



HAL
open science

Développement de nanoparticules intelligentes type coeur/coquille capables d'encapsuler un médicament pour la thérapie anticancéreuse

Dounia Louaguef

► **To cite this version:**

Dounia Louaguef. Développement de nanoparticules intelligentes type coeur/coquille capables d'encapsuler un médicament pour la thérapie anticancéreuse. Matériaux. Université de Lorraine, 2023. Français. NNT : 2023LORR0130 . tel-04237607

HAL Id: tel-04237607

<https://theses.hal.science/tel-04237607>

Submitted on 11 Oct 2023

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.



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Université de Lorraine

École Doctorale Chimie Mécanique Matériaux Physique (C2MP)

THÈSE présentée par :

Dounia LOUAGUEF

Soutenue publiquement le **05 Juillet 2023**

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Spécialité : **Chimie**

Développement de nanoparticules intelligentes type cœur/coquille capables d'encapsuler un médicament pour la thérapie anticancéreuse

Membres du jury :

Lavinia BALA	Directrice de recherche CNRS	Rapporteur
Halima KERDJOUJ	Professeure Université de Reims	Rapporteur
Raphael SCNEIDER	Professeur Université de Lorraine	Président de jury
Damien MERTZ	Chargé de recherche Université de Strasbourg	Examineur
Halima ALEM- MARCHAND	Professeure Université de Lorraine	Directrice de thèse
Eric GAFFET	Directeur de recherche CNRS	Co-Directeur de thèse

Remerciements

*Je voudrais tout d'abord adresser mes remerciements à l'ensemble des membres du jury **Mme Halima Kerdjoudj, Mme Lavinia Balan, Mr Raphael Schneider et Mr Damien Mertz** pour l'intérêt qu'ils ont porté à ma recherche en acceptant d'examiner mon travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

*Je remercie vivement mes encadreurs de thèse, **Mme Halima Alem -Marchand et Mr Eric Gaffet** de m'avoir donné la chance de travailler avec l'équipe 403 «Nanomatériaux et santé » de l'institut Jean Lamour (UMR 7198, CNRS – Université de Lorraine), de m'avoir accordé leur confiance, partagé leur savoir avec moi, pour leur soutien , leurs conseils avisés et leurs remarques pertinentes qui ont permis l'avancement et la réalisation de ces travaux de thèse. Je remercie fortement **Mme Halima Alem- Marchand** pour ces encouragements et ces conseils qui m'ont aidé à avancer tout au long de mon travail de thèse.*

*J'exprime toutes mes reconnaissances à tous les professeurs : **Mr Ghouti Medjahdi, Mr Sébastien Diliberto, Mr Thomas Gries, Mme Stéphanie Michel , Mme Brigitte Vigolo, Mr Sébastien Hupont, Mr Khalid Ferji, Mr Damien Mertz, Mr Jaafar Ghanbaja, Mme Sylvie Migot, Mme Mélanie Emo et Mr Klaus Seemann** qui m'ont aidé à accomplir mon travail de recherche.*

*Je remercie de tout mon cœur mon encadreur de Master **Pr. Goussef Mimanne** pour tout ce qu'elle a fait pour moi afin d'avoir cette bourse d'excellence pour son soutien et surtout de m'avoir transmis sa passion de la recherche scientifique.*

*Je tiens à remercier chaleureusement les docteurs : **Mr .Zied Ferjaoui et Mr. Djallal Ikkène** et la doctorante **Mlle Joelle Bizeau** de m'avoir partagé leurs connaissances*

*Une grand merci à mon ami **Mr Zakaria Baka** de m'avoir soutenu tout au long de ma thèse, écouté, conseillé et d'être un bon ami à moi. Je te remercie également pour les moments inoubliables que nous avons passé ensemble*

*Je tiens à remercier également ma collègue **Mlle Claire Godier** pour sa bonne humeur, sa gentillesse et surtout son aide et sa patience avec mes manip d'évaluation biologique.*

*Je voudrai exprimer ma gratitude à mon collègue **Mr Abhik Mallick** pour les bons moments qu'il a passé avec nous et sa gentillesse et j'aimerais lui dire qu'il est un grand frère pour moi et non seulement un collègue.*

*Je remercie profondément les étudiants de master que j'ai encadré pendant ma thèse **Mr Juan Estéban Montoya Cardona, Mlle Laurine Meistersheim, Mlle Imène Mekelkel et Mlle Gloria Pouit.***

Enfin, j'adresse mes remerciements à mon pays « Algérie » de m'avoir donné cette chance de poursuivre mes études de recherche à l'étranger.

Dédicaces

A ma très chère mère

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon frère et mes sœurs

Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments et mon amour à vous tous.

*Mehadji, Nihed , Abir et Neila, que dieu vous préserve tous et vous procure santé
et longue vie.*

Abréviations

OMS : Organisation mondiale de la santé

ADN : Acide désoxyribonucléique

PLGA: Poly (lactic-co-glycolic acid)

PEG : Polyéthylène glycol

MEO₂MA_x : Poly ((2-(2-méthoxy) éthyle méthacrylate

OEGMA : Oligo (éthylène glycol) méthacrylate))

pH : Potentiel d'hydrogène

MNPs : Magnetic Nano Particles

BCNU : 1,3-bis(2-chloroéthyl) -1-nitrosourée

MT: Magnetic Targeting

EPEG: O-(2-aminoéthyl) polyethylene glycol

SPMNM: self-protecting magnetic nanomedicine

5-FU: 5-Fluorouracil

MPS: 3-(triméthoxysilyl)méthacrylate de propyl

PNIPAM: N-iso-propyl acrylamide

DLE: Efficacité de chargement du médicament (drug loading efficiency)

DLC : Taux de charge du médicament

LCST: Lower critical solution temperature

UCST: Upper critical solution temperature

DOX: Doxorubicine

DAPI: 4',6-diamidino-2-phénylindole

TMSPMA : 3-(triméthoxysilyl)propyl methacrylate

VBA : Vinyl-benzaldehyde

PEI : Poly (éthylène imine)

RM : Résonance magnétique

NPs : Nanoparticules

AF : Acide Folique

CFC : Cube à faces centrées

SAR: Specific absorption rate

SLP: Specific loss power

CTAB: Bromure de Cétyltriméthylammonium

AOT: Bis(2-éthylhexyl) sulfosuccinate

SDBS: Sodium dodécylbenzènesulfonate

SDS: Lauryl-sulfate de sodium

PVCL: Poly (*N*-vinylcaprolactame)

CRP: Controlled radical polymerization

RAFT: Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer

NMP : Polymérisation à médiation par les nitroxydes

ATRP : Polymérisation radicalaire par transfert d'atome

ARGET : Activateurs régénérés par transfert d'électrons

DRX : Diffraction des rayons X

MET : Microscopie électronique en transmission

ICP-OES : Spectroscopie à plasma à couplage inductif

IRTF : Spectroscopie Infra rouge à transformée de Fourier

DAS : Débit d'absorption spécifique

CMPETMS : Chlorométhylphényléthyltriméthoxysilane

TMAH : Hydroxyde de tétraméthylammonium pentahydrate

APTES : (3-Aminopropyl) triéthoxysilane

BIBB : α -Bromoisobutyryl bromide

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

ATG : Mesures d'analyse thermogravimétrique

MET-HR : Microscopie électronique en transmission à haute résolution

DLS : Diffusion dynamique de la lumière

SQUID : Superconducting QUantum Interference Device

SVF: Sérum bovin fœtal

AFM: Alternatif magnetic field

Sommaire

Introduction générale.....	01
Chapitre I : Etat de l'art.....	06
I.1 Le Cancer.....	06
I.2 Les traitements du cancer	07
I.2.1 La chirurgie.....	07
I.2.2 La radiothérapie.....	07
I.2.3 L'immunothérapie.....	07
I.2.4 La chimiothérapie.....	07
I.3 Les nanomatériaux pour la nanomédecine	08
I.4 Générations des nanovecteurs	09
I.4.1 Première génération	10
I.4.2 Deuxième génération	10
I.4.3 Troisième génération	10
I.4.4 Quatrième génération	10
I.5 Nanovecteurs type cœur/coquille à base de nanoparticules magnétiques pour la délivrance du médicament	11
I.6 Nanoparticules d'oxydes de fer	23
I.6.1 Structure cristalline.....	23
I.6.2 Propriétés magnétiques	23
I.7 Hyperthermie magnétique	26
I.8 Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer.....	32
I.8.1 La Co-précipitation	32
I.8.2 Polyol	32
I.8.3 La synthèse hydrothermale.....	32
I.8.4 La microémulsion	33
I.8.5 Sol gel.....	33
I.8.6 La décomposition thermique	33

I.9 Fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer	35
I.9.1 Polymères thermosensibles.....	36
I.9.2 Les polymères thermosensibles les plus utilisés dans le domaine biomédical	38
Le Poly((méth)acrylamide de N-alkyl).....	38
Le Poly(N-vinylamides)	38
Le poly ((2-(2-méthoxy) éthyle méthacrylate et oligo (éthylène glycol) méthacrylate)).....	39
I.9.3 Avantages des nanoparticules fonctionnalisées par un polymère pour le traitement du cancer	41
I.9.4 Techniques du greffage du polymère sur la surface des nanoparticules.....	42
I.9.5 Technique de polymérisation	43
I.10 Description du projet de thèse.....	48
I.11 Références	50
Chapitre II : Synthèse et caractérisations physico-chimique des NPs.....	62
II.1 Introduction	62
II.2 Matériels et méthodes.....	65
II.2.1 Produits	65
II.2.2 Méthodes.....	65
II.2.2.1 Synthèse des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$	65
II.2.2.2 Synthèse des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$	66
II.2.3 Matériels.....	67
II.2.3.1 Diffraction des rayons X (DRX).....	67
II.2.3.2 Spectroscopie Mössbauer	67
II.2.3.3 Microscopie électronique en transmission (MET).....	67
II.2.3.4 Spectroscopie à plasma à couplage inductif (ICP-OES).....	67
II.2.3.5 Spectroscopie Infra rouge à transformée de Fourier (IRTF).....	68
II.2.3.6 Mesures magnétiques.....	68

II.2.3.7 Hyperthermie magnétique	68
II.3 Résultats et discussions	69
II.3.1 Diffraction des rayons X (DRX).....	69
II.3.2 Spectroscopie Mössbauer	70
II.3.3 Microscopie électronique en transmission (MET).....	71
II.3.4 Spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP-OES).....	74
II.3.5 Spectroscopie Infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF).....	75
II.3.6 Propriétés magnétiques	76
II.3.7 Hyperthermie magnétique	78
II.4 Conclusion	80
II.5 Références.....	81
Chapitre III : Fonctionnalisation des nanoparticules pour l'encapsulation et la	
délivrance du principe actif.....	84
III.1 Introduction	84
III.2 Matériels et méthodes	86
III.2.1 Produits.....	86
III.2.2 Méthodes	86
III.2.2.1 Silanisation des NPs $Zn_{0,4}Fe_{2,6}O_4@ MnFe_2O_4$ de 22nm par le CMPETMS.....	86
III.2.2.2 Silanisation des NPs $Zn_{0,4}Fe_{2,6}O_4@ MnFe_2O_4$ de 50nm par les APTES-BIBB.....	87
III.2.2.3 Polymérisation des NPs@ CMPETMS (22nm) et des NPs@ APTES-BIBB (50nm)	88
par le P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀).....	
III.2.2.4 Encapsulation de la DOX.....	90
III.2.3 Matériels	93
III.2.3.1 Mesures d'analyse thermogravimétrique (ATG).....	93
III.2.3.3 Microscopie électronique en transmission à haute résolution (MET-HR).....	93
III.2.3.4 Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	93
III.2.3.5 Superconducting QUantum Interference Device (SQUID).....	94
III.2.3.6 Hyperthermie magnétique.....	94
III.3 Résultats et discussions	95
III.3.1 Analyse par spectroscopie Infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF).....	95
III.3.2 Analyse thermogravimétrique (ATG).....	96
III.3.3 Microscopie électronique en transmission à haute résolution (MET-HR).....	98
III.3.4 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	101
III.3.5 Propriétés magnétiques des NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀).....	102

III.3.6 Encapsulation de la Doxorubicine (DOX)	106
III.3.6.1 Analyse Infra rouge a transformée de Fourier (IRTF) des NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) chargées en DOX.....	106
III.3.6.2 Libération de la DOX en fonction de la température	107
III.3.6.3 Libération de la DOX en fonction du temps.....	110
III.3.7 Hyperthermie magnétique	114
III.4 Conclusion	116
III.5 Références	117
Chapitre IV : Evaluation biologique des nanovecteurs thermosensibles.....	119
IV.1 Introduction	119
IV.2 Matériels et méthodes	121
IV.2.1 Matériels.....	121
IV.2.2 Méthodes.....	122
IV.2.2.1 Test de viabilité cellulaire WST-1	122
IV.3 Résultats et discussions	123
IV.3.1 Cytotoxicité des NPs @ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) de 22nm et 50nm sur les cellules SKOV-3 après 24 et 72 h à 37°C.....	123
IV.3.1.1 NPs @ P(MEO ₂ MA ₆₀ -OEGMA ₄₀) 22 nm.....	123
IV.3.1.2 NPs @ P(MEO ₂ MA ₆₀ -OEGMA ₄₀) 50 nm.....	124
IV.3.2 Cytotoxicité des NPs @ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) de 22nm et 50nm sur les cellules SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C.....	126
IV.3.2.1 NPs @ P(MEO ₂ MA ₆₀ -OEGMA ₄₀) 22 nm.....	126
IV.3.2.2 NPs @ P(MEO ₂ MA ₆₀ -OEGMA ₄₀) 50 nm.....	127
IV.3.3 Cytotoxicité des NPs @ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) - DOX de 22nm et 50nm sur les cellules SKOV-3 après 24 à 37°C et 5h à 42°C.....	129
IV.3.3.1 NPs @ P(MEO ₂ MA ₆₀ -OEGMA ₄₀) 22 nm.....	129
IV.3.3.2 NPs @ P(MEO ₂ MA ₆₀ -OEGMA ₄₀) 50 nm.....	131
IV.4 Conclusion	133
IV.5 Références	134
Chapitre V : Etude des performances thérapeutiques de la vectorisation des NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) modifiées par l'acide folique.....	136
V.1 Introduction	136
V.2 Matériels et méthodes	139
V.2.1 Modification des NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) par l'acide folique.....	139

V.2.2 Encapsulation de la Doxorubicine dans les NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀)-AF.....	140
V.3 Résultats et discussions	140
V.3.1 Analyse par spectroscopie Infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF).....	140
V.3.2 Microscopie électronique en transmission à haute résolution (MET-HR)....	141
V.3.3 Evaluation biologique des NPs @ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀)- AF.....	142
V.3.4 Evaluation biologique des NPs @ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀)- AF chargées en DOX.....	144
V.3.5 Hyperthermie magnétique	146
V.4 Conclusion	147
V.5 Références	148
Conclusion générale	149
I. Synthèses et caractérisations physico-chimique des NPs	149
II. Fonctionnalisation des nanoparticules pour l'encapsulation et la délivrance du principe actif ...	150
III. Evaluation biologique des nanovecteurs thermosensibles	150
IV. Etude des performances thérapeutiques de la vectorisation des NPs	
@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) modifiées par l'acide folique	151
Résumé	153
Annexes	154
Annexe 1 : Techniques de caractérisations	154
A.1.1 Diffraction des rayons X (DRX)	154
A.1.2 Spectroscopie Mössbauer	155
A.1.3 Spectroscopie Infra rouge à transformée de Fourier (IRTF)	157
A.1.4 Spectromètre d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES).....	158
A.1.5 Analyse thermogravimétrique (ATG)	159
A.1.6 Spectroscopie UV- visible (UV-vis)	161
A.1.7 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	163
A.1.8 Microscope électronique en transmission à haute résolution (MET-HR).....	165
A.1.9 Dispositif supraconducteur d'interférence quantique (SQUID).....	167
A.1.10 Vibrating Magnetometer Sample (VSM)	168
Annexe 2 : Synthèses	170
A.2.1 Centrifugeuse	170
A.2.2 Modification de l'acide folique (AF).....	170
Annexe 3 : Calculs	172

Liste des figures

Chapitre I	Page
Figure I-1 : Statistiques des cancers les plus courants dans le monde en 2020 selon l'OMS	6
Figure I-2 : Générations des nano- vecteurs	9
Figure I-3 : Représentation schématique des SPMNM	12
Figure I-4 : (a) Viabilité des cellules U87 après incubation avec EPEG-HMNC (noir), EPEG-HMNC et exposition à un champ magnétique externe de 800 G (rouge) . (b) Cytotoxicité du BCNU libre (noir), SPMNM (rouge), et SPMNM soumis à un champ magnétique 800 G (vert) contre les cellules U87 après 36 h d'incubation. (c) (En haut) Micrographies à fluorescence de cellules U87 exposés à EPEG-HMNC pendant 2 jours (à gauche), 3 jours (au milieu) et 4 jours (à droite). (En bas) Micrographies à fluorescence de cellules U87 traitées avec EPEG-HMNC (à gauche), SPMNM (au milieu) et SPMNM soumis à un champ magnétique externe (MT) de 800 G au-dessus de la ligne blanche pendant 8 h (à droite). Les cellules vivantes et mortes présentent respectivement une fluorescence verte et rouge	12
Figure I-5 : (a) Images par résonance magnétique et reconstructions 3-D correspondantes de cerveaux de rats avec des tumeurs induites par injection intracrânienne de cellules U87. Les animaux ont été traités par voie intraveineuse avec : I, témoin ; II, libre-BCNU ; III, EPEG-HMNC avec MT ; IV, SPMNM seul ; V : SPMNM avec MT. Les images ont été obtenues le jour du traitement (Jour 0) et 4 semaines plus tard (Jour 28). (b) Analyse quantitative des effets des différents traitements sur la taille de la tumeur. (c) Le pourcentage de survie des expérimentations animales	14
Figure I-6 : Illustration schématique de la préparation des microsphères Fe ₃ O ₄ /carbone/PNIPAM et de la libération du médicament	16
Figure I-7 : (a) Température des microsphères sous un champ magnétique en fonction du temps . (b) La dépendance temporelle de la libération du médicament par les microsphères à 35 C° et 50 C°	16
Figure I-8 : Représentations schématiques de la synthèse des UMNPs, BMNPs et FBMNPs accompagnées des photographies des UMNPs et solution de BMNPs dans différents milieux (Phase organique : Chloroforme)	17
Figure I-9 : Libération de médicament en fonction du pH des DOX-FBMNPs dans un environnement cellulaire mimant (réservoir : pH 4 ou 5 et puits : pH 7,3) à 37°	18
Figure I-10 : Images de microscopie à fluorescence des cellules KB après incubation avec DOX-FBMNPs et DAPI dans des conditions de culture (barre d'échelle : 25m, filtre rouge pour DOX et filtre bleu pour DAPI).	19

Figure I-11: (a) Imagerie par résonance magnétique in vivo de la tumeur intrapéritonéale après l'injection intraveineuse de NPs Fe_3O_4 @PEI modifiées et non modifiées par l'acide folique (AF) à différents moments. (b) Mesures de l'intensité des signaux T2 de la tumeur intrapéritonéale chez des souris nude après injection intraveineuse des NPs Fe_3O_4 @PEI modifiées par AF et des Fe_3O_4 @PEI non modifiées (0,6mg Fe) à différentes durées	21
Figure I-12 : Sites tétraédriques (A) et octaédriques (B) dans un cube à faces centrées	23
Figure I-13 : Représentation graphique de l'énergie magnétique (E_B) en fonction de l'angle entre le moment magnétique et l'axe facile d'une particule monodomaines avec une anisotropie uniaxiale pure.	24
Figure I-14 : Illustration des deux modes de relaxation du moment magnétique : (a) Relaxation de Brown , (b) relaxation de Néel.	25
Figure I-15: Nanoparticules CoFe_2O_4 @ MnFe_2O_4 et leurs valeurs de la SLP comparées à celles obtenues par les nanoparticules CoFe_2O_4 (cœur seul) et MnFe_2O_4 (coquille seule) (a). Valeurs de la SLP des nanoparticules MnFe_2O_4 , Fe_3O_4 , CoFe_2O_4 (b) et les coeur@coquille de CoFe_2O_4 @ MnFe_2O_4 , CoFe_2O_4 @ Fe_3O_4 , MnFe_2O_4 @ CoFe_2O_4 , Fe_3O_4 @ CoFe_2O_4 et $\text{Zn}_{0,4}\text{Co}_{0,6}\text{Fe}_2\text{O}_4$ @ $\text{Zn}_{0,4}\text{Mn}_{0,6}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (c)	28
Figure I-16 : Images cartographiées par spectroscopie de perte d'énergie électronique (EELS) de la particules $\text{Zn}_{0,4}\text{Fe}_{2,6}\text{O}_4$ @ CoFe_2O_4 . (i) région Jaune représente le Fe. (ii) région bleu représente le Co et (iii) l'image fusionnée (a). Etats de spin magnétique simulés de la particule sphérique et cubique (b). Valeurs de la magnétisation (emu/g) des particules cubiques et sphériques (c). Valeurs de la saturation magnétique (emu/g) des particules cubiques en fonction de différentes tailles (nm) (d). Valeurs de la SLP (W/g) en fonction de différentes tailles (nm) (e)	30
Figure I-17 : Etapes de synthèse par la décomposition thermique. Synthèse classique (a). Synthèse sous atmosphère contrôlée (b).	34
Figure I-18 : Polymères et molécules organiques utilisés pour la fonctionnalisation des nanoparticules.	35
Figure I-19 : Illustration schématique du comportement des polymères thermosensibles sous l'effet de la température expliquant la « LCST » et la « UCST	36
Figure I-20 : Solutions polymériques contenant des unités OEGMA (oligo (éthylène glycol) méthacrylate) en dessous de la LCST (25°C) et au-dessus de la LCST (37°C)	37
Figure I-21 : Structure chimique du Poly(<i>N</i> -isopropylacrylamide) (PNIPAM)	38
Figure I-22 : Structure chimique du Poly (<i>N</i> -vinylcaprolactame) (PVCL)	38
Figure I-23 : Macro monomères méthacrylates d'Oligo (éthylène glycol). Les parties jaune et bleue représentent les parties hydrophobes et hydrophiles respectivement	39

Figure I-24 : Structures moléculaires des macro monomères « méthacrylates d'Oligo (éthylène glycol) ». Les parties hydrophiles sont représentées en bleu	40
Figure I-25 : Viabilité cellulaire du P(MEO ₂ MA-co-OEGMA ₅₀₀) après 24h sur quatre lignées cellulaires différentes. Les pourcentages sont affichés sous forme de moyenne ± standard écarts (n=5)	41
Figure I-26 : Schéma des deux méthodes du greffage du polymère « grafting to » et « grafting from »	43
Figure I-27 : Schéma du mécanisme ATRP proposé par Matyjaszewski <i>et al.</i>	44
Figure I-28 : Schéma du mécanisme ARGET-ATRP proposé par Matyjaszewski <i>et al.</i>	46
Figure I-29 : Schéma du projet de thèse	48
Chapitre II	Page
Figure II-1 : Représentation schématique des NPs cœur/coquille	63
Figure II-2 : Montage de la réaction	64
Figure II-3 : Schéma de la réaction des NPs Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ @ MnFe ₂ O ₄	65
Figure II-4 : Diffractogrammes RX des NPs tels qu'elles sont préparées (a), après recuit à 300°C (b) et à 700°C (c)	68
Figure II-5 : Spectres Mössbauer des NPs telles qu'elles sont préparées (noir), des NPs recuites à 300°C (bleu) et à 700°C (rouge)	69
Figure II-6 : (1) Images MET (Bright field) des NPs Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ : 5nm (a), 10nm (b), 18nm (c) et 45nm (d). (2) Images MET des NPs Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ @ MnFe ₂ O ₄ : 10nm (a), 15nm (b), 22nm (c) et 50nm (d)	71
Figure II-7 : Images cartographie X des NPs Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ (45nm) (a) et des NPs Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ @MnFe ₂ O ₄ (50nm) (b)	72
Figure II-8 : Spectres EDS des NPs Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ (45nm) (a) et des NPs Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ @MnFe ₂ O ₄ (50nm) (b)	73
Figure II-9 : Analyse ICP-OES des NPs de Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ @MnFe ₂ O ₄	73
Figure II-10 : Spectres IRTF des NPs de Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ (rouge) et Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ @MnFe ₂ O ₄ (noir)	75
Figure II-11 : Courbes de magnétisation des NPs de Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ (a). NPs Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ @MnFe ₂ O ₄ (b). Magnétisation en fonction de la taille des NPs Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ (c). Magnétisation en fonction de la taille des NPs Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ @MnFe ₂ O ₄ (d)	76
Figure II-12 : (a) Valeurs SAR des NPs Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ @MnFe ₂ O ₄ selon leurs différentes tailles. (b) Courbes de chauffage des NPs Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ @MnFe ₂ O ₄ de 50nm en	77

fonction du temps sous un champ magnétique alternatif de 536,5 kHz /300 Gauss ou 796 kHz / 200 Gauss.	
Chapitre III	Page
Figure III-1 : Objective du chapitre III	84
Figure III-2 : Schéma de la silanisation des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ par le CMPETMS	86
Figure III-3 : Schéma de la silanisation des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ par les APTES-BIBB	87
Figure III-4 : Schéma de la polymérisation des NPs @CMPETMS (a) et des NPs@ APTES-BIBB par le P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) (b)	88
Figure III-5 : Encapsulation de la DOX	89
Figure III-6 : Spectres Infra- rouge des NPs-CMPETMS (noir), NPs-CMPETMS@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) (rouge), NPs-APTES (bleu) et des NPs-APTES @ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) (vert)	95
Figure III-7 : (a) courbes ATG des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ (noir) et des NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀)(rouge) de 22nm. (b) courbes ATG des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ (noir) et des NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀)(rouge) de 50nm	96
Figure III-8 : Image MET (Bright field) et histogramme de distribution de taille des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ 22nm (a) , des NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 22nm (b) , des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ 50nm (c) et des NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) de 50nm	98
Figure III-9 : Clichés de diffraction des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ 22nm (a) , des NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 22nm (b) , des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ 50nm (c) et des NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) de 50nm	99
Figure III-10 : Spectres EDS des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ 22nm (a) , des NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 22nm (b) , des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ 50nm (c) et des NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) de 50nm (d)	100
Figure III-11 : Comportement colloïdale des NPs @ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 22nm (a)et 50nm (b) en fonction de la température	101
Figure III-12 : Valeurs de la magnétisation en fonction du champs magnétique des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ 22nm (a) , des NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 22nm (b), des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ 50nm (c) et des NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀)50nm (d)	102
Figure III-13 : Courbes ZFC/FC des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ 22nm (a) , des NPs@P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 22nm (b), des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ 50nm (c) et des NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 50nm (d)	104
Figure III-14 : Spectres IRTF des NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) (bleu), de la DOX (rouge) et des NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) chargées en DOX (noir)	106
Figure III-15 : Courbes de relargage de la DOX en fonction de la température. (a) NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 50nm dans le DMEM. (b) NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 22nm dans le DMEM. (c) NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 50nm dans l'eau. (d) NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 22nm dans l'eau	107

Figure III-16 : Courbes de relargage de la DOX en fonction du temps à 37°C. (a) NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 50nm dans le DMEM. (b) NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 22nm dans le DMEM. (c) NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 50nm dans l'eau. (d) NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 22nm dans l'eau	110
Figure III-17 : Courbes de relargage de la DOX en fonction du temps à 42°C. (a) NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 50nm dans le DMEM. (b) NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 22nm dans le DMEM. (c) NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 50nm dans l'eau. (d) NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 22nm dans l'eau.	111
Figure III-18 : Températures des NPs @ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) de 22nm (a) et des 50nm (b) sous un champs magnétique alternative dans le DMEM et l'eau à 536,5 et 796 KHz	114
Chapitre IV	Page
Figure IV-1 : Viabilité des cellules SKOV-3 après 24h et 72h de contact avec les NPs@P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) de 22nm	123
Figure IV-2 : Viabilité des cellules SKOV-3 après 24h et 72h de contact avec les NPs@P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) de 50nm	124
Figure IV-3 : Viabilité des cellules SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C de contact avec les NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) de 22nm	126
Figure IV-4 : Viabilité des cellules SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C de contact avec les NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) de 50nm	127
Figure IV-5 : Viabilité des cellules SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C de contact avec les NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) de 22nm chargée en DOX et la DOX libre	129
Figure IV-6 : Viabilité des cellules SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C de contact avec les NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) de 50nm chargée en DOX et la DOX libre	130
Chapitre V	Page
Figure V-1 : Objective du chapitre V	137
Figure V-2 : Modification des NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) par l'acide folique	138
Figure V-3 : NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀)- AF	139
Figure V-4 : Spectre IRTF des NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀)- AF	140
Figure V-5 : Image MET (Bright field) et histogramme de distribution de taille des NPs@P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀)- AF (50nm) (a). Cliché de diffraction des NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀)- AF (50nm) (b)	141

Figure V-6 : Viabilité des cellules SKOV-3 après 24h et 72h de contact avec les NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀)-AF de 50nm	142
Figure V-7 : Viabilité des cellules SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C de contact avec les NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀)-AF chargées en DOX et la DOX libre	144
Figure V-8 : Températures des NPs @ AF et de 50nm sous un champs magnétique alternative dans le DMEM et l'eau à 536,5 et 796 KHz	145
Annexes	Page
Figure1 : Illustration schématique de la DRX lorsque la loi de Bragg est satisfaite	153
Figure 2 : Diffractomètre PHILIPS PANalytical X'Pert Pro MPD	154
Figure 3 : Schéma d'un spectromètre Mössbauer	155
Figure 4 : Montage Mössbauer	155
Figure 5 : Interféromètre de Michelson conçu pour la spectroscopie infra rouge	156
Figure 6 : Spectrophotomètre infra-rouge à transformée de Fourier	157
Figure 7 : Perkin Elmer Avio 200- ICP-OES	158
Figure 8 : Montage intérieur d'un appareil ATG	159
Figure 9 : Appareil ATG Setaram Setsys évolution 1750	159
Figure10 : Principe de a spectrométrie UV-visible	160
Figure 11 : Spectrophotomètre UV-visible	162
Figure 12 : Schéma représentatif de la DLS	163
Figure 13 : Goniomètre compact ALV / CGS-3	164
Figure 14 : Schéma représentatif d'un microscope électronique en transmission	165
Figure 15 : (a) MET Philips CM200. (b) MET-HR JEOL JEM - ARM 200F	166
Figure 16 : Magnétomètre MPMS3 Squid de « Quantum design »	167
Figure 17 :Magnétomètre VSM de Microsense	168
Figure 18 :Centrifugeuse multifuge X1, thermo scientific	169
Figure 19 : Synthèse de l'acide folique modifié par l'acide 2-bromoisobutyrate d'hydroxyéthyle	170

Liste des tableaux

Chapitre I	Page
Tableau I- 1 : Efficacité du chargement du principe actif anti -cancéreux des NPs cœur/coquille à base de polymères. (DLC: taux de charge du médicament. DLE : efficacité de chargement du médicament. DEGMA : di(éthylène glycol) methyl éther methacrylate. OEGMA : oligo(éthylène glycol) methyl éther methacrylate. TMSPPMA : 3-(triméthoxysilyl)propyl methacrylate. VBA : -vinyl-benzaldehyde. MEO ₂ MA : 2-(2-méthoxy) éthyle méthacrylate. PNIPAAm : poly(N-isopropylacrylamide)	20
Tableau I- 2 : NPs coeur/coquille étudiées pour le ciblage des cellules cancéreuses	22
Tableau I- 3 : NPs magnétiques type cœur/coquille pour l'hyperthermie Magnétique	31
Chapitre II	Page
Tableau II- 1 : Volume d'acide oléique en fonction du diamètre moyen ciblé des NPs	65
Tableau II- 2 : Les paramètres hyperfins des NPs telles qu'elles sont préparées et celles recuites à 300 et 700°C obtenus par analyse Mössbauer	70
Tableau II- 3 : Diamètre moyen des NPs Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ et des NPs Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ @ MnFe ₂ O ₄	71
Tableau II- 4 : Valeurs de saturation magnétique des NPs Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ et des NPs Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ @ MnFe ₂ O ₄	76
Chapitre III	Page
Tableau III- 1 : Valeurs de la saturation magnétique des NPs en fonction du champ magnétique (7 Tesla) à T=310K	103
Tableau III- 2 : Températures de blocage des NPs	105
Tableau III- 3 : Pourcentage de la DOX libérée par les NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 22 et 50nm en fonction de la température	108
Tableau III- 4 : Données cinétiques de la libération de la DOX par les NPs @ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 22 et 50nm pour des températures égales à 37°C et 42°C dans les deux milieux : eau et DMEM	112
Tableau III- 5 : Valeurs DLC et DLE des NPs	113
Chapitre IV	Page
Tableau IV- 1 : Rôle des différents composants	120
Tableau IV- 2 : Pourcentages des viabilités cellulaires des cellules SKOV-3 après 24h et 72h de contact avec les NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) de 22nm	123
Tableau IV- 3 : Pourcentages des Viabilités cellulaires des cellules SKOV-3 après 24h et 72h de contact avec les NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) de 50nm	124
Tableau IV- 4 : Pourcentages des Viabilités cellulaires des SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C de contact avec les NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) de 22nm	126
Tableau IV- 5 : Pourcentages des viabilités cellulaires des SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C de contact avec les NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) de 50nm	127

Tableau IV- 6 : Pourcentages des viabilités cellulaires des SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C de contact avec les NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) de 22nm chargée en DOX et la DOX libre	129
Tableau IV- 7 : Pourcentages des viabilités cellulaires des SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C de contact avec les NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) de 50nm chargée en DOX et la DOX libre	131
Chapitre V	Page
Tableau V- 1 : Pourcentages des viabilités cellulaires des cellules SKOV-3 après 24h et 72h de contact avec les NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀)-AF de 50nm	142
Tableau V- 2 : Pourcentages des viabilités cellulaires des SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C de contact avec les NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀)-AF de 50nm chargée en DOX et la DOX libre	144
Annexes	Page
Tableau 1 : Masse globale de chaque élément y compris oxygène dans les Zn _{0.4} Fe _{2.6} O ₄ @ MnFe ₂ O ₄ en fonction de la taille des particules	171
Tableau 2 : Pourcentage globale de chaque élément y compris oxygène dans les Zn _{0.4} Fe _{2.6} O ₄ @ MnFe ₂ O ₄ en fonction de la taille des particules	171
Tableau 3: Masse globale de chaque élément sans oxygène dans les Zn _{0.4} Fe _{2.6} O ₄ @ MnFe ₂ O ₄ en fonction de la taille des particules	172
Tableau 4 : Pourcentage globale de chaque élément sans oxygène dans les Zn _{0.4} Fe _{2.6} O ₄ @ MnFe ₂ O ₄ en fonction de la taille des particules	172

Introduction générale

Le cancer est une maladie sévère caractérisée par la croissance et la propagation non contrôlée de cellules anormales. Il est considéré comme étant la deuxième cause de décès dans le monde, selon les estimations de l'OMS (Organisation Mondiale de la santé) d'ici 2030 le nombre de décès causés par cette maladie sera environ 30 millions. Il existe différents traitements pour de nombreux types de cancers, tels que la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Bien que ces traitements ont amélioré la survie des patients, ils présentent néanmoins des limites et de lourds effets secondaires¹.

Au cours de la dernière décennie, les nanomatériaux se sont révélés très prometteurs et ont connu un développement rapide dans le domaine de la nanomédecine⁴ pour différentes applications médicales, en particulier dans le traitement du cancer, en tant que plateformes d'administration de médicaments⁵ combinées à un ciblage spécifique⁶. Ces nanomédicaments, dérivés de nano-objets présentent de grands avantages et des capacités uniques pour surmonter les limites de la chimiothérapie¹ actuelle tout en limitant les effets secondaires.

Le développement de nanoparticules magnétiques a fait l'objet de recherche intensive car leurs propriétés physiques permettent d'envisager des applications en diagnostique (IRM pour Imagerie à Résonance Magnétique) et un traitement par l'Hyperthermie ce qui fait de ces nano-objets des candidats idéaux pour la théragnostique (combinaison entre « thérapeutique » et « diagnostic ». L'hyperthermie est intéressante car en soumettant des nanoparticules à un champ magnétique alternatif externe cela conduit à une augmentation de température qui peut conduire à la mort des cellules malignes sensibles à des températures au-dessus 42°C par apoptose (mort cellulaire programmée)⁷⁻¹⁰. Ce qui lui permet d'être une technique prometteuse envisagée pour traiter les cellules cancéreuses. Les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique (SPIONP)¹¹ sont les candidats idéaux pour cette technologie^{10,12,13}. Elles sont approuvées par la société Américaine Food and Drug Administration (FDA) car elles présentent une bonne biocompatibilité, une biodégradabilité et un faible cout¹⁴ qui les rendent avantageuses pour envisager leur translation clinique rapidement^{9,11,12}. Plusieurs travaux ont été réalisés afin d'étudier et de contrôler leur comportement magnétique pour améliorer l'efficacité de l'hyperthermie pour la thérapie du cancer¹⁴. Pour atteindre cet objectif, les chercheurs ont

concentré leurs travaux sur la composition chimique et la structure morphologique du nanomatériau (taille et forme) et il a été démontré que les SPIONP en forme cubique peuvent présenter des propriétés magnétiques et hyperthermiques plus élevées par rapport que celles ayant une forme sphérique¹⁴⁻¹⁷.

Pour combiner l'hyperthermie et la libération de médicaments, des efforts ont été consacrés à la conception d'une structure cœur/coquille. L'enveloppe peut agir comme un conteneur de médicament mais peut également assurer la stabilisation, améliorer la biocompatibilité des NPs et parfois leurs conférer des propriétés furtives (capacité à échapper à la phagocytose par les cellules immunitaires)¹⁸. Parmi les différents types de nanoparticules qui ont été développés lors de la naissance de la nanomédecine et qui ont permis de faire des progrès significatifs dans la thérapie anti-cancéreuse, on trouve les nanoparticules recouvertes d'une enveloppe à base de polymère¹⁹. L'intérêt de l'utilisation de ces polymères est d'assurer une délivrance efficace du médicament anticancéreux. Il est possible d'y associer ciblage vers le site cancéreux afin de maximiser l'effet anticancer des médicaments tout en limitant leur impact sur les cellules saines²⁰⁻²¹.

L'objectif de ce travail de thèse est le développement d'un nouveau système thermosensible avec des propriétés magnétiques intéressantes qui sera d'une part capable d'encapsuler un médicament anticancéreux (Doxorubicine) et de le relarguer près du site tumoral à une température contrôlée d'une manière spécifique en répondant à un stimulus extérieur (hyperthermie).

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe « Nanomatériaux et santé » sous la direction de Mme Halima Alem-Marchand, Professeure à l'Université de Lorraine et Mr Eric Gaffet Directeur de recherche au CNRS.

Le manuscrit de thèse se compose de 5 chapitres :

Le premier chapitre présente un état de l'art lié à ce projet de thèse.

Le second chapitre sera dédié à la synthèse des nanoparticules de différentes tailles avec leurs caractérisations physico-chimiques.

Le troisième chapitre consiste du développement des NPs élaborées dans le second chapitre et leurs efficacités dans l'encapsulation et la libération du médicament anticancéreux.

Dans le quatrième chapitre, nous présentons les analyses biologiques de ces nano vecteurs vis-à-vis des cellules cancéreuses de l'ovaire.

Enfin, le dernier chapitre sera consacré pour le ciblage des cellules cancéreuses après avoir modifier leur surface avec l'acide folique.

Les résultats de ce projet de thèse vont être présenté en 4 différentes étapes :

- Synthèse et caractérisation physico-chimique des NPs
- Fonctionnalisation des NPs pour l'encapsulation et la délivrance du principe actif
- Évaluation biologique des nanovecteurs thermosensibles
- Étude des performances thérapeutiques de la vectorisation des NPs@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) modifiées par l'acide folique.

Références :

1. Nguyen KT. Targeted Nanoparticles for Cancer Therapy: Promises and Challenges. *J Nanomedicine Nanotechnol.* 2011;02(05). doi:10.4172/2157-7439.1000103e
2. Dilnawaz F, Singh A, Mohanty C, Sahoo SK. Dual drug loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeted cancer therapy. *Biomaterials.* 2010;31(13):3694-3706. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.057
3. Jason LCM, Zurakowski HR. Modeling and analysis of gene-therapeutic combination chemotherapy for pancreatic cancer. *IFAC Proc Vol.* 2011;44(1):14217-14222. doi:10.3182/20110828-6-IT-1002.03162
4. Santhosh PB, Ulrich NP. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Promising tools in cancer theranostics. *Cancer Lett.* 2013;336(1):8-17. doi:10.1016/j.canlet.2013.04.032
5. Jurgons R, Seliger C, Hilpert A, Trahms L, Odenbach S, Alexiou C. Drug loaded magnetic nanoparticles for cancer therapy. *J Phys Condens Matter.* 2006;18(38):S2893-S2902. doi:10.1088/0953-8984/18/38/S24
6. Zhang H, Liu XL, Zhang YF, et al. Magnetic nanoparticles based cancer therapy: current status and applications. *Sci China Life Sci.* 2018;61(4):400-414. doi:10.1007/s11427-017-9271-1
7. Sadhukha T, Wiedmann TS, Panyam J. Inhalable magnetic nanoparticles for targeted hyperthermia in lung cancer therapy. *Biomaterials.* 2013;34(21):5163-5171. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.03.061
8. Yigit MV, Moore A, Medarova Z. Magnetic Nanoparticles for Cancer Diagnosis and Therapy. *Pharm Res.* 2012;29(5):1180-1188. doi:10.1007/s11095-012-0679-7
9. Mahmoudi M, Hofmann H, Rothen-Rutishauser B, Petri-Fink A. Assessing the In Vitro and In Vivo Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Chem Rev.* 2012;112(4):2323-2338. doi:10.1021/cr2002596
10. Abenojar EC, Wickramasinghe S, Bas-Concepcion J, Samia ACS. Structural effects on the magnetic hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles. *Prog Nat Sci Mater Int.* 2016;26(5):440-448. doi:10.1016/j.pnsc.2016.09.004
11. Li L, Jiang W, Luo K, et al. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as MRI contrast agents for Non-invasive Stem Cell Labeling and Tracking. *Theranostics.* 2013;3(8):595-615. doi:10.7150/thno.5366
12. Kievit FM, Zhang M. Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy. *Acc Chem Res.* 2011;44(10):853-862. doi:10.1021/ar2000277
13. Ferjaoui Z, Jamal Al Dine E, Kulmukhamedova A, et al. Doxorubicin-Loaded Thermoresponsive Superparamagnetic Nanocarriers for Controlled Drug Delivery and

- Magnetic Hyperthermia Applications. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(34):30610-30620. doi:10.1021/acsami.9b10444
14. Akbarzadeh A, Samiei M, Joo SW, et al. Synthesis, characterization and in vitro studies of doxorubicin-loaded magnetic nanoparticles grafted to smart copolymers on A549 lung cancer cell line. Published online 2012:13.
 15. Roy D, Cambre JN, Sumerlin BS. Future perspectives and recent advances in stimuli-responsive materials. *Prog Polym Sci*. 2010;35(1-2):278-301. doi:10.1016/j.progpolymsci.2009.10.008
 16. Lee H il, Pietrasik J, Sheiko SS, Matyjaszewski K. Stimuli-responsive molecular brushes. *Prog Polym Sci*. 2010;35(1-2):24-44. doi:10.1016/j.progpolymsci.2009.11.002
 17. Angelopoulou A, Kolokithas-Ntoukas A, Fytas C, Avgoustakis K. Folic Acid-Functionalized, Condensed Magnetic Nanoparticles for Targeted Delivery of Doxorubicin to Tumor Cancer Cells Overexpressing the Folate Receptor. *ACS Omega*. 2019;4(26):22214-22227. doi:10.1021/acsomega.9b03594
 18. Ferjaoui Z, Schneider R, Meftah A, Gaffet E, Alem H. Functional responsive superparamagnetic core/shell nanoparticles and their drug release properties. *RSC Adv*. 2017;7(42):26243-26249. doi:10.1039/C7RA02437A
 19. Nagarajan R, Hatton TA. Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization. :4.
 20. Kumar KS, Kumar VB, Paik P. Recent Advancement in Functional Core-Shell Nanoparticles of Polymers: Synthesis, Physical Properties, and Applications in Medical Biotechnology. *J Nanoparticles*. 2013;2013:1-24. doi:10.1155/2013/672059
 21. Jun Y wook, Seo J wook, Cheon J. Nanoscaling Laws of Magnetic Nanoparticles and Their Applicabilities in Biomedical Sciences. *Acc Chem Res*. 2008;41(2):179-189. doi:10.1021/ar700121f

Chapitre I : Etat de l'art

I.1 Le cancer :

Le cancer est le terme générique de plusieurs maladies qui peuvent affecter n'importe quelle partie du corps. Elle résulte d'une transformation rapide de cellules normales en cellules anormales qui se développent au-delà de leurs limites habituelles¹. Elles se transforment d'un environnement dans lequel elles utilisent de l'oxygène et du glucose (l'état aérobie) à un environnement dans lequel elles utilisent seulement du glucose (l'état anaérobie et glycolytique)². Cette conversion marque le début de la croissance de la tumeur jusqu'à un stade symptomatique qui correspond à sa détection clinique³.

Selon l'OMS (Organisation mondiale de la santé), le cancer est l'une des causes principales de la mortalité dans le monde, environ 10 millions de morts enregistrés en 2020 soit un décès sur six. Et d'ici 2030, l'OMS estime que le nombre de décès causés par cette maladie augmentera jusqu'à 12 millions de plus⁴.

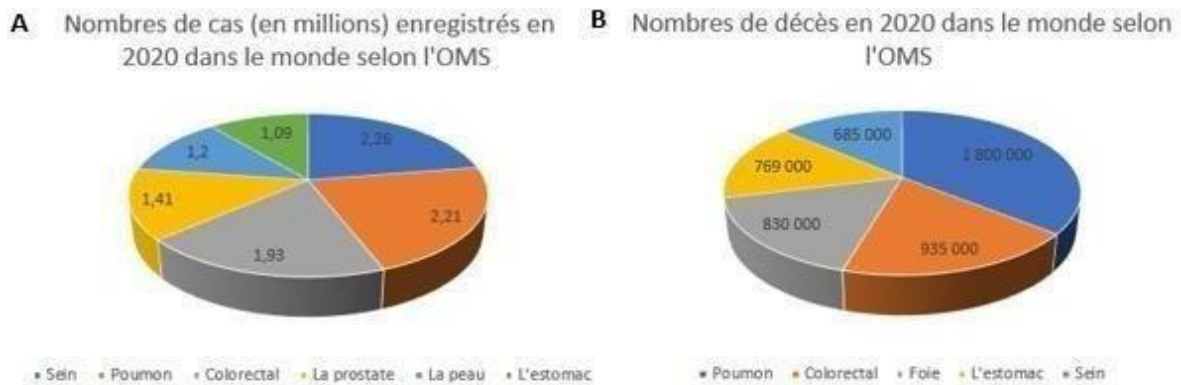


Figure I-1 : Statistiques des cancers les plus courants dans le monde en 2020 selon l'OMS⁴.

A Nombres de cas enregistrés, **B** Nombres de décès

Chez les femmes, les types des cancers les plus fréquents sont le cancer du sein, du colon et du rectum, du poumon, du col de l'utérus et de la thyroïde, tandis que le cancer du poumon, de la prostate, colorectal, de l'estomac et du foie sont les types les plus fréquents chez les hommes⁵. L'incidence du cancer augmente considérablement avec l'âge car les mécanismes de réparation cellulaire ont tendance à être moins efficaces.

Le choix de la stratégie thérapeutique dépend de facteurs relatifs au cancer lui-même : type de cancer, stade de la maladie mais aussi d'éléments propres au patient comme son âge, son état général, la présence d'autres pathologies et bien sur sa capacité à suivre un traitement anti cancéreux. Un diagnostic précis du type du cancer est important pour un traitement efficace car chaque type nécessite un régime de traitement spécifique qui peut être la chirurgie, la radiothérapie, l'immunothérapie ou la chimiothérapie⁴.

I.2 Les traitements du cancer :

I.2.1 La chirurgie : ce traitement est le plus ancien, une fois la tumeur localisée, le patient est opéré pour la retirer. La chirurgie peut prolonger la vie du patient, voire garantir une rémission. Il a été démontré que ce traitement, ne peut garantir une récurrence tumorale⁶.

I.2.2 La radiothérapie : ce traitement basé sur les rayons X à haute dose cible les cellules cancéreuses pour les détruire en fragmentant leur ADN (Acide désoxyribonucléique) afin d'éviter leur multiplication. Son objectif principal est d'atteindre un haut taux de contrôle local par les doses sans aucun effet majeur sur les tissus normaux⁷.

I.2.3 L'immunothérapie : C'est une nouvelle approche thérapeutique⁸ qui n'attaque pas directement la tumeur mais elle stimule les cellules immunitaires impliquées dans sa reconnaissance et sa destruction via des vaccins, des cellules effectrices stimulées *in vitro*, des anticorps⁹ etc . . .

I.2.4 La chimiothérapie : C'est la technique la plus utilisée en ce moment pour traiter le cancer¹⁰. Elle est basée sur l'administration des produits chimiques toxiques avec des propriétés de destruction cellulaire qui éradique la tumeur ou réduit sa charge. Ces médicaments toxiques sont généralement administrés par voie intraveineuse mais l'administration orale est aussi utilisée pour certains médicaments¹¹. Elle est considérée comme une technique invasive car elle comporte un risque dû à la toxicité des médicaments utilisés qui engendrent des effets secondaires sur le patient même si le traitement est réussi¹². Une étude sur les effets secondaires de la chimiothérapie a été menée par Richard *et al.*¹³ : Les résultats obtenus montrent que plus de 80% des patients soumis à ce traitement ont ressenti de la fatigue, des nausées et une perte de cheveux, des troubles du sommeil, des vomissements, une prise du poids, des aphtes dans la bouche et des engourdissements ont été enregistrés chez 40% des patients¹¹.

Dans le but de minimiser ces effets secondaires, les chercheurs travaillent sur le développement d'une nouvelle stratégie basée sur des systèmes d'administration de médicaments anticancer sous forme de nano-objets capables d'encapsuler un médicament et le relarguer près des sites tumoraux d'une manière spécifique afin de protéger les cellules saines et réduire les effets secondaires de la chimiothérapie.

I.3 Les nanomatériaux pour la nanomédecine :

Au cours de la dernière décennie, les nanomatériaux se sont révélés très prometteurs et ont connu un développement rapide dans le domaine de la nanomédecine¹⁴ en raison de leur petite taille, de leur grande surface spécifique et de leur capacité à interagir avec les cellules/tissus¹⁵. En particulier dans le traitement du cancer, les nanomatériaux sont utilisés comme plateformes d'administration de médicaments¹⁶ combinés à un ciblage spécifique. Devenu un enjeu majeur de la recherche médicale aujourd'hui¹⁷. Ils présentent de grands avantages et des capacités uniques pour surmonter les limites de la chimiothérapie¹⁸ tout en limitant les effets secondaires.

Il existe deux grandes classes de nanoparticules : des simples et des complexes. Comme leur nom l'indique, les nanoparticules simples sont constituées d'un seul matériau, tandis que les nanoparticules complexes, peuvent être des nanoparticules composites ou des nanoparticules cœur/coquille constituées de plusieurs matériaux¹⁹. À la fin des années 1980, des chercheurs ont découvert que les nanoparticules de type composites ou encore cœur/coquille étaient plus efficaces que les particules simples correspondantes^{20,21,22}. Ce sont des matériaux avec un noyau interne et une enveloppe externe constitués de différents composés²³. Cette combinaison de différents matériaux est un moyen idéal permettant d'ajouter plusieurs fonctionnalités à l'échelle nanoscopique²⁴. La coquille est choisie comme revêtement protecteur pour le noyau qui permet de modifier et d'améliorer les propriétés physiques du noyau, et le matériau qui constitue la coquille dépend du domaine d'applications²⁵.

Dans la partie suivante, nous décrirons les nano-objets de type cœur/coquille mis en œuvre pour la chimiothérapie.

Les nano-objets cœur/coquille pour la chimiothérapie :

Les nanoparticules cœur/coquille offrent des applications prometteuses en nanomédecine en raison de leurs multifonctionnalités, notamment dans le domaine de la thérapie anticancéreuse avec des systèmes d'administration de médicaments. Différents types de nanoparticules cœur /coquille ont été développés pour servir ce domaine, telles que les PLGA (Poly (lactic-co-glycolic acid)) –lécithine/PEG (polyéthylène glycol)²⁶, Fe₃-δO₄/ PLGA²⁷ et Fe₃-δO₄/P(MEO₂MA_x-OEGMA_y) pour Fe₃-δO₄/ (poly ((2-(2-méthoxy) éthyle méthacrylate - oligo (éthylène glycol) méthacrylate))²⁸, etc. Ces nanomatériaux combinent à la fois des propriétés physico- chimiques qui les rendent capables d'encapsuler un médicament anticancéreux et le relarguer spécifiquement vers les cellules cancéreuses. Des molécules cibles peuvent être greffées sur leur surfaces tels que des anticorps, des peptides ou du polyamine^{10,29}, etc.

I.4 Générations des nanovecteurs :

Il existe quatre générations différentes depuis la découverte des nano-objets mis en œuvre pour l'administration des médicaments (**Figure I-2**).

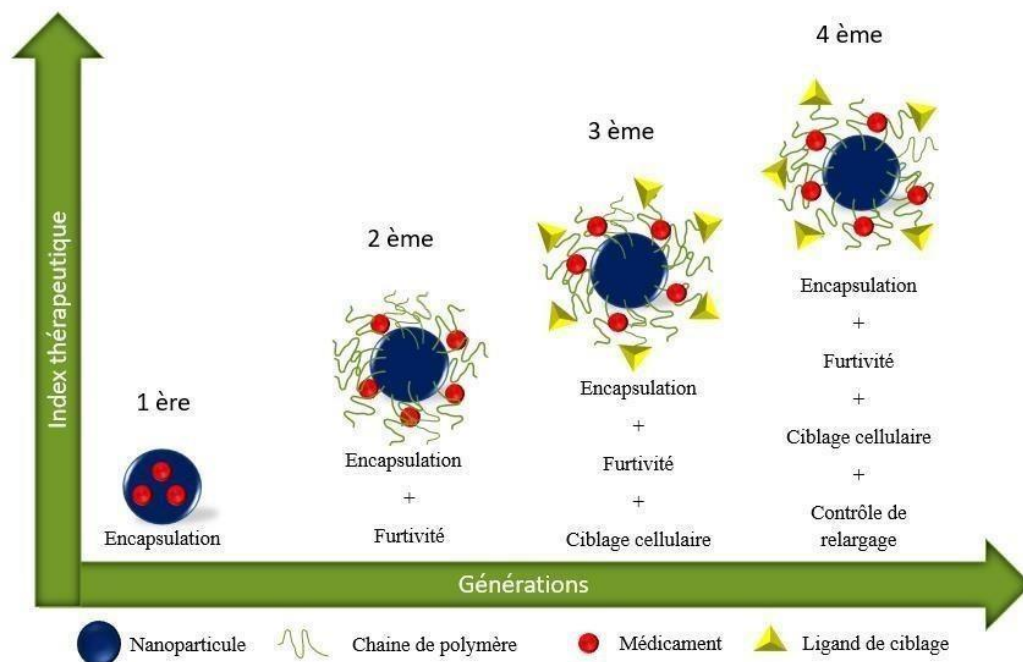


Figure I-2 : Générations des nano-vecteurs¹⁰.

