Nous avons donc estimé la cytotoxicité des nanoparticules d'oxydes de fer à cette concentration en fer et à des concentrations environ quatre fois inférieures et deux fois supérieures soit **6 μg_{Fe}/cm²** et **50 μg_{Fe}/cm²**.

III.1.3.2 Etude de la cytotoxicité induite par les oxydes de fer seuls et les polymères seuls

Le nombre de mesures réalisées pour chaque type cellulaire est très important (4 temps et 3 concentration avec n = 4 à 8 pour chaque condition). Pour offrir une meilleure lisibilité, les résultats obtenus pour tous les temps et toutes les concentrations étudiés sont présentés uniquement pour le modèle des cellules RAW (macrophages). Pour les deux autres types cellulaires, seuls les résultats pour les fortes concentrations (50 μg_{Fe}/cm²) sont présentés et comparés à ceux obtenus sur les macrophages (aucune toxicité n'a été observée pour les deux autres concentrations 6 et 25 μg_{Fe}/cm²).

[24] Voir la partie III.2.2.1.2 pour plus de détails sur le choix de cette valeur.

Avant de tester les nanoparticules modifiées en surface, les cytotoxicités des oxydes de fer seuls et des mPEG seuls (2000 et 5000 $g.mol^{-1}$) ont été évaluées.

III.1.3.2.1 Cytotoxicité des oxydes de fer seuls

Pour les oxydes de fer, les concentrations retenues ont été 6, 25 et 50 $\mu g_{Fe}/cm^2$.
Les viabilités des cellules RAW par rapport au contrôle[25] pour ces trois concentrations à 1, 3, 24 et 72 heures sont données dans la Figure III.1.6.

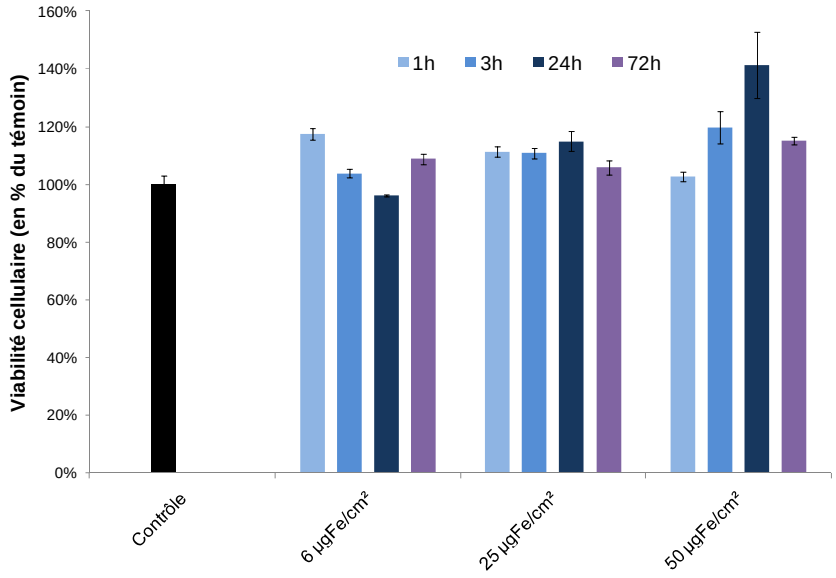


Figure III.1.6 : Mesure de la viabilité cellulaire des macrophages de type RAW à différentes concentrations de nanoparticules d'oxyde de fer pour quatre temps d'incubation. Les résultats sont donnés en pourcentage par rapport à la viabilité du contrôle (n = 6 sur deux expériences indépendantes).

Les oxydes de fer seuls ne semblent pas induire de cytotoxicité sur les cellules RAW quels que soient les temps d'incubation et les concentrations utilisés, les viabilités cellulaires étant toutes proches de 100%.
Aux incertitudes près, les valeurs de viabilités cellulaires sont également inférieures à 120% et ne sont pas significativement différentes du contrôle. Il faut cependant noter que plus la concentration de nanoparticules utilisée est élevée, plus la viabilité est supérieure à 100%. Cette observation pourrait s'expliquer, non pas par une prolifération des cellules mais par l'influence de l'absorbance des oxydes de fer sur la mesure optique du test MTT. En effet, plus les concentrations des nanoparticules sont importantes, plus elles fausseraient les résultats de toxicité. Cependant, cette « déviation » ne masque pas une toxicité potentielle car lorsqu'une condition est toxique, les pourcentages de viabilité obtenus sont bien en-deçà de 80% quelle que soit la quantité d'USPIO mise en contact sur les cellules.

Le protocole du test MTT (Annexe A.7) nécessite d'éliminer le milieu de culture avant d'ajouter le réactif MTT et donc par la même occasion d'éliminer les nanoparticules présentes en suspension. Cependant, les oxydes de fer « collés » à la surface des cellules ou ayant sédimentées par agglomération en conditions physiologiques pourraient augmenter artificiellement l'absorbance et donc la viabilité cellulaire et ceci de manière d'autant plus importante que la proportion de particules non éliminée était importante.

[25] Le contrôle correspond aux cellules étudiées dans leur milieu sans nanoparticules.

Une autre possibilité pourrait être l'internalisation d'une partie des USPIO par les cellules, notamment dans les macrophages. Cette internalisation a nécessairement « coloré » les cellules et ainsi augmenté aussi la valeur de la viabilité par rapport aux cellules témoins. Ainsi, si on mesure dans les mêmes conditions l'absorbance des USPIO seuls pour des concentrations varient de 5 à 50 $\mu g_{Fe}/cm^2$, l'absorbance varie de 0,19 à 0,67 u.a. alors que les absorbances typiques mesurées lors des tests MTT varient de 0,2 à 0,7 u.a. suivant les cellules utilisées.

Il serait donc judicieux d'éliminer l'absorbance due aux oxydes de fer mais il est difficile de connaître en quelle proportion elles sont réellement présentes. En effet, pour un type cellulaire donné, la quantité d'USPIO non éliminée lors du lavage devrait évoluer en fonction du temps que mettraient les nanoparticules à sédimenter ou à être internalisées. Pour ces raisons, les valeurs de viabilité très nettement supérieures à 100% ont été conservées mais des clichés en microscopie optique et électronique (MET) de cellules en contact avec des USPIO ont été effectués dans la partie III.1.4 pour détailler et approfondir ces hypothèses d'internalisation.

Ces observations de viabilités très nettement supérieures à 100% pour les oxydes de fer seuls ont été particulièrement flagrantes pour les cellules hépatiques HepG2 (Figure III.1.7).

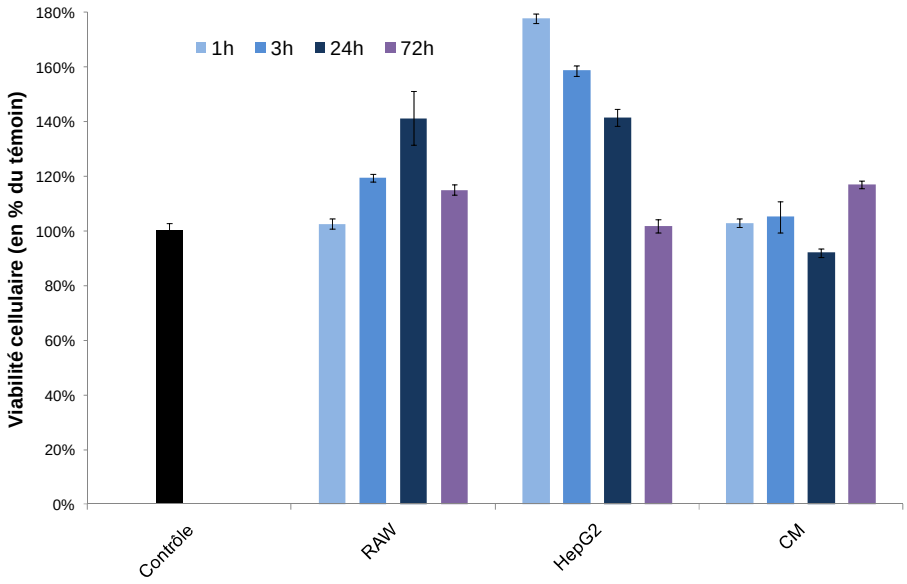


Figure III.1.7 : Mesure de la viabilité cellulaire des macrophages de type RAW, des cellules hépatiques de type HepG2 et des cardiomyocytes (CM) à 50$\mu g_{Fe}/cm^2$ de nanoparticules d'oxyde de fer pour quatre temps d'incubation. Les résultats sont donnés en pourcentage par rapport à la viabilité du contrôle (avec respectivement pour les RAW, HePG2 et les CM : n = 6 ; 2 expériences, n = 4 ; une expérience et n = 4 ; une expérience).

Les valeurs de viabilité sont toutes supérieures à 80% et non significativement différentes signifiant que les oxydes de fer seuls ne semblent pas induire de toxicité sur les trois types cellulaires de l'étude. En revanche, pour les hépatocytes, les viabilités très nettement supérieures à 100% traduisent le problème d'interférence de mesures optiques probablement causé par la trop grande quantité d'USPIO présents sur les cellules après lavage ou internalisés par les cellules.

Pour conclure sur ces premiers résultats de cytotoxicité des USPIO nus, ces-derniers ne semblent pas induire de toxicité mais leur déstabilisation en conditions physiologiques entraîne probablement une surévaluation de la mesure d'absorbance. Il aurait été envisageable

de soustraire l'absorbance des USPIO seuls à l'absorbance des cellules avec le réactif MTT et les oxydes de fer mais il n'a pas été possible de connaître la quantité exacte de particules restant après rinçage du milieu de culture. Cette incertitude nous a fait éliminer cette possibilité et « simplement » supposer que toutes viabilités supérieures à 80% permettaient de conclure quant à une absence de cytotoxicité pour le produit étudié. Cependant, les observations en microscopie de cellules mise en contact avec nos USPIO ont été réalisées pour appuyer cette hypothèse. Les résultats seront présentés en fin de cette partie après les mesures de cytotoxicité (partie III.1.4). Quoi qu'il en soit, il est clair que cette méthode d'évaluation de la cytotoxicité des nanoparticules n'est pas optimale. Il est difficile de trouver un test permettant de s'affranchir des interactions des nano-objets sur les mesures (Dobrovolskaia *et al.* 2009) et sa découverte reste un enjeu important.

III.1.3.2.2 Cytotoxicité des PEG seuls

Après avoir évalué la non-toxicité des USPIO nus, la cytotoxicité des polymères de masses moléculaires 2000 et 5000 $g.mol^{-1}$ a été évaluée. Pour éviter une quelconque réactivité des fonctions éthoxysilanes avec les cellules, la cytotoxicité de ces polymères a été effectuée sur les mPEG non greffés à l'ICPTES.

Leurs concentrations ont été ramenées en µgPEG/cm² par rapport aux pertes de masses obtenues par ATG dans la partie II.2.2.2.4 pour que la quantité de PEG par rapport à celle du fer par nm² soit identique à un USPIO greffé avec ce polymère.
Leurs concentrations sont données dans le Tableau III.1.1.

Produit	**Concentration a (µg/cm²)**	**Concentration b (µg/cm²)**	**Concentration c (µg/cm²)**
USPIO seuls	6	25	50
$mPEG_{2000}$ seul	14	56	112
$mPEG_{5000}$ seul	63	252	504

Tableau III.1.1 : Concentrations de mPEG calculées à mettre en contact avec les cellules pour être équivalent à un UPSIO greffé par ces mPEG aux concentrations a, b et c en $\mu g_{Fe}/cm^2$.

La Figure III.1.8 résume les valeurs de viabilités cellulaires des RAW incubés avec du $mPEG_{2000}$ et du $mPEG_{5000}$.

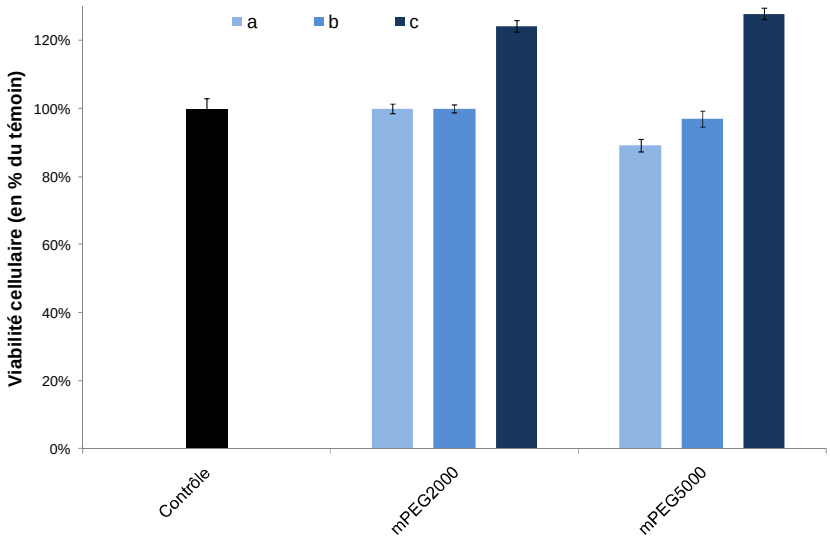


Figure III.1.8 : Mesure de la viabilité cellulaire des macrophages de type RAW à des concentrations de $mPEG_{2000}$ et $mPEG_{5000}$ respectivement de a : 14 et 63 $\mu g_{PEG}/nm^2$; b : 56 et 252 $\mu g_{PEG}/nm^2$; c : 112 et 504 $\mu g_{PEG}/nm^2$ à quatre temps d'incubation. Les résultats sont donnés en pourcentage par rapport à la viabilité du contrôle (n=6 sur deux expériences indépendantes).

Les premiers résultats ne montrent pas de toxicité apparente des deux mPEG sur les RAW quels que soient les temps ou les concentrations. Nous obtenons le même résultat pour les deux autres modèles cellulaires étudiés que ce soit pour le $mPEG_{2000}$ (Figure III.1.9) ou pour le $mPEG_{5000}$ (Figure III.1.10)

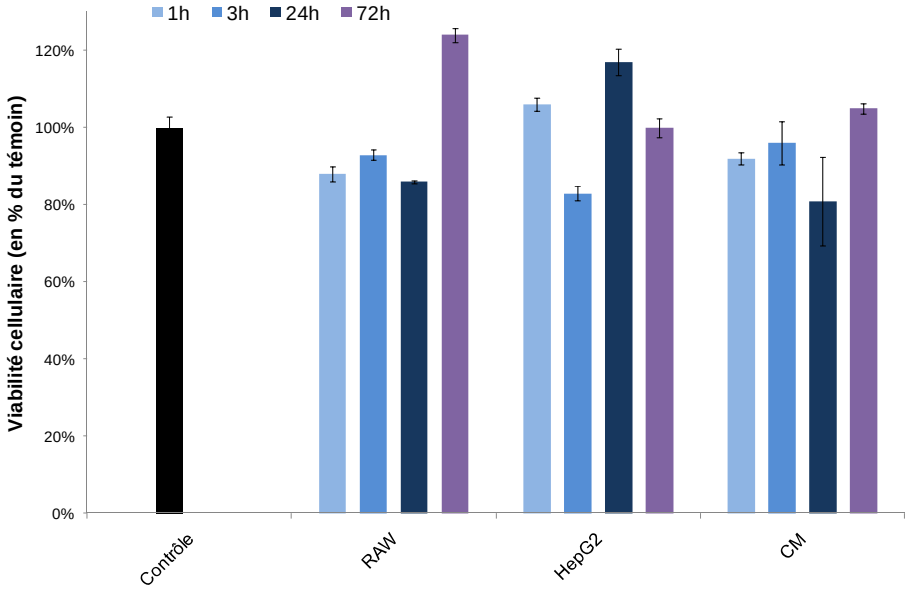


Figure III.1.9 : Mesure de la viabilité cellulaire des macrophages de type RAW, des cellules hépatiques de type HepG2 et des cardiomyocytes (CM) à 112 $\mu g_{PEG}/cm^2$ de $mPEG_{2000}$ pour quatre temps d'incubation. Les résultats sont donnés en pourcentage par rapport à la viabilité du contrôle (avec respectivement pour les RAW, HePG2 et les CM : n = 6,2 expériences, n = 4, une expérience et n = 4, une expérience).

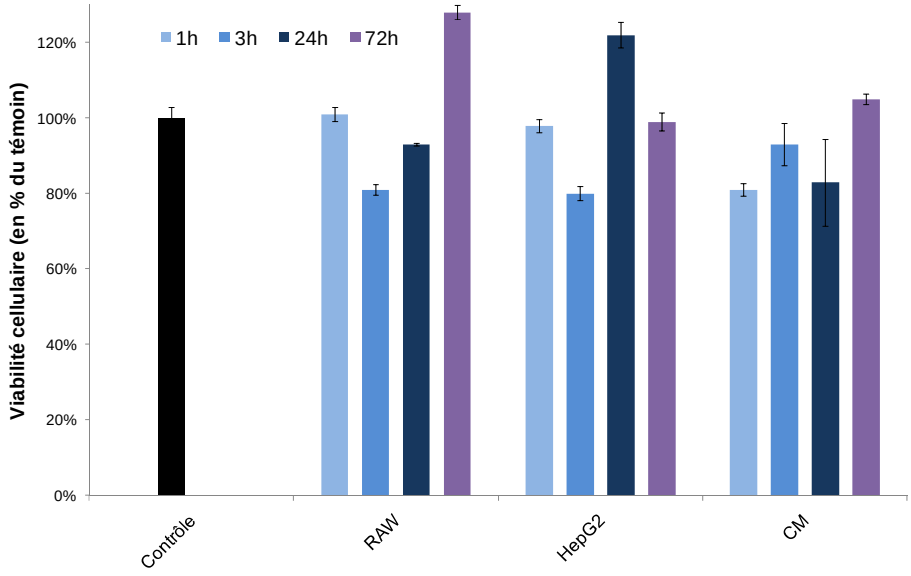


Figure III.1.10 : Mesure de la viabilité cellulaire des macrophages de type RAW, des cellules hépatiques de type HepG2 et des cardiomyocytes (CM) à 504 µg_{PEG}/cm² de mPEG_{5000} pour quatre temps d'incubation. Les résultats sont donnés en pourcentage par rapport à la viabilité du contrôle (avec respectivement pour les RAW, HePG2 et les CM : n = 6,2 expériences, n = 4, une expérience et n = 4, une expérience).

En conclusion, ces résultats montrent que les mPEG ne sont pas toxiques et ce, sur trois lignées cellulaires différentes, résultat attendu au vu de la non toxicité de ce polymère (Mornet *et al.* 2006).

Après cette étude préliminaire, les viabilités des cellules mises en contact avec des USPIO modifiés en surface ont été évaluées.

III.1.3.3 Etude de la cytotoxicité induite par les oxydes de fer modifiés par du PEG et/ou du DMSA

Dans cette partie, seuls les résultats obtenus pour les macrophages ont été présentés, sachant que ceux obtenus pour les hépatocytes et les cardiomyocytes sont équivalents.

Les viabilités cellulaires des RAW ont été mesurées après incubation avec des USPIO seuls, du Cliavist®, des USPIO greffées par du mPEG_{2000}, du mPEG_{5000}, du mPEG_{2000}-DMSA ou du mPEG_{5000}-DMSA. Les résultats sont donnés dans la Figure III.1.11.

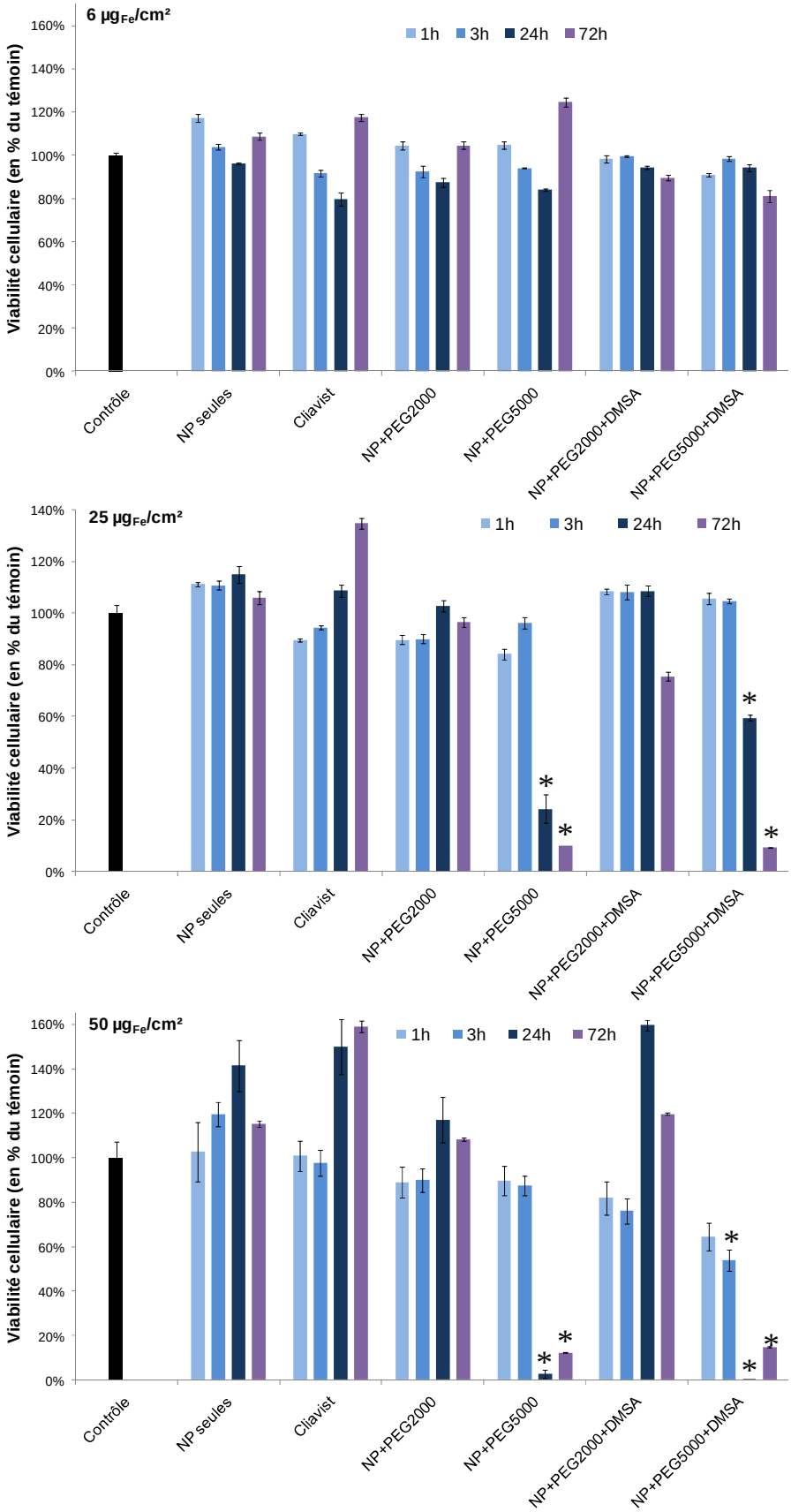


*Figure III.1.11 : Mesures de la viabilité cellulaire des macrophages de type RAW pour différents USPIO comparés au Cliavist® et ce, pour trois concentrations et quatre temps d'incubation. Les résultats sont donnés en pourcentage par rapport à la viabilité du contrôle (n = 6). * : différences significatives à p < 0,05.*

A l'exception des USPIO avec du $mPEG_{5000}$, les nanoparticules testées n'ont pas présenté de toxicité sur les cellules RAW, les cellules hépatiques et les cardiomyocytes. Comme précédemment observé pour les USPIO nus, des viabilités supérieures à 100% sont retrouvées pour les RAW et les HepG2 notamment pour les USPIO-$mPEG_{2000}$ + DMSA et le Cliavist®. Là encore une interférence des USPIO dans le dosage MTT est probable.

En premier lieu, ces augmentations sont d'autant plus importantes que le temps de contact et/ou la concentration de produit utilisée sont élevés.
Là encore, deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces différences :

1) L'agglomération des USPIO influencerait le test MTT. Les viabilités sont supérieures à 120% dans le cas de nanoparticules peu stables dans les conditions de mesure (USPIO seuls et USPIO-$mPEG_{2000}$ + DMSA lavés par décantation acide). Ainsi, plus le temps d'incubation ou la concentration sont élevés, plus la proportion de nanoparticules ayant sédimenté et ne pouvant donc être éliminée lors du lavage augmenterait.
2) Une deuxième hypothèse serait l'internalisation de ces oxydes de fer principalement par les macrophages. En effet, pour ce type cellulaire, les mesures de viabilité augmentent même dans le cas du Cliavist® et sont supérieures à celles obtenues dans le cas des cellules hépatiques ou des cardiomyocytes. Cette observation pourrait s'expliquer par la phagocytose d'une partie des USPIO dans les RAW augmentant ainsi plus l'absorbance mesurée avec ce modèle cellulaire. Là aussi, l'augmentation de la concentration en nanoparticules ou du temps de mise en contact a fait croître artificiellement la mesure de viabilité.

Pour comprendre ces deux phénomènes, une observation de ces systèmes par microscopie optique et par MET sera présentée partie III.1.4.

Au niveau de la toxicité des USPIO pegylés par le $mPEG_{5000}$, la Figure III.1.12 résume l'augmentation de la toxicité des USPIO-$mPEG_{5000}$ en fonction du temps d'incubation. Les tendances de ces résultats sont identiques à ceux obtenus pour les USPIO-$mPEG_{5000}$ plus DMSA.

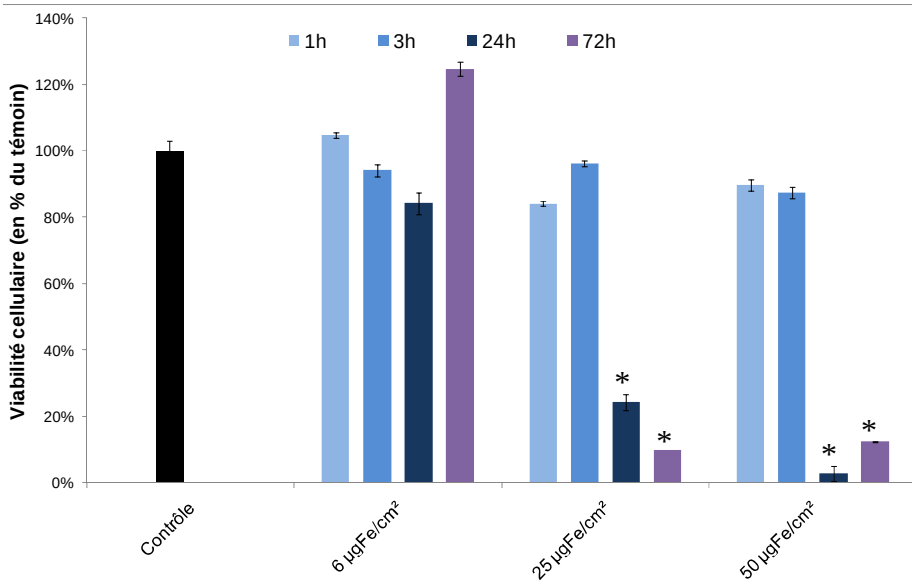


*Figure III.1.12 : Mesure de viabilité cellulaire des macrophages de type RAW à trois concentrations d'USPIO-$mPEG_{5000}$ et à quatre temps d'incubation différents (n=6). Les résultats sont donnés en pourcentage par rapport à la viabilité du contrôle. * : différences significatives à $p < 0,05$.*

Pour la plus faible concentration, les USPIO-mPEG$_{5000}$ ne semblent pas induire de toxicité. En revanche, pour les concentrations plus élevées, la toxicité croît en fonction du temps d'incubation. Ces résultats ont été assez surprenants au vu des valeurs de toxicité préliminaires (partie III.1.3.2). En effet, ni les USPIO nus, ni le mPEG$_{5000}$ n'étaient toxiques. De plus, le PEG, notamment le PEG$_{5000}$, a été choisi car, d'après la littérature, il rend les particules peu toxiques une fois greffé à la surface des USPIO (Gupta *et al.* 2004).

C'est lors de l'analyse des USPIO pegylés (partie II.2.2.2.4.3) qu'une hypothèse a émergé. La présence d'étain lors des analyses XPS sur les USPIO-mPEG$_{5000}$ avec ou sans DMSA a montré la présence probable de résidus du catalyseur utilisé lors de la synthèse du mPEG$_{5000}$-Si : le DBTL. Ce produit étant extrêmement toxique pour l'environnement et le vivant, il est vraisemblablement responsable de la perte de viabilité des cellules mises en contact avec les USPIO pegylés. Pour éviter ces problèmes, il sera nécessaire de synthétiser de nouveau du mPEG$_{5000}$-Si en l'absence de ce dernier (expérience en cours).

III.1.3.4 Conclusions sur la toxicité des USPIO

Lors de cette étude, il est apparu que les nanoparticules d'oxydes de fer nues ou modifiées en surface ne présentent pas de toxicité sur les modèles cellulaires de macrophages, de cellules hépatiques ou des cardiomyocytes. Seuls les USPIO pegylés avec du mPEG$_{5000}$ ont montré une très forte toxicité 24 heures après incubation sans doute due à la présence du catalyseur DBTL utilisé pendant la silanisation de ce polymère. De nouvelles synthèses seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Par le test MTT, des valeurs de viabilité très nettement supérieures au contrôle ont été observées. Ces résultats sont plus flagrants dans le cas des cellules RAW ce qui laisserait supposer que les nanoparticules seraient internalisées en plus grande quantité par les macrophages que par les deux autres types cellulaires. L'internalisation de ces nano-objets par les cellules a pu augmenter artificiellement la valeur d'absorption optique et donc donner des valeurs de viabilité supérieures à 100-120%. L'état d'agglomération a aussi pu jouer un rôle dans ces résultats, les particules déstabilisées pouvant décanter et se coller sur les cellules et ainsi ne pas avoir été éliminées lors du rinçage du milieu avant ajout du réactif MTT. Pour corroborer ces deux hypothèses, des clichés en microscopie optique ont été réalisés sur les trois types cellulaires incubés par des USPIO et des clichés en microscopie électronique ont été effectués sur les RAW.

III.1.4 Observations en microscopie des USPIO incubés dans les trois types cellulaires de l'étude

Pour comprendre les interférences observées lors de l'étude de toxicité, des images en microscopie optique des trois types cellulaires incubés avec des USPIO colorés au bleu de Prusse ont été effectuées. Pour corroborer les résultats obtenus, des observations en microscopie électronique en transmission sur les macrophages ont également été réalisées.
Les cellules ont été incubées pendant 1 et 3 heures avec 25 $\mu g_{Fe}/cm^2$ de différents USPIO, soit la concentration utilisée lors des essais en IRM. C'est d'ailleurs à partir de cette concentration, que les oxydes de fer semblent commencer à influencer les valeurs de viabilité. Seuls les résultats obtenus après 3 heures d'incubation seront présentés.

III.1.4.1 Détection des USPIO dans des cellules en microscopie optique par révélation au bleu de Prusse

Pour cet essai, les trois types cellulaires ont été incubés 1 heure et 3 heures avec du Cliavist®, des USPIO nus et des USPIO modifiés en surface par du mPEG$_{2000}$ avec ou sans

DMSA dans des concentrations de 25 $\mu g_{Fe}/cm^2$. Les USPIO avec du $mPEG_{5000}$ ont été éliminés car leur toxicité a été avérée lors des études de viabilités cellulaires.

Les cellules ont ensuite été traitées par le bleu de Prusse. Un mélange d'acide chlorhydrique (HCl) et de ferrocyanure de potassium ($K_4Fe^{II}(CN)_6$, $3H_2O$) va réagir au contact du fer des nanoparticules. L'acide chlorhydrique dissout une partie des oxydes de fer libérant des fer (III). Le ferrocyanure de potassium va réagir avec ces fer (III) et former du bleu de Prusse communément appelé Perl's Prussian Blue ($Fe^{III}_4[Fe^{II}(CN)_6]_3$). Cette méthode est souvent utilisée pour révéler la présence d'USPIO dans des cellules ou des tissus (Magnitsky *et al.* 2005; Hauger *et al.* 2006; Ju *et al.* 2006; Tallheden *et al.* 2006; He *et al.* 2007; Liu *et al.* 2007).

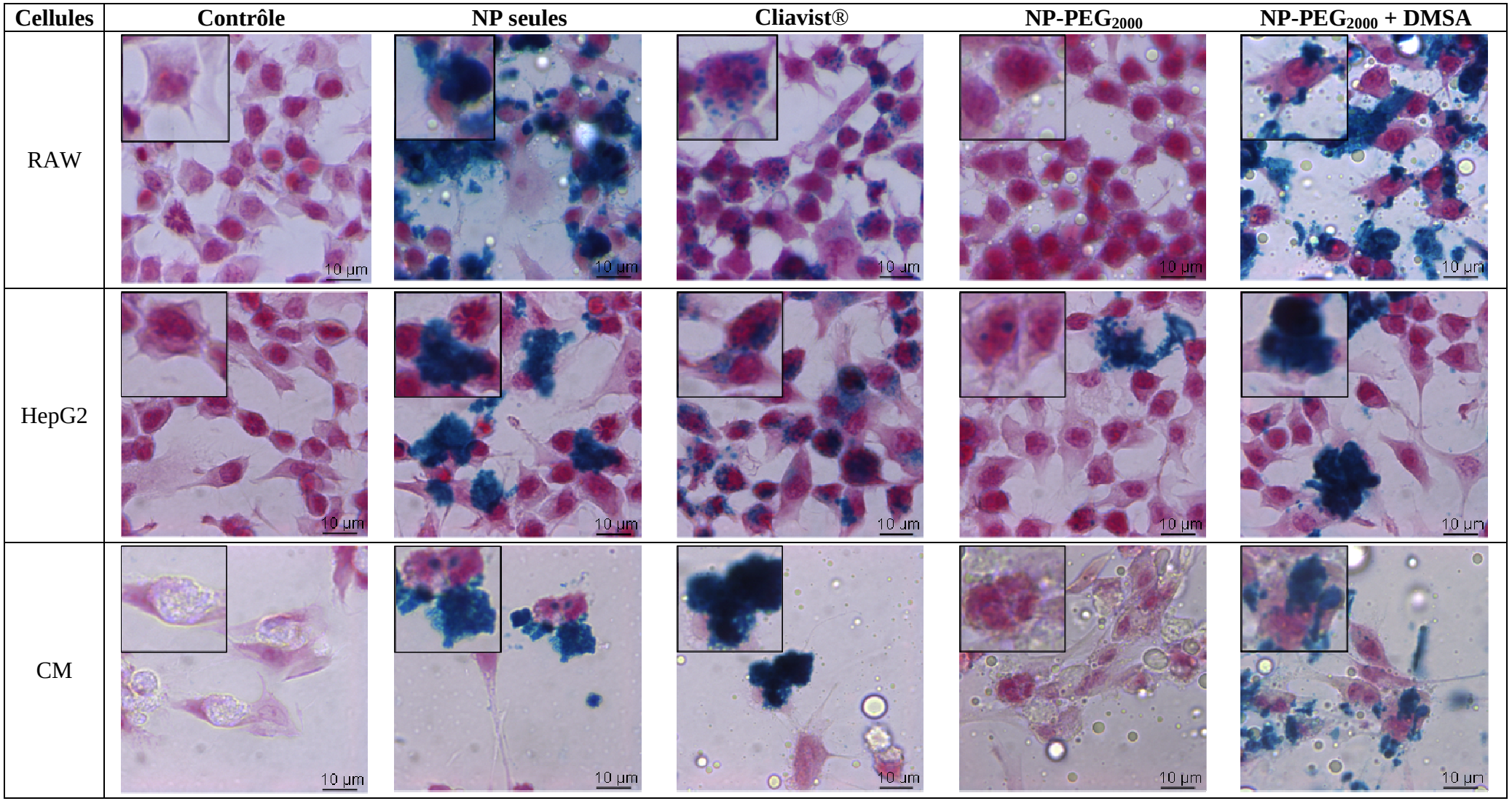


Figure III.1.13 : Observations en microscopie optique de trois types cellulaires (RAW, HepG2 et CM) incubés 3 heures avec des nanoparticules nues, du Cliavist®, des nanoparticules greffées avec du $mPEG_{2000}$ et des nanoparticules greffées avec du $mPEG_{2000}$ et du DMSA à 25 $\mu g_{Fe}/cm^2$. L'encart en haut à gauche est un grossissement d'une des cellules de l'image. Les taches bleues représentent les USPIO révélés par le bleu de Prusse. Les disques blancs sont des bulles formées lors de la préparation des lamelles de microscopie. Objectif x100.

La Figure III.1.13 montre du fer complexé en bleu de Prusse permettant de révéler la présence d'USPIO dans les systèmes biologiques étudiés trois heures après la mise en contact avec les différents types de cellules. Comme il avait été supposé lors du paragraphe III.1.3, les USPIO, pour lesquels les valeurs de viabilités cellulaires étaient très élevées (oxydes de fer seuls et oxydes de fer avec PEG_{2000} et DMSA), sont agglomérés empêchant leur élimination lors des étapes de rinçages des cellules. En regardant les images prises en microscopie, les tailles d'agglomérats sont de plusieurs microns. Les nanoparticules d'oxyde de fer absorbant dans le visible il est clair que ces agglomérats ont forcément entrainé une surévaluation de la mesure d'absorbance du réactif MTT et ainsi donné des viabilités supérieures à 100-120%.

En revanche, il y a moins de bleu de Prusse sur les cellules incubées par les nanoparticules avec du $mPEG_{2000}$ ou avec du Cliavist®. Une plus grande quantité de ces USPIO a sans doute été éliminée lors des étapes de rinçage, sans doute du fait de leur agglomération moins importante, expliquant les valeurs de viabilités relativement cohérentes observées lors des essais de cytotoxicité sur ces nanohybrides. Par ailleurs, les nanoparticules mises en contact avec les cardiomyocytes semblent plus agglomérées peut-être à cause de la plus grande concentration de sérum dans le milieu (20% contre 10% pour les deux autres types cellulaires).

L'internalisation des USPIO est finalement observée dans certaines conditions notamment dans le cas des macrophages incubés par du Cliavist® et des NP-$mPEG_{2000}$ (également dans une moindre mesure dans le cas des hépatocytes). Dans ce cas, les nanoparticules semblent être localisées en « petits » agglomérats dans la cellule comme si elles avaient été internalisées par le système (Figure III.1.13). Bien que dans la littérature, une telle co-localisation de nanohybrides avec des cellules est souvent déduite comme une internalisation (Riviere *et al.* 2005), il est tout de même difficile de trancher à cette échelle d'observation entre internalisation et USPIO « collés » sur la membrane des cellules.

Ces mesures ont donc permis de mettre en évidence l'agglomération et la présence de nanoparticules au voisinage des cellules étudiées. Cependant il n'a pas été possible de savoir si ces nano-objets étaient en surface des cellules ou internalisés par celles-ci. En effet, la résolution du microscope utilisé est beaucoup trop faible pour obtenir une image suffisamment précise pour trancher quant à la présence d'USPIO dans les cellules ou en périphérie. La microcopie confocale pourrait permettre de résoudre ce problème. Quant il n'est pas possible de conclure sur l'internalisation des nanoparticules, on parle alors plutôt de **co-localisation**.

Le modèle cellulaire pouvant principalement présenter une internalisation de nano-objets est les cellules RAW. Avec ces macrophages, incubés 3 heures avec les mêmes types d'USPIO, des images en microscopie électronique en transmission ont été réalisées pour connaître le devenir des nano-objets en présence de ces cellules.

III.1.4.2 Détection des USPIO dans des cellules en microscopie électronique en transmission

La compréhension du devenir des nano-objets une fois mis en présence de matériel biologique a été nécessaire pour de futures études de ciblages diagnostiques. Le modèle cellulaire retenu a été le modèle RAW.

Pour connaître la localisation des nanoparticules révélées par le bleu de Prusse aux alentours de ces macrophages, des images en microscopie électronique sur des coupes de cellules ont été réalisées.

Les RAW ont d'abord été incubés 3 heures avec 25 $\mu g_{Fe}/cm^2$ des différents types d'USPIO étudiés lors des tests de cytotoxicité et de révélation au bleu de Prusse (USPIO

seuls, Cliavist®, USPIO pegylés et USPIO pegylés + DMSA) avant d'être rincés. Les cellules ont ensuite été fixées dans de la résine et traitées aux sels de métaux lourds (acétate d'uranyle et citrate de plomb) pour augmenter le contraste lors des prises de vue (Annexe A.8). Les analyses en microscopie électronique en transmission ont été réalisées sur des coupes de cellules ultrafines de 60 nm. Ainsi, de l'imagerie sur une si faible épaisseur, découpée *a priori* à l'intérieur des cellules, peut permettre de mieux conclure quant à la présence de nanoparticules internalisées par le matériel biologique. La Figure III.1.14 et la Figure III.1.15 montrent les interactions entre les USPIO et les macrophages RAW.