I.4.1 Première génération : Ce sont des nanovecteurs nus encapsulés en médicament anti-cancéreux qui n'ont ni la propriété de furtivité ni celle de ciblage. Ils présentent des limites telles que :

- La non-spécificité du traitement,
- L'élimination par les reins,
- L'accumulation dans la rate et le foie une fois capturés par les macrophages
- Et une courte durée de circulation dans le sang,

ce qui réduit leur efficacité pour le traitement spécifique^{10,30}.

I.4.2 Deuxième génération : Il s'agit des nanovecteurs avec les mêmes caractéristiques que ceux de la première génération mais avec des propriétés de furtivité, grâce aux chaînes de polymères qui sont greffées sur leurs surfaces. L'introduction de ces chaînes permet de diminuer leur accumulation dans la rate et le foie et leur élimination par le système immunitaire et surtout d'augmenter leur durée de circulation dans le sang en limitant l'adsorption des protéines, phénomène susceptible d'inhiber l'absorption des nanovecteurs et d'entraver l'efficacité thérapeutique du système. En revanche, ces chaînes ne permettent pas le ciblage des nanovecteurs vers les cellules tumorales³¹⁻³³.

I.4.3 Troisième génération : Cette génération garde la propriété de furtivité de la deuxième génération mais surmonte le problème du ciblage des nanovecteurs vers les cellules tumorales grâce à des ligands qui sont ajoutés sur leur surface, permettant l'internalisation vers les cellules avec spécificité. Cette génération se distingue du ciblage passif se produisant grâce aux grandes diamètres des vaisseaux des tumeurs (200 nm)³⁴ dans la première et la deuxième générations par le ciblage actif présent dans la troisième génération.

I.4.4 Quatrième génération : Cette dernière concerne les nanovecteurs « intelligents » ou « smart » en anglais, qui réagissent avec l'environnement extracellulaire et qui gardent les mêmes

propriétés que ceux de la troisième génération. Ces nanovecteurs présentent une sensibilité envers différents facteurs extérieurs comme le pH 35, la température et le champ magnétique. Le choix de ces facteurs pour l'activation des nanovecteurs dépend de leurs domaines d'utilisation. Par exemple, les nanovecteurs revêtus d'une coquille thermosensible permettent d'encapsuler un principe actif et de le libérer d'une manière contrôlée par une élévation de la température en ciblant les cellules cancéreuses pour un traitement spécifique et efficace³⁶.

Différents types de nano-objets dits de quatrième génération ont été développés pour la libération du médicament telles que les nanoparticules cœur-coquille à base de métaux³⁷, à base de silice³⁷ à base de carbone, ou encore présentant des propriétés spécifiques magnétiques²⁷, ...etc.

Dans la partie suivante nous nous sommes concentrés sur les nanovecteurs de type cœur/coquille à base de nanoparticules magnétiques (MNPs, Magnetic Nano Particles), qui sont en lien direct avec l'objet de ma thèse.

I.5 Nanovecteurs type cœur/coquille à base de nanoparticules magnétiques pour la délivrance du médicament :

Une large gamme de nanoparticules magnétiques de type cœur/coquille a été développée pour la délivrance du médicament anticancer, prenant comme exemple les nanoparticules qui ont été développées par Yang *et al*³⁸. Ce sont des nanoparticules composées d'un cœur hautement magnétique (89,7emu/g à 6000 Oe) à base d'oxyde de fer Fe₃O₄ (HMNC) et d'une coquille de poly[N-(acide 1-one-butyrique)]aniline (SPANH) ont été synthétisées. Ces nanoparticules ont une capacité de charger le médicament anti-cancéreux « 1,3-bis(2-chloroéthyl)-1-nitrosourée (BCNU) » et le délivrer une fois activées par un champ magnétique (Magnetic targeting MT) . Une couche de o-(2-aminoéthyl)polyéthylène glycol (EPEG) a été ajoutée sur la surface de ces nanoparticules pour qu'elles forment un aimant magnétique dit auto-protecteur (self-protecting magnetic nanomedicine « SPMNM ») (**Figure I-3**), présentant une faible absorption par le système réticulo-endothélial et permettant de réduire la phagocytose par les macrophages et le taux d'hydrolyse du médicament.

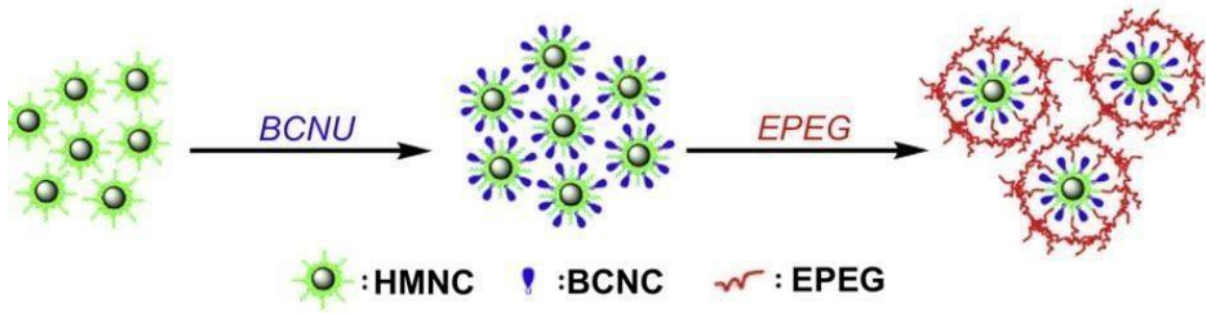


Figure I-3 : Représentation schématique des SPMNM ³⁸.

Pour l'étude de la cytotoxicité, des travaux ont été réalisés³⁸ : afin d'étudier *in-vitro*, la cytotoxicité des BCNU seules, EPEG-HMNC et les SPMNM avant et après leurs expositions à un champ magnétique sur les cellules U87 (les cellules de type U87 sont des cellules d'une lignée cellulaire humaine cancéreuse de glioblastomes). Les résultats de ces travaux sont présentés dans la **Figure I-4**.

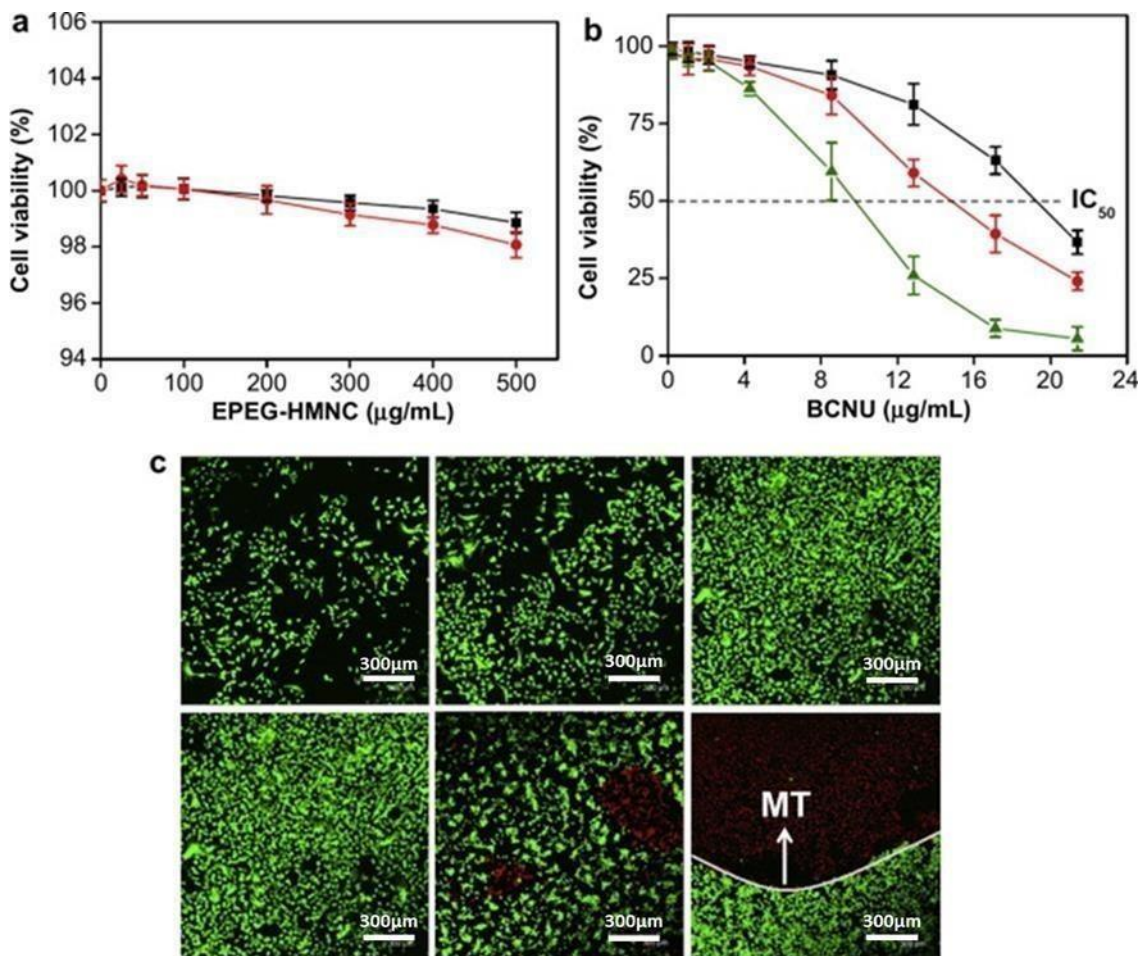


Figure I-4 : (a) Viabilité des cellules U87 après incubation avec EPEG-HMNC (noir), EPEG-HMNC et exposition à un champ magnétique externe de 800 G (rouge) . (b) Cytotoxicité du

BCNU libre (noir), SPMNM (rouge), et SPMNM soumis à un champ magnétique 800 G (vert) contre les cellules U87 après 36 h d'incubation. (c) (En haut) Micrographies à fluorescence de cellules U87 exposés à EPEG-HMNC pendant 2 jours (à gauche), 3 jours (au milieu) et 4 jours (à droite). (En bas) Micrographies à fluorescence de cellules U87 traitées avec EPEG-HMNC (à gauche), SPMNM (au milieu) et SPMNM soumis à un champ magnétique externe (MT) de 800 G au-dessus de la ligne blanche pendant 8 h (à droite). Les cellules vivantes et mortes présentent respectivement une fluorescence verte et rouge³⁸.

Les résultats de cette étude montrent que EPEG-HMNC présente une faible toxicité pour les cellules cancéreuses même à hautes concentrations jusqu'à $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (a), leur viabilité est confirmée par les analyses de la fluorescence microscopique (c en haut) qui montrent que les cellules U87 cultivées en présence d'EPEG-HMNC seul (sans BCNU) ont continué à se reproduire dans la période de culture (4 jours) confirmant que l'EPEG-HMNC n'était pas cytotoxique. Par contre, le BCNU seul et les SPMNM présentent une cytotoxicité qui dépend de leurs concentrations, la concentration requise pour 50 % d'inhibition de la croissance cellulaire (IC_{50}) des SPMNM sans le champ magnétique était de $14,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ et de $9,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ quand le champ magnétique était présent, et celle du BCNU (seul) était de $19,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ (b). Leur cytotoxicité est aussi confirmée par les résultats de la fluorescence microscopique, quand les cellules U87 ont été incubées avec les SPMNM sur le plat et une partie du plat a été soumis à un champ magnétique externe de 800G, la majorité des cellules qui se trouvent dans la région exposée par le champ a été détruite (c en bas à droite).

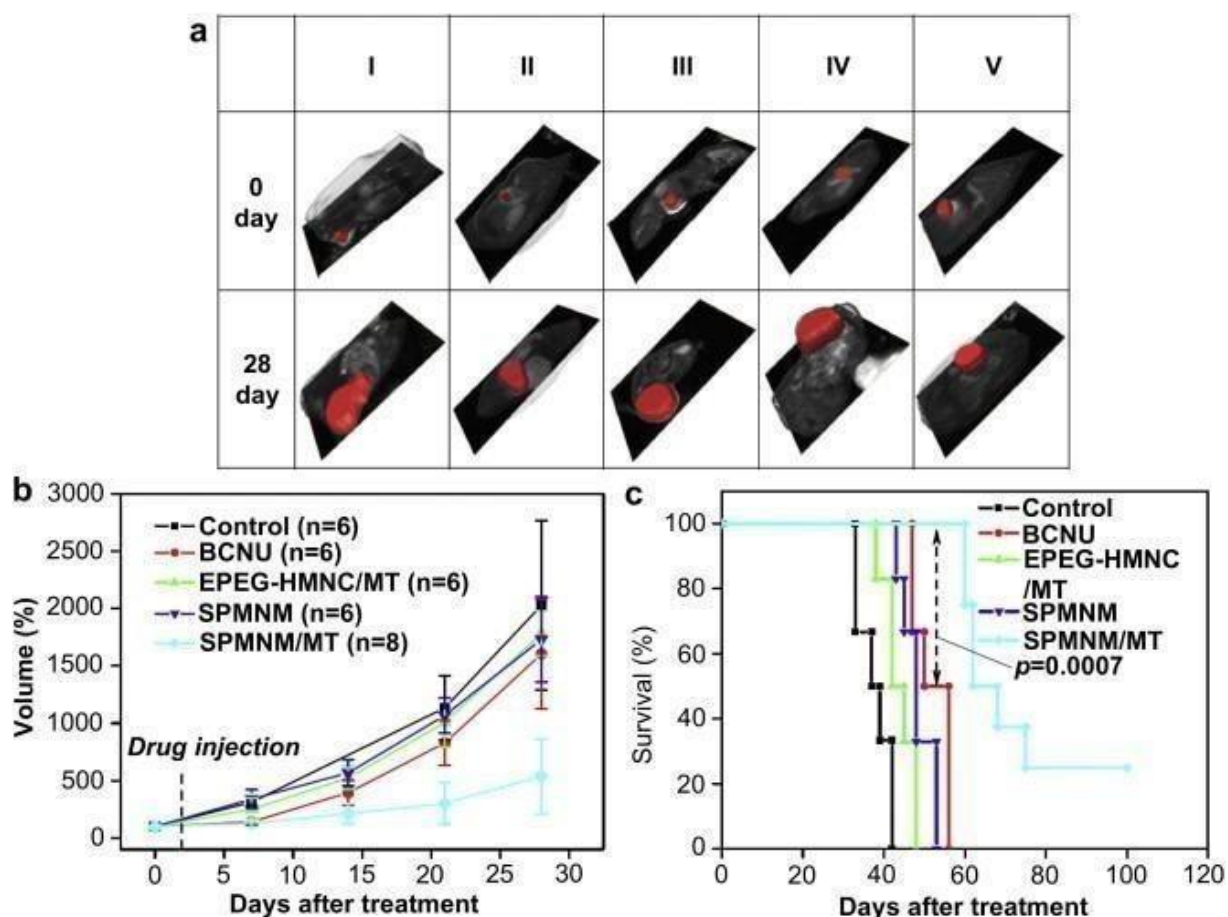


Figure I-5: (a) Images par résonance magnétique et reconstructions 3-D correspondantes de cerveaux de rats avec des tumeurs induites par injection intracrânienne de cellules U87. Les animaux ont été traités par voie intraveineuse avec : I, témoin ; II, libre-BCNU ; III, EPEG-HMNC avec MT ; IV, SPMNM seul ; V : SPMNM avec MT. Les images ont été obtenues le jour du traitement (Jour 0) et 4 semaines plus tard (Jour 28). (b) Analyse quantitative des effets des différents traitements sur la taille de la tumeur. (c) Le pourcentage de survie des expérimentations animales³⁸.

Les analyses *in-vivo*³⁸ ont été réalisées sur cinq groupes de souris (**Figure I-6**), dans le premier groupe, des souris témoins ont reçu une injection de cellules U87 mais avec aucun traitement. Le deuxième groupe a reçu une dose unique de BCNU libre (13,5 mg/kg) via la veine jugulaire externe trois semaines après avoir été injecté avec les cellules tumorales. Pour les troisième et cinquième groupes, un aimant permanent de type « néodyme-fer-bore » avec une densité de flux magnétique maximale de 0,4-T a été fixé solidement sur le crâne des animaux. 15 mg/kg de HMNC greffé EPEG (EPEG-HMNC) et des SPMNM contenant 4,5 mg/kg de BCNU ont été injectés dans les animaux par la veine jugulaire externe. Le champ magnétique externe a été appliqué jusqu'à 24 h après l'injection. Le quatrième groupe a reçu une dose unique de 15 mg.kg⁻¹ de SPMNM contenant 4,5 mg.kg⁻¹ de BCNU administré par la

veine jugulaire externe sans ciblage magnétique (**Figure I-5. a**). Les résultats de ces expériences ont montré qu'environ 23,22% du BCNU injecté étaient concentrés dans la tumeur et le volume de cette dernière a augmenté de $537 \pm 324\%$ par contre, chez les souris témoins l'augmentation du volume était de $2027 \pm 737\%$ et de $1604 \pm 478\%$ chez les souris traitées par le BCNU seul (**Figure I-5. b**). Ces résultats montrent une inhibition efficace de la croissance de la tumeur avec des doses plus faibles du médicament susceptibles de réduire les effets secondaires de la chimiothérapie. De plus, le traitement avec SPMNM seul ou EPEG- HMNC/MT n'a pas inhibé efficacement la croissance de la tumeur. Bien que le traitement par le BCNU libre ou le SPMNM seul a augmenté la survie des animaux à 56 et 63 jours, respectivement, la survie a augmenté de façon significative (75 jours) chez les animaux recevant le SPMNM avec 24 h de traitement (**Figure I-5. c**). Ces résultats confirment l'efficacité des SPMNM associées avec le MT sur le traitement³⁸.

Les nanoparticules cœur/coquille pour la délivrance du médicament ont été aussi développées par Chen *et al.*³⁹. Ils ont synthétisé un nano-système thermosensible capable de charger un médicament anticancer « 5-Fluorouracil (5-FU) » et de le relarguer. Ces microsphères sont composées d'un cœur superparamagnétique constitué de nanocristaux de Fe_3O_4 , encapsulés dans des matrices de microsphères de carbone. Par la suite, ces microsphères ont été silanisées par le 3-(triméthoxysilyl) méthacrylate de propyle (MPS) puis polymérisées par le monomère N-iso-propylacrylamide (PNIPAM) (**Figure I-6**). Le polymère thermosensible (PNIPAM) est un polymère « intelligent » qui permet l'encapsulation du 5-FU et son relargage en changeant son comportement colloïdal lors d'une augmentation de température sous l'effet d'un champ magnétique externe.

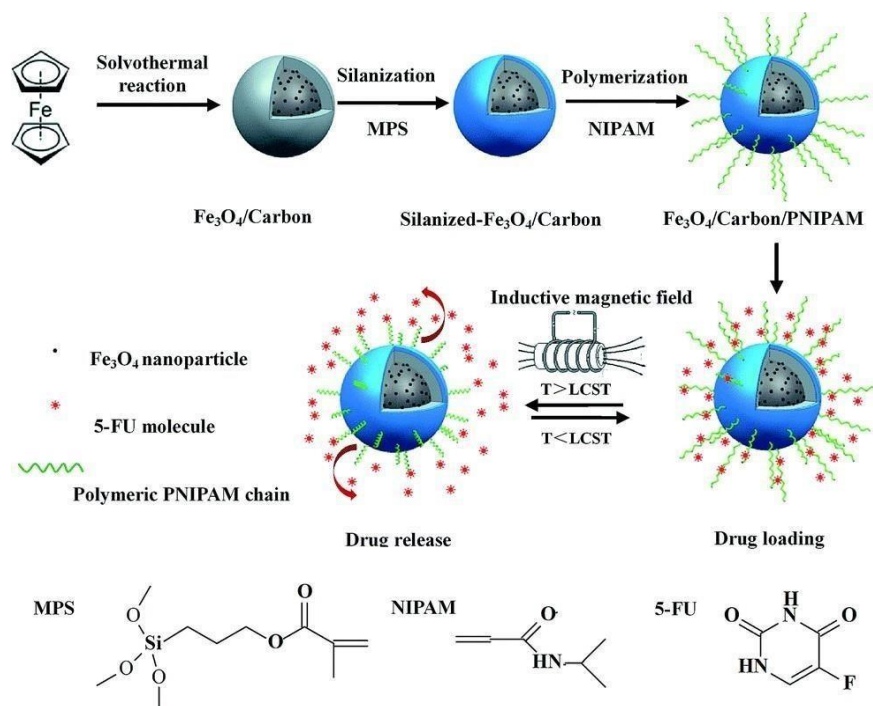


Figure I-6 : Illustration schématique de la préparation des microsphères $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{carbone}/\text{PNIPAM}$ et de la libération du médicament ³⁹.

La **Figure I-7** montre la température des microsphères en fonction du temps après avoir été exposées à un champ magnétique externe (a), ainsi que la libération de 5-FU sous l'effet de la température en fonction du temps selon l'analyse UV-visible (b).

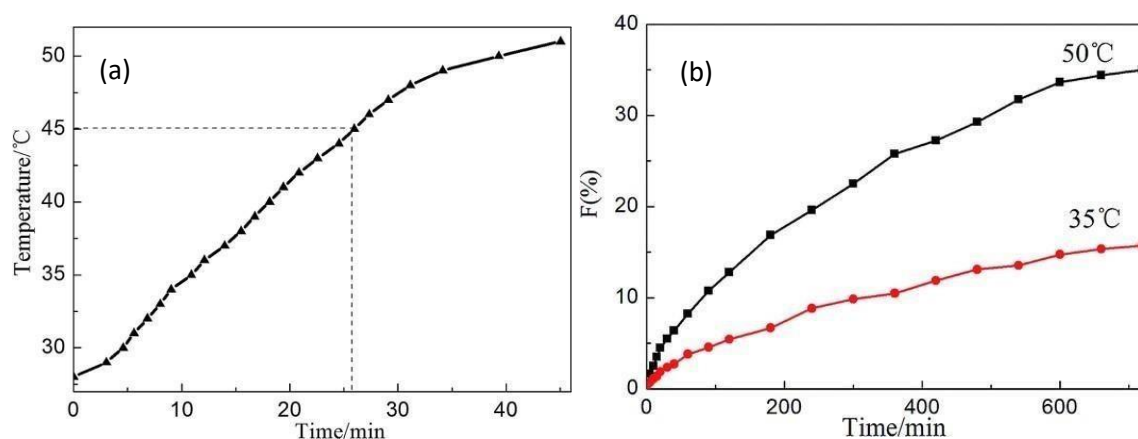


Figure I-7 : (a) Température des microsphères sous un champ magnétique en fonction du temps . (b) La dépendance temporelle de la libération du médicament par les microsphères à 35 C° et 50 C° ³⁹.

La DLE (efficacité de chargement du médicament ou drug loading efficiency en anglais) des microsphères a été examinée sous l'effet de la température en - dessous de 35°C et au-dessus de 50°C. Leurs LCST (Lower critical solution temperature) était de 45°C dans le

PBS. La quantité du médicament libérée était de 15,7% et de 35% à 35 et 50°C respectivement. La quantité libérée à 50°C est plus élevée que celle obtenue à 35°C. Cette différence est expliquée par le fait qu'au-delà de 45°C qui est la LCST, le polymère thermosensible greffé sur la surface des microsphères se contracte ce qui conduit à la libération du 5-FU comme montré dans la **Figure I-6**³⁹. Cette étude montre l'efficacité de ces microsphères en tant que médiateurs d'hyperthermie et administrateurs de médicaments.

D'autres nanoparticules « intelligentes » ont été développées par Rana *et al.*⁴⁰ toujours pour la délivrance du médicament anti-cancéreux, mais celles-ci présentent une deuxième fonction permettant le ciblage actif de ces nanoparticules vers le site tumoral pour un traitement plus spécifique. Les nanoparticules synthétisées lors de cette étude ont été préparées en trois étapes: La première consiste à couvrir les nanoparticules Fe_3O_4 par l'acide undécénoïque (UMNPs), ensuite, des molécules de cystéine bioactives ont été introduites sur la surface des UMNPs (BMNPs) via une réaction de clic-thiol-ène, puis l'acide folique a été conjugué à ces BMNPs via une réaction de couplage (**Figure I-8**).

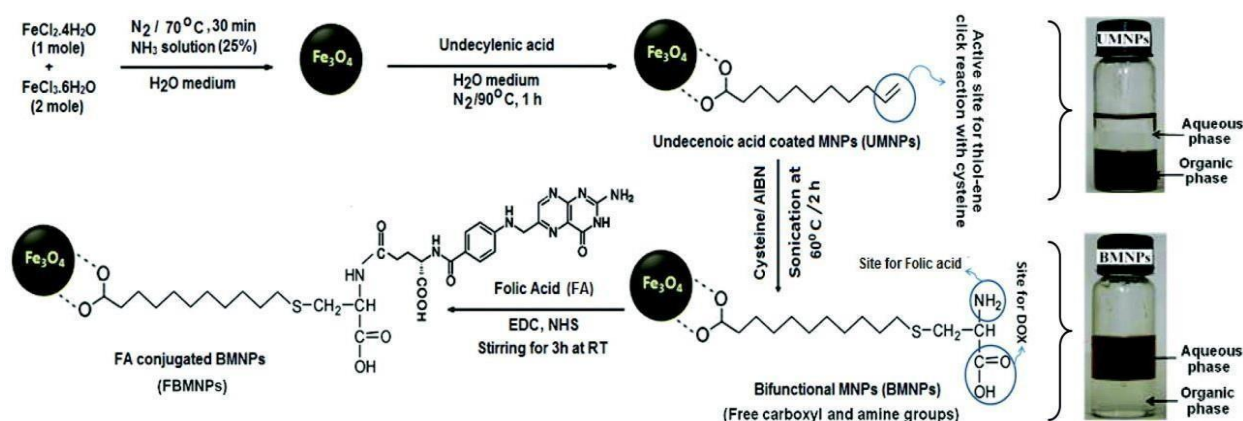


Figure I-8: Représentation schématique de la synthèse des UMNPs, BMNPs et FBMNPs accompagnées des photographies des UMNPs et solution de BMNPs dans différents milieux (Phase organique : Chloroforme)⁴⁰.

La quantité de la Doxorubicine (DOX) qui a été chargée par les nanoparticules via une liaison électrostatique avec le groupe carboxyle libre de la cystéine a été déterminée par la diminution de l'intensité de fluorescence du liquide surnageant après avoir éliminé les FBMNPs

chargés de DOX. Cette quantité encapsulée était d'environ 65% et représente un rapport massique DOX / particules de 1/10. Le profil de libération de la DOX a été étudié en condition réservoir-puits (réservoir : pH = 4 ou 5, puits : pH = 7,3) à 37 °C (**Figure I-9**). Cette étude a montré l'efficacité de ces nano-objets en tant que transporteur de médicament après avoir été chargés par la DOX (DOX-FBMNPs).

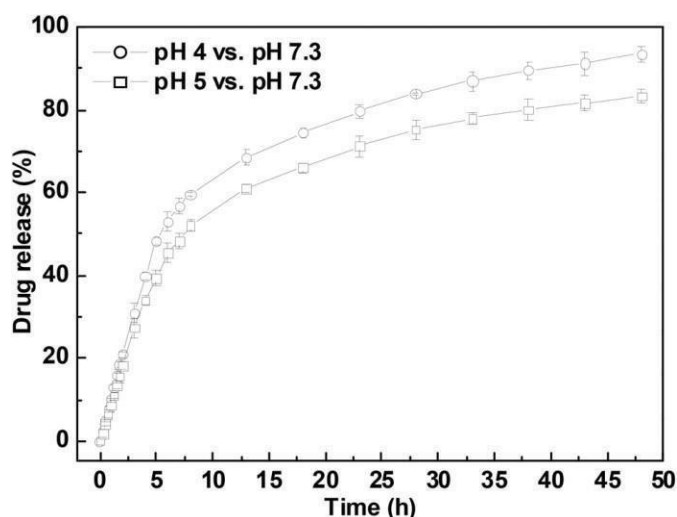


Figure I-9: Libération de médicament en fonction du pH des DOX-FBMNPs dans un environnement cellulaire mimant (réservoir : pH 4 ou 5 et puits : pH 7,3) à 37°C⁴⁰.

La DOX est libérée progressivement sur une période de temps sous l'effet du pH. A pH=4, plus de 93% de DOX est libérée par les NPs, tandis que 83% de la DOX est libérée à pH=5 après 48h. Cette étude montre la sensibilité du relargage de ces NPs au pH, ce qui est pertinent pour le traitement du cancer vu que le pH acide dans les tumeurs déclenchera la libération du médicament. La fluorescence de la DOX a permis l'évaluation de l'activité intracellulaire des NPs chargées en DOX avec les cellules KB, après avoir les incubées ensemble sous des conditions de culture avec différentes concentrations de DOX.

La **Figure I-10** présente les images de microscopie à fluorescences des cellules KB après leur incubation avec les nanoparticules chargées en DOX (DOX-FBMNPs) et DAPI (pour marquer les noyaux des cellules).

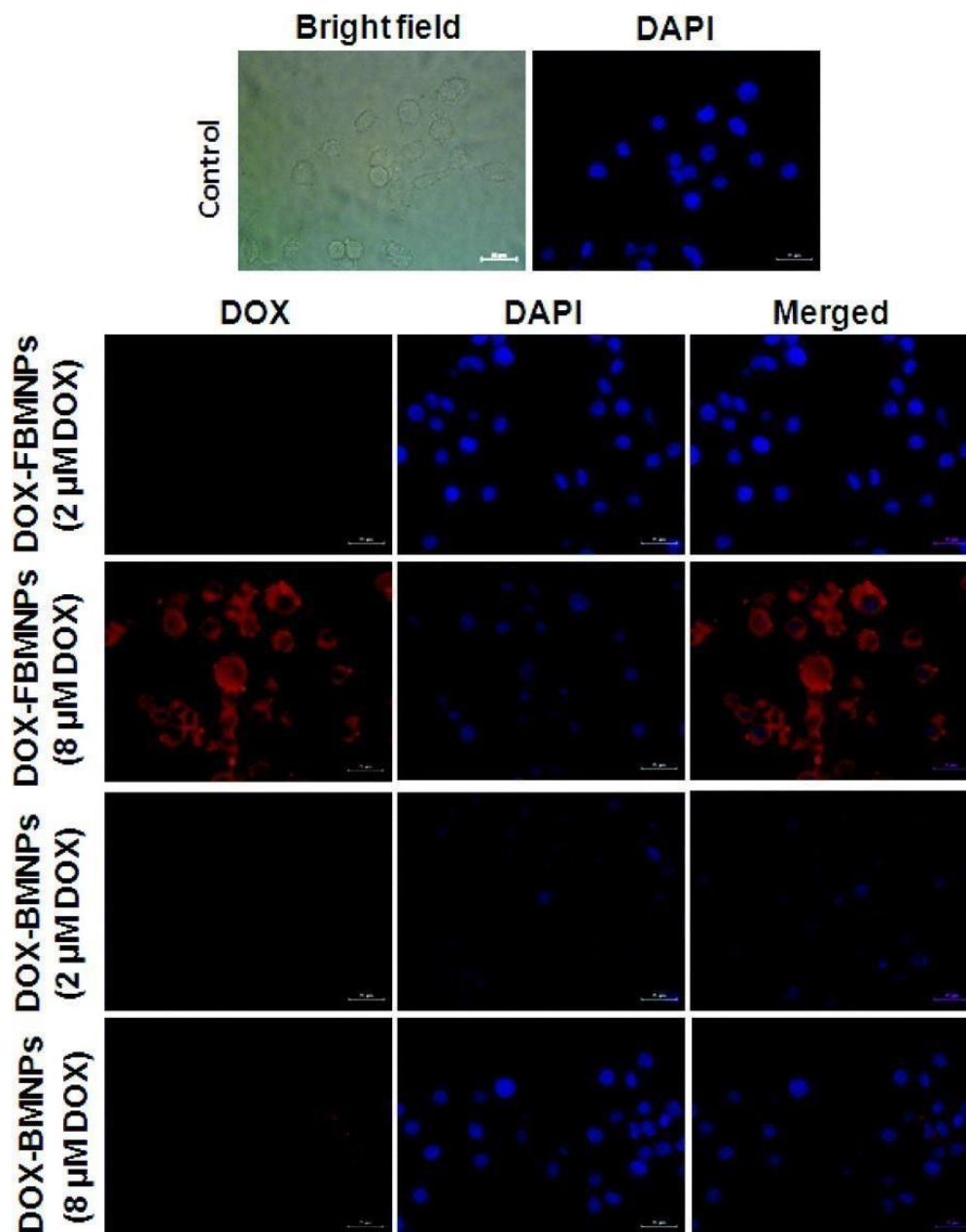


Figure I-10: Images de microscopie à fluorescence des cellules KB après incubation avec DOX-FBMNPs et DAPI dans des conditions de culture (barre d'échelle : 25 m, filtre rouge pour DOX et filtre bleu pour DAPI)⁴⁰.

Les images de fluorescence colorées en rouge sont caractéristiques de la présence de la DOX démontrant l'internalisation des nanoparticules chargées en DOX dans les cellules KB. Tandis que les images colorées en bleu montrent l'émission des noyaux marqués avec le DAPI, et les images fusionnées de la DOX et le DAPI indiquent la localisation des DOX-FBMNPs dans le cytoplasme.

Dans le but de confirmer l'administration de la DOX d'une manière spécifique par l'acide folique et ces récepteurs, une étude comparative a été réalisée avec des BMNP chargées en DOX (l'efficacité du chargement était de 80%) sans acide folique et les FBMNPs sur l'absorption cellulaire dans les mêmes conditions et mêmes concentrations de DOX, et les résultats finaux de cette étude montrent que la fluorescence de la DOX est supérieure dans les cellules KB traitées par DOX-FBMNPs par rapport à celles traitées par DOX-BMNP. Cela confirme que la modification de surface des particules par l'acide folique facilite leur internalisation dans les cellules cancéreuses qui surexpriment les récepteurs du folate ⁴⁰.

Le **Tableau I-1** illustre des exemples des NPs de type coeur/coquille étudiées dans la littérature pour la libération des principes actifs anti-cancéreux ainsi que leurs propriétés en termes d'efficacité de la charge et de libération du principe actif.

Tableau I-1 : Efficacité du chargement du principe actif anti -cancéreux des NPs cœur/coquille à base de polymères. (DLC: taux de charge du médicament. DLE : efficacité de chargement du médicament. DEGMA : di (éthylène glycol) methyl éther methacrylate. OEGMA : oligo (éthylène glycol) methyl éther methacrylate. TMSPMA : 3-(triméthoxysilyl)propyl methacrylate. VBA : -vinyl-benzaldehyde. MEO₂MA : 2-(2-méthoxy) éthyle méthacrylate. PNIPAAm : poly(N-isopropylacrylamide)^{10,28,41-44}

NPs	Polymère	Propriétés	Principe actif	DLC (%)	DLE (%)	Réfs
Fe ₃ O ₄	Chitosan	pH	DOX	/	96	28
Fe ₃ O ₄	P (DEGMA-co-OEGMA-b-[TMSPMA-co-VBA])	pH- température	DOX	7,6	82,3	41
Fe ₃₋₈ O ₄	P (MEO ₂ MA ₆₀ -OEGMA ₄₀)	Température	DOX	6,6	56,1	42
SPIONS	Héparine - Poloxamer	-	DOX	-	66.9 ± 2.7%	43
MMSNPs	PNIPAAm	Température	DOX	19.6 ± 0.5	73.8 ± 0.9	44

L'efficacité de l'acide folique pour le ciblage des cellules cancéreuses a été démontrée aussi dans un autre travail publié par Zhang *et al.*⁴⁵. Dans ce travail, la molécule d'acide folique a été fonctionnalisée en bout de chaînes d'un copolymère à base de poly (éthylène imine) (PEI) et poly (éthylène glycol) (PEG) greffé sur la surface des nanoparticules d'oxyde de fer. La viabilité de ciblage de ces NPs a été étudiée *in- vivo* sur des cellules cancéreuses de l'ovaire (SKOV-3).

Après l'injection intraveineuse des NPs dans les souris porteuses de tumeurs ovariennes intrapéritonéales, un scanner par résonance magnétique (RM) a été réalisé (**Figure I-11 (a)**). Le signal de ces tumeurs a été quantifié à différentes durées (**Figure I-11 (b)**).

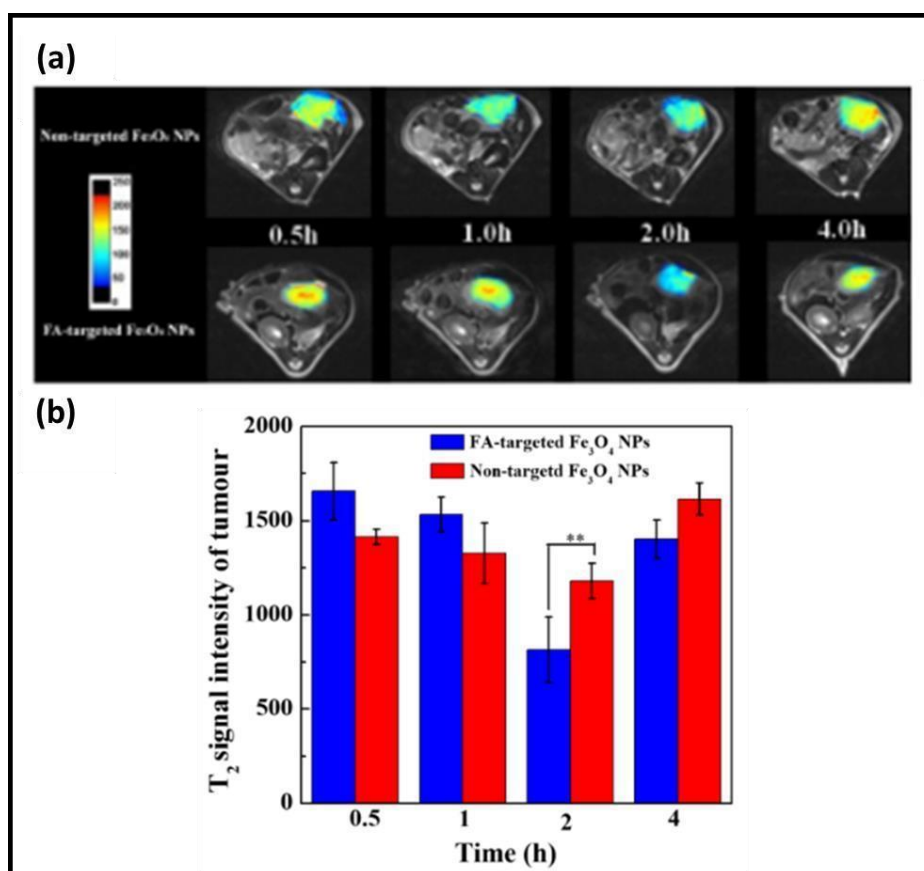


Figure I-11 : (a) Imagerie par résonance magnétique *in vivo* de la tumeur intrapéritonéale après l'injection intraveineuse de NPs Fe₃O₄@PEI modifiées et non modifiées par l'acide folique (AF) à différents moments. (b) Mesures de l'intensité des signaux T₂ de la tumeur intrapéritonéale chez des souris nude après injection intraveineuse des NPs Fe₃O₄@PEI modifiées par AF et des Fe₃O₄@PEI non modifiées (0,6mg Fe) à différentes durées⁴⁵.

Le signal RM de la tumeur chez les souris injectées avec les deux particules a progressivement diminué avec le temps après l'injection (a). D'après les images RM, l'intensité du contraste était plus élevée 2h après l'injection. Après 2h, le signal T₂ s'est rétabli grâce à la

poursuite du métabolisme. Pour l'analyse quantitative du signal (b), l'intensité du signal était plus faible 2h après l'injection des NPs modifiées et non modifiées par l'AF. Les NPs modifiées par l'AF et les NPs non modifiées par l'AF ont présenté des signaux T2 de 1666 ± 152 , 1534 ± 92 , 749 ± 56 , 1402 ± 102 , 1414 ± 42 , 1328 ± 162 , 1181 ± 93 et 1615 ± 84 à 0, 5, 1, 2 et 4h respectivement. L'intensité du signal chez les souris traitées par les NPs modifiées par l'AF est plus faible que celui des NPs non modifiées par l'AF 2h après l'injection. Ce résultat confirme que les NPs utilisées ont un grand potentiel pour être utilisées comme des agents de contraste pour l'imagerie RM ciblée afin de diagnostiquer les tumeurs ovariennes⁴⁵.

Le **Tableau I-2** regroupe des exemples des NPs de type coeur/coquille étudiées dans la littérature pour le ciblage des cellules cancéreuses.

Tableau I-2 NPs coeur/coquille étudiées pour le ciblage des cellules cancéreuses^{10,46-49}.

NPs	Polymère	Ligand	Cancer	Cellules ciblées	Réfs
Fe _{3-δ} O ₄	P(MEO ₂ MA ₆₀ -OEGMA ₄₀)	Acid folique	Ovaire	SKOV-3	10
Fe _{3-δ} O ₄	Alginate	d-galactosamine	Foie	HepG2	46
NPs	poly(lactide-co-glycolide)-g-polyéthylénimine	5-boronopicolinic acid	Sein	4T1 MCF-7	47
MNP@SiO ₂	(2-[methoxy(polyethyleneoxy)propyl]trimethoxysilane	Maleimide	Sein	MCF-7	48
Dye@MSNs	polyéthylène glycol	MAB	Sein	BT-474 MCF-7	49

Dans les étapes suivantes de notre étude, nous nous sommes intéressés aux nanoparticules d'oxydes de fer compte tenu des avantages qu'elles présentent comparativement aux autres types, notamment :

- La facilité de synthèse⁵¹,
- le faible cout⁵²,
- la biocompatibilité⁵³,
- la biodégradabilité,
- les propriétés magnétiques⁵⁴.

I.6 Nanoparticules d'oxydes de fer :

I.6.1 Structure cristalline :

Les ferrites spinelles ont la formule chimique MFe_2O_4 , où M représente un métal : Fe, Co, Mn, Zn, Ni ... qui cristallisent dans une structure spinelle AB_2O_4 . Dans le cube à faces centrées (CFC) d'anions d'oxygènes O^{2-} où les sites tétraédriques (A) sont occupés par les cations métalliques M^{2+} et les sites octaédriques (B) par les cations Fe^{3+} (**Figure I-12**). Seulement un huitième des sites tétraédriques est occupé ce qui fait 1 site pour 4 O^{2-} par maille, et la moitié des sites octaédriques donc 2 sites pour 4 O^{2-} par maille^{55,56}.

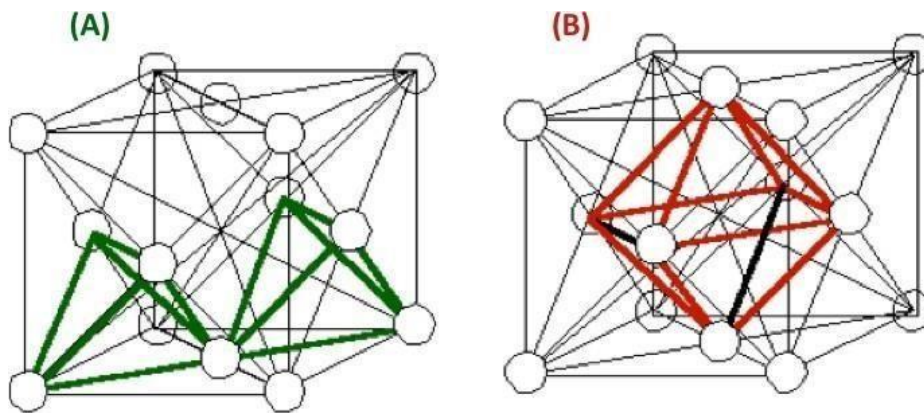


Figure I-12 : Sites tétraédriques (A) et octaédriques (B) dans un cube à faces centrées⁵⁵.

I.6.2 Propriétés magnétiques :

Les nanoparticules d'oxyde de fer possèdent des propriétés magnétiques qui dépendent de leurs tailles. Lorsque leur diamètre est inférieur à l'épaisseur nécessaire à la formation d'une paroi de Bloch, les particules sont dites monodomaines²⁸ et si leur diamètre est supérieur à la formation de la paroi, elles sont dites multi domaines.

Les particules monodomaines sont caractérisées par la relaxation superparamagnétique où l'aimantation de la particule est nulle en l'absence du champ magnétique et uniaxiale fluctuent entre deux directions de facile aimantation : alignés parallèlement (spin haut) ou antiparallèlement (spin bas) (**Figure I-13**). Cet état du superparamagnétisme est caractérisé par deux paramètres :

- Temps de relaxation : qui est l'intervalle de temps nécessaire pour que l'aimantation bascule d'une direction facile à une autre,
- Température de blocage T_B : qui est la température en dessous de laquelle la direction de l'aimantation est bloquée dans l'une des directions de facile aimantation⁵⁷.

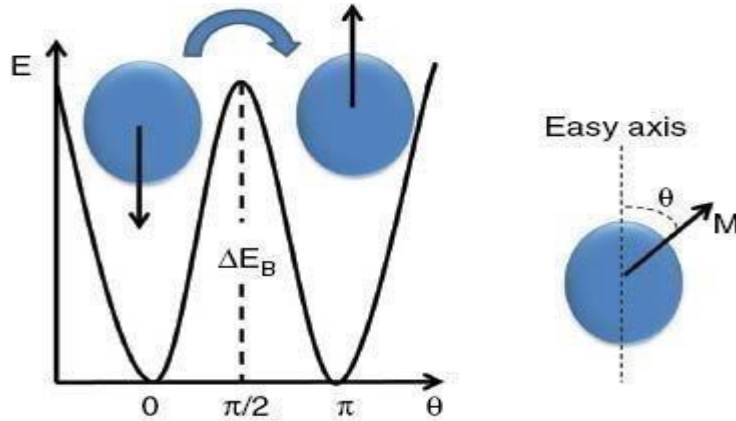


Figure I-13 : Représentation graphique de l'énergie magnétique (E_B) en fonction de l'angle entre le moment magnétique et l'axe facile d'une particule monodomaines avec une anisotropie uniaxiale pure⁵⁸.

Pour les particules monodomaines avec une anisotropie uniaxiale, l'énergie d'anisotropie magnétique nécessaire pour basculer les moments magnétiques d'un état à un autre est définie par l'équation suivante (**Equation I-1**) :

$$E_B (\theta) = KV \sin^2 \theta \quad (\text{I-1})$$

D'où :

K : La constante d'anisotropie uniaxiale effective ;

V : Le volume de la particule ;

θ : l'angle entre l'axe du facile aimantation et les moments magnétiques duspin⁵⁹.

Quand l'énergie thermique est inférieure à l'énergie d'activation, les moments magnétiques sont bloqués et orientés vers deux directions de plus basse énergie. Au-delà d'une certaine valeur de température appelée « Température de blocage T_B », l'énergie thermique devient suffisante pour contre balancer les moments magnétiques du spin⁶⁰.

Les moments magnétiques des nanoparticules possèdent deux modes de rotation

(Figure I-14) :

- Une rotation externe appelée mouvement de Brown (a),
- Une rotation interne appelée mouvement de Néel (b).

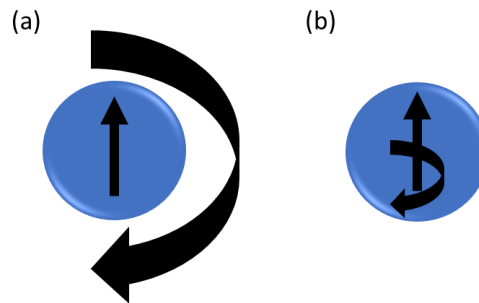


Figure I-14 : Illustration des deux modes de relaxation du moment magnétique :

(a) Relaxation de Brown, (b) relaxation de Néel⁶⁰.

Le temps de relaxation de Brown (τ_B) est donné par la relation (**Equation I-2**) :

$$\tau_B = \frac{3\eta v_h}{kT} \quad (\text{I-2})$$

D'où :

η : la viscosité du solvant ;

V_h : le volume hydrodynamique de la particules (cœur + revêtement) ;

K : la constante de Boltzmann ;

T : la température.

Et le temps de relaxation de Néel par la relation (**Equation I-3**) :

$$\tau_N = \tau_0 e^{\frac{E_a}{kT}} \quad (\text{I-3})$$

Avec :

τ_0 : un temps d'essai ;

E_a : énergie d'anisotropie magnétique ;

K : la constante de Boltzmann ;

T : la température ⁵⁵.

I.7 Hyperthermie magnétique :

L'hyperthermie magnétique ou l'hyperthermie magnéto - induite est la conversion d'une énergie électromagnétique en énergie thermique par des nanoparticules magnétiques excitées par un champ magnétique alternatif externe à une fréquence importante ⁶¹. L'aire du cycle d'hystérèse présenté par les nanoparticules magnétiques correspond à l'énergie thermique émise par le matériau. Cette énergie peut être calculée par le taux d'absorption spécifique « SAR » (Specific absorption rate)⁵⁵ (**Equation I-4**).

$$SAR = \frac{Af}{\rho} = C \frac{\Delta T}{\Delta t} \quad (\mathbf{I-4})$$

D'où :

A : l'aire du cycle d'hystérèse (J/g) ;

f : la fréquence du champ magnétique alternatif (KHz) ;

ρ : la masse volumique du ferrite (Kg/L).

C : La chaleur spécifique du matériau (J/Kg)⁶².

Dans un régime superparamagnétique, le cycle d'hystérèse est fermé donc l'aire du cycle est nulle ce qui explique que l'énergie thermique émise par les nanoparticules l'est aussi. Dans ce cas pour que les nanoparticules passent à un régime ferromagnétique pour pouvoir chauffer il faut appliquer un champ magnétique d'une fréquence suffisante ⁶⁰. D'autres facteurs principaux pour l'amélioration de l'énergie thermique émise sont : l'anisotropie, la forme, la température et l'amplitude.

La génération de la chaleur par les nanoparticules est possible selon de principaux mécanismes :

- a- Les courants de Foucault : ce sont les courants créés dans tous les matériaux conducteurs électriques soumis à un champ magnétique alternatif ;
- b- La perte par hystérésis : ce phénomène désigne les matériaux qui présentent un cycle d'hystérèse ouvert « les ferromagnétiques ». Ils sont proportionnels à la surface du cycle et elles se traduisent par un dégagement de chaleur et l'augmentation de la température du matériau magnétique ⁶⁰ ;

c- Les pertes par les relaxations de types Brownien et de Néel : En appliquant un champ magnétique alternatif aux nanoparticules, l'énergie de ce champ conduit à la rotation des moments magnétiques et les aligne vers la direction du champ magnétique en surmontant l'énergie thermique. Une fois le champ magnétique supprimé, les moments magnétiques ne se détendent pas immédiatement pour revenir à leur état initial. Ces relaxations sont nommées « relaxations de Néel ». Dans le cas des relaxations Brownienne, la barrière énergétique pour la réorientation de la particule est donnée par le frottement de rotation qui est dû à la rotation de la particule magnétique entière vers la direction du champ magnétique. Ces alignements et rotations conduisent à la génération de la chaleur ce qui augmente l'énergie thermique des nanoparticules⁶³.

Dans le domaine de la nanomédecine, l'hyperthermie magnétique est considérée comme une technique prometteuse pour la thérapie anti-cancéreuse. En effet, l'hyperthermie magnétique permet l'augmentation de la température des cellules cancéreuses au-delà de leurs températures habituelles, ce qui va conduire à la mort de ces dernières. Le principe d'utilisation des nanoparticules magnétiques est de cibler les cellules cancéreuses d'une manière spécifique tout en protégeant les cellules saines avoisinantes ⁶⁴. Actuellement, l'utilisation de l'hyperthermie magnétique pour le traitement du cancer est en cours d'amélioration et d'évaluation *in vitro* mais malgré les résultats encourageants, elle présente une limitation qui est le faible pouvoir chauffant des nanoparticules magnétiques pour un effet thérapeutique suffisant ⁵⁵. La majorité des travaux scientifiques dans ce domaine visent à améliorer les propriétés magnétiques des nanoparticules pour obtenir un pouvoir chauffant suffisant en jouant sur différents paramètres clés physico-chimiques tels que la composition chimique, la taille et l'anisotropie magnétique⁶⁵.

Par exemple dans le travail publié par Lee *et al.* ⁶⁶, le pouvoir chauffant des nanoparticules de MnFe_2O_4 , $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ et CoFe_2O_4 et d'autres de type cœur/coquille : $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{MnFe}_2\text{O}_4$, $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{Fe}_3\text{O}_4$, $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CoFe}_2\text{O}_4$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CoFe}_2\text{O}_4$ et $\text{Zn}_{0,4}\text{Co}_{0,6}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{Zn}_{0,4}\text{Mn}_{0,6}\text{Fe}_2\text{O}_4$ a été comparé. Les résultats de cette comparaison sont montrés dans la **Figure I-15**.

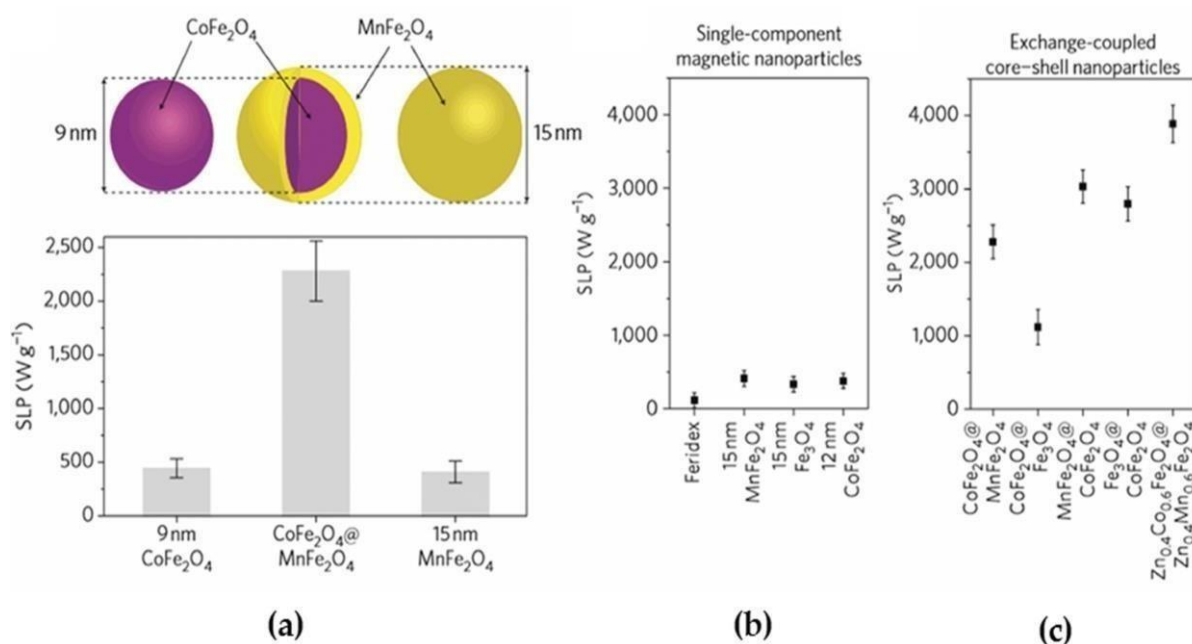


Figure I-15 : Nanoparticules $\text{CoFe}_2\text{O}_4@15\text{ nm MnFe}_2\text{O}_4$ et leurs valeurs de la SLP comparées à celles obtenues par les nanoparticules CoFe_2O_4 (cœur seul) et MnFe_2O_4 (coquille seule) (a). Valeurs de la SLP des nanoparticules MnFe_2O_4 , Fe_3O_4 , CoFe_2O_4 (b) et les cœur@coquille de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@15\text{ nm MnFe}_2\text{O}_4$, $\text{CoFe}_2\text{O}_4@15\text{ nm Fe}_3\text{O}_4$, $\text{MnFe}_2\text{O}_4@15\text{ nm CoFe}_2\text{O}_4$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@15\text{ nm CoFe}_2\text{O}_4$ et $\text{Zn}_{0.4}\text{Co}_{0.6}\text{Fe}_2\text{O}_4@15\text{ nm Zn}_{0.4}\text{Mn}_{0.6}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (c)⁶⁶.

Les valeurs de la SLP (specific loss power) des NPs CoFe_2O_4 (9 nm), $\text{CoFe}_2\text{O}_4@15\text{ nm MnFe}_2\text{O}_4$ et des MnFe_2O_4 (15 nm) sont présentées dans l'histogramme (a). Les NPs $\text{CoFe}_2\text{O}_4@15\text{ nm MnFe}_2\text{O}_4$ présentent des valeurs de SLP les plus élevées comparant aux NPs cœurs qui sont à base de CoFe_2O_4 et MnFe_2O_4 . Les valeurs de la SLP des MnFe_2O_4 sont aussi comparées avec des cœurs de Fe_3O_4 (15 nm) et des CoFe_2O_4 plus grandes de 12 nm dans le but d'étudier l'effet de la taille sur les propriétés magnétiques des NPs (b). Dans cette étude les NPs à base de MnFe_2O_4 donnent une valeur SLP supérieure comparant aux autres cœurs. Cela montre l'effet de la taille des NPs sur l'amélioration des propriétés magnétiques et hyperthermiques des NPs. En effet plus la taille des NPs est plus grande, plus les NPs présentent un pouvoir chauffant plus grand. Dans la partie (c). Les auteurs comparent les valeurs de la SLP de différentes NPs type cœur/ coquille avec différentes compositions chimiques : $\text{CoFe}_2\text{O}_4@15\text{ nm MnFe}_2\text{O}_4$, $\text{CoFe}_2\text{O}_4@15\text{ nm Fe}_3\text{O}_4$, $\text{MnFe}_2\text{O}_4@15\text{ nm CoFe}_2\text{O}_4$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@15\text{ nm CoFe}_2\text{O}_4$ et $\text{Zn}_{0.4}\text{Co}_{0.6}\text{Fe}_2\text{O}_4@15\text{ nm Zn}_{0.4}\text{Mn}_{0.6}\text{Fe}_2\text{O}_4$. Ces dernières donnent les valeurs les plus intéressantes. Cette étude comparative démontre l'effet de la coquille et de la composition chimique des NPs sur le pouvoir chauffant des NPs. Les nanoparticules type cœur/coquille présentent un pouvoir

chauffant deux à quatre fois plus élevé que les particules simples, ce qui les rend plus intéressantes pour des applications en hyperthermie⁶⁶.

Dans une autre étude menée par Noh *et al.*⁶⁷, Les propriétés magnétiques des nanoparticules de type cœur/coquille composées de $Zn_{0,4}Fe_{2,6}O_4@CoFe_2O_4$ (**a**) de deux morphologies différentes (cubique et sphérique) ont été comparées. Les résultats de cette étude sont présentés dans la **Figure I-16**.

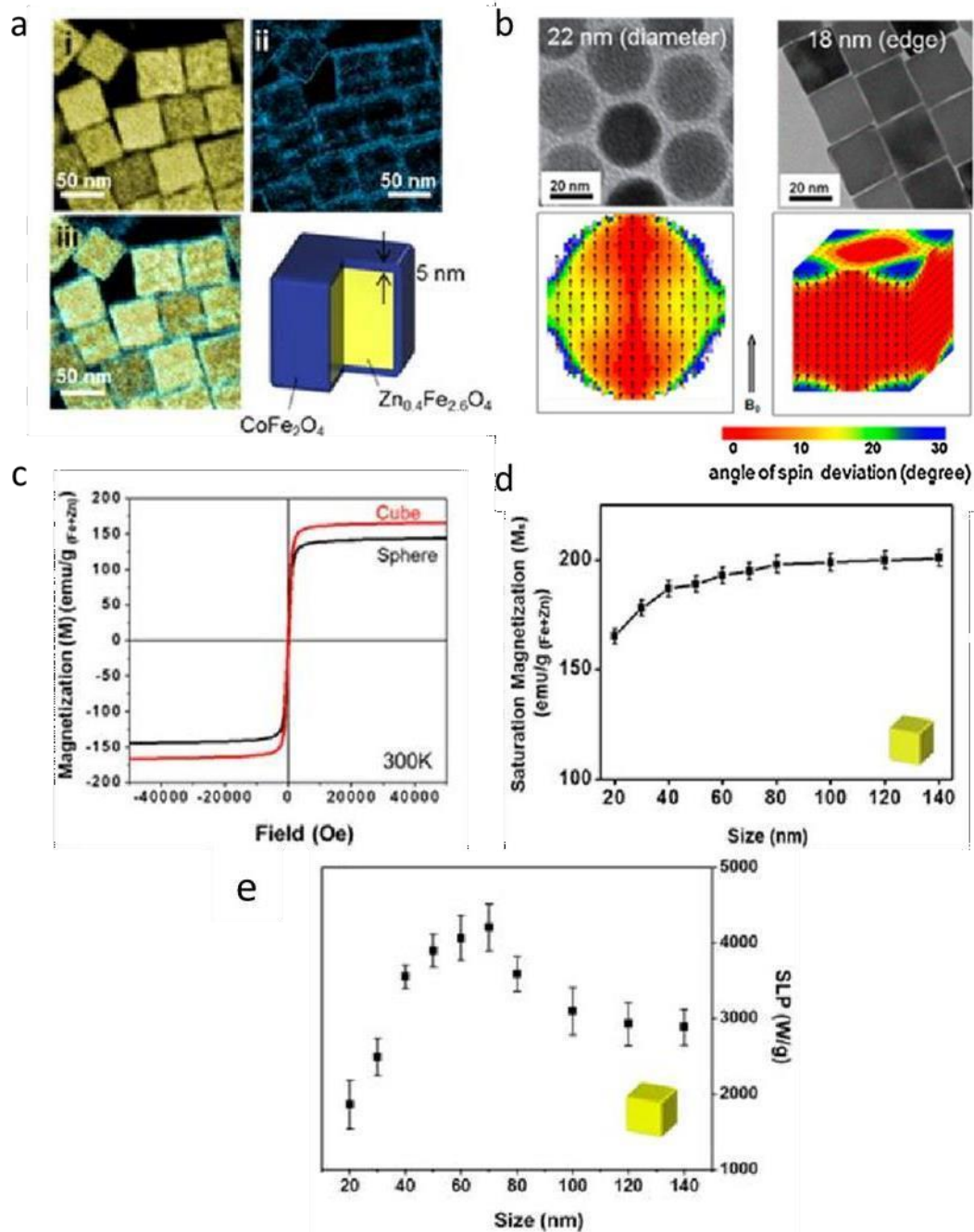


Figure I-16 : Images cartographiées par spectroscopie de perte d'énergie électronique (EELS) de la particules $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@CoFe_2O_4$. (i) région Jaune représente le Fe. (ii) région bleu représente le Co et (iii) l'image fusionnée (a). Etats de spin magnétique simulés de la particule sphérique et cubique (b). Valeurs de la magnétisation (emu/g) des particules cubiques et sphériques (c). Valeurs de la saturation magnétique (emu/g) des particules cubiques en fonction de différentes tailles (nm) (d). Valeurs de la SLP (W/g) en fonction de différentes tailles (nm) (e) ⁶⁷.

Lors de cette étude, Noh *et al.* ont démontré l'intérêt des concepts d'anisotropie de surface, la taille et la forme des nanoparticules dans l'amélioration des propriétés magnétiques de ces dernières. Ils montrent que les particules d'une morphologie cubique présentent des valeurs de magnétisations plus intéressantes que celles obtenues avec la morphologie sphérique (**Figure I-16 - c**). Cette différence de magnétisation est due à l'anisotropie de surface qui est plus petite dans le cube par rapport à la sphère (**Figure I-16 -b**). Le deuxième paramètre visé pour l'amélioration des propriétés magnétiques de ces cubes est bien leur taille. Pour cela, l'équipe de Noh a mesuré la saturation magnétique des cubes de différentes tailles (18, 40, 60, 80 et 120 nm) (**Figure I-16 -d**). La saturation magnétique augmente proportionnellement avec la taille des cubes jusqu'à 200emu/g pour une taille de 140 nm. Le cube de 70 nm présente plus de 95% de la valeur globale de la saturation ainsi que la valeur maximale de la SLP qui est d'environ 4206W/g (**Figure I-16 -e**). Une telle capacité de chauffage est hautement efficace pour des applications en hyperthermie ⁶⁷.

Dans le **Tableau I-3**, nous citons des exemples des NPs magnétiques de type coeur/coquille utilisées pour l'hyperthermie magnétique.

Tableau I-3 : NPs magnétiques type coeur/coquille pour l'hyperthermie magnétique^{55,68-71}.

NPs Cœur/coquille	Forme	Taille (nm)	Synthèse chimique	Fréquence (KHz)	SLP (W/g)	Réfs
CoFe ₂ O ₄ @ MnFe ₂ O ₄	Sphérique	15	Décomposition thermique	500	1710	55
CoFe ₂ O ₄ @ Fe ₃ O ₄	Sphérique	12,8	Solvothermale	183	59	68
(Zn,Co)Fe ₂ O ₄ @MnFe ₂ O ₄	Sphérique	11	Méthode de reflux	520	1955	69
Fe ₃ O ₄ Dopé au Zn	Cubique	40	Décomposition thermique	293	1675	70
Fe ₃ O ₄ @ (Zn,Co)Fe ₂ O ₄	Sphérique	13	Co-précipitation	97	380	71

I.8 Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer :

De nombreuses méthodes de synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer sont décrites dans la littérature telles que : la Co-précipitation ⁷³, polyol ⁷⁴, la synthèse hydrothermale ⁷⁵, la microémulsion ⁷⁶, le procédé sol-gel ⁷⁷ et la décomposition thermique⁷⁸.

Dans les lignes suivantes, nous décrivons le principe de chaque méthode.

I.8.1 La Co-précipitation :

C'est une méthode simple et facile pour synthétiser des nanoparticules magnétiques à partir de solutions aqueuses salines en présence d'une base sous une atmosphère inerte et à température ambiante ou élevée⁷⁹. Elle est généralement utilisée pour la préparation des oxydes métalliques et les ferrites. La taille, la forme ainsi que la composition des nanoparticules dépendent du type de sels utilisés : chlorures, sulfates ou nitrates⁸⁰.

I.8.2 Polyol :

C'est une méthode simple et respectueuse de l'environnement qui ne nécessite pas la présence d'un gaz inerte. Elle est considérée comme étant une méthode pratique et polyvalente pour la préparation des nanoparticules d'argent (Ag) et des oxydes métalliques de 10 à 100 nm. Le polyol dans la réaction joue le rôle d'un solvant, d'un stabilisateur et d'un agent réducteur limitant la croissance des particules en les agglomérant⁸¹. La synthèse des nanoparticules par cette méthode se fait en deux étapes : nucléation et croissance. Les polyols utilisés sont caractérisés par un point d'ébullition très élevé tels que : l'éthylène glycol, le di éthylène glycol, le tétra éthylène glycol ou le glycérol⁸².

I.8.3 La synthèse hydrothermale :

Elle fait partie des méthodes les plus utilisées pour la synthèse des nanoparticules. C'est une approche basée sur la réaction en solution. La production des nanoparticules se fait dans une large gamme de températures, d'une température ambiante à des températures très élevées (de 100 à 10.000°C)⁸³. Le contrôle de la morphologie des nanoparticules peut être réalisé soit dans des conditions à basse pression ou à haute pression. Cela dépend de la pression de vapeur de la principale composition dans la réaction. Parmi les avantages de cette méthode est la

possibilité de produire des particules à haute pression avec une perte minimale et le pouvoir de contrôler la composition des nanoparticules⁸⁴.

I.8.4 La microémulsion :

La synthèse des nanoparticules via la méthode microémulsion se fait dans un mélange ternaire composé d'eau, d'un agent de surface et d'huile ou quaternaire à base d'eau, d'agent de surface, un co-surfactant et l'huile. Le choix du mélange dépend de la proportion des composants et de l'équilibre hydrophile-lyophile du tensioactif utilisé lors de la synthèse.

Différents tensioactifs peuvent être utilisés dans cette méthode :

- Des tensioactifs cationiques tel que le bromure de Cétyltriméthylammonium (CTAB),
- Des tensioactifs anioniques tels que le bis(2-éthylhexyl) sulfosuccinate (AOT), le sodium dodécylbenzènesulfonate (SDBS) et le lauryl-sulfate de sodium (SDS),
- Des tensioactifs non ioniques tel que Triton X-100⁸⁵.

Il existe trois différents types de microémulsion : cationique, anionique et non-ionique. Le choix du type dépend des exigences et des conditions de la réaction⁸⁶.

I.8.5 Sol-gel :

C'est une des approches utilisées pour la préparation des oxydes métalliques et des mélanges de métaux de haute qualité. C'est une méthode avec un faible coût et une grande pureté par rapport aux autres méthodes⁸⁷. Elle peut être réalisée avec une faible température et moins d'énergie, ce qui la rend plus économique. Parmi ses avantages, est l'excellent contrôle de la texture et les propriétés de surface des métaux. Elle se réalise en cinq étapes : l'hydrolyse, la polycondensation, le vieillissement, le séchage et la décomposition thermique⁸⁸.

I.8.6 La décomposition thermique :

C'est une méthode par laquelle des nanoparticules uniforme, monodispersées avec une taille étroite peuvent être obtenues⁸⁹. Elle est basée sur la décomposition de complexes à haute température jusqu'à 300°C⁹⁰ (ces complexes peuvent être des acétylacétonates)⁹¹. La décomposition de ces complexes est réalisée dans des solvants ayant une température d'ébullition élevée comme : l'éther benzylique (298°C)⁹², l'hexadécane (287,6°C)⁹³, le phényl éther (258°C)⁹⁴⁵⁵, en présence d'un surfactant : Oléylamine ou acide oléique qui se lie d'une manière sélective à des facettes cristallines spécifiques et règle la vitesse de croissance des facettes du cristal afin de déterminer la forme et la taille des particules⁸⁹.

L'inconvénient de cette méthode est l'obtention des particules avec une taille limite de 12 nm avec un faible rendement à la fin de la synthèse : une grande partie des précurseurs est réduite lors de l'étape de la nucléation et seule la petite partie qui reste sera disponible pour l'étape de la croissance ⁵⁵.

Afin, d'augmenter la taille des particules au-delà de 12 nm, il faut travailler sous atmosphère contrôlée car la diminution de l'oxygène dans le système ralentit l'étape de la nucléation et cette dernière ne sera pas complète lors du commencement de l'étape de la croissance ce qui va permettre d'avoir des particules de deux tailles différentes dans le système. En augmentant le temps de la synthèse, une troisième étape de type « mûrissement d'Ostwald » apparaîtra. Au cours de cette étape, les particules de petites tailles se recondensent sur les plus grandes (**Figure I-17**) ⁹⁵.

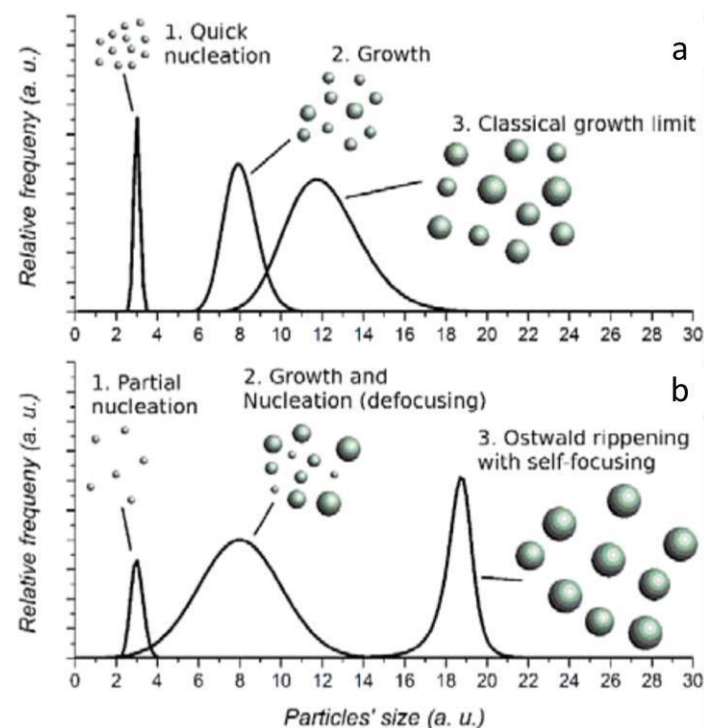


Figure I-17 : Etapes de synthèse par la décomposition thermique. Synthèse classique (a). Synthèse sous atmosphère contrôlée (b) ⁹⁵.

Pour la synthèse de nos nanoparticules, nous avons choisi la décomposition thermique pour pouvoir avoir des nanoparticules monodispersées avec une morphologie cubique.

I.9 Fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer :

Les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent être fonctionnalisées par différentes molécules telles que : les polymères, l'alginate, la chitosane ...etc (**Figure I-18**)⁹⁶ . Ces fonctionnalisations peuvent les rendre capables de lier des molécules d'intérêt pharmaceutique. Ces propriétés soutiennent des applications biomédicales pour les IONP, notamment dans les thérapies contre le cancer. Le choix de la molécule se fait en fonction de l'application visée . Dans le champ biomédical, les polymères « intelligents » capables de répondre aux conditions extérieurs telles que : le pH ⁹⁷, la lumière⁹⁸ ou la température⁹⁹ sont les plus décrits dans la littérature.

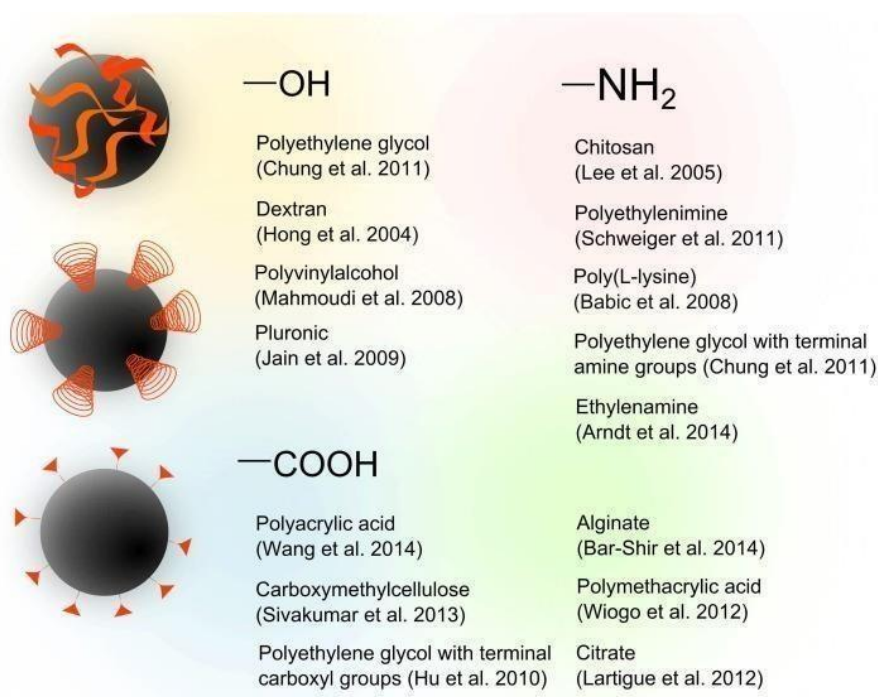


Figure I-18 : Polymères et molécules organiques utilisés pour la fonctionnalisation des nanoparticules⁹⁶.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux nanoparticules fonctionnalisées par des polymères thermosensibles pour l'internalisation et la délivrance du médicament.

I.9.1 Polymères thermosensibles :

Comme leur nom l'indique, ce sont des polymères sensibles à la température. Ils changent de comportement colloïdal à une certaine température, cette température est appelée la « LCST : Lower Critical Solution Temperature » dans le cas des polymères hydrophiles¹⁰⁰ et « UCST : Upper Critical Solution Temperature » dans le cas des polymères hydrophobes¹⁰¹.

- En dessous de la LCST, les chaînes du polymères sont hydrophiles donc dispersibles dans l'eau. Leur dispersion est favorisée par la formation de liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau¹⁰².
- Au-dessus de la LCST, les interactions polymère-polymère deviennent favorisées thermodynamiquement par rapport aux interactions polymère-eau²⁸ ce qui rend les chaînes du polymère hydrophobes et non- dispersibles dans l'eau. Contrairement à ceux qui présentent une UCST dont les chaînes sont hydrophobes (non-dispersibles) en dessous de leur UCST et hydrophiles (dispersibles) au-dessus¹⁰³ **Figure I-19** .

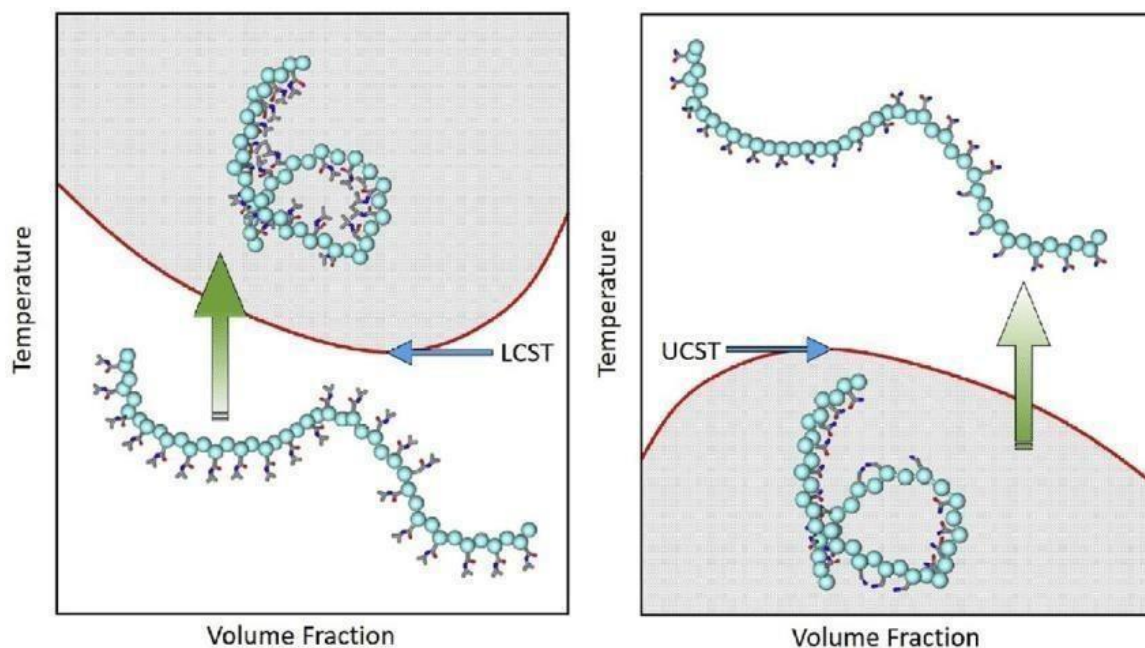


Figure I-19 : Illustration schématique du comportement des polymères thermosensibles sous l'effet de la température expliquant la « LCST » et la « UCST »¹⁰⁴.

Les polymères se dissolvent dans un solvant lorsque l'énergie de Gibbs du système diminue ce qui veut dire qu'elle est négative. L'énergie de Gibbs est calculée par l'équation suivante (**Equation I-5**) :

$$\Delta G_{mel} = \Delta H_{mel} - T\Delta S_{mel} \quad (\text{I-5})$$

Où:

ΔG_{mel} : la variation d'énergie libre du mélange ;

ΔH_{mel} : la variation d'enthalpie du mélange ;

T : la température ;

ΔS_{mel} : la variation d'entropie du mélange.

Quand l'énergie de Gibbs augmente, le polymère devient insoluble dans le solvant. Ce phénomène est expliqué par la rupture des liaisons hydrogènes entre les molécules d'eau et le polymère^{105,106}.

La transition du polymère de l'état hydrophile à l'état hydrophobe est déterminable par l'opacité de la solution dans laquelle il est dispersé, car une solution polymérique en dessous de la LCST est transparente et homogène par contre au-dessus de la LCST elle devient trouble¹⁰³ **Figure I-20**.

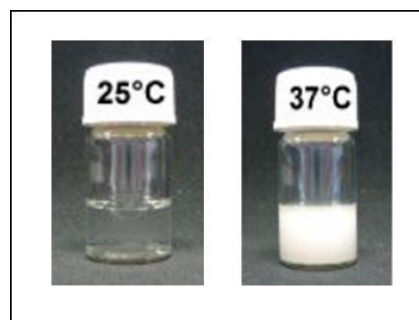


Figure I-20 : Solutions polymériques contenant des unités OEGMA (oligo (éthylène glycol) méthacrylate) en dessous de la LCST (25°C) et au-dessus de la LCST (37°C)^{28,107}.

La valeur de la LCST peut varier en fonction de la nature des groupes de substitution, la longueur de la chaîne, la masse molaire du polymère ainsi que la nature du solvant et sa composition (viscosité, concentration en sel...) ¹⁰³.

Dans le domaine biomédical, les polymères hydrophiles sont plus souvent étudiés en comparaison aux polymères hydrophobes qui sont rarement étudiés.

I.9.2. Les polymères thermosensibles les plus utilisés dans le domaine biomédical :

- **Poly((méth)acrylamide de N-alkyl):**

Ce sont les premiers polymères avec des propriétés de thermo sensibilité. Ils sont à base des polyacrylamides¹⁰⁸. Les plus connus sont les poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) qui sont composés d'un groupement polaire (amide) et de parties hydrophobes (groupements isopropyle) et une chaîne carbonée (**Figure I-21**). Sa LCST est de 32°C¹⁰⁹ ce qui lui a permis d'être souvent étudié¹¹⁰ vu qu'elle est très proche de la température physiologique du corps humain (37°C)¹¹¹ mais son utilisation reste limitée à cause de sa cytotoxicité¹¹².

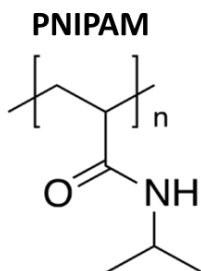


Figure I-21 : Structure chimique du Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM)⁹⁸.

- **Poly(*N*-vinylamides) :**

Comme le poly (*N*-vinylcaprolactame) (PVCL). Il contient des groupes hydrophiles carboxyliques et amides (**Figure I-22**). Le groupe amide est relié au chaîne principale carbone-carbone hydrophobe de sorte que son hydrolyse ne produira pas de composés amides qui sont néfastes pour les applications biomédicales⁷⁴. Il a été utilisé dans le domaine biomédical grâce à sa biocompatibilité et sa LCST qui est de 32°C mais il présente un inconvénient majeur résidant dans sa non-biodégradabilité⁷⁵.

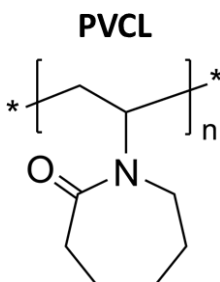


Figure I-22 : Structure chimique du Poly(*N*-vinylcaprolactame) (PVCL)^{98,112}.

- **Poly ((2-(2-méthoxy) éthyle méthacrylate et oligo (éthylène glycol) méthacrylate)) :**

Les macro monomères poly éthylène glycol (PEG) composés d'une fraction polymérisable à base de méthacrylate lié à un oligo éthylène sont apparus dans la littérature scientifique dans les années 80¹¹³. Ces macro monomères sont constitués de chaînes hydrophiles de poly éthylène glycol de différentes longueurs (les oxygènes des groupements glycol forment des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau)¹¹⁴ liés à une chaîne carbonée hydrophobe¹¹⁵ (**Figure I-23**).

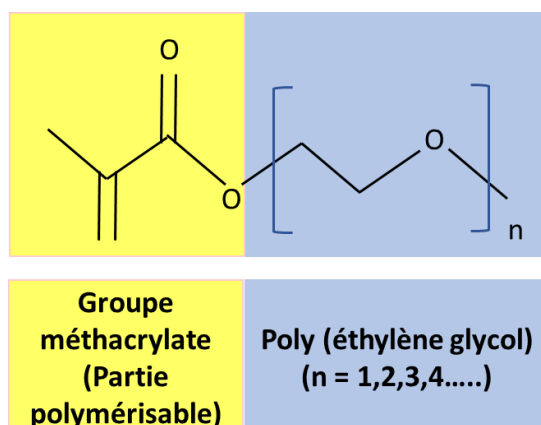


Figure I-23 : Macro monomères méthacrylates d'oligo (éthylène glycol). Les parties jaune et bleue représentent les parties hydrophobes et hydrophiles respectivement^{28,116}.

Le PEG présente l'avantage d'être non-toxique, non-antigénique, non-immunogène, biodégradable, soluble dans l'eau mais il présente une LCST très élevée (90°C)¹¹⁷, pour cela son utilisation pour des applications biomédicales est limitée. Néanmoins, l'ajout des méthacrylates d'oligo éthylène glycol (EO_nMa) par la copolymérisation conduit à baisser sa LCST¹⁰⁹.

Il existe plusieurs macro monomères EO_nMA dont la différence se présente par la longueur de la chaîne d'oligo (éthylène glycol). Cette longueur est définie par le degré de la polymérisation (n)¹¹⁶. L'hydrophilie de ces macro monomères change en fonction de leurs degrés de polymérisation (**Figure I-24**). Plus la chaîne est plus longue, plus le macro monomère est soluble dans l'eau et réciproquement.

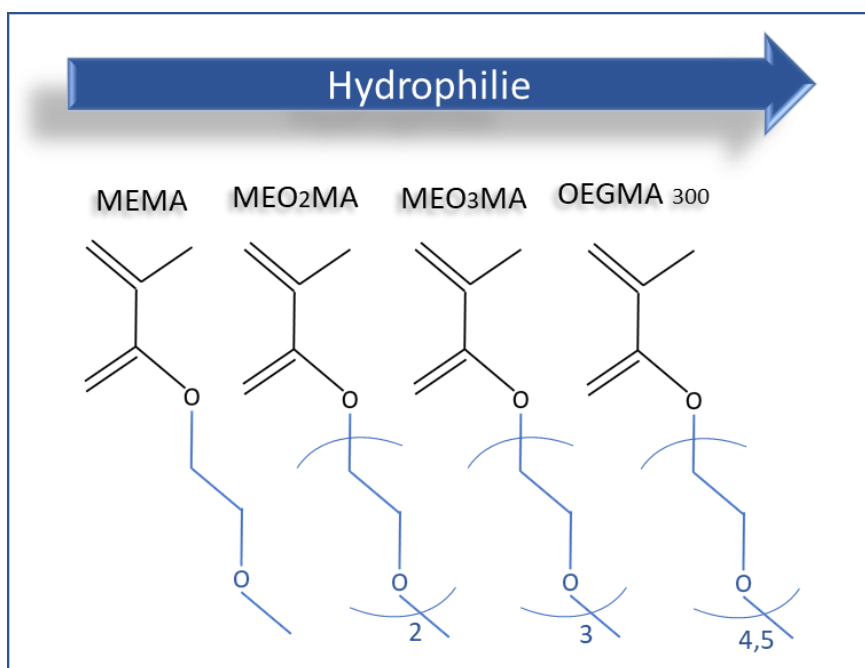


Figure I-24 : Structures moléculaires des macro monomères « méthacrylates d'oligo (éthylène glycol) ». Les parties hydrophiles sont représentées en bleu¹¹⁶.

La combinaison entre MEO₂MA (2-(2-méthoxy) éthyle méthacrylate) et OEGMA (oligo (éthylène glycol) méthacrylate) conduit à la formation d'un polymère thermosensible hydrosoluble qui possède une LCST modifiable au-dessus de la température physiologique (37°C). Cette température peut être modifiée en modulant les rapports molaire MEO₂MA/OEGMA^{118,119} : plus la chaîne latérale des unités oligo (éthylène glycol) du polymère est longue, plus la valeur de la LCST est élevée¹²⁰.

Comme mentionné précédemment, les polymères à base de segments de poly (éthylène glycol) sont des polymères biocompatibles qui sont utiles pour des applications biomédicales notamment la délivrance du médicament¹⁰. La biocompatibilité du P(MEO₂MA-OEGMA) a été démontrée par Alejo *et al*^{120,121}.

Alejo *et al.* ont étudié la cytotoxicité *in vitro* du P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀) sur quatre différentes lignées cellulaires : U251 MG glioblastoma, Fibroblastes dermiques humains, THP-1 (leucémie monocyttaire) et mMSCs (Cellules souches mésenchymateuses de souris) avec une densité de 5000, 6000, 70000 et 5000 cellules /puits, respectivement. Les cellules ont été mises en contact avec le P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀) dans une plaque de 96 puits pendant 24h.

Les résultats de cette étude ont été évalués à l'aide du dispositif « Blue Cell Viability » (Abenova). Ces résultats sont présentés dans la **Figure I-25**.

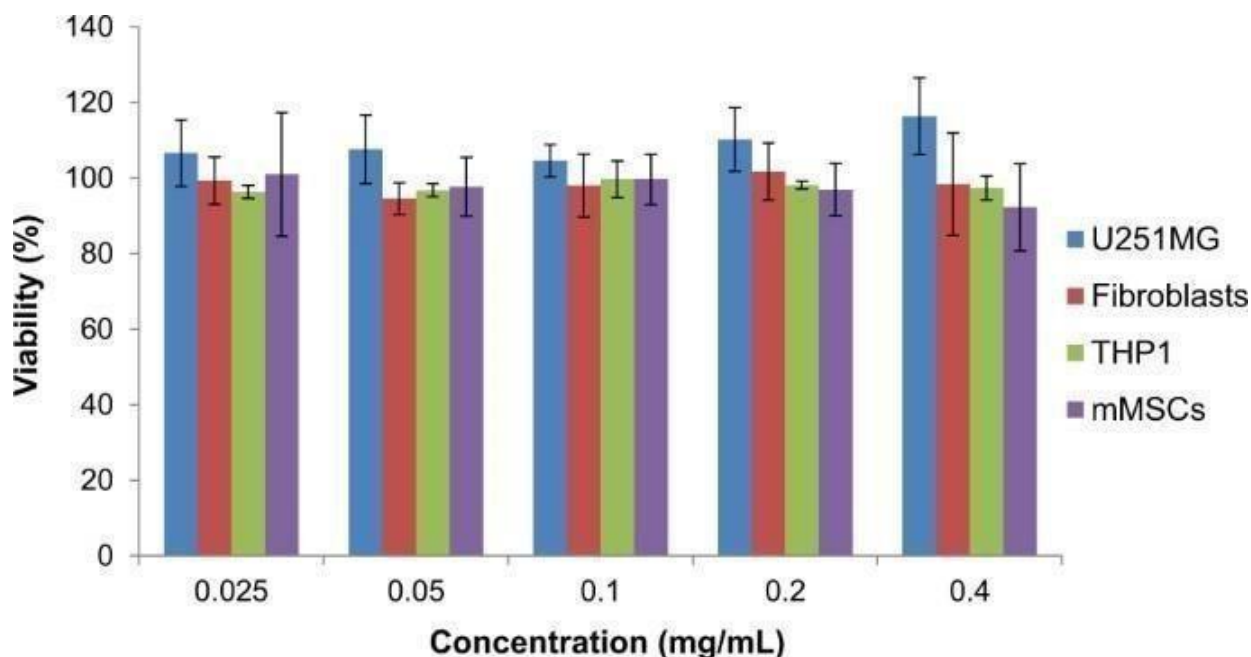


Figure I-25 : Viabilité cellulaire du P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀) après 24h sur quatre lignées cellulaires différentes. Les pourcentages sont affichés sous forme de moyenne \pm standard écarts (n=5)¹²¹.

Une augmentation de la concentration en P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀) n'a pas modifié la viabilité cellulaire après 24h. Le pourcentage de la viabilité est supérieur à 92% pour les quatre différentes lignées cellulaires testées, ce qui prouve une excellente biocompatibilité du polymère pour les applications biomédicales¹²¹.

I.9.3 Avantages des nanoparticules fonctionnalisées par un polymère pour le traitement du cancer :

Les nanoparticules polymérisées présentent de nombreux avantages dans le domaine de la thérapie anticancéreuse tels que¹²²⁻¹²⁴ :

- Une efficacité significative par rapport aux méthodes d'administration orale et intraveineuse traditionnelles,
- L'augmentation de la stabilité des agents pharmaceutiques dans la circulation systémique,

- La capacité de circuler pendant une période prolongée en ciblant un organe particulier grâce à leurs propriétés de furtivité qui réduisent leur absorption par les organismes,
- L'encapsulation d'une concentration plus élevée d'agent pharmaceutique,
- La libération du médicament à l'emplacement souhaité avec une vitesse soutenue vers le site d'action.

I.9.4 Techniques de greffage du polymère sur la surface des nanoparticules :

Le greffage du polymère sur la surface des nanoparticules est capable de conférer de nouvelles propriétés aux matériaux. Il existe deux méthodes permettant de greffer le polymère sur la surface des nanoparticules d'une manière covalente « grafting to » et « grafting from »¹²⁵.

Dans la méthode « Grafting to », les extrémités fonctionnalisées du polymère pré-synthétisé réagissent avec une surface activée (**Figure I-26**). Le greffage avec cette méthode permet un bon contrôle de la longueur des chaînes du polymère et une facilité de caractérisation de ces chaînes avant qu'elles ne soient greffées¹²⁶. Cependant le greffage n'est pas efficace si le bout du polymère ne possède pas une fonctionnalité terminale¹²⁷. Il est également moins efficace pour des polymères avec un poids moléculaire élevé¹²⁸, car la gêne stérique empêche les chaînes d'approcher la surface à concentration élevée et en fonction de leur configuration dans les conditions de greffage.

Par contre la méthode « Grafting from » consiste à faire croître les chaînes du polymère à partir d'un initiateur auto-assemblé c'est-à-dire le processus de la polymérisation commence à partir d'une surface en ancrant un initiateur au substrat approprié¹²⁹ (**Figure I-26**). Cette méthode présente l'avantage d'utiliser une gamme variée de monomères simultanément¹², de conduire à une densité de greffage plus élevée que la première méthode¹³⁰, car elle permet d'éviter les phénomènes de gênes stériques¹²⁸.

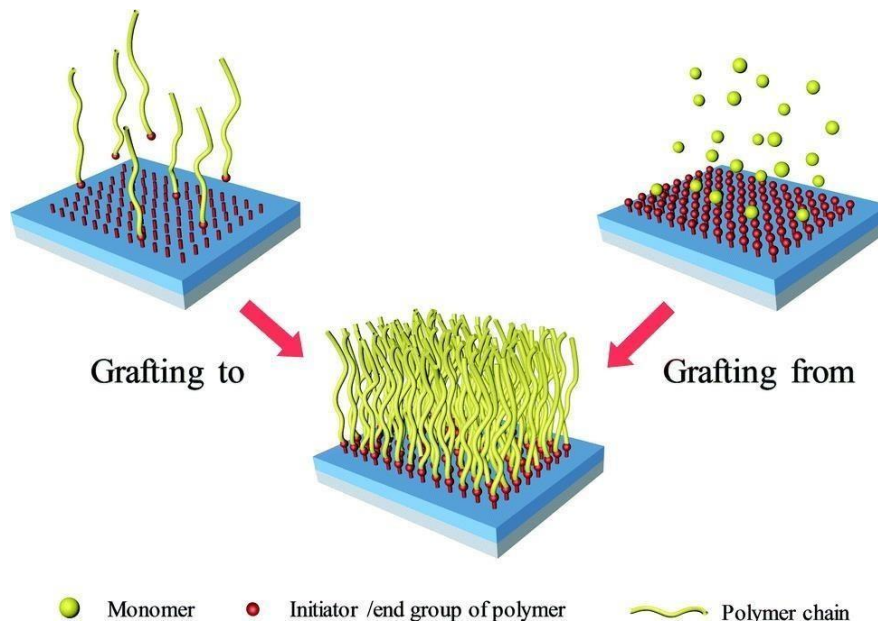


Figure I-26 : Schéma des deux méthodes de greffage du polymère « grafting to » et « grafting from »¹³¹.

I.9.5 Techniques de polymérisation :

Le polymère a un rôle très important dans la modification des propriétés de surface des nanoparticules. Pour cela, il est nécessaire de contrôler sa taille sur la surface des nanoparticules car elle influence leurs propriétés optiques et magnétiques¹²⁸. Il existe différentes techniques de polymérisation radicalaire contrôlée (Controlled radical polymerization (CRP)) qui ont été citées dans la littérature¹³². Parmi ces techniques :

- **la polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition- fragmentation (Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT)) :** C'est une méthode polyvalente en ce qui concerne les conditions de la réaction et la classe de monomères mais elle souffre d'une limitation surtout dans le cas de polymères non- ioniques avec certains agents de type dithioester, le processus de la polymérisation peut être retardé et il nécessite souvent des durées longues de polymérisation (>24h)¹³³.
- **la polymérisation à médiation par les nitroxydes (NMP) :** Est une technique qui permet de synthétiser des macro-organismes complexes, fonctionnels et bien définis¹³⁴. Le développement de nouveaux systèmes d'amorçage des nitroxydes a été ralenti à cause du succès continu de l'ATRP notamment dans l'amélioration de la vitesse de la réaction de

polymérisation¹³⁵. Cette dernière est la méthode la plus utilisée grâce à sa facilité comparativement aux autres méthodes¹³⁶.

- **Polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP)**

Mise au point en 1995 par Sawamoto et son équipe, Wang et Matyjaszewski¹³⁷ et développée par Barboiu¹³⁸, la polymérisation radicalaire par transfert d'atome est l'une des méthodes de polymérisation radicalaire contrôlée les plus étudiées dans la littérature¹³⁹ grâce à sa polyvalence, sa compatibilité avec de nombreux monomères¹³⁷. Elle permet une synthèse de (co-)polymères avec des poids moléculaires contrôlés¹³⁸. Elle est spécialement adaptée pour la modification des surfaces et la préparation de brosses moléculaires.¹⁴⁰

L'ATRP est un mécanisme qui réagit par un équilibre entre une espèce dormante et une espèce active du système. Pour former les radicaux ($R\cdot$), un atome halogène est extrait à partir d'un halogénure organique ($R-X$) par un complexe de métal de transition ($M^n - y/\text{ligand}$) pour former un groupe fonctionnel oxydé ($X - M_t^{n+1} - y/\text{ligand}$)¹⁴¹ (**Figure I-27**).

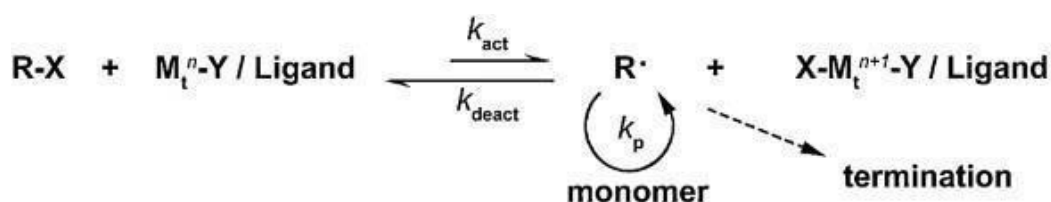


Figure I-27: Schéma du mécanisme ATRP proposé par Matyjaszewski *et al.*¹⁴².

Par la suite, un monomère peut être ajouté dans l'étape de propagation sur le radical activé. La partie active peut réagir avec le complexe métallique oxydé par rétro-transfert de l'atome halogène à l'extrémité de la chaîne de propagation pour désactiver le radical¹⁴³.

Les réactifs utilisés dans l'ATRP sont les suivants : monomère, initiateur, catalyseur et ligand.

- **Monomère**

Différents types de monomères peuvent être polymérisés par l'ATRP tels que : les styrènes, les acrylonitriles, les (méth)acrylamides et les (méth)acrylates¹⁴⁴. Avec les monomères à base de (méth)acrylates, la constante d'équilibre de la polymérisation est élevée.

l'activation des espèces dormantes est indiquée comme étant plus facile par rapport aux autres monomères¹²⁸.

- **Initiateur**

L'initiateur a un rôle très important dans la réussite de l'ATRP car il détermine le nombre des chaînes initiées. Les initiateurs avec une structure similaire à celle du monomère conviennent mieux à la polymérisation. Les halogénures d'alkyles sont les plus utilisés tel que les bromures d'alkyles et les chlorure d'alkyles¹⁴⁵. La structure de l'initiateur a un effet sur la formation du polymère, par exemple si c'est un initiateur qui comporte un seul groupe d'halogénure d'alkyle, le polymère se forme d'une manière linéaire et si y a plusieurs groupes sur un seul cœur, le polymère se forme comme une structure étoilée¹²⁸.

- **Catalyseur**

Le catalyseur est le composant le plus important du mécanisme ATRP car il détermine la constante d'équilibre entre l'espèce dormante et l'espèce active par la transition de l'atome halogène. Différents types de catalyseurs peuvent être utilisés pour la polymérisation tels que ceux qui sont à base de cuivre et de fer¹⁴⁶ ou encore de nickel¹⁴⁷. Ceux à base de cuivre sont souvent les plus utilisés dans la littérature¹⁴⁸.

- **Ligand**

Il est utilisé avec le catalyseur à base d'halogénure pour former le complexe catalytique. Son rôle est d'augmenter la solubilité du catalyseur dans le solvant de la polymérisation et ajuster le potentiel redox du centre métallique afin de permettre une réactivité dans le processus de la polymérisation¹⁴⁹. Les ligands les plus utilisés pour la polymérisation sont ceux composés d'azote et de phosphore mais ceux contenant de l'azote sont les plus souvent utilisés avec les complexes en cuivre comme le tris[(2-pyridyl)méthyl]amine (TPMA)^{128,150}.

Bien que ce processus présente de nombreux avantages, il présente également quelques limites telles que l'exigence d'une grande quantité de catalyseur à base de métal de transition nécessitant à la fin de la polymérisation de purifier le produit obtenu, ce qui augmentera le coût de la production industrielle¹⁵¹. D'un autre côté, les traces du cuivre conduisent à des problèmes de toxicité surtout quand il s'agit d'applications biologiques. La sensibilité à l'oxygène présente

aussi un inconvénient majeur dans ce processus, nécessitant à la fin un dégazage complet, augmentant le coût du processus¹⁵².

Afin de surmonter ces limites, l'équipe de Matyjaszewski a développé une nouvelle méthode ATRP nommée « activateurs régénérés par transfert d'électrons (ARGET) » dont laquelle la concentration du catalyseur peut être réduite à l'échelle du ppm et le niveau de tolérance en oxygène peut être prolongé¹⁵³.

- **Activateurs régénérés par transfert d'électrons (ARGET) - ATRP**

L'ARGET-ATRP est la méthode développée à partir de l'ATRP pour réduire la concentration du catalyseur¹²⁸. Elle permet l'utilisation des espèces qui sont plus stables à l'oxydation comme le Cu(II) et un agent réducteur qui réduit le catalyseur métallique Cu(II) introduit en Cu(I) durant la polymérisation^{154,155} (**Figure I-28**).

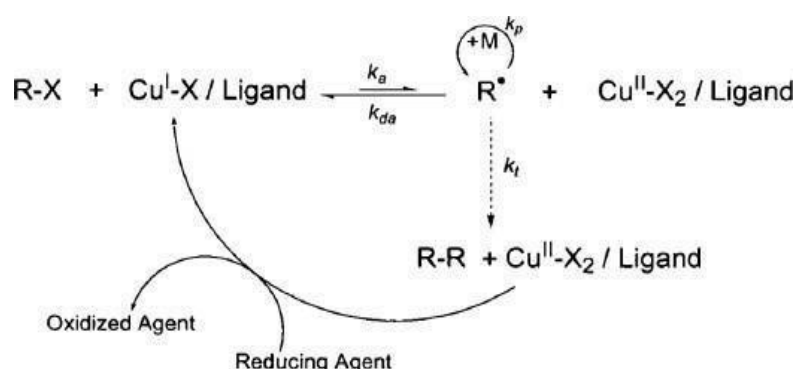


Figure I-28 : Schéma du mécanisme ARGET-ATRP proposé par Matyjaszewski *et al.*¹⁵⁶.

Si l'agent réducteur utilisé lors de la polymérisation est trop fort par rapport au Cu(II), le Cu(II) sera trop faible ce qui va réduire le contrôle sur le développement du poids moléculaire et la polymérisation devient rapide ($\sim 2h$)¹¹⁹ et s'il est trop faible, la polymérisation ralentit ou elle ne sera pas réalisée¹³⁸.

L'un des inconvénients de cette méthode est la quantité du ligand ajouté qui doit être en excès (3 à 10 fois molaire) pour assurer l'efficacité et le contrôle de la polymérisation car il aide à protéger le complexe catalytique des réactions déstabilisantes^{140,154}.

I.10 Description du projet de thèse :

Ce projet de thèse fait suite à la thèse de doctorat de Dr . Zied Ferdjaoui (soutenu le 27 Avril 2020, IJL, Ecole Doctorale C2MP, Université de Lorraine), dans laquelle des NPs cœur/coquille ont été obtenues à partir de la croissance par polymérisation radicalaire contrôlée du copolymère composé de méthacrylate de 2-(2-méthoxy) éthyle (MEO₂MA) et de méthacrylate d'oligo (éthylène glycol) (OEGMA), conduisant à la formation de P(MEO₂MA_xOEGMA_{100-x}). Le rapport des deux monomères a été modifié pour ajuster la température de libération (LCST) de la Doxorubicine (DOX). Ces NPs étaient capables de charger et de libérer un médicament modèle (DOX) avec une capacité de charge de 15 %, ce qui est nettement supérieur aux performances actuelles des nanoparticules^{10,28,99}.

Durant mon travail de thèse, une étude similaire sera réalisée avec un autre type de nanoparticules cœur/coquille dans le but d'améliorer les propriétés d'hyperthermie. Ces nano-objets combineront le diagnostic, le traitement des cellules cancéreuses et la livraison ciblée vers le site tumoral.

Dans la première partie du travail, différentes tailles de nanoparticules cœur/coquille (10, 15, 22 et 50 nm) vont être synthétisées et caractérisées par la microscopie électronique en transmission (MET), la spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier (IRTF), la diffraction de rayons X (DRX) et la spectroscopie Mössbauer. Les propriétés magnétiques de ces nanoparticules seront étudiées par le Vibrating Sample Magnetometer (VSM) afin de sélectionner la bonne taille avec des propriétés magnétiques les plus élevées.

Dans une seconde partie, les nanoparticules sélectionnées seront fonctionnalisées par le P(MEO₂MA_xOEGMA_{100-x}) et la DOX sera encapsulée dans les NPs (**Figure I-29**) pour étudier l'effet de relargage du médicament en fonction du temps et de la température. L'hyperthermie de ces nanoparticules sera étudiée ainsi que leur cytotoxicité sur les cellules SKOV-3 (Cellules du cancer ovarien).

Dans la troisième partie, la surface des nanoparticules fonctionnalisées sera modifiée par l'acide folique (AF) afin de permettre de cibler d'une manière sélective les cellules cancéreuses (**Figure I-29**).