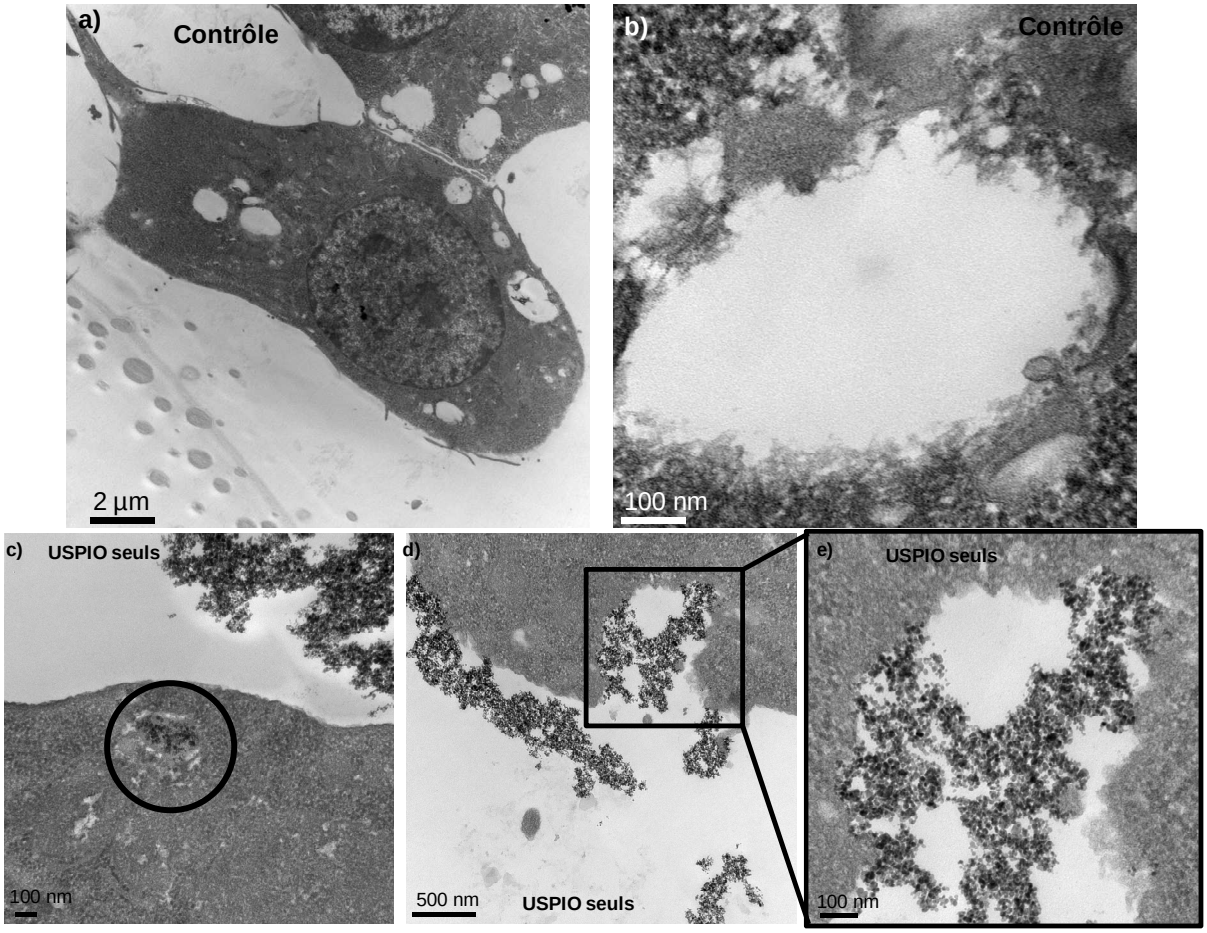


Figure III.1.14 : Clichés MET de macrophages RAW contrôle (a-b : b correspondant à un phagosome) et de l'internalisation d'USPIO nus à 25 µg_{Fe}/cm² par les macrophages RAW après 3 h d'incubation (c-d-e). Les zones encadrées sont les parties zoomées des clichés suivants. Le cercle noir représente les USPIO présents dans les cellules.

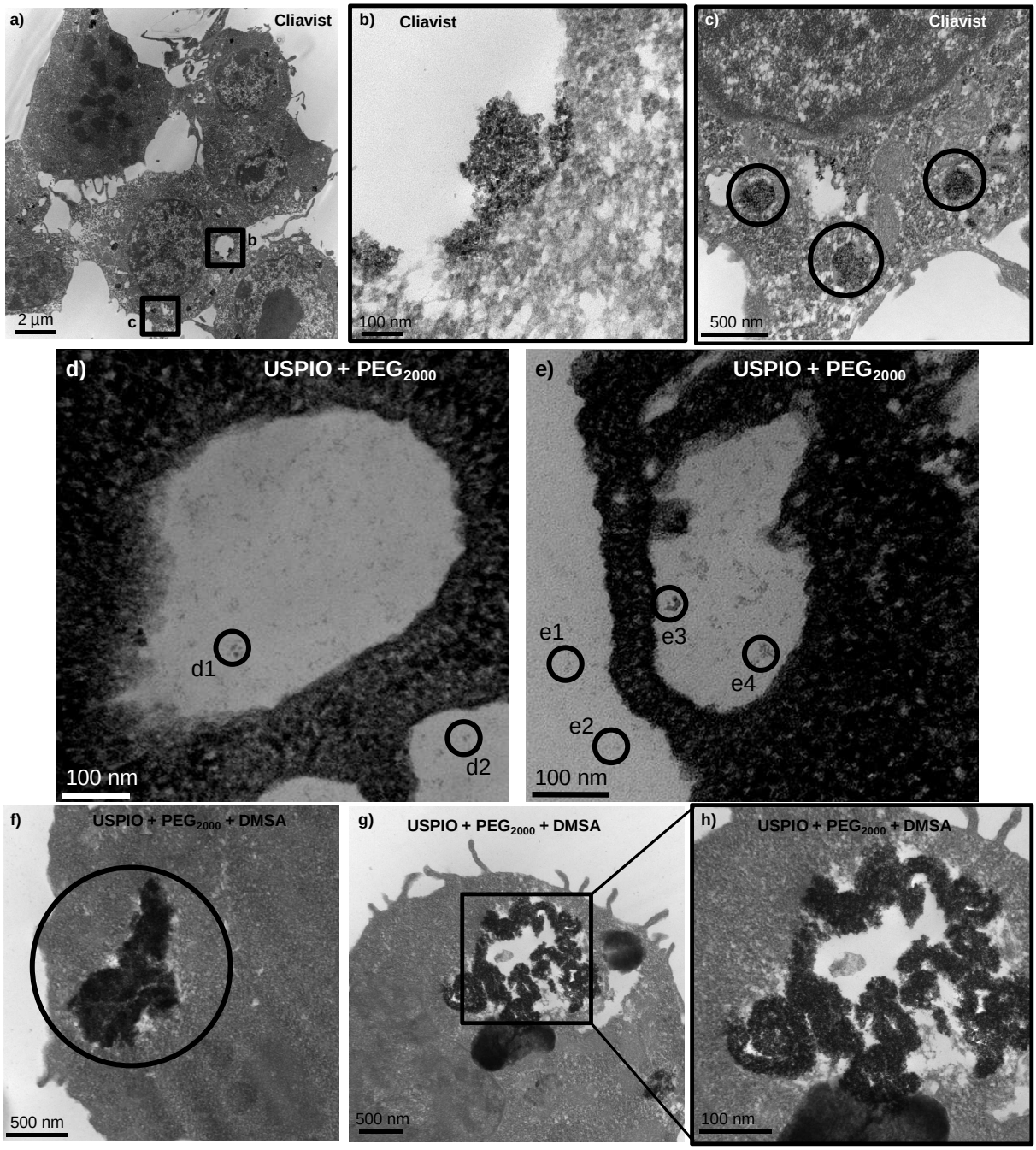


Figure III.1.15 : Clichés MET de l'internalisation du Cliavist® (a-b-c), des USPIO greffés par du $mPEG_{2000}$ (d-e) et des USPIO greffés par du $mPEG_{2000}$ et du DMSA (f-g-h) à 25 µg_{Fe}/cm² par les macrophages RAW après 3 h d'incubation. Les zones encadrées sont les parties zoomées des clichés suivants. Les cercles noirs représentent quelques USPIO présents dans les cellules. La luminosité des clichés des USPIO-$mPEG_{2000}$ a été diminuée pour faire apparaître les oxydes de fer.

La Figure III.1.14 a et b montre un macrophage de type RAW.
Les nanomatériaux mis en présence avec ce type cellulaire ont été localisés à deux endroits différents :

1) Une partie des USPIO seuls et avec $mPEG_{2000}$ et DMSA se retrouvent à l'extérieur de la cellule (Figure III.1.14-c[26]) et de manière très agglomérée comme c'était déjà le cas lors de la révélation au bleu de Prusse (partie III.1.4.1). Peu de Cliavist® a été détecté en dehors de la cellule comme pendant les clichés en microscopique optique (Figure III.1.13 RAW / Cliavist®) laissant supposer qu'une grande majorité de ces nanoparticules a été internalisée par les macrophages. Les USPIO-$mPEG_{2000}$ sont difficilement détectables avec ce microscope électronique et il a été nécessaire d'observer des clichés à fort grossissement et de diminuer leur luminosité pour faire apparaître des oxydes de fer à l'extérieur (Figure III.1.15-e cercles e1 et e2). La taille de ces nanohybrides ne semble pas avoir augmenté (toujours de l'ordre de 40 nm comme lors de leurs caractérisations après greffage partie II.2.2.2.3).
2) Une partie des nano-objets a été internalisée dans des vésicules d'endocytose (appelées phagosomes) de taille supérieure au micromètre (Figure III.1.15-a zoomée en b, Figure III.1.15-d et e, Figure III.1.15-g zoomée en h), phénomène normal de phagocytose par les macrophages face à un agent étranger.
   Sur la Figure III.1.14-d zoomée en e, une invagination membranaire piégeant les nanoparticules et allant former un phagosome a été observée. Dans le cas des USPIO-$mPEG_{2000}$ (Figure III.1.15 d et e : cercles d1, d2, e3 et e4), les agrégats restent élémentaires de l'ordre de leur taille d'origine (environ 40 nm) et sont également localisés dans ces vésicules. Les particules de Cliavist®, quant à elles, sont un peu agglomérées avec des tailles de plusieurs centaines de nanomètres.

Ces images de microscopie électronique ont révélé la présence de nanoparticules en périphérie des cellules et ont démontré leur internalisation par les macrophages.
Les oxydes de fer testés se sont agglomérés dans le milieu de culture contenant du sérum avec des diamètres pouvant dépasser le micron, à l'exception des USPIO-$mPEG_{2000}$ qui sont restés à leur taille d'origine inférieure à 40 nm rendant par ailleurs leur détection difficile. Leur internalisation a été confirmée par l'observation du phénomène d'endocytose.

Il est intéressant de noter que presque aucune nanoparticule de Cliavist® ne se trouvait à l'extérieur des RAW 3 heures après incubation quand une partie non négligeable des USPIO pegylés n'était pas encore internalisée et donc toujours libre dans le milieu biologique. Ce retardement dans leur capture pourrait être dû à la faible taille des agrégats ou au polymère ($mPEG_{2000}$-Si) à la surface.

III.1.4.3 Détection de l'internalisation d'USPIO par les cardiomyocytes grâce à un fluorophore

Lors de la partie II.2.3.1, des nanoparticules d'oxyde de fer pegylées (avec du $mPEG_{2000}$-Si) et fonctionnalisées par de la rhodamine silanisée ont été synthétisées. En marge de l'étude sur la toxicité et les interactions d'USPIO avec les cellules, la possibilité de détection par fluorescence de ces nanohybrides mis en contact avec des cardiomyocytes a été testée.

Les nanohybrides pegylés (0,10 rhodamine/nm²) à une concentration de 25 $\mu g_{Fe}/cm^2$ ont été mis en contact 24 heures avec des cardiomyocytes.

[26] C'est également le cas pour les USPIO-$mPEG_{2000}$ + DMSA mais les clichés n'ont pas été présentés dans ce travail.

Après fixation dans du paraformaldéhyde (PAF) 4%, les noyaux ont été marqués par du DAPI[27]. Les CM incubés avec des nanoparticules fluorescentes[28] ont ensuite été observés en microscopie confocale à fluorescence et comparés avec des CM non incubés avec des USPIO (contrôle). Deux acquisitions ont été réalisées sur une épaisseur d'environ 160 nm au milieu de la cellule : la première à une longueur d'onde d'excitation de 409 nm et d'émission de 498 nm et la deuxième à une longueur d'onde d'excitation de 555 nm et d'émission de 610 nm. Les deux images ont été superposées pour obtenir les photos de la Figure III.1.16.

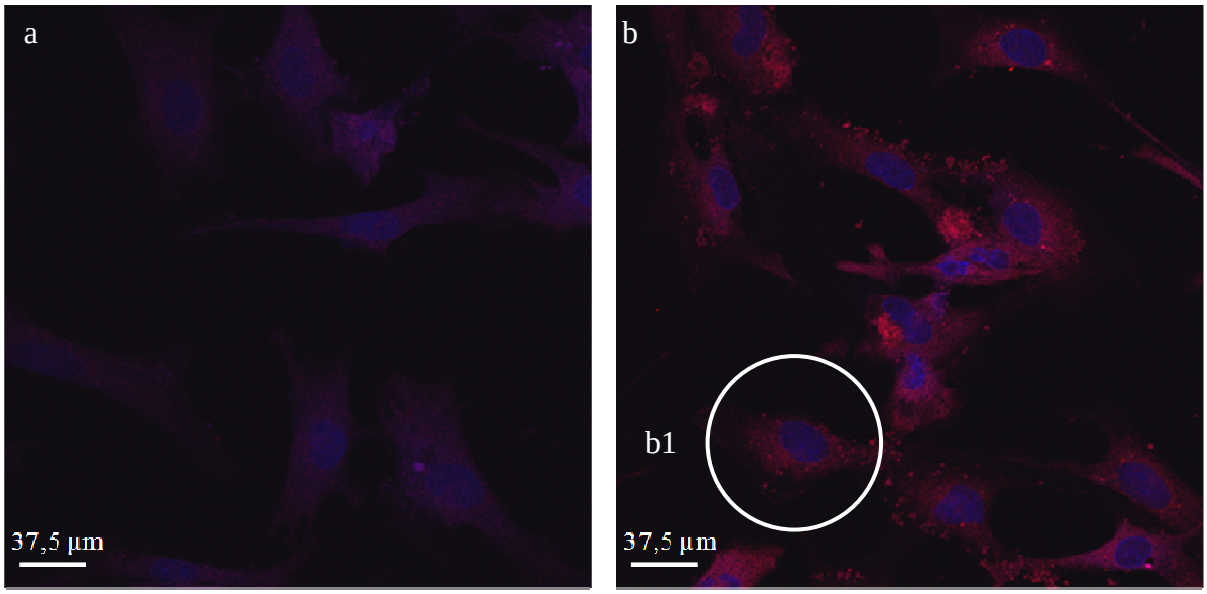


Figure III.1.16 : Clichés en microscopie confocale à fluorescence (80X : objectif 40X et zoom numérique 2X) de cardiomyocytes contrôle (a) et de cardiomyocytes incubés avec 25µg_{Fe}/cm² des USPIO-mPEG$_{2000}$ fonctionnalisés avec de la rhodamine (b). Les noyaux sont marqués en bleu par du DAPI et la fluorescence due à la rhodamine apparaît en rouge (b). Le cercle blanc représente une des cellules dont les contours sont révélés par la rhodamine.

Aux mêmes longueurs d'ondes de mesures, les CM contrôles ont une autofluorescente rouge mais la fluorescence rouge observée sur les CM avec des USPIO et de la rhodamine est plus intense et localisée. Ces observations en microscopie confocale à fluorescence ont permis de mettre en évidence la présence de nanoparticules dans les CM (Figure III.1.16-b). A l'intérieur du cercle b1 de la Figure III.1.16 on observe une cellule ayant internalisé des USPIO qui apparaissent sous forme de vésicules, probablement des endosomes.
De plus, la fonctionnalisation d'USPIO par de la rhodamine permet une détection rapide de ces nanohybrides en microcopie optique, technique moins laborieuse et moins coûteuse que la microscopie électronique.

Il faudrait cependant étudier l'influence du fluorophore sur les interactions biologiques, cette molécule ne pouvant servir qu'à des études préliminaires, elle ne doit pas influencer les résultats obtenus sans rhodamine. Dans notre cas, ces nanohybrides fonctionnalisés n'ont pas été utilisés pour les mesures en IRM ou les tests de toxicité, et ce problème n'a donc pas été soulevé.

[27] Le DAPI ou 4,6-diamidino-2-phenylindole est utilisé en cytochimie pour marquer l'ADN et donc le noyau et fluoresce dans le bleu (λ excitation = 358 nm et λ émission = 463 nm)
[28] Rhodamine : λ excitation = 560/540 nm et λ émission = 630/675 nm

III.1.4.4 Conclusion sur la présence d'USPIO dans les cellules

Par révélation chimique au bleu de Prusse et observation en microscopie optique ou par observation MET, il a été possible de mettre en évidence l'interaction entre les USPIO et les trois modèles cellulaires étudiés. Un état d'agglomération très important de toutes les nanoparticules (sauf les USPIO-PEG_{2000}) dans le milieu de culture a pu clairement influencer les mesures de cytotoxicité (mesure d'absorbance à 512 nm). Avec les clichés MET, l'internalisation de ces nano-objets, notamment par phagocytose, préalablement observée en microscopie optique (Figure III.1.13 ligne 1) a été confirmée. Les macrophages ont été capables de « capturer » dans des endosomes des USPIO de tailles allant de la dizaine de nanomètres au micron. Cette phagocytose a semblé être retardée pour les USPIO-$mPEG_{2000}$ par rapport au Cliavist®, ce qui pourrait permettre d'obtenir un temps de circulation *in vivo* plus long, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles applications pour la détection en IRM.

Au niveau des cellules hépatiques et des cardiomyocytes, de l'imagerie électronique serait envisageable pour mieux comprendre l'interaction de ces types cellulaires avec nos USPIO. Les premières observations en révélation au bleu de Prusse et microscopie confocale laissant tout de même penser que ces cellules sont également capables d'internaliser les USPIO.

III.1.5 Conclusions sur la toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées

Les mesures de viabilité cellulaire par les tests MTT sur les trois modèles cellulaires n'ont montré aucune toxicité sur 72 heures des USPIO synthétisés et du Cliavist® pour des concentrations de 6, 25 et 50 $\mu g_{Fe}/cm^2$ encadrant la concentration utilisée lors des mesures IRM *in vivo*. Les oxydes de fer modifiés par du $mPEG_{5000}$ ont montré une toxicité importante au-delà de 24 heures sans doute due à la mauvaise élimination du catalyseur de synthèse du PEG silanisé (le DBTL). De nouveaux greffages avec du $mPEG_{5000}$-Si sein sont en cours.
Il s'est avéré que la forte agglomération d'une partie des nanoparticules d'oxydes de fer dans le milieu de culture couplée à l'internalisation d'une partie des USPIO ont entrainé des viabilités supérieures à 100-120% dues à une surévaluation de la lecture optique. Ce phénomène peut être dû à la forte concentration en phosphates des milieux de culture ou à la présence de sérum.

En conclusion, on peut dire que la cytotoxicité *via* le test MTT n'est pas une mesure suffisante pour estimer la toxicité *in vivo* de nos USPIO. Il est aisé de comprendre que si un produit n'est pas toxique au niveau cellulaire, il peut l'être pour l'animal. En effet, les tests de toxicités dépassant rarement 96 heures, ils ne peuvent révéler des toxicités à long terme sur les tissus vivants. Ainsi, si une cellule hépatique en présence d'USPIO, ne voit pas sa viabilité évoluer, il n'est pas évident que l'organe complet réagira de la même manière.

En revanche, il serait judicieux de considérer l'effet inverse. Les cellules seules sont, en effet, plus facilement soumises à des stress ou des contaminations et ne sont pas « protégées » par le système immunitaire. Ainsi, une cytotoxicité importante ne devrait pas forcément être considérée comme inducteur de toxicité *in vivo*. Il est vrai que cette hypothèse peut sembler hasardeuse et n'est pas trop reconnue par la communauté.
Quoi qu'il en soit, ces tests de cytotoxicité sont indispensables avant toutes applications à l'animal et surtout chez l'homme mais ne dispensent surtout pas d'évaluation de la toxicité *in vivo*.

Au niveau des interactions des nanoparticules avec les cellules, les révélations des oxydes de fer par le bleu de Prusse ont confirmé l'hypothèse de l'agglomération des USPIO dans les conditions où les viabilités cellulaires étaient surévaluées.

Dans le cas des nanoparticules avec du $mPEG_{2000}$, ces valeurs étaient cohérentes (aux alentours de 100%) et peu de nano-objets ont été révélés par bleu de Prusse laissant supposer une absence d'agglomération de ce type d'USPIO.
En microscopie électronique, les interactions entre les oxydes de fer et les macrophages ont été observées. Les cellules RAW ont bien phagocyté tous les types de particules même quand celles-ci dépassaient le micron. Il a été également remarqué que les USPIO-$mPEG_{2000}$ semblaient être moins vite capturés par ces cellules que le Cliavist®. Cette propriété de capture retardée de ces nanohybrides par le système immunitaire est intéressante pour la circulation de ces nano-objets dans le corps ainsi que leurs utilisations comme agents de contraste pour des pathologies spécifiques, principalement inflammatoires.

Ces différences entre nos USPIO et le Cliavist® semblent venir des modifications de surface (respectivement du PEG et du dextran). Ainsi, des études en IRM ont été entreprises pour découvrir si des fonctionnalisations différentes pouvaient également influencer le pouvoir contrastant de ces oxydes de fer.

III.2 Les USPIO comme agents de contraste en IRM

Après s'être intéressé à la cytotoxicité et à l'internalisation des USPIO synthétisés, leur efficacité en tant qu'agent de contraste en IRM a été évaluée.
Dans un premier temps, des mesures magnétiques sur poudres et des calculs de relaxivités sur des gels ont été réalisés.
Dans une deuxième partie, les oxydes de fer ont été utilisés *in vivo* dans un modèle animal murin pour estimer leur effet contrastant et leur localisation dans les organes de la souris.

III.2.1 Mesures magnétiques sur poudres et sur gels

Les USPIO testés dans cette étude ont été :

- Les USPIO seuls
- Les USPIO-mPEG$_{550}$
- Les USPIO-mPEG$_{2000}$
- Les USPIO-mPEG$_{5000}$
- Les USPIO-DMSA
- Les USPIO-mPEG$_{2000}$ + DMSA
- Les USPIO synthétisés sur le dispositif hydrothermal en continu avec 100% de citrates (partie II.3.3.2).

L'influence de la charge de surface et de la longueur de chaîne de polymère sur la relaxivité a ainsi été évaluée.
Les aimantations à saturation et les relaxivités de ces USPIO ont été comparées à un des produits de référence en IRM : le Cliavist®.

III.2.1.1 Hystérésimétrie

Les propriétés magnétiques de certains USPIO ont été mesurées notamment l'aimantation à saturation (M_s). Les mesures ont été réalisées à température de l'azote liquide (-196°C) et à la température ambiante (20°C) (Annexe A.9). Les USPIO-mPEG$_{2000}$ + DMSA n'ont pas été testés dans cette partie.

Fonctionnalisation	M_s à -196°C (uem.g^{-1})	M_s à 20°C (uem.g^{-1})	Taux de greffage (% massique)
Cliavist®	30 ± 1	26 ± 1	67%
Nue	92 ± 1	82 ± 1	0%
mPEG$_{550}$-Si	47 ± 1	42 ± 1	49%
mPEG$_{2000}$-Si	28 ± 1	23 ± 1	70%
mPEG$_{5000}$-Si	10 ± 1	25 ± 1	89%
DMSA	69 ± 1	64 ± 1	25%
Acide citrique hydrothermal	36 ± 1	nd	nd

Tableau III.2.1 : Aimantations à saturation (σ_s) de certains USPIO fonctionnalisés comparées au Cliavist® à -196°C et 20°C sous un champ magnétique de 16 kOe. nd : non déterminé.

La valeur de l'aimantation à saturation de la magnétite nue synthétisée, à température ambiante, est de 82 uem.g^{-1} en accord avec la littérature (Mikhaylova *et al.* 2004; Daou *et al.* 2006). Cette valeur se rapproche des valeurs théoriques de 92 uem.g^{-1} pour la magnétite et 83 uem.g^{-1} pour la maghémite (Daou *et al.* 2006). Dans le cas des autres USPIO, M_s est plus faible car cette valeur est ramenée par masse de nanohybride, prenant donc en compte les molécules organiques à la surface. Ainsi, comme ces nanoparticules sont toutes composées à

partir de la même suspension d'oxyde de fer et que seul ce composé peut donner une aimantation à saturation, il est ainsi possible d'estimer un taux de greffage (en % massique) de ces USPIO par rapport à M_s à -196°C. Le taux de greffage du Cliavist® peut également être estimé en considérant que l'aimantation à saturation de l'oxyde de fer de ce composé est égale à celle de nos USPIO nus. Les taux de greffage trouvés sont proches des valeurs mesurées en ATG (partie II.2.2.2.4). L'aimantation à saturation des nanoparticules synthétisées sur le dispositif hydrothermal en continu avec 100% de citrates donne une valeur faible. Comme ces oxydes sont différents de la synthèse de référence (taille, taux d'oxydation, …), le taux de greffage n'a pas été calculé.

A température ambiante, la valeur de l'aimantation rémanente (M_r) et le champ coercitif sont très faibles montrant que nos USPIO sont bien **superparamagnétiques** dans les conditions ambiantes.

III.2.1.2 Mesures magnétiques sur gel

Dans cette partie les effets influençant le temps de relaxation transversale T_2 (partie I.2) du proton en imagerie par résonance magnétique (IRM) ont été étudiés. Les oxydes de fer diminuent généralement les temps T_2 et ainsi diminuent l'intensité des signaux en IRM (Mornet *et al.* 2006). On parle alors d'effet négatif qui peut être mesuré par la relaxivité r_2 (en $mM.s^{-1}$) : plus cette valeur est élevée plus l'effet contrastant négatif est poussé pour les nanoparticules utilisées. Bien que les nanoparticules de très faibles tailles puissent également avoir un effet contrastant T_1 évalué par sa relaxivité r_1 (Roch *et al.* 2005; Tromsdorf *et al.* 2009), seules les relaxivités r_2 ont été prises en compte dans le cahier des charges initial (partie I.3).

III.2.1.2.1 Conditions opératoires de mesures de la relaxivité

Les nanoparticules testées ont tout d'abord été figées dans des gels d'acrylamide pour éviter une éventuelle sédimentation des USPIO nus et leurs relaxivités ont ensuite été mesurées dans un appareil d'imagerie par résonance magnétique (IRM) clinique de 3T au centre hospitalier universitaire de Dijon permettant de travailler dans les mêmes conditions que pour les études *in vivo*.

III.2.1.2.1.1 Préparation des gels pour les mesures magnétiques

Pour mesurer les relaxivités des nanoparticules d'oxydes de fer en imagerie par résonance magnétique, il faut que les suspensions d'USPIO soient bien homogènes : **la moindre déstabilisation pouvant influencer drastiquement les résultats obtenus**[29]. Dans le cas d'UPSIO non modifiés en surface, leur rapide sédimentation n'a pas permis d'acquérir des données reproductibles en milieu purement aqueux. Ainsi, pour figer les suspensions et pour simuler un tissu vivant, un milieu gélifié a été choisi (Goussard 2006-2007) à base d'acrylamide.

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

Pour les mesures IRM, un compromis a dû être trouvé pour la concentration en monomère lors de la gélification. En effet, plus le taux de monomère est élevé plus la polymérisation est rapide et plus il est facile de « figer » des suspensions instables. En revanche, en augmentant la concentration en monomère, le temps de relaxation T_2^0 diminue (Tableau III.2.2). Or, il faut que le T_2^0 du gel soit le plus élevé possible pour que les mesures

[29] Voir la partie III.2.1.2.1.2 pour plus de détails.

de relaxivités soient plus sensibles aux variations de concentrations en fer tout en veillant à ce que la polymérisation se fasse le plus rapidement possible. Dans notre étude, la concentration volumique en monomère choisie a été de 4,5%.

Proportion de gel d'acrylamide dans l'eau (en % volumique)	**T_2^0 (ms)**	**Temps de polymérisation à 60°C**
3,0 %	415 ± 27	~20 min
4,5 %	326 ± 11	10 min
6,0 %	286 ± 21	< 5 min
9,0 %	237 ± 9	< 5 min
12,0 %	205 ± 2	< 5 min

Tableau III.2.2 : Mesures du temps de relaxation T_2^0 et temps de polymérisation à 60°C de différents gels d'acrylamide de différentes proportions volumiques.

Six concentrations en fer (en mM_{Fe}) ont été mélangées à la solution d'acrylamide et la réaction a été amorcée et entretenue par respectivement 20 µL de PSA et 15 µL de TEMED. Les tubes ont ensuite été placés à l'étuve à 60°C pendant 5 à 10 minutes. Après cette étape les gels sont formés et homogènes (Figure III.2.1). Les relaxivités ont été exprimées par rapport aux **concentrations de fer** quelles que soient les modifications de surface utilisées.

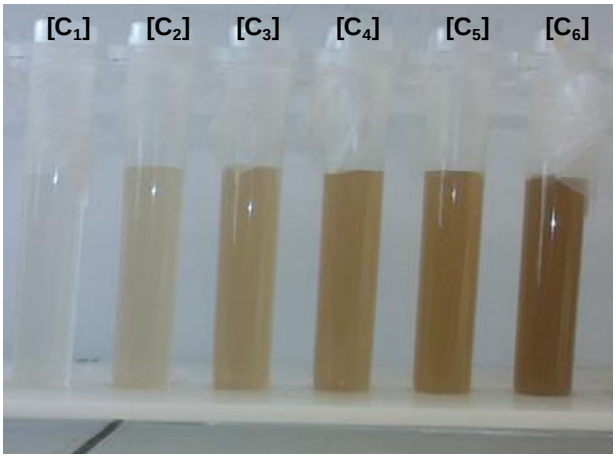


Figure III.2.1 : Photographies des gels d'acrylamide (à 4,5 % volumique de monomère) à différentes concentrations (C_1, C_2, C_3, C_4, C_5 et C_6) d'USPIO

III.2.1.2.1.2 Les mesures de relaxivités

Une fois les gels préparés, ils sont analysés grâce à l'IRM clinique à 32 temps d'échos T_E différents allant de 8,6 à 275,2 ms avec des pas de 8,6 ms. Plus le temps d'écho est élevé, plus le contraste est négatif. Ainsi, sur la Figure III.2.2 on peut voir le signal diminuer proportionnellement aux cinq temps d'échos et aux 6 concentrations en oxydes de fer dans les gels ; les concentrations les plus faibles étant situées dans les colonnes de tubes à gauche.

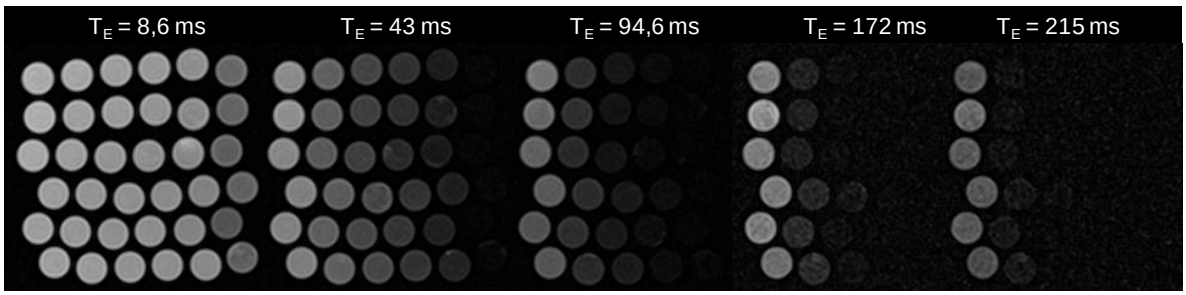


Figure III.2.2 : Clichés IRM (coupe de 5 mm) de 6 fois 6 tubes de concentrations en oxydes de fer nus croissantes de gauche à droite pour 5 temps d'échos différents dans une IRM clinique 3T en séquence écho de spin à pondération T_2.

L'acquisition des images a été réalisée sur des coupes de 5 mm au centre des gels et c'est pour cette raison qu'il fallait nécessairement travailler avec des suspensions homogènes. La mesure se faisant sur une petite coupe de l'échantillon, elle se devait d'être représentative. En effet, si cette coupe était trop ou pas assez concentrée par rapport à l'ensemble du tube, la relaxivité s'en serait vue drastiquement modifiée.

Pour chaque tube et pour les 32 temps d'échos, des mesures de niveaux de gris (noté S) ont été obtenues à l'aide du logiciel image-J (avec 0 pour le noir absolu et 2047 pour le blanc pur et donc 2048 niveaux de gris). Plus le temps d'écho est élevé, plus le contraste est négatif et le niveau de gris faible. En reportant sur un graphe l'intensité du signal mesurée en fonction du temps d'écho (en ms) (Figure III.2.3), il est possible d'établir une courbe de décroissance exponentielle et de trouver un temps de relaxation T_2 (en ms) d'après l'équation :

$$S_{TE} = S_0 \cdot e^{-(T_E / T_2)} + \varepsilon \qquad \text{Eq. III.2.1}$$

avec S_{TE} le contraste à un T_E donné, S_0 le contraste à $T_E = 0$ (l'ordonnée à l'origine) et ε le bruit de fond de la mesure.

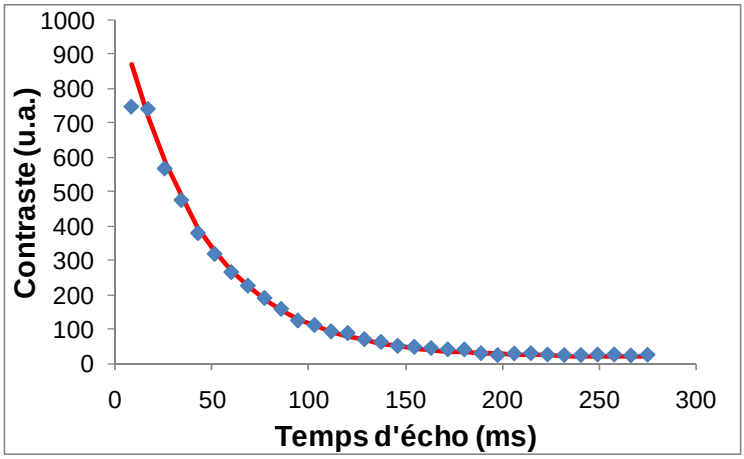


Figure III.2.3 : Courbe du contraste d'un tube analysé dans une IRM clinique 3T en fonction des temps d'écho des mesures. La modélisation (en rouge) de cette courbe permet d'accéder au temps de relaxation longitudinale T_2.

Avec ces mesures, des temps T_2 ont été obtenus pour les 6 concentrations d'un type d'oxyde de fer. En traçant l'inverse du T_2, appelé R_2 ou taux de relaxation (en s^{-1}), en fonction de la concentration en fer des USPIO étudiés (C en mM_{Fe}), l'équation de la droite obtenue est :

$$R_2 = r_2.C + R_2^0 \qquad \text{Eq. III.2.2}$$

avec r_2 la relaxivité de ce produit (en $mM_{Fe}^{-1}.s^{-1}$) et R_2^0 le taux de relaxation en absence d'agent de contraste (Okuhata 1999; Bjornerud *et al.* 2004; Park *et al.* 2008).

Par exemple, dans la Figure III.2.4, les R_2 des USPIO nus ont été tracés en fonction de leurs concentrations dans les gels. La relaxivité trouvée est de 260 $mM_{Fe}^{-1}.s^{-1}$ et R_2^0 = 3,05 s^{-1} soit un T_2^0 de 328 ms.

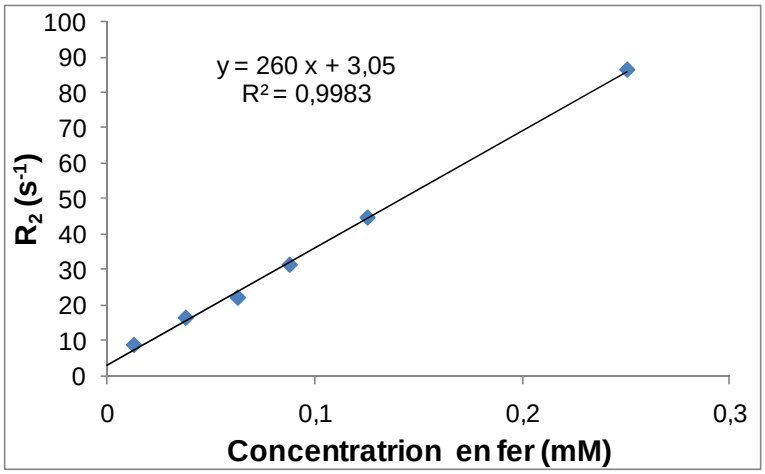


Figure III.2.4 : Courbe de relaxation R_2 en fonction de la concentration en Cliavist® ayant permis de trouver sa relaxivité r_2 et le taux de relaxation T_2^0 en absence d'USPIO

III.2.1.2.2 Les relaxivités mesurées sur gels

A partir de la méthode décrite dans la partie III.2.1.2.1, les relaxivités de diverses formulations d'USPIO ont été calculées et comparées avec celle du Cliavist®. Les influences de la modification de surface, de la charge de surface et éventuellement de la taille d'agrégats et de cristallites sur les temps de relaxation ont été évaluées.

Avant de présenter les résultats de relaxivités, le Tableau III.2.3 résume les caractéristiques principales des USPIO testés.

Produits testés	Diamètre cristallites (nm)	Diamètre PCS (nm)	Potentiel Zêta (mV)
Cliavist® (Reimer *et al.* 2003)	4,2	62	-40
USPIO seuls pH = 5	7,7	23	+30
USPIO seuls	7,7	nd	~ 0
USPIO seuls pH = 10	7,7	23	-30
USPIO-$mPEG_{550}$	7,7	30	~ 0
USPIO-$mPEG_{2000}$	7,7	38	~ 0
USPIO-$mPEG_{5000}$	7,7	45	~ 0
USPIO-DMSA	7,7	51	-40
USPIO-$mPEG_{2000}$ + DMSA	7,7	36	-30
USPIO HT 100% AC	3,8	~40	-40

Tableau III.2.3 : Résumé des tailles de cristallites, d'agrégats et des charges de surface à pH = 7 (sauf mention contraire) des USPIO étudiés in vitro en IRM. nd : la mesure PCS à pH = 7 n'a pas été réalisée.

En premier lieu, l'influence de la charge nette de surface des USPIO nus a été étudiée. L'eau pouvant être considérée comme un dipôle, la charge d'agents de contraste aurait pu influencer leurs relaxivités en attirant plus de molécules d'eau aux alentours des nanoparticules et ainsi augmenter leurs interactions et obtenir un meilleur contraste T_2.

Des USPIO en suspensions acides, neutres et basiques ont été préparés pour obtenir, respectivement des nanoparticules chargées positivement (+30 mV), neutres (~0mV) et chargées négativement (-30mV). Leurs relaxivités ont été mesurées et comparées au Cliavist® (Figure III.2.5).

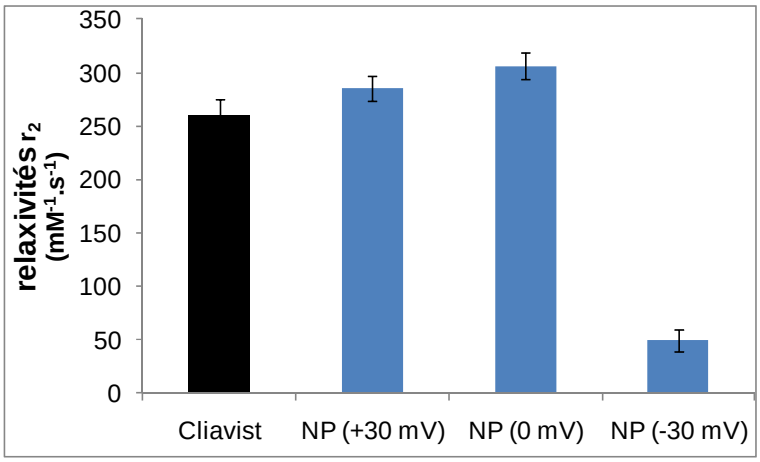


Figure III.2.5 : Relaxivités des USPIO sans modification de surface et chargés positivement, neutres ou négativement comparées à la relaxivité du Cliavist®. Les mesures ont été effectuées sur une IRM 3 T en séquences écho de spin pondérées en T_2 avec 6 concentrations d'oxydes de fer différentes (expériences répétées entre 3 et 12 fois)

En première observation, les relaxivités de nos oxydes de fer neutres et chargés positivement sont relativement identiques à celle du Cliavist®.