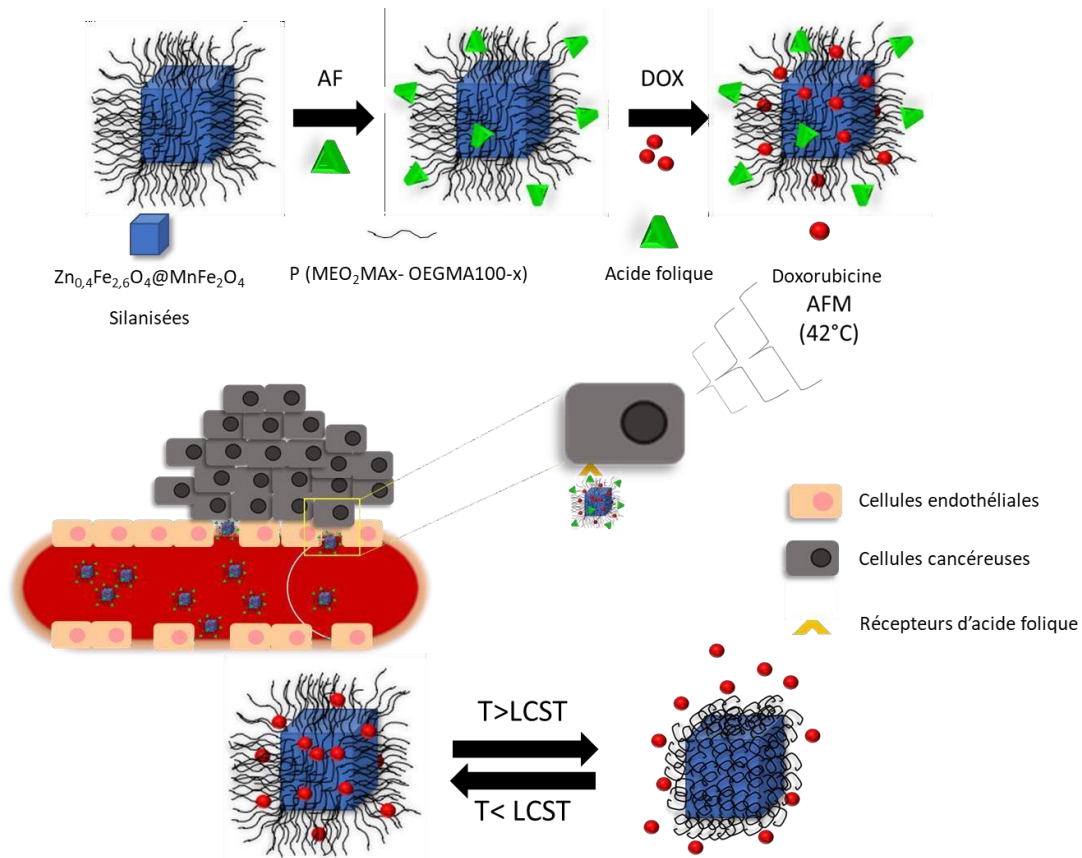


Figure I-29 : Schéma du projet de thèse.

Ces travaux ont été réalisés au sein de l'Equipe « Nanomatériaux et Santé » NaSa, Institut Jean Lamour (IJL), Nancy, en collaboration avec :

- ✓ L'institut de physique et de chimie des Matériaux de Strasbourg (IPCMS) pour les analyses d'hyperthermie (Dr. Damien Mertz),
- ✓ Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), Nancy pour la DLS (Dr. Khalid Ferji)

I.11 Références :

1. De Silva DD, Rapior S, Fons F, Bahkali AH, Hyde KD. Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: an approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action. *Fungal Divers.* 2012;55(1):1-35. doi:10.1007/s13225-012-0151-3
2. Bradford RW, Allen HW. The Primordial Thesis of Cancer. *Med Hypotheses.* 1992;37(1):20-23. doi:10.1016/0306-9877(92)90006-X
3. Sonveaux P, Végran F, Verrax J, et al. Cancer : lorsque recycler devient une faiblesse. *médecine/sciences.* 2009;25(4):327-329. doi:10.1051/medsci/2009254327
4. Cancer.htm.
5. Statistiques - Nanotechnologie et le cancer.html.
6. Tohme S, Simmons RL, Tsung A. Surgery for Cancer: A Trigger for Metastases. *Cancer Res.* 2017;77(7):1548-1552. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1536
7. Allozi R, Li XA, White J, et al. Tools for consensus analysis of experts' contours for radiotherapy structure definitions. *Radiother Oncol.* 2010;97(3):572-578. doi:10.1016/j.radonc.2010.06.009
8. Mansi L, Thiery-Vuillemin A, Kalbacher E, et al. L'immunothérapie : une nouvelle approche dans la prise en charge du cancer de prostate résistant à la castration. *Bull Cancer (Paris).* 2012;99(1):S57-S65. doi:10.1684/bdc.2012.1564
9. Emens LA, Ascierto PA, Darcy PK, et al. Cancer immunotherapy: Opportunities and challenges in the rapidly evolving clinical landscape. *Eur J Cancer.* 2017;81:116-129. doi:10.1016/j.ejca.2017.01.035
10. Ferjaoui Z. Functional responsive superparamagnetic core/shell nanoparticles and their drug release properties. *RSC Adv.* Published online 2017:8.
11. Nygren P. What is cancer chemotherapy? *Acta Oncol.* 2001;40(2-3):166-174. doi:10.1080/02841860151116204
12. Feng SS, Chien S. Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chem Eng Sci.* 2003;58(18):4087-4114. doi:10.1016/S0009-2509(03)00234-3
13. Side effects and emotional distress during cancer chemotherapy - Love - 1989 - Cancer - Wiley Online Library.htm.
14. Santhosh PB, Ulrich NP. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Promising tools in cancer theranostics. *Cancer Lett.* 2013;336(1):8-17. doi:10.1016/j.canlet.2013.04.032
15. Goenka S, Sant V, Sant S. Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *J Controlled Release.* 2014;173:75-88. doi:10.1016/j.jconrel.2013.10.017

16. Ramos AP, Cruz MAE, Tovani CB, Ciancaglini P. Biomedical applications of nanotechnology. *Biophys Rev.* 2017;9(2):79-89. doi:10.1007/s12551-016-0246-2
17. Zhang LY, Gu HC, Wang XM. Magnetite ferrofluid with high specific absorption rate for application in hyperthermia. *J Magn Magn Mater.* 2007;311(1):228-233. doi:10.1016/j.jmmm.2006.11.179
18. Nguyen KT. Targeted Nanoparticles for Cancer Therapy: Promises and Challenges. *J Nanomedicine Nanotechnol.* 2011;02(05). doi:10.4172/2157-7439.1000103e
19. Chin AB, Yaacob II. Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart's procedure. *J Mater Process Technol.* 2007;191(1-3):235-237. doi:10.1016/j.jmatprotec.2007.03.011
20. Alimunnisa J, Ravichandran K, Meena KS. Synthesis and characterization of Ag@SiO₂ core-shell nanoparticles for antibacterial and environmental applications. *J Mol Liq.* 2017;231:281-287. doi:10.1016/j.molliq.2017.01.103
21. Cardona JEM, Louaguef D, Gaffet E, Ashammakhi N, Alem H. Review of core/shell nanostructures presenting good hyperthermia properties for cancer therapy. *Mater Chem Front.* 2021;5(17):6429-6443. doi:10.1039/D1QM00353D
22. Gawande MB, Goswami A, Asefa T, et al. Core-shell nanoparticles: synthesis and applications in catalysis and electrocatalysis. *Chem Soc Rev.* 2015;44(21):7540-7590. doi:10.1039/C5CS00343A
23. Nomoev AV, Bardakhanov SP, Schreiber M, et al. Structure and mechanism of the formation of core-shell nanoparticles obtained through a one-step gas-phase synthesis by electron beam evaporation. *Beilstein J Nanotechnol.* 2015;6:874-880. doi:10.3762/bjnano.6.89
24. Schärtl W. Current directions in core-shell nanoparticle design. *Nanoscale.* 2010;2(6):829. doi:10.1039/c0nr00028k
25. Ahmadipour M, Hatami M, Rao KV. Preparation and Characterization of Nano-Sized (Mg_xFe_{1-x}O/SiO₂) (x = 0.1) Core-Shell Nanoparticles by Chemical Precipitation Method. *Adv Nanoparticles.* 2012;01(03):37-43. doi:10.4236/anp.2012.13006
26. Chan JM, Zhang L, Yuet KP, et al. PLGA-lecithin-PEG core-shell nanoparticles for controlled drug delivery. *Biomaterials.* 2009;30(8):1627-1634. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.12.013
27. Verma NK, Crosbie-Staunton K, Satti A, et al. Magnetic core-shell nanoparticles for drug delivery by nebulization. *J Nanobiotechnology.* 2013;11(1):1. doi:10.1186/1477-3155-11-1
28. Ferjaoui Z. Synthèse et caractérisation de nanoparticules magnétiques répondantes pour des applications en thérapie cancéreuse. :154.

29. Mir M, Ishtiaq S, Rabia S, et al. Nanotechnology: from In Vivo Imaging System to Controlled Drug Delivery. *Nanoscale Res Lett.* 2017;12(1):500. doi:10.1186/s11671-017-2249-8
30. Hoffman AS. The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. *J Controlled Release.* 2008;132(3):153-163. doi:10.1016/j.jconrel.2008.08.012
31. Caliceti P. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)–protein conjugates. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(10):1261-1277. doi:10.1016/S0169-409X(03)00108-X
32. Peracchia MT, Fattal E, Desmaële D, et al. Stealth® PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *J Controlled Release.* 1999;60(1):121-128. doi:10.1016/S0168-3659(99)00063-2
33. Duan X, Li Y. Physicochemical Characteristics of Nanoparticles Affect Circulation, Biodistribution, Cellular Internalization, and Trafficking. *Small.* 2013;9(9-10):1521-1532. doi:10.1002/sml.201201390
34. Hirsjarvi S, Passirani C, Benoit JP. Passive and Active Tumour Targeting with Nanocarriers. *Curr Drug Discov Technol.* 2011;8(3):188-196. doi:10.2174/157016311796798991
35. Gerweck LE, Seetharaman K. Cellular pH Gradient in Tumor versus Normal Tissue: Potential Exploitation for the Treatment of Cancer. :6.
36. Laurent S, Dutz S, Häfeli UO, Mahmoudi M. Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci.* 2011;166(1-2):8-23. doi:10.1016/j.cis.2011.04.003
37. Yue H, Yuan L, Zhang W, Zhang S, Wei W, Ma G. Macrophage responses to the physical burden of cell-sized particles. *J Mater Chem B.* 2018;6(3):393-400. doi:10.1039/C7TB01673E
38. Yang HW, Hua MY, Liu HL, et al. Self-protecting core-shell magnetic nanoparticles for targeted, traceable, long half-life delivery of BCNU to gliomas. *Biomaterials.* 2011;32(27):6523-6532. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.05.047
39. Chen L, Li L, Zhang H, et al. Magnetic thermosensitive core/shell microspheres: synthesis, characterization and performance in hyperthermia and drug delivery. *RSC Adv.* 2014;4(87):46806-46812. doi:10.1039/C4RA09393C
40. Rana S, Shetake NG, Barick KC, Pandey BN, Salunke HG, Hassan PA. Folic acid conjugated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin. *Dalton Trans.* 2016;45(43):17401-17408. doi:10.1039/C6DT03323G
41. Unsoy G, Khodadust R, Yalcin S, Mutlu P, Gunduz U. Synthesis of Doxorubicin loaded magnetic chitosan nanoparticles for pH responsive targeted drug delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2014;62:243-250. doi:10.1016/j.ejps.2014.05.021
42. Hervault A, Dunn AE, Lim M, et al. Doxorubicin loaded dual pH- and thermo-responsive magnetic nanocarrier for combined magnetic hyperthermia and targeted controlled drug delivery applications. *Nanoscale.* 2016;8(24):12152-12161. doi:10.1039/C5NR07773G

43. Hoang Thi T, Nguyen Tran DH, Bach L, et al. Functional Magnetic Core-Shell System-Based Iron Oxide Nanoparticle Coated with Biocompatible Copolymer for Anticancer Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2019;11(3):120. doi:10.3390/pharmaceutics11030120
44. Yu JW, Jung J, Choi YM, et al. Enhancement of the crosslink density, glass transition temperature, and strength of epoxy resin by using functionalized graphene oxide co-curing agents. *Polym Chem*. 2016;7(1):36-43. doi:10.1039/C5PY01483B
45. Zhang H, Li J, Hu Y, Shen M, Shi X, Zhang G. Folic acid-targeted iron oxide nanoparticles as contrast agents for magnetic resonance imaging of human ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2016;9(1):19. doi:10.1186/s13048-016-0230-2
46. Wu K, Liao SH, Liu CH, et al. Functionalized magnetic iron oxide/alginate core-shell nanoparticles for targeting hyperthermia. *Int J Nanomedicine*. Published online May 2015:3315. doi:10.2147/IJN.S68719
47. Hao X, Gai W, Wang L, et al. 5-Boronopicolinic acid-functionalized polymeric nanoparticles for targeting drug delivery and enhanced tumor therapy. *Mater Sci Eng C*. 2021;119:111553. doi:10.1016/j.msec.2020.111553
48. Yoon TJ, Yu KN, Kim E, et al. Specific Targeting, Cell Sorting, and Bioimaging with Smart Magnetic Silica Core-Shell Nanomaterials. *Small*. 2006;2(2):209-215. doi:10.1002/sml.200500360
49. Tsai CP, Chen CY, Hung Y, Chang FH, Mou CY. Monoclonal antibody-functionalized mesoporous silica nanoparticles (MSN) for selective targeting breast cancer cells. *J Mater Chem*. 2009;19(32):5737. doi:10.1039/b905158a
50. Comfort KK, Maurer EI, Braydich-Stolle LK, Hussain SM. Interference of Silver, Gold, and Iron Oxide Nanoparticles on Epidermal Growth Factor Signal Transduction in Epithelial Cells. *ACS Nano*. 2011;5(12):10000-10008. doi:10.1021/nn203785a
51. Cheong S, Ferguson P, Feindel KW, et al. Simple Synthesis and Functionalization of Iron Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging. *Angew Chem*. 2011;123(18):4292-4295. doi:10.1002/ange.201100562
52. Cusioli LF, Quesada HB, Barbosa de Andrade M, Gomes RG, Bergamasco R. Application of a novel low-cost adsorbent functioned with iron oxide nanoparticles for the removal of triclosan present in contaminated water. *Microporous Mesoporous Mater*. 2021;325:111328. doi:10.1016/j.micromeso.2021.111328
53. Uzunova V, Tsiapla AR, Stoyanova T, et al. BIOCOMPATIBILITY OF IRON OXIDE NANOPARTICLES. Published online 2021:5.
54. Vangijzegem T, Stanicki D, Laurent S. Magnetic iron oxide nanoparticles for drug delivery: applications and characteristics. *Expert Opin Drug Deliv*. 2019;16(1):69-78. doi:10.1080/17425247.2019.1554647
55. Gavrilov-Isaac V. Synthèse de nanoparticules magnétiques à énergie d'anisotropie modulable. :174.

55. Andersen HL, Saura-Múzquiz M, Granados-Miralles C, Canévet E, Lock N, Christensen M. Crystalline and magnetic structure–property relationship in spinel ferrite nanoparticles. *Nanoscale*. 2018;10(31):14902-14914. doi:10.1039/C8NR01534A
56. Mendili YE. Etude des propriétés structurales et magnétiques de nanoparticules de maghémite dispersées dans une matrice de silice. :181.
57. Kostopoulou A, Lappas A. Colloidal magnetic nanocrystal clusters: variable length-scale interaction mechanisms, synergetic functionalities and technological advantages. *Nanotechnol Rev*. 2015;4(6). doi:10.1515/ntrev-2014-0034
58. Abenojar EC, Wickramasinghe S, Bas-Concepcion J, Samia ACS. Structural effects on the magnetic hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles. *Prog Nat Sci Mater Int*. 2016;26(5):440-448. doi:10.1016/j.pnsc.2016.09.004
59. Hallali N. Utilisation de nanoparticules magnétiques dans les traitements anti-tumoraux: Au-delà de l'hyperthermie magnétique. :207.
60. Guibert C, Dupuis V, Peyre V, Fresnais J. Hyperthermia of Magnetic Nanoparticles: Experimental Study of the Role of Aggregation. *J Phys Chem C*. 2015;119(50):28148-28154. doi:10.1021/acs.jpcc.5b07796
61. Cardona JEM, Louaguef D, Gaffet E, Ashammakhi N, Alem H. Review of core/shell nanostructures presenting good hyperthermia properties for cancer therapy. *Mater Chem Front*. 2021;5(17):6429-6443. doi:10.1039/D1QM00353D
62. Shafie SNT. EVALUATION OF HYPERTHERMIA USING MAGNETIC NANOPARTICLES AND ALTERNATING MAGNETIC FIELD. :130.
63. Zhi D, Yang T, Yang J, Fu S, Zhang S. Targeting strategies for superparamagnetic iron oxide nanoparticles in cancer therapy. *Acta Biomater*. 2020;102:13-34. doi:10.1016/j.actbio.2019.11.027
64. Nemati Z, Alonso J, Martinez LM, et al. Enhanced Magnetic Hyperthermia in Iron Oxide Nano-Octopods: Size and Anisotropy Effects. *J Phys Chem C*. 2016;120(15):8370-8379. doi:10.1021/acs.jpcc.6b01426
65. Lee JH, Jang J tak, Choi J sil, et al. Exchange-coupled magnetic nanoparticles for efficient heat induction. *Nat Nanotechnol*. 2011;6(7):418-422. doi:10.1038/nnano.2011.95
66. Noh S hyun, Na W, Jang J tak, et al. Nanoscale Magnetism Control via Surface and Exchange Anisotropy for Optimized Ferrimagnetic Hysteresis. *Nano Lett*. 2012;12(7):3716-3721. doi:10.1021/nl301499u
67. Sanna Angotzi M, Mameli V, Cara C, et al. Coupled hard–soft spinel ferrite-based core–shell nanoarchitectures: magnetic properties and heating abilities. *Nanoscale Adv*. 2020;2(8):3191-3201. doi:10.1039/D0NA00134A
68. Phadataré MR, Meshram JV, Gurav KV, Kim JH, Pawar SH. Enhancement of specific absorption rate by exchange coupling of the core–shell structure of magnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia. *J Phys Appl Phys*. 2016;49(9):095004. doi:10.1088/0022-3727/49/9/095004

69. Pardo A, Yáñez S, Piñeiro Y, et al. Cubic Anisotropic Co- and Zn-Substituted Ferrite Nanoparticles as Multimodal Magnetic Agents. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(8):9017-9031. doi:10.1021/acsami.9b20496
70. Darwish MSA, Kim H, Lee H, Ryu C, Young Lee J, Yoon J. Engineering Core-Shell Structures of Magnetic Ferrite Nanoparticles for High Hyperthermia Performance. *Nanomaterials*. 2020;10(5):991. doi:10.3390/nano10050991
71. Darwish MSA, Kim H, Lee H, Ryu C, Young Lee J, Yoon J. Engineering Core-Shell Structures of Magnetic Ferrite Nanoparticles for High Hyperthermia Performance. *Nanomaterials*. 2020;10(5):991. doi:10.3390/nano10050991
72. Venturini P. Synthèse et caractérisation de nanomatériaux hybrides innovants pour le biomédical. :198.
73. Zehani M. Optimisation du procédé polyol pour la synthèse de nanoparticules d'oxyde de zinc: mise à l'échelle du procédé et applications photovoltaïques. :352.
74. Maurizi L. Elaboration de nanoparticules fonctionnelles: applications comme agents de contraste en IRM. :255.
75. Nguyen TTT. Poly(oxyde d'éthylène)s fonctionnels à extrémité acide phosphonique et à fonctionnalité réversible pour la stabilisation de nanoparticules magnétiques. :189.
76. Labidi S. Elaboration des nanoparticules d'oxyde de zirconium par voie sol-gel: mise en forme et application pour la synthèse de biodiesel. :283.
77. Hufschmid R, Arami H, Ferguson RM, et al. Synthesis of phase-pure and monodisperse iron oxide nanoparticles by thermal decomposition. *Nanoscale*. 2015;7(25):11142-11154. doi:10.1039/C5NR01651G
78. Macías-Martínez BI, Cortés-Hernández DA, Zugasti-Cruz A, Cruz-Ortíz BR, Múzquiz-Ramos EM. Heating ability and hemolysis test of magnetite nanoparticles obtained by a simple co-precipitation method. *J Appl Res Technol*. 2016;14(4):239-244. doi:10.1016/j.jart.2016.05.007
79. Faraji M, Yamini Y, Rezaee M. Magnetic nanoparticles: Synthesis, stabilization, functionalization, characterization, and applications. *J Iran Chem Soc*. 2010;7(1):1-37. doi:10.1007/BF03245856
80. Zhao T, Sun R, Yu S, et al. Size-controlled preparation of silver nanoparticles by a modified polyol method. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp*. 2010;366(1-3):197-202. doi:10.1016/j.colsurfa.2010.06.005
81. Chieng BW, Loo YY. Synthesis of ZnO nanoparticles by modified polyol method. *Mater Lett*. 2012;73:78-82. doi:10.1016/j.matlet.2012.01.004
82. Sōmiya S, Roy R. Hydrothermal synthesis of fine oxide powders. *Bull Mater Sci*. 2000;23(6):453-460. doi:10.1007/BF02903883
83. Gan YX, Jayatissa AH, Yu Z, Chen X, Li M. Hydrothermal Synthesis of Nanomaterials. *J Nanomater*. 2020;2020:1-3. doi:10.1155/2020/8917013

84. Zhang W, Qiao X, Chen J. Synthesis of silver nanoparticles—Effects of concerned parameters in water/oil microemulsion. *Mater Sci Eng B*. 2007;142(1):1-15. doi:10.1016/j.mseb.2007.06.014
85. Malik MA, Wani MY, Hashim MA. Microemulsion method: A novel route to synthesize organic and inorganic nanomaterials. *Arab J Chem*. 2012;5(4):397-417. doi:10.1016/j.arabjc.2010.09.027
86. Xu J, Yang H, Fu W, et al. Preparation and magnetic properties of magnetite nanoparticles by sol–gel method. *J Magn Magn Mater*. 2007;309(2):307-311. doi:10.1016/j.jmmm.2006.07.037
87. Parashar M, Shukla VK, Singh R. Metal oxides nanoparticles via sol–gel method: a review on synthesis, characterization and applications. *J Mater Sci Mater Electron*. 2020;31(5):3729-3749. doi:10.1007/s10854-020-02994-8
88. Yang J, Kou Q, Liu Y, et al. Effects of amount of benzyl ether and reaction time on the shape and magnetic properties of Fe₃O₄ nanocrystals. *Powder Technol*. 2017;319:53-59. doi:10.1016/j.powtec.2017.06.042
89. Belaïd S, Stanicki D, Vander Elst L, Muller RN, Laurent S. Influence of experimental parameters on iron oxide nanoparticle properties synthesized by thermal decomposition: size and nuclear magnetic resonance studies. *Nanotechnology*. 2018;29(16):165603. doi:10.1088/1361-6528/aae59
90. Dixit S, Jeevanandam P. Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles by Thermal Decomposition Approach. *Adv Mater Res*. 2009;67:221-226. doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.67.221
91. Chandunika RK, Vijayaraghavan R, Sahu NK. Magnetic hyperthermia application of MnFe₂O₄ nanostructures processed through solvents with the varying boiling point. *Mater Res Express*. 2020;7(6):064002. doi:10.1088/2053-1591/ab955e
92. Wu G, Katsumura Y, Matsuura C, Ishigure K, Kubo J. Comparison of Liquid-Phase and Gas-Phase Pure Thermal Cracking of *n*-Hexadecane. *Ind Eng Chem Res*. 1996;35(12):4747-4754. doi:10.1021/ie960280k
93. Gao J, Zhang B, Gao Y, Pan Y, Zhang X, Xu B. Fluorescent Magnetic Nanocrystals by Sequential Addition of Reagents in a One-Pot Reaction: A Simple Preparation for Multifunctional Nanostructures. *J Am Chem Soc*. 2007;129(39):11928-11935. doi:10.1021/ja0731017
94. Muscas G, Singh G, Glomm WR, et al. Tuning the Size and Shape of Oxide Nanoparticles by Controlling Oxygen Content in the Reaction Environment: Morphological Analysis by Aspect Maps. *Chem Mater*. 2015;27(6):1982-1990. doi:10.1021/cm5038815
95. Hola K, Markova Z, Zoppellaro G, Tucek J, Zboril R. Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances. *Biotechnol Adv*. 2015;33(6):1162-1176. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.003

96. Bharti S, Kaur G, Gupta S, Tripathi SK. Pegylated CdSe/ZnS core/shell nanoparticles for controlled drug release. *Mater Sci Eng B*. 2019;243:115-124. doi:10.1016/j.mseb.2019.03.015
97. Lapresta-Fernández A, Salinas-Castillo A, Capitán-Vallvey LF. Synthesis of a thermoresponsive crosslinked MEO2MA polymer coating on microclusters of iron oxide nanoparticles. *Sci Rep*. 2021;11(1):3947. doi:10.1038/s41598-021-83608-z
98. Ferjaoui Z, Jamal Al Dine E, Kulmukhamedova A, et al. Doxorubicin-Loaded Thermoresponsive Superparamagnetic Nanocarriers for Controlled Drug Delivery and Magnetic Hyperthermia Applications. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(34):30610-30620. doi:10.1021/acsami.9b10444
99. Zarrintaj P, Jouyandeh M, Ganjali MR, et al. Thermo-sensitive polymers in medicine: A review. *Eur Polym J*. 2019;117:402-423. doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.05.024
100. Le PN, Huynh CK, Tran NQ. Advances in thermosensitive polymer-grafted platforms for biomedical applications. *Mater Sci Eng C*. 2018;92:1016-1030. doi:10.1016/j.msec.2018.02.006
101. Kono K. Thermosensitive polymer-modified liposomes. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;53(3):307-319. doi:10.1016/S0169-409X(01)00204-6
102. Doberenz F, Zeng K, Willems C, Zhang K, Groth T. Thermoresponsive polymers and their biomedical application in tissue engineering – a review. *J Mater Chem B*. 2020;8(4):607-628. doi:10.1039/C9TB02052G
103. Nasserri R, Deutschman CP, Han L, Pope MA, Tam KC. Cellulose nanocrystals in smart and stimuli-responsive materials: a review. *Mater Today Adv*. 2020;5:100055. doi:10.1016/j.mtadv.2020.100055
104. Mai Y, Eisenberg A. Self-assembly of block copolymers. *Chem Soc Rev*. 2012;41(18):5969. doi:10.1039/c2cs35115c
105. Southall NT, Dill KA, Haymet ADJ. A View of the Hydrophobic Effect. *J Phys Chem B*. 2002;106(3):521-533. doi:10.1021/jp015514e
106. Lutz JF, Jahed N, Matyjaszewski K. Preparation and characterization of graft terpolymers with controlled molecular structure: Graft Terpolymers. *J Polym Sci Part Polym Chem*. 2004;42(8):1939-1952. doi:10.1002/pola.20043
107. Hocine S, Li MH. Thermoresponsive self-assembled polymer colloids in water. *Soft Matter*. 2013;9(25):5839. doi:10.1039/c3sm50428j
108. Liu HY, Zhu XX. Lower critical solution temperatures of N -substituted acrylamide copolymers in aqueous solutions. *Polymer*. 1999;40(25):6985-6990. doi:10.1016/S0032-3861(98)00858-1
109. Gil E, Hudson S. Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. *Prog Polym Sci*. 2004;29(12):1173-1222. doi:10.1016/j.progpolymsci.2004.08.003

110. Schild HG. Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Prog Polym Sci.* 1992;17(2):163-249. doi:10.1016/0079-6700(92)90023-R
111. Lau ACW, Wu C. Thermally Sensitive and Biocompatible Poly(N -vinylcaprolactam): Synthesis and Characterization of High Molar Mass Linear Chains. *Macromolecules.* 1999;32(3):581-584. doi:10.1021/ma980850n
112. Masson P, Beinert G, Franta E, Rempp P. Synthesis of polyethylene oxide macromers. *Polym Bull.* 1982;7(1). doi:10.1007/BF00264152
113. Israelachvili J. The different faces of poly(ethylene glycol). *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94(16):8378-8379. doi:10.1073/pnas.94.16.8378
114. Tasaki K. Poly(oxyethylene)–Water Interactions: A Molecular Dynamics Study. *J Am Chem Soc.* 1996;118(35):8459-8469. doi:10.1021/ja951005c
115. Lutz JF. Polymerization of oligo(ethylene glycol) (meth)acrylates: Toward new generations of smart biocompatible materials. *J Polym Sci Part Polym Chem.* 2008;46(11):3459-3470. doi:10.1002/pola.22706
116. Ward MA, Georgiou TK. Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications. *Polymers.* 2011;3(3):1215-1242. doi:10.3390/polym3031215
117. Xu FJ, Yang WT. Polymer vectors via controlled/living radical polymerization for gene delivery. *Prog Polym Sci.* 2011;36(9):1099-1131. doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.11.005
118. Jamal Al Dine E, Ferjaoui Z, Ghanbaja J, et al. Thermo-responsive magnetic Fe₃O₄@P(MEO 2 MA X -OEGMA 100-X) NPs and their applications as drug delivery systems. *Int J Pharm.* 2017;532(2):738-747. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.09.019
119. Hu Z, Cai T, Chi C. Thermoresponsive oligo(ethylene glycol)-methacrylate- based polymers and microgels. *Soft Matter.* 2010;6(10):2115. doi:10.1039/b921150k
120. Alejo T, Prieto M, García-Juan H, et al. A facile method for the controlled polymerization of biocompatible and thermoresponsive oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate copolymers. *Polym J.* 2018;50(2):203-211. doi:10.1038/s41428-017-0004-8
121. Kayser O, Lemke A, Hernandez-Trejo N. The Impact of Nanobiotechnology on the Development of New Drug Delivery Systems. *Curr Pharm Biotechnol.* 2005;6(1):3-5. doi:10.2174/1389201053167158
122. Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles - A review. *Trop J Pharm Res.* 2007;5(1):561-573. doi:10.4314/tjpr.v5i1.14634
123. Pelaz B, del Pino P, Maffre P, et al. Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. *ACS Nano.* 2015;9(7):6996-7008. doi:10.1021/acsnano.5b01326
124. Tomczak N, Jańczewski D, Han M, Vancso GJ. Designer polymer–quantum dot architectures. *Prog Polym Sci.* 2009;34(5):393-430. doi:10.1016/j.progpolymsci.2008.11.004

125. Larnaudie SC, Brendel JC, Jolliffe KA, Perrier S. Cyclic peptide-polymer conjugates: Grafting-to vs grafting-from. *J Polym Sci Part Polym Chem*. 2016;54(7):1003-1011. doi:10.1002/pola.27937
126. Cao L, Man T, Zhuang J, Kruk M. Poly(N-isopropylacrylamide) and poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) grafted on an ordered mesoporous silica surface using atom transfer radical polymerization with activators regenerated by electron transfer. *J Mater Chem*. 2012;22(14):6939. doi:10.1039/c2jm15251g
127. Dine EJA. Synthèse et caractérisation des nanoparticules intelligentes. :226.
128. Kim M, Schmitt S, Choi J, Krutty J, Gopalan P. From Self-Assembled Monolayers to Coatings: Advances in the Synthesis and Nanobio Applications of Polymer Brushes. *Polymers*. 2015;7(7):1346-1378. doi:10.3390/polym7071346
129. Rubio N, Au H, Leese HS, Hu S, Clancy AJ, Shaffer MSP. *Grafting from* versus *Grafting to* Approaches for the Functionalization of Graphene Nanoplatelets with Poly(methyl methacrylate). *Macromolecules*. 2017;50(18):7070-7079. doi:10.1021/acs.macromol.7b01047
130. Wang S, Wang Z, Li J, Li L, Hu W. Surface-grafting polymers: from chemistry to organic electronics. *Mater Chem Front*. 2020;4(3):692-714. doi:10.1039/C9QM00450E
131. Braunecker WA, Matyjaszewski K. Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives. *Prog Polym Sci*. 2007;32(1):93-146. doi:10.1016/j.progpolymsci.2006.11.002
132. Lowe AB, McCormick CL. Reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT) radical polymerization and the synthesis of water-soluble (co)polymers under homogeneous conditions in organic and aqueous media. *Prog Polym Sci*. 2007;32(3):283- 351. doi:10.1016/j.progpolymsci.2006.11.003
133. Nicolas J, Guillaneuf Y, Lefay C, Bertin D, Gignes D, Charleux B. Nitroxide-mediated polymerization. *Prog Polym Sci*. 2013;38(1):63-235. doi:10.1016/j.progpolymsci.2012.06.002
134. Grubbs RB. Nitroxide-Mediated Radical Polymerization: Limitations and Versatility. *Polym Rev*. 2011;51(2):104-137. doi:10.1080/15583724.2011.566405
135. Strozyk MS, Chanana M, Pastoriza-Santos I, Pérez-Juste J, Liz-Marzán LM. Protein/Polymer-Based Dual-Responsive Gold Nanoparticles with pH-Dependent Thermal Sensitivity. *Adv Funct Mater*. 2012;22(7):1436-1444. doi:10.1002/adfm.201102471
136. Matyjaszewski K. Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current Status and Future Perspectives. *Macromolecules*. 2012;45(10):4015-4039. doi:10.1021/ma3001719
137. Lou Q, Shipp DA. Recent Developments in Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Methods to Reduce Metal Catalyst Concentrations. *ChemPhysChem*. 2012;13(14):3257-3261. doi:10.1002/cphc.201200166

138. Minko S. Grafting on Solid Surfaces: “Grafting to” and “Grafting from” Methods. In: Stamm M, ed. *Polymer Surfaces and Interfaces*. Springer Berlin Heidelberg; 2008:215-234. doi:10.1007/978-3-540-73865-7_11
139. Matyjaszewski K, Dong H, Jakubowski W, Pietrasik J, Kusumo A. Grafting from Surfaces for “Everyone”: ARGET ATRP in the Presence of Air. *Langmuir*. 2007;23(8):4528-4531. doi:10.1021/la063402e
140. Siegwart DJ, Oh JK, Matyjaszewski K. ATRP in the design of functional materials for biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2012;37(1):18-37. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.08.001
141. Siegwart DJ, Oh JK, Matyjaszewski K. ATRP in the design of functional materials for biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2012;37(1):18-37. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.08.001
142. Haddleton DM, Jackson SG, Bon SAF. Copper(I)-Mediated Living Radical Polymerization under Fluorous Biphasic Conditions. *J Am Chem Soc*. 2000;122(7):1542-1543. doi:10.1021/ja993478f
143. Patten TE, Matyjaszewski K. Atom Transfer Radical Polymerization and the Synthesis of Polymeric Materials. *Adv Mater*. 1998;10(12):901-915. doi:10.1002/(SICI)1521-4095(199808)10:12<901::AID-ADMA901>3.0.CO;2-B
144. Matyjaszewski K, Xia J. Atom Transfer Radical Polymerization. *Chem Rev*. 2001;101(9):2921-2990. doi:10.1021/cr940534g
145. Matyjaszewski K, Wei M, Xia J, McDermott NE. Controlled/“Living” Radical Polymerization of Styrene and Methyl Methacrylate Catalyzed by Iron Complexes. *Macromolecules*. 1997;30(26):8161-8164. doi:10.1021/ma971010w
146. Granel C, Dubois Ph, Jérôme R, Teyssié Ph. Controlled Radical Polymerization of Methacrylic Monomers in the Presence of a Bis(ortho-chelated) Arylnickel(II) Complex and Different Activated Alkyl Halides. *Macromolecules*. 1996;29(27):8576-8582. doi:10.1021/ma9608380
147. Zidelmal N. SILIPOLYSALEN: étude du greffage par polymérisation contrôlée de complexes de salen sur silicium pour une application en catalyse asymétriquehétérogène. :180.
148. Qiu J, Matyjaszewski K, Thouin L, Amatore C. Cyclic voltammetric studies of copper complexes catalyzing atom transfer radical polymerization. :7.
149. Tang H, Shen Y, Li BG, Radosz M. Tertiary Amine - Enhanced Activity of ATRP Catalysts CuBr/TPMA and CuBr/Me₆TREN. *Macromol Rapid Commun*. 2008;29(22):1834-1838. doi:10.1002/marc.200800378
150. Jakubowski W, Min K, Matyjaszewski K. Activators Regenerated by Electron Transfer for Atom Transfer Radical Polymerization of Styrene. *Macromolecules*. 2006;39(1):39-45. doi:10.1021/ma0522716

151. Hansson S, Östmark E, Carlmark A, Malmström E. ARGET ATRP for Versatile Grafting of Cellulose Using Various Monomers. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2009;1(11):2651-2659. doi:10.1021/am900547g
152. Meszynska A. Iterative synthesis of sequence-defined polymers using solid and soluble supports. :192.
153. Chan N, Cunningham MF, Hutchinson RA. ARGET ATRP of Methacrylates and Acrylates with Stoichiometric Ratios of Ligand to Copper. *Macromol Chem Phys*. 2008;209(17):1797-1805. doi:10.1002/macp.200800328
154. Jakubowski W, Kirci-Denizli B, Gil RR, Matyjaszewski K. Polystyrene with Improved Chain-End Functionality and Higher Molecular Weight by ARGET ATRP. *Macromol Chem Phys*. 2008;209(1):32-39. doi:10.1002/macp.200700425
155. Akeroyd N, Klumperman B. The combination of living radical polymerization and click chemistry for the synthesis of advanced macromolecular architectures. *Eur Polym J*. 2011;47(6):1207-1231. doi:10.1016/j.eurpolymj.2011.02.003

Chapitre II: Synthèse et caractérisations physico-chimique des NPs

II.1 Introduction :

Comme nous l'avons mentionné dans le Chapitre I, les nanoparticules magnétiques ont suscité un grand intérêt dans le domaine biomédical notamment dans le traitement du cancer grâce à leurs propriétés uniques : petite taille, biocompatibilité, biodégradabilité et surtout propriétés magnétiques¹. Ces caractéristiques leur permettent d'être des candidates idéales pour combiner l'hyperthermie et la délivrance de médicament anticancéreux².

Comme expliqué précédemment, l'hyperthermie est une méthode prometteuse pour le traitement du cancer car elle peut traiter la tumeur d'une manière sélective avec des effets réduits sur les cellules saines comparativement à la chimiothérapie et la radiothérapie³. Elle est basée sur l'application d'un champ magnétique alternatif externe qui permet de chauffer les NPs en augmentant leur température au-delà de 42°C⁴. L'institut national du cancer des Etats-Unis l'a défini comme « *Un type de traitement dans lequel les tissus corporels sont exposés à des températures élevées pour endommager et tuer les cellules cancéreuses ou pour les rendre plus sensibles aux effets des radiations et de certains médicaments anticancéreux* »⁵. Dans le traitement des cellules cancéreuses par l'hyperthermie avec des NPs, ces dernières sont dispersées dans un fluide et injectées dans les cellules. Elles sont ensuite exposées à un champ magnétique externe alternatif qui entraîne un mécanisme de perte magnétique avec les deux phénomènes de relaxation - Néel et Brown - et permet la génération de la chaleur⁶. Pour cela, différents types de NPs à base de métaux magnétiques ont été suggérés pour l'hyperthermie mais les meilleurs candidats sont les NPs d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIONPs) car elles présentent un faible taux de toxicité, elles sont biodégradables et faciles à synthétiser avec un faible coût. Ce qui les rendent appropriées pour des applications in-vivo^{7,8}.

Il a été précisé que la distribution de tailles ainsi que la morphologie des NPs sont des facteurs clés qui déterminent leurs capacités magnétiques^{2,9}. Le contrôle précis de ces paramètres est crucial pour les performances de l'hyperthermie¹⁰. Au cours de ces dernières années, les NPs sphériques de Fe_{3,8}O₄ ont été les plus souvent étudiées pour des applications d'hyperthermie mais en raison des limitations de leurs propriétés magnétiques¹¹, l'étude d'une nouvelle phase semblait nécessaire pour améliorer leurs propriétés magnétiques. Des efforts ont été consacrés à la conception d'une structure cœur/coquille où le cœur et la coquille peuvent être composés

d'oxyde de fer avec une structure spinelle "MFe₂O₄" (M représente le métal dopé comme Fe, Co, Mn, Zn, Ni...)¹², l'avantage de ce dernier dans l'amélioration des propriétés magnétiques et de la specific loss power (SLP) par rapport aux non dopés a été démontré dans des travaux précédemment cités dans la littérature^{11,13,14}.

À l'échelle nanométrique, l'anisotropie de surface et la distribution de la taille des particules font également partie des paramètres qui affectent les propriétés magnétiques des NPs. Dans un travail publié par Noh *et al*¹³, les valeurs de la saturation magnétique (M_s) et de SLP des NPs cœur/coquille (Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@CoFe₂O₄) avec deux morphologies différentes : sphériques et cubiques et avec différentes tailles ont été comparées. Les résultats obtenus ont montré :

- l'intérêt de la morphologie cubique pour améliorer les capacités magnétiques des NPs par rapport aux sphériques et cette différence s'explique par le facteur d'anisotropie de surface qui est plus faible dans la forme cubique par rapport à la sphérique.

- l'effet de la taille sur la modulation des propriétés magnétiques des particules : plus la taille est plus grande plus les capacités magnétiques des NPs sont plus importantes^{13,15,16}.

Dans l'étude de Noh *et al.*¹³ le dopage de la coquille avec du cobalt (Co) semblerait être une idée intéressante pour améliorer les propriétés magnétiques des NPs puisque les NPs dopées au Co présentent des valeurs les plus élevées de la SLP mais pour les applications biomédicales, il est également nécessaire de prendre en considération la biocompatibilité des NPs sur les cellules.

En effet, une étude récente de Papis *et al*¹⁷, a démontré que les NPs à base de Co représentent un inconvénient pour certaines applications biomédicales en raison de la toxicité du Co. Pour cette raison, son utilisation dans le domaine biomédical ne peut être envisagée. Par contre, il est possible de remplacer le Co par un autre métal moins toxique tel que le Manganèse (Mn)¹⁸ pour des résultats plus fiables dans les tests biologiques. Pour cette raison, le Mn est le métal choisi pour notre étude.

Parmi les différentes approches pour la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer telles que : la coprécipitation¹⁹, l'hydrothermal²⁰, le sol-gel²¹, la micelle inverse²², la solvothermal²³, le polyol²⁴, la microémulsion²⁵..., la décomposition thermique est la méthode la plus puissante pour produire des NPs monodispersées et reproductibles avec une morphologie uniforme, une haute cristallinité et une distribution de tailles étroite^{26,27}. L'acétylacétonate de fer est l'un des

précurseurs les plus utilisés pour cette méthode, il se décompose à un point d'ébullition élevé d'un solvant organique en présence d'un surfactant ou d'un réactif^{1,26,28}.

Dans ce chapitre, nous visons à synthétiser et caractériser des NPs cœur/coquille de différentes tailles dans le but d'améliorer leurs propriétés magnétiques et hyperthermiques seront qui seront présentées à la fin de ce chapitre de thèse.

Les NPs étudiées sont composées d'un noyau à base de $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ et d'une coquille en $MnFe_2O_4$ (**Figure 01**).

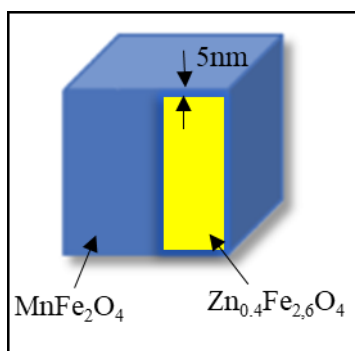


Figure II-1 : Représentation schématique des NPs cœur/coquille.

La synthèse de ces NPs a été réalisée selon la méthode publiée précédemment par *Noh et al*¹³ où différentes tailles ont été obtenues en changeant le ratio des réactifs (acétylacétonate de fer, zinc et cobalt). Dans notre cas, les différentes tailles ont été obtenues en ajustant la quantité du tensioactif (acide oléique) en remplaçant le cobalt par le manganèse dans la structure de la coquille pour éviter toute cytotoxicité des NPs.

II.2 Matériels et méthodes :

II.2.1 Produits:

La synthèse des NPs est réalisée à partir de la décomposition thermique de l'acétylacétonate de fer (Aldrich), de zinc (Merck KGaA) et de manganèse (Aldrich) dans l'éther benzylique (pureté 99%, d'Accros Organics) en présence de l'acide oléique (Aldrich).

L'éthanol absolu anhydre et le toluène ont été achetés chez Carlo ERBA. Tous les réactifs ont été utilisés tels qu'ils ont été reçus.

II.2.2 Méthodes:

II.2.2.1 Synthèse des NPs $Zn_{0,4}Fe_{2,6}O_4$:

Les NPs $Zn_{0,4}Fe_{2,6}O_4$ ont été obtenues en mélangeant de l'acétylacétonate de fer (III) (0,55 mmol) et de l'acétylacétonate de Zn (II) (0,83 mmol) en présence d'acide oléique (**Tableau 1**) et d'éther benzylique (52,61 mmol). Le mélange a été placé dans un ballon à fond rond à trois cols de 250 ml et chauffé à 290°C pendant 30 minutes sous atmosphère d'argon (**Figure II-2**) . Après 30 minutes, le mélange a été refroidi à température ambiante dans des conditions ambiantes, de l'éthanol a été ajouté au mélange formant un précipité noir qui a été centrifugé (10000 rpm (rotation/min) pendant 10mn) et lavé deux fois avec de l'éthanol et dispersé dans du toluène.

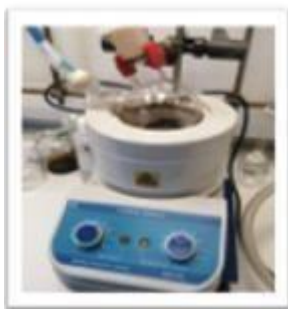


Figure II-2 : Montage de la réaction.

II.2.2.2 Synthèse des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$:

Les NPs obtenues lors de la première étape ($Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$) ont été recouvertes d'une coquille à base de $MnFe_2O_4$ (5 nm d'épaisseur) en mélangeant de l'acétylacétonate de fer (III) (0,18 mmol) et de l'acétylacétonate de Mn (II) (0,33 mmol) en présence d'acide oléique (**Tableau 1**) et d'éther benzylique (52,5 mmol). Après l'ajout des NPs de $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ en suspension dans l'hexane, le mélange a été chauffé à 290°C et maintenu sous atmosphère d'argon pendant 30 minutes. Ensuite, le mélange a été refroidi à température ambiante et de l'éthanol a été ajouté au mélange pour donner un précipité noir. Le mélange a été centrifugé (10000 rpm) et lavé deux fois avec de l'éthanol et dispersé dans du toluène (**Figure II-3**).

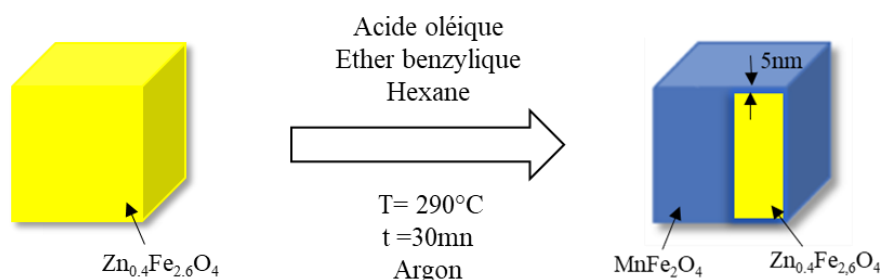


Figure II-3 : Schéma de la réaction des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$.

Tableau 1. Volume d'acide oléique en fonction du diamètre moyen ciblé des NPs.

Core NPs average diameter (nm)	Core/shell NPs average diameter (nm)	Oleic acid Volume (mmol)
5	10	6.3
10	15	5,6
18	22	4.2
45	50	0.7

II.2.3 Matériels:

II.2.3.1 Diffraction des rayons X (DRX) :

Le profil de diffraction des rayons X des NPs telles qu'elles ont été préparées (**Figure II-4 (a)**) a été obtenu avec un diffractomètre PANalytical X'Pert Pro MPD . Ce dernier a été utilisé dans une configuration Bragg-Brentano en réflexion, équipé d'une anticathode en Cu (rayonnement $K\alpha$, 0,154 nm) et d'un détecteur X'Celerator multicanaux à haute vitesse. Les échantillons étaient placés sur un porte-échantillon à fond zéro en silicium. Ce dernier a été installé sur un spinner rotatif pour permettre au plus grand nombre de grains d'être en position de diffraction et le diagramme XRD a été enregistré à température ambiante. Pour les NPs recuites (**Figure II-4 (b) et (c)**), la chambre utilisée est nommée Anton Paar 1200N. La poudre a été placée dans un porte-échantillon en silicium à recul zéro et l'ensemble est placé dans le porte-échantillon dans la chambre à air.

II.2.3.2 Spectroscopie Mössbauer :

Les analyses Mössbauer (**Figure II-5**) ont été réalisées en utilisant un spectromètre Mössbauer conventionnel dans une configuration de transmission standard à température ambiante. L'échelle de vitesse a été calibrée avec une source de CoRh (25mCi) et une feuille de fer métallique. L'évaluation des spectres Mössbauer a été effectuée par ajustement des lignes par la méthode des moindres carrés en utilisant le programme Winnormos (Wissel). L'erreur sur tous les spectres Mössbauer du Fe était de $\pm 0,1 \text{ mm.s}^{-1}$.

II.2.3.3 Microscopie électronique en transmission (MET) :

Les images MET (**Figure II-6**) ont été obtenues à l'aide d'un CM200 de Philips avec une tension d'accélération de 200kV, une résolution ponctuelle d'environ 0,27 nm et un grossissement de $\times 50\,000$ à $\times 750\,000$. Une goutte d'une solution diluée de NPs dans du toluène a été déposée sur une grille de carbone trouée. Cette dernière a été chauffée sur une plaque chauffante à 50°C pendant 2 heures pour éliminer toute trace de solvant.

II.2.3.4 Spectroscopie à plasma à couplage inductif (ICP-OES) :

La spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES) qui a été utilisée pour la détermination de la quantité de fer (Fe), de zinc (Zn) et de manganèse (Mn) qui composent les NPs (**Figure II-7**) est un Perkin Elmer Avio 200-OES après minéralisation des dépôts dans de l'acide nitrique chaud 14M. Système standard d'introduction des échantillons : chambre de pulvérisation cyclonique à chicanes avec un nébuliseur Meinhardt K1. Les

paramètres de fonctionnement sont les suivants : Puissance RF:1.5kW ; débit de gaz plasma 10 L min⁻¹, débit de gaz auxiliaire 0.2 L min⁻¹, débit de gaz du nébuliseur 0.7 L min⁻¹ et débit d'introduction de l'échantillon 1.0 L min⁻¹. Des longueurs d'onde ioniques ont été utilisées pour les mesures : Zn (206,2nm) et Fe (238,204nm), Mn (257,61nm).

II.2.3.5 Spectroscopie Infra rouge à transformée de Fourier (IRTF) :

Les deux spectres IRTF (**Figure II-8**) ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre commercial Agilent FTIR 680 en mode de réflexion totale atténuée (ATR). Ils ont été acquis de 400 à 4000 cm⁻¹ avec une résolution spectrale de 4 cm⁻¹. Des spectres de référence ont été acquis avant chaque acquisition pour déterminer les spectres d'absorption dans des conditions ambiantes. Chaque mesure a été moyennée sur 200 scans en mode continu pour améliorer le rapport signal/bruit.

II.2.3.6 Mesures magnétiques :

Les propriétés magnétiques des NPs (Figure II-9) ont été étudiées à l'aide d'un magnétomètre à échantillon vibrant (VSM) de Microsense appliquant un champ magnétique de 5KOe. Plusieurs mg de NPs purifiées et sans tensioactif ont été encapsulées dans une coupe en verre de quartz et hermétiquement scellées.

II.2.3.7 Hyperthermie magnétique :

Les mesures du débit d'absorption spécifique (DAS) (**figure II-10**) ont été réalisées par une méthode calorimétrique sur un instrument DM 100 et un applicateur DM (Nanoscale Biomagnetics™, nB, Zaragoza, Espagne) sous le logiciel MaNIaC (Nanoscale Biomagnetics™). 1 mL d'une solution contenant les NPs dispersées dans du toluène (5 mg.mL⁻¹) a été placé dans des flacons adaptés à cette mesure et un champ magnétique alternatif de 536,5 kHz / 300 Gauss ou 796 kHz / 200 Gauss a été appliqué. L'augmentation de la température a été enregistrée pendant 1 min (60s) . La valeur du DAS a ensuite été calculée selon la méthode décrite par Perigo *et al*²⁹, la courbe ΔT=f(t) a été ajustée avec une fonction polynomiale du second ordre de la forme y=a+b1*x+b2*x² où b1 correspond à [dT/dt]_{t=0}. La valeur du DAS a finalement été calculée avec l'équation suivante :

$$SAR (W/g) = \frac{m_{toluène} * Cp_{toluène}}{m_{particules}} * \left[\frac{dT}{dt} \right]_{t=0}$$

où $m_{\text{toluène}}$ et $C_{p_{\text{toluène}}}$ sont respectivement la masse (g) et la capacité thermique ($\text{J}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) de l'échantillon, $m_{\text{particules}}$ (g) est la masse des nanoparticules magnétiques présentes dans l'échantillon et $[dT/dt]_{t=0}$ la fonction dérivée de la température à $t = 0$ ($\text{K}\cdot\text{s}^{-1}$).

II.3 Résultats et discussions :

II.3.1 Diffraction des rayons X (DRX):

Les diagrammes de rayons X des NPs de $\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_{2.6}\text{O}_4$ avant et après le recuit à 300°C et 700°C sont montrés dans (**Figure II-4**). Le recuit des nanoparticules à ces températures était une étape essentielle pour éliminer l'excès d'acide oléique afin de distinguer les pics de Bragg.

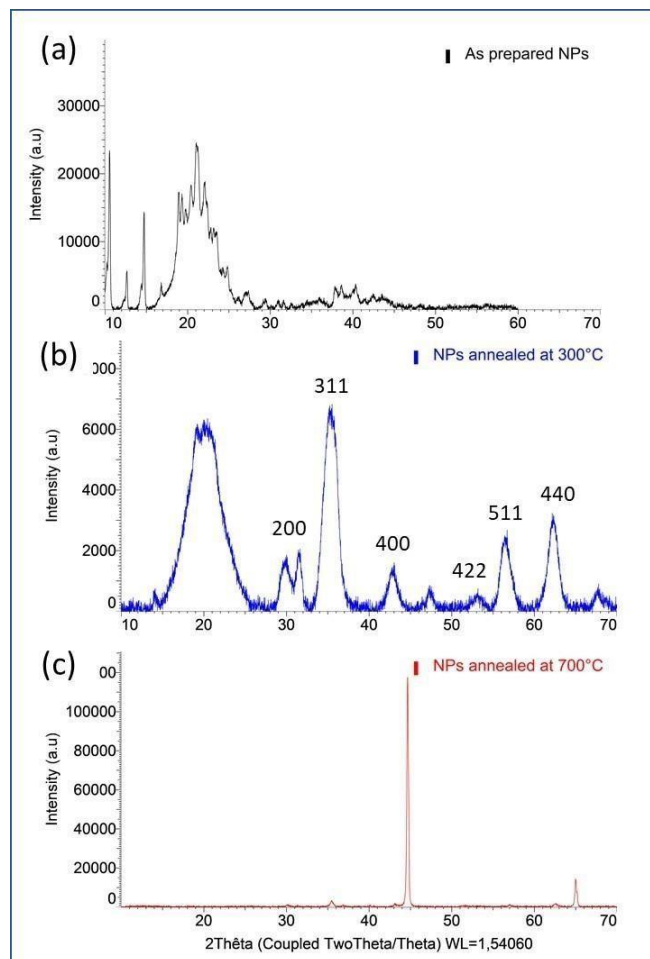


Figure II-4 : Diffractogrammes RX des NPs telles qu'elles sont préparées (a), après recuit à 300°C (b) et à 700°C (c).