Les USPIO de charges négatives présentent, quant à eux, une faible valeur de relaxivité sans doute due à une mauvaise homogénéité lors de la préparation des gels IRM. En effet, en dispersant en milieu basique ces nanoparticules (stockées à pH acide : partie II.1.3), le pH est passé par le point isoélectrique pouvant créer une agglomération difficilement réversible. Le temps de stabilisation du pH, les oxydes de fer ont pu plus facilement se déstabiliser et sédimenter dans le tube d'acrylamide avant gélification. Il sera donc nécessaire de réitérer cette expérience pour confirmer que la charge négative ne ferait pas baisser drastiquement les valeurs de relaxivités.

En s'affranchissant de cette valeur, la charge de surface des nanoparticules ne semble pas jouer sur la relaxivité comme également démontré par LaConte *et al* (LaConte *et al.* 2007).

D'après la littérature, deux facteurs semblent influencer la relaxivité d'USPIO non modifiés :

1) La taille des cristallites
2) L'état d'agglomération

Dans leurs travaux, Tromsdorf *et al* (Tromsdorf *et al.* 2007) et de Jun *et al* (Jun *et al.* 2005; Jun *et al.* 2008) ont montré que le temps de relaxation transversales T_2 diminue avec l'augmentation de la taille des cristallites. La relaxivité r_2 augmenterait donc avec ce paramètre.

L'état d'agglomération semblerait également influencer les taux de relaxations. Quelques travaux (Roch *et al.* 2005; Larsen *et al.* 2008) relatent de l'augmentation de r_2 avec une plus grande agglomération des nanoparticules superparamagnétiques. Une hypothèse avancée par Roch *et al* (Roch *et al.* 2005) pourrait être la plus forte concentration de mono-domaines magnétiques par agrégat rendant ainsi le champ magnétique généré plus important et influençant plus les protons alentours.

Ces deux paramètres semblent jouer un rôle sur les relaxivités r_2 des oxydes de fer, mais dans le cadre de cette étude, les faibles différences de tailles de cristallites et d'agrégats entre nos USPIO et le Cliavist® n'ont pas permis de voir une différence significative.

D'après LaConte *et al* (LaConte *et al.* 2007) la longueur de chaîne de PEG influencerait la relaxivité. Dans leur étude, plus le PEG est de faible masse moléculaire, plus la relaxivité r_2 ($mM^{-1}.s^{-1}$) est élevée et plus r_1 augmente. Leur idée serait que les PEG de grandes chaînes déplaceraient le plan de cisaillement entre l'eau et la couche de Stern autour des USPIO et modifieraient ainsi les relaxivités.

En effectuant la même expérience sur nos USPIO greffés avec des mPEG de masses moléculaires différentes (550, 2000 et 5000 $g.mol^{-1}$), les résultats sont différents de ceux de LaConte *et al* (Figure III.2.6).

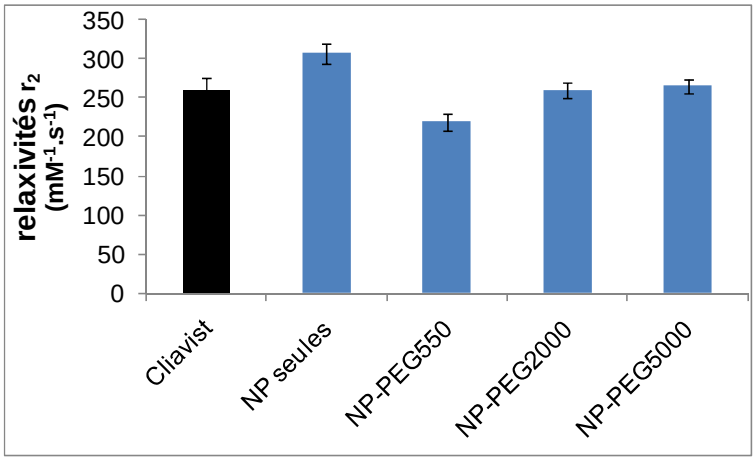


Figure III.2.6 : Relaxivités des nanoparticules d'oxyde de fer nues et greffées par des mPEG de masses moléculaires de 550, 2000 et 5000 $g.mol^{-1}$ comparées à la relaxivité du Cliavist®. Les mesures ont été effectuées sur une IRM 3T en séquences écho de spin pondérées en T_2 avec 6 concentrations d'oxydes de fer différentes (expériences répétées entre 3 et 12 fois).

Dans notre cas, toutes les relaxivités sont du même ordre de grandeur que celle du Cliavist®, aucune différence significative n'a été observée entre les différents mPEG utilisés.

Ces différences entre nos résultats et la littérature peuvent s'expliquer par des taux de greffages (nombre de molécules de PEG par nm^2) probablement différents (mais non indiqués dans le cas de LaConte et al (LaConte *et al.* 2007)) et il est possible que, dans notre cas, il n'y ait pas eu assez de mPEG pour interagir réellement avec les molécules d'eau environnantes.

En dernière partie, les relaxivités de tous nos USPIO ont été comparées à celle du Cliavist® pour connaître l'influence soit des différentes modifications de surface chargeant négativement les nanoparticules (USPIO-DMSA et USPIO-$mPEG_{2000}$ +DMSA), soit de la taille des nanoparticules ou des agrégats avec les USPIO mélangés à un ratio massique de 100% de citrate synthétisés avec le dispositif hydrothermal en continu[30] (Figure III.2.7)

[30] Les nanoparticules d'oxydes de fer synthétisés en domaine supercritique n'ont pas pu être étudiées à cause de leur instabilité même pendant le court laps de temps nécessaire à la polymérisation des gels.

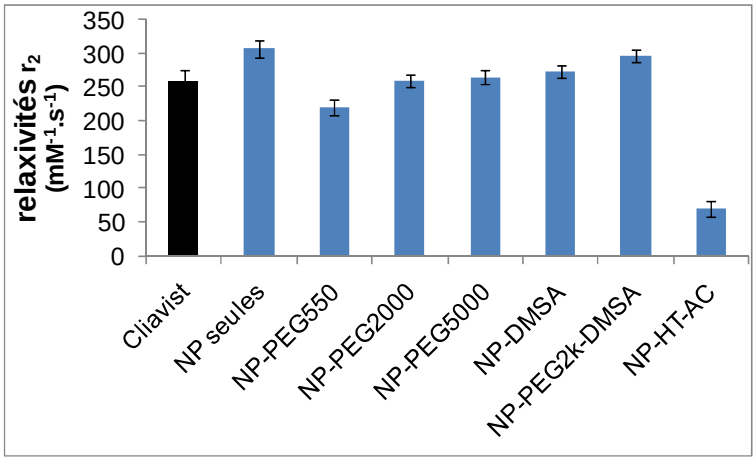


Figure III.2.7 : Relaxivités des nanoparticules d'oxyde de fer seules et modifiées en surface par des mPEG de masses moléculaires de 550, 2000 et 5000 g.mol^{-1}, du DMSA, du DMSA et du mPEG$_{2000}$ et des nanoparticules citratées à 100% avec le dispositif hydrothermal en continu comparées à la relaxivité du Cliavist®. Les mesures ont été effectuées sur une IRM 3T en séquences écho de spin pondérées en T_2 avec 6 concentrations d'oxydes de fer différentes (expériences répétées entre 3 et 12 fois)

Il faut noter que, à l'exception des nanoparticules synthétisées avec le dispositif hydrothermal et continu, toutes les relaxivités sont nettement supérieures à celle du premier produit référence utilisé lors de notre étude : l'Endorem® avec $\mathbf{r_2 = 205 \pm 7\ mM^{-1}.s^{-1}}$. Ce produit ayant été retiré du marché pendant notre étude, nous nous sommes par la suite intéressés au Cliavist® (partie III.1.2).

Toutes les relaxivités sont relativement identiques quelles que soient les modifications de surface mises en œuvre sur les oxydes de fer. Le fait de charger négativement les USPIO avec du DMSA, n'influencerait également pas leurs propriétés magnétiques. Cependant, les nanoparticules citratées en conditions hydrothermales et continues présentent des relaxivités beaucoup plus faibles que celles des autres produits testés.
Cette différence pourrait s'expliquer par deux phénomènes :

1) En premier lieu, la déstabilisation des nanoparticules pourrait avoir empêché d'obtenir des valeurs cohérentes de relaxivité à cause d'une suspension peu homogène, les nanoparticules citratées en continu n'étant pas aussi stables que celles modifiées post-synthèse (partie II.2). L'écart type des mesures est certes faible mais la quantité totale d'USPIO analysée peut être surévaluée. En effet, les analyses IRM se faisant sur des coupes placées au milieu du tube, en cas de sédimentation de l'échantillon, une grosse quantité d'USPIO se retrouve en culot au fond du tube et n'est pas mesurée. Ainsi, bien que la relaxivité totale mesurée pour cet échantillon ait des barres d'erreur faibles, sa faible valeur peut quand même être due à l'inhomogénéité de l'échantillon.
2) Dans un second temps, la très faible taille des cristallites a pu diminuer la relaxivité obtenue pour ce produit. Bien que sa taille d'agrégats mesurée par PCS soit du même ordre de grandeur que celles des autres USPIO, il est également possible qu'elle ne soit pas représentative de la taille des grains dans le gel. En effet, la distribution de ces grains dans le gel pourrait plutôt être une distribution de cristallites élémentaires (de diamètres inférieurs à 4 nm). En effet, la préparation de ce gel n'a été faite qu'avec le surnageant de réaction stable alors que la mesure de taille hydrodynamique avait été faite avec l'ensemble de la suspension. Dans ce cas, la taille moyenne des agrégats peut s'en retrouvée très diminuée. Ainsi, ces USPIO pourraient être considérés comme des cristallites élémentaires dispersées. Dans ce cas, il a été montré (Mornet *et al.*

2004; Duguet *et al.* 2006; Mornet *et al.* 2006) que les relaxivités de ces nanoparticules sont beaucoup plus faibles que celles possédant des cristallites agrégées. Cependant ces très petits USPIO semblent également présenter un effet T_1 intéressant (Tromsdorf *et al.* 2009) et il aurait été nécessaire de mesurer également la relaxivité r_1 de ces oxydes de fer. Pour affirmer cette hypothèse, le ratio r_2/r_1 peut être un meilleur indicateur pour comparer tous nos résultats.

III.2.1.2.3 Conclusions sur les relaxivités mesurées sur gels

Les nanoparticules synthétisées présentent des efficacités en tant qu'agents de contraste en IRM au moins aussi bonnes que celle d'un agent commercial déjà utilisé en centres hospitaliers : le Cliavist®. Par ailleurs, la charge de surface et la longueur du polymère utilisé pour stabiliser les nanoparticules n'ont pas significativement influencé la relaxivité de nos nanopoudres. Au niveau des USPIO synthétisés et citratés à l'aide du dispositif en domaine hydrothermal et continu, les relaxivités ont été beaucoup plus faibles comparées à toutes les autres. Ce résultat peut être dû, soit à une faible stabilité de la suspension lors de la gélification des tubes, soit à la présence majoritaire de cristallites élémentaires dispersées qui possèderaient de faibles relaxivités r_2 mais également un contraste de type T_1 non négligeable. Pour trancher sur ce résultat, il serait nécessaire de mesurer également les relaxivités r_1 pour pouvoir comparer les ratios r_1/r_2 de tous les USPIO testés. Quoi qu'il en soit, ces résultats sont prometteurs pour toutes les nanoparticules synthétisées. Bien que les USPIO réalisés en continu aient présenté des propriétés intéressantes, la trop grande incertitude sur leurs stabilités *in vivo* ne nous a pas permis de les utiliser pour les mesures chez la souris avant des optimisations de synthèses prévues dans la suite de ce travail.

III.2.2 Les mesures IRM in vivo chez la souris

Dans cette partie, les USPIO synthétisés et testés en cytotoxicité ont été étudiés lors de mesures IRM *in vivo* chez la souris.

III.2.2.1 Conditions opératoires des mesures IRM chez la souris

Comme lors des essais sur gels, les mesures *in vivo* ont été réalisées sur un appareil IRM clinique de 3 T. L'intérêt d'utiliser une IRM clinique est la réalisation, en une seule fois, de l'imagerie de 16 animaux grâce à un dispositif créé par les ateliers du laboratoire ICB. Ces mesures sur des volumes importants et l'utilisation d'une antenne de tête permettent d'améliorer le signal.

III.2.2.1.1 Le modèle animal étudié

Un total de 45 souris swiss albinos mâles d'environ 30 grammes provenant de chez Janvier a été utilisé. Les animaux ont été stabulés 1 semaine à l'animalerie de l'Université de Bourgogne avant d'être manipulés. Les mesures en IRM ont été réalisées sur deux campagnes distinctes. Des souris étant mortes avant analyses (probablement due à l'anesthésie et/ou aux produits injectés), le nombre réel d'animaux est 34, soit entre 2 et 6 animaux étudiés par produit de contraste et par condition choisie. Le nombre d'animaux utilisés pour chaque produit testé est donné dans le Tableau III.2.4. Cette expérience est en accord avec le comité d'éthique français sur l'expérimentation animale et a reçu l'autorisation n°B0410.

III.2.2.1.2 Les produits testés *in vivo* en IRM et la dose choisie

Les produits choisis pour cette étude ont été :

- Sérum physiologique comme contrôle (NaCl à pH = 7,4 et 0,15 M)
- Cliavist®

- USPIO fonctionnalisés par du $mPEG_{2000}$-Si
- USPIO fonctionnalisés par du $mPEG_{5000}$-Si
- USPIO fonctionnalisés par du $mPEG_{2000}$-Si et du DMSA

Ces quatre produits ayant des relaxivités similaires, l'étude de leur biodistribution a été possible par analyse des images. Ils ont été préparés dans une solution de sérum physiologique qui a également fait office de produit de contrôle.

A partir des données de la littérature traitant de l'injection de nanoparticules d'oxydes de fer chez des modèles animaux, une concentration moyenne de fer à injecter a été choisie. Chez le petit animal (la souris, le rat ou le lapin), les quantités d'USPIO injectées sont comprises entre 5 et 300 µmoles de fer par kg (Dousset *et al.* 1999; Yang *et al.* 2001; Huh *et al.* 2005; Brochet *et al.* 2006; Lee *et al.* 2006; Sosnovik *et al.* 2008; Chen *et al.* 2009), la dose retenue a été de **100 μmol_{Fe}/kg**.

En considérant la masse des souris comme égale à 30 g, la quantité de fer à injecter était de **3 µmol** par animal. Le volume sanguin d'une souris étant d'environ 2 mL, la quantité à utiliser ne devait pas dépasser 100 µL (5 à 10 % du volume total de sang de l'animal). Ainsi, des suspensions de 30 $\mu moles_{Fe}$/mL dans du sérum physiologique ont été préparées pour cette étude.

III.2.2.1.3 Les conditions de mesures des produits de contraste chez la souris

L'utilisation d'une IRM clinique a permis le passage simultané d'un grand nombre d'animaux (dix au total).
Les souris étaient préalablement anesthésiées par injection en intrapéritonéal (IP) de deux produits : la kétamine à hauteur de 100 mg/kg (soit 3 mg par souris) et 10 mg/kg de xylazine (soit 0,3 mg par souris).
100 µL d'USPIO ou de sérum physiologique seul ont été injectés dans la veine jugulaire mise à nue des animaux puis recousue après injection.

Les images IRM ont été réalisées à 1 et 3 heures après injection pour tous les animaux et 24 heures après injection pour la moitié de la population étudiée. Les souris étaient anesthésiées pendant l'acquisition des images durant environ une demi-heure.

Les séquences IRM d'écho de gradient pondéré en T_2^* sont utilisées avec des temps d'écho (T_E) faibles de 4,2 ms. Ces séquence ont été préférées à des échos de spin (angle de bascule de 60°) car, bien que le T_2^* soit plus sensible à la variation de champ magnétique que le T_2 (Partie I.2), la forte concentration en USPIO a nécessité l'utilisation de T_E très courts pour éviter un vide de signal trop important. Les images ont été prises en coupes sagittales[31], coronales[32] et transversales [33] de 2 mm.

La moitié des souris a été sacrifiée 3 heures après injection et l'autre moitié l'a été 24 heures post-injection.

Des organes de ces animaux ont été prélevés, séchés à 60°C et conservés à -20°C pour effectuer un dosage du fer permettant d'estimer la biodistribution de ces USPIO : vessie et urine, pancréas, intestin, rate, rein, foie, cœur, poumons et sang.

---

[31] Le plan sagittal est un plan qui sépare le corps dans le sens de la longueur en une partie gauche et une partie droite.
[32] Le plan coronal (ou frontal) est un plan perpendiculaire au plan sagittal qui coupe également le corps dans le sens de la longueur en le séparant en une partie antérieure ou ventrale et une partie postérieure ou dorsale. Ce plan permet d'avoir une vision complète du corps de face.
[33] Le plan transversal est un plan perpendiculaire au plan coronal qui sépare le corps en une partie craniale (du côté de la tête) et une partie caudale (du côté de la queue).

Le Tableau III.2.4 résume le nombre d'animaux analysés pour chaque condition et la relaxivité r_2 de chaque produit.

	Produit testé	Nombre de campagnes IRM	Nombre de souris testées	Nombre de souris mortes avant analyse	Nombre de souris réellement analysées	Relaxivité r_2 ($mM^{-1}.s^{-1}$)
1 et 3 heures	Sérum physiologique	2	9	3	6	0
	Cliavist®	2	8	2	6	260 ± 14
	USPIO-$mPEG_{2000}$	2	6	0	6	260 ± 9
	USPIO-$mPEG_{5000}$	2	8	2	6	265 ± 10
	USPIO-$mPEG_{2000}$ + DMSA	1	2	0	2	297 ± 9
24 heures	Sérum physiologique	2	4	0	4	0
	Cliavist®	2	6	2	4	260 ± 14
	USPIO-$mPEG_{2000}$	2	5	1	4	260 ± 9
	USPIO-$mPEG_{5000}$	2	4	1	3	265 ± 10
	USPIO-$mPEG_{2000}$ + DMSA	1	2	0	2	297 ± 9
	Total		**45***	**11**	**34***	

Tableau III.2.4 : Nombres de souris, testées par produit étudié, mortes avant analyse et réellement analysées. Les relaxivités r_2 de chaque produit sont également rappelées. Les nombres de souris testées et réellement analysées sont donnés sur la ligne total du tableau. Il faut noter qu'une partie des souris passées en IRM 3 heures post-injection, l'étaient aussi 24 heures post-injection alors que d'autres étaient sacrifiées.*

III.2.2.1.4 Les techniques de quantification de la biodistribution des USPIO dans différents organes

La quantité de nanoparticules d'oxydes de fer présente dans les organes préalablement séchés a été estimée de deux manières différentes :

1) Les organes séchés ont été dissous dans 1 à 2 mL d'acide nitrique fumant (69%). Les solutions ont ensuite été filtrées à un seuil de coupure de 0,2 µm et diluées 100 fois pour être dans des conditions moins acides pour doser par ICP (inductively coupled plasma) le fer présent et ainsi remonter à la teneur en nanoparticules dans les organes (Boutry *et al.* 2005; Brillet *et al.* 2005; Chen *et al.* 2009). Seuls les foies, les cœurs et les reins ont été analysés dans cette partie.
2) Des coupes histologiques des foies et des cœurs ont été effectuées et les USPIO ont été révélés par bleu de Prusse (Dousset *et al.* 1999).

III.2.2.2 Mesures des contrastes IRM obtenus chez les souris

Les souris ont été analysées en IRM à différents temps après injection des USPIO testés (1 heure, 3 heures et 24 heures). Des images en coupes sagittales, coronales et transversales ont été réalisées (Figure III.2.8).

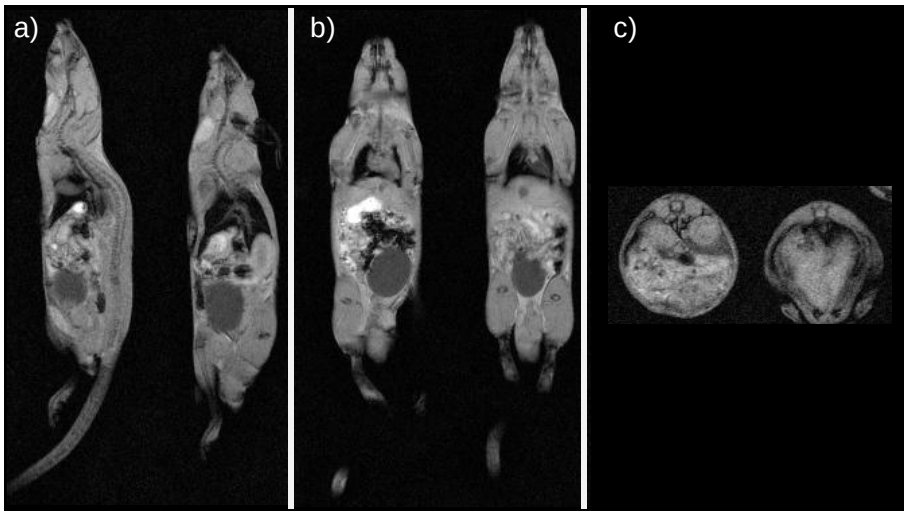


Figure III.2.8 : Images IRM 3T en séquences écho de gradient de 2 souris 1 heure post-injection de sérum physiologique en coupes : a) sagittales ; b) coronales et c) transversales. T_E 2,9 ms ; T_R 300 ms ; épaisseur de coupe 2 mm ; résolution 0,35 µm²

III.2.2.2.1 Principe de mesure des contrastes en IRM

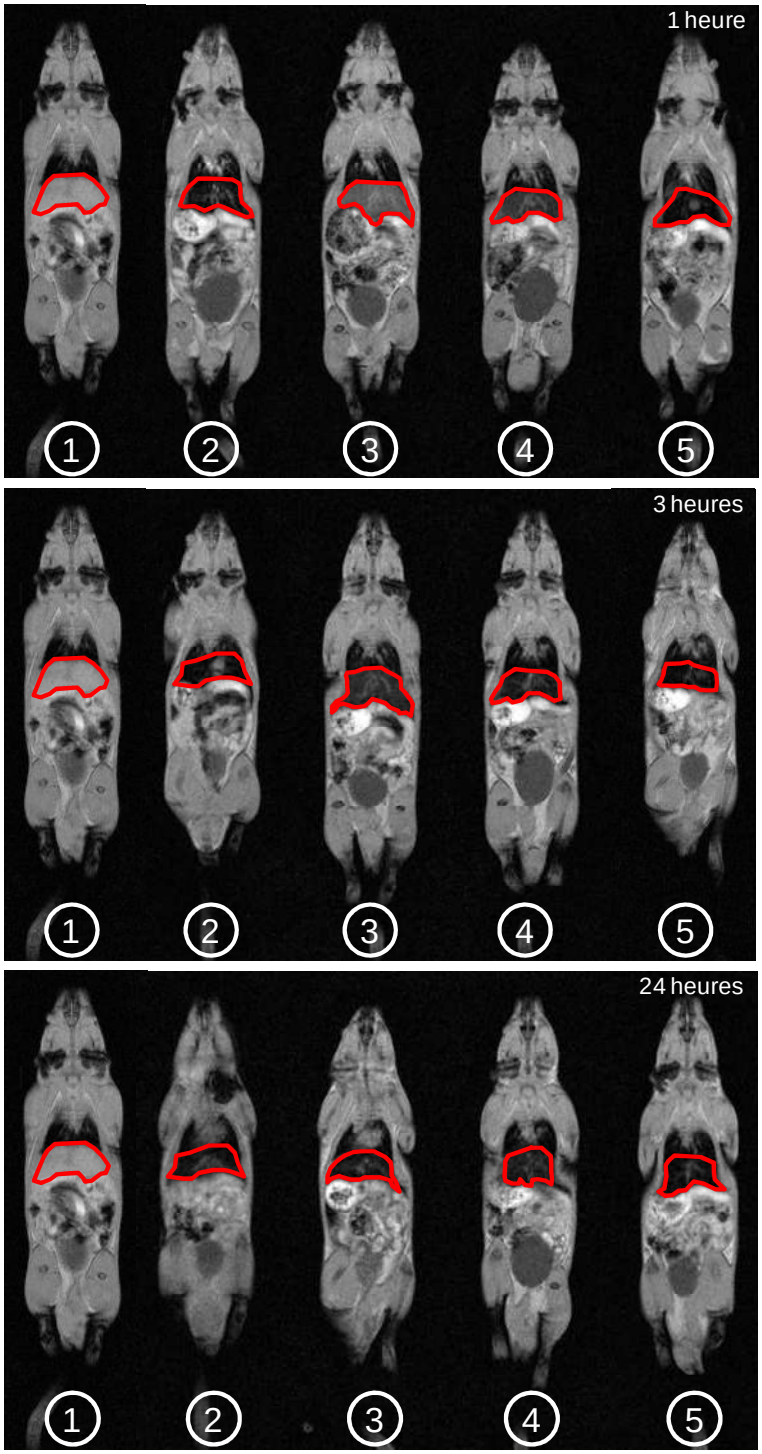
Le Cliavist® étant un agent de contraste majoritairement hépatique (partie III.1.2) et les applications visées étant les pathologies cardiovasculaires, les signaux provenant des foies et des cœurs ont été évalués. Pour savoir si la clairance des nanoparticules est urinaire, les signaux des reins et de la vessie ont également été mesurés.
Les contrastes ont été mesurés sur des coupes coronales pour toutes les souris utilisées à tous les temps d'imagerie post-injection.

A l'aide du logiciel image-J, des valeurs de niveaux de gris[34] ont été mesurées sur les différents organes des animaux et comparées aux signaux des souris « contrôles ». Si les valeurs de niveaux de gris étaient inférieures au contrôle, alors le contraste était considéré comme négatif (type T_2) et si elles étaient supérieures alors le contraste était positif (type T_1).

III.2.2.2.2 Valeurs des signaux obtenus sur les cœurs et foies des souris

Les signaux des foies et des cœurs ont été évalués en mesurant les niveaux de gris sur des zones sélectionnées comme présentées dans la Figure III.2.9. Les vessies et les reins ont également été observés.

[34] La mesure de niveau de gris sous le logiciel image-J donne la valeur 0 pour le noir total et 2047 pour le blanc total soit 2048 niveaux de gris différents.



1) Sérum physiologique (762 ± 13 u.a.)
2) Cliavist® (109 ± 2 u.a.)
3) USPIO-mPEG$_{2000}$ (490 ± 26 u.a.)
4) USPIO-mPEG$_{5000}$ (342 ± 25 u.a.)
5) USPIO-mPEG$_{2000}$ + DMSA (67 ± 6 u.a.)

1) Sérum physiologique (762 ± 10 u.a.)
2) Cliavist® (113 ± 2 u.a.)
3) USPIO-mPEG$_{2000}$ (426 ± 22 u.a.)
4) USPIO-mPEG$_{5000}$ (241 ± 34 u.a.)
5) USPIO-mPEG$_{2000}$ + DMSA (90 ± 3 u.a.)

1) Sérum physiologique (726 ± 26 u.a.)
2) Cliavist® (59 ± 10 u.a.)
3) USPIO-mPEG$_{2000}$ (160 ± 26 u.a.)
4) USPIO-mPEG$_{5000}$ (130 ± 4 u.a.)
5) USPIO-mPEG$_{2000}$ + DMSA (60 ± 1 u.a.)

Figure III.2.9 : IRM 3T en séquences écho de gradient de souris de haut en bas 1h, 3h et 24 h post-injection de sérum physiologique (1), de Cliavist® (2), des nanoparticules modifiées par du mPEG$_{2000}$-Si (3), du mPEG$_{5000}$-Si (4), du mPEG$_{2000}$-Si et du DMSA (5). Les cercles rouges représentent les foies analysés dont les valeurs du signal sont données à droite de chaque image en unités arbitraires. T_E 2,9 ms ; T_R 300 ms ; épaisseur de coupe 2 mm ; résolution 0,35 µm²

A première vue, tous les produits utilisés semblent produire un contraste négatif majoritairement sur le foie. Les cœurs, vessies et reins ne semblent pas avoir de signaux significativement différents par rapport aux souris servant de contrôle.

Cependant, ces signaux hépatiques ne semblent pas tous équivalents en fonction du temps. Ainsi, la Figure III.2.10 représente cette évolution pour les différents USPIO utilisés.

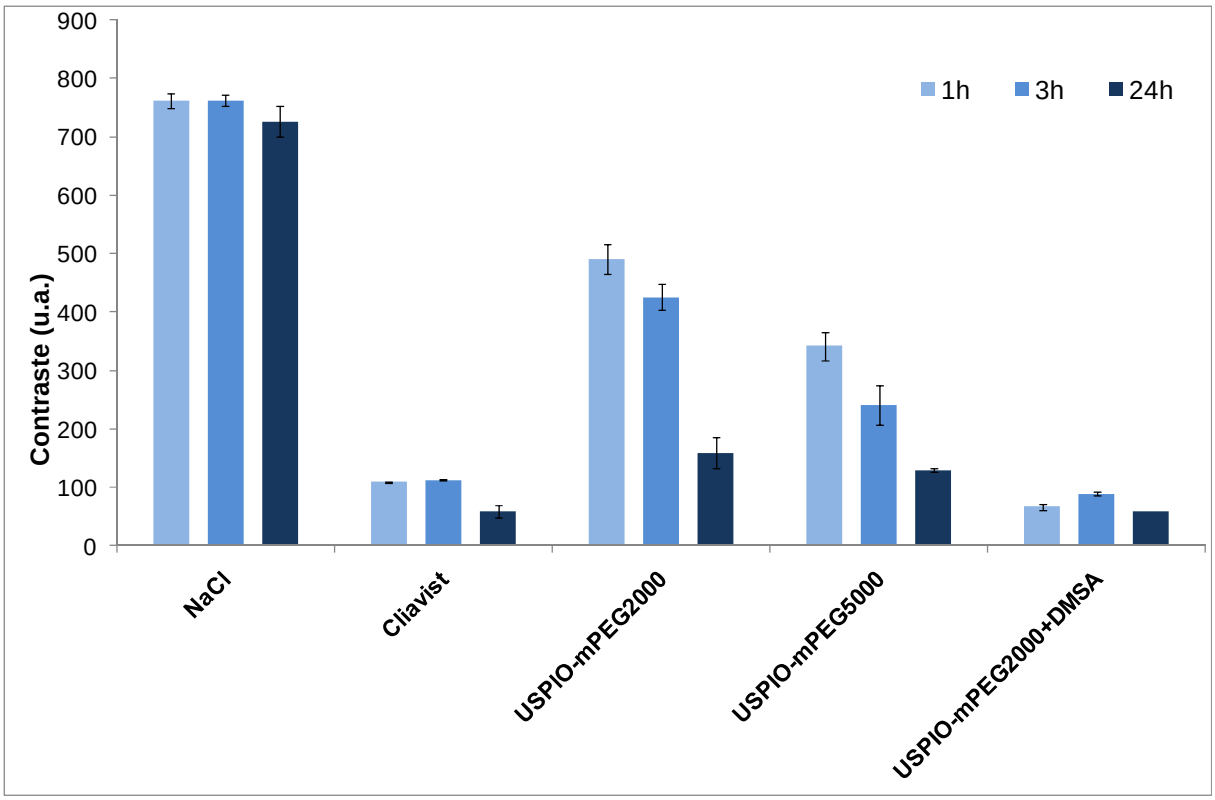


Figure III.2.10 : Evolution en fonction des temps de mesure post-injection des signaux des foies de souris ayant reçu du sérum physiologique, du Cliavist®, des USPIO modifiés par du $mPEG_{2000}$-Si, du $mPEG_{5000}$-Si et du $mPEG_{2000}$-Si et du DMSA.

Comme attendu, le Cliavist® a conféré un contraste négatif hépatique très important en moins d'une heure et ce contraste n'a pas beaucoup évolué en fonction du temps. Les USPIO-$mPEG_{2000}$ avec le DMSA ont également créé un contraste négatif très rapidement et de valeurs similaires à celles du Cliavist®.

Au niveau des oxydes de fer pegylés, les valeurs des signaux hépatiques 1 et 3 heures après injection n'ont pas été aussi basses qu'avec les deux précédents produits. Cependant, au bout de 24 heures, les signaux se sont également retrouvés au niveau de celui généré par le Cliavist®. Cet effet de retardement dans le contraste hépatique laisse penser que les USPIO modifiés par du mPEG ont pu circuler plus longtemps dans l'organisme et donc être potentiellement plus longtemps au contact d'autres tissus et organes de la souris.

Ces résultats ont déjà été observés dans la littérature. Il est communément admis que les oxydes de fer de tailles hydrodynamiques supérieures à 40 nm ont majoritairement des biodistributions hépatiques et rapides (Okuhata 1999), comme c'est notamment le cas pour le Cliavist® (Reimer *et al.* 1998).

Le retard de captation par le foie des USPIO pegylés peut être lié à la taille des nanoparticules. Ce temps de circulation allongé pour les petits USPIO a été souvent observé dans la littérature (Okuhata 1999; Wang *et al.* 2001; Mornet *et al.* 2006). C'est vraisemblablement pour cette raison que les nanoparticules pegylées présentent un effet contrastant hépatique retardé par rapport au Cliavist® et aux USPIO-$mPEG_{2000}$ avec du DMSA, leurs tailles hydrodynamiques étant inférieures à 40 nm alors que les autres produits ont dû dépasser cette valeur seuil (Mornet *et al.* 2004). Comme déjà observé lors de l'étude de cytotoxicité (partie III.1) les nanoparticules avec du PEG_{2000} et du DMSA s'étaient

agglomérées en conditions physiologiques augmentant leurs tailles moyennes et les rendant sans doute internalisables plus rapidement par le foie.

Par ailleurs, la fonctionnalisation avec du PEG a vraisemblablement permis de retarder le phénomène d'opsonisation (Duguet *et al.* 2006) c'est-à-dire d'adsorption de protéines plasmatiques à la surface des nanoparticules et leurs phagocytoses par les macrophages de l'organisme (résultats déjà observé dans la partie III.1.4.2). Ainsi, les USPIO pegylés ont pu être plus furtifs aux défenses de l'organisme permettant ainsi un plus grand temps de circulation avant accumulation dans le foie. Ce résultat n'a pas été observé sur les USPIO-mPEG$_{2000}$ avec du DMSA sans soute à cause de la trop faible proportion de PEG en surface et surtout la charge de surface conférée par le DMSA (moins de 0,8 PEG/nm² : partie II.2.3.2). En effet, l'absence de charge nette des USPIO uniquement pegylés à pH physiologique a dû retarder leur accumulation dans les tissus riches en macrophages. Faure *et al* (Faure *et al.* 2009), Goutayer *et al* (Goutayer *et al.* 2010) ainsi que Corot *et al* (Corot *et al.* 2006) ont démontré que la charge nette des USPIO favorise leur captation hépatique. Ainsi, la distribution rapide dans le foie des USPIO-mPEG$_{2000}$ avec du DMSA peut également s'expliquer par la charge nette négative de ces nanoparticules.

Les cœurs, vessies et reins analysés n'ont pas montré de différences de signal significatives par rapport aux souris ayant reçu du sérum physiologique. La Figure III.2.11 présente les signaux mesurés sur les cœurs pour les quatre produits. Les résultats sont sensiblement identiques pour les mesures effectuées sur les vessies et les reins.

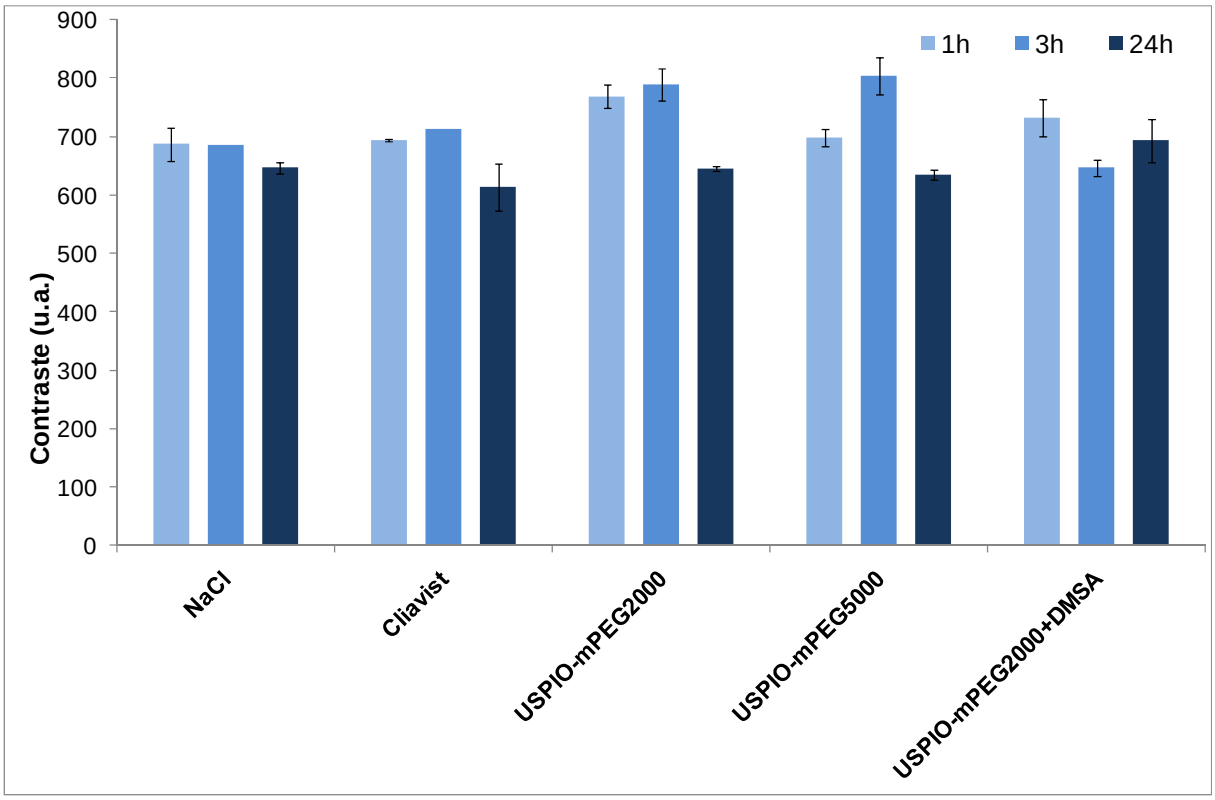


Figure III.2.11 : Evolutions en fonction des temps de mesures post-injection des signaux des cœurs de souris injectées avec du sérum physiologique, du Cliavist®, des nanoparticules modifiées par du mPEG$_{2000}$-Si, du mPEG$_{5000}$-Si et modifiées par du mPEG$_{2000}$-Si et du DMSA.

Les USPIO testés n'ont pas semblé induire un effet contrastant sur les autres organes, notamment sur le cœur. Les signaux mesurés l'ont été sur le muscle du myocarde et non sur la

cavité cardiaque. Or, en regardant les images des souris une heure post-injection (Figure III.2.12), on peut voir un effet T_1 du Cliavist® sur la cavité cardiaque que nos USPIO n'ont pas. Cet effet provient vraisemblablement de la circulation du Cliavist® dans le sang présent dans la cavité.

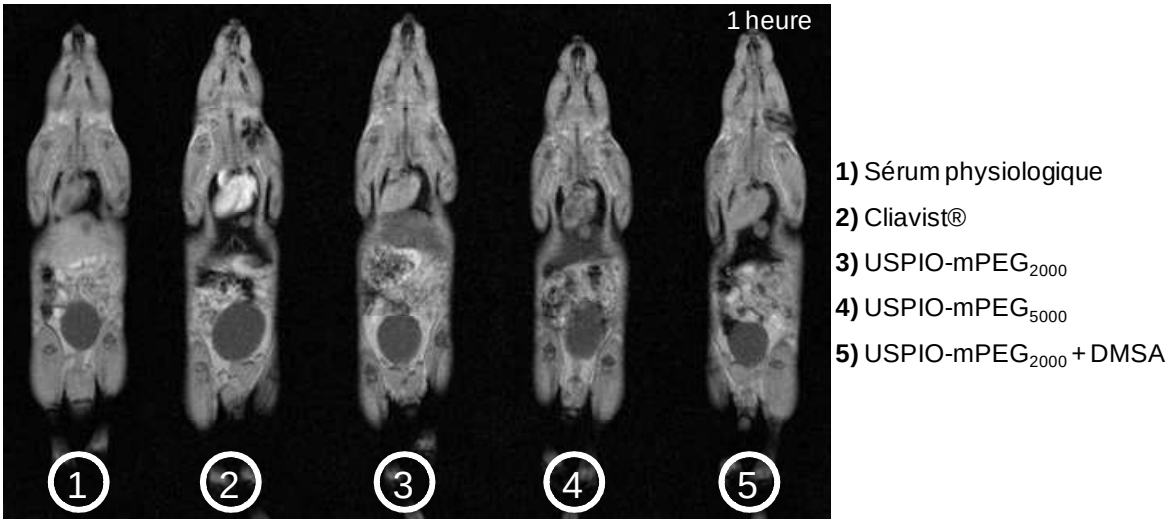


Figure III.2.12 : IRM 3T en séquences écho de gradient de souris post-injection de sérum physiologique, de Cliavist®, de nanoparticules modifiées par du $mPEG_{2000}$-Si, du $mPEG_{5000}$-Si, du $mPEG_{2000}$-Si et du DMSA. T_E 2,9 ms ; T_R 300 ms ; épaisseur de coupe 2 mm ; résolution 0,35 µm²

Ce contraste T_1 du Cliavist® est seulement observé une heure post-injection et pourrait poser des problèmes pour la détection de pathologies cardiovasculaires. Il serait en effet intéressant de coupler des USPIO conduisant à un effet T_2 à des complexes de gadolinium générant quant à eux un effet T_1. Ces agents à base de Gd sont classiquement utilisés pour imager les zones de myocarde infarcies sur des patients post-infarctus. Or, proche de ces zones, il pourrait être intéressant de diagnostiquer également des zones de fibroses (riches en macrophages). L'association avec des USPIO prend alors tout son sens, si tant est que ceux-ci n'aient pas un contraste de type T_1, comme c'est le cas du Cliavist® pour certaines séquences.

Cet effet T_1 pourrait être dû, soit à la plus petite taille des cristallites du Cliavist® par rapport à nos USPIO (4,2 nm contre 7,7 nm en DRX) (Roch *et al.* 2005; Tromsdorf *et al.* 2009). La fonctionnalisation pourrait également jouer un rôle sur la relaxation longitudinale des protons aux alentours des nanoparticules.

Les nanoparticules pegylées ont montré un temps de circulation dans l'organisme de l'ordre de 24 heures mais sans accumulation dans aucun autre organe que le foie. Il sera donc nécessaire de fonctionnaliser ces nanoparticules avec des molécules ou des protéines spécifiques à des pathologies cardiovasculaires pour cibler ces organes en veillant cependant à ne pas masquer l'effet protecteur du PEG et à ne pas augmenter significativement les tailles d'agrégats, ces deux paramètres semblant être la cause de ce retardement.

III.2.2.3 La biodistribution du fer dans les organes

Dans cette partie, le fer a été dosé dans le foie et le cœur par ICP et par révélation au bleu de Prusse.

III.2.2.3.1 Dosage du fer dans les organes par ICP

Les foies, les cœurs et les reins préalablement séchés ont été dissous dans de l'acide nitrique (69%) puis filtrés à 0,2 µm et dilués 100 fois. Après analyse en ICP, la quantité de fer présente est exprimée en mg_{Fe}/L (ou ppm de fer) pour le sérum physiologique, le Cliavist®, les USPIO-$mPEG_{2000}$ et les USPIO-$mPEG_{5000}$[35]. Cette valeur a pu être ramenée en µg de fer par mg d'organe sec (organes ayant été au préalable séchés). La précision de l'appareil utilisé étant de l'ordre de 0,5 à 1 ppm, le seuil de précision des résultats est placé sur la Figure III.2.13. Les masses d'organes étant différentes, les seuils ont été de :

1) 0,05 $\mu g_{Fe}/mg_{organe}$ pour le foie (masse moyenne ≈ 500 mg)
2) 0,40 $\mu g_{Fe}/mg_{organe}$ pour le cœur (masse moyenne ≈ 45 mg)
3) 0,15 $\mu g_{Fe}/mg_{organe}$ pour le rein (masse moyenne ≈ 150 mg)

[35] Les dosages en spectrométrie de flamme n'ont pas été réalisés sur des organes de souris ayant reçu les USPIO-$mPEG_{2000}$ + DMSA car ces prélèvements d'organes ont eu lieu lors de la première campagne d'IRM *in vivo* et ce produit n'avait pas été utilisé lors de ces essais.

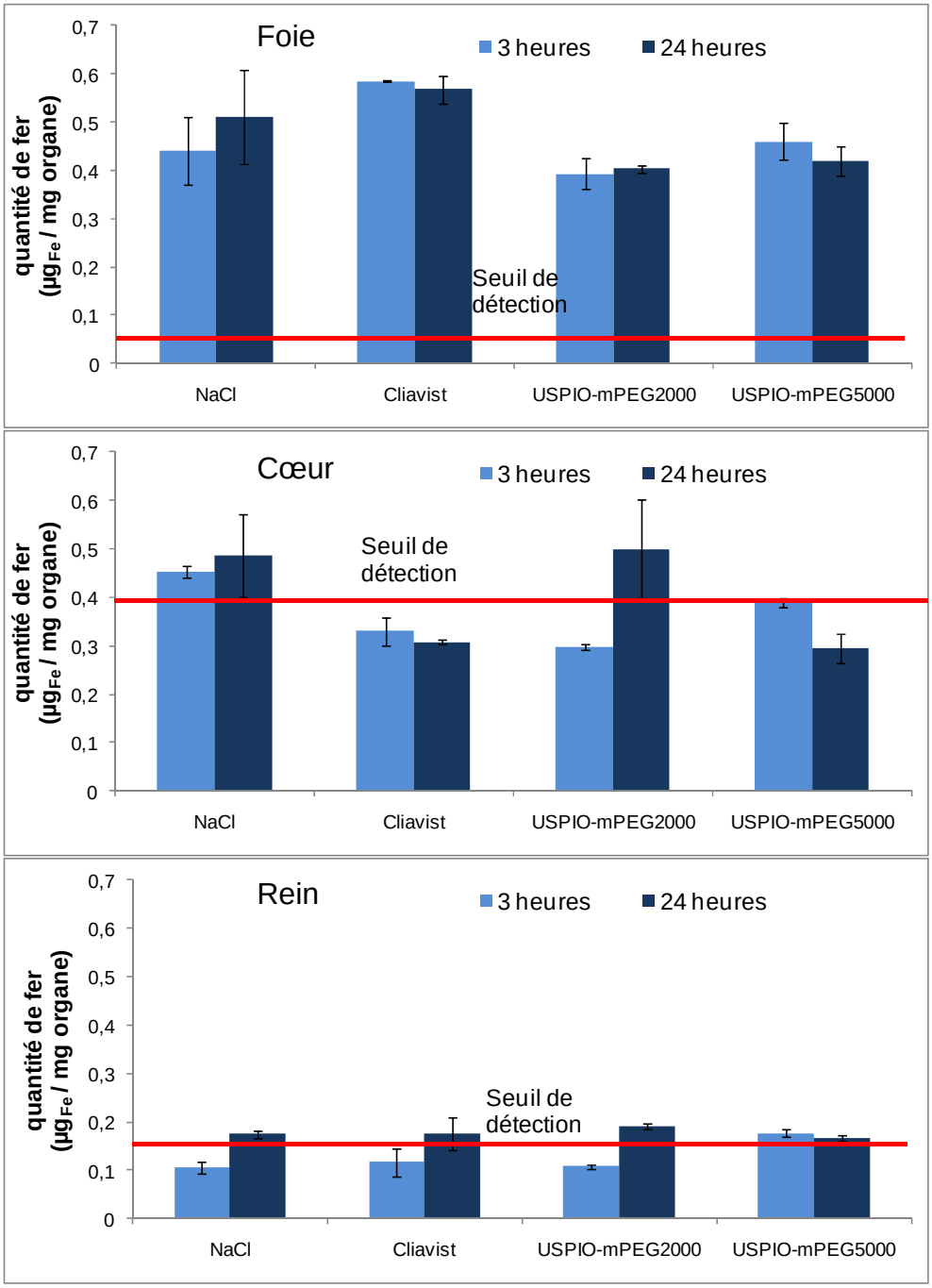


Figure III.2.13 : Quantités de fer présent dans les organes des souris sacrifiées 3 et 24 heures après injection de sérum physiologique, de Cliavist®, d'USPIO-mPEG$_{2000}$ et d'USPIO-mPEG$_{5000}$. Les organes dosés par spectrométrie de flamme sont les foies, les cœurs et les reins. La ligne rouge distingue le seuil de détection minimale de l'appareil (> 0,5 ppm ramenés en masse d'organe).

Avant de discuter des résultats obtenus pour les foies, on peut remarquer que les quantités de fer présent dans les cœurs et les reins ne sont pas significativement différentes car les valeurs sont toutes proches de la limite de sensibilité de l'appareil.

Au niveau des foies (l'organe où le contraste en IRM était visible), les masses de fer trouvées par analyses en ICP ne permettent pas de conclure quant à la présence ou non d'une grande quantité d'USPIO dans cet organe. Bien que le seuil de détection soit dépassé, les concentrations en fer dans les solutions diluées ont dû être trop faibles pour appréhender une différence entre différents USPIO et le contrôle. Il aurait été logique de détecter plus de fer dans le foie, les USPIO étant majoritairement localisés à cet endroit, par rapport à la quantité

totale de fer normalement présente dans cet organe. De plus, en diluant 100 fois les solutions, les différences entre les contrôles et les organes injectés ont été également divisées par 100 ne permettant peut être plus de mesurer une quelconque variation. L'appareil utilisé étant une ICP optique, sa précision est trop faible pour détecter de si faibles quantités de fer.

De nouveaux essais ont été prévus en utilisant de nouveaux protocoles pour dissoudre les organes comme de l'acide nitrique dix fois moins concentré couplé à de l'eau oxygénée (H_2O_2) permettant d'éviter une dilution trop importante des solutions, une ICP-MS sera par ailleurs utilisé.

Les analyses en ICP optique n'ont pas permis de quantifier correctement le nombre d'USPIO présents dans les différents organes sans doute à cause du manque de précision de l'appareil. De nouvelles mesures sur une ICP à spectrométrie de masse (ICP-MS) devront être réalisées pour quantifier la présence d'USPIO dans les organes.

III.2.2.3.2 Dosage du fer dans les organes par révélation au bleu de Prusse

Une autre méthode de dosage du fer dans les organes a été la révélation par le bleu de Prusse. Comme lors de la partie III.1.4.1, des coupes de foies et de cœurs prélevés lors des essais IRM ont été réalisées et ont été traitées au bleu de Prusse.
La Figure III.2.14 résume les images obtenues sur des coupes de foies de souris sacrifiées 3 et 24 heures après injection des 4 produits testés. Des coupes du cœur 24 heures après injection ont également été présentées.

Dans le cas du Cliavist® et des UPSIO-PEG_{2000} + DMSA, le nombre de taches bleues sur les coupes de foie 3 heures et 24 heures après injection semble être identique laissant supposer que la majorité des oxydes de fer étaient déjà présents dans cet organe après 3 heures. Au niveau des USPIO pegylés, le nombre de taches augmente entre 3 et 24 heures après injection corroborant l'effet retardateur de l'accumulation de ces produits dans le foie.
Les révélations chimiques des cœurs n'ont pas révélé la présence de fer et donc d'USPIO dans cet organe de la même manière que les mesures précédentes n'avaient pas révélé leurs présences en IRM.

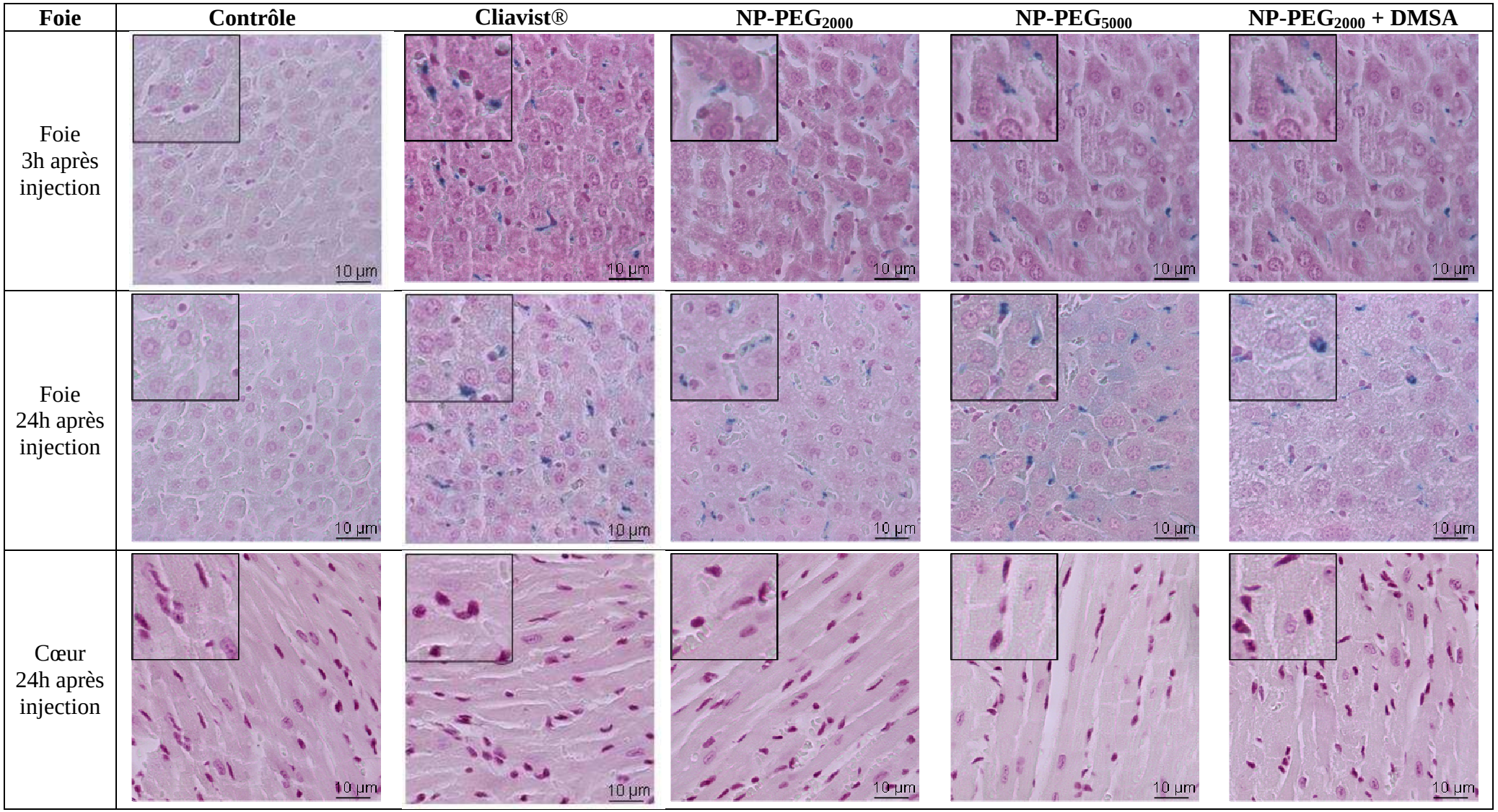


Figure III.2.14 : Observations en microscopie optique de coupes de foies 3 heures et 24 heures post-injection et de coupes de cœurs 24 heures post-injection par, du sérum physiologique, du Cliavist®, des nanoparticules greffées avec du $mPEG_{2000}$ ou du $mPEG_{5000}$ et des nanoparticules greffées avec du $mPEG_{2000}$ et du DMSA. L'encart en haut à gauche est un grossissement d'une partie de la coupe. Les taches bleues représentent les USPIO révélés par le bleu de Prusse.

III.2.2.4 Conclusion sur l'imagerie in vivo

Les nanoparticules synthétisées ont montré un effet contrastant majoritairement hépatique sur les souris testées de même efficacité que le Cliavist®. Le PEG, l'absence de charge et la petite taille des agrégats ont sans doute permis de retarder l'accumulation dans le foie de certains USPIO. Cet effet furtif des agents de contraste pegylés a permis une plus grande circulation dans l'organisme et pourrait, en couplant les USPIO à une molécule ou une protéine ne modifiant pas significativement ses propriétés, permettre de détecter des pathologies spécifiques autres qu'hépatiques.

Les nanoparticules $mPEG_{2000}$-DMSA ont le même pouvoir contrastant que le Cliavist® sans l'effet T_1 cardiaque indésirable pour les applications cardio-vasculaires. Le seul problème est la captation hépatique de ces USPIO en moins d'une heure. Le ciblage recherché pourra être obtenu par le greffage d'anticorps possédant des cystéines surnuméraires. De tels anticorps peuvent être obtenus, par ingénierie moléculaire, et se lier aux fonctions thiols protégées par les chaînes de $mPEG_{2000}$-Si (partie II.2.3.2).

Une dernière possibilité pour la détection de pathologies spécifiques, notamment cardiovasculaires, serait l'imagerie cellulaire. En marquant des macrophages par nos USPIO et en les injectant comme « agents de contraste », il serait possible de cibler des zones inflammatoires, ces cellules se localisant habituellement aux alentours de ces zones.

III.3 Conclusion générale sur les essais biologiques

Les USPIO fonctionnalisés n'ont pas montré de toxicité apparente sur trois types cellulaires différents (hépatocytes, cardiomyocytes et macrophages) à l'exception des nanoparticules avec du $mPEG_{5000}$-Si. La présence du catalyseur utilisé lors de la synthèse de ce polymère (DBTL) a sans doute causé cette toxicité et de nouveaux greffages seront nécessaires en veillant à éliminer, ou à éviter, cette molécule pour confirmer ces observations.
L'internalisation de ces USPIO par les macrophages a été mise en évidence par révélation chimique du fer de ces nanoparticules au bleu de Prusse et par microscopie électronique. Les USPIO-$mPEG_{2000}$ ont vu leur captation retardée par rapport aux autres nanohybrides.
En parallèle, les nanoparticules pegylées couplées à un fluorophore ont été observées en microscopie confocale qui a confirmée l'internalisation d'USPIO par les cardiomyocytes.

Les mesures des relaxivités r_2 sur gels de ces agents de contraste n'ont pas montré de différence entre les diverses modifications de surface (charge, longueur du polymère) ou la morphologie des USPIO (tailles de cristallite et d'agrégat) mais ont confirmé l'effet T_2 de ces nanomatériau.

Sur le modèle murin, la biodistribution hépatique de nos USPIO pegylés a été retardée plus de 3 heures après injection sans doute à cause de la différence de taille, de charge et grâce à l'action hydrophile de ce polymère. Il serait nécessaire d'étudier la toxicité animale des ces nanohybrides sur un plus long temps d'analyse. En effet, Corot *et al* (Corot *et al.* 2006) ont montré que la majorité du fer injecté était éliminée après plus de 84 jours dans les *faeces*. Ce long temps d'élimination devra donc être pris en compte et évalué pour les prochaines études *in vivo*.

Enfin, L'absence d'effet T_1 des USPIO-$mPEG_{2000}$ + DMSA ainsi que la possibilité de greffer des molécules spécifiques permettraient de les utiliser dans des applications cardiovasculaires.

Conclusion générale

Ce travail de thèse consistait à élaborer des nanoparticules d'oxyde de fer pouvant être utilisées comme agents de contraste en imagerie médicale, plus particulièrement en IRM.

L'objectif de ce travail était tout d'abord de synthétiser des nanoparticules d'oxyde de fer en **optimisant** leurs tailles et leur dispersion pour des applications biomédicales (stockage de manière stable pendant une longue période) (partie II.1). Par méthode de co-précipitation (Massart 1981) d'un ratio d'un ion ferreux pour deux ions ferriques dans de la soude des nanoparticules de structure spinelle aux propriétés superparamagnétiques sont obtenues. La suspension est ensuite peptisée à pH acide (pH = 3) dans l'acide nitrique pour stabiliser les nanoparticules par répulsions électrostatiques grâce aux groupements hydroxyles présents à leurs surfaces. Par analyses thermogravimétriques le nombre de ces groupements a été déterminé et est de 7 OH/nm². Le lavage par dialyse a été proscrit à cause de l'apparition d'une phase non désirée : la goethite (γ-FeOOH). Par analyse en diffraction des rayons X, la phase synthétisée est bien la structure spinelle recherchée avec un état d'oxydation compris entre celui de la magnétite (Fe_3O_4) possédant le ratio Fe^{II}/Fe^{III} stœchiométrique et celui de la maghémite (γ-Fe_2O_3) ne possédant que des ions ferriques. La déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène (δ) a été mesurée par la méthode de Poix et a donné une composition de formule $Fe_{3(1-0,077)}O_4$ montrant qu'une partie assez importante des ions ferreux se sont oxydés sous air et en particulier lors des lavages acides.

Plusieurs cycles de centrifugation ont été appliqués à ce ferrofluide acide pour tenter de diminuer la taille moyenne des agrégats. Ainsi, par mesure en diffraction des rayons X, par comptage en microscopie électronique en transmission et par mesure de la surface spécifique, la taille des cristallites est d'environ (9 ± 2) nm. La surface spécifique de ces nanoparticules est d'environ 100 $m^2.g^{-1}$. Par PCS et par comptage en MET, la taille des agrégats est d'environ 20 nm avec une population de gros agrégats (tailles supérieures à 150 nm) qui a diminué par rapport au ferrofluide n'ayant pas subi de cycles de centrifugation.

L'analyse de la surface par zêtamétrie a montré une charge nulle de ces nanoparticules aux alentours du pH physiologique (pH = 7,4) entraînant leur agglomération et leur sédimentation. De plus, quel que soit le pH, ces phénomènes sont également observés dans des solutions de fortes concentrations en sel. Ces contraintes empêchent d'utiliser les oxydes de fer nanostructurés « nus » pour des applications biomédicales et a entraîné la deuxième partie de cette thèse.

Il a ainsi été nécessaire d'étudier l'influence de molécules organiques sur la **stabilisation** et sur la morphologie des nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées (partie II.2).

Deux acides carboxyliques ont tout d'abord été testés : l'acide citrique et le DMSA.

1) Dans le premier cas, l'acide citrique a été utilisé directement pendant la co-précipitation des ions ferreux et ferriques pour étudier son influence sur la morphologie et sur l'oxydation des nanoparticules obtenues. Trois ratios acide citrique/fer ont été testés (5, 20 et 100%). En premier lieu, utilisé dans ces conditions, l'acide citrique a un effet stabilisant quel que soit le ratio utilisé grâce aux charges négatives de cette molécule qui chargent négativement les oxydes de fer à pH physiologique (répulsion électrostatique). De plus, l'acide citrique a permis de diminuer la taille moyenne des cristallites (mesurée par diffraction des rayons X) de

9,8 nm à 7,6 nm pour les ratios 5 et 20% et 5,5 nm pour le ratio 100% grâce à l'effet chélatant de cette molécule entraînant une réduction de la croissance des cristallites. A ce dernier ratio, le paramètre δ a diminué de 0,077 à 0,057 montrant qu'en plus de son effet stabilisant et chélatant l'acide citrique peut avoir un effet antioxydant. En augmentant le ratio lors de la co-précipitation, des analyses en XPS et en zêtamétrie ont montré l'élimination des groupements hydroxyles et un déplacement du point isoélectrique vers les pH acides.

2) Dans un second cas, l'acide 2,3-dimercapto-succinique (DMSA) a été utilisé pour stabiliser les oxydes de fer après synthèse. De la même manière que l'acide citrique, le DMSA stabilise les nanoparticules par répulsion électrostatique à pH supérieur à 4 grâce à ces deux fonctions carboxyliques. La floculation des nanoparticules à pH inférieur à 4 peut être un outil intéressant pour éliminer des molécules en excès en solution. La présence de fonctions thiols (SH) sur le DMSA nous a fait envisager cette molécule pour des couplages ultérieurs avec des protéines ou des anticorps. Cependant, en essayant de mesurer les fonctions thiols libres avec le réactif Ellman, nous avons démontré comme Roger *et al* (Roger *et al.* 1999) qu'elles s'inactivent rapidement en formant des ponts disulfures.

Les acides carboxyliques stabilisent les nanoparticules par répulsion électrostatique et peuvent avoir une influence sur la morphologie quand ils sont utilisés directement durant l'étape de co-précipitation. En revanche, ils ne permettent pas de conserver longtemps cette stabilité dans le cas de solutions à fortes forces ioniques. A partir de ces observations la stabilisation stérique par le polyéthylène glycol a été envisagée.

Des mPEG de masses moléculaires de 550, 2000 et 5000 $g.mol^{-1}$ ont été couplés à des fonctions silanes par le biais de l'ICPTES pour pouvoir se greffer de manière covalente aux hydroxyles de surface des nanoparticules. En premier lieu, plus la chaîne de polymère est longue, plus la taille mesurée en nombre en PCS augmente. Cette différence de taille n'est pas observée en MET sans doute par la difficulté de voir la couche de polymère avec cet instrument. Avec les $mPEG_{2000}$-Si et $mPEG_{5000}$-Si, les nanoparticules sont stabilisées dans les conditions physiologiques (pH = 7,4 et NaCl = 0,15 M), un peu moins avec le $mPEG_{550}$-Si, les nanoparticules décantant dans le temps dans ce cas.

Par analyses thermogravimétriques, il y a entre 4 et 6 polymères par nm^2 sur les nanoparticules. Par analyses XPS, la disparition du signal du fer au profit du carbone, de l'oxygène et du silicium du mPEG-Si confirme la présence importante de ces molécules à la surface des oxydes de fer et ce, proportionnellement aux longueurs des mPEG-Si. La liaison covalente Si-O-Fe n'a pas pu être mise en évidence mais toutes les analyses ont prouvé la présence et l'effet stabilisant de ces polymères. La présence résiduelle de catalyseur de réaction (DBTL) dans le cas des nanoparticules greffées avec du $mPEG_{5000}$-Si a ensuite posé des problèmes de cytotoxicité.

Des agents fluorescents (rhodamine) ont ensuite été greffés sur ces nanoparticules. Deux méthodes ont été utilisées :

1) Dans un premier temps, de la rhodamine a été couplée à une fonction silane pour réagir avec les hydroxyles de surface comme dans le cas des mPEG-Si. Le nombre de molécules par nm^2 a été estimé par mesures d'absorbances en spectroscopie UV-visible à hauteur de 0,01 et 0,1 molécule par nm^2.
2) La combinaison du mPEG-Si avec le DMSA, a permis de conserver libres les fonctions thiols de cet acide carboxylique pour pouvoir coupler les nanoparticules avec des molécules thio-réactives. Des premiers essais ont permis de greffer des

rhodamines couplées à une fonction maléimide démontrant la possibilité de conserver les fonctions thiols libres du DMSA grâce au mPEG-Si (sur plusieurs semaines).

Ces agents couplés à des molécules fluorescentes ont pu être observés en microscopie optique pour estimer leurs interactions avec des cellules.

La troisième partie de ce travail a été d'élaborer des nanoparticules d'oxyde de fer à l'aide du dispositif de synthèse hydrothermal en continu pouvant s'étendre au domaine eau supercritique développé au sein de l'équipe MaNaPI. L'objectif était de transposer les synthèses de nanoparticules d'oxyde de fer au **domaine industriel** grâce au dispositif de notre équipe de recherche et de voir les potentialités de cette technique pour produire des suspensions stables d'USPIO de petites tailles.

Deux types de synthèses ont été étudiés :

1) Des synthèses hydrothermales à 150°C et à 25 MPa avec un débit de réactifs de 60 $mL.min^{-1}$ et un ratio d'ions ferreux et ferriques stœchiométrique (1:2) ont été réalisées. Des essais de modifications de surface en continu ont été tentés avec de l'acide citrique et du $mPEG_{2000}$-Si. Sans molécule fonctionnalisante, ces conditions de synthèse ont permis d'obtenir des nanoparticules d'oxydes de fer avec une proportion de près de 10% d'une phase non désirée car non superparamagnétique : l'hématite (α-Fe_2O_3). La phase majoritaire obtenue est de structure spinelle avec une déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène $\delta = 0,05$ et la taille des cristallites mesurée par DRX est de (5,4 ± 0,1) nm. Grâce à l'acide citrique et au mPEG-Si utilisés, la phase obtenue est plus proche de la magnétite (respectivement $\delta = 0,02$ pour l'acide citrique et $\delta = 0,043$ pour le mPEG-Si) et il n'y a plus d'hématite lors de ces conditions de synthèse. Avec l'acide citrique, les nanoparticules sont chargées négativement à pH physiologique et donc stabilisées avec des diamètres hydrodynamiques d'agrégats compris entre 30 et 60 nm. Les tailles des cristallites ont été diminuées jusqu'à (3,8 ± 0,1) nm.
2) Des synthèses en eau supercritique à 400°C et à 25 MPa avec un débit de réactifs de 30 $mL.min^{-1}$ ont également été réalisées. Dans cette partie, différents ratio d'ions ferreux et ferriques ont été testés : (3:0) et (2:1). Des synthèses ont été réalisées avec et sans base et avec ou sans acide citrique. Avec base, la co-précipitation en conditions supercritiques a permis d'obtenir des nanoparticules de magnétite, de maghémite et d'hématite. La proportion d'hématite diminue quand le taux d'ions ferreux augmente.
   Sans base, avec le ratio (1:2), la phase obtenue est seulement de l'hématite. Avec le ratio (3:0), la phase spinelle est majoritaire avec une proportion d'environ 60%. En ajoutant de l'acide citrique avec les ions ferreux (3:0), la phase obtenue est majoritairement la phase spinelle recherchée (moins de 1% d'hématite).

Avec le dispositif de l'équipe MaNaPI dans les conditions hydrothermales, il a été possible d'élaborer, en continu, des nanoparticules superparamagnétiques stabilisées par de l'acide citrique et de très petites tailles de cristallites (3,8 nm). En conditions supercritiques, des nanoparticules superparamagnétiques ont été élaborées mais avec des tailles trop importantes pour des applications biologiques. Cependant, la possibilité de synthétiser des nanoparticules sans base dans ces conditions est prometteuse pour les enjeux économiques et écologiques des prochaines années.

En dernier lieu, le troisième chapitre de ce manuscrit a consisté à **valider** les compatibilités biologiques des agents de contraste synthétisés. En raison du manque d'optimisation des oxydes de fer obtenus grâce au dispositif hydrothermal en continu, seules

les nanoparticules synthétisées et greffées dans les deux premières parties de ce travail ont été testées *in vitro* et *in vivo*.

Tout d'abord, les interactions de ces nanoparticules avec différents types cellulaires ont été observées *in vitro*. Des mesures par le test MTT ont montré l'absence de cytotoxicité des nanoparticules élaborées sur des macrophages, des cellules hépatiques et des cellules cardiaques à l'exception de celles fonctionnalisées par le $mPEG_{5000}$-Si. Cette toxicité semble s'expliquer par la présence résiduelle du catalyseur de la réaction de synthèse du mPEG-Si : le DBTL. Des valeurs de viabilités cellulaires supérieures à 100% ont laissé penser à des interactions des nanoparticules avec ce test (perturbations lors des mesures d'absorbance) sans doute dues soit à des problèmes de stabilité des suspensions d'oxyde de fer soit à l'internalisation de ces dernières par les cellules. Grâce à la révélation au bleu de Prusse et à des clichés MET, l'hypothèse de l'internalisation, dans le cas des macrophages, est confirmée. En parallèle, des clichés en microscopie confocale ont pu montrer la présence de nanoparticules fonctionnalisées par de la rhodamine dans des cardiomyocytes.

La deuxième étude biologique de ce travail s'est déroulée sur une IRM clinique de 3T. Les mesures de relaxivités ont montré que nos agents de contraste possèdent les mêmes efficacités que l'agent commercial de référence : le Cliavist®. Les légères différences observées pourraient s'expliquer par la différence de tailles des cristallites et des agrégats mais mériteraient une étude plus approfondie. La charge de surface ou la longueur du polymère utilisé n'ont pas semblé modifier la relaxivité des agents testés.

In vivo chez le modèle murin, les nanoparticules pegylées ont montrées un contraste T_2 hépatique retardé par rapport au Cliavist® et aux nanoparticules $mPEG_{2000}$-Si et DMSA, ouvrant la voie à des détections pathologiques plus larges. L'absence d'effet T_1 de nos USPIO est aussi un avantage pour les détections cardiovasculaires visées.

Perspectives de ce travail

Ce travail a contribué à intégrer la thématique « NanoBio » à la fois au consortium Pharmimage® et au projet 3 MIM en synthétisant des agents de contraste en IRM prometteurs pour des détections cardiovasculaires spécifiques.
Par ailleurs, cette étude ouvre la voie à de nombreuses autres perspectives.

En premier lieu, le changement de composition superparamagnétique pourrait permettre d'obtenir des relaxivités supérieures à celles des agents de contraste commerciaux. Les ferrites de manganèse semblent être de bons candidats (Tromsdorf *et al.* 2007) (Fe_2MnO_4). Des premières synthèses ont permis d'obtenir la phase désirée mais pas de manière optimale. Une solution d'un ion Mn^{2+} avec deux ions Fe^{3+} a été mélangée dans de la soude ou de l'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) à 90°C comme lors des synthèses de type Massart (Massart 1981). Les premiers résultats (Paris 2010) montrent l'absence de cristallisation avec l'utilisation d'hydroxyde d'ammonium mais des nanoparticules de ferrite de manganèse sont obtenues avec de la soude. En MET, les tailles des nanoparticules sont très polydisperses (Figure 1).

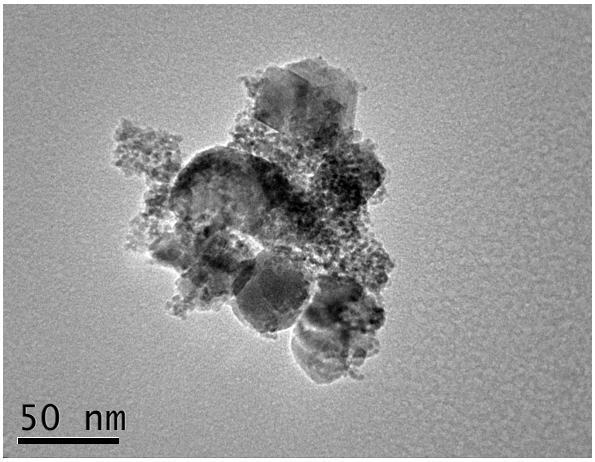


Figure 1 : Cliché MET de nanoparticules de ferrites de manganèse obtenues par co-précipitation classique de deux ions Fe^{3+} pour un ion Mn^{2+} dans de la soude.

Il reste à optimiser la synthèse de ces nanoparticules et à tester leurs interactions avec des milieux biologiques (toxicité, internalisation, …) et leur efficacité comme agent de contraste.

Pour limiter la toxicité de ces nanoparticules et faciliter les greffages à leur surface, une alternative pourrait être leur encapsulation dans des nanoparticules de silice de taille calibrée (Graf *et al.* 2006). Par ailleurs, le fait d'obtenir des billes de silice éviterait le problème de polydispersité rencontré. La condensation des alkoxysilanes pourrait être utilisée pour enrober des nanoparticules d'oxyde de fer. Des premiers essais ont été réalisés. Dans une solution eau/éthanol (25%/75%) à pH basique (pH supérieur à 9), des nanoparticules peptisées (chargées négativement) ont été agitées avec du TEOS (tetra-éthoxy silanes) (Belounis 2008). Les « nano-billes » de SiO_2 obtenues ont bien enrobées les nanoparticules d'oxyde de fer mais leur synthèse devrait être optimisée notamment pour améliorer la dispersion des différentes billes (Figure 2).

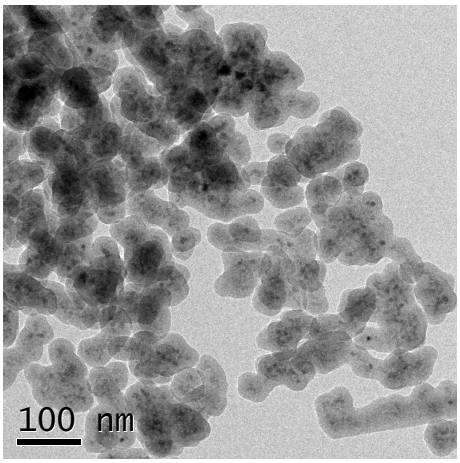


Figure 2 : Cliché MET de nanoparticules de silice ayant enrobé des nanoparticules d'oxyde de fer obtenues par co-précipitation classique

Concernant le dispositif hydrothermal en continu, les synthèses pourraient être optimisées pour obtenir des tailles de nanoparticules plus compatibles avec les applications biomédicales, notamment en domaine supercritique. L'enjeu important qui m'a tenu à cœur dans ce travail est de réussir à obtenir des nanoparticules stabilisées en continu. L'ajout d'une quatrième voie de réactifs sur le dispositif en 2011 pourra certainement concrétiser ce désir (Figure 3). En jouant sur les temps de séjour et le solvant (en remplaçant par exemple l'eau par un mélange eau/éthanol), il sera sans doute possible de greffer du mPEG-Si en conditions hydrothermales et continues permettant d'avoir des agents de contrastes biocompatibles **en une seule étape et en grande quantité**.

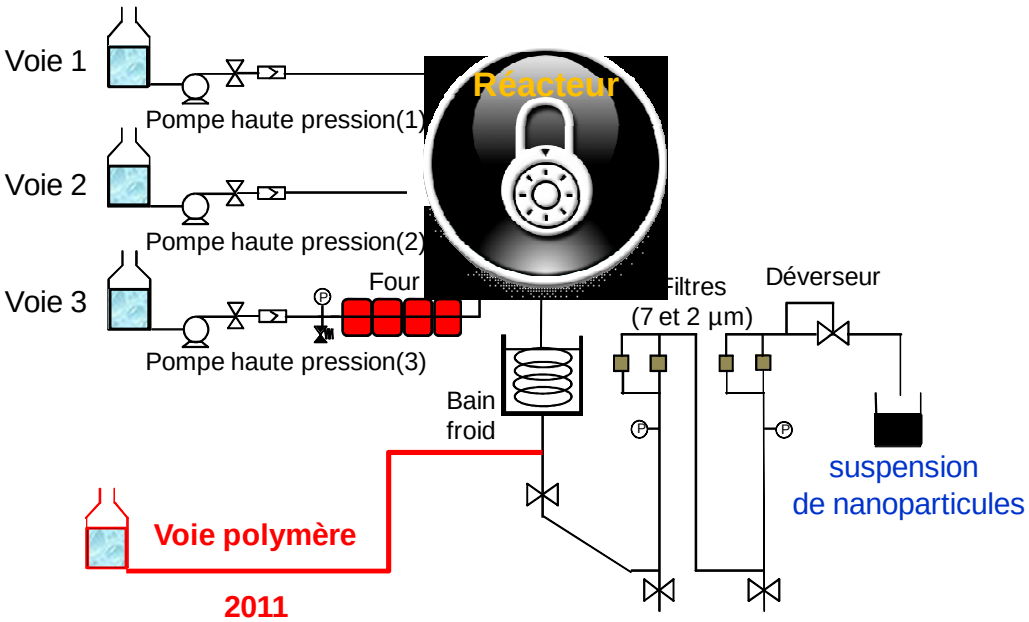


Figure 3 : Schéma du dispositif de synthèse hydrothermale en continu (2011). Une voie permettant d'amener du mPEG-Si après le refroidissement de la suspension sera ajoutée par rapport au dispositif 2010.

Au niveau du ciblage de pathologies, les fonctions thiols protégées par le $mPEG_{2000}$-Si pourraient servir au greffage de protéines ou d'anticorps possédant une cystéine surnuméraire. De cette manière et avec le couplage d'un fluorophore, il sera possible d'obtenir un agent de contraste bimodal et spécifique aux pathologies cardiovasculaires pouvant être détecté en

IRM et en microscopie optique. L'absence d'effet T_1 pourrait, par ailleurs, être un avantage pour les pathologies ciblées (Figure 4).

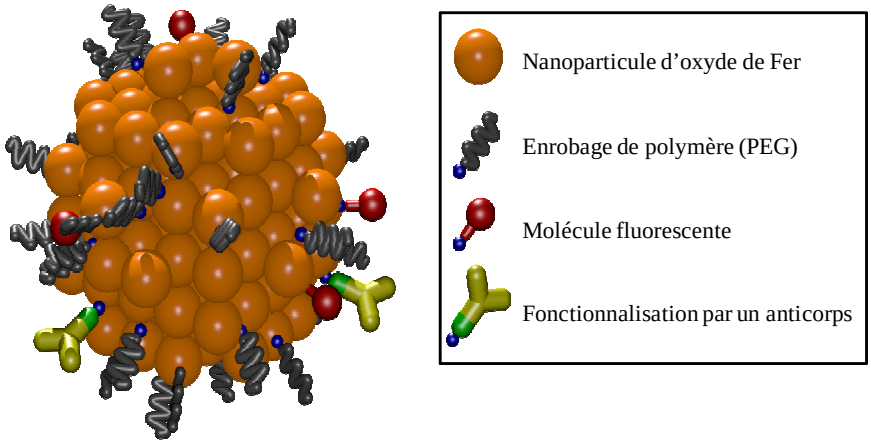


Figure 4 : Représentation d'un futur agent de contraste pour utilisation en IRM composé d'un cœur magnétique stabilisé par des molécules organiques et couplé à la fois à une molécule fluorescente et un anticorps spécifique à des pathologies cardiovasculaires.