Les diffractogrammes de rayons X des NPs recuites à 300°C (b) montrent les phases d'oxyde de fer des NPs qui sont moins cristallisées comparées à celles recuites à 700°C (c) qui représentent un matériau bien cristallisé revient au Fe métal avec une petite quantité de magnétite²⁸ (expliquée plus tard par l'analyse de spectroscopie Mössbauer). Ils peuvent

représenter soit la magnétite (Fe_2O_3) ou la maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), en raison de la similitude de leurs motifs XRD, il est impossible de faire la différence entre la phase magnétite et la phase maghémite avec l'analyse des rayons X^{26,30}. Pour préciser la nature de la phase, les nanoparticules ont été analysées par spectroscopie Mössbauer (voir **Figure II-5**). Mais il est à noter que le recuit modifie les propriétés du matériau, de sorte qu'il n'est pas certain que l'analyse XRD après recuit permet de caractériser la structure actuelle du matériau. Nous avons malgré tout effectué des analyses par Mössbauer mais nous considérerons que la structure des nanoparticules sera essentiellement obtenue par des analyses de microscopie électronique à transmission à haute résolution.

II.3.2 Spectroscopie Mössbauer :

Les spectres Mössbauer obtenus des NPs telles que préparées et celles recuites à 300°C et 700°C sont montrés dans (**Figure II-5**). Leurs paramètres hyperfins sont listés dans le **Tableau 2**.

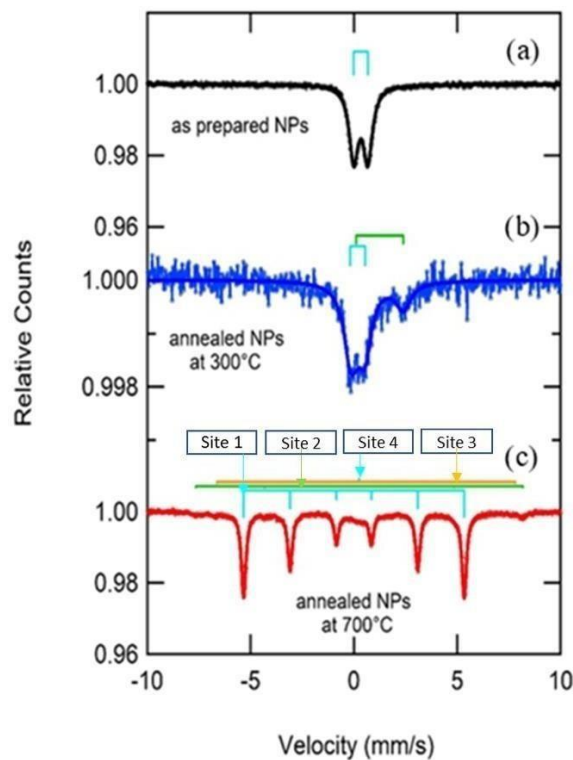


Figure II-5 : Spectres Mössbauer des NPs telles qu'elles sont préparées (noir), des NPs recuites à 300°C (bleu) et à 700°C (rouge).

Les spectres Mössbauer des NPs telles qu'elles sont préparées (a) représentent un doublet pur qui correspond aux NPs superparamagnétiques de $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ (fer au stade d'oxydation III). La présence de Fe^{3+} est également montrée dans le spectre (b) qui correspond aux NPs recuites à 300°C avec un pourcentage de 65% et les 35% restants représentent Fe^{2+} . D'autre part, le sextet bien défini obtenu à partir des NPs recuites à 700°C (c) (largeur de ligne 0.50mm/s) est attribué au métal Fe. Le site 1 de ce spectre correspond à Fe^0 et le pourcentage de cette phase est de 85%, les sites 2 et 3 correspondent à la magnétite avec un pourcentage de 8%, enfin le site 4 est attribué à 7% de NPs superparamagnétiques. Comme indiqué précédemment, nous ne pouvons pas considérer que les données après le recuit à 700°C puissent rendre compte de la microstructure et de la composition des nanoparticules ce qui est confirmé par les mesures de Mössbauer où la quantité de Fe III diminue drastiquement.

Tableau 2. Les paramètres hyperfins des NPs telles qu'elles sont préparées et celles recuites à 300 et 700°C obtenus par analyse Mössbauer.

T° (°C)	Component	IS (mm/s)	EQ (mm/s)	B(T)	Phase	Mass (%)
As prepared NPs	1	0,33	0,69	-	Fe III	
300°C	1	0,19	0,74	-	Fe III	65
	2	1,24	2,28	-	Fe II	35
700°C	1	0	0	33,1	Fe^0	85
	2	0,29	0	49	Fe_3O_4	8
	3	0,62	0	46		
	4	0,25	0		Fe III	7

II.3.3 Microscopie électronique en transmission (MET):

Afin de déterminer la taille et la morphologie des NPs, des caractérisations MET ont été effectuées, les images des NPs $\text{Zn}_{0,4}\text{Fe}_{2,6}\text{O}_4$ et les $\text{Zn}_{0,4}\text{Fe}_{2,6}\text{O}_4@ \text{MnFe}_2\text{O}_4$ ainsi que leurs histogrammes de distribution de taille, sont présentées par la **Figure II-6**. Les NPs sont monodispersées, elles ont une forme cubique et leurs diamètres moyens sont représentés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3. Diamètre moyen des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ et des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@MnFe_2O_4$.

$Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ (1)		$Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@MnFe_2O_4$ (2)	
Diametre (nm)	Image	Diametre (nm)	Image
5.0 ± 0.4	1a	10.0 ± 1.1	2a
10.0 ± 0.7	1b	15.0 ± 1.03	2b
18.0 ± 1.7	1c	22.0 ± 1.02	2c
45.0 ± 1.2	1d	50.0 ± 1.0	2d

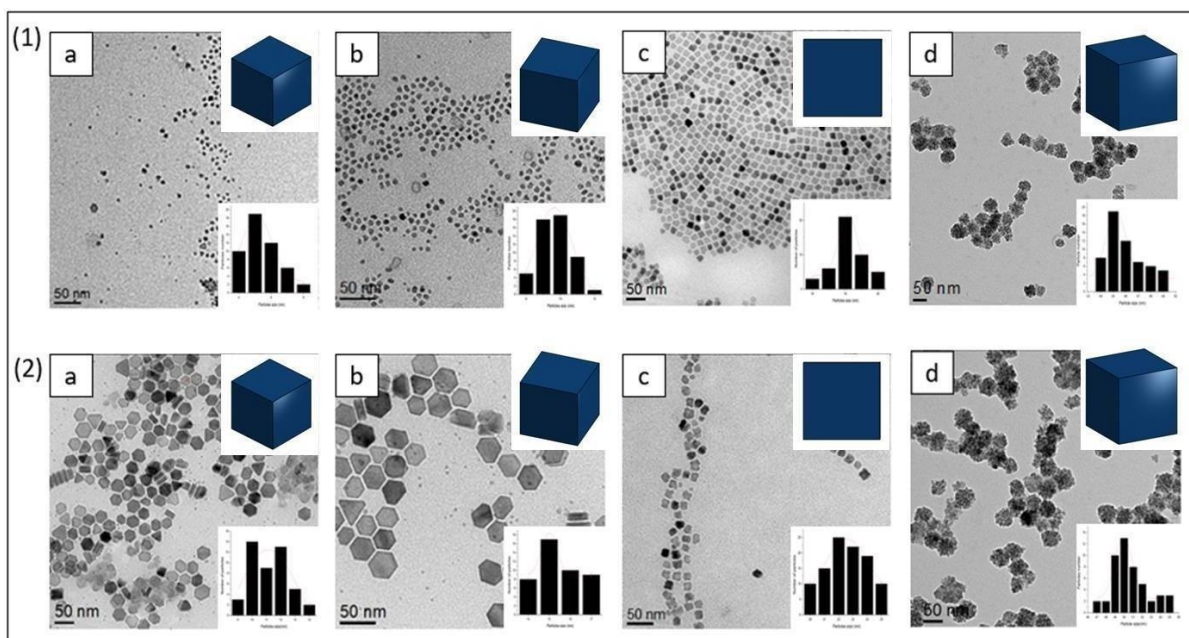


Figure II-6 : (1) Images MET (fond clair /bright field) des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$: 5nm (a), 10nm (b), 18nm (c) et 45nm (d). (2) Images MET des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@MnFe_2O_4$: 10nm (a), 15nm (b), 22nm (c) et 50nm (d).

Dans le but de confirmer la présence des différents éléments : Fe , Zn, O et Mn, une analyse par la microscopie électronique en transmission à haute résolution (MET-HR) en combinaison avec la microscopie électronique en transmission à énergie filtrée (EELS) a été réalisée sur les NPs

$Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ de 45nm et les NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ de 50nm . Les images de cette analyse sont représentées dans la **figure II-7**.

Ces images montrent la présence du Fe, O et le Zn dans les NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ (a) ainsi que les NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ (b) et elles confirment la présence du Mn comme un élément qui existe uniquement dans la coquille des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$. Les traces de silice en (a) et (b) peuvent être attribuées aux atomes de silicium constituant la diode Si du TEM excités par un effet photoélectrique dès lors que l'énergie des photos X incidentes est supérieure à celle de l'ionisation du silicium³².

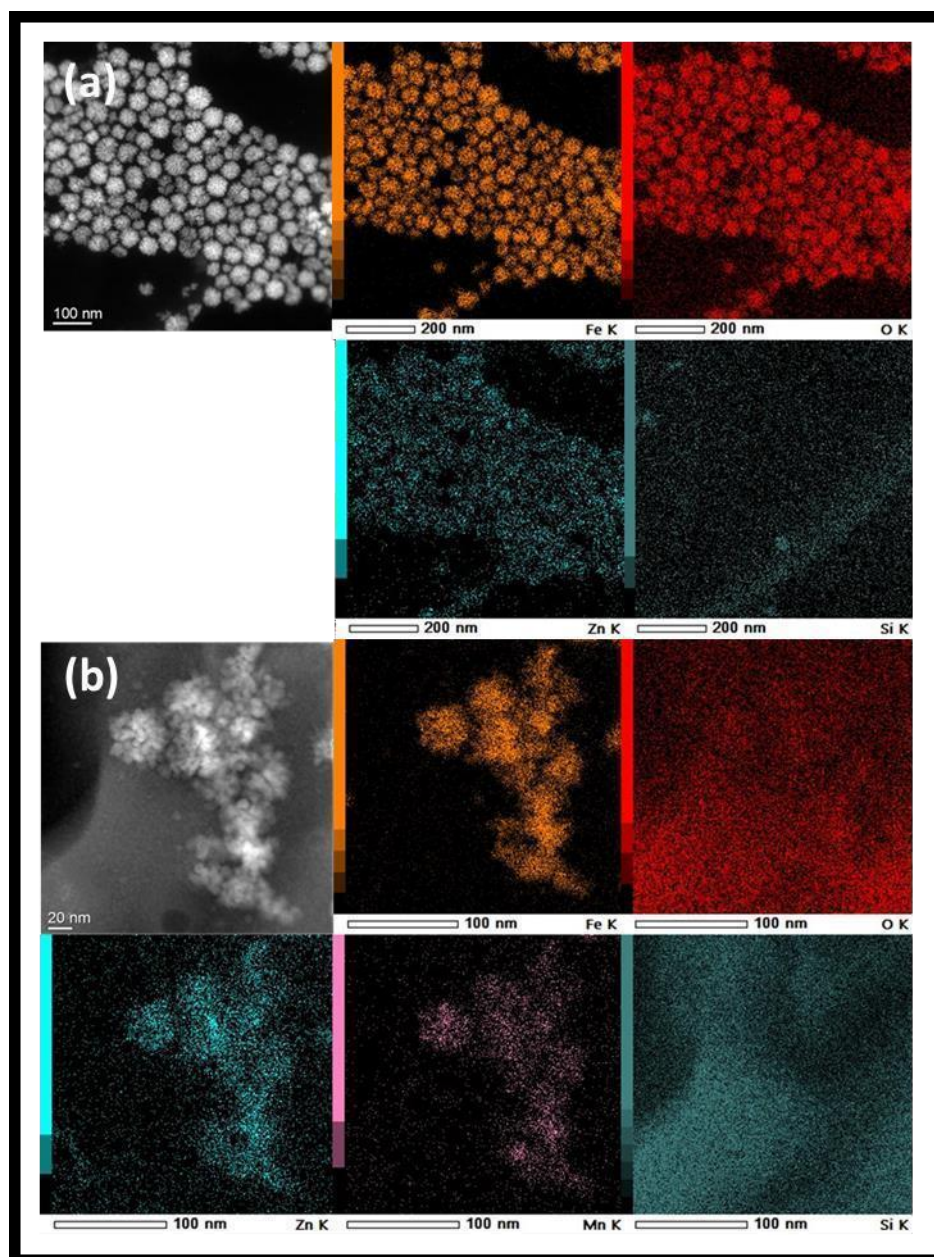


Figure II-7 : Images cartographie X des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ (45nm) (a) et des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@MnFe_2O_4$ (50nm) (b).

Les quatre différentes tailles des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@MnFe_2O_4$ 10,15, 22 et 50 nm présentent des pourcentages en Fe, Zn et Mn différents. Théoriquement et d'après les pourcentages calculés, le Fe représente la phase principale pour les quatre tailles des NPs avec des pourcentages plus élevés par rapport à ceux du Zn et Mn. Les pourcentages des métaux varient en fonction de la taille des NPs. Le Fe et le Zn diminue pour les tailles les plus petites des NPs par contre le Mn augmente pour les tailles les plus petites. Ceci peut être expliqué par le changement de la taille du cœur des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ par rapport à la coquille des NPs $MnFe_2O_4$. En effet, pour les NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@MnFe_2O_4$ 50nm, le cœur est de 45nm et la coquille est d'une épaisseur de 5nm. Par contre, pour les NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@MnFe_2O_4$ les plus petites 10nm, le cœur et la coquille ont la même taille de 5nm. Pour cela, plus la taille du cœur se rapproche de la taille de la coquille, le pourcentage en Fe et en Zn diminue : de 80,15 et 11,31% respectivement pour les 50nm à 69,36 et 2,015% respectivement pour les 10nm. Par ailleurs, le pourcentage du Mn s'élève : de 8,53% pour les 50nm à 28,62% pour les 10nm. Les pourcentages obtenus par les analyses ICP-OES montrent les mêmes variations des métaux par rapport aux quatre tailles des NPs avec une différence en pourcentages. L'augmentation des teneurs en Zn et Mn par rapport aux celles du Fe peut être attribuée aux traces libres Zn et Mn qui n'ont pas été dopé avec les oxydes de fer (voir **Figure II-7**).

II.3.5 Spectroscopie Infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF):

Les spectres FTIR des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ et des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@MnFe_2O_4$ sont présentés dans la **Figure II-10**. Les deux spectres sont identiques, ils présentent :

- Une petite bande autour de 3391 cm^{-1} correspondante à la liaison O-H de l'acide oléique³¹.
- Deux bandes intenses situées à 2925 et 2854 cm^{-1} qui correspondent respectivement aux liaisons d'étirement symétriques et asymétriques des groupes CH_2 de l'acide oléique.
- A 1721 cm^{-1} une autre bande qui revient à la vibration d'étirement C=O de la fonction COOH.
- A 1560 cm^{-1} et 1416 cm^{-1} deux bandes attribuées respectivement aux modes de vibration d'étirement symétrique et asymétrique de la fonction COO^- .
- Une autre petite bande présentée à 1086 cm^{-1} qui correspond aux liaisons C-O de l'acide oléique.
- Et enfin, une bande observée à 717 cm^{-1} attribuée aux liaisons Fe-O.

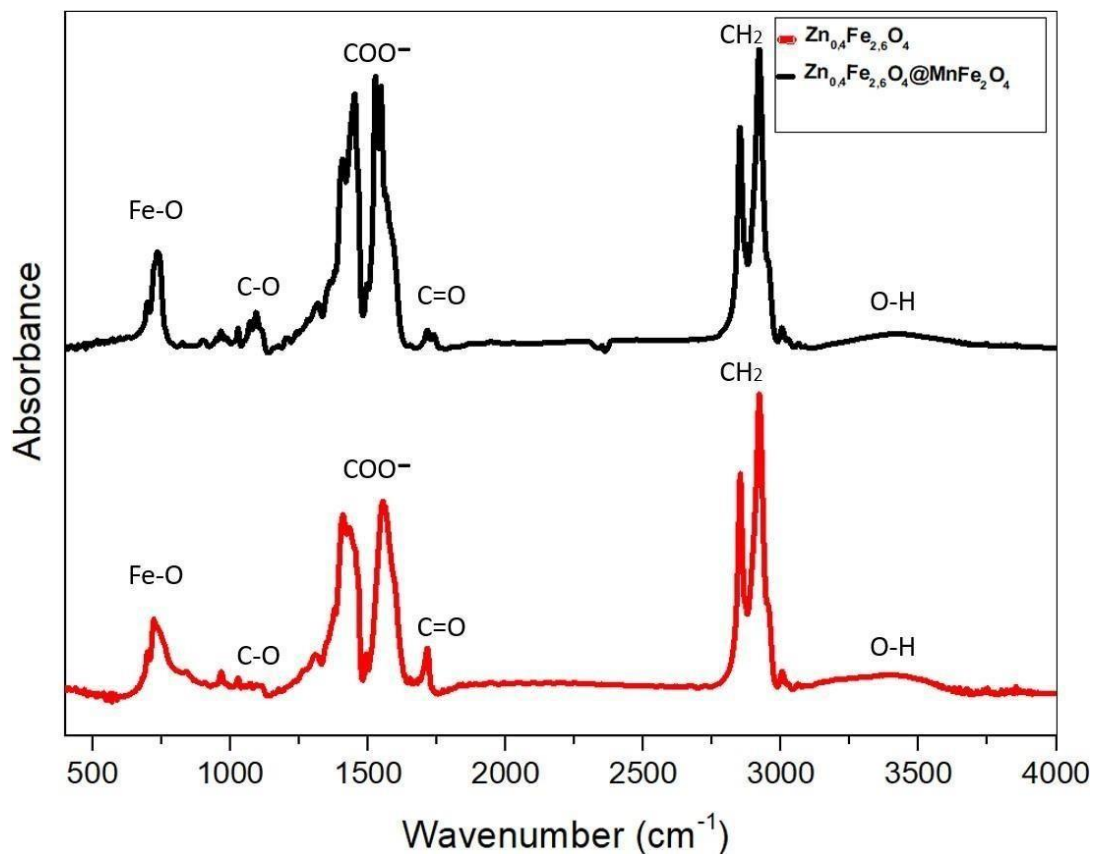


Figure II-10 : Spectres IRTF des NPs de $\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_{2.6}\text{O}_4$ (rouge) et $\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_{2.6}\text{O}_4 @ \text{MnFe}_2\text{O}_4$ (noir).

II.3.6 Propriétés magnétiques :

Les analyses de magnétisation en fonction du champ magnétique des NPs $\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_{2.6}\text{O}_4$ et des NPs $\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_{2.6}\text{O}_4 @ \text{MnFe}_2\text{O}_4$ sont présentées dans la **Figure II-11**. Le champ appliqué dans cette étude est de 5000 Oe. Les valeurs de cette analyse sont listés dans le **Tableau 4**.

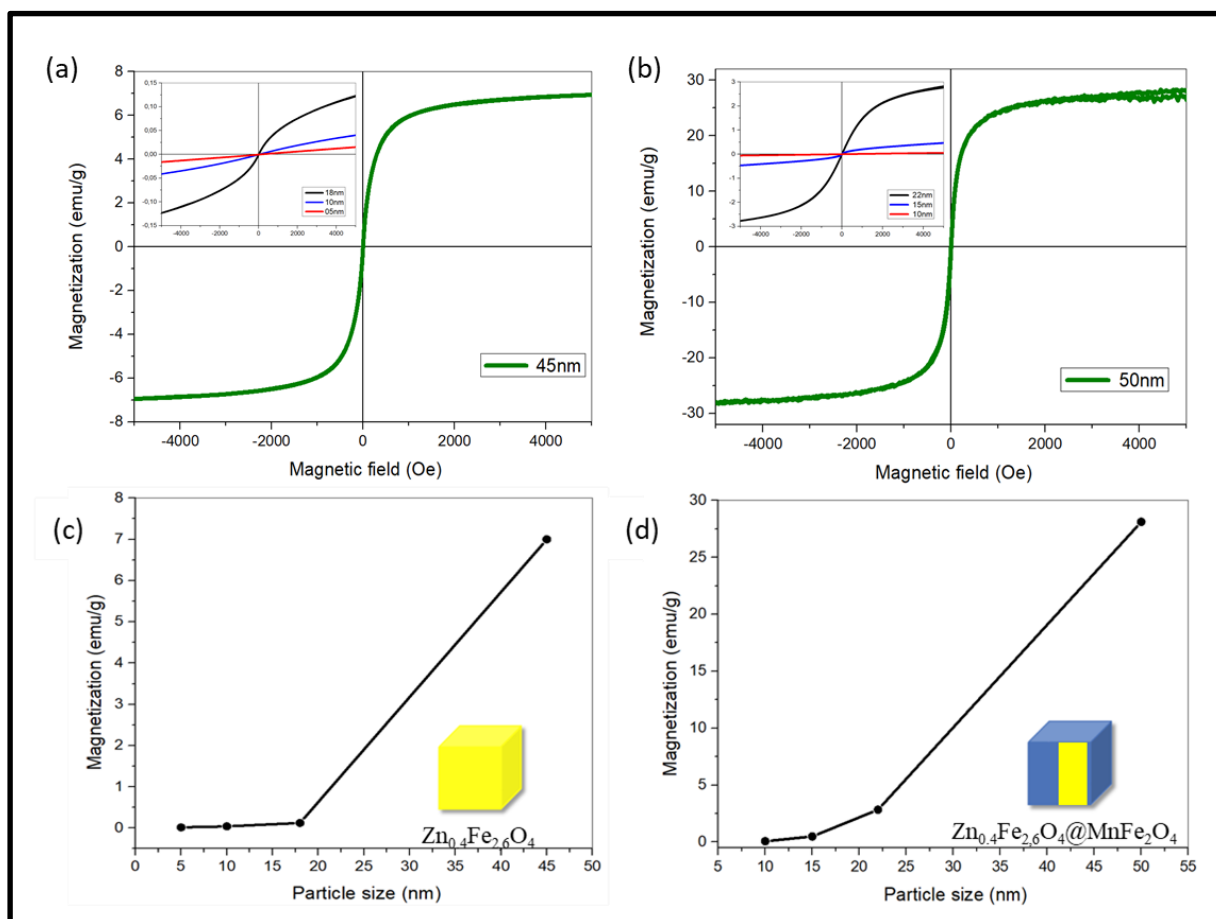


Figure II-11 : Courbes de magnétisation des NPs de $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ (a). NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@MnFe_2O_4$ (b). Magnétisation en fonction de la taille des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ (c). Magnétisation en fonction de la taille des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@MnFe_2O_4$ (d).

Tableau 4 : Valeurs de saturation magnétique des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ et des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@MnFe_2O_4$

$Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ Taille (nm)	Saturation magnétique emu / g	$Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@MnFe_2O_4$ Taille (nm)	Saturation magnétique emu / g
5,0 ± 0,4 (rouge)	0.0122	10,0 ± 1,1 (rouge)	0.0655
10,0 ± 0,7 (bleu)	0.0317	15,0 ± 1,03 (bleu)	0.4918
18,0 ± 1,7 (noir)	0.1295	22,0 ± 1,0 (noir)	2.8463
45,0 ± 1,2 (vert)	7.000	50,0 ± 1,0 (vert)	28,1214

Les valeurs de saturation magnétique des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ (1) de $5,0 \pm 0,4$ nm (rouge), $10,0 \pm 0,7$ nm (bleu), $18,0 \pm 1,7$ nm (noir) et $45,0 \pm 1,2$ nm (vert) sont respectivement de 0.0159, 0.041, 0.123 et 7 emu / g, et de 0.065, 0.478, 2.83, et 28,12 emu / g avec leur coquille correspondante ($MnFe_2O_4$) $10,0 \pm 1,1$ nm (rouge), $15,00 \pm 1,03$ nm (bleu), $22,00 \pm 1,02$ nm (noir) et $50,0 \pm 1,0$

nm (vert) respectivement (2). Les NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ de 45,0 nm et les $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ de 50,0 nm présentent les valeurs de saturation de magnétisation les plus élevées (c) et (d). Ceci explique que les valeurs de magnétisation augmentent avec la taille des NPs. Ce comportement dépendant revient à la contribution réduite de la surface lorsque la taille des NPs devient plus grande¹³. Les résultats obtenus montrent l'intérêt de l'ajout de la coquille qui améliore les propriétés magnétiques des NPs de plus de 4 fois. Pour les deux NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ et $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$, l'aimantation est proche de 0 à champ nul, ce qui est typique de l'effet superparamagnétique, et l'effet ferromagnétique est absent puisque les courbes d'aimantation ne présentent pas d'hystérésis.

II.3.7 Hyperthermie magnétique :

Dans la **figure II-12**, les valeurs de la SAR des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@MnFe_2O_4$ sont présentées en fonction de leurs différentes tailles 10, 15, 22 et 50 nm ainsi que les courbes de chauffage des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@MnFe_2O_4$ de 50nm en fonction du temps sous un champ magnétique alternatif de 536,5 kHz / 300 Gauss et 796 kHz / 200 Gauss.

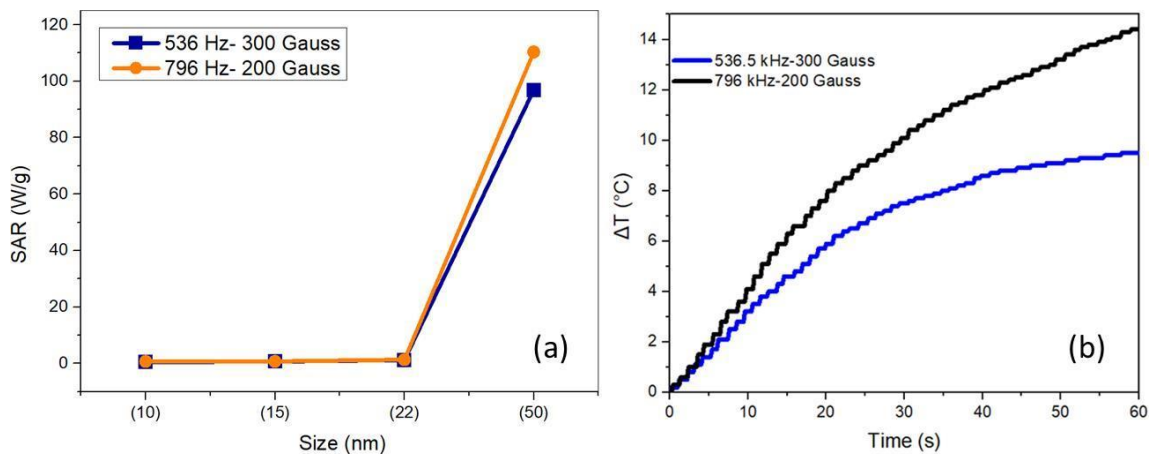


Figure II-12 : (a) Valeurs SAR des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@MnFe_2O_4$ selon leurs différentes tailles. (b) Courbes de chauffage des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@MnFe_2O_4$ de 50nm en fonction du temps sous un champ magnétique alternatif de 536,5 kHz /300 Gauss ou 796 kHz / 200 Gauss.

L'objectif principal de notre étude depuis le début était d'optimiser la taille des NPs afin d'augmenter les propriétés d'hyperthermie. Les précédentes études de mesure magnétique ont déjà montré l'importance des capacités magnétiques des NPs de 50 nm $\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_{2.6}\text{O}_4@\text{MnFe}_2\text{O}_4$ par rapport aux plus petites tailles (**Figure II- 9**). Ces capacités sont également confirmées par l'analyse de l'hyperthermie. Les NPs $\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_{2.6}\text{O}_4@\text{MnFe}_2\text{O}_4$ de 50nm donnent les valeurs de SAR les plus élevées par rapport aux NPs les plus petites avec 96,92 et 110,38 W/g sous un champ magnétique alternatif de 536 kHz et 796 kHz respectivement (**Figure II-10 (a)**). La chaleur générée par ces NPs est attribuée aux relaxations browniennes et de Néel. Les courbes de chauffage (**Figure II-10 (b)**) montrent une augmentation progressive de la température des NPs en fonction du temps. Après 1mn (60s) la température des NPs atteint 9,56 et 14,42 C° sous un champ magnétique de 536 kHz et 796 kHz respectivement.

II.4 Conclusion :

Dans cette étude, différentes tailles de NPs cœur/coquille à base d'oxyde de fer superparamagnétiques monodisperses cubiques ont été synthétisées par décomposition thermique. Les résultats obtenus par les analyses magnétiques montrent que les plus grosses particules de 50 nm présentent des propriétés magnétiques supérieures à celles des plus petites. En revanche, ils justifient le rôle de la coquille dans l'amélioration des propriétés magnétiques des NPs par rapport au cœur seul plus de 4 fois. Les résultats d'hyperthermie ont confirmé la capacité de ces NPs à présenter de bons résultats de chauffage après une courte période de temps (60s).

II.5 Références :

1. Simeonidis K, Mourdikoudis S, Moulla M, et al. Controlled synthesis and phase characterization of Fe-based nanoparticles obtained by thermal decomposition. *J Magn Magn Mater*. 2007;316(2):e1-e4. doi:10.1016/j.jmmm.2007.02.009
2. Chatterjee J, Haik Y, Chen CJ. Size dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *J Magn Magn Mater*. Published online 2003:6.
3. Patsula V, Moskvina M, Dutz S, Horák D. Size-dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *J Phys Chem Solids*. 2016;88:24-30. doi:10.1016/j.jpcs.2015.09.008
4. Cardona JEM, Louaguef D, Gaffet E, Ashammakhi N, Alem H. Review of core/shell nanostructures presenting good hyperthermia properties for cancer therapy. *Mater Chem Front*. 2021;5(17):6429-6443. doi:10.1039/D1QM00353D
5. Bañobre-López M, Teijeiro A, Rivas J. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. *Rep Pract Oncol Radiother*. 2013;18(6):397-400. doi:10.1016/j.rpor.2013.09.011
6. Saeedi M, Vahidi O, Bonakdar S. Synthesis and characterization of glycyrrhizic acid coated iron oxide nanoparticles for hyperthermia applications. *Mater Sci Eng C*. 2017;77:1060-1067. doi:10.1016/j.msec.2017.04.015
7. Nguyen KT. Targeted Nanoparticles for Cancer Therapy: Promises and Challenges. *J Nanomedicine Nanotechnol*. 2011;02(05). doi:10.4172/2157-7439.1000103e
8. Mahmoudi M, Hofmann H, Rothen-Rutishauser B, Petri-Fink A. Assessing the In Vitro and In Vivo Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Chem Rev*. 2012;112(4):2323-2338. doi:10.1021/cr2002596
9. Amara D, Felner I, Nowik I, Margel S. Synthesis and characterization of Fe and Fe₃O₄ nanoparticles by thermal decomposition of triiron dodecacarbonyl. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp*. 2009;339(1-3):106-110. doi:10.1016/j.colsurfa.2009.02.003
10. Laurent S, Dutz S, Häfeli UO, Mahmoudi M. Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci*. 2011;166(1-2):8-23. doi:10.1016/j.cis.2011.04.003
11. Abenojar EC, Wickramasinghe S, Bas-Concepcion J, Samia ACS. Structural effects on the magnetic hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles. *Prog Nat Sci Mater Int*. 2016;26(5):440-448. doi:10.1016/j.pnsc.2016.09.004
12. Gavrilov-Isaac V. Synthèse de nanoparticules magnétiques à énergie d'anisotropie modulable. :174.
13. Noh S hyun, Na W, Jang J tak, et al. Nanoscale Magnetism Control via Surface and Exchange Anisotropy for Optimized Ferrimagnetic Hysteresis. *Nano Lett*. 2012;12(7):3716-3721. doi:10.1021/nl301499u

14. Dutz S, Buske N, Landers J, Gräfe C, Wende H, Clement JH. Biocompatible Magnetic Fluids of Co-Doped Iron Oxide Nanoparticles with Tunable Magnetic Properties. *Nanomaterials*. 2020;10(6):1019. doi:10.3390/nano10061019
15. Noh S hyun, Moon SH, Shin TH, Lim Y, Cheon J. Recent advances of magneto-thermal capabilities of nanoparticles: From design principles to biomedical applications. *Nano Today*. 2017;13:61-76. doi:10.1016/j.nantod.2017.02.006
16. Vasilakaki M, Binns C, Trohidou KN. Susceptibility losses in heating of magnetic core/shell nanoparticles for hyperthermia: a Monte Carlo study of shape and size effects. *Nanoscale*. 2015;7(17):7753-7762. doi:10.1039/C4NR07576E
17. Papis E, Rossi F, Raspanti M, et al. Engineered cobalt oxide nanoparticles readily enter cells. *Toxicol Lett*. 2009;189(3):253-259. doi:10.1016/j.toxlet.2009.06.851
18. Barrioni BR, Naruphontjirakul P, Norris E, et al. Effects of manganese incorporation on the morphology, structure and cytotoxicity of spherical bioactive glass nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*. 2019;547:382-392. doi:10.1016/j.jcis.2019.04.016
19. Predoi D. A STUDY ON IRON OXIDE NANOPARTICLES COATED WITH DEXTRIN OBTAINED BY COPRECIPIATION. :5.
20. Takami S, Sato T, Mousavand T, Ohara S, Umetsu M, Adschiri T. Hydrothermal synthesis of surface-modified iron oxide nanoparticles. *Mater Lett*. 2007;61(26):4769-4772. doi:10.1016/j.matlet.2007.03.024
21. Xu J, Yang H, Fu W, et al. Preparation and magnetic properties of magnetite nanoparticles by sol-gel method. *J Magn Magn Mater*. 2007;309(2):307-311. doi:10.1016/j.jmmm.2006.07.037
22. Iida H, Nakanishi T, Takada H, Osaka T. Preparation of magnetic iron-oxide nanoparticles by successive reduction-oxidation in reverse micelles: Effects of reducing agent and atmosphere. *Electrochimica Acta*. 2006;52(1):292-296. doi:10.1016/j.electacta.2006.05.007
23. Li S, Zhang T, Tang R, Qiu H, Wang C, Zhou Z. Solvothermal synthesis and characterization of monodisperse superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J Magn Magn Mater*. 2015;379:226-231. doi:10.1016/j.jmmm.2014.12.054
24. Joseyphus RJ, Kodama D, Matsumoto T, Sato Y, Jeyadevan B, Tohji K. Role of polyol in the synthesis of Fe particles. *J Magn Magn Mater*. 2007;310(2):2393-2395. doi:10.1016/j.jmmm.2006.10.1132
25. Chin AB, Yaacob II. Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart's procedure. *J Mater Process Technol*. 2007;191(1-3):235-237. doi:10.1016/j.jmatprotec.2007.03.011
26. Glasgow W, Fellows B, Qi B, et al. Continuous synthesis of iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles via thermal decomposition. *Particuology*. 2016;26:47-53. doi:10.1016/j.partic.2015.09.011

27. Sharifi Dehsari H, Halda Ribeiro A, Ersöz B, Tremel W, Jakob G, Asadi K. Effect of precursor concentration on size evolution of iron oxide nanoparticles. *CrystEngComm*. 2017;19(44):6694-6702. doi:10.1039/C7CE01406F
28. Amara D, Felner I, Nowik I, Margel S. Synthesis and characterization of Fe and Fe₃O₄ nanoparticles by thermal decomposition of triiron dodecacarbonyl. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp*. 2009;339(1-3):106-110. doi:10.1016/j.colsurfa.2009.02.003
29. Périgo EA, Hemery G, Sandre O, et al. Fundamentals and advances in magnetic hyperthermia. *Appl Phys Rev*. 2015;2(4):041302. doi:10.1063/1.4935688
30. Köçkar H, Karaagac O, Özel F. Effects of biocompatible surfactants on structural and corresponding magnetic properties of iron oxide nanoparticles coated by hydrothermal process. *J Magn Magn Mater*. 2019;474:332-336. doi:10.1016/j.jmmm.2018.11.053
31. Soares PIP, Laia CAT, Carvalho A, et al. Iron oxide nanoparticles stabilized with a bilayer of oleic acid for magnetic hyperthermia and MRI applications. *Appl Surf Sci*. 2016;383:240-247. doi:10.1016/j.apsusc.2016.04.181
32. (PDF) cours EDX 2009 - PDFSLIDE.NET.htm.

Chapitre III : Fonctionnalisation des nanoparticules pour l'encapsulation et la délivrance du principe actif

III.1 Introduction :

Comme nous l'avons indiqué dans le chapitre précédent, les nano-objets à base d'oxyde de fer ont connu un développement très rapide dans le domaine de la nanomédecine notamment pour la thérapie anticancéreuse grâce à leurs propriétés magnétiques et leurs faibles toxicités. Ceci a permis leur sélection comme outil pertinent pour combiner l'hyperthermie magnétique et la libération contrôlée du médicament anticancéreux¹ dans le cadre de la thérapie cancéreuse.

Les nano-objets de type cœur/coquille développés dans le cadre de ce travail de thèse, présentent de nombreux avantages dans le domaine de la délivrance du médicament. En effet, la combinaison entre les propriétés magnétiques du cœur et les propriétés macromoléculaires de la coquille confère aux nano-objets des propriétés intéressantes. Les systèmes fonctionnalisés par des polymères sensibles souvent nommés « systèmes intelligents » et qui répondent à un stimuli extérieur tel que le pH², la lumière³ ou la température⁴ sont souvent les plus prometteurs pour la délivrance contrôlée du médicament et les plus étudiés dans la littérature. Par exemple, dans le cas des polymères thermosensibles, une augmentation de la température conduit au changement du comportement colloïdales de ce dernier dans le solvant à une certaine température nommée la LCST (Lower Critical Solution Temperature)⁵. Ce changement de l'état hydrophile à l'état hydrophobe entraîne la libération du médicament lorsque l'encapsulation du médicament est essentiellement due aux interactions hydrogènes⁴.

Nous avons déjà mentionné dans le chapitre I, les différents types de polymères thermosensibles les plus utilisés dans des applications biomédicales et nous avons justifié les avantages des polymères qui sont à base MEO₂MA (2-(2-méthoxy) éthyle méthacrylate) et OEGMA (oligo (éthylène glycol) méthacrylate) par rapport aux autres dans le secteur de la délivrance du médicament tels que la biocompatibilité et la biodégradabilité⁶. Nous avons également citer les deux différentes techniques de greffage du polymère sur la surface des nanoparticules : « grafting-to » et « grafting-from » et pour une densité de greffage supérieure, nous avons choisis d'utiliser la deuxième technique en faisant croître le polymère à partir de la surface des nanoparticules. La technique de polymérisation utilisée lors de notre étude et la technique de la polymérisation radicalaire par transfert d'atome à travers les activateurs régénérés par transfert d'électron (ARGET-ATRP) qui a été décrite précédemment. L'avantage de cette technique pour

le greffage du polymère ainsi que pour l'encapsulation du médicament anticancéreux (Doxorubicine) a été démontré dans le travail de thèse mené par Zied Ferjaoui *et al*⁷.

Dans ce travail, des nanoparticules de $Fe_{3-\delta}O_4$ type cœur/coquille ont été obtenues à partir de la croissance, par polymérisation vivante contrôlée, de copolymères basés sur des fragments de méthacrylate de 2-(2-méthoxy) éthyle (MEO_2MA) et de méthacrylate d'Oligo (éthylène glycol) (OEGMA), ce qui a donné $P(MEO_2MA_x-OEGMA_{100-x})$ (le rapport des deux monomères a été modifié pour ajuster la température de libération d'un médicament modèle (doxorubicine). Ils ont montré que ces nanoparticules étaient capables de charger et de libérer la Doxorubicine avec un taux de charge (DLC) de 6,6% et une efficacité de chargement de 56,1% ce qui est presque similaire aux résultats de la littérature.

Dans ce chapitre, les nanoparticules $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4 @ MnFe_2O_4$ présentées précédemment, seront fonctionnalisées par le copolymère $poly(MEO_2MA_{60}-OEGMA_{40})$ afin d'obtenir un système thermosensible capable d'encapsuler et de libérer la Doxorubicine en changeant son comportement colloïdal sous l'effet de la température générée par le processus d'hyperthermie. La libération de la doxorubicine en fonction de différentes températures ainsi qu'en fonction du temps à deux températures fixes sera étudiée dans l'eau et dans le milieu physiologique afin d'imiter au mieux les conditions physiologiques du corps humain. L'objectif de ce chapitre est représenté dans la **figure III-1**.

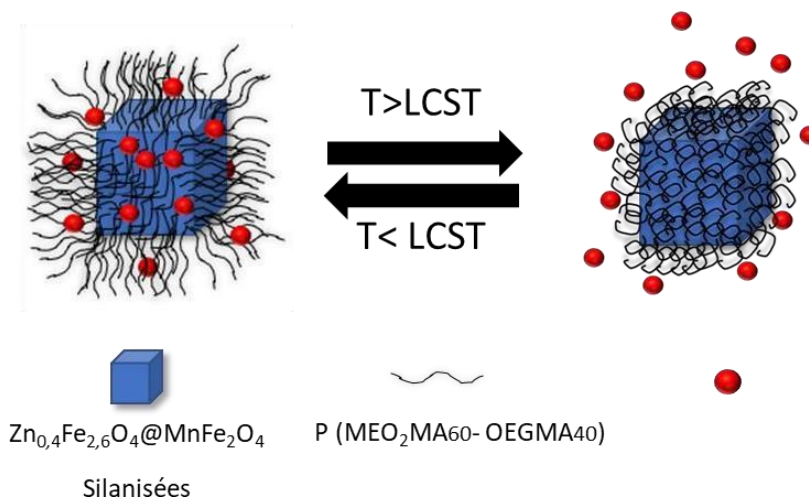


Figure III-1 : Objectif du chapitre III.

III.2 Matériels et méthodes :

III.2.1 Produits utilisés :

Les produits chimiques utilisés pour la silanisation des nanoparticules sont le (chlorométhyl) phényléthyl triméthoxysilane (CMPETMS) de Gelest, > 95%, l'hydroxyde de tétraméthylammonium pentahydrate (TMAH) (99,8%), le (3-aminopropyl) triéthoxysilane (APTES), le α -bromoisobutyryl bromide (BIBB) et le toluène (réactif de laboratoire, > 99,3%) de Sigma-Aldrich.

Pour la polymérisation, on a utilisé des fragments de méthacrylate de 2-(2-méthoxy) éthyle (MEO₂MA) (98%) et de méthacrylate d'oligo (éthylène glycol) (OEGMA) (98%), du diméthyl sulfoxyde (DMSO) (> 99,8%) de Sigma-Aldrich et de l'eau Milli-Q.

La doxorubicine (DOX) médicale utilisée pour l'encapsulation provient du laboratoire « Accord » avec une concentration de 50mg/25ml. Le DMEM utilisé est de la marque Gibco. Il contient 4,5 g/L de D-glucose, de la L-Glutamine, 25 mM de tampon HEPES et pas de pyruvate de sodium, ni de rouge de phénol.

III.2.2 Méthodes :

III.2.2.1 Silanisation des NPs Zn_{0,4}Fe_{2,6}O₄@ MnFe₂O₄ de 22nm par le CMPETMS :

Le silane joue le rôle d'un amorceur de polymérisation qui permettra le greffage du polymère sur la surface des nanoparticules.

Le protocole de la silanisation que nous avons adopté se fait en deux étapes :

- **La première étape :** consiste à disperser 100mg de NPs Zn_{0,4}Fe_{2,6}O₄@ MnFe₂O₄ dans une solution de 30 ml de toluène. Le mélange est soumis aux ultrasons pendant 15 mn pour bien disperser les NPs dans le solvant. Puis, 0,4 mmol, (V = 98,2 μ l) de chlorométhylphényléthyltriméthoxysilane (CMPETMS) est injecté dans la solution. Le mélange est chauffé à 50°C sous une pression d'argon et sous une agitation magnétique.

À cette température, 2 ml d'une solution de TMAH (217,5 mg dans 6 ml d'éthanol) a été ajouté au mélange. Ce dernier est agité pendant 24 heures. Après les 24h, les NPs

sont refroidies jusqu'à la température ambiante, récupérées et lavées deux fois avec le toluène par une centrifugation (10000rpm/10mn).

- **la deuxième étape** : les NPs sont dispersées dans 20 ml de toluène. Le mélange est chauffé à 50°C sous une agitation et sous l'argon. À cette température, 4 ml d'une solution de TMAH sont ajoutés. Nous laissons agir les réactifs pendant 30 mn. Enfin, le mélange est refroidi. Les NPs sont récupérées et lavées deux fois avec le toluène par une centrifugation (10000rpm/10mn) (**Figure III-2**).

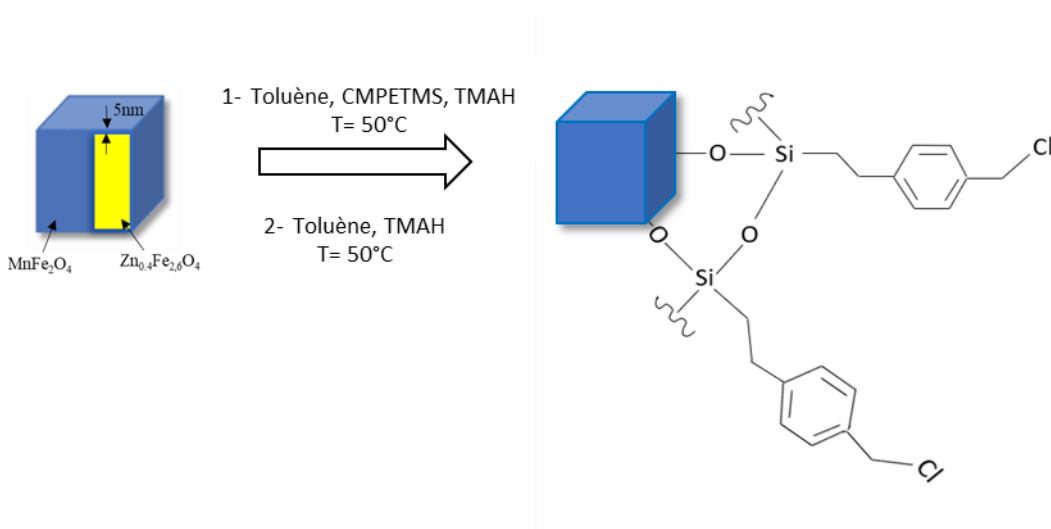


Figure III-2 : Schéma de la silanisation des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ par le CMPETMS.

III.2.2.2 Silanisation des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ de 50nm par les APTES-BIBB :

La silanisation des NPs avec les APTES ((3-Aminopropyl) triéthoxysilane) se fait également en deux étapes :

Première étape : 100mg de NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ ont été dispersées dans un volume de 30ml de toluène. Puis, le mélange a été mis aux ultrasons pendant 15 mn afin de bien disperser les NPs dans le solvant. Ensuite, le mélange a été mis sous bain d'huile, chauffage à 50°C sous agitation magnétique et sous argon pendant 30mn. A cette température, un volume de 90µl des APTES a été ajouté goutte à goutte. Le mélange est resté sous agitation magnétique pendant 24h à 50°C et sous argon.

Deuxième étape : après les 24h, les NPs ont été récupérées par une centrifugation (1000rpm/10mn) et lavées 2 fois avec le toluène. Puis, elles ont été redispersées dans 30ml de toluène anhydre. Ensuite, 150µl de TEA (triéthylamine) a été ajouté au mélange. Après, le mélange a été refroidit à 0°C avec un bain de glace. A cette température, 75µl de BIBB (α- bromoisobutyryl bromide) a été injecté au mélange. Ce mélange est resté sous agitation pendant 30mn à 0°C puis 24h à une température ambiante. Enfin, les NPs ont été récupérées par une centrifugation (1000rpm/10mn) et lavées 2 fois avec le toluène (**Figure III-3**). .

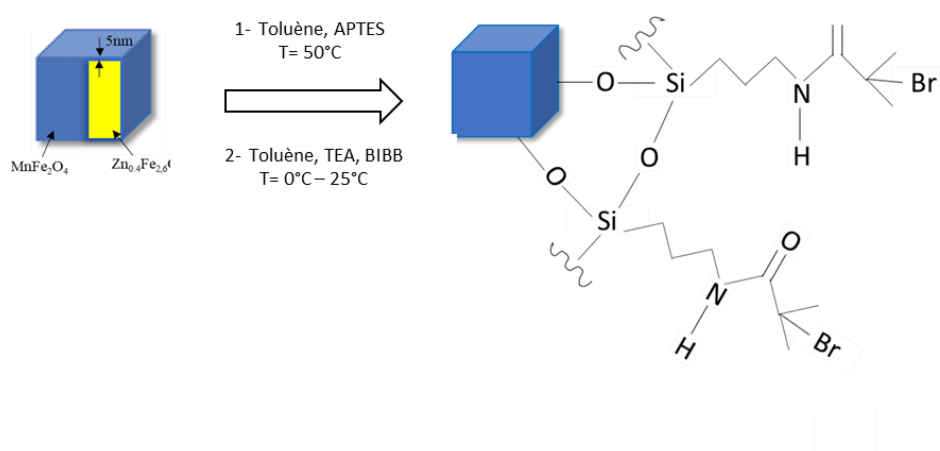


Figure III-3 : Schéma de la silanisation des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ par les APTES-BIBB.

III.2.2.3 Polymérisation des NPs@ CMPETMS (22nm) et des NPs@ APTES-BIBB (50nm) par le P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) :

La fonctionnalisation des NPs@ CMPETMS et des NPs @ APTES-BIBB par le P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) a été réalisée selon le processus ARGET-ATRP qui a été décrit dans le premier chapitre.

Premièrement, les NPs (50mg) ont été dissoutes dans le DMSO (30ml) puis dispersées aux ultrasons pendant 15mn. Ensuite, un volume fixe de 2-(2-méthoxy) éthyle méthacrylate (MEO₂MA) (1,16ml) et d'oligo (éthylène glycol) méthacrylate (OEGMA) (1,14ml) a été ajouté à la solution goutte à goutte. Puis, une quantité de CuBr₂ (200µl) (CuBr₂/TPMA/DMSO)

(0.884 mmol CuBr₂, 4.3 mmol TPMA) a été injectée. Ce dernier, joue le rôle d'activation de greffage du polymère sur le silane. La réaction est réalisée sous argon et sous agitation magnétique pendant 30mn. Après les 30mn, un volume d'hydrazine/DMSO (250μl) a été injecté dans le mélange. Le mélange reste sous argon et sous agitation magnétique pendant 2 heures. Enfin, le mélange est versé dans 300ml d'eau chauffée à 50°C pour permettre la précipitation des NPs. Les NPs sont lavées deux fois à l'eau chaude (50°C) (**Figure III-4**).

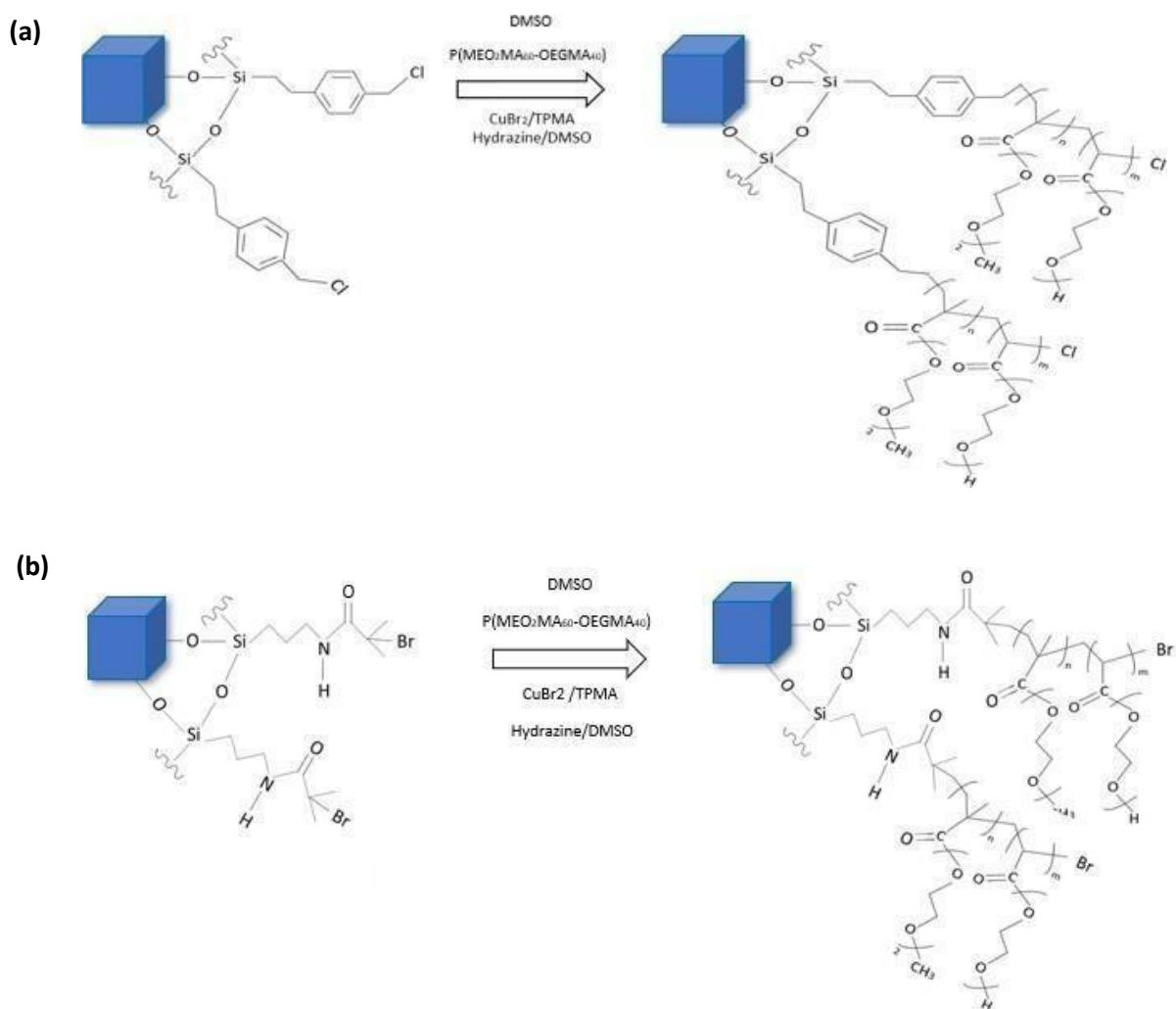


Figure III-4 : Schémas de la polymérisation des NPs @CMPETMS (a) et des NPs@APTMS-BIBB par le P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) (b).