En plus de cette étude réalisée avec la société NVH Medicinal et le CHU de Dijon, d'autres partenaires ouvrent la voie à de nouvelles applications de nos USPIO.

En premier lieu, l'école d'ingénieur en agronomie (Agrosup Dijon) par le biais de l'équipe GPMA (Génie des Procédés Alimentaires et Microbiologiques) a commencé à tester l'utilisation de nanoparticules d'oxydes de fer pour stresser par hyperthermie des spores. Les premiers essais d'internalisation par séparation magnétique (Cunault 2009) de ces nanomatériaux couplés à de la rhodamine dans des miro-organismes ont donné des résultats encourageants (Figure 5).

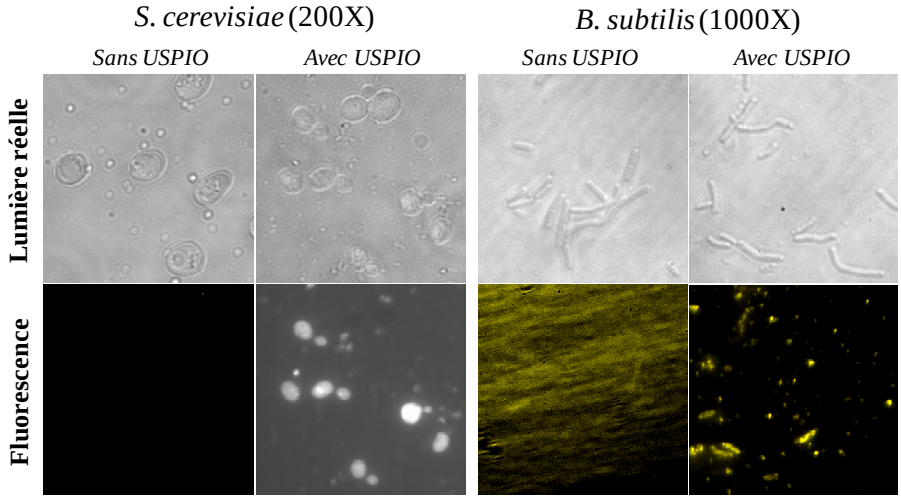


Figure 5 : Observation microscopique en lumière réelle et en fluorescence de levures (Saccharomyces cerevisiae Y10000) et de bactéries (Bacillus subtilis ATCC31324) marquées ou non par des USPIO couplés à de la rhodamine.

En marge de ce travail, des tous premiers essais ont permis d'obtenir des nanotubes d'oxyde de titanes (Papa *et al.* 2009) marqués par des USPIO. Cette combinaison inédite permettra de tirer profits des effets de la forme en aiguille des nanotubes facilitant leur internalisation dans des cellules (Papa 2009), des propriétés photocatalytiques du titane et des propriétés magnétiques des USPIO pouvant permettre l'utilisation de ce nouveau

nanomatériau dans de nombreux domaines biologiques tels que, l'IRM, le traitement oncologique, l'hyperthermie ou d'autres applications encore inconnues (Figure 6).

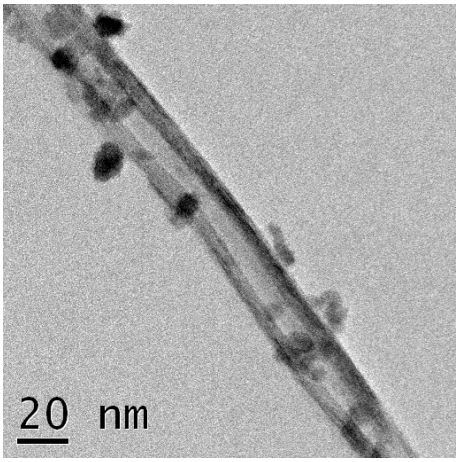


Figure 6 : Cliché MET de nanotubes d'oxyde de titane décorés par des USPIO

Annexes

A.1. Récapitulatif des techniques utilisées

TECHNIQUES	APPAREIL	CARACTERISTIQUES
BET	AUTOSORB 1C - Quantachrome	Molécule sonde : azote ou krypton. Désorption : 150°C durant 3 h.
Diffusion de la lumière et Zêtamétrie	MALVERN Nano ZS	Mesure de taille pour suspension de nanoparticules de 0,3 à 10.000 nm. Logiciel : DTS (nano) V 4.2
DRX	INEL CPS 120 Siemens D5000	λ ($K_{\alpha 1}$ Co) = *1,78897* Å λ (K_{β} Cu) = *1,39222* Å
Lecteur de plaques	VICTOR X3 (Perkin-Elmer)	570 nm (MTT)
Magnétométrie	Magnetometer M2100	Température de l'azote liquide et ambiante (-196 et 20°C).
MET pour cellule	HITACHI H-7500	80 kV
MET pour nanoparticules	JEOL JEM - 2100 LaB6	Résolution 0,25 nm - 200 kV. Préparation des échantillons.
Microscope à confocal	LEICA TCS SP2	Filtres : Dapi (Excitation BP 409 nm, Emission LP 498 nm), RBITC (Excitation BP 555 nm, Emission BP 610 nm)
Spectromètre d'Emission Optique par Plasma à Couplage Inductif	VARIAN ICP OES Vista-Pro	ICP optique
Spectromètre InfraRouge	BRUKER IFS 28	Analyses de composés organiques sous forme de poudre. Logiciel : OPUS V 3.1
Spectromètre UV-Visible	CARY 1E	Logiciel : WinUV V 3.0
XPS	SIA 100 Riber/Cameca	Source K_{α} Al (énergie : 1486,6 eV, tension : 12 kV et puissance : 200 W). Préparation des échantillons.

A.2. Informations obtenues par diffraction des rayons X

A.2.1. Diffraction des rayons X sur poudre (tiré du cours " Méthodes d'analyses et de caractérisations des solides"du Prof. N. Millot, Université de Bourgogne, version de mai 2010)

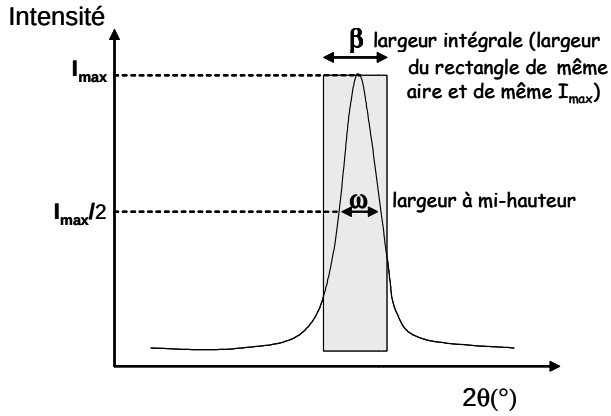
Une analyse soignée des diffractogrammes permet d'accéder à diverses caractéristiques d'un matériau cristallisé :
- la position des raies nous permet de remonter à la phase cristalline et à ses paramètres de maille,
- la forme des raies nous informe sur la taille des domaines cohérents de diffraction et sur le taux de défauts de structure présents dans l'échantillon,
- l'intensité relative des raies nous permet de remonter à la teneur des différentes phases cristallines d'un mélange, à la position des différents atomes dans la maille cristalline. Mais elle peut être aussi influencée par des phénomènes de texturation.

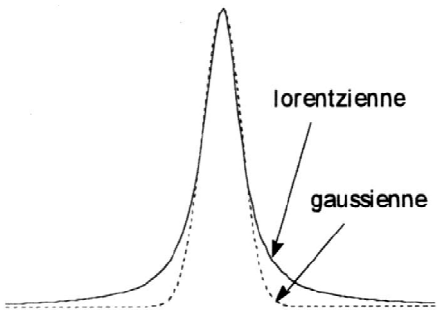
A.2.1.1. Analyse de profils de raies

On a un élargissement des raies de diffraction :
- lorsque les cristaux de l'échantillon ne satisfont pas à l'hypothèse du cristal infini (cristaux nanométriques)
- lorsque les cristaux présentent des défauts cristallins (dislocations, mâcles…)

Méthode de Scherrer

Nombreux sont encore à ce jour les travaux où la taille des particules est déterminée à partir des profils des raies de diffraction par cette méthode.





$$\phi = \frac{180\lambda}{\pi\omega \cos\theta}$$

où ϕ est la taille des cristallites,
λ la longueur d'onde du rayonnement incident,
ω la largeur à mi hauteur de la raie de diffraction,
θ l'angle de diffraction.

Des modèles plus élaborés, dépendants de la nature du profil des raies de diffraction ont été développés : les méthodes d'Halder et Wagner et de Williamson et Hall.

Correction instrumentale

Afin de procéder à l'analyse microstructurale d'un matériau et d'accéder aux informations contenues dans le profil d'une raie de diffraction, il est nécessaire de remonter au profil vrai de la raie. Pour cela il faut déconvoluer le profil expérimental du profil instrumental. La courbe de résolution a pour but de quantifier la déformation, en terme d'élargissement, que subit un signal lorsqu'il est enregistré. Chaque appareil a sa propre résolution qui peut dépendre des conditions de réglage et du domaine d'enregistrement.
La correction instrumentale sur l'élargissement des raies est déterminée à l'aide d'un matériau de référence : BaF_2 recuit. Ce matériau est supposé parfait (taille des grains importante et pas de microdistorsions).

Pour remonter au profil vrai de la raie, il faut alors déconvoluer le profil expérimental du profil instrumental. Si ces profils sont lorentziens, la déconvolution est simple :
$\beta_{vrai}=\beta_{exp}-\beta_{inst}$

β est la largeur intégrale de la raie de diffraction

Si les profils sont de Voigt, l'approximation de Wagner est utilisée :

$$\beta_{vrai} = \sqrt{\beta_{exp}^2 - \beta_{exp} \times \beta_{inst}}$$

Méthode d'Halder & Wagner

C'est la méthode appropriée au profil de Voigt des raies de diffraction. L'élargissement des profils de raies dû au matériau est alors calculé de la façon suivante :

$$\left(\frac{\beta^*_{vrai}}{d^*}\right)^2 = \frac{1}{\varepsilon} \times \frac{\beta^*_{vrai}}{d^{*2}} + \left(\frac{\eta}{2}\right)^2$$

où β est la largeur intégrale,
ε le paramètre lié à la taille ou à la forme des particules,
η le paramètre lié aux contraintes.

$\beta^*=\beta\cos\theta/\lambda$ et $d^*=2\sin\theta/\lambda$ sont les coordonnées réduites dépendant de l'angle de diffraction θ et de la longueur d'onde du rayonnement λ. La taille apparente des domaines cohérents de diffraction ε (ou la taille des cristallites égale à 4/3 ε si les grains sont sphériques) et le taux de défauts de structure ($\frac{\eta}{5}$) sont déduits des diagrammes d'Halder et Wagner tracés à partir de l'équation précédente. Les incertitudes sur ces paramètres découlent du coefficient de régression linéaire de la droite d'Halder et Wagner.

Méthode de Williamson & Hall

Cette méthode est utilisée dans le cas d'un profil de raies lorentzien. L'élargissement des profils de raies dû au matériau est calculé de la façon suivante :

$$\beta^*_{vrai} = \frac{1}{\varepsilon} + \eta \times d^*$$

La taille des domaines cohérents de diffraction (ε) et le taux de défauts de structure (η×d*) sont déduits des diagrammes de Williamson et Hall tracés à partir l'équation précédente. Les incertitudes sur ces paramètres découlent, là encore, du coefficient de régression linéaire de la droite de Williamson et Hall.

Si les points de ce diagramme ne s'alignent pas : il faut alors regarder les différentes ordonnées à l'origine des droites tracées par famille d'harmoniques. On a alors des dimensions différentes selon les directions cristallographiques : les grains ne sont pas sphériques (phénomène observé pour des matériaux issus de traitements mécaniques par exemple).

A.2.2. Evaluation de la déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène (δ) avec la méthode de Poix

δ est la déviation par rapport à la stœchiométrie en oxygène. Dans le cas de la magnétite, δ est donc relié aux taux de cations Fe^{2+}/Fe^{3+}.

Par la méthode de Poix, il est possible d'estimer δ. En suivant cette notation, l'oxydation de la magnétite (Fe_3O_4) peut s'écrire sous la forme d'une fixation d'oxygène et de création de nouvelles entités structurales :

$$(Fe^{3+})[Fe^{2+}Fe^{3+}]O_4^{2-} + \frac{\delta}{2-2\delta}O_2 \rightarrow \frac{4-3\delta}{4-4\delta}\left\{\left(Fe^{3+}_{\frac{4-4\delta}{4-3\delta}}\square_{\frac{\delta}{4-3\delta}}\right)\left[Fe^{2+}_{\frac{4-12\delta}{4-3\delta}}Fe^{3+}_{\frac{4+4\delta}{4-3\delta}}\square_{\frac{2\delta}{4-3\delta}}\right]O_4^{2-}\right\}$$

Cependant, des cations Fe^{3+} migrent des sites octaédriques vers les sites tétraédriques de manière à ce qu'il n'apparaisse des lacunes cationiques que dans les sites octaédriques. Ainsi, la réaction globale d'oxydation devient :

$$(Fe^{3+})[Fe^{2+}Fe^{3+}]O_4^{2-} + \frac{\delta}{2-2\delta}O_2 \rightarrow \frac{4-3\delta}{4-4\delta}\left\{\left(Fe^{3+}\right)\left[Fe^{2+}_{\frac{4-12\delta}{4-3\delta}}Fe^{3+}_{\frac{4+3\delta}{4-3\delta}}\square_{\frac{3\delta}{4-3\delta}}\right]O_4^{2-}\right\}$$

□ représente une lacune, () et [] indiquent respectivement les sites tétraédriques et octaédriques et $\frac{4-3\delta}{4-4\delta}$ correspond au nombre d'unités de structure présentes à un état d'oxydation donné.

En mesurant le paramètre de maille par diffraction des rayons X, il est possible par la méthode de Poix d'obtenir la déviation δ.

On peut ainsi définir une distance tétraédrique moyenne d_4 et une distance octaédrique moyenne d_6 :

$$d_4 = \sum x_i d_{Ai} - O$$
$$d_6 = \sum x_i d_{Bi} - O$$

où x_i est la teneur en cation i dans ce site, d_{Ai}-O la distance du cation i – oxygène et d_{Bi}-O la distance du cation i – oxygène.

Selon Poix (Poix 1965), le paramètre de maille d'une structure spinelle est relié aux distances cations – anions par la formule:

$$a = \frac{40}{11\sqrt{3}} d_4 + \sqrt{\frac{64}{11} d_6^2 - \frac{512}{363} d_4^2}$$

Chaque distance caractéristique d'un cation est définie suivant l'état de valence et de coordination et est unique.

Cations	Distance cation – anion (nm)
Fe^{3+} tétraédrique	0,18580
Fe^{3+} octaédrique	0,20200
Fe^{2+} octaédrique	0,21320
□	0,22394

Distances caractéristiques moyennes cation – anion définies pour les sites tétraédriques et octaédriques et utilisées pour le calcul par la méthode de Poix du paramètre d'après (Belin 2002) et (Guigue-Millot 1998). □ *représente les lacunes en sites octaédriques.*

Les distances d_4 et d_6 ont donc les valeurs suivantes et peuvent être injectées dans l'équation reliant δ au paramètre de maille. Ainsi, en connaissant le paramètre de maille de $Fe_{3(1-\delta)}O_4$, il est possible de retrouver δ.

$$d_4 = 0{,}18580$$

$$d_6 = \frac{0{,}8304 - 0{,}6403\delta}{4 - 3\delta}$$

A titre d'exemple :

3) δ_0 de la magnétite = 0 → $Fe_{3(1-0)}O_4 = Fe_3O_4$
4) δ_{max} de la maghémite = 1/9 =0,111 → $Fe_{3(1-0,111)}O_4$.

A.3. Bilan sur les notions de grains et de taille de grains

(tiré du cours " Méthodes d'analyses et de caractérisations des solides" du Prof. N. Millot, Université de Bourgogne, version de mai 2010)

Des techniques d'investigation très différentes permettent de caractériser la granularité des poudres cristallines : MEB, DRX, Sorptométrie, Granulométries, MET…

Ces différentes techniques ne **"voient"** pas nécessairement la poudre de la même manière. Il convient donc de préciser le vocabulaire à employer (NF X 11-630 de 1981).

A.3.1. Les définitions

Particule ou Grain :

Dans une poudre, fragment de matière solide : particule élémentaire, agrégat, ou agglomérat pris en compte par une technique d'observation ou de mesure donnée.

Particule élémentaire :

Le plus petit fragment de poudre que l'on peut individualiser géométriquement par les méthodes microscopiques.

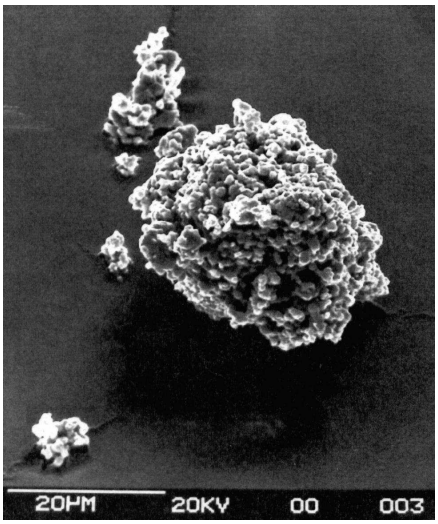
Agrégat :

Ensemble de particules discrètes, jointives par des surfaces. La cohésion de l'agrégat est d'ordre physico-chimique et difficile à rompre par un moyen physique (ultrasons).

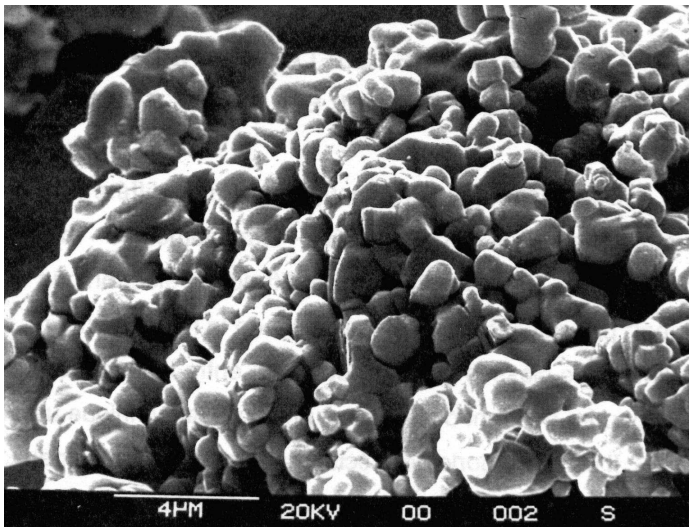
Agglomérat :

Ensemble de particules discrètes et/ou d'agrégats. La cohésion de l'agglomérat est d'ordre physique ; elle est relativement facile à rompre par un moyen physique (ultrasons).

A.3.2. Ce que voient les techniques



Cliché MEB d'un grain de $BaTiO_3$: agrégat de 30 μm environ

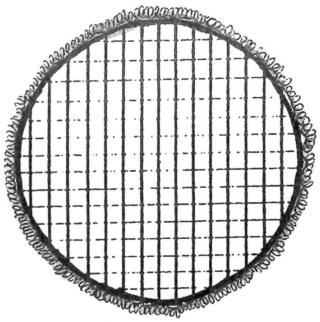


Cet agrégat est constitué de particules élémentaires d'environ 1 à 2 μm.

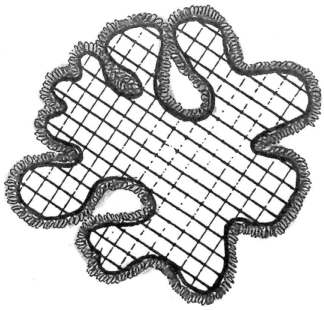
Lors d'une investigation de cette poudre avec un granulomètre, ce sont les agrégats qui sont vus comme étant les particules constitutives de la poudre de taille ϕ_G.

Le MEB révèle la structure de ces grains et permet, dans ce cas, de faire la distinction entre l'agrégat de taille ϕ_G et la véritable particule élémentaire de taille ϕ_M.

Le diamètre équivalent déduit de mesures d'aires spécifiques $\phi_S = \phi_M$; ce qui révèle l'absence d'une porosité au niveau des grains : ceux-ci sont lisses et non tourmentés.



Cas d'un grain de surface lisse et non tourmentée : $\phi_S = \phi_M$



Cas d'un grain de surface très tourmentée et présentant une porosité ouverte: $\phi_S << \phi_M$

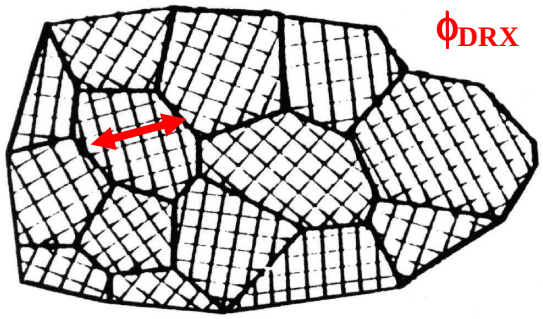
Couche adsorbée sur deux grains de diamètre moyen à peu près identique

Les résultats obtenus par les techniques de diffraction : DRX et MET sont complémentaires aux précédents. De nouvelles notions sont à clarifier.

Grain polycristallin :

Du point de vue de la diffraction, un tel grain diffracte comme plusieurs petits cristaux plus ou moins désorientés les uns par rapport aux autres.

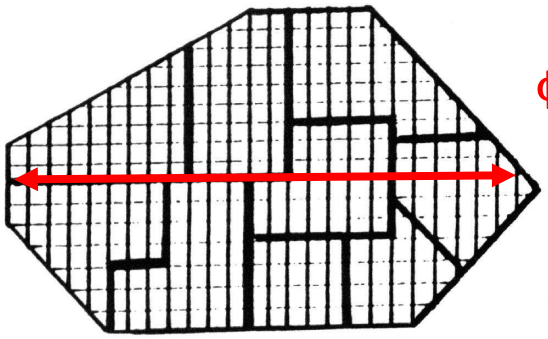
Un grain polycristallin est un grain dans lequel il n'y a pas continuité du réseau cristallin.



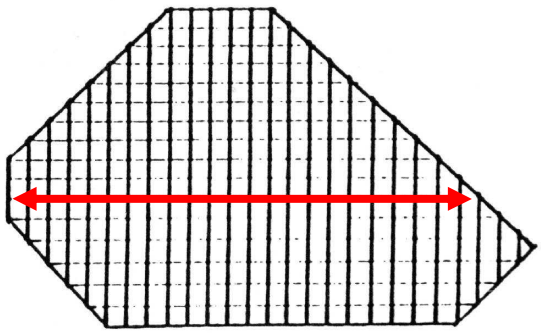
Grain monocristallin :

Un grain monocristallin est un grain qui donne un cliché de diffraction de monocristal.

Toutefois, il existe encore une subdivision possible : un grain monocristallin peut être constitué de plusieurs cristallites ou d'un seul. Dans ce dernier cas on parle alors de **monocristal**.



Un grain monocristallin constitué de plusieurs cristallites



Un grain monocristallin constitué d'un seul cristallites

Cristallite :

C’est le domaine de matériau dans lequel il y a continuité parfaite du réseau cristallin.

Les dimensions des cristallites sont accessibles par analyse des profils des raies de diffraction et par MET en champ sombre ou Haute Résolution.

Pour résumer :

A.4. Analyses XPS des nanoparticules

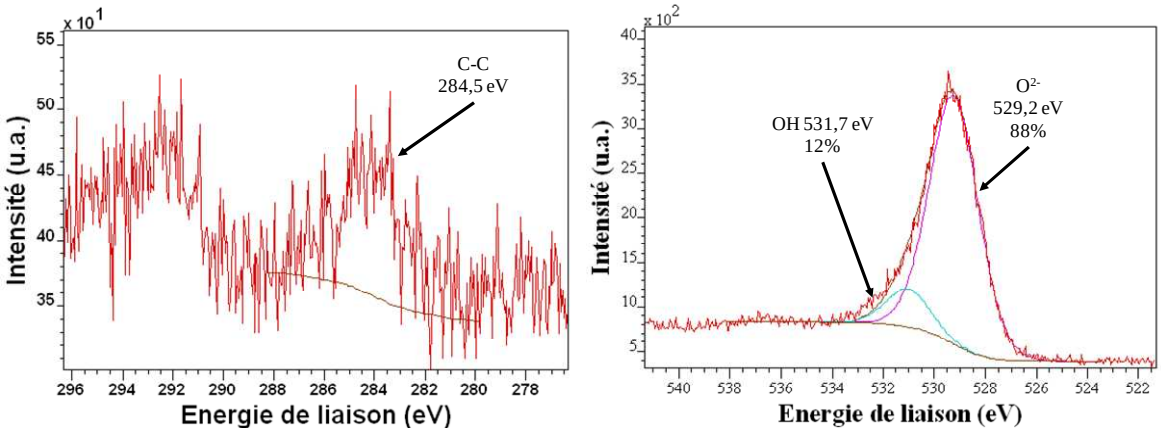
La spectroscopie de photon-électrons X a permis de donner une estimation des espèces présentes en surface dans les cas des nanoparticules modifiées par de l'acide citrique, du DMSA, mPEG-Si et du mPEG-Si + DMSA en les comparant au fer de surface de la magnétite (fer 2p).

Les trois composés utilisés pour modifier la surface de la magnétite possèdent majoritairement des carbones et des oxygènes dont les spectres vont donner des énergies de liaisons différentes suivant l'environnement électronique qui les entoure. Il faut noter que dans un grand nombre de spectres obtenus en XPS un pic correspondant à du carbone de pollution (C-C) est observé. **Son énergie de liaison est fixée à 284,5 eV** et permet de fixer tous les autres pics d'un spectre et de pouvoir les comparer.

Pour désommer les pics en différentes contributions, les largeurs à mi-hauteur sont fixées à 2 eV maximum. Dans le cas du carbone, une fois le carbone de pollution fixé à **284,5 eV**, les positions des pics sont fixées avec un écart d'environ 1,5 eV par liaison oxygène sur le carbone. Ainsi un carbone C-O doit se situer vers 286 eV, un carbone O-C-O ou C=O vers 287,5 eV et un carbone O-C=O vers 289 eV.
Le logiciel CasaXPS en version 2.2 a été utilisé pour les désommations des pics.

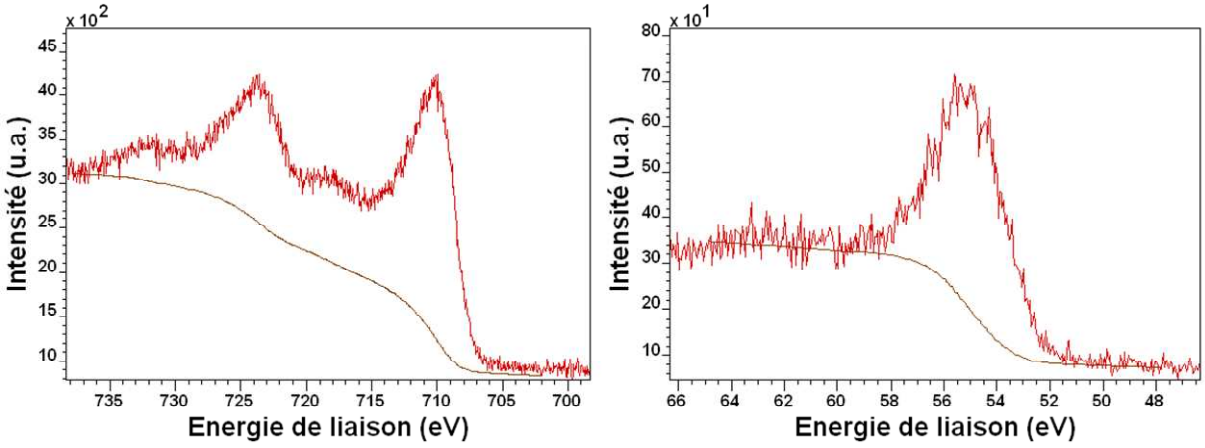
A.4.1. La magnétite

Le fer, l'oxygène, l'azote et le carbone de pollution de la magnétite ont été analysés par XPS.



Spectres XPS du carbone de pollution et de l'oxygène de la magnétite et désommation du pic de l'oxygène en deux contributions avec leurs proportions relatives.

Il n'y a pas de pic dû à l'énergie de liaison de l'azote. En revanche, le fer peut se diviser en 2 pics, le fer 2p qui est considéré comme du fer de « surface » et le fer 3p qui est du fer global sur la cristallite.



Spectres XPS du fer 2p et du fer 3p de la magnétite

Toutes les études ont consisté à quantifier les atomes des molécules en surface. Ils ont donc été comparés aux atomes de fer en surface soit le fer 2p.

Les répartitions en pourcentage des trois éléments analysés pour la magnétite nue sont les suivantes :

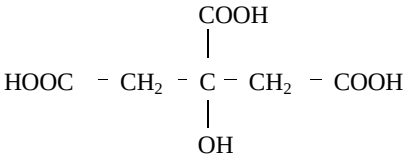
Synthèse	Proportion Fe 2p (%)	Proportion O^{2-} (%)	Proportion OH (%)	Proportion C pollution (%)
Référence	40	49	7	4

Proportions, obtenues par XPS, du fer et de l'oxygène et du carbone de pollution de la structure spinelle

A.4.2. L'acide citrique

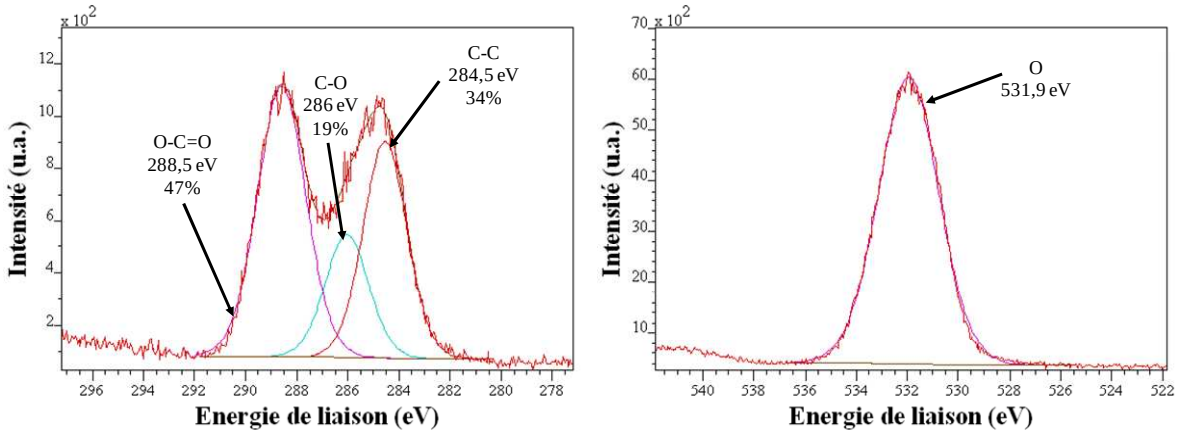
A.4.2.1. Les caractéristiques XPS de l'acide citrique

L'acide citrique possède 6 atomes de carbone et 7 atomes d'oxygène.



Formule semi-développée de l'acide citrique

En XPS, le rapport des aires du pic de l'énergie de liaison de l'oxygène et de celui du carbone est de 1,28 quand en réalité il est de 1,17. Aux incertitudes de mesures près, les analyses XPS donnent une bonne idée de la proportion d'atomes de l'acide citrique.



Spectres XPS du carbone et de l'oxygène d'acide citrique et désommation du pic du carbone en trois contributions avec leurs proportions relatives.

Le pic de vibration du carbone peut se décomposer en trois contributions :

1) Une contribution à 284,5 eV correspondant au carbone de pollution et aux carbones des liaisons CH (2/6 des carbones)
2) Une contribution à 286 eV correspondant au carbone d'une liaison C-O (1/6 des carbones). Il est communément admis que les oxygènes de liaisons font se décaler le pic de carbone d'environ 1,5 eV par liaison avec l'oxygène. Dans ce cas, cette hypothèse est vérifiée (284,5 +1,5 = 286 eV)
3) Une contribution à 288,5 eV correspondant aux carbones des liaisons O-C=O (3/6 des carbones). Dans ce cas, cette liaison est considérée comme une triple oxygène et devrait se décaler de 4,5 eV et son déplacement « réel » est proche de celui théorique (4 eV)

Au niveau des aires relatives de ces trois contributions du carbone, les valeurs sont relativement identiques à celles théoriques :

Rapport des aires	CH	C-O	O-C=O
Théorique	33,3 %	16,7 %	50 %
Réelle	34 %	19 %	47 %

Aires théoriques des 3 types de carbone de l'acide citrique et aire relative des aires des pics des énergies de liaisons des 3 carbones de l'acide citrique mesurées en XPS

Le fait que les aires théoriques et relatives obtenues par XPS soient relativement proches nous a fait penser que l'analyse du pic de la liaison O-C=O (288,5 eV) serait *a priori* un bon indicateur sur la présence ou non de citrates sur des nanoparticules citratées car ce pic est très intense (50% de la vibration du carbone est due à cette liaison). En effet, le pic de la liaison C-O (286 eV) pourrait être trop faible et celui des liaisons CH était confondu avec celui du carbone de pollution (284,5 eV).

Le pic de vibration de l'oxygène, quant à lui, est une gaussienne et il est délicat de le désommer en oxygène de liaison C=O (3/7 des oxygènes) et en oxygène de C-OH (4/7 des oxygènes) et il est donc considéré comme un unique pic aux alentours de 531,9 eV.

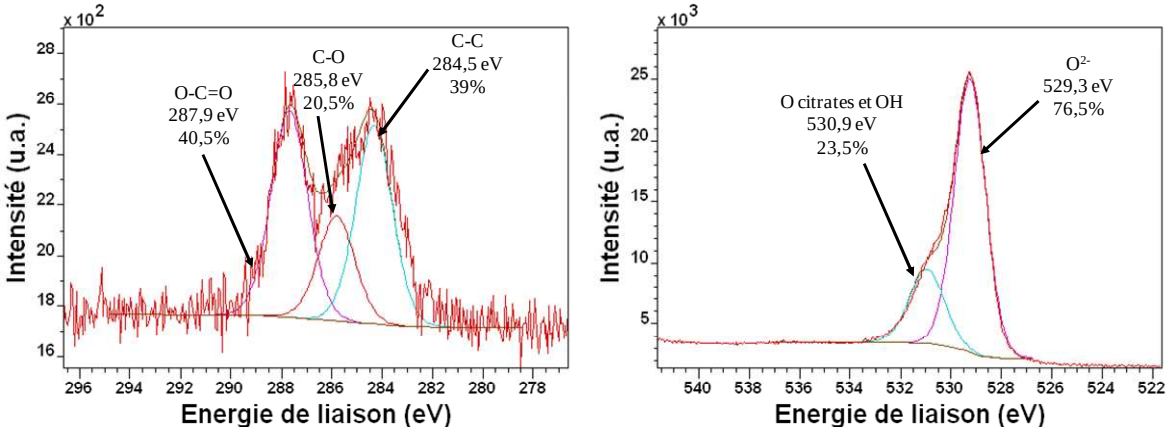
A.4.2.2. Quantification par XPS de l'acide citrique sur des nanoparticules citratées

Dans les parties 2 et 3, des nanoparticules ont été modifiées par de l'acide citrique. Pour savoir si cette molécule est présente à la surface de la magnétite, des analyses XPS ont été réalisées.

Nous avions tout d'abord pensé voir une différence entre l'oxygène des citrates et les oxygènes de la magnétite (OH- ou O^{2-}). Cependant, le pic des hydroxyles de Fe_3O_4 sortant vers 531,7 eV et celui des citrates vers 531,9 eV, il a été difficile d'impliquer cette énergie dans la recherche de citrates à la surface.

En revanche, l'énergie de liaison de O-C=O est caractéristique du carbone des citrates et peut être différenciée du carbone de pollution. En effet, en mesurant l'aire de ce pic seulement (situé vers 288,5 eV) et en la multipliant par 2 (la moitié des carbones du citrate ont une énergie de liaison à ce pic), on peut trouver l'aire de tous les carbones provenant de cette molécule. Ensuite, en multipliant par 7/6, on peut trouver l'aire théorique de l'énergie de liaison de l'oxygène des citrates (7 oxygènes pour 6 carbones) située vers 531,9 eV et plus ou moins confondue avec les hydroxyles de la magnétite. De cette manière, il suffit de soustraire à ce pic d'énergie de liaison de l'oxygène, la contribution des citrates pour trouver s'il existe toujours des hydroxyles libres. Le pic du carbone à 286 eV (liaison C-O) est aussi caractéristique du citrate mais est plus difficilement désommable que celui de la liaison O-C=O et n'a donc pas été retenu pour nos exploitations.

Prenons un exemple pour illustrer ces propos : le cas des nanoparticules mélangées à un ratio molaire de 100% de citrates dans la soude.
Les spectres XPS du carbone et de l'oxygène sont les suivants :



Spectres XPS et désommation avec leurs proportions relatives du carbone et de l'oxygène de nanoparticules avec de l'acide citrique dans un ratio molaire de 100%.

Les répartitions en pourcentage des trois éléments analysés pour les nanoparticules citratées à 100% sont les suivantes :

Rapport des aires	C	O	Fe2p
Mesurée en XPS	10,5 %	54,5 %	35 %

Rapport des aires des pics des énergies de liaisons mesurées en XPS du carbone, de l'oxygène et du fer sur des nanoparticules citratées à 5%.

La part du carbone due à la liaison O-C=O représente 40,5% et donc environ 81% de l'aire du carbone mesurée et due aux citrates (19% est donc du carbone de pollution). Des 10,5% due au carbone, 8,5% (10,5*81%) sont donc dus aux citrates.

La part de l'oxygène correspondant aux hydroxyles et aux citrates est de 23% soit 12,5% au total (54,5*23%).

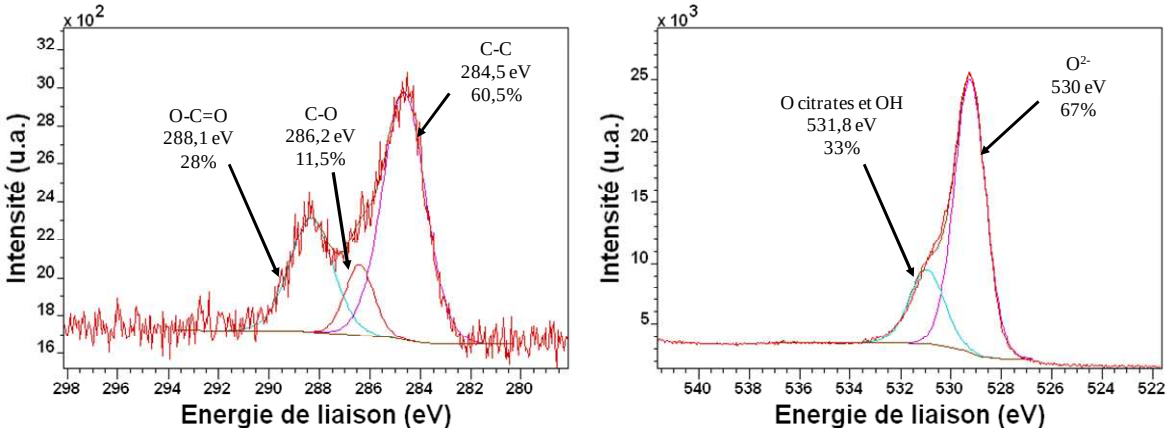
Sachant que 6 carbones représentent 7 oxygènes, la part d'oxygènes due au citrate est d'environ 10 %. Il ne reste donc que 2,5% des atomes analysés qui sont des hydroxyles de surface.

Synthèse	Proportion Fe 2p (%)	Proportion O^{2-} (%)	Proportion OH (%)	Proportion C pollution (%)
Référence	40	49	7	4
100% citrates	35	42	2,5	2

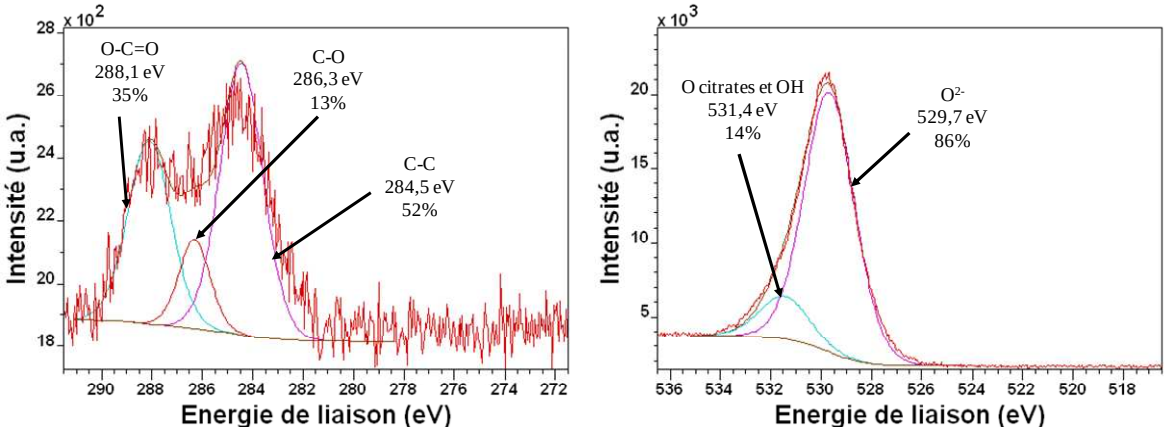
Synthèse	Proportion C citrates (%)	Proportion O citrates (%)
Référence	0	0
100% citrates	8,5	10%

Proportions, obtenues par XPS, du fer et de l'oxygène de la structure spinelle, du carbone et de l'oxygène des citrates et du carbone de pollution sur la synthèse de référence et les magnétites citratées à 100% à pH = 12.

A.4.2.3. Les spectres XPS des autres nanoparticules citratées



Spectres XPS et désommation avec leurs proportions relatives du carbone et de l'oxygène de nanoparticules avec de l'acide citrique dans un ratio molaire de 5%.

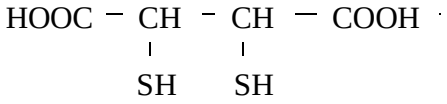


Spectres XPS et désommation avec leurs proportions relatives du carbone et de l'oxygène de nanoparticules avec de l'acide citrique dans un ratio molaire de 20%.

A.4.3. Le DMSA

A.4.3.1. Les caractéristiques XPS du DMSA

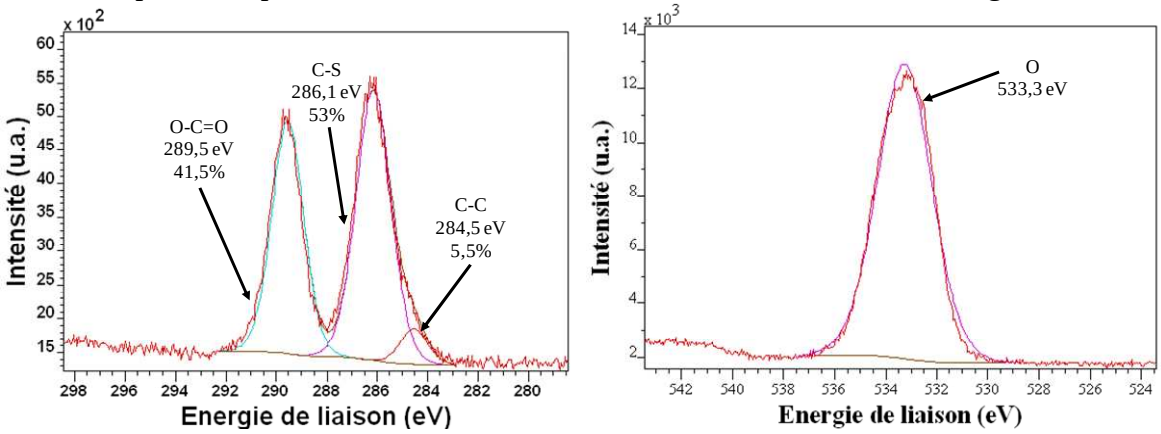
Le DMSA est une molécule plus facile à observer en XPS que l'acide citrique car elle possède en plus de 4 carbones et 4 oxygènes, 2 soufres.



Formule semi-développée du DMSA

La présence de ces atomes de soufre permet de conclure quant à la présence ou non de DMSA.

De plus, les spectres XPS sont aisément dissociables de ceux de la magnétite.



Spectres XPS du carbone et de l'oxygène du DMSA et désommation du pic du carbone en trois contributions avec leurs proportions relatives (la contribution à 284,5 eV est du carbone de pollution).

Les liaisons des carbones du DMSA ont deux énergies de liaisons totalement dissociées de celle du carbone de pollution :

1) Une contribution à 286 eV correspondant au carbone d'une liaison C-S (2/4 des carbones).
2) Une contribution à 289,5 eV correspondant aux carbones des liaisons O-C=O (2/4 des carbones).

Au niveau des aires relatives de ces deux contributions du carbone, les valeurs sont relativement identiques à celles théoriques.

Rapport des aires	C-S	O-C=O
Théorique	50 %	50 %
Réelle	56 %	44 %

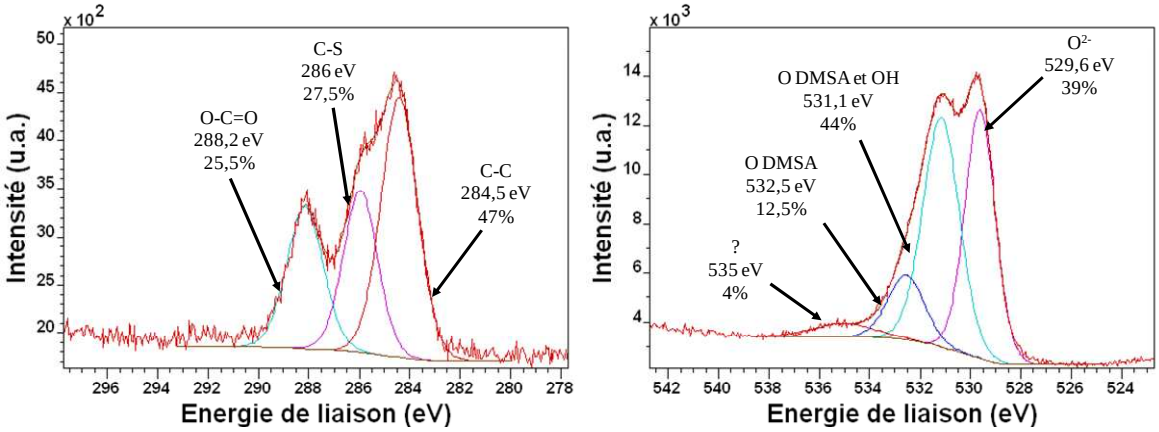
Aires théoriques des 3 carbones de l'acide citrique et aires relatives des pics des énergies de liaisons des 3 carbones de l'acide citrique mesurées en XPS

Les 2 contributions des carbones du DMSA sont à peu près équivalentes (56% pour C-S et 44% pour O-C=O) comme dans la molécule.

L'énergie de liaison de l'oxygène sort, quant à elle, vers 533 eV et n'est donc pas confondue avec les hydroxyles de la magnétite (vers 531,7 eV).

A.4.3.2. Quantification par XPS du DMSA sur des nanoparticules

De la même manière qu'avec l'acide citrique, il est possible de quantifier la proportion d'hydroxyles libres à la surface de la magnétite et le taux de DMSA en étudiant les pics caractéristiques du carbone et de l'oxygène de cette molécule.



Spectres XPS et désommation avec leurs proportions relatives du carbone et de l'oxygène de nanoparticules avec du DMSA à 8% en proportion massique

Dans le cas du couplage du DMSA avec la magnétite, le pic du carbone de la liaison O-C=O a été déplacé, il en a été probablement de même du pic de l'oxygène dont une partie des oxygènes du DMSA ont pu se confondre avec le pic des hydroxyles, sans doute lors du couplage du DMSA avec la surface de la magnétite.

Les 2 contributions du carbone sont cependant bien proportionnelles et c'est à partir de leurs proportions relatives que la quantité de DMSA a été estimée.

En premier lieu, la proportion des atomes de carbone a été comparée à la proportion du soufre trouvée. Le ratio C/S devait être aux alentours de 2 d'après la formule du DMSA. Avec la proportion de carbone, il suffit ensuite de retirer la même proportion aux pics de l'oxygène à 531,1 eV après avoir retiré l'intégralité du pic à 532,5 eV du exclusivement au DMSA. L'oxygène de structure O^{2-} n'est impliqué que dans le cas de la magnétite et le dernier pic vers 535 eV a été négligé.

Les répartitions en pourcentage des quatre éléments analysés pour les nanoparticules avec du DMSA à 8% massique sont les suivantes :

Rapport des aires	C	O	Fe2p	S
Mesurée en XPS	30 %	48,5 %	14 %	7 %

Aires des pics des énergies de liaisons mesurées en XPS du carbone, de l'oxygène, du fer et du soufre sur des nanoparticules avec du DMSA à 8% massique.

La part des carbones due au DMSA représente 53% de l'aire du carbone mesurée (47% est donc du carbone de pollution). Des 30% dus au carbone, 16% (30*53%) sont donc dus au DMSA. Ces 16% sont à peu près le double du soufre trouvé (7%) comme attendu par la formule de cette molécule.

La part de l'oxygène correspondant à la structure spinelle est de 39% soit 19% au total (48,5*39%).

12,5% des oxygènes proviennent forcément du DMSA soit 6% du total. Sachant que 4 carbones représentent 4 oxygènes, la part d'oxygène due au DMSA doit être d'environ 16%. Il manque donc 10% d'oxygène probablement dans le même pic que les hydroxyles de surface (531,1 eV). La proportion d'atomes dans ce pic est de 20,5%. Il reste donc 10,5% d'hydroxyles libres soit une grande quantité. Les 4% d'oxygène restant ont été imputés au

DMSA. La désommation du pic ne permettant tout de même pas un calcul parfaitement stœchiométrique.

Synthèse	Proportion Fe 2p (%)	Proportion O^{2-} (%)	Proportion OH (%)	Proportion C pollution (%)
Référence	40	49	7	4
NP-DMSA	14	19,5	10,5	14

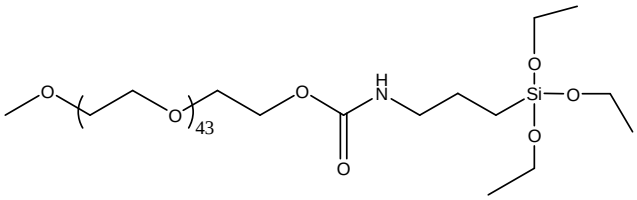
Synthèse	Proportion C DMSA(%)	Proportion O DMSA (%)	Proportion S DMSA (%)
Référence	0	0	0
NP-DMSA	16	19	7

Proportions, obtenues par XPS, du fer et de l'oxygène de la structure spinelle, du carbone, de l'oxygène et du soufre du DMSA et du carbone de pollution sur la synthèse de référence et sur de la magnétite modifiée par du DMSA à 8% massique

A.4.4. Le mPEG-Si

A.4.4.1. Les caractéristiques XPS du mPEG-Si

Le mPEG-Si est également une molécule facilement différenciable en XPS notamment grâce à la présence d'azote et de silicium.

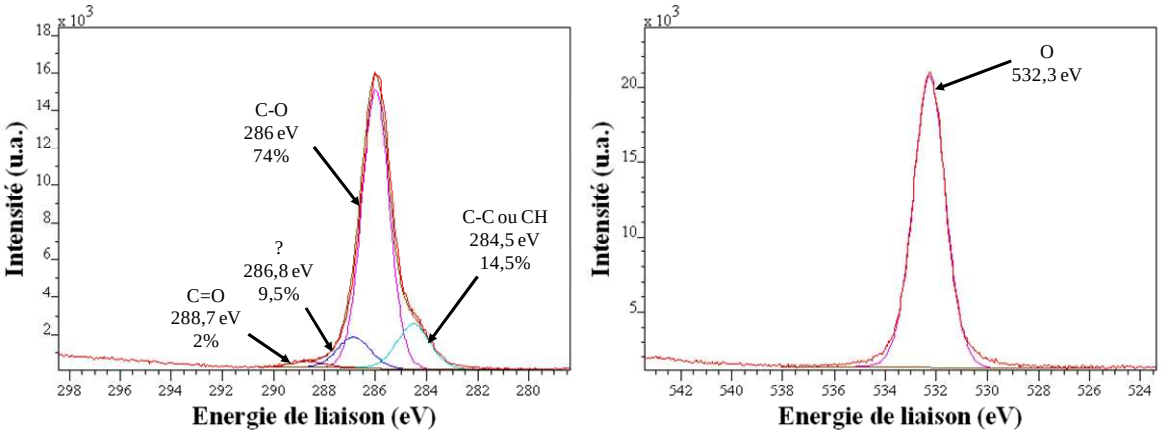


Formule semi-développée du $mPEG_{2000}$-Si

Au niveau des pics d'énergie du carbone on peut trouver :

1) Une contribution à 284,5 eV correspondant au carbone de pollution et aux carbones des liaisons CH.
2) Une contribution à 286 eV correspondant au carbone d'une liaison C-O. C'est ce pic caractéristique qui est observé lors du greffage de PEG sur la magnétite.
3) Une contribution à 286,8 eV qui est difficilement attribuable et est sûrement confondue avec la contribution précédente.
4) Une contribution à 288,7 eV correspondant peut être à la liaison C=O.

Le pic de l'énergie de vibration de l'oxygène sort aux alentours de 532 eV et pourra éventuellement être confondu avec les hydroxyles de surface de la magnétite.



Spectres XPS du carbone et de l'oxygène du mPEG$_{2000}$-Si

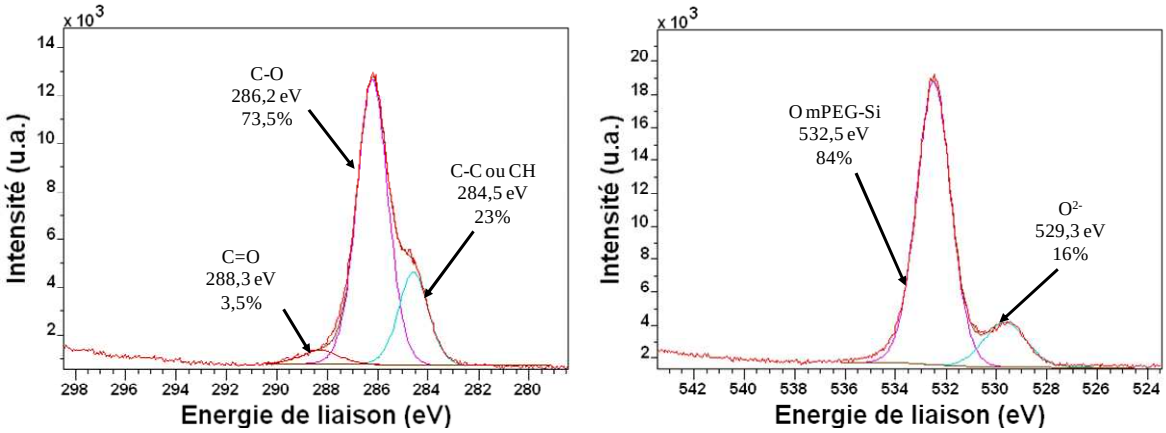
Au niveau des aires relatives des contributions des quatre éléments du mPEG-Si, les valeurs sont relativement identiques à celles théoriques.

Rapport des aires	C	O	N	Si
Théorique	65,5 %	33 %	0,75 %	0,75 %
Réelle	66 %	32 %	1 %	1 %

Aires théoriques et relatives aux pics d'énergie de liaison en XPS du carbone, de l'oxygène, du silicium et de l'azote du mPEG-Si

A.4.4.2. Quantification par XPS du mPEG2000-Si sur des nanoparticules

De la même manière qu'avec l'acide citrique, il est possible de quantifier la proportion d'hydroxyles libres à la surface de la magnétite et le taux de mPEG-Si en regardant les pics caractéristiques du carbone et de l'oxygène de cette molécule. L'exemple suivant est décrit pour le cas de nanoparticules avec du mPEG$_{2000}$-Si mais le raisonnement est le même quelle que soit la longueur du polymère.



Spectres XPS et désommation avec leurs proportions relatives du carbone et de l'oxygène de nanoparticules avec du mPEG$_{2000}$-Si

En premier lieu, le carbone possède le même profil que celui du mPEG2000-Si seul, laissant supposer que seul le carbone de ce polymère est détecté, ce qui est relativement logique au vu du nombre de ces atomes sur les chaines du PEG.

Au niveau de l'oxygène, la contribution à 529,3 eV est due aux O^{2-} de la magnétite et le pic à 532,5 eV a, en premier lieu, été considéré comme exclusivement dû au polymère.

Les répartitions en pourcentage des cinq éléments analysés pour les nanoparticles pegylées sont les suivantes :

Rapport des aires	C	O	Fe2p	N	Si
Mesurée en XPS	60,5 %	34 %	2 %	0,5 %	3 %

Aires des pics des énergies de liaisons mesurées en XPS du carbone, de l'oxygène, du fer, de l'azote et du silicium sur des nanoparticules avec du $mPEG_{2000}$-Si.

La part des carbones due au $mPEG_{2000}$-Si représente 100% de l'aire du carbone mesurée (le carbone de pollution est négligé dans ce cas) donc 60,5% du total.

La part de l'oxygène correspondant à la structure spinelle est de 16% soit 4,5% au total (34*16%). Le reste pourrait être dû à l'oxygène du $mPEG_{2000}$-Si soit 29,5% et éventuellement des hydroxyles de surface. Cependant, au vu de la faible proportion de fer 2p (2%), la contribution de ces groupements a été négligée. De plus le rapport C/O dans le $mPEG_{2000}$-Si et de l'ordre de 2 comme nos résultats (60,5% de C et 29,5% d'O soit un ratio de 2,05).

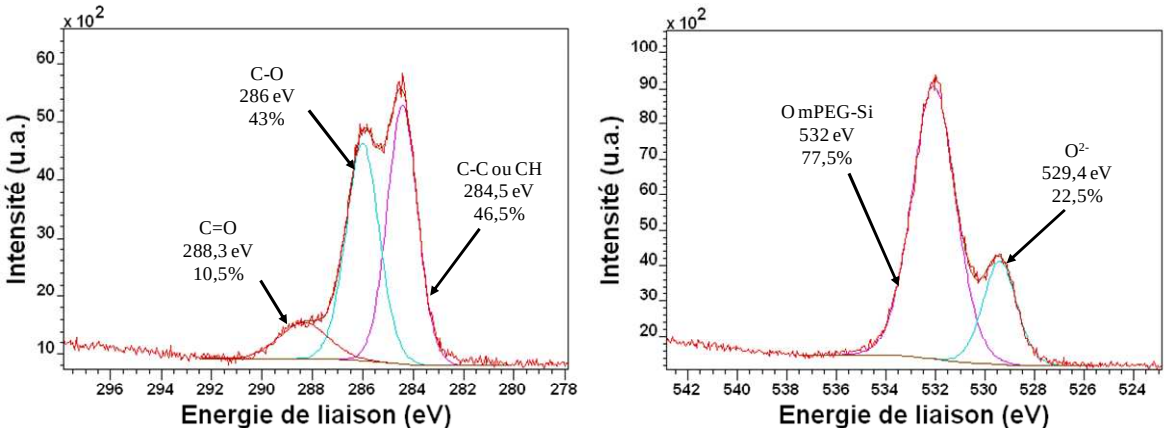
Synthèse	**Proportion Fe 2p (%)**	**Proportion O^{2-} (%)**	**Proportion OH (%)**	**Proportion C pollution (%)**
Référence	40	49	7	4
$mPEG_{2000}$-Si	2	4,5	0	
Synthèse	**Proportion C PEG (%)**	**Proportion O PEG (%)**	**Proportion Si PEG (%)**	**Proportion N PEG (%)**
Référence	0	0	0	0
$mPEG_{2000}$-Si	60,5	29,5	3	0,5

Proportions, obtenues par XPS, du fer et de l'oxygène de la structure spinelle ; du carbone, de l'oxygène, du silicium et de l'azote du mPEG silanisé et du carbone de pollution sur la synthèse de référence et la magnétite pegylée par $mPEG_{2000}$-Si

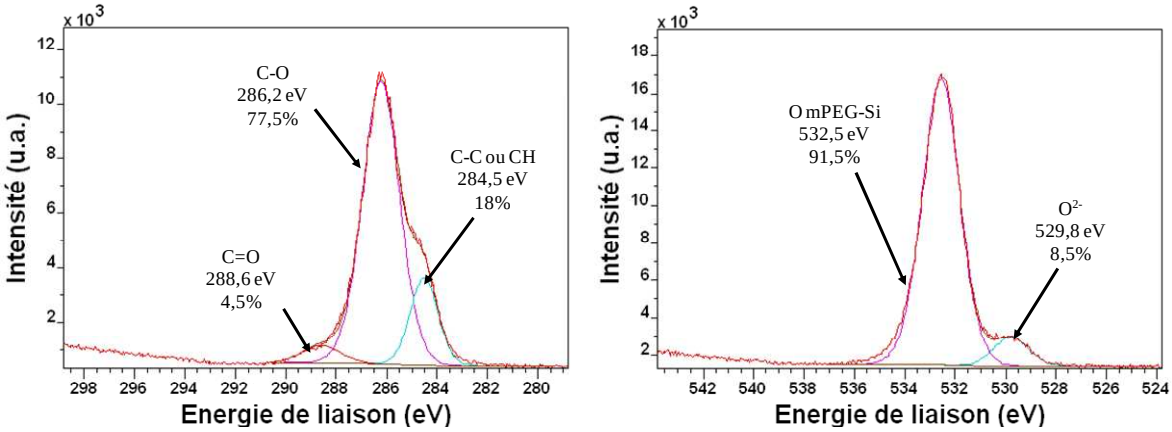
Dans le cas du greffage de PEG sur les nanoparticules d'oxyde de fer, il faut noter que vu les longues masses moléculaires de mPEG-Si utilisés (800, 2250 et 5250 $g.mol^{-1}$) et la faible profondeur d'analyse en XPS (de l'ordre de 3-4 nm), les mesures effectuées risquent de faire seulement apparaître les carbones et les oxygènes de ces polymères au détriment de ceux de pollution ou provenant du réseau de la magnétite. Par ailleurs, le signal du fer risque aussi d'être masqué et ce d'autant plus que le PEG utilisé sera long.

Dans le cas d'oxydes de fer greffés par du mPEG-Si, la contribution de l'énergie de liaison des hydroxyles a été négligée de même que celle du carbone de pollution.

A.4.4.3. Les spectres XPS des autres nanoparticules pegylées



Spectres XPS et désommation avec leurs proportions relatives du carbone et de l'oxygène de nanoparticules avec du $mPEG_{550}$-Si.

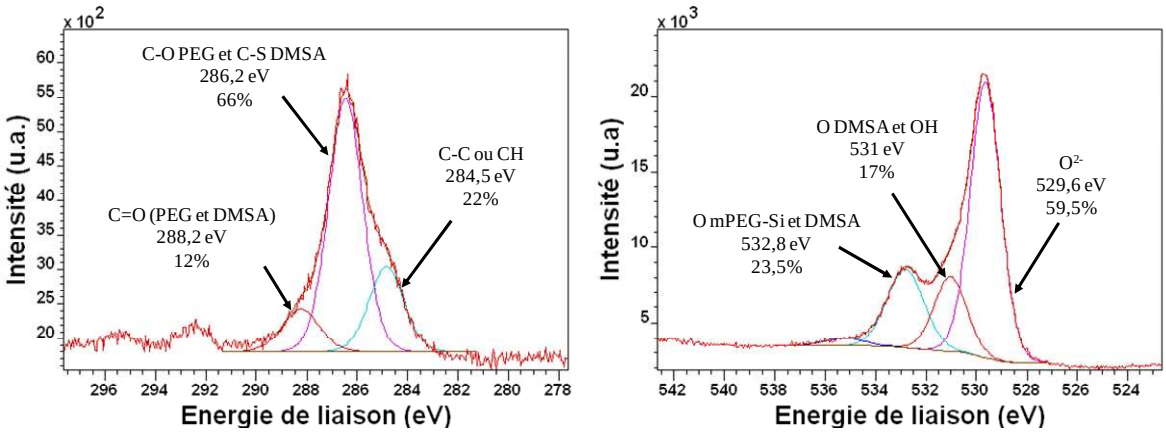


Spectres XPS et désommation avec leurs proportions relatives du carbone et de l'oxygène de nanoparticules avec du $mPEG_{5000}$-Si.

A.4.5. Le cas des nanoparticules pegylées + DMSA

A.4.5.1. Exemple des nanoparticules + mPEG2000-Si + DMSA décantées en solution acide

L'analyse XPS a été plus délicate dans le cas des nanoparticules pegylées + DMSA notamment dans le cas des lavages par décantation à pH acide (NP_{acide}). Dans le cas des lavages par dialyse, le fort taux de mPEG-Si nous a fait procéder comme lors des nanoparticules seulement pegylées (sauf dans le cas du $mPEG_{550}$-Si).



Spectres XPS et désommation avec leurs proportions relatives du carbone et de l'oxygène de nanoparticules avec du mPEG$_{2000}$-Si + DMSA lavées par décantation acide (pH = 3-4)

En premier lieu, le carbone possède un profil à la frontière entre le mPEG$_{2000}$-Si et le DMSA. En effet, la proportion du carbone de liaison C=O (288,2 eV) est plus importante que celle du polymère seul. Le pic à 286,2 eV ne peut donc plus être attribué au mPEG-Si seulement.

Au niveau des oxygènes, le pic des hydroxyles (531 eV) doit être considéré comme appartenant également au DMSA. De même, pour le dernier pic (532,8 eV) les oxygènes appartiennent au DMSA et au mPEG-Si.

Les répartitions en pourcentage des six éléments analysés pour les nanoparticules pegylées + DMSA sont les suivantes :

Rapport des aires	C	O	Fe2p	N	Si	S
Mesurée en XPS	25,5 %	51,5 %	19 %	0%	2,5 %	1,5 %

Aires des pics des énergies de liaisons mesurées en XPS du carbone, de l'oxygène, du fer, de l'azote, du silicium et du soufre sur des nanoparticules avec du mPEG$_{2000}$-Si et du DMSA lavées par décantation à pH acide (pH = 3-4).

Pour quantifier tous ces atomes, nous pouvons raisonner de manière stœchiométrique.

Commençons par le cas de l'oxygène. Le pic à 529,6 eV est caractéristique des O^{2-} et donc représente 56,5% de l'ensemble des oxygènes mesurés donc 31% (56,5%*51,5). Le reste est à départager entre les hydroxyles, le DMSA et le mPEG-Si. Le DMSA étant une petite molécule, il est plus facile de considérer sa détection comme stœchiométrique. Ainsi, si 1,5% des atomes sont des soufres, alors 3% des atomes proviennent des oxygènes sans doute répartis en 1,5% sur le pic des OH (531 eV) et 1,5% sur l'autre pic à 288,2 eV. Ainsi, sur les 17% des oxygènes du premier pic (soit environ 9% des atomes totaux), 1,5% proviennent du DMSA et donc 7,5% proviennent des hydroxyles. Sur le dernier pic, le reste des oxygènes est de 11,5% (51,5% -31% O^{2-}-1,5%DMSA-7,5% OH) avec 1,5% pour le DMSA et donc 10% provenant du mPEG-Si.

Le cas du carbone est plus simple une fois les oxygènes répartis suivant les molécules. Ainsi, si nous avons 3% d'oxygènes dus au DMSA, nous avons également 3% de carbones. Pour le mPEG-Si, quelle que soit sa longueur de chaîne, la proportion C/O est toujours d'environ 2 ([CH_2-CH_2-O]). Ainsi si 10% des atomes sont dus à l'oxygène du mPEG-Si alors 20% sont des carbones. La totalité des carbones est de 25,5% des atomes totaux. On peut donc trouver le carbone de pollution par soustraction : 25,5- 20% PEG- 3% DMSA = 2,5%.

Avec ces calculs, il a été possible de quantifier la proportion de chaque atome du DMSA, du mPEG-Si et de la magnétite en considérant des rapports stœchiométriques.

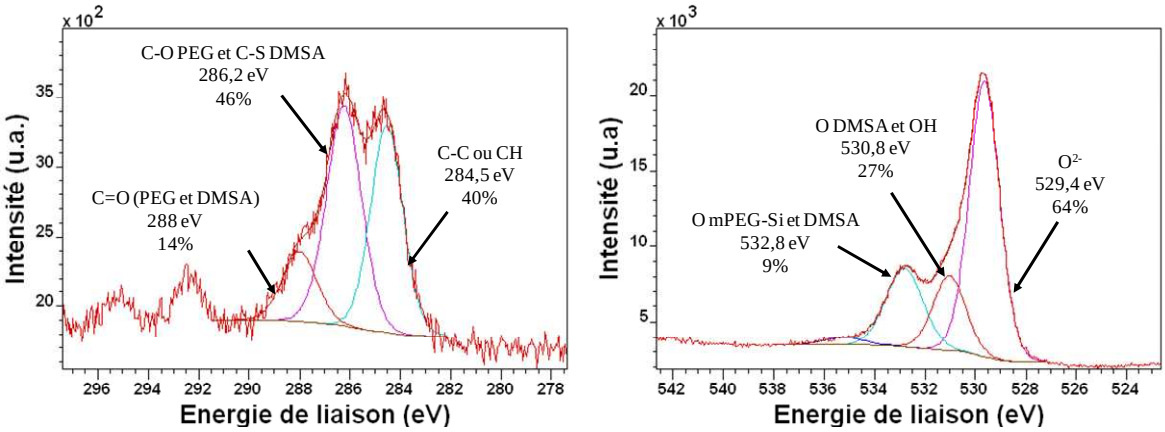
Synthèse	Proportion Fe 2p (%)	Proportion O^{2-} (%)	Proportion OH (%)	Proportion C pollution (%)
Référence	40	49	7	4
$NP_{2000acide}$	19	31	7,5	2,5

Synthèse	Proportion C DMSA (%)	Proportion O DMSA (%)	Proportion S DMSA (%)
Référence	0	0	0
$NP_{2000acide}$	3	3	1,5

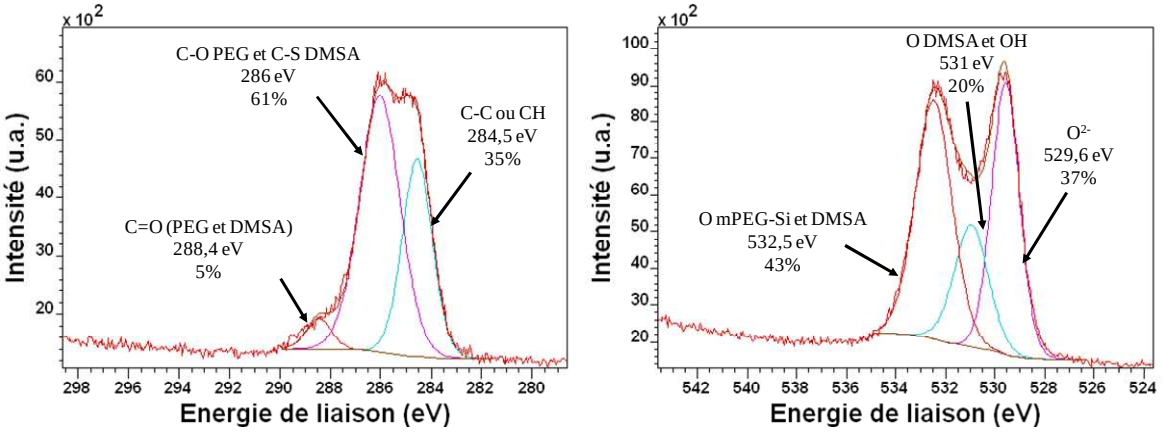
Synthèse	Proportion C PEG (%)	Proportion O PEG (%)	Proportion Si PEG (%)	Proportion N PEG (%)
Référence	0	0	0	0
$NP_{2000acide}$	20	10	2,5	0

Proportions, obtenues par XPS, du fer et de l'oxygène de la structure spinelle ; du carbone, de l'oxygène et du soufre du DMSA ; du carbone, de l'oxygène, du silicium et de l'azote du mPEG silanisé et du carbone de pollution sur la synthèse de référence et des nanoparticules pegylées avec des $mPEG_{2000}$-Si et du DMSA lavées par décantation acide (pH = 3-4).

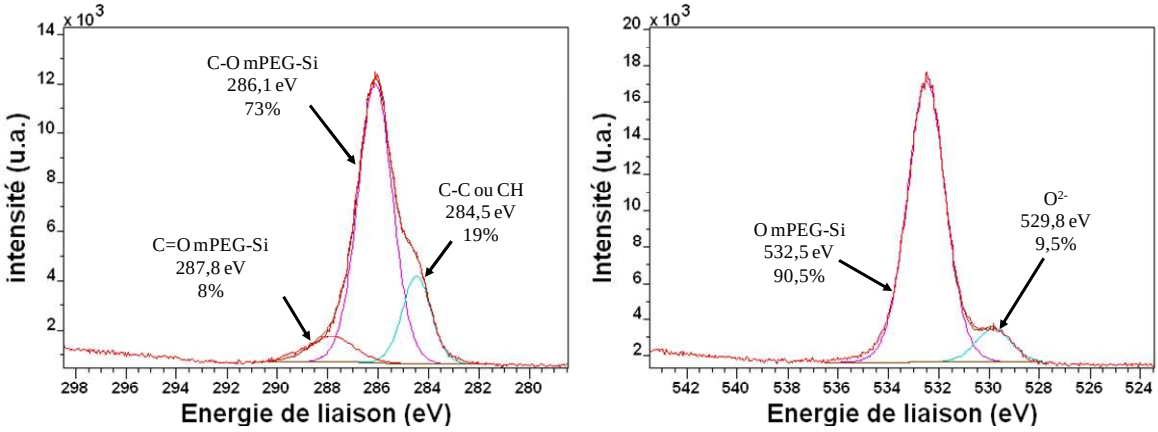
A.4.5.2. Les spectres XPS des autres nanoparticules pegylées + DMSA



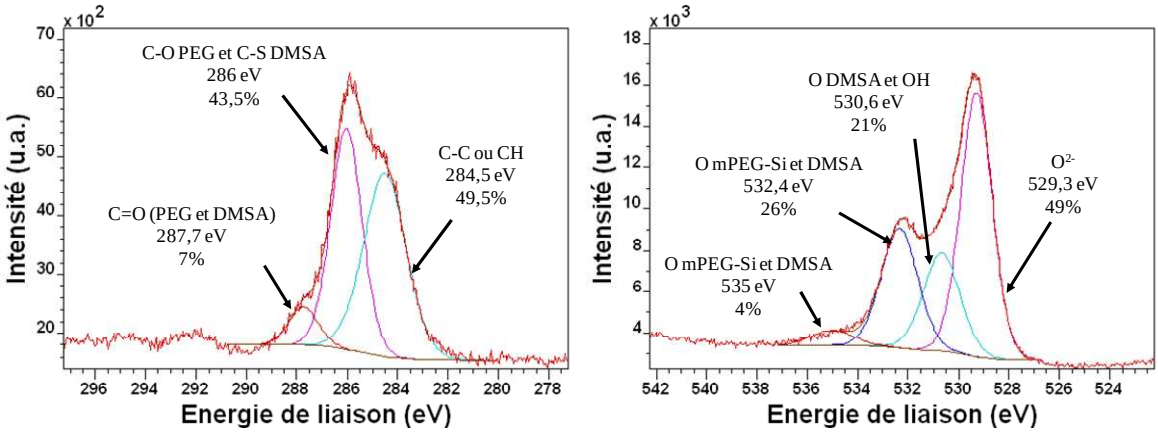
Spectres XPS et désommation avec leurs proportions relatives du carbone et de l'oxygène de nanoparticules avec du $mPEG_{550}$-Si + DMSA lavées par décantation acide (pH = 3-4)



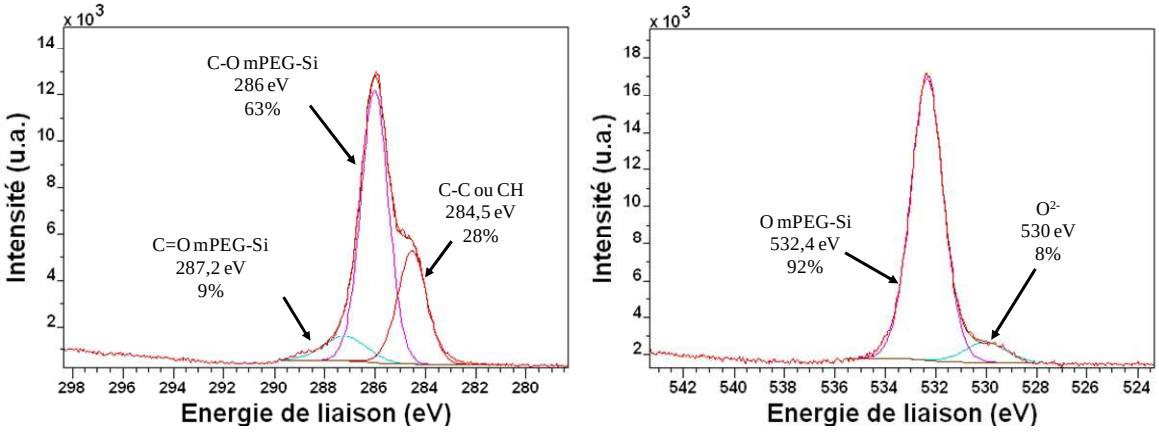
Spectres XPS et désommation avec leurs proportions relatives du carbone et de l'oxygène de nanoparticules avec du $mPEG_{550}$-Si + DMSA lavées par dialyse



Spectres XPS et désommation avec leurs proportions relatives du carbone et de l'oxygène de nanoparticules avec du $mPEG_{2000}$-Si + DMSA lavées par dialyse

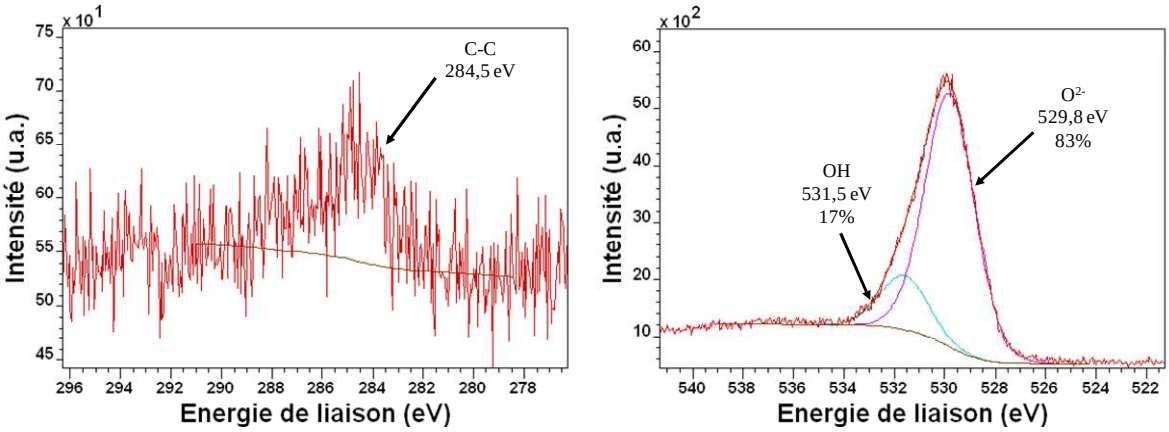


Spectres XPS et désommation avec leurs proportions relatives du carbone et de l'oxygène de nanoparticules avec du $mPEG_{5000}$-Si + DMSA lavées par décantation acide (pH = 3-4)

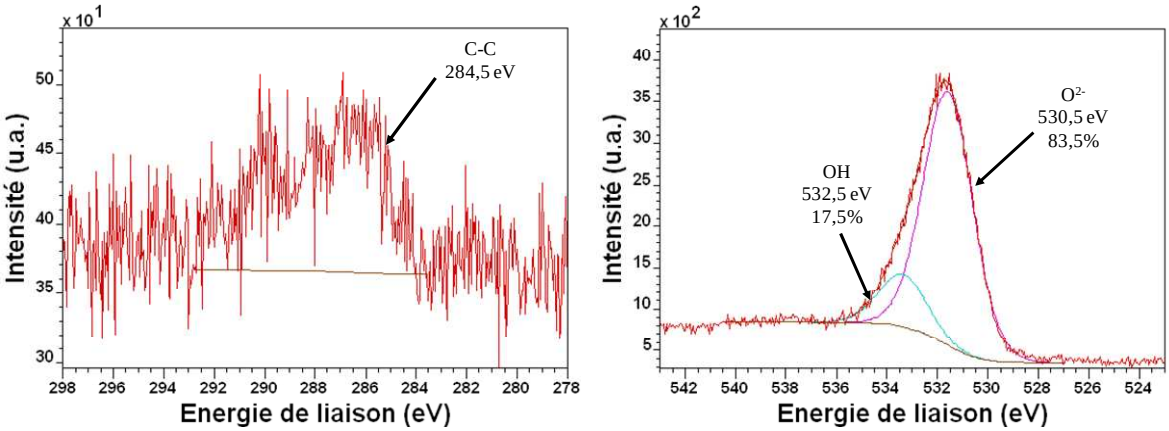


Spectres XPS et désommation avec leurs proportions relatives du carbone et de l'oxygène de nanoparticules avec du $mPEG_{5000}$-Si + DMSA lavées par dialyse

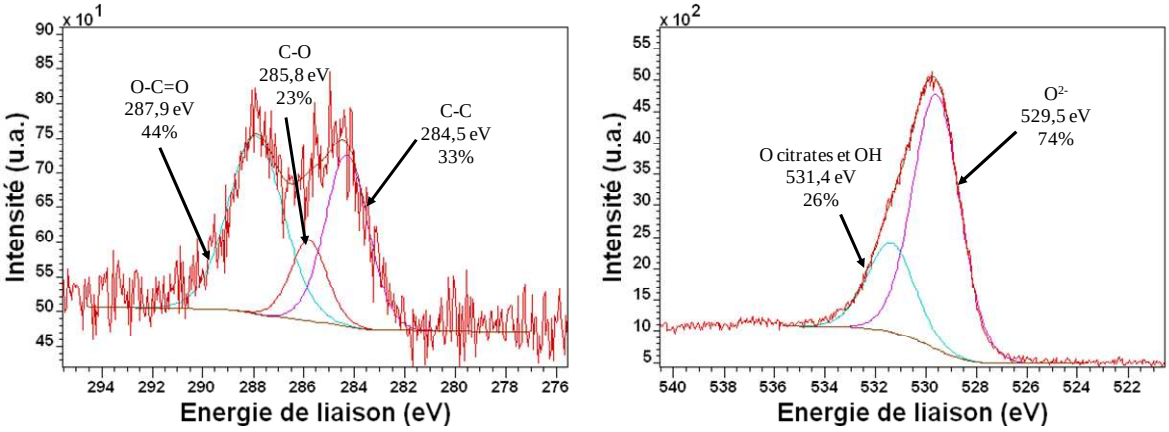
A.4.6. Les analyses XPS des synthèses en conditions hydrothermales et continues



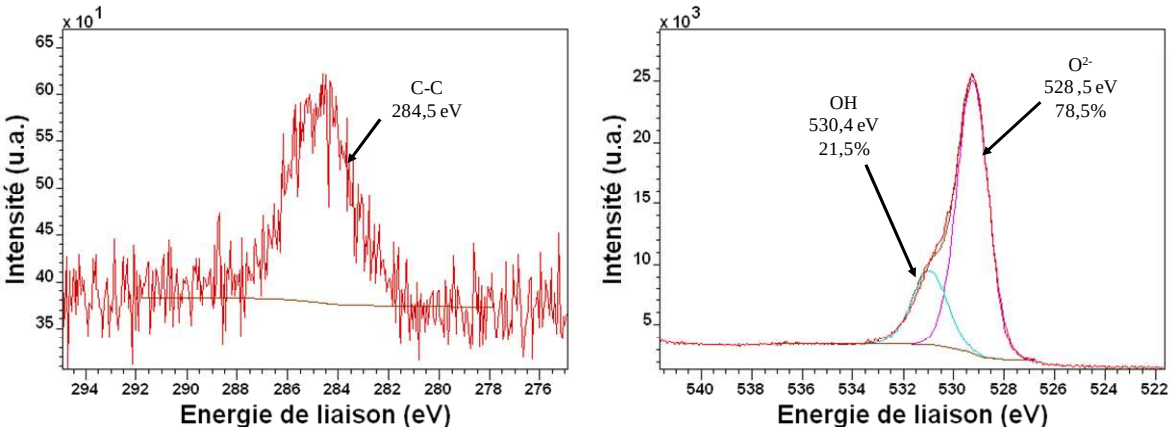
Spectres XPS et désommation avec leurs proportions relatives du carbone et de l'oxygène de nanoparticules synthétisées en conditions hydrothermales et continues



Spectres XPS et désommation avec leurs proportions relatives du carbone et de l'oxygène de nanoparticules synthétisées avec un ratio molaire de 5% de citrates en conditions hydrothermales et continues



Spectres XPS et désommation avec leurs proportions relatives du carbone et de l'oxygène de nanoparticules synthétisées avec un ratio molaire de 100% de citrates en conditions hydrothermales et continues



Spectres XPS et désommation avec leurs proportions relatives du carbone et de l'oxygène de nanoparticules synthétisées avec du $mPEG_{2000}$-Si en conditions hydrothermales et continues

A.5. Estimation du nombre de rhodamine par unité de surface en UV-Visible

1) Estimation par mesure directe de la suspension de nanoparticules fonctionnalisées par la rhodamine

Les nanoparticules greffées au $mPEG_{2000}$ ($NP\text{-}mPEG_{2000}$) présentent la même perte de masse en ATG que celles pegylées et fonctionnalisées à la rhodamine (NP_{XRITC}). Ainsi, leurs absorbances dues à l'oxyde de fer sont les mêmes. Des suspensions de $NP_{PEG2000}$ et $NP_{0,5RITC}$ et NP_{5RITC} de mêmes concentrations massiques sont réalisées. Les absorbances sont mesurées sur les NP_{XRITC} avec comme cellule de référence $NP_{PEG2000}$. Dans les deux cas, un volume de 100 ou 200 µL est dilué dans 3 mL d'eau (volume total).
Pour les quatre mesures, la courbe d'étalonnage utilisée est la première réalisée pour les plus fortes concentrations.