III.2.2.4 Encapsulation de la DOX:

la doxorubicine a été encapsulée dans les NPs en mettant en suspension 2,5 mg de NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) dans 5ml d'eau MilliQ et 5ml de milieu physiologique (DMEM) séparément. Le mélange a été mis aux ultrasons pour bien disperser les NPs. Puis, il a été mis en contact avec 2,5mg de DOX (0,5mg.mL⁻¹). Le mélange a été agité dans l'obscurité pendant 24h. Après les 24h , les NPs chargées en DOX ont été lavées par l'eau Milli-Q et par le DMEM 4 fois jusqu'à ce que le surnageant soit clair et aucun signal de DOX ne puisse être détecté par spectroscopie UV-visible (**Figure III-5**).

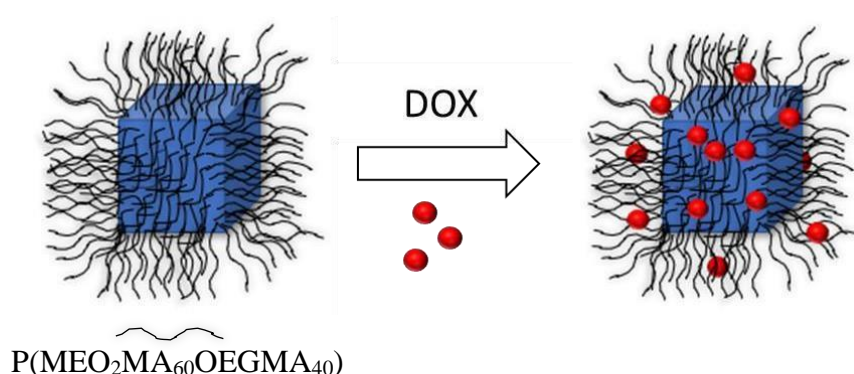


Figure III-5 : Encapsulation de la DOX.

A la fin les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) chargées en DOX ont été dispersées dans 3 ml de solvant (eau et DMEM) pour l'analyse UV-visible.

Le relargage de la DOX a été étudié en mesurant l'absorbance de la DOX libérée dans le surnageant par UV-visible à 480nm en fonction de la température et du temps.

Pour les mesures en fonction de la température, les NPs chargées en DOX ont été dispersées respectivement dans 3 mL d'eau Milli-Q et dans 3 mL de DMEM. Ces deux solutions ont été chauffées pendant 5 min une fois la température ciblée atteinte. Les NPs sont ensuite séparées du surnageant grâce à un aimant. Le surnageant est analysé par UV-vis puis les NPs sont à nouveau dispersées dans ce surnageant. Cette opération est répétée pour plusieurs températures entre 35°C et 50°C.

Les mesures de la cinétique de libération de la DOX ont été étudiées pareil dans l'eau Milli-Q et dans le DMEM en mesurant l'absorbance du surnageant, obtenu de la même manière que

précédemment chaque une heure de 1 à 50h. Pour chaque milieu, deux températures sont fixées : 37°C (température physiologique) et 42°C (LCST).

Il est possible de déterminer le taux de charge du médicament (DLC) sur les NPs et l'efficacité d'encapsulation (DLE) grâce aux formules suivantes :

$$DLC \% = \frac{\text{masse de DOX encapsulée dans les NPs}}{\text{masse de NPs}} \times 100$$

$$DLE \% = \frac{\text{masse de DOX encapsulée dans les NPs}}{\text{masse de DOX mise en contact avec les NPs}} \times 100$$

Les résultats du relargage obtenus seront comparés aux trois modèles mathématiques empiriques qui décrivent la nature du mécanisme de la libération du principe actif par des NPs cœur/coquille. Les trois modèles comparés sont⁸⁻¹¹ :

Modèle d'ordre zéro : Ce modèle représente la vitesse de libération indépendante de la concentration du principe actif dissous. Si la libération du principe actif suit le modèle cinétique d'ordre zéro, cela explique que la libération du principe actif se fait d'une manière constante et la libération est contrôlée. Ce modèle est représenté par l'équation suivante :

$$M_t = M_0 + K_0 \cdot t \quad (\text{III-1})$$

Ou :

M_t : la quantité de principe actif libérée au temps t ,

M_0 : la quantité de principe actif initiale (généralement $M_0 = 0$),

K_0 : la constante de libération d'ordre zéro.

Modèle premier ordre : Ce modèle représente la vitesse de libération dépendante de la concentration du principe actif dissous. Dans ce modèle, la libération du principe actif est

rapide au début. Cette vitesse est expliquée par la diffusion du principe actif qui est encapsulé proche de la surface puis elle se ralentit.

L'équation de ce modèle est représentée comme suite :

$$\ln(M_0 - M_t) = \ln(M_0) - K_1 \cdot t \quad (\text{III-2})$$

Avec :

M_0 : la quantité de principe actif avant la dissolution,

M_t : la quantité de principe actif libérée au temps t ,

K_1 : la constante de libération de premier ordre.

Modèle d'Higuchi : Ce modèle définit la libération par diffusion et il décrit la libération à partir des matrices solides. L'équation de ce modèle est la suivante :

$$M_t = K_h \cdot \sqrt{t} \quad (\text{III-3})$$

Où :

M_t : la quantité de principe actif libérée au temps t ,

K_h : la constante de vitesse. La libération s'effectue par diffusion et ne dépend pas de M_0 .

III.2.3 Matériels :

III.2.3.1 Mesures d'analyse thermogravimétrique (ATG) :

Les analyses ATG ont été réalisées avec un Setaram Setsys évolution 1750. Les expériences ont été effectuées en air sec (débit 20 mL.min⁻¹) comme gaz porteur et une rampe de température de 5 °C.min⁻¹ de la température ambiante à 550 °C.

III.2.3.3 Microscopie électronique en transmission à haute résolution (MET-HR) :

Les images de la microscopie électronique en transmission (TEM) et de microscopie électronique en transmission à balayage (STEM) ont été réalisées sur un microscope JEOL JEM - ARM 200F Cold FEG fonctionnant à 200 kV et équipé d'un correcteur de sonde à aberration sphérique (Cs). Les compositions chimiques ont été déterminées par spectroscopie X dispersive en énergie (EDXS). Les cartes X ont été enregistrées sur un spectromètre Jeol (SDD, Jeol DRY SD 30 GV).

III.2.3.4 Diffusion dynamique de la lumière (DLS) :

Les mesures de diffusion de la lumière ont été effectuées à l'aide d'un ALV/ CGS-3 système de goniomètre compact, équipé d'un corrélateur numérique tau multiple ALV-7004 et un laser He-Ne optimisé d'une puissance de sortie de 22 mW fonctionnant à une longueur $\lambda = 632,8$ nm. Pendant l'analyse, l'échantillon a été conservé dans un bain de toluène pour maintenir une température constante de l'échantillon (de 20 °C à 50 °C) et pour supprimer les reflets du verre-air- interface de la cellule d'échantillonnage. La lumière diffusée a été détectée à angles de diffusion $30^\circ \leq \theta \leq 150^\circ$, correspondant à la diffusion régime vectoriel $0,00459 \text{ nm}^{-1} \leq q \leq 0,00255 \text{ nm}^{-1}$. qui peut être calculée en utilisant l'équation (III- 4), où n est l'indice de réfraction du solvant (eau).

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \left(\frac{\theta}{2} \right) \quad (\text{III-4})$$

En DLS, les fonctions d'autocorrélation ont été analysées en termes de distribution du temps de relaxation (τ) en fonction de la routine REPES. Le rayon hydrodynamique moyen (RH) a été estimé à l'aide de l'équation de Stokes-Einstein (III-5), où D_0 est des nanoobjets

déterminé de la pente de la dépendance q^2 du taux de relaxation ($\langle \Gamma \rangle = Dq^2$), k_B est la constante de Boltzmann, T est la température absolue et η_s est la viscosité du solvant (eau).

$$R_H = \frac{k_B T}{6M \eta_s D_0} \quad (\text{III-5})$$

III.2.3.5 Superconducting Quantum Interference Device (SQUID) :

Les mesures du magnétisme réalisées dans ce chapitre ainsi que les courbes ZFC/FC des NPs ont été réalisées à l'aide d'un magnétomètre MPMS3 Squid produit par « Quantum design ». Les paramètres de mesures sont comme suite : Amplitude vibration = 5nm , temps moyen = 2sec. Les échantillons ont été analysés dans une capsule gélatine fixée dans une paille en verre.

III.2.2.6 Hyperthermie magnétique :

Les mesures du taux d'absorption spécifique (SAR) ont été réalisées par une méthode calorimétrique sur un instrument DM 100 et un applicateur DM (Nanoscale Biomagnetics™, nB, Zaragoza, Espagne) sous le logiciel MaNIaC (Nanoscale Biomagnetics™). 1 mL d'une solution contenant les NPs dispersées dans le toluène (5 mg.mL^{-1}) a été placé dans des flacons adaptés à cette mesure et un champ magnétique alternatif de 536,5 kHz / 300 Gauss ou 796 kHz / 200 Gauss a été appliqué. L'augmentation de la température a été enregistrée pendant 2 min 40s. La valeur de SAR a ensuite été calculée selon la méthode décrite par Perigo et al12, la courbe $\Delta T=f(t)$ a été ajustée avec une fonction polynomiale du second ordre de la forme $y=a+b_1*x+b_2*x^2$ où b_1 correspond à $[dT/dt]_{t=0}$. La valeur de SAR a finalement été calculée avec l'équation suivante :

$$SAR (W/g) = \frac{m_{\text{toluene}} * C_{p\text{toluene}}}{m_{\text{particules}}} * \left[\frac{dT}{dt} \right]_{t=0}$$

où $m_{\text{toluène}}$ et $C_{p\text{toluène}}$ sont respectivement la masse (g) et la capacité thermique thermique ($\text{J.g}^{-1}.\text{K}^{-1}$) de l'échantillon, $m_{\text{particules}}$ (g) est la masse des nanoparticules magnétiques présentes dans l'échantillon et $[dT/dt]_{t=0}$ est la fonction dérivée de la température à $t = 0$ (K.s^{-1})

III.3 Résultats et discussions :

III.3.1 Analyse par spectroscopie Infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF) :

Dans le but de confirmer le greffage du CMPETMS et du copolymère P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) sur la surface des NPs Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄ de 22nm et de APTES avec le copolymère sur la surface des NPs Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄ de 50nm, une analyse par spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier a été effectuée. Les résultats en fonction du diamètre des NPs considérées sont présentés dans la **figure III-6**.

Le spectre infra rouge à transformée de Fourier des NPs-CMPETMS (**Figure III-6** noir) montre une bande à 736 cm⁻¹ caractéristique à la liaison Fe-O, une deuxième bande intense et fine à 946 cm⁻¹ qui est attribuée aux vibrations des liaisons Fe-Si-O qui prouve que la surface des NPs est bien modifiée par le Silane. La présence du Silane est aussi bien confirmée par les vibrations d'élongation des liaisons C-C à 1485, C=C à 1630 cm⁻¹ et des liaisons C-H à 3024 cm⁻¹. D'après le spectre des Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄@CMPETMS@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) (rouge), la présence du copolymère est confirmée par la bande d'absorption située entre 2900 et 2980 cm⁻¹ et qui est attribuée à la liaison de vibration C-H. Une autre bande très intense et fine qui caractérise les liaisons de vibration C=O est située à 1700 cm⁻¹, et enfin les liaisons de vibration C-C et C-O qui sont présentes à 1400 et 1100cm⁻¹.

Le spectre bleu montre une bande moyenne de la liaison N-H et une bande intense de la liaison C-H qui présentent les APTES fixés sur la surface des NPs. La présence des APTES est fortement confirmée par les liaisons CO-Br, NH-CO, C-N, Si-O et C-Br à 1683, 1645, 1244, 1013 et 767cm⁻¹ respectivement. Le spectre vert des NPs-APTES@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) confirme la réussite de la fonctionnalisation des NPs-APTES avec le copolymère P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) par les liaisons de vibrations C=O et C-O situées à 1730 et 1225cm⁻¹ respectivement.

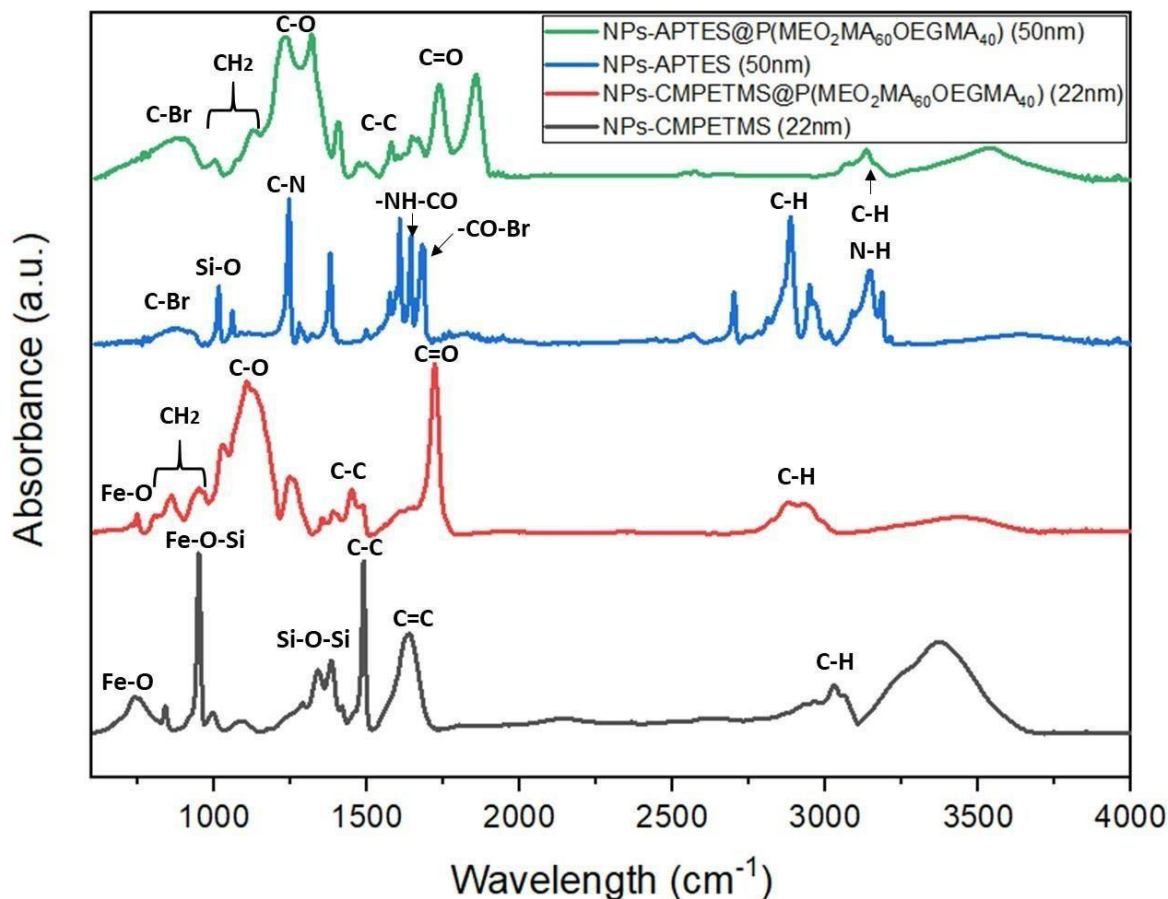


Figure III-6 : Spectres IRTF des NPₛ-CMPETMS (noir), NPₛ-CMPETMS@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) (rouge), NPₛ-APTES (bleu) et des NPₛ-APTES@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) (vert).

III.3.2 Analyse thermogravimétrique (ATG):

L'ATG a été utilisée dans le but de déterminer la quantité de l'acide oléique et du copolymère sur les nano-objets $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@MnFe_2O_4$ de 22 et 50nm.

Les résultats de cette analyse sont représentés dans **la figure III-7**.

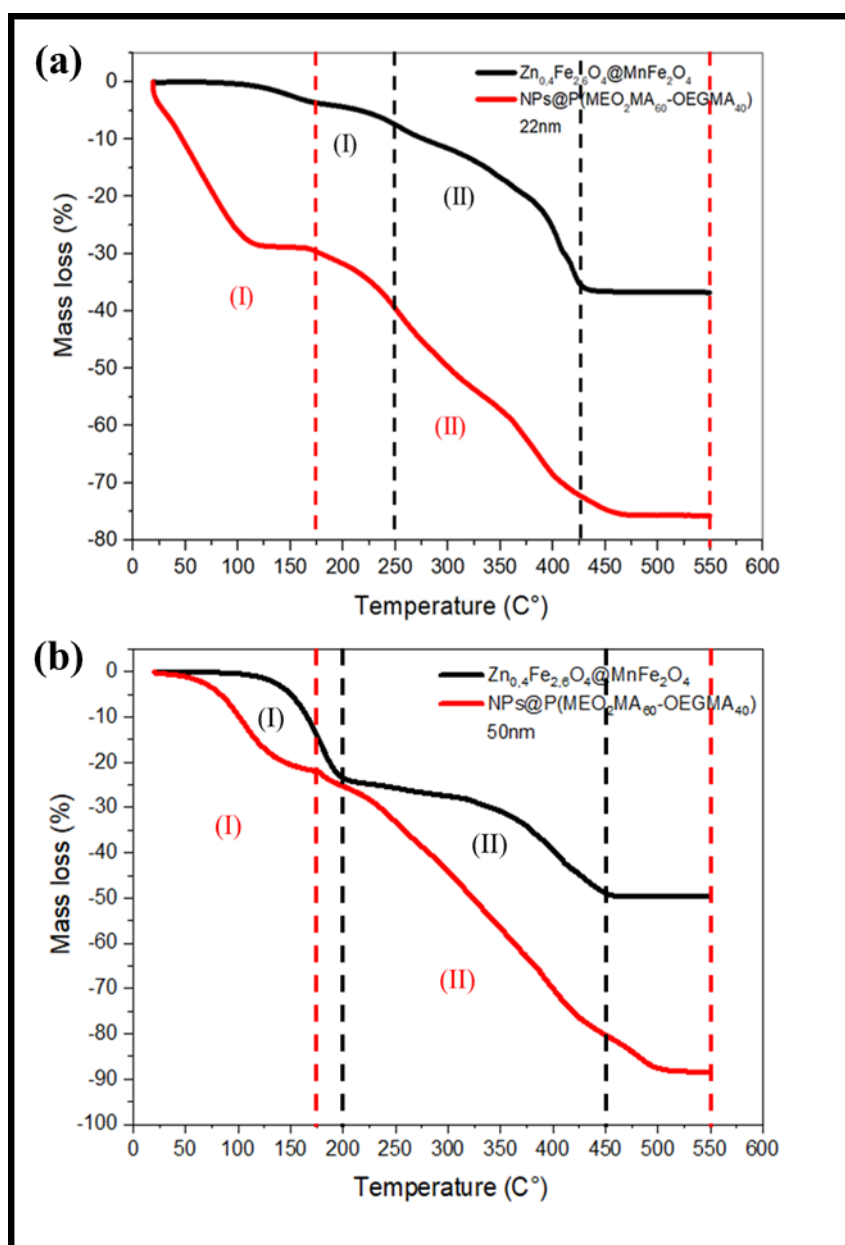


Figure III-7 : (a) courbes ATG des NPs Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄ (noir) et des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀)(rouge) de 22nm. (b) courbes ATG des NPs Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄ (noir) et des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀)(rouge) de 50nm.

La présence de l'acide oléique dans la synthèse des NPs conduit à sa formation sous forme d'une bicouche sur la surface des NPs. La première couche se forme grâce à des liaisons ioniques entre son COO^- et le Fe^{3+} de l'oxyde de fer (chimisorption) et la deuxième couche se forme avec les queues de la première (physisorption, liaison Van der Waals)^{12,13}. La formation de cette bicouche sur la surface des NPs explique la division de la perte de masse des NPs $\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_{2.6}\text{O}_4@ \text{MnFe}_2\text{O}_4$ en deux parties. Par contre, il est difficile de discerner dans les courbes d'ATG la décomposition de l'acide oléique de l'évaporation des solvants utilisés lors de la synthèse qui malgré les différents rinçages peut rester présent ainsi que le solvant des lavages. En effet nous avons utilisé d'éther benzylique et le toluène dont les points d'ébullitions sont de 298° et 110°C. Nous choisissons donc de ne discuter que les résultats avec le greffage du co-polymère ou seules les molécules d'eau restent adsorbées en surface et s'évaporent autour de 100°C.

La courbe ATG (rouge(a)) des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22nm présente une perte de 28% qui revient à l'évaporation des gouttes d'eau à moins de 150°C (I) qui est enregistrée dans la courbe des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 50nm (rouge(b)) avec une perte de 22%.

La perte de masse observée de 200°C à 550°C des deux courbes des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22nm (rouge(a)) et des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 50nm (rouge (b)) est attribuée à la décomposition du copolymère P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) avec un pourcentage de perte de 47 et 65% respectivement ceci s'explique par le fait que la masse du copolymère greffée sur la surface des NPs de 50nm est plus grande que celle greffée sur la surface des NPs de 22nm.

III.3.3 Microscopie électronique en transmission à haute résolution (MET-HR):

Une analyse par le microscope électronique en transmission à haute résolution a été réalisée dans le but d'étudier la stabilité cristalline des NPs $\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_{2.6}\text{O}_4@ \text{MnFe}_2\text{O}_4$ après la modification de leurs surfaces avec le silane et le copolymère P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀).

La **figure III-8** montre les images MET-HR des NPs $\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_{2.6}\text{O}_4@ \text{MnFe}_2\text{O}_4$ de 22 et 50 nm avant et après la fonctionnalisation par le copolymère P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) avec leurs histogrammes de distribution de taille. Les histogrammes sont réalisés à partir de centaines de NPs pour chaque échantillon. La distribution a été ajustée par une distribution de Gauss.

Les images (a) et (c) montrent des NPs $\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_{2.6}\text{O}_4@ \text{MnFe}_2\text{O}_4$ cubiques monodispersées avec une taille moyenne de 22 et 50nm respectivement avant la modification avec le silane et le

copolymère. Les NPs fonctionnalisées par le P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22nm montrent une certaine agrégation causée par les chaînes du copolymère. Les NPs fonctionnalisées de 22 et 50nm sont représentées dans l'image (b) et (d).

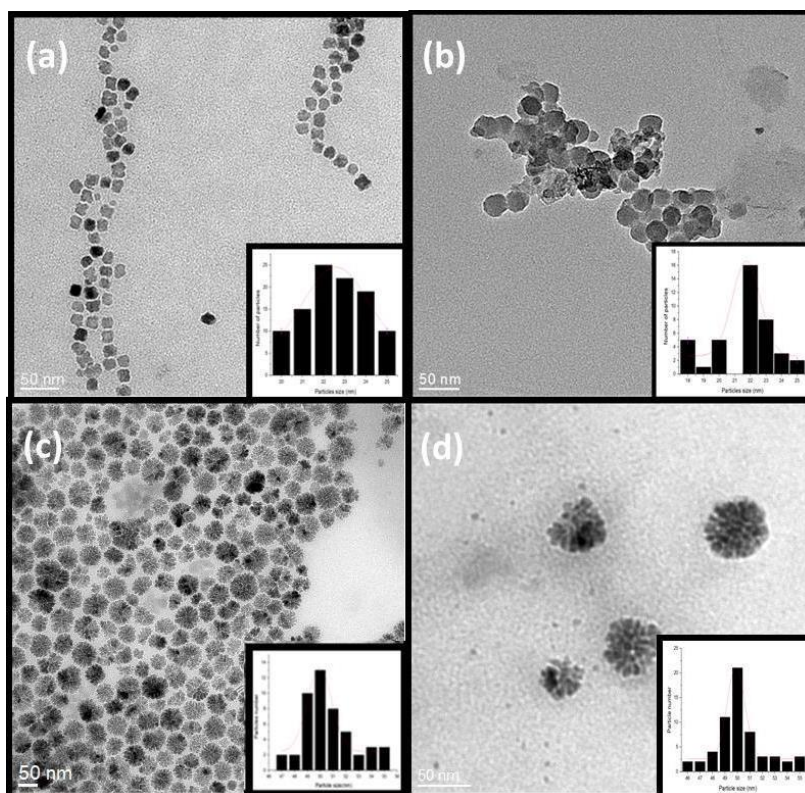


Figure III-8 : Image MET (bright field- fond clair) et histogramme de distribution de taille des NPs Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄ 22nm (a) , des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 22nm (b), des NPs Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄ 50nm (c) et des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 50nm.

Les NPs Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄ fonctionnalisées par le copolymère P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) gardent leurs tailles sur les images MET de 22nm (b) et de 50nm (d) ainsi que leurs formes. La détection du carbone qui revient au copolymère n'a pas été possible sur des grilles en Cu recouvertes d'un film de carbon qui ont été utilisées pour cette analyse.

La **figure III-9** montre des clichés de diffraction électronique des NPs présentées précédemment dans la **figure III-8**.

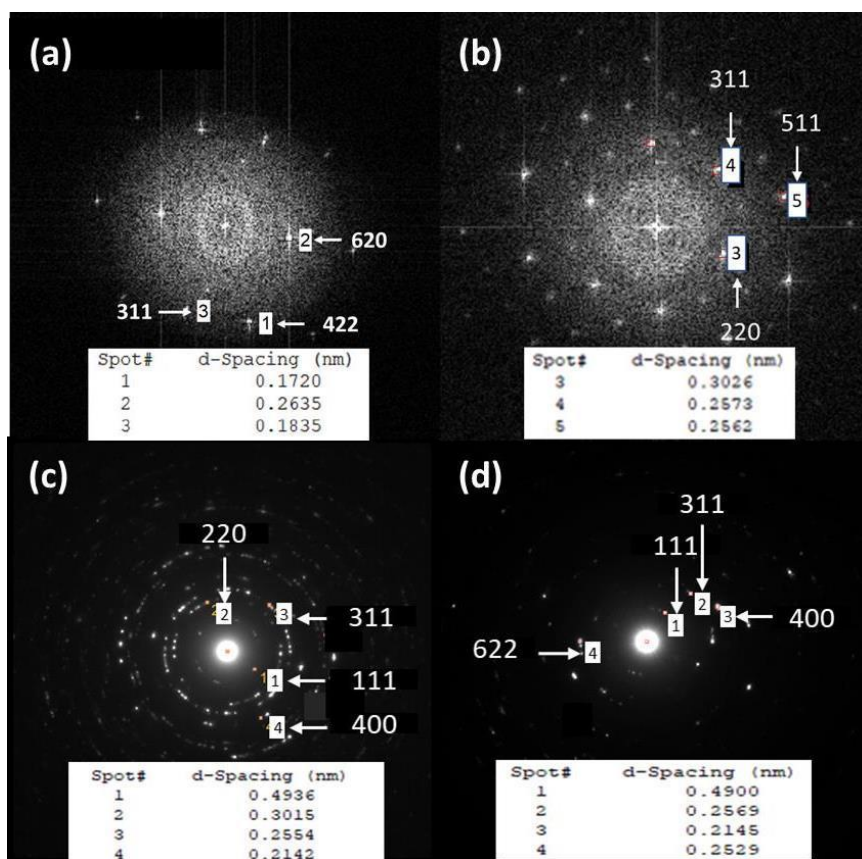


Figure III-9 : Clichés de diffraction des NPs Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄ 22nm (a) , des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 22nm (b) , des NPs Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄ 50nm (c) et des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 50nm.

Les clichés de diffraction électronique des Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@MnFe₂O₄ et des NPs@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) des deux tailles 22 et 50 nm sont représentés dans les images (a) , (b), (c) et (d) respectivement. Ces clichés présentent des taches ponctuelles bien organisées associées aux différents plans cristallins de la magnétite (les plans sont présentés sur les images) et qui sont similaires à ceux obtenus par la diffraction des rayons-X. Ces clichés montrent que la fonctionnalisation des NPs n'affecte pas la structure cristalline des NPs.

Une analyse chimique par l'EDS a été réalisée pour les NPs étudiées. Les spectres de cette analyse sont représentés dans la **figure III-10**.

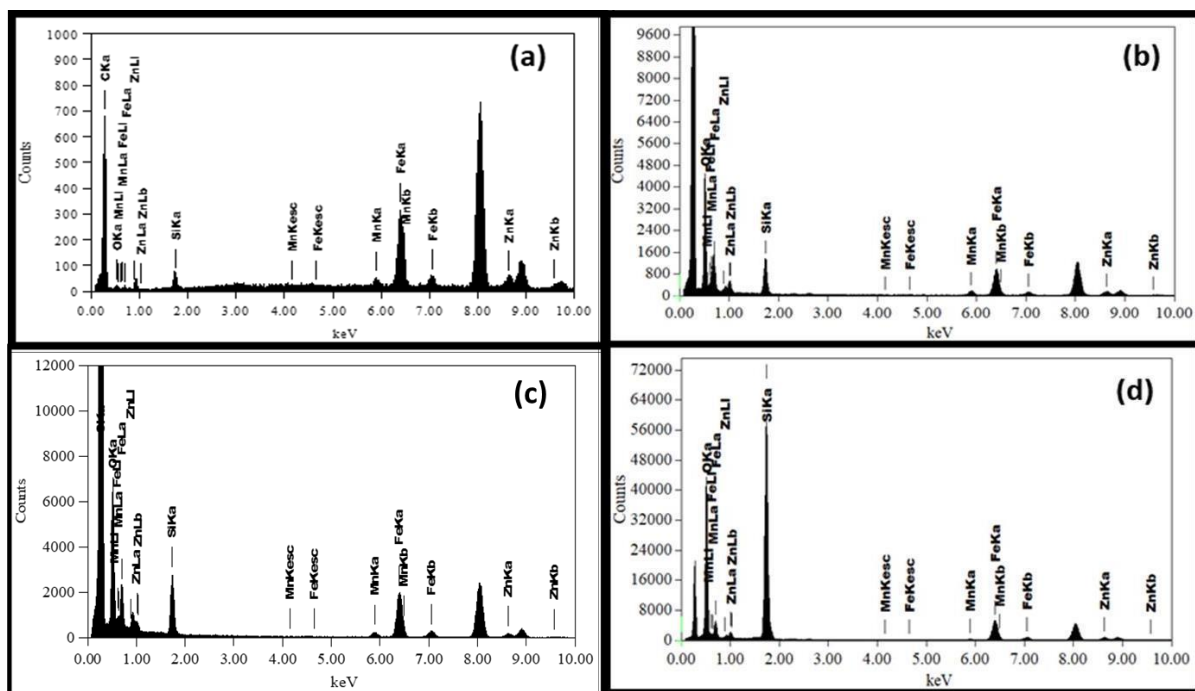


Figure III-10 : Spectres EDS des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ 22nm (a) , des NPs@ $P(MEO_2MA_{60}OEGMA_{40})$ 22nm (b) , des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ 50nm (c) et des NPs@ $P(MEO_2MA_{60}OEGMA_{40})$ de 50nm (d).

Les spectres EDS des NPs $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ 22nm (a) , 50nm (c) et des NPs @ $P(MEO_2MA_{60}OEGMA_{40})$ 22nm (b) et 50nm (d) montrent les différents éléments : Fe, Zn, O et Mn qui forment les NPs. Comme il a été mentionné précédemment, il n'est pas possible de détecter le Carbone qui est présent dans le silane et le copolymère $P(MEO_2MA_{60}OEGMA_{40})$ à cause du type de grille MET utilisé.

III.3.4 Diffusion dynamique de la lumière (DLS) :

Afin d'étudier le comportement colloïdale des NPs@ $P(MEO_2MA_{60}OEGMA_{40})$ dans le milieu aqueux sous l'effet de la température , une analyse par la diffusion dynamique de la lumière a été réalisée. Dans la **figure III-11** nous présentons l'évolution du diamètre hydrodynamique des NPs@ $P(MEO_2MA_{60}OEGMA_{40})$ 22 (a) et 50nm (b) à différentes températures de 20 jusqu'au 50°C.

A des températures inférieures de 40°C, on ne remarque pas un changement significatif du diamètre hydrodynamique soit pour les NPs @ $P(MEO_2MA_{60}OEGMA_{40})$ de 22nm (a) ou celles de 50nm (b).

Au-delà de 40°C, le diamètre hydrodynamique des deux tailles diminue brusquement jusqu'à ce qu'il atteigne une certaine stabilité.

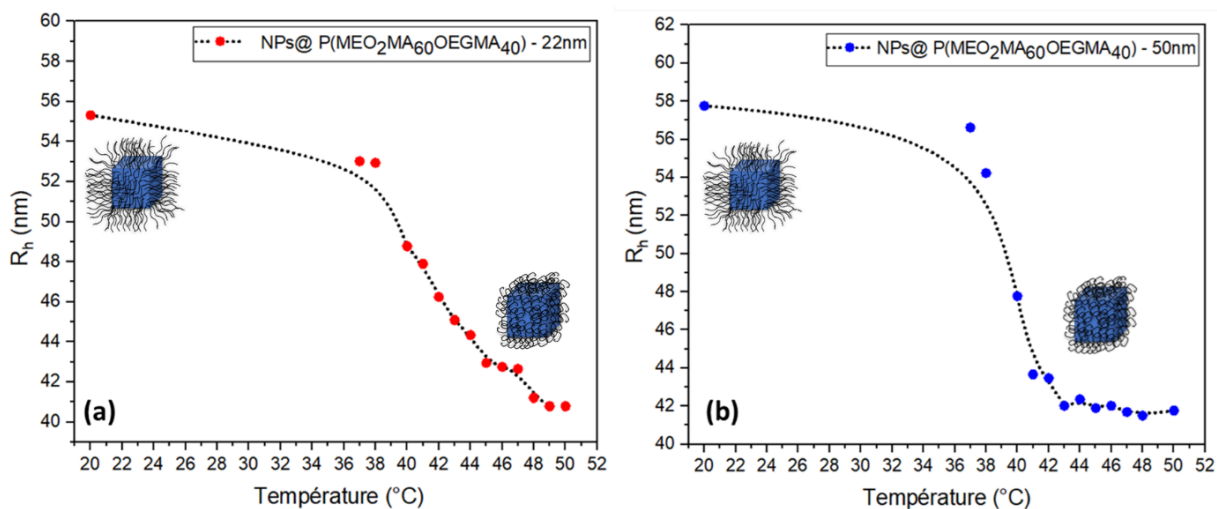


Figure III-11 : Comportement colloïdal des NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 22nm (a) et 50nm (b) en fonction de la température

En dessous de 40°C qui est une température très proche de la LCST des Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@MnFe₂O₄ @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 22 et 50 nm dans l'eau, le diamètre hydrodynamique des NPs est plus grand car les chaînes du copolymère greffées sur la surface des NPs sont hydrophiles et donc elles sont gonflées par l'eau via les liaisons hydrogènes entre le copolymère et l'eau.

La diminution du diamètre hydrodynamique à des températures supérieures à 40°C s'explique par le changement colloïdal du copolymère de l'état hydrophile à l'état hydrophobe par la rétraction des chaînes.

III.3.5 Propriétés magnétiques des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) :

Des mesures de magnétisation en fonction du champs magnétique (**Figure III-12**) ainsi que des analyses d'aimantation type ZFC/FC (zéro field cooling/field cooling) (**Figure III-13**) ont été réalisées par un SQUID dans le but d'étudier les propriétés magnétiques des NPs Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@MnFe₂O₄ et des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) ainsi que l'effet de la fonctionnalisation des NPs avec le copolymère sur les propriétés magnétiques des NPs.

La **figure III-12** montre les courbes de magnétisation en fonction du champ magnétique (7 Tesla) appliqué à une température constante de 310K des Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄ 22nm (a),

NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 22nm (b), des Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄ 50nm (c) et des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 50nm (d).

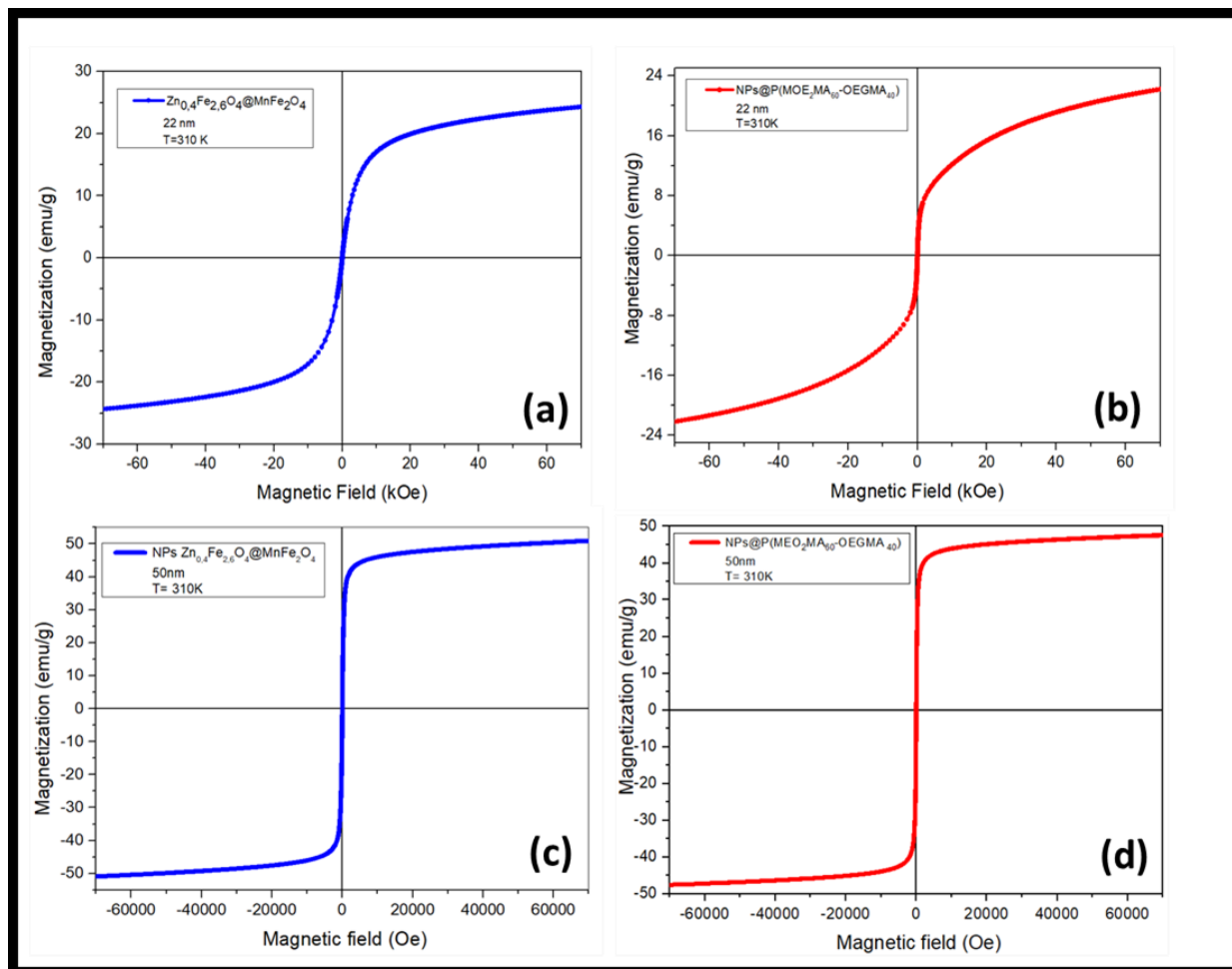


Figure III-12 : Valeurs de la magnétisation en fonction du champs magnétique des NPs Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄ 22nm (a) , des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 22nm (b), des NPs Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄ 50nm(c) et des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 50nm (d).

Les résultats obtenus lors de ces mesures montrent que les NPs Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄ et les NPs@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22 et 50nm possèdent des propriétés superparamagnétiques. L'effet superparamagnétique des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) est conduit par le cœur magnétique des NPs et non pas la couche polymérique¹⁴.

Les valeurs de saturation magnétiques des NPs Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄ 22 et 50nm et des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 22 et 50nm à une température constante de 310K sont représentées dans le **tableau III-1**.

Tableau III-1. Valeurs de la saturation magnétique des NPs en fonction du champ magnétique (7 Tesla) à T=310K.

NPs	Saturation magnétique (emu/g)
Zn _{0.4} Fe _{2.6} O ₄ @ MnFe ₂ O ₄ 22nm	24
NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 22nm	22
Zn _{0.4} Fe _{2.6} O ₄ @ MnFe ₂ O ₄ 50nm	51
NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 50nm	48

Les NPs de 50 nm présentent les meilleures valeurs de magnétisations avant et après la fonctionnalisation avec le copolymère P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) comparant à celles de 22 nm et celles synthétisées précédemment dans l'équipe qui présentaient une saturation magnétique de 30emu/g⁷.

La diminution de la valeur de magnétisation de 24 à 22 emu/g et de 51 à 48 emu/g par rapport aux NPs de 22 et 50nm respectivement est dû au copolymère qui est greffé sur la surface des NPs qui représente 47 et 65% de la masse totale des NPs (voir analyse ATG **figure III-7**) et qui entraîne une diminution de l'interaction magnétique entre les NPs¹⁵.

La figure III-13 montre les courbes ZFC /FC (zéro field cooling/field cooling) à un champ magnétique constant de 25Oe des Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄ 22nm (a), NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 22nm (b), des Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄ 50nm (c) et des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 50nm (d).

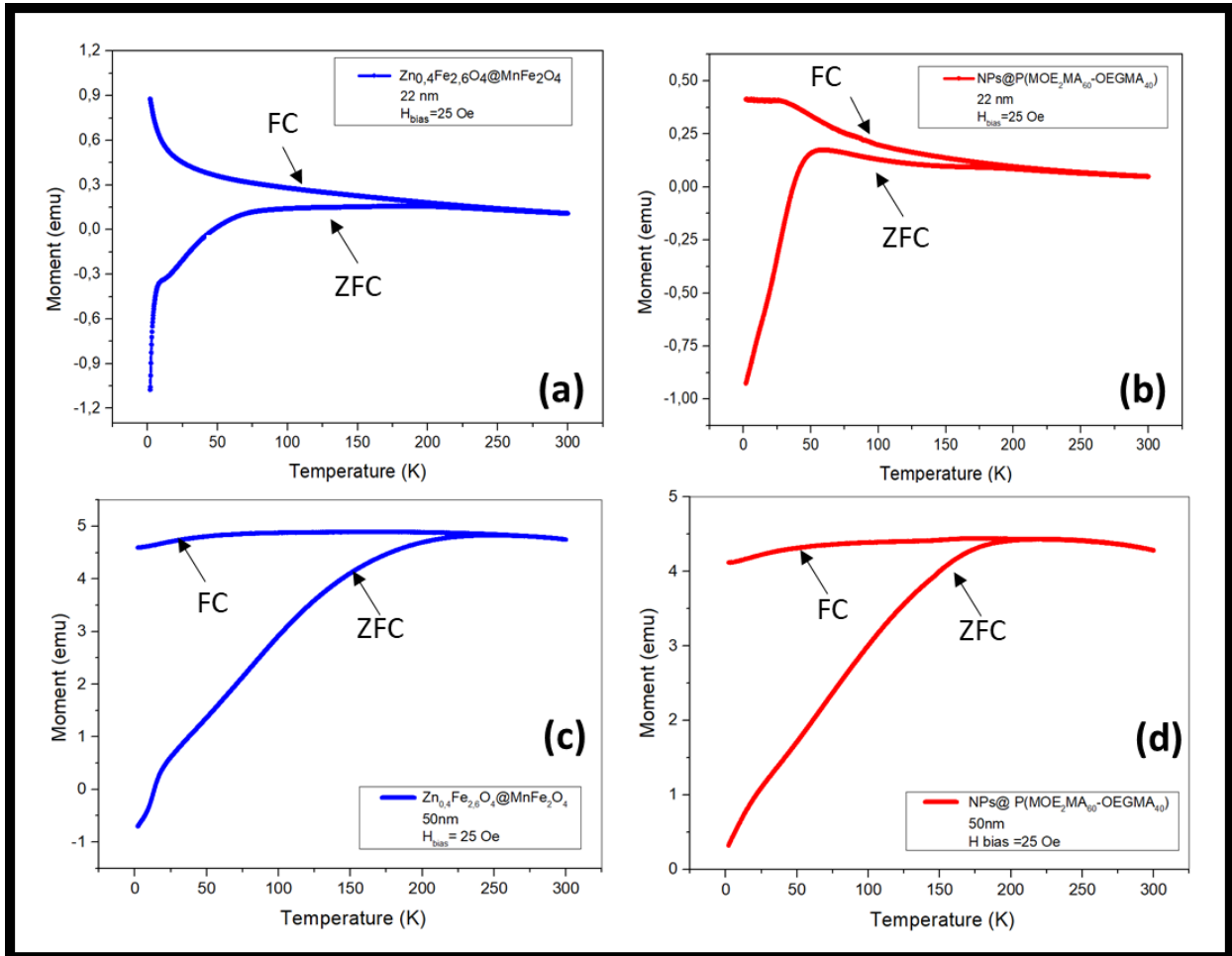


Figure III-13 : Courbes ZFC/FC des NPs $\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_{2.6}\text{O}_4 @ \text{MnFe}_2\text{O}_4$ 22nm (a) , des NPs@ $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{OEGMA}_{40})$ 22nm (b), des NPs $\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_{2.6}\text{O}_4 @ \text{MnFe}_2\text{O}_4$ 50nm (c) et des NPs@ $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{OEGMA}_{40})$ 50nm (d).

Les courbes ZFC/FC (a), (b), (c) et (d) montre une augmentation de l'aimantation en fonction de la température sous un champ magnétique constant 25 Oe. La valeur maximale de chacune de ces courbes correspond à la température de blocage des NPs. Cette température est la température en dessous de laquelle les NPs sont dans l'état superparamagnétique et l'aimantation des particules est bloquée¹⁶.

Les valeurs de ces températures sont regroupées dans le **tableau III-2**.

Tableau III-2. Températures de blocage des NPs

NPs	Température de blocage (K)
$Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ 22nm	200 ± 10
NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 22nm	200 ± 10
$Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@ MnFe_2O_4$ 50nm	225 ± 10
NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) 50nm	225 ± 10

III.3.6 Encapsulation de la Doxorubicine (DOX) :

III.3.6.1 Analyse infra rouge à transformée de Fourier (IRTF) des NPs@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) chargées en DOX :

Une analyse IRTF a été effectuée dans l'objectif d'étudier l'interaction de la DOX avec le copolymère. La **figure III-14** présente les spectres IRTF des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) (bleu), de la DOX (rouge) et des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) chargées en DOX (noir).

Le spectre de la DOX (rouge) montre une bande large intense à 3419 cm⁻¹ qui correspond à une liaison de vibration O-H. Une liaison C-H est présente à 2933 cm⁻¹. A 1727 cm⁻¹ et 1622 cm⁻¹ le spectre enregistre deux bandes d'étirement attribuées aux liaisons C=O et N-H dans NH₂ respectivement. Les bandes enregistrées à 1417 ,1255 ,1109 et 990 cm⁻¹ représentent les liaisons : C=C , C-O, C-N et HC=CH₂ respectivement des fractions aromatiques de la DOX.

Le spectre des NPs@ P(MEO₂M₆₀-OEGMA₄₀) chargées en DOX (noir) montre des pics à 3400, 2898, 1421 et 1100cm⁻¹ caractéristiques aux liaisons : O-H, C-H, C=C et C-O qui représente le copolymère greffé sur la surface des NPs. La présence de la DOX encapsulée dans les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) est confirmée par les liaisons C=O, N-H et C-N enregistrées à 1720, 1645 et 1234cm⁻¹ respectivement.

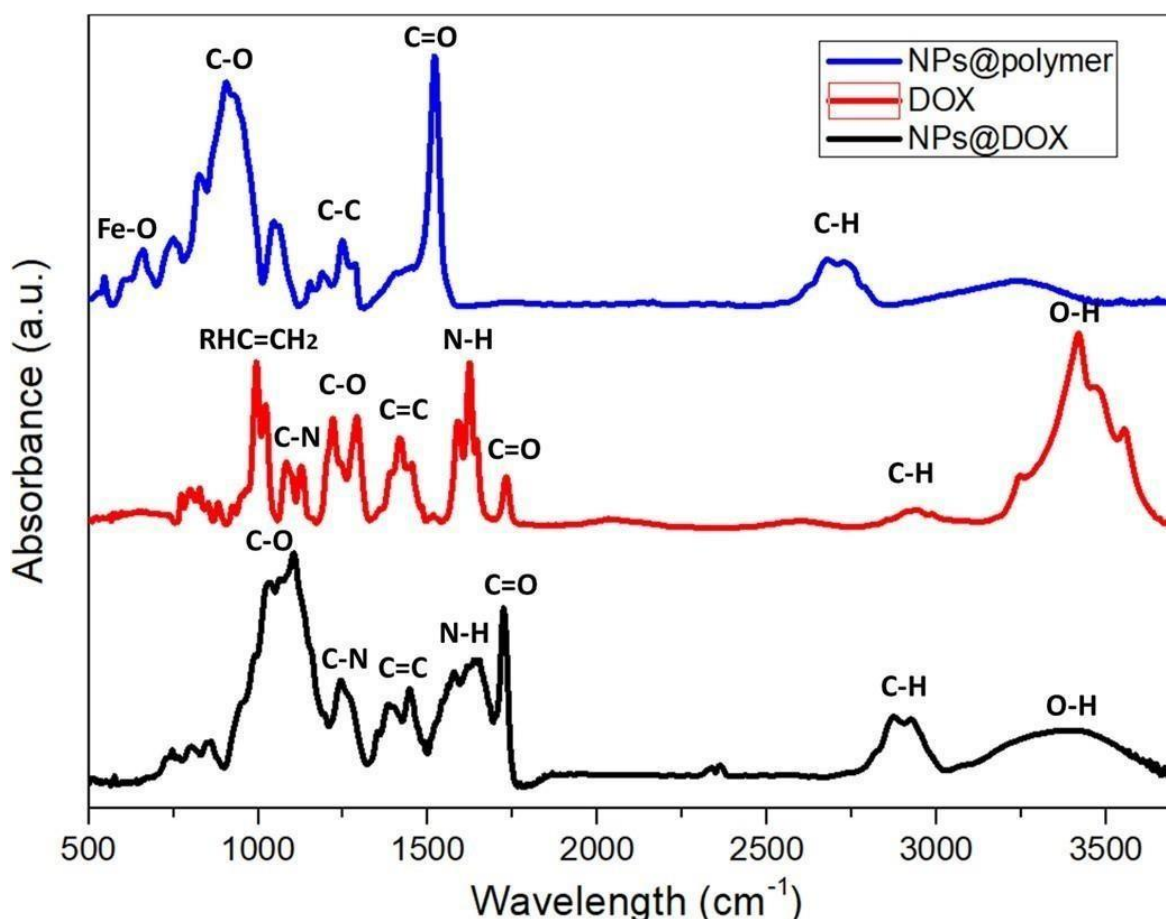


Figure III-14 : Spectres IRTF des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) (bleu), de la DOX (rouge) et des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) chargées en DOX (noir).

III.3.6.2 Libération de la DOX en fonction de la température :

La libération de la DOX chargées sur les Zn_{0,4}Fe_{2,6}O₄@ MnFe₂O₄@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22 et 50nm a été étudiée en fonction de différentes températures de 37 à 50°C pendant 5min (chaque température) afin de fixer la LCST (lower critical solution temperature), la température à partir de laquelle le copolymère change son comportement colloïdal en devenant hydrophobe¹⁷. Ce changement permettra la libération de la DOX. Cette étude permettra également à quantifier la concentration de la DOX qui a pu être chargée entre les chaînes du copolymère et qui a pu être relarguée par le système sous l'effet de différentes températures. L'encapsulation de la DOX entre les chaînes du copolymère se fait grâce à des liaisons hydrogène quand les chaînes sont hydrophiles sous la LCST, elles forment des interactions typehydrogène avec les molécules d'eau (H₂O) ce qui aide la DOX à être bloquée entre les chaînes¹⁸.

Au-delà de la LCST, les chaînes du copolymère se rétrécissent en devenant hydrophobe ce qui va conduire à casser ces liaisons hydrogène et par la suite à libérer la DOX.

Dans la **figure III-15** nous présentons les résultats de la libération des $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@MnFe_2O_4@P(MEO_2MA_{60}OEGMA_{40})$ de 22 et 50nm chargées en DOX en fonction de différentes températures (37-50°C). Chaque analyse a été réalisée trois fois afin d'assurer la reproductibilité de la libération de la DOX sous les différentes conditions étudiées (température, temps et milieu d'analyse).