Nous détaillerons le calcul pour 100 µL de NP_{5RITC}. Dans ce cas, l'absorbance mesurée est de 0,0731. En utilisant l'équation de la courbe de tendance de calibration ($R^2 = 0,9999$) : Absorbance = 0,0766 * concentration ($\mu g_{RITC\text{-}APTES}.mL^{-1}$) on trouve comme concentration dans les trois mL de la cuvette : 0,954 $\mu g.mL^{-1}$ ce qui donne sur le volume total de la cuvette :
0,954 $\mu g.mL^{-1}$*3 mL = 2,862 µg de RITC-APTES.
En utilisant la masse molaire de la rhodamine-APTES (M = 757,5 $g.mol^{-1}$) on peut trouver le nombre de rhodamines présentes dans les 3 mL d'après l'équation :

$$N_{RITC-APTES} = \frac{2,862\mu g}{757,5 \cdot 10^{6}} \cdot 6,02 \cdot 10^{23} = 2,275 \cdot 10^{15}$$

Dans ces 3 mL sont présents également 100 µL de NP_{5RITC} à 4,40 $mg.mL^{-1}$ de nanoparticules avec 58% en masse de $mPEG_{2000}$-Si. On a donc 100 µL d'une solution à 1,85 $mg.mL^{-1}$ de magnétite nue soit 0,185 mg de magnétite. Sa surface spécifique étant de 110 $m^2.g^{-1}$, la surface développée par 3 mL de suspension de nanoparticules est de $2,03.10^{16}$ nm^2.

On peut ainsi trouver le taux de rhodamine par nm^2 :

$$N_{RITC/nm^2} = \frac{N_{RITC-APTES}}{Surface_{magnétite}} = \frac{(2,275 \cdot 10^{15})Rhod}{(2,03 \cdot 10^{16})nm^2} = 0,112 \cdot Rhod/nm^2$$

2) Estimation par mesures des eaux de lavage de la suspension de nanoparticules fonctionnalisées par la rhodamine

Toutes les synthèses ont été dialysées et chaque dialysat a été analysé par spectroscopie UV-visible jusqu'à ce que la valeur de l'absorbance soit nulle. En mesurant les absorbances de chaque dialysat, il a été possible de trouver la masse totale de rhodamine éliminée et donc de remonter au taux de fonctionnalisation.
Nous détaillerons le calcul pour NP_{5RITC}. 30 mL des 1,8 L des 4 dialysats ont été passés en UV-visible pour relever leur absorbance. La première absorbance obtenue était assez importante pour suivre la première courbe d'étalonnage :

Absorbance = 0,0766 * concentration ($\mu g_{RITC\text{-}APTES}.mL^{-1}$) ($R^2 = 0,999$)

Les deux suivantes suivaient la deuxième courbe d'étalonnage d'équation :

Absorbance = 0,0693 * concentration ($\mu g_{RITC\text{-}APTES}.mL^{-1}$) + 0,0019 ($R^2 = 1$)

Les trois dernières étaient inférieures à 0,0030 elles ont été négligées.

Les calculs de concentrations dans les 30 mL de dialysats gardés pour les trois premières dialyses ont donné les des valeurs qui ont permis de retrouver la masse totale de rhodamine présente dans le réservoir de dialyse en multipliant la concentration trouvée en $\mu g.mL^{-1}$ par les 1800 mL du dialysat.

1) Absorbance = 0,098 soit 1,28 $\mu g.mL^{-1}$ soit 2303 µg de RITC-APTES
2) Absorbance = 0,0118 soit 0,14 $\mu g.mL^{-1}$ soit 257 µg de RITC-APTES
3) Absorbance = 0,0051 soit 0,05 $\mu g.mL^{-1}$ soit 83 µg de RITC-APTES

La masse totale de rhodamine perdue est de 2643 µg. Etant donné que nous avions ajouté 3800 µg de RITC-APTES pour la réaction, la masse restante est donc de 1157 µg soit 1,53 µmoles. De la même manière, ces 1,53 µmoles de RITC-APTES se sont donc couplées au 100 mg d'oxyde de fer (soit 11 m²).

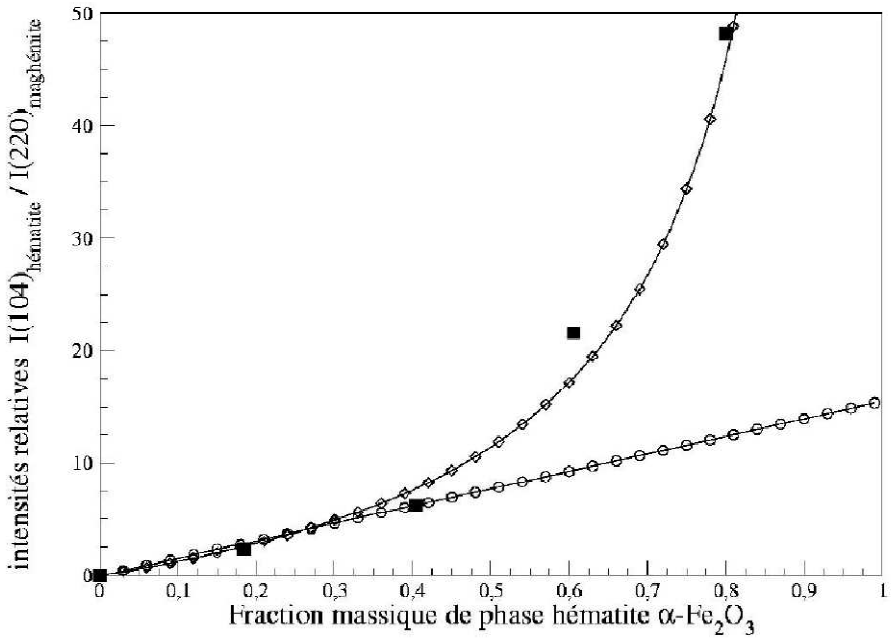
Ainsi le nombre de RITC-APTES peut se calculer de la manière suivante :

$$N_{RITC/nm^2} = \frac{N_{RITC-APTES}}{Surface_{magnétite}} = \frac{(1{,}53 \cdot 10^{-6} \cdot 6{,}02 \cdot 10^{23}) Rhod}{(11 \cdot 10^{18}) nm^2} = 0{,}084 \cdot Rhod / nm^2$$

A.6. Calcul de la proportion d'hématite et de magnétite dans un diffractogramme possédant les deux phases

Lors d'études antérieures au sein de l'équipe MaNaPI (Belin 2002), il a été montré que la quantification de maghémite (γ-Fe_2O_3) et d'hématite (α-Fe_2O_3) pouvaient se faire directement par le rapport des intensités relatives de raies caractéristiques de ces deux phases. Les raies de l'hématite (104) d'intensité relative 100 et de la maghémite (220) d'intensité relative 35 ont été utilisées car ces deux raies ne se chevauchent pas et ne sont pas influencées par les autres raies des diffractogrammes.

Deux courbes d'étalonnages ont été réalisées pour divers pourcentages massiques d'hématite pour deux approximations.



Courbes d'étalonnages des intensités relatives du pic correspondant à la raie (104) de l'hématite par rapport à la raie (220) de la magnétite en fonction de la fraction massique d'hématite utilisée d'après (Belin 2002).

Pour des fractions massiques d'hématite inférieures à 30%, le ratio $\frac{I_{(104)}}{I_{(220)}}$ varie linéairement avec la fraction massique d'hématite selon l'équation suivante :

$$\frac{I_{(104)}}{I_{(220)}} = 15{,}471 \cdot x_{alpha}$$

Au-delà d'une fraction de 30 à 40%, une approximation de la méthode sans standard est choisit :

$$\frac{I_{(104)}}{I_{(220)}} = 11{,}447 \cdot \left(\frac{x_{alpha}}{1 - x_{alpha}} \right)$$

Cependant, dans notre cas, seule la méthode linéaire a été retenue car jamais la quantité d'hématite synthétisée avec la maghémite n'a dépassée 20%.

A.7. Mesure de la fonction mitochondriale par le MTT

Ce test permet d'estimer le degré de lésions cellulaires en déterminant la fonction mitochondriale des cellules par mesure de la bioréduction par les cellules du bromure 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium (MTT, Sigma) en formazan coloré. Cette conversion est probablement accomplie par la succinate déshydrogénase produite par les mitochondries de cellules métaboliquement actives (Gomez *et al.* 1997). Après chaque traitement, les cellules en plaque 24 puits (ou plaque 96 puits) sont rincées deux fois délicatement avec du PBS pré-chauffé à 37°C. Elles sont ensuite incubées en présence de 500 µL (100 µL) de MTT à 2 $mg.mL^{-1}$ dans du milieu Puck G+ pendant une heure à 37°C en normoxie. Le MTT est éliminé et les cellules sont finalement lysées par ajout de 500 µL (200 µL) d'isopropanol contenant 0,1 $mol.L^{-1}$ de HCl pendant une heure à température ambiante. La quantité de formazan produite est évaluée par mesure de l'absorbance à 570 nm sur un spectrophotomètre (Victor3, Wallac). Le pourcentage de cellules métaboliquement actives est exprimé par rapport à des cellules en conditions normales (contrôle), dont la valeur est considérée comme égale à 100 %.

A.8. Protocole de préparation d'échantillons pour Microscopie Electronique en Transmission (Suspensions bactériennes, levures ou cellulaires)

La **fixation** du matériel biologique est réalisée durant 30 min à température ambiante dans un mélange paraformaldéhyde 4%, glutaraldhéhyde 1,5% dans du tampon phosphate de Sorensen (0,1 mol.L^{-1}, pH 7,4 final). Après fixation, le matériel est lavé plusieurs fois (minimum cinq fois) par du tampon phosphate de Sorensen, comme précédemment. Le dernier bain de lavage est réalisé durant une nuit à + 4°C.

Les cellules sont ensuite **post-fixées** 60 min, à température ambiante et à l'obscurité dans une solution à 1 % de Tétroxyde d'Osmium dans le tampon de Sorensen 0,1 mol.L^{-1} à pH 7,4.

Un lavage rapide dans du tampon est réalisé puis les étapes de déshydratation, substitution et imprégnation dans la résine sont ensuite effectuées.

Déshydratation : bains successifs d'alcools de degrés croissants, à température ambiante : éthanol 30°, 50°, 70° et 95 (15 min pour chaque bain), puis éthanol Absolu 100 (trois bains de 15 min).

Substitution : deux bains de 30 min dans des volumes égaux de résine : éthanol absolu, à température ambiante.

Imprégnation : une nuit dans de la résine seule et à température ambiante.

Remarque : La résine utilisée est de l'EMBed-812 (résine époxyde) mélange d'EMBed-812, de DDSA, de NMA et de BDMA.

DDSA : Dodecenyl Succinic Anhydride,
EMBed-812 = Epon 812,
NMA : Nadic Methyl Anhydride = Methyl-5-Norbornene-2,3Dicarboxylic Anhydride,
BDMA : Benzyldimethylamine = N-Benzyl-N,N-Dimethylamine (accélérateur de polymérisation).

Enfin, des capsules de gélatine sont remplies de résine et retournées sur les boîtes de culture. La polymérisation est initiée pendant une nuit à 37°C puis finalisée après 48 h à 60°C.

Les blocs de résine obtenus sont coupés à l'aide d'un Ultracut. Des coupes ultrafines de l'ordre de 80 à 90 nanomètres sont réalisées à l'aide d'un diamant et déposées sur des grilles métalliques Cuivre/Palladium de 200 Meshs. Après séchage, les grilles sont **contrastées** par des sels de métaux lourds (sels d'uranium et sels de plomb).

Les étapes du contraste :

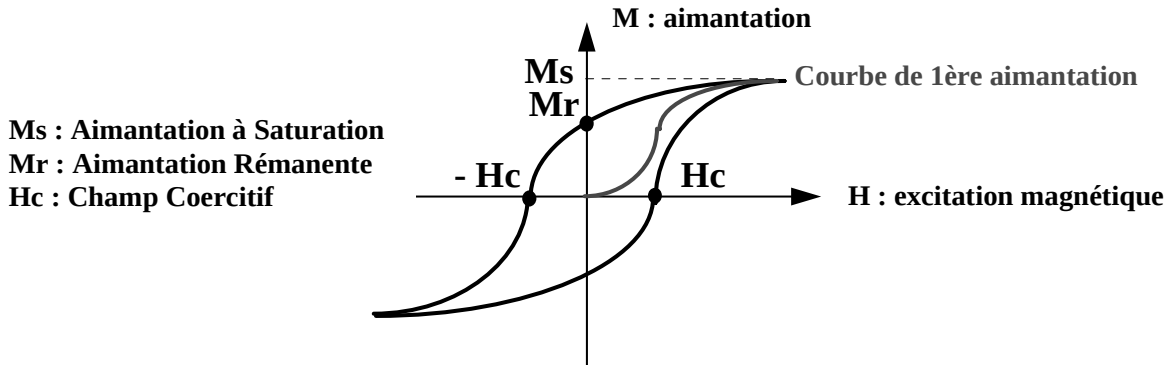
- 30 min dans une solution d'**acétate d'uranyle à 5 %** à l'obscurité et à température ambiante suivies d'un rinçage abondant à l'eau dégazée,

- 3 min dans une solution de **citrate de plomb** à l'abri des carbonates de l'air et à température ambiante suivies d'un rinçage abondant à l'eau dégazée et d'un séchage à l'air ambiant.

A.9. Les mesures magnétiques

Les ferrites de structure spinelle de tailles inférieures à 20 nm possèdent un comportement superparamagnétique. Cependant, à la température de l'azote liquide (-196°C) elles sont ferrimagnétiques et présentent un cycle d'hystérésis magnétique traduisant l'irréversibilité des mécanismes d'aimantation caractérisé par :

- un champ coercitif Hc
- une aimantation rémanente Mr et à saturation Ms
- sa carrure Mr/Ms.



Cycle d'hystérésis d'un composé ferri ou ferromagnétique.

Pour caractériser les propriétés magnétiques de nos USPIO, les aimantations à saturation (M_s) et rémanente (M_r) ainsi que le champ coercitif ont été mesurées.

A.10. Valorisations des travaux de thèse

A.10.1. Publications avec comité de lecture

Easy Route to Functionalize Iron Oxide Nanoparticles via Long-Term Stable Thiol Groups
L. Maurizi, H. Bisht, F. Bouyer and N. Millot, **Langmuir 2009**, 25 (16), 8857-8859
(doi : 10.1021/la901602w)

A.10.2. Communications orales dans le cadre de congrès

Le nom de la personne présentante est souligné.

Synthesis of third generation USPIO for biomedical applications
L. Maurizi, H. Bisht, M. Ariane, D. Vandroux, P. Walker, J.M. Perrier-Cornet, F. Bouyer and N. Millot, **Nanohybrides 06**, La Marana (France), Juin 2009.

USPIO for Biomedical applications
L. Maurizi, H. Bisht, M. Ariane, D. Vandroux, P. Walker, J.M. Perrier-Cornet, F. Bouyer and N. Millot, **Séminaire invité**, Ljubljana (Slovénie), septembre 2009.

Synthesis of new generation iron oxides (USPIO) and MRI validation in mice
L. Maurizi, P. Walker, H. Bisht, L. Dumont, D. Vandroux, F. Bouyer and N. Millot, **Communication invitée groupe Pharmimage**, Dijon (France), décembre 2009.

New methods to synthesize USPIO as cardiovascular pathologies contrast agents : in vitro and in vivo in mice studies
L. Maurizi, D. Vandroux, L. Dumont, P. Walker, F. Demoisson, F. Bouyer and N. Millot, **Nanohybrides 07**, Porquerolles (France), mai 2010

New Method of Synthesis of USPIO: In Vitro and In Vivo Biological Applications as a MRI Contrast Agent
L. Maurizi, H. Bisht, M. Ariane, D. Vandroux, L. Dumont, P. Walker, F. Demoisson, F. Bouyer and N. Millot, **Particles 2010**, Orlando (USA), mai 2010.

A.10.3. Communication orale dans le cadre de la formation doctorale

Développement de SPIO de troisième génération pour applications biomédicales
L. Maurizi, **X^{èmes} journées des écoles Carnot et Louis Pasteur**, Dijon, 14-15 mai 2009.

A.10.4. Communications par affiches

Le nom de la personne présentante est souligné.

Elaboration and characterization of functional nanoparticles : application as Magnetic Resonance Imaging (MRI) contrast agents
L. Maurizi, H. Bisht, D. Vandroux, P. Walker, F. Bouyer and N. Millot, **Nanohybrides 05**, Porquerolles (France), juin 2008.

Elaboration and characterization of functional nanoparticles: application as Magnetic Resonance Imaging (MRI) contrast agents
L. Maurizi, H. Bisht, D. Vandroux, P. Walker, F. Bouyer and N. Millot, **Ecole Galerne**, Marcoul (France), octobre 2008.

Nanomaterials for diagnosis and gene delivery
H. Bisht, L. Maurizi, A. L. Papa, F. Bouyer, D. Vandroux, P. Walker and N. Millot, **Transalp'Nano 08**, Lyon (France), octobre 2008.

New third generation SPIO as apoptosis cells markers in MRI
L. Maurizi, H. Bisht, D. Vandroux, P. Walker, Jean-Marie Perrier-Cornet, F. Bouyer and N. Millot, **Hybrid Materials**, Tours (France), mars 2009.

Nanomaterials for diagnosis and gene delivery
H. Bisht, L. Maurizi, A. L. Papa, F. Bouyer, D. Vandroux, P. Walker and N. Millot, **Nanomed 09**, Berlin (Allemagne), mars 2009.

Synthesis of Oxide Nano-Particles with an Continuous Hydrothermal Production Process under Sub and Supercritical Conditions
F. Demoisson, M. Ariane, L. Maurizi, F. Bouyer, N. Millot and F. Bernard, **12th EMSF (European Meetings on Supercritical Fluids)**, Graz (Autriche), mai 2010.

Titanate nanotubes as new carriers in the field of cardiovascular diseases: synthesis, functionalization, internalization and toxicity
A-L Papa, L. Dumont, L. Maurizi, P. Athias, D. Vandroux and N. Millot, **Particles 2010**, Orlando (USA), mai 2010.

New method of synthesis of SPIONs: in vitro and in vivo biological applications as a MRI contrast agent
L. Maurizi, H. Bisht, M. Ariane, D. Vandroux, L. Dumont, P. Walker, F. Demoisson, F. Bouyer and N. Millot, **8th SCAMC (International Conference on the scientific and clinical applications of magnetic carriers)**, Rostock (Allemagne), mai 2010.

Synthesis by a continuous hydrothermal process and functionalization of SPIONs. In vitro and in vivo biological applications
L. Maurizi, J. Paris, H. Bisht, D. Vandroux, L. Dumont, P.Walker, F. Demoisson, F. Bouyer, N. Millot, **9th Japan-France Workshop on Nanomaterials**, Toulouse (France), novembre 2010.

Evaluation des activités cytotoxiques et prooxydantes de nanoparticules d'oxydes de fer fonctionnalisées sur des cultures d'oligodendrocytes murins 158N
F. Bouyer, L. Maurizi, M. Baarine, N. Millot, J. Bruniaux, F. Masson, G. Lizard, **Congrès annuel de l'Association française de cytométrie**, Marseille (France), octobre 2010.

Références bibliographiques

Adair, J. H. and E. Suvaci (2000). "Morphological control of particles." Current Opinion in Colloid & Interface Science **5**(1-2): 160-167.

Adschiri, T., Y. Hakuta and K. Arai (2000). "Hydrothermal synthesis of metal oxide fine particles at supercritical conditions." Industrial & Engineering Chemistry Research **39**(12): 4901-4907.

Agarwal, R., S. M. Brunelli, K. Williams, M. D. Mitchell, H. I. Feldman and C. A. Umscheid (2009). "Gadolinium-based contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis: a systematic review and meta-analysis." Nephrology Dialysis Transplantation **24**(3): 856-863.

Aimable, A. (2007). Thèse de doctorat : Synthèse hydrothermale en continu et en conditions supercritiques du matériau d'électrode positive des batteries Li-ion $LiFePO_4$: du matériau au procédé. Institut Carnot de Bourgogne UMR 5209 CNRS/Université de Bourgogne. Dijon (France), Université de Bourgogne**:** 223.

Aimable, A., H. Muhr, C. Gentric, F. Bernard, F. Le Cras and D. Aymes (2009). "Continuous hydrothermal synthesis of inorganic nanopowders in supercritical water: Towards a better control of the process." Powder Technology **190**(1-2): 99-106.

Arkles, B. (1977). "Tailoring surfaces with silanes." Chemtech **7**(12): 766-778.

Arkles, B., J. R. Steinmetz, J. Zazyczny and P. Mehta (1992). "Factors contributing to the stability of alkoxysilanes in aqueous-solution." Journal of Adhesion Science and Technology **6**(1): 193-206.

Barale, M., G. Lefevre, F. Carrette, H. Catalette, M. Fedoroff and G. Cote (2008). "Effect of the adsorption of lithium and borate species on the zeta potential of particles of cobalt ferrite, nickel ferrite, and magnetite." Journal of Colloid and Interface Science **328**(1): 34-40.

Barrera, C., A. P. Herrera and C. Rinaldi (2009). "Colloidal dispersions of monodisperse magnetite nanoparticles modified with poly(ethylene glycol)." Journal of Colloid and Interface Science **329**(1): 107-113.

Bartolozzi, C., R. Lencioni, F. Donati and D. Cioni (1999). "Abdominal MR: liver and pancreas." European Radiology **9**(8): 1496-1512.

Bashir, S., R. W. McCabe, C. Boxall, M. S. Leaver and D. Mobbs (2009). "Synthesis of alpha- and beta-FeOOH iron oxide nanoparticles in non-ionic surfactant medium." Journal of Nanoparticle Research **11**(3): 701-706.

Basly, B., D. Felder-Flesch, P. Perriat, C. Billotey, J. Taleb, G. Pourroy and S. Begin-Colin (2010). "Dendronized iron oxide nanoparticles as contrast agents for MRI." Chemical Communications **46**(6): 985-987.

Bee, A., R. Massart and S. Neveu (1995). "Synthesis of very fine maghemite particles." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **149**(1-2): 6-9.

Belin, T. (2002). Thèse de doctorat : Interface externe et propriétés structurales d'un solide nanométrique : cas de nanocristaux de γ-Fe_2O_3 adsorption d'eau et transition de phase γ-α. Laboratoire de Recherche sur la Réactivité des Solides UMR 5613 CNRS/Université de Bourgogne Dijon (France), Université de Bourgogne**:** 169.

Belin, T., N. Millot, N. Bovet and M. Gailhanou (2007). "In situ and time resolved study of the gamma/alpha-Fe_2O_3 transition in nanometric particles." Journal of Solid State Chemistry **180**(8): 2377-2385.

Belin, T., N. Millot, F. Villieras, O. Bertrand and J. P. Bellat (2004). "Structural variations as a function of surface adsorption in nanostructured particles." Journal of Physical Chemistry B **108**(17): 5333-5340.

Belounis, F. (2008). Rapport de stage : Elaboration et caractérisation de suspensions d'oxydes de fer pour applications en imagerie médicale. Institut Carnot de Bourgogne UMR 5209 CNRS/Université de Bourgogne. Dijon (France), Université de Bourgogne**:** 51.

Berret, J. F., N. Schonbeck, F. Gazeau, D. El Kharrat, O. Sandre, A. Vacher and M. Airiau (2006). "Controlled clustering of superparamagnetic nanoparticles using block copolymers: Design of new contrast agents for magnetic resonance imaging." Journal of the American Chemical Society **128**(5): 1755-1761.

Berry, C. C. and A. S. G. Curtis (2003). "Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine." Journal of Physics D-Applied Physics **36**(13): R198-R206.

Bertorelle, F., C. Wilhelm, J. Roger, F. Gazeau, C. Menager and V. Cabuil (2006). "Fluorescence-modified superparamagnetic nanoparticles: Intracellular uptake and use in cellular imaging." Langmuir **22**(12): 5385-5391.

Bjornerud, A. and L. Johansson (2004). "The utility of superparamagnetic contrast agents in MRI: theoretical consideration and applications in the cardiovascular system." Nmr in Biomedicine **17**(7): 465-477.

Bonnemain, B. (2008). "Nanoparticules : le point de vue d'un industriel. Applications en imagerie diagnostique." Annales Pharmaceutiques Françaises **66**: 263-267.

Bourrinet, P., H. H. Bengele, B. Bonnemain, A. Dencausse, J. M. Idee, P. M. Jacobs and J. M. Lewis (2006). "Preclinical safety and pharmacokinetic profile of ferumoxtran-10, an ultrasmall superparamagnetic iron oxide magnetic resonance contrast agent." Investigative Radiology **41**(3): 313-324.

Boutry, S., C. Burtea, S. Laurent, G. Toubeau, L. Vander Elst and R. N. Muller (2005). "Magnetic resonance imaging of inflammation with a specific selectin-targeted contrast agent." Magnetic Resonance in Medicine **53**(4): 800-807.

Brauer, M. (2003). "In vivo monitoring of apoptosis." Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry **27**(2): 323-331.

Bridot, J. L., A. C. Faure, S. Laurent, C. Riviere, C. Billotey, B. Hiba, M. Janier, V. Josserand, J. L. Coll, L. Vander Elst, R. Muller, S. Roux, P. Perriat and O. Tillement (2007). "Hybrid gadolinium oxide nanoparticles: Multimodal contrast agents for in vivo imaging." Journal of the American Chemical Society **129**(16): 5076-5084.

Brillet, P. Y., F. Gazeau, A. Luciani, B. Bessoud, C. A. Cuenod, N. Siauve, J. N. Pons, J. Poupon and O. Clement (2005). "Evaluation of tumoral enhancement by superparamagnetic iron oxide particles: comparative studies with ferumoxtran and anionic iron oxide nanoparticles." European Radiology **15**(7): 1369-1377.

Brinker, C. J. and G. W. Scherer (1990). Sol-Gel Science : the physics and chemistry of sol-gel processing, Academic Press INC.

Brochet, B., M. S. A. Deloire, T. Touil, O. Anne, J. M. Caille, V. Dousset and K. G. Petry (2006). "Early macrophage MRI of inflammatory lesions predicts lesion severity and disease development in relapsing EAE." Neuroimage **32**(1): 266-274.

Butterworth, M. D., L. Illum and S. S. Davis (2001). "Preparation of ultrafine silica- and PEG-coated magnetite particles." Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **179**(1): 93-102.

Cabanas, A. and M. Poliakoff (2001). "The continuous hydrothermal synthesis of nano-particulate ferrites in near critical and supercritical water." Journal of Materials Chemistry **11**(5): 1408-1416.

Caillot, T. (2002). Thèse de doctorat : Synthèse microondes et caractérisation de nanoparticules associant une phase métallique M (M=Fe, FeCo, FeNi) et un oxyde de structure spinelle $Fe_{3-x}M'_xO4$ (M'=Fe, Co, Ni, Mn,MnZn). Laboratoire de Recherche

sur la Réactivité des Solides UMR 5613 CNRS/Université de Bourgogne Dijon (France), Université de Bourgogne**:** 228.

Cansell, F., B. Chevalier, A. Demourgues, J. Etourneau, C. Even, Y. Garrabos, V. Pessey, S. Petit, A. Tressaud and F. Weill (1999). "Supercritical fluid processing: a new route for materials synthesis." Journal of Materials Chemistry **9**(1): 67-75.

Chatterjee, J., Y. Haik and C. J. Chen (2003). "Size dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **257**(1): 113-118.

Chen, D. H., X. L. Jiao and D. R. Chen (2001). "Solvothermal synthesis of alpha-Fe_2O_3 particles with different morphologies." Materials Research Bulletin **36**(5-6): 1057-1064.

Chen, T. J., T. H. Cheng, C. Y. Chen, S. C. N. Hsu, T. L. Cheng, G. C. Liu and Y. M. Wang (2009). "Targeted Herceptin-dextran iron oxide nanoparticles for noninvasive imaging of HER2/neu receptors using MRI." Journal of Biological Inorganic Chemistry **14**(2): 253-260.

Chen, Z. P., Y. Zhang, S. Zhang, J. G. Xia, J. W. Liu, K. Xu and N. Gu (2008). "Preparation and characterization of water-soluble monodisperse magnetic iron oxide nanoparticles via surface double-exchange with DMSA." Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **316**(1-3): 210-216.

Cheng, C. M., G. Kou, X. L. Wang, S. H. Wang, H. C. Gu and Y. J. Guo (2009). "Synthesis of carboxyl superparamagnetic ultrasmall iron oxide (USPIO) nanoparticles by a novel flocculation-redispersion process." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **321**(17): 2663-2669.

Chin, A. B. and I. I. Yaacob (2007). "Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart's procedure." Journal of Materials Processing Technology **191**(1-3): 235-237.

Chorny, M., I. Fishbein, B. B. Yellen, I. S. Alferiev, M. Bakay, S. Ganta, R. Adamo, M. Amiji, G. Friedman and R. J. Levy (2010). "Targeting stents with local delivery of paclitaxel-loaded magnetic nanoparticles using uniform fields." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**(18): 8346-8351.

Cinteza, L. O., T. Y. Ohulchanskyy, Y. Sahoo, E. J. Bergey, R. K. Pandey and P. N. Prasad (2006). "Diacyllipid micelle-based nanocarrier for magnetically guided delivery of drugs in photodynamic therapy." Molecular Pharmaceutics **3**(4): 415-423.

Clark, S. M., S. G. Prilliman, C. K. Erdonmez and A. P. Alivisatos (2005). "Size dependence of the pressure-induced gamma to alpha structural phase transition in iron oxide nanocrystals." Nanotechnology **16**(12): 2813-2818.

Corchero, J. and A. Villaverde (2009). "Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles." Trends in Biotechnology **27**(8): 468-476.

Corot, C., P. Robert, J. M. Idee and M. Port (2006). "Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging." Advanced Drug Delivery Reviews **58**(14): 1471-1504.

Cremin, J. D., M. L. Luck, N. K. Laughlin and D. R. Smith (1999). "Efficacy of succimer chelation for reducing brain lead in a primate model of human lead exposure." Toxicology and Applied Pharmacology **161**(3): 283-293.

Cunault, C. (2009). Rapport de stage : Caractérisation de nanoparticules internalisées par des organismes unicellulaires : applications en agroalimentaire. Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires. Dijon (France), Université de Bourgogne**:** 17.

Daou, T. J., G. Pourroy, S. Begin-Colin, J. M. Greneche, C. Ulhaq-Bouillet, P. Legare, P. Bernhardt, C. Leuvrey and G. Rogez (2006). "Hydrothermal Synthesis of Monodisperse Magnetite Nanoparticles." Chemistry of Materials **18**(18): 4399-4404.

Dennis, C. L., A. J. Jackson, J. A. Borchers, R. Ivkov, A. R. Foreman, P. J. Hoopes, R. Strawbridge, Z. Pierce, E. Goerntiz, J. W. Lau and C. Gruettner (2008). "The influence of magnetic and physiological behaviour on the effectiveness of iron oxide nanoparticles for hyperthermia." Journal of Physics D-Applied Physics **41**(13).

des Rieux, A., V. Fievez, M. Garinot, Y. J. Schneider and V. Preat (2006). "Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach." Journal of Controlled Release **116**(1): 1-27.

Diamandescu, L., D. Mihaila-Tarabasanu, N. Popescu-Pogrion, A. Totovina and I. Bibicu (1999). "Hydrothermal synthesis and characterization of some polycrystalline alpha-iron oxides." Ceramics International **25**(8): 689-692.

Dobrovolskaia, M. A., D. R. Germolec and J. L. Weaver (2009). "Evaluation of nanoparticle immunotoxicity." Nature Nanotechnology **4**(7): 411-414.

Dodd, C. H., H. C. Hsu, W. J. Chu, P. G. Yang, H. G. Zhang, J. D. Mountz, K. Zinn, J. Forder, L. Josephson, R. Weissleder and J. M. Mountz (2001). "Normal T-cell response and in vivo magnetic resonance imaging of T cells loaded with HIV transactivator-peptide-derived superparamagnetic nanoparticles." Journal of Immunological Methods **256**(1-2): 89-105.

Dousset, V., L. Ballarino, C. Delalande, M. Coussemacq, P. Canioni, K. G. Petry and J. M. Caille (1999). "Comparison of ultrasmall particles of iron oxide (USPIO)-enhanced T2-weighted, conventional T2-weighted, and gadolinium-enhanced T1-weighted MR images in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis." American Journal of Neuroradiology **20**(2): 223-227.

Doyon, D., E.-A. Cabanis, M.-T. Iba-Zizen, B. Roger, J. Frija, D. Pariente and I. Idy-Peretti (2004). IRM Imagerie par résonance magnétique.

Duguet, E., S. Vasseur, S. Mornet and J. M. Devoisselle (2006). "Magnetic nanoparticles and their applications in medicine." Nanomedicine **1**(2): 157-168.

Ek, S., A. Root, M. Peussa and L. Niinisto (2001). "Determination of the hydroxyl group content in Silica by thermogravimetry and a comparison with H-1 MAS NMR results." Thermochimica Acta **379**(1-2): 201-212.

Eyer, P., F. Worek, D. Kiderlen, G. Sinko, A. Stuglin, V. Simeon-Rudolf and E. Reiner (2003). "Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment." Analytical Biochemistry **312**(2): 224-227.

Fauconnier, N., A. Bee, J. Roger and J. N. Pons (1999). "Synthesis of aqueous magnetic liquids by surface complexation of maghemite nanoparticles." Journal of Molecular Liquids **83**(1-3): 233-242.

Fauconnier, N., J. N. Pons, J. Roger and A. Bee (1997). "Thiolation of maghemite nanoparticles by dimercaptosuccinic acid." Journal of Colloid and Interface Science **194**(2): 427-433.

Faure, A. C., S. Dufort, V. Josserand, P. Perriat, J. L. Coll, S. Roux and O. Tillement (2009). "Control of the in vivo Biodistribution of Hybrid Nanoparticles with Different Poly(ethylene glycol) Coatings." Small **5**(22): 2565-2575.

Flesch, C., M. Joubert, E. Bourgeat-Lami, S. Mornet, E. Duguet, C. Delaite and P. Dumas (2005). "Organosilane-modified maghemite nanoparticles and their use as co-initiator in the ring-opening polymerization of epsilon-caprolactone." Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **262**(1-3): 150-157.

Flesch, C., Y. Unterfinger, E. Bourgeat-Lami, E. Duguet, C. Delaite and P. Dumas (2005). "Poly(ethylene glycol) surface coated magnetic particles." Macromolecular Rapid Communications **26**(18): 1494-1498.

Funovics, M. A., B. Kapeller, C. Hoeller, H. S. Su, R. Kunstfeld, S. Puig and K. Macfelda (2004). "MR imaging of the her2/neu and 9.2.27 tumor antigens using immunospecific contrast agents." Magnetic Resonance Imaging **22**(6): 843-850.

Gillot, B. (1994). "DTG curves of selective oxidation of submicrometer mixed-valency spinels - data table for the oxidation temperature of transition-metals and its relation to the cation-oxygen distance." Journal of Solid State Chemistry **113**(1): 163-167.

Gnanaprakash, G., S. Ayyappan, T. Jayakumar, J. Philip and B. Raj (2006). "Magnetic nanoparticles with enhanced gamma-Fe_2O_3 to alpha-Fe_2O_3 phase transition temperature." Nanotechnology **17**(23): 5851-5857.

Godin, B., J. H. Sakamoto, R. E. Serda, A. Grattoni, A. Bouamrani and M. Ferrari (2010). "Emerging applications of nanomedicine for the diagnosis and treatment of cardiovascular diseases." Trends in Pharmacological Sciences **31**(5): 199-205.

Gomez, L. A., A. E. Alekseev, L. A. Aleksandrova, P. A. Brady and A. Terzic (1997). "Use of the MTT assay in adult ventricular cardiomyocytes to assess viability: Effects of adenosine and potassium on cellular survival." Journal of Molecular and Cellular Cardiology **29**(4): 1255-1266.

Goulle, J.-P., A. Cattaneo, E. Saussereau, L. Mathieu, M. Guerbet and C. Lacroix (2009). "MRI gadolinium-based contrast agents. Radiologists beware!" Annales Pharmaceutiques Françaises **67**: 335-339.

Goussard, C. (2006-2007). Rapport de stage : Etude de la toxicité et de la potentialité en tant qu'agent de contraste en IRM de nanoparticules d'oxydes de fer (USPIO). Institut Carnot de Bourgogne. Dijon (France), Université de Bourgogne**:** 39.

Goutayer, M., S. Dufort, V. Josserand, A. Royere, E. Heinrich, F. Vinet, J. Bibette, J. L. Coll and I. Texier (2010). "Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles: Assessment by in vivo fluorescence imaging." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **75**(2): 137-147.

Graf, C., S. Dembski, A. Hofmann and E. Ruhl (2006). "A general method for the controlled embedding of nanoparticles in silica colloids." Langmuir **22**(13): 5604-5610.

Gromovaya, V. F., G. S. Shapoval and I. E. Mironyuk (2002). "Antiradical and antioxidant activity of biologically active carboxylic acids." Russian Journal of General Chemistry **72**(5): 774-777.

Grzeta, B., M. Ristic, I. Nowik and S. Music (2002). "Formation of nanocrystalline magnetite by thermal decomposition of iron choline citrate." Journal of Alloys and Compounds **334**: 304-312.

Guigue-Millot, N. (1998). Thèse de doctorat : Synthèse et propriétés de ferrites nanométriques : Influence de la taille des grains et de la nature de la surface sur les propriétés structurales et magnétiques de ferrites de titane synthétisés par chimie douce et mécanosynthèse. Laboratoire de Recherche sur la Réactivité des Solides UMR 5613 CNRS/Université de Bourgogne Dijon (France), Université de Bourgogne**:** 124.

Gupta, A. K. and A. S. G. Curtis (2004). "Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Interaction studies with human fibroblasts in culture." Journal of Materials Science-Materials in Medicine **15**(4): 493-496.

Gupta, A. K. and M. Gupta (2005). "Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications." Biomaterials **26**(18): 3995-4021.

Gupta, A. K. and S. Wells (2004). "Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Preparation, characterization, and cytotoxicity studies." Ieee Transactions on Nanobioscience **3**(1): 66-73.

Hajdu, A., E. Illes, E. Tombacz and I. Borbath (2009). "Surface charging, polyanionic coating and colloid stability of magnetite nanoparticles." Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **347**(1-3): 104-108.

Halbreich, A., J. Roger, J. N. Pons, D. Geldwerth, M. F. Da Silva, M. Roudier and J. C. Bacri (1998). "Biomedical applications of maghemite ferrofluid." Biochimie **80**(5-6): 379-390.

Hauger, O., E. E. Frost, R. van Heeswijk, C. Deminiere, R. Xue, Y. Delmas, C. Combe, C. T. W. Moonen, N. Grenier and J. W. M. Bulte (2006). "MR evaluation of the glomerular homing of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a rat model of nephropathy." Radiology **238**(1): 200-210.

He, G. X., H. Zhang, H. C. Wei, Y. Wang, X. L. Zhang, Y. Tang, Y. J. Wei and S. S. Hu (2007). "In vivo imaging of bone marrow mesenchymal stem cells transplanted into myocardium using magnetic resonance imaging: A novel method to the transplanted cells." International Journal of Cardiology **114**(1): 4-10.

HeywangKobrunner, S. H., P. Viehweg, A. Heinig and C. Kuchler (1997). "Contrast-enhanced MRI of the breast: Accuracy, value, controversies, solutions." European Journal of Radiology **24**(2): 94-108.

Huber, D. L. (2005). "Synthesis, properties, and applications of Iron nanoparticles." Small **1**(5): 482-501.

Huh, Y. M., Y. W. Jun, H. T. Song, S. Kim, J. S. Choi, J. H. Lee, S. Yoon, K. S. Kim, J. S. Shin, J. S. Suh and J. Cheon (2005). "In vivo magnetic resonance detection of cancer by using multifunctional magnetic nanocrystals." Journal of the American Chemical Society **127**(35): 12387-12391.

Hyeon, T., S. S. Lee, J. Park, Y. Chung and H. Bin Na (2001). "Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process." Journal of the American Chemical Society **123**(51): 12798-12801.

Iwasaki, M., M. Hara and S. Ito (2000). "Synthesis of nanometer-sized hematite single crystals through NAC-FAS method." Journal of Materials Science **35**(4): 943-949.

Jarlbring, M., L. Gunneriusson, B. Hussmann and W. Forsling (2005). "Surface complex characteristics of synthetic maghemite and hematite in aqueous suspensions." Journal of Colloid and Interface Science **285**(1): 212-217.

Jing, Z. H., S. H. Wu, S. M. Zhang and W. P. Huang (2004). "Hydrothermal fabrication of various morphological alpha-Fe_2O_3 nanoparticles modified by surfactants." Materials Research Bulletin **39**(13): 2057-2064.

Jo, S. and K. Park (2000). "Surface modification using silanated poly(ethylene glycol)s." Biomaterials **21**(6): 605-616.

Johannsen, M., U. Gneueckow, B. Thiesen, K. Taymoorian, C. H. Cho, N. Waldofner, R. Scholz, A. Jordan, S. A. Loening and P. Wust (2007). "Thermotherapy of prostate cancer using magnetic nanoparticles: Feasibility, imaging, and three-dimensional temperature distribution." European Urology **52**(6): 1653-1662.

Jolivet, J.-P., C. Chaneac and E. Tronc (2004). "Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks." Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)(5): 481-487.

Jolivet, J.-P., E. Tronc and C. Chaneac (2002). "Synthesis of iron oxide-based magnetic nanomaterials and composites." Comptes Rendus Chimie **5**(10): 659-664.

Jolivet, J. P. (1994). De la solution à l'oxyde. Paris, Interéditions / CNRS Edition.

Jolivet, J. P., E. Tronc and C. Chaneac (2006). "Iron oxides: From molecular clusters to solid. A nice example of chemical versatility." Comptes Rendus Geoscience **338**(6-7): 488-497.

Ju, S. H., G. J. Teng, Y. Zhang, M. Ma, F. Chen and Y. C. Ni (2006). "In vitro labeling and MRI of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood." Magnetic Resonance Imaging **24**(5): 611-617.

Jun, Y. W., Y. M. Huh, J. S. Choi, J. H. Lee, H. T. Song, S. Kim, S. Yoon, K. S. Kim, J. S. Shin, J. S. Suh and J. Cheon (2005). "Nanoscale size effect of magnetic nanocrystals and their utilization for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging." Journal of the American Chemical Society **127**(16): 5732-5733.

Jun, Y. W., J. W. Seo and A. Cheon (2008). "Nanoscaling laws of magnetic nanoparticles and their applicabilities in biomedical sciences." Accounts of Chemical Research **41**(2): 179-189.

Jung, C. W. (1995). "Surface properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents : Ferumoxides, Ferumoxtran, Ferumoxsil." Magnetic Resonance Imaging **13**(5): 675-691.

Jung, C. W. and P. Jacobs (1995). "Physical and chemical-properties of superparamagnetic iron-oxide mr contrast agents - ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxsil." Magnetic Resonance Imaging **13**(5): 661-674.

Kallumadil, M., M. Tada, T. Nakagawa, M. Abe, P. Southern and Q. A. Pankhurst (2009). "Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia (vol 321, pg 1509, 2009)." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **321**(21): 3650-3651.

Kim, D. K., Y. Zhang, W. Voit, K. V. Rao and M. Muhammed (2001). "Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **225**(1-2): 30-36.

Kohler, N., C. Sun, A. Fichtenholtz, J. Gunn, C. Fang and M. Q. Zhang (2006). "Methotrexate-immobilized poly(ethylene glycol) magnetic nanoparticles for MR imaging and drug delivery." Small **2**(6): 785-792.

Kosmulski, M. (2009). "pH-dependent surface charging and points of zero charge. IV. Update and new approach." Journal of Colloid and Interface Science **337**(2): 439-448.

Kosmulski, M., E. Maczka, E. Jartych and J. B. Rosenholm (2003). "Synthesis and characterization of goethite and goethite-hematite composite: experimental study and literature survey." Advances in Colloid and Interface Science **103**(1): 57-76.

Kou, G., S. H. Wang, C. M. Cheng, J. Gao, B. H. Li, H. Wang, W. Z. Qian, S. Hou, D. P. Zhang, J. X. Dai, H. C. Gu and Y. J. Guo (2008). "Development of SM5-1-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles for hepatoma detection." Biochemical and Biophysical Research Communications **374**(2): 192-197.

LaConte, L. E. W., N. Nitin, O. Zurkiya, D. Caruntu, C. J. O'Connor, X. P. Hu and G. Bao (2007). "Coating thickness of magnetic iron oxide nanoparticles affects R-2 relaxivity." Journal of Magnetic Resonance Imaging **26**(6): 1634-1641.

Lam, U. T., R. Mammucari, K. Suzuki and N. R. Foster (2008). "Processing of Iron Oxide Nanoparticles by Supercritical Fluids." Industrial & Engineering Chemistry Research **47**(3): 599-614.

Larsen, B. A., M. A. Haag, N. J. Serkova, K. R. Shroyer and C. R. Stoldt (2008). "Controlled aggregation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for the development of molecular magnetic resonance imaging probes." Nanotechnology **19**(26).

Larsen, E. K. U., T. Nielsen, T. Wittenborn, H. Birkedal, T. Vorup-Jensen, M. H. Jakobsen, L. Ostergaard, M. R. Horsman, F. Besenbacher, K. A. Howard and J. Kjems (2009). "Size-Dependent Accumulation of PEGylated Silane-Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in Murine Tumors." Acs Nano **3**(7): 1947-1951.

Lattuada, M. and T. A. Hatton (2007). "Functionalization of monodisperse magnetic nanoparticles." Langmuir **23**(4): 2158-2168.

Laurent, S., D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. V. Elst and R. N. Muller (2008). "Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications." Chemical Reviews **108**(6): 2064-2110.

Lee, H. C., J. H. Kim, J. H. In and C. H. Lee (2005). "NaFeEDTA decomposition and hematite nanoparticle formation in supercritical water oxidation." Industrial & Engineering Chemistry Research **44**(17): 6615-6621.

Lee, H. Y., N. H. Lim, J. A. Seo, S. H. Yuk, B. K. Kwak, G. Khang, H. B. Lee and S. H. Cho (2006). "Preparation and magnetic resonance imaging effect of polyvinylpyrrolidone-coated iron oxide nanoparticles." Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials **79B**(1): 142-150.

Lee, J. H., Y. W. Jun, S. I. Yeon, J. S. Shin and J. Cheon (2006). "Dual-mode nanoparticle probes for high-performance magnetic resonance and fluorescence imaging of neuroblastoma." Angewandte Chemie-International Edition **45**(48): 8160-8162.

Lee, S. Y. and M. T. Harris (2006). "Surface modification of magnetic nanoparticles capped by oleic acids: Characterization and colloidal stability in polar solvents." Journal of Colloid and Interface Science **293**(2): 401-408.

Lemaire, B. J., P. Davidson, J. Ferre, J. P. Jamet, D. Petermann, P. Panine, I. Dozov and J. P. Jolivet (2004). "Physical properties of aqueous suspensions of goethite (alpha-FeOOH) nanorods - Part I: In the isotropic phase." European Physical Journal E **13**(3): 291-308.

Liang, M. T., S. H. Wang, Y. L. Chang, H. I. Hsiang, H. J. Huang, M. H. Tsai, W. C. Juan and S. F. Lu (2009). "Iron oxide synthesis using a continuous hydrothermal and solvothermal system." Ceramics International **36**(3): 1131-1135.

Lim, S. K., K. J. Chung, Y. H. Kim, C. K. Kim and C. S. Yoon (2004). "Synthesis of iron oxide nanoparticles in a polyimide matrix." Journal of Colloid and Interface Science **273**(2): 517-522.

Liu, C. H., Y. R. Kim, J. Q. Ren, F. Eichler, B. R. Rosen and P. K. Liu (2007). "Imaging cerebral gene transcripts in live animals." Journal of Neuroscience **27**(3): 713-722.

Liu, X. H., G. Z. Qiu, A. G. Yan, Z. Wang and X. G. Li (2007). "Hydrothermal synthesis and characterization of alpha-FeOOH and alpha-Fe_2O_3 uniform nanocrystallines." Journal of Alloys and Compounds **433**(1-2): 216-220.

Ma, M., Y. Zhang, W. Yu, H. Y. Shen, H. Q. Zhang and N. Gu (2003). "Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane." Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **212**(2-3): 219-226.

Ma, Z. Y., D. Dosev, M. Nichkova, R. K. Dumas, S. J. Gee, B. D. Hammock, K. Liu and I. M. Kennedy (2009). "Synthesis and characterization of multifunctional silica core-shell nanocomposites with magnetic and fluorescent functionalities." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **321**(10): 1368-1371.

Magnitsky, S., D. J. Watson, R. M. Walton, S. Pickup, J. W. M. Bulte, J. H. Wolfe and H. Poptani (2005). "In vivo and ex vivo MRI detection of localized and disseminated neural stem cell grafts in the mouse brain." Neuroimage **26**(3): 744-754.

Mahmoudi, M., A. Simchi, A. S. Milani and P. Stroeve (2009). "Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles." Journal of Colloid and Interface Science **336**(2): 510-518.

Martinez-Mera, I., M. E. Espinosa-Pesqueira, R. Perez-Hernandez and J. Arenas-Alatorre (2007). "Synthesis of magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles without surfactants at room temperature." Materials Letters **61**(23-24): 4447-4451.

Massart, R. (1981). Ferromagnetic fluid. Application: DE, (Agence Nationale de Valorisation de la Recherche, Fr.). 15 pp.

Massart, R. (1981). "Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media." Ieee Transactions on Magnetics **MAG-17**(2): 1247-8.

Maurizi, L., H. Bisht, F. Bouyer and N. Millot (2009). "Easy Route to Functionalize Iron Oxide Nanoparticles via Long-Term Stable Thiol Groups." Langmuir **25**(16): 8857-8859.

Mergo, P. J., J. D. Engelken, T. Helmberger and P. R. Ros (1998). "MRI in focal liver disease: A comparison of small and ultra-small superparamagnetic iron oxide as hepatic contrast agents." Jmri-Journal of Magnetic Resonance Imaging **8**(5): 1073-1078.

Mikhaylova, M., D. K. Kim, N. Bobrysheva, M. Osmolowsky, V. Semenov, T. Tsakalakos and M. Muhammed (2004). "Superparamagnetism of magnetite nanoparticles: Dependence on surface modification." Langmuir **20**(6): 2472-2477.

Miller, A. L. (1998). "Dimercaptosuccinic Acid (DMSA), A Non-Toxic, Water-Soluble Treatment For Heavy Metal Toxicity." Alternative Medicine Review **3**(3): 199-207.

Millot, N. (2005). Habilitation à Diriger des Recherches : Rôle des interfaces sur les propriétés des nanomatériaux. Laboratoire de Recherche sur la Réactivité des Solides UMR 5613 CNRS/Université de Bourgogne Dijon (France), Université de Bourgogne.

Millot, N., B. Xin, C. Pighini and D. Aymes (2005). "Hydrothermal synthesis of nanostructured inorganic powders by a continuous process under supercritical conditions." Journal of the European Ceramic Society **25**(12): 2013-2016.

Miraux, S. (2004). Thèse de doctorat : IRM du petit animal : de la création de nouveaux contrastes vers la microscopie. Université Victor Segalen. Bordeaux (France), Université Bordeaux 2**:** 115.

Moghimi, S. M., A. C. Hunter and J. C. Murray (2001). "Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice." Pharmacological Reviews **53**(2): 283-318.

Montemayor, S. M., L. A. Garcia-Cerda, J. R. Torres-Lubian and O. S. Rodriguez-Fernandez (2008). "Ultrafine magnetic particles dispersed in silica: Characterization of cobalt iron citrate precursor and magnetic properties." Materials Research Bulletin **43**(5): 1112-1118.

Mornet, S., J. Portier and E. Duguet (2005). "A method for synthesis and functionalization of ultrasmall superparamagnetic covalent carriers based on maghemite and dextran." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **293**(1): 127-134.

Mornet, S., S. Vasseur, F. Grasset and E. Duguet (2004). "Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy." Journal of Materials Chemistry **14**(14): 2161-2175.

Mornet, S., S. Vasseur, F. Grasset, P. Veverka, G. Goglio, A. Demourgues, J. Portier, E. Pollert and E. Duguet (2006). "Magnetic nanoparticle design for medical applications." Progress in Solid State Chemistry **34**(2-4): 237-247.

Munnier, E., S. Cohen-Jonathan, C. Linassier, L. Douziech-Eyrolles, H. Marchais, M. Souce, K. Herve, P. Dubois and I. Chourpa (2008). "Novel method of doxorubicin-SPION reversible association for magnetic drug targeting." International Journal of Pharmaceutics **363**(1-2): 170-176.

Music, S., I. CzakoNagy, I. SalajObelic and N. Ljubesic (1997). "Formation of alpha-Fe_2O_3 particles in aqueous medium and their properties." Materials Letters **32**(5-6): 301-305.

Oh, C., Y. G. Lee, T. S. Choi, C. U. Jon and S. G. Oh (2009). "Facile synthesis of PEG-silica hybrid particles using one-step sol-gel reaction in aqueous solution." Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **349**(1-3): 145-150.

Ohishi, T. (2004). "Preparation and properties of sol-gel thin film containing rhodamine B derivative with ethoxy silano group on organic substrate and its application to surface-treatment thin film for display." Journal of Sol-Gel Science and Technology **32**(1-3): 281-285.

Okuhata, Y. (1999). "Delivery of diagnostic agents for magnetic resonance imaging." Advanced Drug Delivery Reviews **37**(1-3): 121-137.

Pan, B. F., D. X. Cui, Y. Sheng, C. G. Ozkan, F. Gao, R. He, Q. Li, P. Xu and T. Huang (2007). "Dendrimer-modified magnetic nanoparticles enhance efficiency of gene delivery system." Cancer Research **67**(17): 8156-8163.

Panchuk-Voloshina, N., R. P. Haugland, J. Bishop-Stewart, M. K. Bhalgat, P. J. Millard, F. Mao and W. Y. Leung (1999). "Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates." Journal of Histochemistry & Cytochemistry **47**(9): 1179-1188.

Pankhurst, Q. A., J. Connolly, S. K. Jones and J. Dobson (2003). "Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine." Journal of Physics D-Applied Physics **36**(13): R167-R181.

Papa, A.-L. (2009). Thèse de doctorat : Synthèse et caractérisations de nanotubes d'oxydes de titane. Fonctionnalisations en vue de leur application comme nouveaux nanovecteurs biologiques : cas de la transfection d'ADN dans les cardiomyocytes. Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne UMR 5209 CNRS/Université de Bourgogne. Dijon (France), Université de Bourgogne**:** 177.

Papa, A. L., N. Millot, L. Saviot, R. Chassagnon and O. Heintz (2009). "Effect of Reaction Parameters on Composition and Morphology of Titanate Nanomaterials." Journal of Physical Chemistry C **113**(29): 12682-12689.

Paris, J. (2010). Rapport de stage : Elaboration par chimie douce et voie supercritique de nanoparticules d'oxydes de fer pour applications biomedicales. Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne UMR 5209 CNRS/Université de Bourgogne. Dijon (France), Université de Bourgogne**:** 35.

Park, J. Y., P. Daksha, G. H. Lee, S. Woo and Y. M. Chang (2008). "Highly water-dispersible PEG surface modified ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles useful for target-specific biomedical applications." Nanotechnology **19**(36).

Park, K. C., F. Wang, S. Morimoto, M. Fujishige, A. Morisako, X. X. Liu, Y. J. Kim, Y. C. Jung, I. Y. Jang and M. Endo (2009). "One-pot synthesis of iron oxide-carbon core-shell particles in supercritical water." Materials Research Bulletin **44**(7): 1443-1450.

Perez-Maqueda, L. A., J. M. Criado, J. Subrt and C. Real (1999). "Synthesis of acicular hematite catalysts with tailored porosity." Catalysis Letters **60**(3): 151-156.

Perriat, P., B. Domenichini and B. Gillot (1996). "A model for oxidation in finely divided ferrites taking into account the stresses generated during reaction." Journal of Physics and Chemistry of Solids **57**(11): 1641-1652.

Petri-Fink, A., M. Chastellain, L. Juillerat-Jeanneret, A. Ferrari and H. Hofmann (2005). "Development of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells." Biomaterials **26**(15): 2685-2694.

Pighini, C. (2006). Thèse de doctorat : Synthèses de nanocristaux de TiO2 anatase à distribution de taille contrôlée. Influence de la taille des cristallites sur le spectre Raman et étude des propriétés de surface. Laboratoire sur la réactivité des solides UMR 5613 CNRS/Université de Bourgogne Dijon (France), Université de Bourgogne**:** 192.

Pinkas, J., V. Reichlova, R. Zboril, Z. Moravec, P. Bezdicka and J. Matejkova (2008). "Sonochemical synthesis of amorphous nanoscopic iron(III) oxide from Fe(acac)3." Ultrasonics Sonochemistry **15**(3): 257-264.

Pinna, N., G. Garnweitner, M. Antonietti and M. Niederberger (2005). "A general nonaqueous route to binary metal oxide nanocrystals involving a C-C bond cleavage." Journal of the American Chemical Society **127**(15): 5608-5612.

Plonski, I. H. (1997). "Effect of bare metal surface on the dissolution in aqueous citrate solutions of magnetite films on carbon steel." Journal of Applied Electrochemistry **27**(10): 1184-1192.

Poix, P. (1965). "Sur une methode de determination des distances cation-oxygene dans les oxydes mixtes a structure spinelle - application des valeurs a quelques cas particuliers." Bulletin De La Societe Chimique De France(4): 1085-1087.

Pretsch, E., P. Buhlmann and C. Affolter (2000). Structure determination of organic compounds. Tables of spectra data. New York, Spinger.

Pringuet, A. (2010). Thèse de doctorat : Granulation d'une poudre d'anatase par voie colloïdale. Etude de formulations pour l'élaboration de sphères poreuses millimétriques. Laboratoire de Sciences des Procédés Céramiques et Traitements de Surface. Limoges (France), Université de Limoges**:** 170.

Racuciu, M., D. E. Creanga and A. Airinei (2006). "Citric-acid-coated magnetite nanoparticles for biological applications." European Physical Journal E **21**(2): 117-121.

Racuciu, M., D. E. Creanga, V. Badescu and N. Sulitanu (2007). "Microstructural investigation of some biocompatible ferrofluids." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **316**(2): E772-E775.

Raming, T. P., A. J. A. Winnubst, C. M. van Kats and A. P. Philipse (2002). "The synthesis and magnetic properties of nanosized hematite (alpha-Fe_2O_3) particles." Journal of Colloid and Interface Science **249**(2): 346-350.

Reimer, P. and T. Balzer (2003). "Ferucarbotran (Resovist): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications." European Radiology **13**(6): 1266-1276.

Reimer, P. and B. Tombach (1998). "Hepatic MRI with SPIO: detection and characterization of focal liver lesions." European Radiology **8**(7): 1198-1204.

Riviere, C., F. P. Boudghene, F. Gazeau, J. Roger, J. N. Pons, J. P. Laissy, E. Allaire, J. B. Michel, D. Letourneur and J. F. Deux (2005). "Iron oxide nanoparticle-labeled rat smooth muscle cells: Cardiac MR imaging for cell graft monitoring and quantitation." Radiology **235**(3): 959-967.

Roch, A., Y. Gossuin, R. N. Muller and P. Gillis (2005). "Superparamagnetic colloid suspensions: Water magnetic relaxation and clustering." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **293**(1): 532-539.

Roger, J., J. N. Pons, R. Massart, A. Halbreich and J. C. Bacri (1999). "Some biomedical applications of ferrofluids." European Physical Journal-Applied Physics **5**(3): 321-325.

Schering, L. (2003). "Avis de la commission sur l'autorisation de mise sur le marché du Cliavist." Commission de la transparence. République française: 11.

Schwertmann, U. and E. Murad (1983). "Effetc of pH on the formation of goethite and hematite from ferrihydrite." Clays and Clay Minerals **31**(4): 277-284.

Shao, H. F., X. F. Qian, J. Yin and Z. K. Zhu (2005). "Controlled morphology synthesis of beta-FeOOH and the phase transition to Fe_2O_3." Journal of Solid State Chemistry **178**(10): 3130-3136.

Shen, R., P. H. C. Camargo, Y. Xia and H. Yang (2008). "Silane-based poly(ethylene glycol) as a primer for surface modification of nonhydrolytically synthesized nanoparticles using the Stober method." Langmuir **24**(19): 11189-11195.

Shi, H., X. X. He, K. M. Wang, Y. Yuan, K. Deng, J. Y. Chen and W. H. Tan (2007). "Rhodamine B isothiocyanate doped silica-coated fluorescent nanoparticles (RBITC-DSFNPs)-based bioprobes conjugated to Annexin V for apoptosis detection and imaging." Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine **3**(4): 266-272.

Shieh, D. B., F. Y. Cheng, C. H. Su, C. S. Yeh, M. T. Wu, Y. N. Wu, C. Y. Tsai, C. L. Wu, D. H. Chen and C. H. Chou (2005). "Aqueous dispersions of magnetite nanoparticles

with NH3+ surfaces for magnetic manipulations of biomolecules and MRI contrast agents." Biomaterials **26**(34): 7183-7191.

Shkilnyy, A., E. Munnier, K. Herve, M. Souce, R. Benoit, S. Cohen-Jonathan, P. Limelette, M. L. Saboungi, P. Dubois and I. Chourpa (2010). "Synthesis and Evaluation of Novel Biocompatible Super-paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles as Magnetic Anticancer Drug Carrier and Fluorescence Active Label." Journal of Physical Chemistry C **114**(13): 5850-5858.

Sonvico, F., S. Mornet, S. Vasseur, C. Dubernet, D. Jaillard, J. Degrouard, J. Hoebeke, E. Duguet, P. Colombo and P. Couvreur (2005). "Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: Synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments." Bioconjugate Chemistry **16**(5): 1181-1188.

Sorescu, M., L. Diamandescu and D. Tarabasanu-Mihaila (2004). "alpha-Fe_2O_3-In_2O_3 mixed oxide nanoparticles synthesized under hydrothermal supercritical conditions." Journal of Physics and Chemistry of Solids **65**(10): 1719-1725.

Sosnovik, D. E., M. Nahrendorf and R. Weissleder (2008). "Magnetic nanoparticles for MR imaging: agents, techniques and cardiovascular applications." Basic Research in Cardiology **103**(2): 122-130.

Steitz, B., H. Hofmann, S. W. Kamau, P. O. Hassa, M. O. Hottiger, B. von Rechenberg, M. Hofmann-Amtenbrink and A. Petri-Fink (2007). "Characterization of PEI-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for transfection: Size distribution, colloidal properties and DNA interaction." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **311**(1): 300-305.

Steitz, B., J. Salaklang, A. Finka, C. O'Neil, H. Hofmann and A. Petri-Fink (2007). "Fixed bed reactor for solid-phase surface derivatization of superparamagnetic nanoparticles." Bioconjugate Chemistry **18**: 1684-1690.

Stoll, G. and M. Bendszus (2009). "Imaging of inflammation in the peripheral and central nervous system by magnetic resonance imaging." Neuroscience **158**(3): 1151-1160.

Straub, V., K. M. Donahue, V. Allamand, R. L. Davisson, Y. R. Kim and K. P. Campbell (2000). "Contrast agent-enhanced magnetic resonance imaging of skeletal muscle damage in animal models of muscular dystrophy." Magnetic Resonance in Medicine **44**(4): 655-659.

Sue, K., M. Suzuki, K. Arai, T. Ohashi, H. Ura, K. Matsui, Y. Hakuta, H. Hayashi, M. Watanabe and T. Hiaki (2006). "Size-controlled synthesis of metal oxide nanoparticles with a flow-through supercritical water method." Green Chemistry **8**(7): 634-638.

Sun, C., J. S. H. Lee and M. Q. Zhang (2008). "Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery." Advanced Drug Delivery Reviews **60**(11): 1252-1265.

Sun, J., S. B. Zhou, P. Hou, Y. Yang, J. Weng, X. H. Li and M. Y. Li (2007). "Synthesis and characterization of biocompatible Fe_3O_4 nanoparticles." Journal of Biomedical Materials Research Part A **80A**(2): 333-341.

Sun, Y.-k., M. Ma, Y. Zhang and N. Gu (2004). "Synthesis of nanometer-size maghemite particles from magnetite." Colloids and Surfaces, A Physicochemical and Engineering Aspects **245**(1-3): 15-19.

Takami, S., T. Sato, T. Mousavand, S. Ohara, M. Umetsu and T. Adschiri (2007). "Hydrothermal synthesis of surface-modified iron oxide nanoparticles." Materials Letters **61**(26): 4769-4772.

Tallheden, T., U. Nannmark, M. Lorentzon, O. Rakotonirainy, B. Soussi, F. Waagstein, A. Jeppsson, E. Sjogren-Jansson, A. Lindahl and E. Omerovic (2006). "In vivo MR imaging of magnetically labeled human embryonic stem cells." Life Sciences **79**(10): 999-1006.

Teja, A. S. and P. Y. Koh (2009). "Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles." Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials **55**(1-2): 22-45.

Teodor, E., S. C. Litescu, C. Petcu, M. Mihalache and R. Somoghi (2009). "Nanostructured biomaterials with controlled properties synthesis and characterization." Nanoscale Research Letters **4**(6): 544-549.

Tewari, P. H. and A. W. McLean (1971). "Temperature dependance of point of zero charge of alumina and magnetite." Abstracts of Papers of the American Chemical Society(NSEP): 94-&.

Thies-Weesie, D. M. E., J. P. de Hoog, M. H. H. Mendiola, A. V. Petukhov and G. J. Vroege (2007). "Synthesis of goethite as a model colloid for mineral liquid crystals." Chemistry of Materials **19**(23): 5538-5546.

Tombach, B. and W. Heindel (2002). "Value of 1.0-m gadolinium chelates: review of preclinical and clinical data on gadobutrol." European Radiology **12**(6): 1550-1556.

Tromsdorf, U. I., N. C. Bigall, M. G. Kaul, O. T. Bruns, M. S. Nikolic, B. Mollwitz, R. A. Sperling, R. Reimer, H. Hohenberg, W. J. Parak, S. Forster, U. Beisiegel, G. Adam and H. Weller (2007). "Size and surface effects on the MRI relaxivity of manganese ferrite nanoparticle contrast agents." Nano Letters **7**(8): 2422-2427.

Tromsdorf, U. I., O. T. Bruns, S. C. Salmen, U. Beisiegel and H. Weller (2009). "A highly effective, nontoxic T1 MR contrast agent based on ultrasmall PEGylated iron oxide nanoparticles." Nano Lett **9**(12): 4434-40.

Tronc, E., A. Ezzir, R. Cherkaoui, C. Chaneac, M. Nogues, H. Kachkachi, D. Fiorani, A. M. Testa, J. M. Greneche and J. P. Jolivet (2000). "Surface-related properties of gamma-Fe_2O_3 nanoparticles." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **221**(1-2): 63-79.

Van der Laan, G. P. and A. Beenackers (1999). "Kinetics and selectivity of the Fischer-Tropsch synthesis: A literature review." Catalysis Reviews - Science and Engineering **41**(3-4): 255-318.

Venditto, V. J., C. A. S. Regino and M. W. Brechbiel (2005). "PAMAM dendrimer based macromolecules as improved contrast agents." Molecular Pharmaceutics **2**(4): 302-311.

Verhaegh, N. A. M. and A. Vanblaaderen (1994). "Dispersions of Rhodamine-labeled silica spheres - Synthesis, characterization and fluorescence confocal scanning laser microscopy." Langmuir **10**(5): 1427-1438.

Villaraza, A. J. L., A. Bumb and M. W. Brechbiel (2010). "Macromolecules, Dendrimers, and Nanomaterials in Magnetic Resonance Imaging: The Interplay between Size, Function, and Pharmacokinetics." Chemical Reviews **110**(5): 2921-2959.

Wang, Y. X. J., S. M. Hussain and G. P. Krestin (2001). "Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging." European Radiology **11**(11): 2319-2331.

Watanabe, H. and J. Seto (1993). "Specific acidities of the surface hydroxyl-groups on maghemite." Bulletin of the Chemical Society of Japan **66**(2): 395-399.

Wilhelm, C., L. Bal, P. Smirnov, I. Galy-Fauroux, O. Clement, F. Gazeau and J. Emmerich (2007). "Magnetic control of vascular network formation with magnetically labeled endothelial progenitor cells." Biomaterials **28**: 3797-3806.

Wilhelm, C. and F. Gazeau (2009). "Magnetic nanoparticles: Internal probes and heaters within living cells." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **321**(7): 671-674.

Xie, J., C. Xu, N. Kohler, Y. Hou and S. Sun (2007). "Controlled PEGylation of monodisperse Fe_3O_4 nanoparticles for reduced non-specific uptake by macrophage cells." Advanced Materials **19**(20): 3163-3167.

Xin, B. (2005). Thèse de doctorat : De la chimie douce, au milieu hydrothermal étendu au domaine supercritique, du réacteur fermé au dispositif en continu : synthèse d'oxydes métalliques nanostructurés Laboratoire de recherche sur la réactivité des solides UMR 5613 CNRS/Université de Bourgogne. Dijon (France), Université de Bourgogne.

Xu, C. and A. S. Teja (2008). "Continuous hydrothermal synthesis of iron oxide and PVA-protected iron oxide nanoparticles." Journal of Supercritical Fluids **44**(1): 85-91.

Xu, C. B. and A. S. Teja (2006). "Supercritical water synthesis and deposition of iron oxide (alpha-Fe_2O_3) nanoparticles in activated carbon." Journal of Supercritical Fluids **39**(1): 135-141.

Xue, X. F., K. Hanna, C. Despas, F. Wu and N. S. Deng (2009). "Effect of chelating agent on the oxidation rate of PCP in the magnetite/H2O2 system at neutral pH." Journal of Molecular Catalysis A: Chemical **311**(1-2): 29-35.

Yang, D. W., Q. Ye, M. Williams, Y. Sun, T. C. C. Hu, D. S. Williams, J. M. F. Moura and C. Ho (2001). "USPIO-enhanced dynamic MRI: Evaluation of normal and transplanted rat kidneys." Magnetic Resonance in Medicine **46**(6): 1152-1163.

Zhang, S., Z. P. Bian, C. R. Gu, Y. Zhang, S. Y. He, N. Gu and J. N. Zhang (2007). "Preparation of anti-human cardiac troponin I immunomagnetic nanoparticles and biological activity assays." Colloids and Surfaces B-Biointerfaces **55**(2): 143-148.

Zhang, Y., N. Kohler and M. Q. Zhang (2002). "Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake." Biomaterials **23**(7): 1553-1561.

Zhang, Z. L., R. Dharmakumar, N. Mascheri, Z. Y. Fan, S. Y. Wu and D. B. Li (2009). "Comparison of Superparamagnetic and Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Cell Labeling for Tracking Green Fluorescent Protein Gene Marker with Negative and Positive Contrast Magnetic Resonance Imaging." Molecular Imaging **8**(3): 148-155.

Zhao, D., X. Wu, H. Guan and E. Han (2007). "Study on supercritical hydrothermal synthesis of $CoFe_2O_4$ nanoparticles." Journal of Supercritical Fluids **42**(2): 226-233.

Titre : Elaboration de nanoparticules fonctionnelles : applications comme agents de contraste en IRM

Résumé : Les nanoparticules d'oxyde de fer de structure spinelle ouvrent de nombreuses voies dans le domaine biomédical. Parmi les applications possibles, les propriétés superparamagnétiques des cristallites d'une dizaine de nanomètres permettent de les utiliser pour le diagnostic médical, notamment en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM).
Ce travail a consisté à élaborer des suspensions colloïdales de nanoparticules de magnétite ou de maghémite (nommées USPIO pour Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide) compatibles avec les conditions physiologiques (pH = 7,4 et [NaCl] = 0,15 M).
Par co-précipitation classique, des USPIO, de taille de cristallites de 8 nm, de surface spécifique de 110 $m^2.g^{-1}$ et agrégés en assemblages d'environ 20 nm ont été obtenus. Pour stabiliser ces nano-objets, deux voies ont été explorées. Des agents électrostatiques (acide citrique et DMSA) ont modifié la charge nette de surface des oxydes de fer. La stabilisation stérique a également été explorée par greffage de méthoxy-PEG couplés à des fonctions silanes (mPEG-Si). Par combinaison de $mPEG_{2000}$-Si et de DMSA, des suspensions stables ont également été obtenues. De plus, les fonctions thiols apportées par le DMSA et présentes à la surface des agrégats se trouvent protégées de leur oxydation naturelle par l'encombrement stérique des chaînes de polymère (la formation de ponts disulfures est évitée). La post-fonctionnalisation de ces nanoparticules via ces fonctions thiols est alors possible plusieurs semaines après leur synthèse. Ce concept a été validé par post-greffage d'un fluorophore (0,48 RITC/nm^2) pour la détection *in vitro* en microscopie à fluorescence.
En parallèle de cette étude en « batch », des nanoparticules d'oxyde de fer ont été synthétisées en continu à l'aide d'un procédé hydrothermal pouvant s'étendre au domaine eau supercritique. En voie hydrothermale classique, des USPIO stabilisés par des ions citrates ont été obtenus en continu. Grâce aux propriétés physicochimiques de l'eau supercritique, la co-précipitation de magnétite a été possible sans l'utilisation de base.
La cytotoxicité et l'internalisation cellulaire de ces USPIO ont été évaluées sur trois modèles cellulaires (macrophages RAW, hépatocytes HepG2 et cardiomyocytes) et les efficacités comme agents de contraste en IRM de ces nanoparticles ont été mesurées sur gel et sur modèle murin et comparées à un agent de contraste commercial à base d'oxyde de fer. Les nanohybrides étudiés n'ont pas présenté de cytotoxicité et ont développé des pouvoirs contrastants comparables à l'agent commercial. La biodistribution hépatique des nanoparticules couplées au mPEG-Si a été retardée de plus de 3 heures ouvrant la voie à des détections spécifiques.

Mots clés : Nanohybrides, Fe_3O_4, USPIO, eau supercritique, mPEG-Si, DMSA, acide citrique, cytotoxicité des nanoparticules, IRM, relaxivité

Title : Elaboration of functionalized nanoparticles: applications as MRI contrast agent

Abstract : Spinel structured iron oxide nanoparticles open the way of biomedical applications of nanomaterials. Superparamagnetic properties of ten nanometer size crystallites permit to use them in diagnosis such as Magnetic Resonance Imaging (MRI).
The aim of this work was to synthesize colloidal suspension of magnetite or maghemite (called USPIO for Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide) stable in physiological conditions (pH = 7.4 and [NaCl] = 0.15M).
By classical co-precipitation method, UPSIO were synthesized with a mean crystallite size of 8 nm, with a specific surface area of 110 $m^2.g^{-1}$ and an aggregate size of 20 nm. To stabilize these nano-objects, two ways were investigated. Electrostatic agents (like citric acid and DMSA) modified iron oxide surface charge. Steric stabilization was also studied by grafting methoxy-PEG coupled with a silane function (mPEG-Si).and the combination mPEG - DMSA also resulted in stable suspensions. Moreover thiols functions coming from DMSA and present on the surface of the nanoparticles were prevented from oxidation thanks to steric protection of polymer chains. Thanks to this method post-functionalization of USPIO was possible several weeks after synthesis. This concept was validated with the post-grafting of a dye (0.48 RITC per nm^2) used for *in vitro* detection in fluorescent microscopy.
Nanoparticles were also synthesized in a continuous way with a hydrothermal process which could work from soft chemistry to supercritical water. In classical hydrothermal conditions, USPIO stabilized with citrates were obtained in a continuous way. Thanks to the physico-chemical properties of supercritical water, co-precipitation of magnetite without base adding was possible.
Cytotoxicity and cellular internalization assays were done with our USPIO in three cellular models (macrophages RAW, hepatocytes HePG2 and cardiomyocytes). Moreover the efficiency as MRI contrast agents were measured in gels tubes and on mice models and compared to an iron oxide commercial product. Late hepatic biodistribution (more than three hours) was proven with pegylated nanoparticles, which opens the way of specific detections.

Key words : Nanohybrids, Fe_3O_4, USPIO ; supercritical water, mPEG-Si, DMSA, citric acid, nanoparticles cytotoxicity, MRI, relaxivity