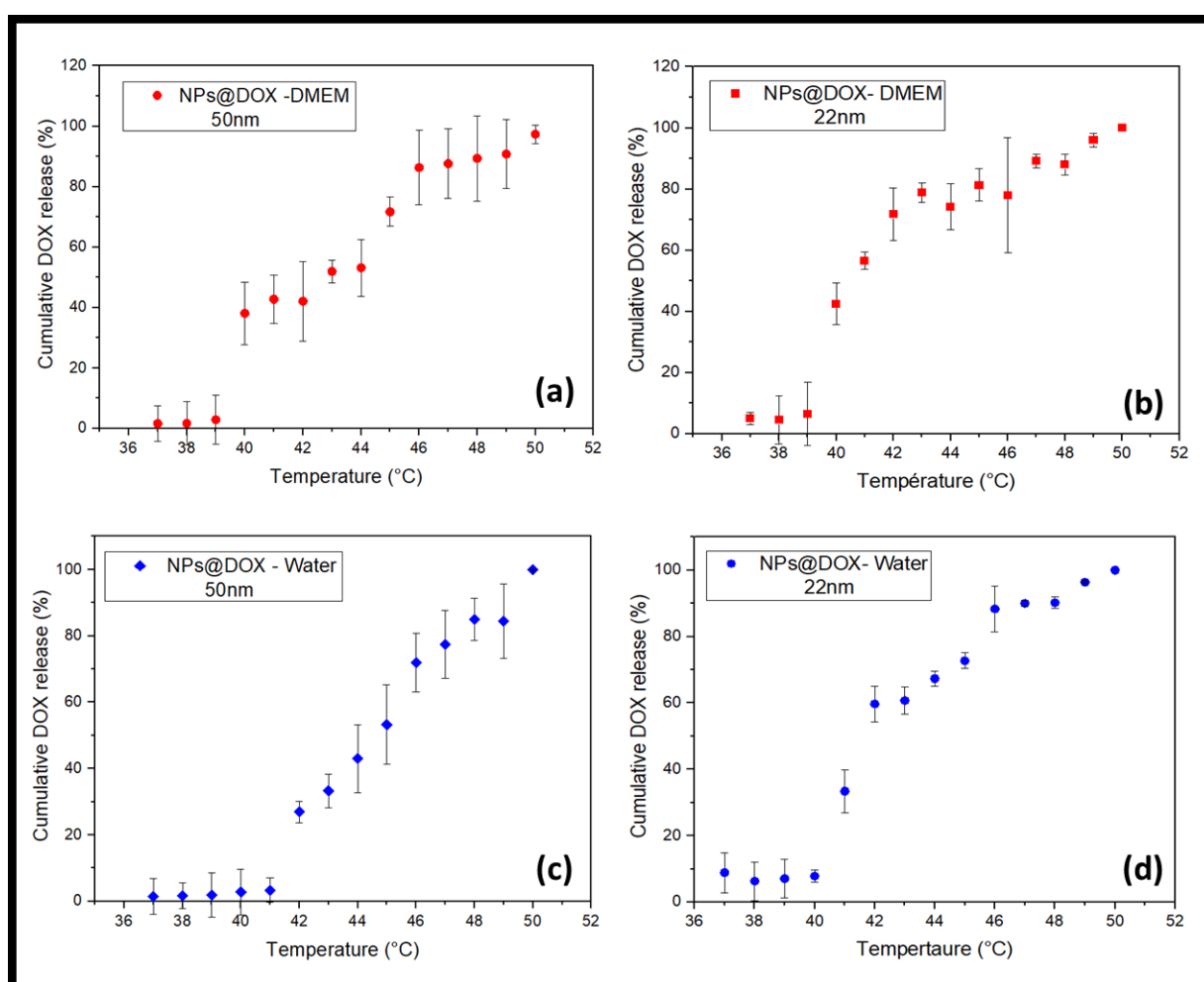


Figure III-15 : Courbes de relargage de la DOX en fonction de la température. (a) NPs@ $P(MEO_2MA_{60}OEGMA_{40})$ 50nm dans le DMEM. (b) NPs@ $P(MEO_2MA_{60}OEGMA_{40})$ 22nm dans le DMEM. (c) NPs@ $P(MEO_2MA_{60}OEGMA_{40})$ 50nm dans l'eau. (d) NPs@ $P(MEO_2MA_{60}OEGMA_{40})$ 22nm dans l'eau.

Les quatre courbes de relargage présentent une augmentation de la quantité de la DOX libérée en fonction de la température. A des températures inférieures de 39°C et de 40°C dans les deux milieu DMEM et eau respectivement, il n’y a presque pas de DOX libérée pour les deux tailles de NPs (22 et 50nm). La libération de la DOX commence à partir de 40°C dans le DMEM pour les NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22 (b) et 50 nm (a). De 42°C pour les NPs 50nm dans l’eau (c) et de 41°C pour les NPs de 22nm dans l’eau (d). Ces températures représentent les LCST des NPs@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) dans les deux milieux (DMEM et eau). Les pourcentages de la DOX libérée par les quatre systèmes et pour chaque température sont listées dans le **tableau III-3**.

Tableau III-3. Pourcentage de la DOX libérée par les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 22 et 50nm en fonction de la température.

NPs Température (°C)	DOX libérée (%) NPs 22nm		DOX libérée (%) NPs 50nm	
	DMEM	EAU	DMEM	EAU
	37	5,00	8,88	1,92
38	4,58	6,29	3,31	1,75
39	6,52	7,05	4,44	1,94
40	42,52	7,82	32,38	2,77
41	56,62	33,38	42,72	3,32
42	71,84	59,70	42,08	25,26
43	78,88	60,73	51,93	34,3
44	74,23	67,35	53,17	46,29
45	81,33	72,73	71,68	57,7
46	77,99	88,32	86,33	81,53
47	89,17	90,03	87,62	80,37
48	88,01	90,23	89,33	82,05
49	96,02	96,40	90,79	84,45
50	100	100	97,35	100

Nous observons qu’il n’y a pas d’influence du rayon de courbure des nanoparticules sur la LCST du copolymère. Par contre l’influence du milieu est très visible, elle conduit à la libération

de la DOX à des températures plus basses ; 40°C dans le milieu et 41-42°C dans l'eau. Les milieux de cultures contenant un mélange de sel, d'acides aminés et de protéines conduit ces éléments à interagir avec les groupements C-O de la chaîne de polymère et rentrer en compétition avec la DOX qui interagit avec les chaînes via des liaisons hydrogènes⁴. Ce résultat est en total adéquation avec les travaux précédents.

III.3.6.3 Libération de la DOX en fonction du temps :

Dans l'étude précédente, nous avons mentionné qu'au-delà de la LCST, les chaînes du copolymère changent leur comportement colloïdal et elles passent d'un état gonflé à un état contracté à la surface des nanoparticules. Cette transition est dirigée par la stabilité de l'interaction hydrogène qui sera rompue via le mécanisme au niveau des liaisons hydrogène avec les molécules H₂O.

D'après les résultats obtenus lors de l'analyse précédente, le copolymère greffé sur la surface des NPs possède une LCST qui varie entre 40 et 42°C et dépend du milieu dans lequel l'analyse a été étudiée. C'est à cette même température que les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) changent leur comportement et commencent à libérer la DOX. Ce qui confirme que l'interaction entre la DOX et les chaînes du copolymère est dirigée principalement par les interactions hydrogènes.

Pour déterminer la durée nécessaire pour la libération de la masse totale de la DOX encapsulée, nous avons envisagé d'étudier la libération de la DOX en fonction du temps de 1 à 50 heures à deux températures fixes : 37°C qui est la température physiologique afin de se rapprocher des conditions biologiques et 42°C qui est la LCST.

Les résultats de cette étude sont présentés dans la **figure III-16** et la **figure III-17**.

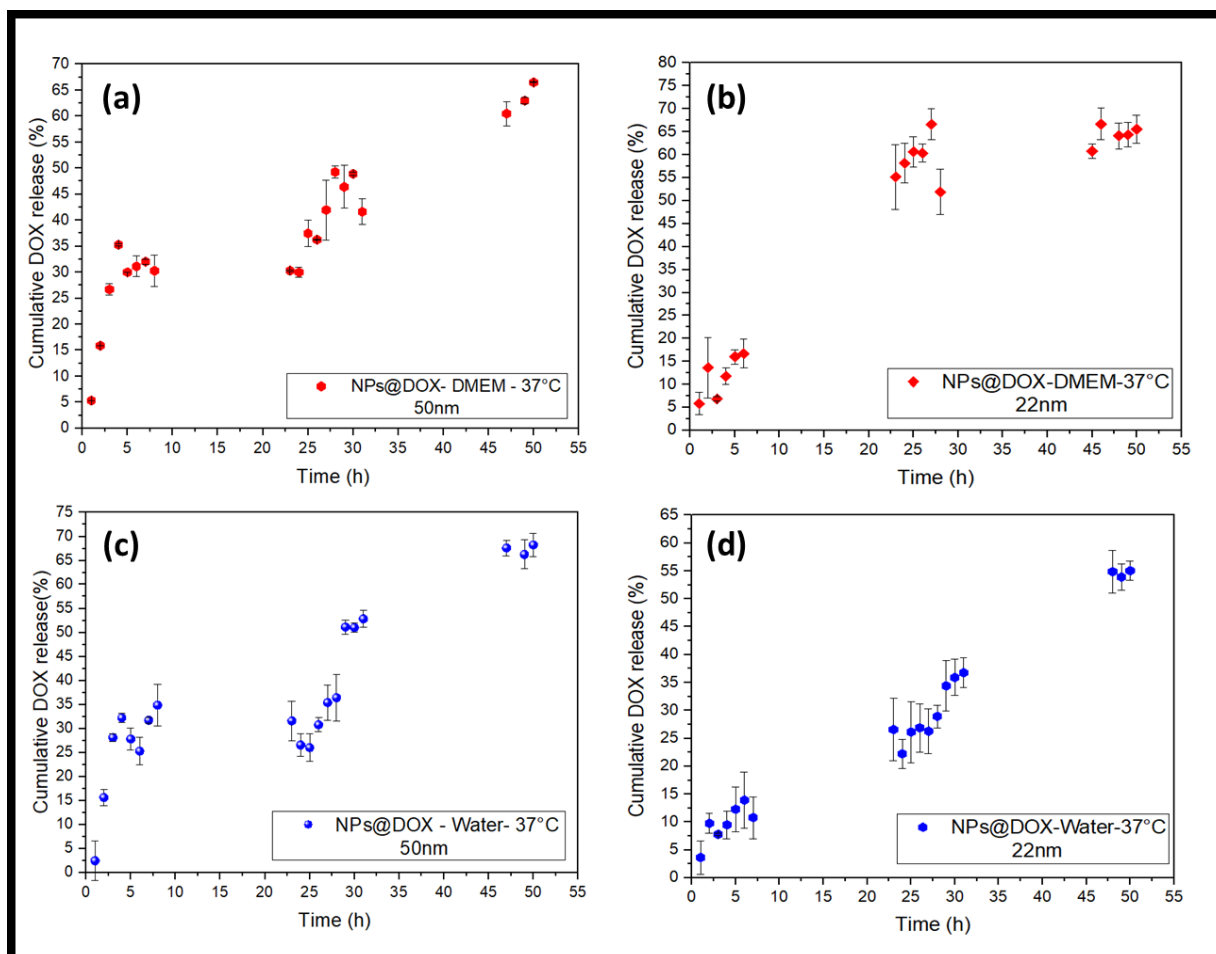


Figure III-16 : Courbes de relargage de la DOX en fonction du temps à 37°C. (a) NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 50nm dans le DMEM. (b) NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 22nm dans le DMEM. (c) NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 50nm dans l'eau. (d) NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 22nm dans l'eau.

Les quatre courbes de relargage présentent une augmentation de la DOX libérée en fonction du temps. A 37°C, la quantité de la DOX libérée dans le DMEM et dans l'eau par les NPs de 50 et 22nm après une heure est de 5% (a, b) et 2,5% (c, d) respectivement. A cette température et après 29h, les NPs@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 50 nm libèrent la moitié de la quantité encapsulée de la DOX (50%) dans le DMEM (a) et dans l'eau (c). La même quantité est libérée par les NPs@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 22nm dans le DMEM (b) et dans l'eau (d) après une durée de 14 et 47h respectivement (b). Au bout de 50h, le relargage de la DOX dans le DMEM et dans l'eau atteint son maximum. A 37°C les quatre systèmes de NPs ne libèrent pas la quantité totale de la DOX encapsulée.

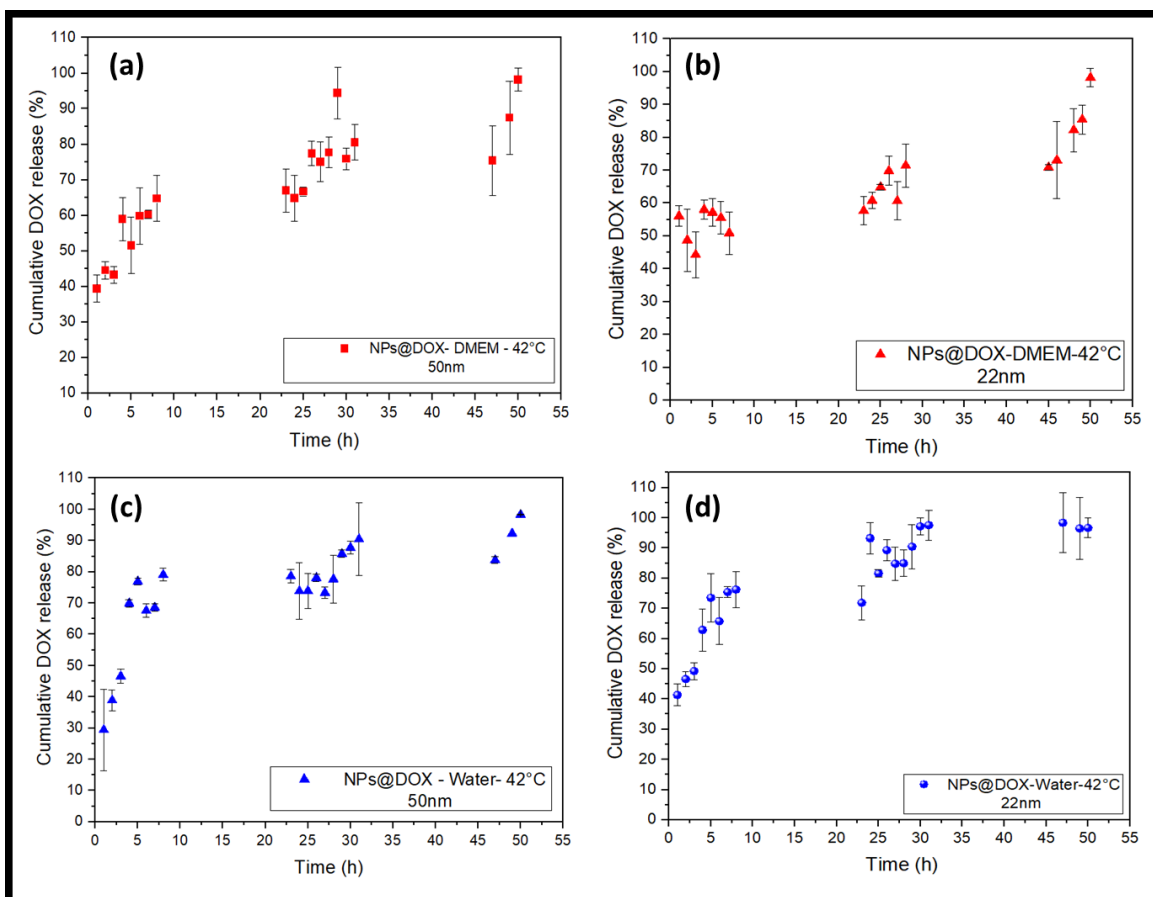


Figure III-17 : Courbes de relargage de la DOX en fonction du temps à 42°C. (a) NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 50nm dans le DMEM. (b) NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 22nm dans le DMEM. (c) NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 50nm dans l'eau. (d) NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 22nm dans l'eau.

A 42°C, on observe une libération de la DOX par les NPs@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 50 nm et 22nm dans le DMEM à partir de la première heure avec un pourcentage de 40 et 55% respectivement. Comme attendu, le pourcentage de la DOX libérée par les deux tailles est plus faible dans l'eau par rapport à la libération dans le DMEM et représente 30 et 40% la première heure pour les NPs de 50 et 22nm respectivement.

Après 4h, les NPs 50 et 22nm libèrent plus que la moitié (50%) de la DOX encapsulée et le relargage atteint son maximum au bout de 50h dans les deux milieux.

Les trois modèles mathématiques décrits précédemment dans ce chapitre ont été comparés dans le but de déterminer la nature du mécanisme de relargage du principe actif (DOX).

Les paramètres K_0 , K_1 et K_h des trois modèles : Ordre zéro, premier ordre et Higuchi respectivement ainsi que leurs coefficients de corrélations « R^2 » sont présentés dans le **tableau III-4**.

Le mécanisme de relargage de la DOX par les NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 22 et 50nm suit le modèle « Ordre Zéro ». Les deux autres modèles étudiés : premier ordre et Higuchi ne conviennent pas bien aux résultats du relargage car ils présentent des coefficients de corrélation (R_2) faibles. Ces résultats expliquent que la vitesse de la libération du principe actif par nos NPs est une vitesse indépendante de la concentration du principe actif dissous. C'est-à-dire, qu'elle se fait d'une manière constante même si la concentration du principe actif est plus grande¹¹.

Tableau III-4. Données cinétiques de la libération de la DOX par les NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 22 et 50nm pour des températures égales à 37°C et 42°C dans les deux milieux : eau et DMEM.

NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) Taille /milieu/température	Ordre Zéro		Premier ordre		Higuchi	
	K_0	R^2	K_1	R^2	K_h	R^2
22nm/eau /37°C	0,97698	0,96926	-0,01517	0.93689	1.58015	0.71051
22nm/eau /42°C	0,61331	0,90373	-0.05245	0.76351	1.98536	0.83084
22nm/DMEM /37°C	1,21033	0,92986	-0.02163	0.82966	2.70648	0.91864
22nm/DMEM /42°C	0,67446	0,79273	-0.01949	0.7661	1.12731	0.71982
50nm/eau /37°C	0,86345	0,97536	-0.01753	0.75783	0.05094	0.68616
50nm/eau /42°C	0,84315	0,89371	-0.03386	0.65722	1.63579	0.68912
50nm/DMEM /37°C	0,74956	0,92914	-0.0154	0.81511	2.91797	0.76788
50nm/DMEM /42°C	0,8457	0,82184	-0.02649	0.8131	2.66878	0.81627

Les valeurs de la DLC et la DLE qui ont été obtenues pour une quantité de 2,5mg (0,5mg.mL⁻¹) de DOX mise en contact avec les NPs à partir de ces deux systèmes sont regroupées dans le **tableau III-5** comparées avec ceux obtenues par une étude réalisée précédemment dans l'équipe « Nanomatériaux et santé 403 ».

Tableau III-5. Valeurs DLC et DLE des NPs

Nano- objets	Taille (nm)	DLC (%)	DLE (%)	Réf
Fe ₃₋₈ O ₄ @P(MEO ₂ MA ₆₀ -OEGMA ₄₀)	10	6,6	56,1	⁷
NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀)	22	5,2	52,9	-
NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀)	50	7	70,28	-

Les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 50 nm présentent un taux de charge du médicament et une efficacité de charge plus importante comparant aux autres systèmes.

III.3.7 Hyperthermie magnétique :

Des analyses de mesure des propriétés magnétiques de nos nanovecteurs ont été réalisées dans le but d'étudier leurs capacité d'échauffement sous un champs magnétique externe afin d'envisager leur utilisation dans le traitement de la tumeur. Ces analyses ont été effectuées en collaboration avec Mr. Damien Mertz et Mlle. Joelle Bizeau de l'ICPMS à Strasbourg.

Dans des analyses précédentes, nous avons étudié l'effet de la température sur le comportement colloïdal de nos NPs et il a été démontré qu'elles présentent une LCST comprise entre 40 et 42°C. Cette valeur de LCST varie selon la taille des NPs ainsi que le milieu dans lequel l'analyse a été faite (eau ou DMEM). L'échauffement des NPs jusqu'à cette température permettra la libération du médicament anticancéreux encapsulé sur les NPs dans la tumeur.

Il a été démontré aussi par les mesures magnétiques que nos NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22 ou de 50nm possèdent des propriétés superparamagnétiques. Ce qui explique leur échauffement par les deux phénomènes de relaxation de Brown ou/et de Néel¹⁹. Ces mesures ont aussi confirmé l'influence de la taille des NPs sur leurs capacités magnétiques. Les NPs avec la plus grande taille (50nm) présentent des propriétés magnétiques plus importantes que

les plus petites (22nm) cela expliquera leurs capacités d'échauffement une fois soumise à un champs magnétique externe.

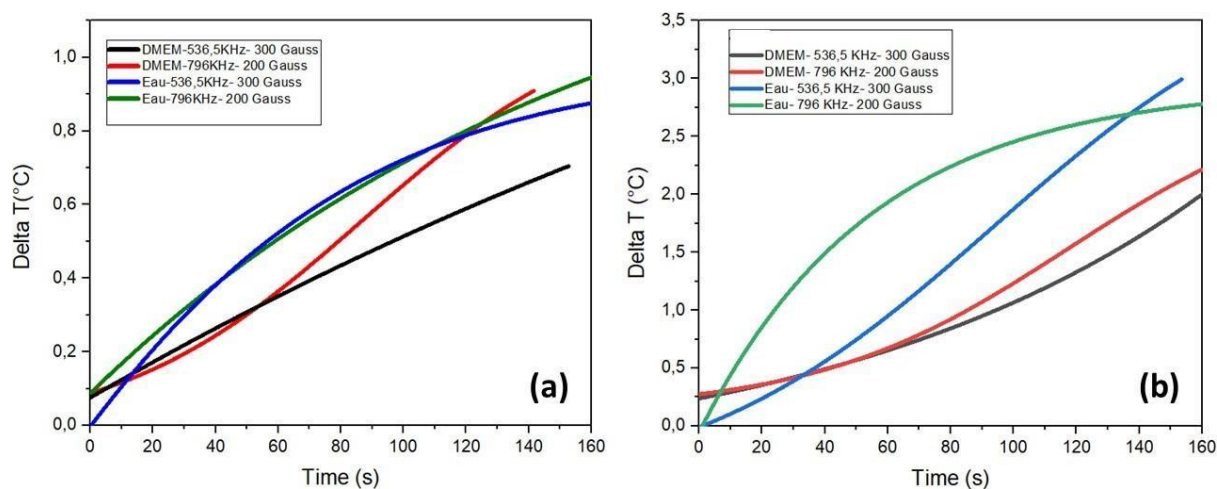


Figure III-18 : Températures des NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22nm (a) et des 50nm

- sous un champs magnétique alternative dans le DMEM et l'eau à 536,5 et 796 KHz.

Les nanoparticules NPs@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de diamètre 22 nm (a) présentent des propriétés d'hyperthermie magnétique 3 fois plus faible que celles du diamètre 50nm (b). Une augmentation de la température de 3 et 2°C a été observée après seulement 160 s dans l'eau et dans le DMEM respectivement à 536,5 KHz par les NPs de diamètre 50 nm (équivalent a une SAR de 57,81 et 53,21 W.g⁻¹ respectivement). Ces résultats restent très faible comparés aux augmentations des NPs non polymérisées (voir **Figure II-12**). La chute des valeurs de la température s'explique par la présence du copolymère P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) sur la surface des NPs. Ces résultats montrent des valeurs prometteuses comparant aux résultats obtenus précédemment dans l'équipe qui donnent des températures de 2 et 1,6°C dans l'eau et le milieu physiologique après le même temps de mesure⁷.

III.4 Conclusion :

Dans ce chapitre, plusieurs analyses ont été mis au point pour étudier nos NPs. Nous avons réussi à fonctionnaliser les NPs synthétisées dans le chapitre précédent par le silane et par le copolymère thermosensibles P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) sans aucun effet sur la structure cristalline des NPs Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄. Le changement du comportement colloïdal du copolymère sous l'effet de la température a été démontré par les analyses DLS. Ce changement de l'état hydrophile à l'état hydrophobe permet aux NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) d'encapsuler la doxorubicine et la libérer à des températures contrôlées. Par la suite, nous avons montré la libération de la DOX en fonction de différentes températures et à différent temps dans deux milieux différents ce qui nous a permis de calculer leurs efficacité et taux de chargement du médicament et dans cette partie que nous avons montré que nos NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 50nm ont une efficacité et un taux de charge de DOX plus important que celles de 22 nm et celles étudiées précédemment dans notre équipe.

Dans le prochain chapitre, nous allons étudier les performances biologiques de nos nanovecteurs en présence des cellules cancéreuses dans différentes conditions.

III. 5 Références :

1. Chatterjee J, Haik Y, Chen CJ. Size dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *J Magn Magn Mater*. Published online 2003:6.
2. Bharti S, Kaur G, Gupta S, Tripathi SK. Pegylated CdSe/ZnS core/shell nanoparticles for controlled drug release. *Mater Sci Eng B*. 2019;243:115-124. doi:10.1016/j.mseb.2019.03.015
3. Lapresta-Fernández A, Salinas-Castillo A, Capitán-Vallvey LF. Synthesis of a thermoresponsive crosslinked MEO2MA polymer coating on microclusters of iron oxide nanoparticles. *Sci Rep*. 2021;11(1):3947. doi:10.1038/s41598-021-83608-z
4. Ferjaoui Z, Jamal Al Dine E, Kulmukhamedova A, et al. Doxorubicin-Loaded Thermoresponsive Superparamagnetic Nanocarriers for Controlled Drug Delivery and Magnetic Hyperthermia Applications. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(34):30610-30620. doi:10.1021/acsami.9b10444
5. Zarrintaj P, Jouyandeh M, Ganjali MR, et al. Thermo-sensitive polymers in medicine: A review. *Eur Polym J*. 2019;117:402-423. doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.05.024
6. Alejo T, Prieto M, García-Juan H, et al. A facile method for the controlled polymerization of biocompatible and thermoresponsive oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate copolymers. *Polym J*. 2018;50(2):203-211. doi:10.1038/s41428-017-0004-8
7. Ferjaoui Z. Synthèse et caractérisation de nanoparticules magnétiques répondantes pour des applications en thérapie cancéreuse. :154.
8. Wu IY, Bala S, Škalko-Basnet N, di Cagno MP. Interpreting non-linear drug diffusion data: Utilizing Korsmeyer-Peppas model to study drug release from liposomes. *Eur J Pharm Sci*. 2019;138:105026. doi:10.1016/j.ejps.2019.105026
9. Kaya D, Küçükada K, Alemdar N. Modeling the drug release from reduced graphene oxide-reinforced hyaluronic acid/gelatin/poly(ethylene oxide) polymeric films. *Carbohydr Polym*. 2019;215:189-197. doi:10.1016/j.carbpol.2019.03.041
10. Wojcik-Pastuszka D, Krzak J, Macikowski B, Berkowski R, Osiński B, Musiał W. Evaluation of the Release Kinetics of a Pharmacologically Active Substance from Model Intra-Articular Implants Replacing the Cruciate Ligaments of the Knee. *Materials*. 2019;12(8):1202. doi:10.3390/ma12081202
11. PEREIRA_CAMELO_SARAH_Diff.pdf.
12. Yang K, Peng H, Wen Y, Li N. Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Appl Surf Sci*. 2010;256(10):3093-3097. doi:10.1016/j.apsusc.2009.11.079
13. Baharuddin AA, Ang BC, Abu Hussein NA, Andriyana A, Wong YH. Mechanisms of highly stabilized ex-situ oleic acid-modified iron oxide nanoparticles functionalized with

4-pentynoic acid. *Mater Chem Phys.* 2018;203:212-222.
doi:10.1016/j.matchemphys.2017.09.051

14. Dine EJA. Synthèse et caractérisation des nanoparticules intelligentes. :226.
15. Hervault A, Dunn AE, Lim M, et al. Doxorubicin loaded dual pH- and thermo-responsive magnetic nanocarrier for combined magnetic hyperthermia and targeted controlled drug delivery applications. *Nanoscale.* 2016;8(24):12152-12161. doi:10.1039/C5NR07773G
16. Concas G, Congiu F, Muscas G, Peddis D. Determination of Blocking Temperature in Magnetization and Mössbauer Time Scale: A Functional Form Approach. *J Phys Chem C.* 2017;121(30):16541-16548. doi:10.1021/acs.jpcc.7b01748
17. Saeki S, Kuwahara N, Nakata M, Kaneko M. Upper and lower critical solution temperatures in poly (ethylene glycol) solutions. *Polymer.* 1976;17(8):685-689. doi:10.1016/0032-3861(76)90208-1
18. Moghaddam SZ, Thormann E. Hofmeister effect on thermo-responsive poly(propylene oxide) in H₂O and D₂O. *RSC Adv.* 2016;6(33):27969-27973. doi:10.1039/C6RA02703B
19. Hallali N. Utilisation de nanoparticules magnétiques dans les traitements anti-tumoraux: Au-delà de l'hyperthermie magnétique. :207.

Chapitre IV : Evaluation biologique des nanovecteurs thermosensibles

IV.1 Introduction :

Comme il a été démontré dans le chapitre précédent, les nanovecteurs thermosensibles dont le cœur présente des propriétés magnétiques peuvent être utilisés pour le diagnostic et la libération contrôlée d'un principe actif anticancéreux (ici la DOX). Afin d'améliorer leur efficacité thérapeutique, il est nécessaire d'avoir une connaissance approfondie sur leur cytotoxicité vis-à-vis des cellules. La toxicité qui peut être apportée aux cellules cancéreuses par les NPs peut se présenter par une inflammation, la formation d'espèces réactives oxygénées (ROS), la condensation des chromosomes ainsi que la diminution de l'activité mitochondriale¹⁻³.

Étant donné que la taille de ces particules est très petite (entre 1 et 100nm)⁴ par rapport à celle des cellules (entre 5 et 50 μm)⁵ elle va leur permettre de traverser la membrane nucléaire et provoquer des mutations. La pénétration des NPs à l'intérieur de la cellule ne se fait pas par phagocytose (absorption de grosses molécules) à moins de la formation d'agrégats. Par contre elle peut être réalisée par différents mécanismes. Les plus connus sont : la diffusion passive⁶, par la clathrine⁷, par la cavéoline⁸ et l'endocytose médiée par les récepteurs. Cette dernière peut jouer pour tous les types cellulaires⁹.

L'entrée des NPs à l'intérieur de la cellule est un mécanisme compliqué capable à déclencher des effets indésirables. Ces effets dépendent du type de la cellule ainsi que des propriétés physico-chimique des NPs telles que leur taille, morphologie, concentration et la composition de leur surface¹⁰. La faible solubilité des nanoparticules nues est aussi un phénomène qui cause la mort cellulaire par l'agglomération de ces dernières¹¹ ce qui peut conduire à une obstruction au niveau des vaisseaux sanguins¹². L'ajout d'une enveloppe biocompatible recouvrant les nanoparticules améliore leur stabilité et leur biocompatibilité dans les milieux biologiques en évitant leur agglomération et en améliorant leur durée de circulation dans les milieux physiologiques¹³.

Dans le cas des SPIONS, une fois qu'elles pénètrent la membrane cellulaire, il a été démontré qu'elles sont dégradées en ions Fe^{2+} par des enzymes qui se présentent dans les lysosomes. Ces ions permettent la production des espèces d'oxygène actives (ROS) qui

altèrent le fonctionnement des mitochondries à l'intérieur de la cellule conduisant à la mort cellulaire^{14,15}.

Pour chaque nouvelle matière susceptible d'être en contact avec le vivant, des analyses biologiques et de cytotoxicité sont nécessaires à réaliser. Ces études peuvent être soit *in vitro* en mettant les NPs en contact avec des cellules ou *in vivo* en les injectant dans un organisme entier (plus souvent les rongeurs)¹⁰. Il existe différentes méthodes pour l'étude de la cytotoxicité des NPs *in vitro* telles que : les tests d'exclusion au bleu trypan, les méthodes Alamar bleu basées sur la résazurine¹⁶ et les tests colorimétriques basés sur la réduction de différents types de sels de tétrazolium (MTT et WST-1)¹⁷.

Dans ce chapitre, la cytotoxicité des NPs@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) vis-à-vis des cellules SKOV-3 (cellules cancéreuses de l'ovaire) qui sont sensibles à la DOX¹⁸ sera étudiée via le test WST-1.

IV.2 Matériels et méthodes :

IV.2.1 Matériels :

Les cellules SKOV-3 (lignée cellulaire dérivée de l'adénocarcinome ovarien) ont été achetées chez Sigma-Aldrich et cultivées dans le milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), complété par 10 % (v/v) de sérum bovin fœtal (SVF), 2 % de L-glutamine, 1 % de pénicilline-streptomycine et 0,05 % d'amphotéricine B. Tous les réactifs de culture cellulaire ont été fournis par Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Tableau IV-1 : Rôle des différents composants

Composant	Rôle
Sérum bovin fœtal	Supplément de croissance riche en protéine qui aide les cellules à survivre, grandir et se multiplier ¹⁹ .
L-glutamine	Acide aminé : source majeur d'énergie pour la prolifération cellulaire ²⁰ .
Pénicilline-streptomycine	Des antibiotiques qui aident à éviter la contamination bactérienne des cultures cellulaires ²¹ .
Amphotéricine B	Empêche la croissance des champignons en causant une perméabilité accrue au niveau de leurs membranes plasmiques fongiques ²² .

IV.2.2 Méthodes :

IV.2.2.1 Test de viabilité cellulaire WST-1 :

La lignée cellulaire a été cultivée dans des flacons T75 à 37°C, 5 % de CO₂, avec un passage deux fois par semaine.

La veille de la réalisation du test, les cellules SKOV-3 ont été traitées à la trypsine, récupérées dans du milieu DMEM complet et ensemencées dans une plaque à 96 puits à un débit de 1.10⁵ cellules / mL (1.10⁴ cellules par puits).

L'ensemencement des cellules se fait selon les étapes suivantes :

- Vérification de l'état des cellules au microscope inversé ;
- Le milieu usagé a été remplacé par 5 mL de nouveau milieu ;
- 4 mL de trypsine a été ajouté au milieu. Le mélange reste incubé pendant environ 5 minutes ;
- Les cellules ont été vérifiées par le microscope inversé afin d'assurer leur bon détachement ;
- La réaction a été arrêtée en ajoutant 1 mL de SVF ;
- Les cellules adhérentes sur le fond de la boîte ont été décollées par un flusher ;
- La suspension cellulaire a été récupérée dans un tube falcon de 15 mL puis centrifugée à 890 rpm à une température ambiante pendant 5 minutes ;
- Le surnageant a été jeté et le culot a été mis dans un milieu complet frais. Dans cette étape, le flusher a été réutilisé pour resuspendre et individualiser les cellules ;
- 20 µL de suspension cellulaire a été prélevée et placée dans un tube eppendorf de 200 µL ;
- 20 µL de bleu trypan a été ajouté au mélange. 20 µL du mélange a été déposé dans une lame de comptage pour compter les cellules ;
- L'ensemble des cellules a été ensemencées à 100 000 cellules.mL⁻¹ (soit 10 000 par puit) dans 100 µL de milieu complet ;
- Cette solution est versée dans un bac blanc et l'ensemble de l'ensemencement s'effectue avec une pipette multicanal réglée sur 100 µL.
- La solution a été incubée pendant 24h à 37°C, 5% de CO₂ pour que les cellules s'accrochent au fond des puits.

Le lendemain les cellules ont été exposées aux nanoparticules avec différentes concentrations

(3,125, 6,25 , 12,5 , 25, 50 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) et déposées dans l'incubateur pendant 24, 72 et 5h à 37 et 42°C (selon l'analyse).

Une fois que les cellules sont traitées par les nanoparticules, un volume de 10 μL de WST-1 à été ajouté dans chaque puit.

La lecture des plaques se fait après 1h de l'ajout du WST-1 par le spectrophotomètre.

IV.3 Résultats et discussions :

IV.3.1 Cytotoxicité des NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22nm et 50nm sur les cellules SKOV-3 après 24 et 72 h à 37°C :

La **Figure IV-1** et **Figure IV-2** montrent les résultats de la viabilité cellulaire des SKOV-3 après leur exposition à différentes concentrations de NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22 et 50nm (3,125 ;6,25 ; 12,5 ;25 ; 50 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) à 37°C (température physiologique) pendant 24 et 72h.

Les tests WST-1 démontrent une viabilité cellulaire dépendante de la concentration croissante des nanoparticules sur les cellules cancéreuses SKOV-3.

IV.3.1.1 NPs @ P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) 22 nm

Les NPs @ P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) 22 nm (**Figure IV-1**) présentent néanmoins une faible cytotoxicité. En effet, pour une concentration de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à 37°C elles présentent une viabilité cellulaire supérieur à 89% après 24h et de 88,92% après 72h. Pour une concentration de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, la viabilité cellulaire est de 84,47% et 86,47% après 24 et 72h respectivement et plus de 77 et 88% pour une concentration de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

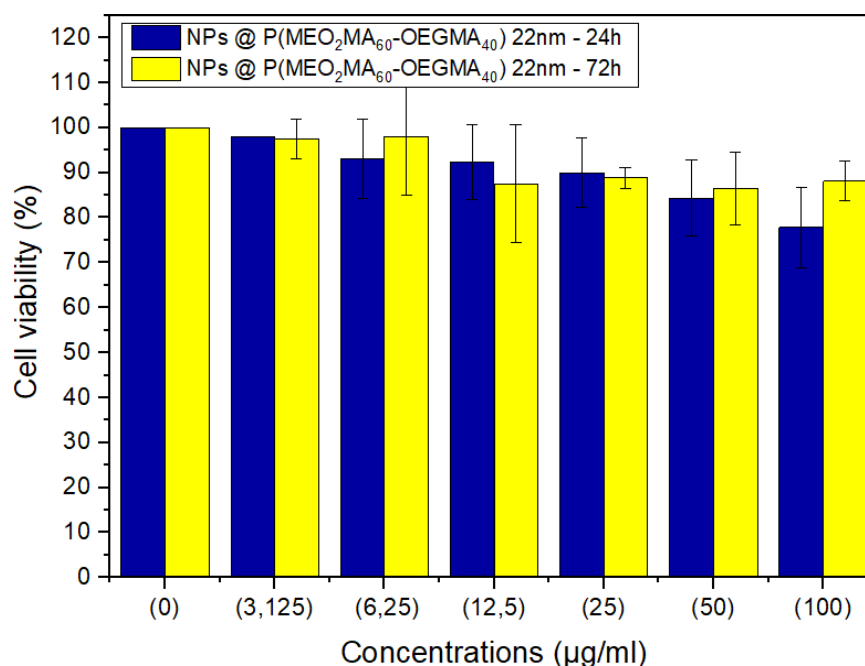


Figure IV-1 : Viabilité des cellules SKOV-3 après 24h et 72h de contact avec les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22nm.

Tableau IV-2 : Pourcentages des viabilités cellulaires des cellules SKOV-3 après 24h et 72h de contact avec les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22nm.

Concentrations NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) (µg .mL ⁻¹)	0	3,125	6,25	12,5	25	50	100
Viabilité cellulaire après 24h (%)	100	97,98	93,31	92,36	89,91	84,28	77,66
Viabilité cellulaire après 72h (%)	100	97,25	97,98	87,46	88,92	86,47	88,19

IV.3.1.2 NPs @ P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) 50 nm

Les NPs@P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) 50 nm (**Figure IV-2**) montrent aussi une cytotoxicité faible contre les cellules SKOV-3. Elles présentent un pourcentage de viabilité de 95 et 87% après 24 et 72h respectivement pour une concentration de 25µg.mL⁻¹. La viabilité des cellules diminue. Pour une concentration de NPs de 50µg.mL⁻¹ à des valeurs de 89,40 et 81,32% après

24 et 72h respectivement et pour la concentration la plus élevée de $100\mu\text{g.mL}^{-1}$, les pourcentages de la viabilité sont de 77,41% après 24 et 72h.

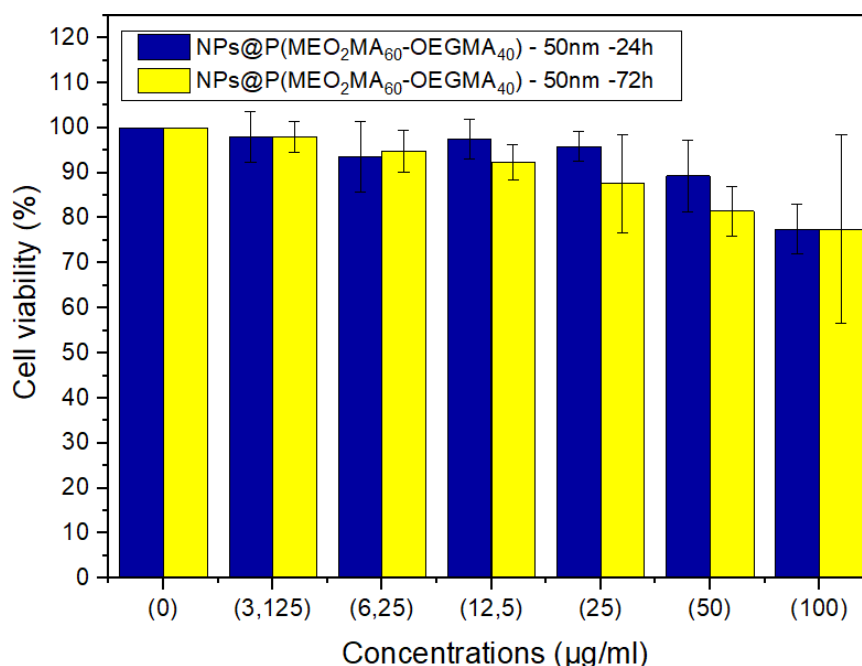


Figure IV-2 : Viabilité des cellules SKOV-3 après 24h et 72h de contact avec les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 50nm.

Tableau IV-3 : Pourcentages des Viabilités cellulaires des cellules SKOV-3 après 24h et 72h de contact avec les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 50nm.

Concentrations NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) (µg .mL ⁻¹)	0	3,125	6,25	12,5	25	50	100
Viabilité cellulaire après 24h (%)	100	97,98	93,56	97,73	95,76	89,40	77,41
Viabilité cellulaire après 72h (%)	100	97,98	94,80	92,10	87,46	81,32	77,41

La diminution de la viabilité cellulaire en fonction de la concentration des NPs est expliquée par l'augmentation de la concentration des ions métalliques qui composent les NPs et qui entraîne une cytotoxicité vis-à-vis des cellules SKOV-3²³. Cette cytotoxicité est due à la faible solubilité des ions Fe²⁺/Fe³⁺ au pH physiologique lorsque leur concentration augmente au-delà du

seuil critique²⁴ et qui provoque une perturbation mitochondriale qui pourrait donner lieu à différentes réactions tissulaires telles que la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui peut provoquer la mort cellulaire²⁵.

IV.3.2 Cytotoxicité des NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22nm et 50nm sur les cellules SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C :

Après avoir déterminé les valeurs de la LCST qui varient entre 40 et 42°C et à partir desquelles les NPs commencent à libérer la DOX, il est important d'étudier l'influence de la température et le temps sur la cytotoxicité des NPs.

Dans la **Figure IV.3** et la **Figure IV.4**, nous présentons les résultats de ces études. La cytotoxicité des NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22 et 50nm vis-à-vis des cellules SKOV-3 a été étudiée à deux températures différentes : à 37°C (température physiologique) pendant 24h et à 42°C (LCST) pendant 5h.

IV.3.2.1 NPs @ P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) 22 nm

Les NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) 22nm présentent des valeurs de cytotoxicité faibles même à des concentrations les plus élevées à 37 et 42°C.

A 37°C, pour une concentration de 100µg.mL⁻¹ les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22nm présentent des valeurs de viabilité cellulaire supérieures à 90% et pour les concentrations inférieures : 50 et 25µg.mL⁻¹, les pourcentages sont de 98,28 et 96,42% respectivement.

Les valeurs de la viabilité cellulaire diminuent après avoir augmenté la température du milieu à 42°C mais les viabilités restent supérieures à 88, 86 et 75% pour des concentrations de 25,50 et 100µg.mL⁻¹ respectivement.

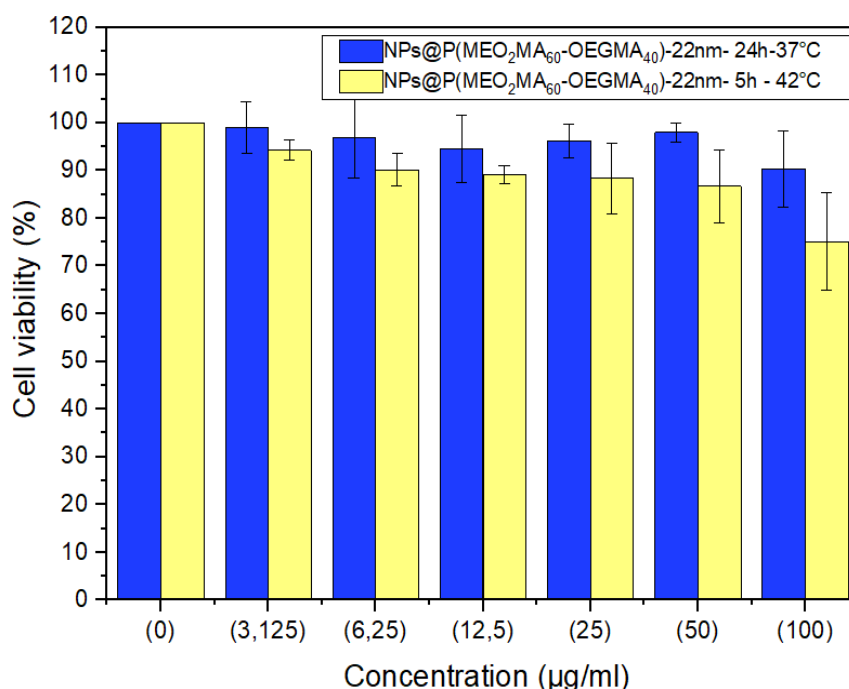


Figure IV-3 : Viabilité des cellules SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C de contact avec les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22nm

Tableau IV-4 : Pourcentages des viabilités cellulaires des SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C de contact avec les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22nm

Concentrations NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) (µg .mL-1)	0	3,125	6,25	12,5	25	50	100
Viabilité cellulaire après 24h à 37°C (%)	100	98,98	96,87	94,52	96,42	98,28	90,52
Viabilité cellulaire après 5h à 42°C (%)	100	94,28	90,07	89,12	88,42	86,77	75,01

IV.3.2.2 NPs @ P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) 50 nm :

L'activité métabolique des cellules diminue légèrement en les exposant aux NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 50 nm par rapport à celles de 22nm (**Figure IV-4**). Cette diminution est expliquée par la quantité des métaux qui est supérieure dans les NPs de 50nm (voir l'analyse ICP-OES **Chapitre II- Figure II**).

Pour des concentrations de 25, 50 et 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 50nm présentent des valeurs de viabilité cellulaire de 90,86, 85,23 et 77,66% à 37° et 89,91, 84,28 et 78,39% à 42°C respectivement.

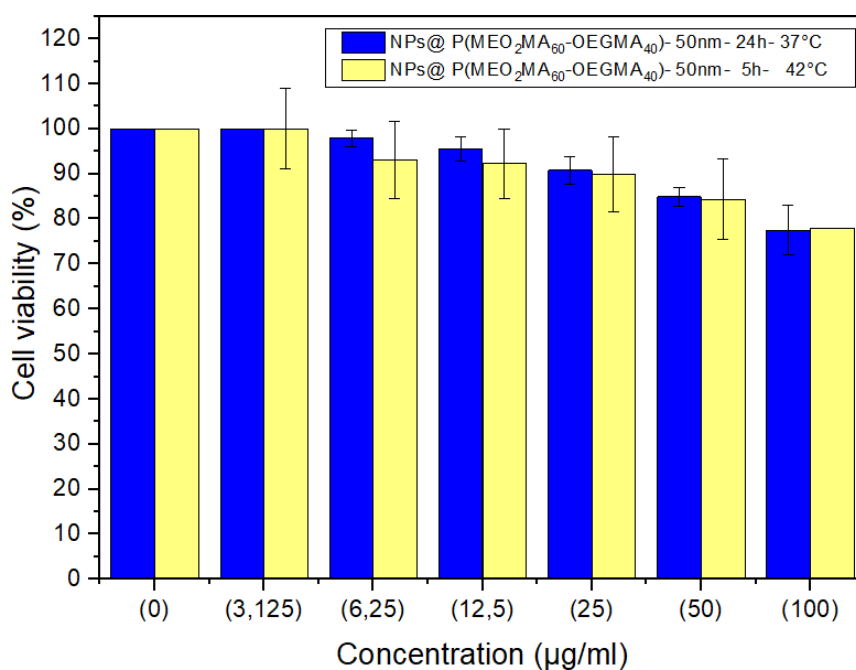


Figure IV-4 : Viabilité des cellules SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C de contact avec les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 50nm

Tableau IV-5 : Pourcentages des viabilités cellulaires des SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C de contact avec les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 50nm

Concentrations NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀) ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0	3,125	6,25	12,5	25	50	100
Viabilité cellulaire après 24h à 37°C (%)	100	100	97,98	95,54	90,86	85,23	77,66
Viabilité cellulaire après 5h à 42°C (%)	100	100	93,09	92,36	89,91	84,28	78,39

IV.3.3 Cytotoxicité des NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) - DOX de 22nm et 50nm sur les cellules SKOV-3 après 24 à 37°C et 5h à 42°C :

Dans le chapitre précédent, nous avons démontré l'efficacité des nanovecteurs NPs@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) des deux tailles 22 et 50nm comme système capable d'encapsuler et de relarguer le principe actif anticancéreux (DOX) sous l'effet de la température.

Afin de valider ce système comme un outil de traitement de cancer, il est nécessaire d'analyser la cytotoxicité des NPs chargées en DOX à 37 et 42°C température physiologique et LCST à partir de laquelle les NPs commencent à relarguer la DOX respectivement vis-à-vis des cellules cancéreuses et les comparer à la DOX libre.

Cette étude a été réalisée avec différentes concentrations de la DOX (**figures IV-5 et IV-6**). Ces concentrations représentent la quantité de la DOX qui a pu être encapsulée par les quantités des NPs (22 et 50 nm) étudiées précédemment dans les analyses WST-1.

Dans les analyses suivantes, les NPs@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) chargées en DOX seront nommées NPs@DOX.

IV.3.3.1 NPs @ P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) 22 nm :

Les NPs@DOX de 22nm (**Figure IV-5**) présentent également des pourcentages de viabilité cellulaire qui décroît d'une manière proportionnelle avec les concentrations de la DOX encapsulées et la DOX libre. Les SKOV-3 montrent une viabilité cellulaire de 84, 90, 76, 90 et 71,50% à 37°C après avoir été exposées à 1,32 ; 2,64 et 5,29 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de DOX chargée dans les NPs respectivement pendant 24h. A 42°C et après 5h la viabilité des SKOV-3 diminue à 78,56 ; 67,02 et 72,45% respectivement. Le traitement des SKOV-3 par les NPs chargées en DOX montrent des pourcentages de viabilité cellulaire proches de ceux obtenus pas les SKOV-3 traitées par la DOX libre.

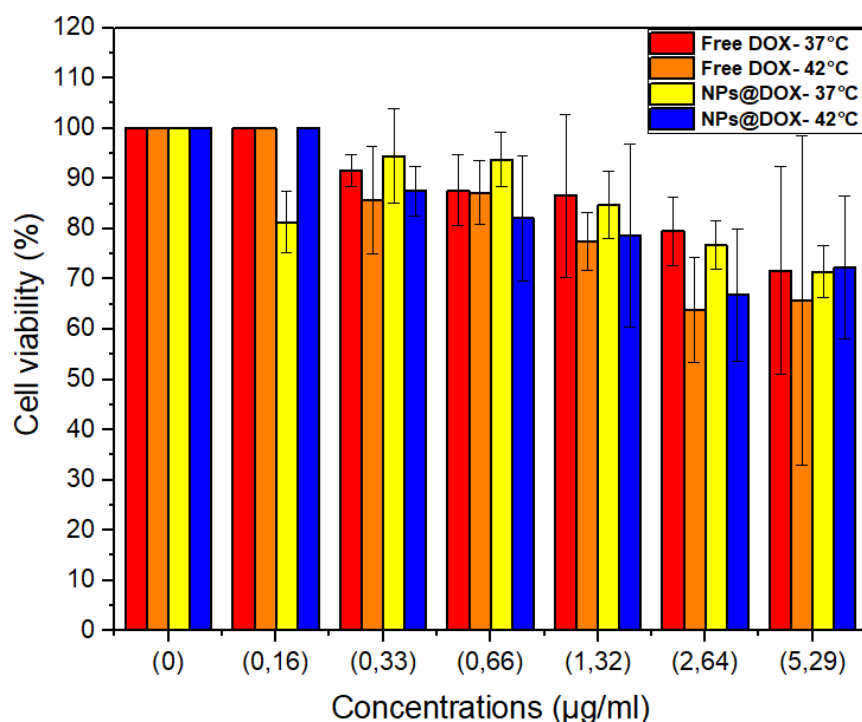


Figure IV-5 : Viabilité des cellules SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C de contact avec les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22nm chargée en DOX et la DOX libre.

Tableau IV-6 : Pourcentages des viabilités cellulaires des SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C de contact avec les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22nm chargées en DOX et la DOX libre.

Concentrations DOX encapsulée (µg .mL ⁻¹)		0	0,16	0,33	0,66	1,32	2,64	5,29
DOX libre	Viabilité cellulaire après 24h à 37°C (%)	100	100	91,69	87,96	86,77	79,95	71,97
	Viabilité cellulaire après 5h à 42°C (%)	100	100	85,82	82,25	77,85	63,97	65,63
NPs@DOX	Viabilité cellulaire après 24h à 37°C (%)	100	81,38	94,54	93,59	84,90	76,90	71,50
	Viabilité cellulaire après 5h à 42°C (%)	100	100	87,48	82,29	78,56	67,02	72,45

IV.3.3.2 NPs @ P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) 50 nm :

Dans le cas des NPs@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 50nm (**Figure IV-6**), la viabilité des SKOV-3 décroît fortement une fois exposées aux NPs chargées en DOX à 42°C par rapport à la DOX libre. Les pourcentages de viabilité cellulaire des SKOV-3 traitées par 1,86 ; 3,73 et 7,46 µg.mL⁻¹ de NPs@DOX sont de 92,40, 46,35 et 41,19% à 37°C pendant 24h respectivement et de 50,83, 44,72 et 33,42% à 42°C pendant 5h respectivement. Le traitement des SKOV-3 par les NPs @DOX montrent des pourcentages de viabilité cellulaire inférieurs par rapport à ceux obtenus par le traitement de la DOX libre. Ces pourcentages sont montrés dans le **tableau IV-7**.

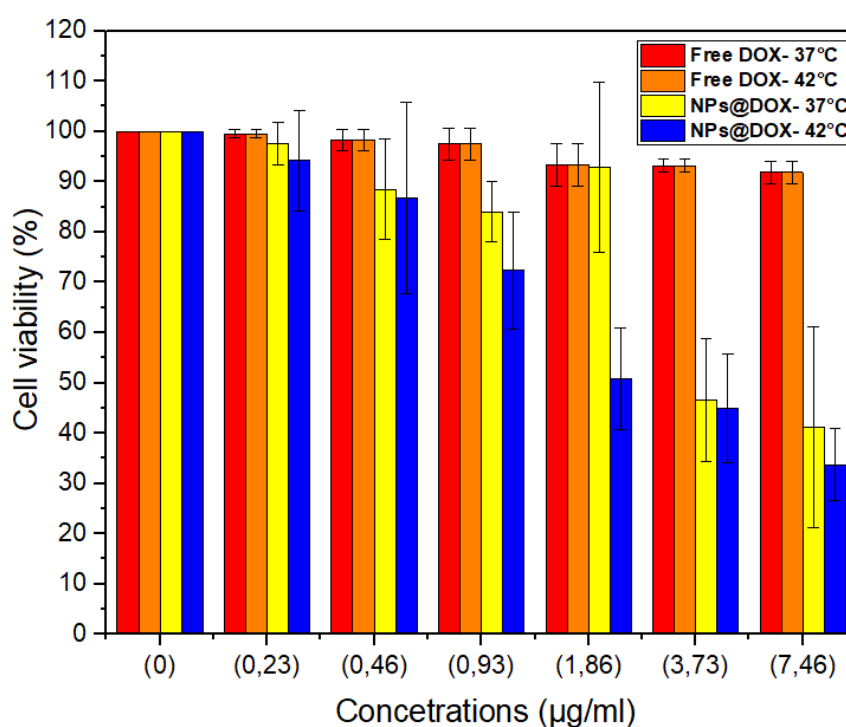


Figure IV-6 : Viabilité des cellules SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C de contact avec les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 50nm chargées en DOX et la DOX libre.

Tableau IV-7 : Pourcentages des viabilités cellulaires des SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C de contact avec les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 50nm chargées en DOX et la DOX libre.

Concentrations DOX encapsulée ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		0	0,23	0,46	0,93	1,86	3,73	7,46
DOX libre	Viabilité cellulaire après 24h à 37°C (%)	100	99,46	98,28	97,60	93,35	92,88	91,69
	Viabilité cellulaire après 5h à 42°C (%)	100	99,46	98,04	97,80	93,12	92,88	91,93
NPs@DOX	Viabilité cellulaire après 24h à 37°C (%)	100	97,36	88,20	83,95	92,88	46,35	40,96
	Viabilité cellulaire après 5h à 42°C (%)	100	94,30	87,01	72,69	51,07	45,16	33,42

IV.4 Conclusion:

Les résultats de ces analyses biologiques démontrent que les NPs@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22 et de 50 nm non chargées par le principe actif (DOX) sont des nanovecteurs non ou peu cytotoxiques vis-à-vis des cellules cancéreuses de l'ovaire (SKOV-3) à des concentrations pouvant atteindre les 50µg.mL⁻¹. La cytotoxicité de ces nanovecteurs augmente une fois chargées par la DOX et elles présentent une cytotoxicité plus élevée vis-à-vis des cellules cancéreuses comparativement à la DOX libre. Ce phénomène démontrent l'efficacité du traitement des cellules cancéreuses par la libération de la DOX encapsulée dans les NPs@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) par rapport à la DOX libre. L'efficacité du traitement augmente encore plus à des températures supérieures ou égale à la LCST (42°C). A cette température, les NPs@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) chargées en DOX présentent des pourcentages de viabilité cellulaires proches de ceux de la DOX libre ce qui confirme que nos nano-objets sans ligands ne permettent pas une augmentation drastique de l'efficacité thérapeutique.

Dans le but d'améliorer l'efficacité du traitement des cellules cancéreuses par nos nanovecteurs, ces derniers seront greffés avec un ligand de ciblage spécifique pour les cellules cancéreuses de l'ovaire dans le chapitre suivant de ce manuscrit.

IV.5 Références :

1. Häfeli UO, Riffle JS, Harris-Shekhawat L, et al. Cell Uptake and *in Vitro* Toxicity of Magnetic Nanoparticles Suitable for Drug Delivery. *Mol Pharm*. 2009;6(5):1417-1428. doi:10.1021/mp900083m
2. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro*. 2005;19(7):975-983. doi:10.1016/j.tiv.2005.06.034
3. Jeng HA, Swanson J. Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles in Mammalian Cells. *J Environ Sci Health Part A*. 2006;41(12):2699-2711. doi:10.1080/10934520600966177
4. Rani K. Biomedical Applications of Silver and Gold Nanoparticles: Effective and Safe Non-Viral Delivery Vehicles. *J Appl Biotechnol Bioeng*. 2017;3(2). doi:10.15406/jabb.2017.03.00059
5. Cellule définition, rôle, composition, anomalie.htm.
6. Bastien E. Conception et optimisation de nanoparticules dendrimériques photoactivables dans le cadre d'un traitement photodynamique.
7. Steinbach JM, Seo YE, Saltzman WM. Cell penetrating peptide-modified poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles with enhanced cell internalization. *Acta Biomater*. 2016;30:49-61. doi:10.1016/j.actbio.2015.11.029
8. Costa C, Kiliç G, Brandão F, et al. Cytotoxicity of iron oxide nanoparticles with different coatings on human neuronal cells. *Toxicol Lett*. 2014;229:S199. doi:10.1016/j.toxlet.2014.06.673
9. Marano F, Guadagnini R. Les nanoparticules dans l'alimentation : quels risques pour le consommateur ? *Cah Nutr Diététique*. 2013;48(3):142-150. doi:10.1016/j.cnd.2013.01.005
10. Safar R. Étude toxicologique de nanoparticules polymériques véhicules de S-nitrosoglutathion.
11. Epple M. Review of potential health risks associated with nanoscopic calcium phosphate. *Acta Biomater*. 2018;77:1-14. doi:10.1016/j.actbio.2018.07.036
12. Thorat ND, Bohara RA, Malgras V, Tofail SAM, Ahamad T, Alshehri SM. Multimodal Superparamagnetic Nanoparticles with Unusually Enhanced Specific Absorption Rate for Synergetic Cancer Therapeutics and Magnetic Resonance Imaging. :29.
13. Pelaz B, del Pino P, Maffre P, et al. Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. *ACS Nano*. 2015;9(7):6996-7008. doi:10.1021/acsnano.5b01326
14. Risom L, Møller P, Loft S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res Mol Mech Mutagen*. 2005;592(1-2):119-137. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.06.012

15. Mahmoudi M, Laurent S, Shokrgozar MA, Hosseinkhani M. Toxicity Evaluations of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Cell “Vision” versus Physicochemical Properties of Nanoparticles. *ACS Nano*. 2011;5(9):7263-7276. doi:10.1021/nn2021088
16. Yin LM, Wei Y, Wang Y, Xu YD, Yang YQ. Long Term and Standard Incubations of WST-1 Reagent Reflect the Same Inhibitory Trend of Cell Viability in Rat Airway Smooth Muscle Cells. *Int J Med Sci*. 2013;10(1):68-72. doi:10.7150/ijms.5256
17. Shete PB, Patil RM, Thorat ND, et al. Magnetic chitosan nanocomposite for hyperthermia therapy application: Preparation, characterization and in vitro experiments. *Appl Surf Sci*. 2014;288:149-157. doi:10.1016/j.apsusc.2013.09.169
18. Dine EJA. Synthèse et caractérisation des nanoparticules intelligentes. :226.
19. Gstraunthaler G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: Serum-free cell culture. *ALTEX*. Published online 2003:257-281. doi:10.14573/altex.2003.4.257
20. Singer P, Smadja P. Diètes immuno-enrichies en protéines. *Nutr Clin Métabolisme*. 2010;24(2):45-51. doi:10.1016/j.nupar.2008.10.006
21. Poly_cours_bio_STIA2_007.pdf.
22. Amphotéricine B substance active à effet thérapeutique - VIDAL.htm.
23. Concas G, Congiu F, Muscas G, Peddis D. Determination of Blocking Temperature in Magnetization and Mössbauer Time Scale: A Functional Form Approach. *J Phys Chem C*. 2017;121(30):16541-16548. doi:10.1021/acs.jpcc.7b01748
24. Quignard S. Comportement des nanoparticules de silice en milieu biologique: des cellules aux biomatériaux.
25. Saeki S, Kuwahara N, Nakata M, Kaneko M. Upper and lower critical solution temperatures in poly (ethylene glycol) solutions. *Polymer*. 1976;17(8):685-689. doi:10.1016/0032-3861(76)90208-1

Chapitre V : Etude des performances thérapeutiques de la vectorisation des NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) modifiées par l'acide folique

V.1 Introduction :

Dans ce chapitre, notre but est d'améliorer les performances thérapeutiques des nanoparticules présentées dans les chapitres précédents via leur vectorisation. La modification de la surface des NPs par un agent de ciblage est une approche intéressante pour obtenir un système avec une libération contrôlée qui évite la dégradation du médicament et ses effets toxiques sur les cellules saines¹. L'acide folique fait partie des agents de ciblage les plus reconnus dans la littérature qui sont stables, peu coûteux et non-immunogènes² pour cibler spécifiquement les cellules cancéreuses grâce à ces récepteurs qui sont fréquemment surexprimés sur la surface de ces cellules par rapport aux cellules saines³. Ces récepteurs ont été identifiés comme des marqueurs de tumeur, en particulier dans les tumeurs ovariennes⁴.

Dans le chapitre précédent, nous avons démontré l'efficacité de nos nanovecteurs comme un système capable d'encapsuler la doxorubicine et de la libérer de manière contrôlée à 42°C. Pour améliorer les performances thérapeutiques de ces nanovecteurs, nous avons choisi de greffer sur les bouts des chaînes polymériques de l'acide folique qui permettra le ciblage de ces nanovecteurs vers les cellules cancéreuses de l'ovaire (SKOV-3).

Dans un travail publié par Fong *et al*⁵ et dans le but de cibler des cellules cancéreuses du sein (MCF-7), des nano-objets à base d'oxyde de graphène (GO) sensibles au pH ont été greffés par l'acide folique (GOFA) et chargés avec la doxorubicine (DOX) (GOFA-DOX). Les GOFA-DOX ont été encapsulés dans un hydrogel thermosensible composé de l'acide hyaluronique-chitosan-g-poly(N-isopropylacrylamide) (HACPN) afin d'assurer une libération intra-tumorale de la DOX. La libération de la DOX se fait après une dégradation lente du HACPN (3 semaines) et une absorption cellulaire des GOFA-DOX par les cellules tumorales à l'aide des interactions entre les GOFA-DOX et les récepteurs du folate sur la surface des cellules tumorales. Le noyau des cellules MCF-7 a été marqué par le bleu de Trypan et les GOFA-DOX par la DOX chargée. Les cellules ont été mises en contact avec GOFA-DOX pendant 1h. Après ce temps, des images ont été prises par le microscope confocal.

Ces images montrent le ciblage des noyaux des cellules cancéreuses (MCF-7) par les GOFA-DOX ⁵.

Le groupe de Wang *et al* ⁶ a synthétisé des liposomes magnétiques thermosensibles enveloppés par le 7-Allylamio-17-desmethoxygeldanamycin (17-AAG). Le 17-AAG est un inhibiteur de HSP90 qui a la capacité d'augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses à l'hyperthermie sans sensibiliser les cellules saines. Le HSP90 est un type de protéines de choc thermique (HSP : Heat Shock Proteins) qui sont surexprimées par les cellules dans le cas de stress, en particulier à des températures élevées. Ces magnéto-liposomes ont été greffés par l'acide folique (7 – AAG /MTSLs - FA) pour cibler les cellules tumorales de l'ovaire (SKOV-3). Le ciblage des cellules a été étudié *in vitro* et *in vivo* en combinaison avec l'hyperthermie. La prolifération des cellules SKOV-3 par les liposomes ainsi que leur apoptose ont été confirmées par les analyses MTT, la cyrtométrie en flux, le microscope optique et le MET. Des expériences *in vivo* utilisant un modèle sous cutané de souris et un modèle de xénogreffe de tumeur d'ascite ont montré la stabilité des 7-AAG/MTSLs-FA *in vivo* et l'efficacité du ciblage des cellules tumorales qui surexpriment le récepteur des folates. Cette étude a montré que l'acide folique était capable d'augmenter l'absorption cellulaire des liposomes en présence de l'hyperthermie ⁶.

Dans un autre travail réalisé par Afzalipour *et al* ⁷ et pour le même objectif de cibler les cellules cancéreuses par l'acide folique, l'efficacité du traitement des nanoparticules magnétiques chargées de témozolomide (TMZ) greffées avec l'acide folique (TMZ/MNPs-FA) sur le gliome C6 des rats a été étudiée en présence d'un champ magnétique alternatif (AMF). Les gliomes C6 des rats ont été injectés par voie intraveineuse par le TMZ libre, des MNPs-FA et des TMZ/MNPs-FA en présence et en absence de l'AMF (43°C). Après deux heures, les rats ont été anesthésiés par la kétamine/xylazine. Les têtes des rats ont été placées dans une bobine magnétique alternative (13,56MHz, 40 A/m) pour bien localiser la tumeur pour une durée de 8 ou 20mn. L'efficacité du traitement a été évaluée en surveillant le volume tumoral et la durée de survie des rats. Le traitement avec TMZ ou AFM seul n'était pas très efficace. Avec ce traitement, le volume de la tumeur a augmenté lentement par rapport aux tumeurs sans traitement. Le volume de la tumeur a aussi augmenté après le traitement des cellules avec MNPs-FA sans AFM.

L'association du AFM au traitement avec le TMZ était plus efficace. Il a conduit à une augmentation de la survie du rat à 67 jours avec une diminution du volume de la tumeur (3 fois moins que le témoin). Les NPs chargées de TMZ ont présenté des résultats similaires : une augmentation de la survie à 71 jours et la diminution du volume de la tumeur jusqu'au 3,6 moins

que le témoin. Le traitement avec les MNPs-FA chargées de TMZ associé avec l'AMF a montré la meilleure réponse. Le volume de la tumeur a diminué 7-10 fois et la survie du rat a augmenté jusqu'au 97-106 jours. Ces résultats ont confirmé que la combinaison de l'AMF avec les TMZ/MNPs-FA a pu supprimer la croissance tumorale en favorisant l'apoptose⁷.

Dans les travaux précédents de l'équipe, le ciblage des cellules cancéreuses a été étudié par Dr. Zied Ferjaoui. Dans cette étude, des NPs magnétiques thermosensibles NPs@P(MEO₂MA_x-OEGMA_{100-x}) ont été greffées avec l'acide folique dans le but de mettre en évidence l'impact de cette molécule sur le ciblage des cellules cancéreuses (SKOV-3)⁸.

Dans ce chapitre, les NPs synthétisées précédemment (50nm) dans le chapitre II recouvertes du copolymère thermosensible P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) dans le chapitre III vont être greffées par l'acide folique dans l'objectif d'étudier son effet sur le ciblage des cellules SKOV-3 par les NPs. L'objectif de cette étape est résumé dans la **figure V-1**.

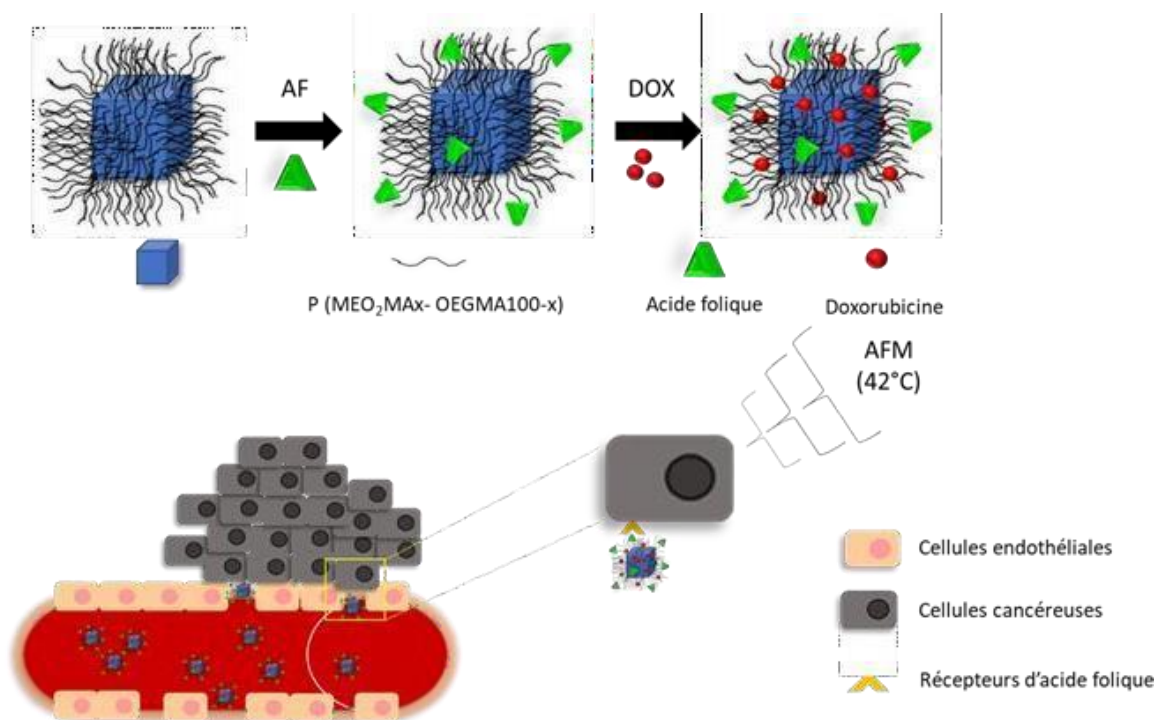


Figure V-1 : Objectif du chapitre V.

V.2 Matériels et méthodes :

V.2.1 Modification des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) par l'acide folique:

La molécule de l'acide folique modifiée (**annexe**) a été greffée sur la surface des NPs@ P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) selon les étapes suivantes:

Une masse de 200 mg d'acide folique a été dispersée dans un volume de 20ml d'éthanol. Le mélange a été soumis aux ultrasons pendant 30mn afin de bien disperser l'acide folique. Puis, 6 mg de NPs@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) ont été ajoutés au mélange et dispersés encore par les ultrasons. 200 μ L de CuBr₂ / TPMA (0,884 μ mol CuBr₂ / 4,3 μ mol de TPMA) ont été injectés dans le mélange. Le mélange a été agité sous argon pendant 30mn. Ensuite, 250 μ L d'hydrazine (7,1 mg mL⁻¹ dans du DMSO) ont été ajoutés et le mélange a été agité sous argon pendant 24 h. Après 24h, le mélange a été versé dans 200 ml d'eau Milli-Q chaude à 50°C afin de précipiter les NPs. Les NPs ont été récupérées à l'aide d'un aimant et lavées 3 fois à l'eau chaude (50°C) (**Figure V-2**).

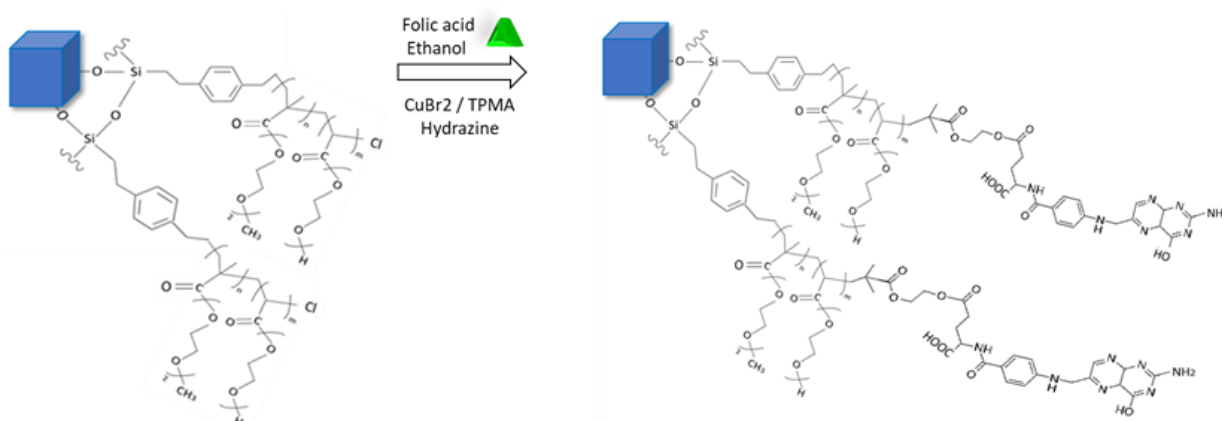


Figure V-2 : Modification des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) par l'acide folique.

V.2.2 Encapsulation de la doxorubicine dans les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀)-AF:

L'encapsulation de la DOX a été faite selon les étapes du protocole cité dans le chapitre III (page 89).

La **figure V-3** représente les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) modifiées par l'acide folique.

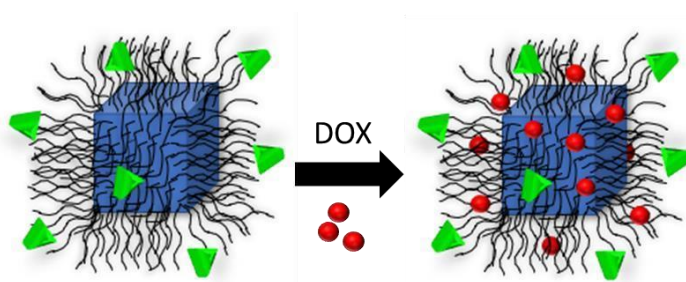


Figure V-3 : NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀)- AF.

V.3 Résultats et discussions :

V.3.1 Analyse par spectroscopie Infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF) :

Comme pour chaque étape de modification de surface des NPs, l'analyse par la spectroscopie Infra rouge à transformée de Fourier a été faite dans l'objectif de confirmer la modification de la surface des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) par l'acide folique. Le résultat de cette analyse est présenté dans la **FigureV-4**.

Le spectre infrarouge montre trois pics à 1122 ;1493 et 1693 cm⁻¹ qui correspondent aux vibrations d'élongation des liaisons C-O, C=C et C=O respectivement du copolymère P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀). La présence du copolymère est aussi confirmée par la liaison C-H située à 2849 cm⁻¹. Le greffage de l'acide folique sur la surface des NPs@ P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) est confirmée par les vibrations d'élongation des liaisons N-H et C-N situées à 3300 cm⁻¹ et à 1307 cm⁻¹ ainsi que par la liaison N-H à 750 cm⁻¹.

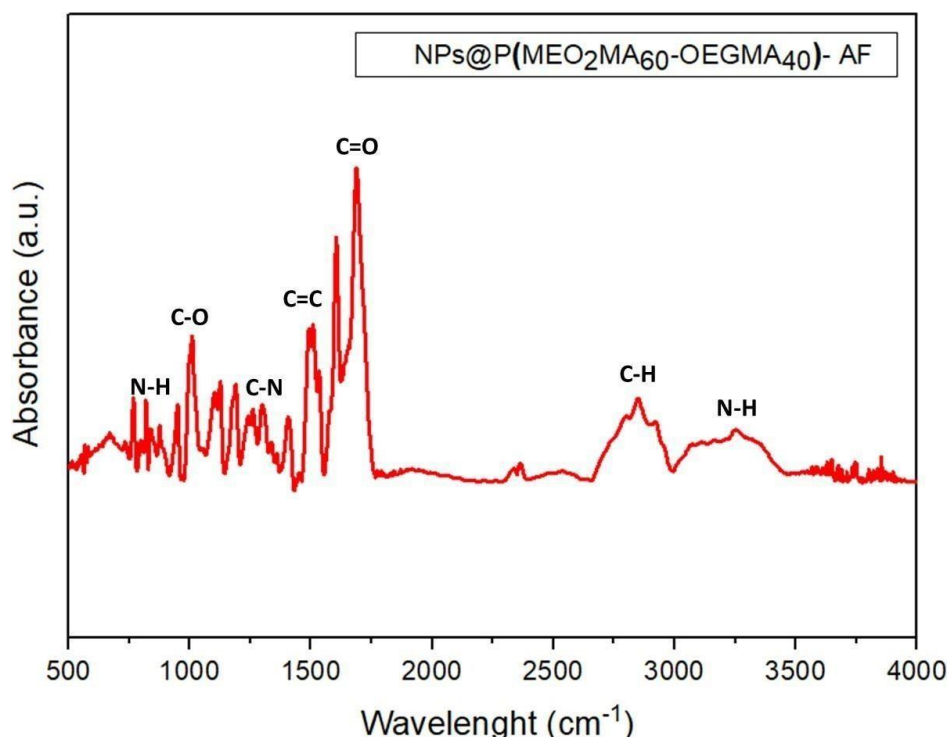


Figure V-4 : Spectre IRTF des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀)- AF.

V.3.2 Microscopie électronique à transmission à haute résolution (MET-HR):

Dans cette étape de fonctionnalisation des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) par l'acide folique, l'analyse par la microscopie électronique à transmission à haute résolution a été refaite dans l'objectif de confirmer la stabilité cristalline des NPs après le greffage.

Les images de cette analyse sont présentées dans la **FigureV-5**.

Le cliché de la microscopie électronique (a) montre des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀)-AF. Ces particules sont monodispersées et elles gardent la même taille des NPs Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄ qui est d'une moyenne de 50nm ainsi que la forme cubique.

Le cliché de diffraction réalisé par le microscope électronique à haute résolution (MET-HR) (b) présente des tâches bien organisées qui correspondent aux plans cristallins : (111), (400), (311), (200) et (220) qui sont identiques à ceux de la magnétite présentés dans le Chapitre II de ce manuscrit.

Cette analyse nous confirme que la fonctionnalisation des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) par l'AF n'altère pas la structure cristalline du cœur des NPs.

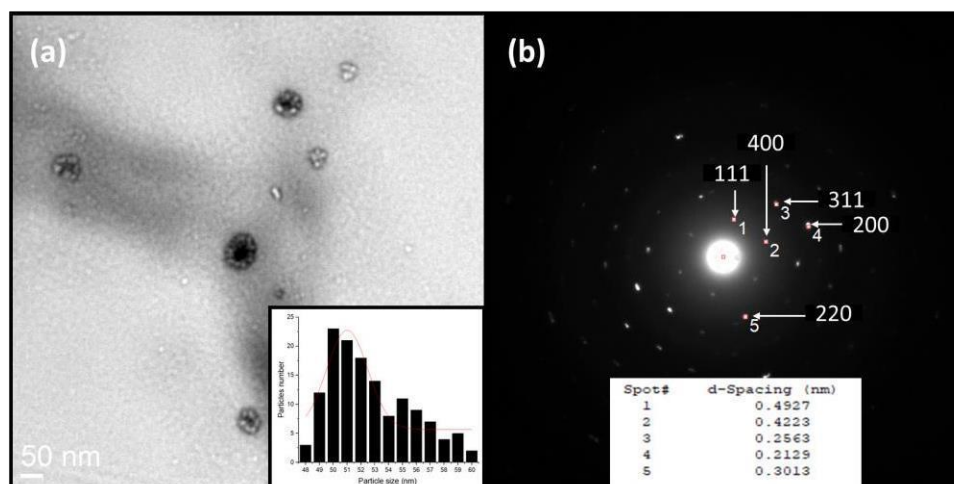


Figure V-5 : Image MET (bright field-fond clair) et histogramme de distribution de taille des NPs@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀)- AF (50nm) (a). Cliché de diffraction des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀)- AF (50nm) (b).

V.3.3 Evaluation biologique des NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀)- AF:

La cytotoxicité des nanoparticules fonctionnalisées à l'acide folique sur les cellules SKOV-3 a été évaluée grâce au test de viabilité cellulaire WST-1. Leur effet cytotoxique a été quantifié après incubation des cellules en présence des nanoparticules pendant 24 et 72 heures à 37°C pour les mêmes concentrations en nanoparticules étudiées dans le chapitre IV (de 3,125 µg.mL⁻¹ à 100 µg.mL⁻¹).

La **Figure V-6** présente les résultats de la viabilité cellulaire des NPs @ P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀)-AF en fonction de différentes concentrations de NPs. Les valeurs des pourcentages de ces viabilités sont regroupés dans le **tableau V-1**.

Cette analyse démontre une cytotoxicité dépendante de la concentration croissante des nanoparticules sur les cellules cancéreuses. Les NPs@P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀)-AF présentent néanmoins une faible cytotoxicité. En effet, pour des concentrations de 25 ; 50 et 100µg.mL⁻¹, elles présentent une viabilité cellulaire autour de 83 ;47 ; 78,31 et 61,40% après 24h et de 80,42 , 70,31 et 54,59% après 72h.

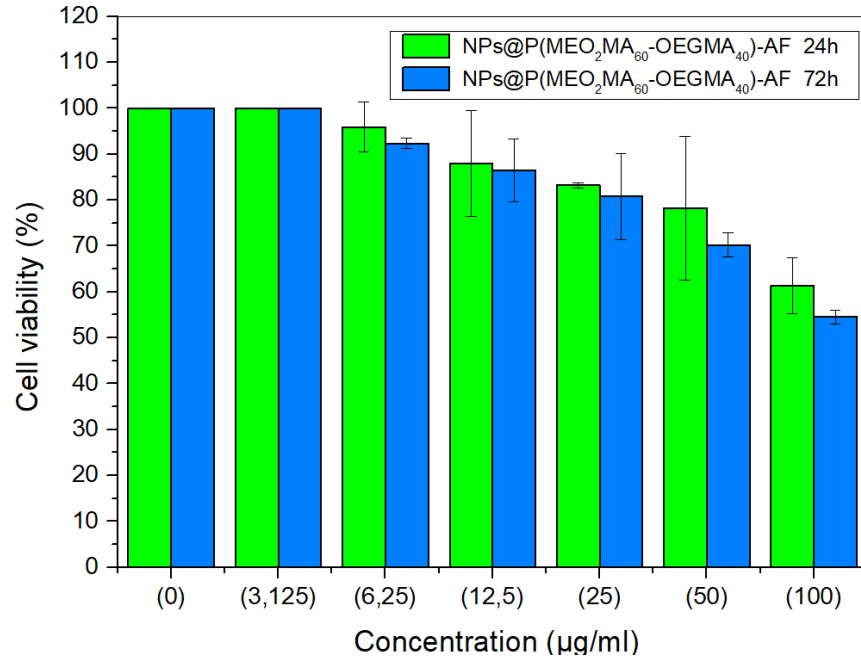


Figure V-6 : Viabilité des cellules SKOV-3 après 24h et 72h de contact avec les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀)-AF de 50nm.

Tableau V-1 : Pourcentages des viabilités cellulaires des cellules SKOV-3 après 24h et 72h de contact avec les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀)-AF de 50nm.

Concentrations NPs@ P(MEO ₂ MA ₆₀ OEGMA ₄₀)- AF (µg .mL-1)	0	3,125	6,25	12,5	25	50	100
Viabilité cellulaire après 24h (%)	100	100	95,71	87,96	83,47	78,31	61,40
Viabilité cellulaire après 72h (%)	100	100	92,42	86,31	80,42	70,31	54,59

V.3.4 Evaluation biologique des NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀)- AF chargées en DOX:

Après avoir chargé les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀)-AF avec la DOX, leur cytotoxicité a été étudiée vis-à-vis de la lignée cellulaire SKOV-3. La viabilité cellulaire des NPs a été analysée à deux températures 37°C (température physiologique) et 42°C (LCST) et elle a été comparée aux différentes concentrations de la DOX libre (0,23 ; 0,46 ; 0,93 ; 1,86 ; 3,73 et 7,46 µg.mL⁻¹). Ces concentrations présentent la quantité de la DOX chargée dans les NPs de 50 nm (3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 et 100 µg.mL⁻¹ qui ont été précédemment analysées dans le chapitre IV.

Nous présentons les analyses de cette étude dans la **Figure V-7** et les pourcentages obtenus dans le **tableau V-2**.

Les résultats montrent une viabilité cellulaire supérieure à 93 ; 92 et 91% pour des concentrations de DOX de 1,86 ; 3,73 et 7,46 µg.mL⁻¹ à 37 et 42°C. Une grande diminution de la viabilité est observée lors du traitement des cellules avec des NPs modifiées avec l'AF et chargées en même temps avec la DOX.

A 37°C et pour des concentrations de DOX de 1,86 ; 3,73 et 7,46 µg.mL⁻¹, la viabilité cellulaire est de 73,60 ; 51,51 et 33,19% respectivement.

A une température de 42°C et à laquelle les NPs libèrent la DOX chargée, la viabilité des SKOV-3 est de 34,85; 22,16 et 17,44 µg.mL⁻¹ pour les mêmes concentrations de la DOX. La viabilité cellulaire des SKOV-3 traitées par les NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀)-AF chargées en DOX à 42°C est largement inférieure à celle de la DOX libre à la même température. En effet, elle diminue de 91,93 jusqu'à 17,20% à une concentration de DOX de 7,46 µg.mL⁻¹. Cette diminution peut être due à la présence de la molécule de l'acide folique fonctionnalisée sur la surface des NPs et son rôle dans l'internalisation des NPs vers les SKOV-3.

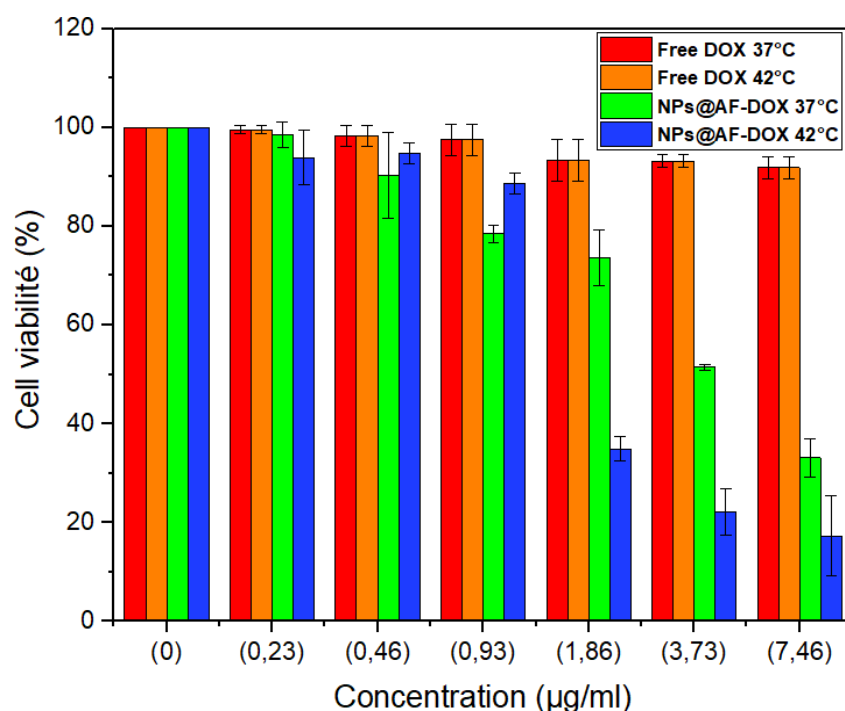


Figure V-7 : Viabilité des cellules SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C de contact avec les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀)-AF chargées en DOX et la DOX libre.

Tableau V-2 : Pourcentages des viabilités cellulaires des SKOV-3 après 24h à 37°C et 5h à 42°C de contact avec les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀)-AF de 50nm chargée en DOX et la DOX libre

Concentrations DOX encapsulée (µg .mL ⁻¹)		0	0,23	0,46	0,93	1,86	3,73	7,46
DOX libre	Viabilité cellulaire après 24h à 37°C (%)	100	99,46	98,28	97,60	93,35	92,88	91,69
	Viabilité cellulaire après 5h à 42°C (%)	100	99,46	98,04	97,80	93,12	92,88	91,93
NPs@AF-DOX	Viabilité cellulaire après 24h à 37°C (%)	100	98,51	90,30	78,56	73,60	51,51	33,19
	Viabilité cellulaire après 5h à 42°C (%)	100	93,83	94,75	78,56	34,85	22,16	17,44

V.3.5 Hyperthermie magnétique :

Le comportement des NPs @ AF (50nm) soumise à un champ magnétique alternative d'une fréquence de 536,5 et de 796KHz et à une amplitude de 300 et 200 Oe respectivement dans l'eau et le DMEM est présenté dans la **Figure V-8**.

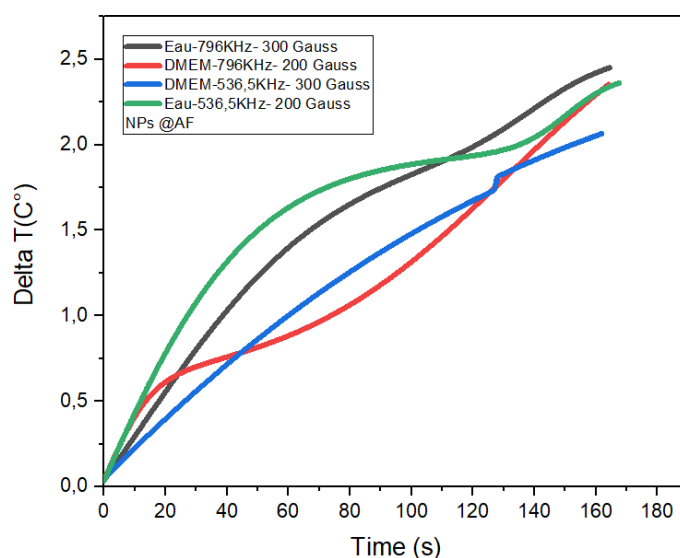


Figure V-8 : Températures des NPs @ AF (50nm) sous un champs magnétique alternative dans le DMEM et l'eau à 536,5 et 796 KHz.

Lorsque elles sont soumise à un champ magnétique alternative d'une fréquence de 536,5 et 796KHz, les NPs @ AF (50nm) présentent des températures de chauffage comprises entre 2 et 2,5 °C dans l'eau et le DMEM après seulement 2min et 40 secondes. La diminution de la température de 3 °C des NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) (**Figure III-18**) à une température de 2,5°C dans l'eau à 796KHz est expliquée par la présence de la molécule d'acide folique sur la surface des NPs.

V.4 Conclusion :

Dans cette étape, nous avons réussi à greffer l'AF comme une molécule de ciblage des cellules cancéreuses au bout des chaînes du copolymère P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) qui enveloppent les NPs Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄.

La modification de surface de ces NPs par l'AF a été confirmée par la spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier. La microscopie électronique à transmission à haute résolution nous a prouvé que le greffage de cette molécule n'altère pas la structure cristalline des NPs Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄, qui reste la structure d'un cube à faces centrées.

Les NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀)- AF ont montré une bonne viabilité cellulaire vis-à-vis des SKOV-3 après 24 et 72h. Cette viabilité diminue lorsque les cellules sont traitées par les nanovecteurs chargées en DOX ce qui nous prouve que la quantité de la DOX chargée dans les NPs est suffisante pour avoir un bon taux d'apoptose des SKOV-3.

Malheureusement, dans ce chapitre de thèse, nous n'avons pas la possibilité de présenter des analyses d'internalisation de ces nanovecteurs du au temps limité des expériences.

^

V.5 Références :

1. Stella B, Arpicco S, Peracchia MT, et al. Design of Folic Acid-Conjugated Nanoparticles for Drug Targeting. *J Pharm Sci.* 2000;89(11):1452-1464. doi:10.1002/1520-6017(200011)89:11<1452::AID-JPS8>3.0.CO;2-P
2. Antony AsC. The Biological Chemistry of Folate Receptors. :14.
3. Weitman SD, Lark RH, Coney LR, et al. Distribution of the Folate Receptor GP38 in Normal and Malignant Cell Lines and Tissues. :6.
4. Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ. Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci.* 1990;87(18):7235-7239. doi:10.1073/pnas.87.18.7235
5. Fong Y, Chen CH, Chen JP. Intratumoral Delivery of Doxorubicin on Folate-Conjugated Graphene Oxide by In-Situ Forming Thermo-Sensitive Hydrogel for Breast Cancer Therapy. *Nanomaterials.* 2017;7(11):388. doi:10.3390/nano7110388
6. Wang X, Yang R, Yuan C, An Y, Tang Q, Chen D. Preparation of Folic Acid-Targeted Temperature-Sensitive Magnetoliposomes and their Antitumor Effects In Vitro and In Vivo. *Target Oncol.* 2018;13(4):481-494. doi:10.1007/s11523-018-0577-y
7. Afzalipour R, Khoei S, Khoee S, et al. Thermosensitive magnetic nanoparticles exposed to alternating magnetic field and heat-mediated chemotherapy for an effective dual therapy in rat glioma model. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 2021;31:102319. doi:10.1016/j.nano.2020.102319
8. Ferjaoui Z. Synthèse et caractérisation de nanoparticules magnétiques répondantes pour des applications en thérapie cancéreuse. :154.

Conclusion Générale

Durant ce travail de thèse, une formulation de NPs type cœur/coquille à base d'un cœur magnétique et une coquille thermosensible a été développée. Cette formulation est capable d'encapsuler un médicament anticancéreux et le libérer près du site tumorale sous l'effet de la température.

Ce travail a été présenté en quatre chapitres :

- Synthèses et caractérisations physico-chimique des NPs ;
- Fonctionnalisation des nanoparticules pour l'encapsulation et la délivrance du principe actif ;
- Evaluation biologique des nanovecteurs thermosensibles ;
- Etude des performances thérapeutiques de la vectorisation des NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) modifiées par l'acide folique.

I. Synthèses et caractérisations physico-chimique des NPs :

Dans ce chapitre, quatre différentes tailles de NPs Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄ ont été synthétisées dans le but d'étudier l'influence de cette dernière sur leurs propriétés magnétiques et hyperthermiques. Les NPs synthétisées ont été caractérisées par différentes méthodes de caractérisations physico-chimique. La taille et la morphologie des NPs ont été identifiées par la microscopie électronique en transmission (MET). Leur composition chimique a été déterminée par le diffraction des rayons X (DRX), la spectroscopie d'émission de plasma à couplage inductif (ICP-OES) et la spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier (IR-TF). Les propriétés magnétiques des NPs ont été analysées pour chaque taille de NPs. Nous avons démontré par ces analyses l'influence de la taille des NPs sur leurs propriétés magnétiques et les NPs Zn_{0.4}Fe_{2.6}O₄@ MnFe₂O₄ de la taille la plus grande de 50nm montrent des valeurs de saturations magnétiques et des valeurs de SAR les plus élevées par rapport aux autres tailles.

II. Fonctionnalisation des nanoparticules pour l'encapsulation et la délivrance du principe actif :

Dans ce second chapitre, les NPs synthétisées précédemment ont été fonctionnalisées par un copolymère thermosensible P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀). Le procédé de polymérisation utilisé lors de cette étape est fondé sur la polymérisation radicalaire par un transfert d'atomes (ATRP), à travers les activateurs régénérés par un transfert d'électrons (ARGET), connus sous l'acronyme ARGET-ATRP. Le changement du comportement colloïdal du copolymère sous l'effet de la température a été démontré par les analyses DLS. Ce changement de l'état hydrophile à l'état hydrophobe permet aux NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) d'encapsuler la doxorubicine et la libérer à des températures contrôlées. La libération de la DOX en fonction de la température et du temps a été étudiée grâce à l'UV-visible. Ce qui nous a permis de fixer les valeurs LCST de nos NPs et de calculer leur efficacité et le taux de chargement de médicament. Les résultats de ces études ont montrés que nos NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 50nm donnent des valeurs de la DLC et la DLE plus élevées que celles de 22 nm et celles étudiées précédemment dans notre équipe. Dans ce chapitre, nous avons bien réussi à développer des nanovecteurs thermosensibles capable a encapsuler un médicament anticancéreux et le libérer à une température contrôlée.

III. Evaluation biologique des nanovecteurs thermosensibles :

Dans cette troisième partie de thèse, la cytotoxicité des NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22 et 50 nm avec et sans DOX a été étudiée vis-à-vis des cellules cancéreuses de l'ovaire (SKOV-3) en fonction de différentes concentrations de NPs et sous l'effet du temps et de la température (37et 42°C). Les résultats de ces analyses biologiques ont démontré que les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) de 22 et de 50 nm non chargées par le principe actif (DOX) sont des nanovecteurs non ou peu cytotoxiques vis-à-vis des SKOV-3 à des concentrations pouvant atteindre les 50µg.mL⁻¹ . La cytotoxicité de ces nanovecteurs augmente une fois chargés par la DOX à 42°C et elles présentent une cytotoxicité plus élevée vis-à-vis des SKOV-3 comparativement à la DOX libre. Ces analyses prouvent l'efficacité du traitement des cellules cancéreuses par la libération de la DOX encapsulée dans les NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) par rapport à la DOX libre.

IV. Etude des performances thérapeutiques de la vectorisation des NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) modifiées par l'acide folique :

Dans ce dernier chapitre, la surface des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) a été modifiée par l'acide folique au bout des chaînes du copolymère P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) greffé sur la surface des NPs Zn_{0,4}Fe_{2,6}O₄@ MnFe₂O₄ dans le but de cibler les cellules cancéreuses. La modification de surface de ces NPs par l'AF a été confirmée par la spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier. Les analyses de cytotoxicité des NPs P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀ @AF ont montré une bonne viabilité cellulaire vis-à-vis des SKOV-3 après 24 et 72h. Cette viabilité diminue lorsque les cellules sont traitées par les nanovecteurs chargés en DOX. Les analyses d'internalisation de ces nanovecteurs n'ont pas pu être finalisées pour ce chapitre de thèse à cause du temps limité de la thèse mais l'efficacité de l'internalisation à l'aide de l'acide folique a été déjà prouvée dans des travaux précédents de notre équipe de recherche.

Perspectives

L'objectif principal de ce projet de thèse se concentre sur la libération du médicament anticancéreux (DOX) via des NPs thermosensibles type cœur /coquille à base d'oxyde de fer. La vectorisation de la DOX a été réalisée en deux étapes complémentaires . En premier lieu, nous nous sommes concentrés sur la synthèse d'un nouveau type de NPs à base d'oxyde de fer dopées avec du zinc et du manganèse, leurs caractérisations physico-chimique ainsi que leur fonctionnalisation par un copolymère thermosensibles. La deuxième étape consiste à charger les NPs élaborées dans la première étape par la DOX et étudier la libération de cette dernière en fonction de la température et du temps. La toxicité de ces NPs a été évaluée in vitro grâce aux cellules SKOV-3.

Les résultats de cette étude nous a permis d'envisager des perspectives qui suivent ce projet de recherche afin de le compléter.

- Les résultats préliminaires des NPs @ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) -AF chargées en DOX nous encourage à étudier l'internalisation de ces NPs et quantifier le pourcentage de la DOX libérée.
- Une autre molécule de greffage sera greffée sur la surface des NPs@ P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀) (Pph³⁺ : triphénylphosphonium) pour un ciblage mitochondriale.
- l'insertion d'une deuxième drogue 5-Fluoro-Uracile (5-FU) : la stabilité et le taux du chargement en drogue des NPs seront caractérisés.
- Des études in vitro de ces nouvelles formulations seront réalisées qui visent à évaluer l'activité cytotoxique, à inhiber les résistances et à définir le taux d'internalisation.
- Ces études nous permettront de sélectionner des formulations qui présenteront une meilleure stabilité dans le milieu biologique, une activité cytotoxique plus efficace, une internalisation plus importante et une inhibition complète des résistances. Ces formulations seront analysées sur des systèmes micro-fluidiques et in-vivo.

Résumé : Les nanoparticules cœur/coquille offrent des applications prometteuses en nanomédecine en raison de leur multifonctionnalité. Une attention particulière a été accordée aux nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIONs) type cœur/coquille pour le traitement ciblé du cancer. La conception des nanoparticules développées dans ce travail de thèse est basée sur la polymérisation contrôlée initiée en surface de monomères à la surface d'un cœur à base d'oxyde de fer. Ces nouveaux nanomatériaux peuvent tirer parti des propriétés physiques du noyau et des propriétés macromoléculaires de l'enveloppe réactive (un copolymère réactif a été développé à partir de notre procédé). Ces nanomatériaux intelligents sont alors capables de transporter un médicament anticancéreux et de le délivrer à température contrôlée dans l'environnement physiologique à proximité du site tumoral. Les nanomatériaux finaux peuvent alors combiner l'hyperthermie et la chimiothérapie. Dans ce travail, différentes tailles de nanoparticules cœur/coquille d'oxyde de fer dopées au zinc et au manganèse ($Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4 @ MnFe_2O_4$) avec une morphologie cubique ont été synthétisées par décomposition thermique et fonctionnalisées par un copolymère thermosensible à base de (2- (méthoxy éthoxy)méthacrylate d'éthyle/méthacrylate d'éthylène glycol (MEO₂MA/OEGMA). Pour induire le ciblage du cancer et l'internalisation des nanoparticules vers les cellules cancéreuses, les nanoparticules synthétisées ont été fonctionnalisées avec l'acide folique, puisque ces cellules surexpriment les récepteurs qui se lient au folate $\alpha 3$. Dans ce travail nous présenterons nos résultats récents sur les nouveaux nanomatériaux que nous développons et leur caractérisation complète.

Mots-clés : Nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétiques (SPIONs), P(MEO₂MA-OEGMA), doxorubicine (DOX), délivrance du médicament, hyperthermie magnétique, acide folique, SKOV-3.

Abstract : Core/shell nanoparticles offer promising applications in nanomedicine due to their multifunctionality. Particular attention has been given to superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) core/shell type for the targeted treatment of cancer. The design of the nanoparticles developed in this thesis work is based on the surface-initiated controlled polymerization of monomers of an iron oxide-based core. These new nanomaterials can take advantage of the physical properties of the core and the macromolecular properties of the reactive envelope (a reactive potential has been developed from our process). These smart nanomaterials are then able to transport an anti-cancer drug and deliver it at a controlled temperature in the physiological environment near the tumor site. The final nanomaterials can then combine hyperthermia and chemotherapy. In this work, various sizes of core/shell nanoparticles of iron oxide doped with zinc and manganese ($Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4 @ MnFe_2O_4$) with a cubic morphology were synthesized by thermal decomposition and functionalized by a heat-sensitive associate based on of (2-(methoxy ethoxy)ethyl methacrylate/ethylene glycol methacrylate (MEO₂MA/OEGMA)). To induce cancer targeting and internalization of nanoparticles to cancer cells, the synthesized nanoparticles were functionalized with folic acid, since these cells overexpress receptors that bind folate $\alpha 3$. In this work, we present our recent results on the new nanomaterials we develop and their complete characterizations.

Keywords: Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs), P(MEO₂MA-OEGMA), Doxorubicin (DOX), drug delivery, magnetic hyperthermia, folic acid, SKOV-3.

Annexes

Annexe 1 : Techniques de caractérisations

A.1.1 Diffraction des rayons X (DRX) :

La diffraction des rayons X est une technique polyvalente non-destructive utilisée pour l'analyse quantitative et qualitative des matériaux cristallins. Elle définit la structure cristalline des solides, la distance entre les plans qui forment le solide, la texture, la déformation, l'orientation des monocristaux et du poly cristallins ainsi que l'épaisseur de films.

Cette technique est décrite par la loi de Bragg (**Equation 1**) :

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (1)$$

Avec :

n : un entier

λ : la longueur d'onde de la lumière incidente,

d : la distance entre les plans atomiques,

θ : l'angle d'incidence,

Lorsque la loi de Bragg est satisfaite, une interférence constructive survient. La différence de la longueur $A+B$ est égale à un nombre entier (n) d'oscillations de l'onde lumineuse^{1,2} (**Figure1**).

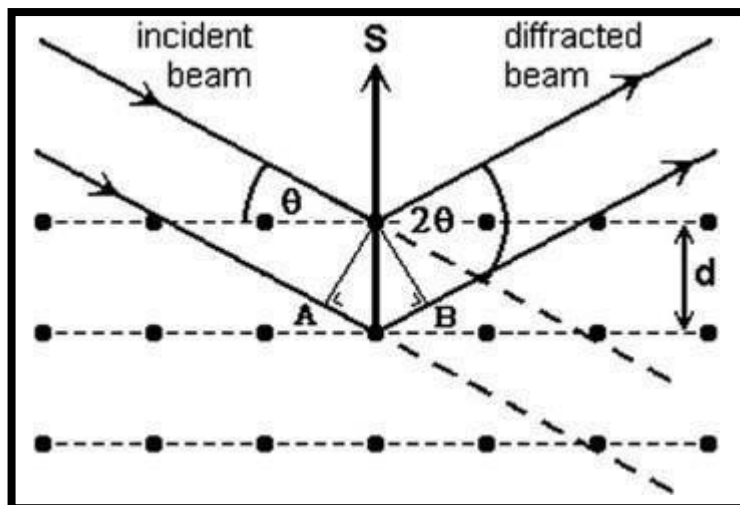


Figure 1 : Illustration schématique de la DRX lorsque la loi de Bragg est satisfaite².

Le diffractomètre utilisé pour la caractérisation de nos nanoparticules est un PHILIPS PANalytical X'Pert Pro MPD (**Figure 2**).



Figure 2 : Diffractomètre PHILIPS PANalytical X'Pert Pro MPD.

A.1.2 Spectroscopie Mössbauer :

La spectroscopie Mössbauer est une méthode de spectroscopie basée sur l'absorption des rayons gamma par les noyaux atomiques dans un solide. Elle permet de déterminer le degré d'oxydation d'un élément chimique par la mesure des transitions entre les niveaux d'énergie de ces noyaux³.

Un spectromètre Mössbauer est constitué principalement d'une source de rayons , un collimateur et un détecteur (**figure 3**).

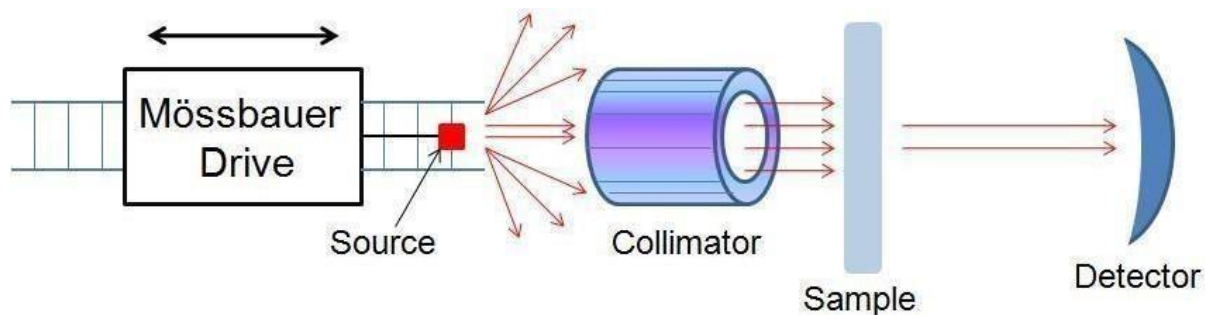


Figure 3 : Schéma d'un spectromètre Mössbauer⁴

Un échantillon solide est exposé à des rayons gamma. L'intensité du signal des rayons est transmise à travers l'échantillon est mesurée par un détecteur. Dans le spectromètre Mössbauer, le collimateur permet d'obtenir un faisceau de rayons de lumière parallèle à partir de la source. Les atomes de la source émettrice doivent être du même isotope que dans l'échantillon par exemple pour le fer 57, on utilise une source au cobalt 57, qui produit par capture électronique un noyau de fer 57 dans un état excité⁵.

Le spectromètre Mössbauer utilisé dans notre étude est un appareil home made (**Figure 4**)



Figure 4 : Montage Mössbauer

A.1.3 Spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier (IRTF) :

La spectroscopie Infra rouge à transformée de Fourier est une méthode qualitative pour la caractérisation physico-chimique des matériaux. Cette technique permet la détermination de la nature chimique d'un matériaux en identifiant ses liaisons chimiques qui sont présentés sous forme de bandes d'absorption dans le spectre infra rouge⁶. Le principe de cette technique est basé sur la mesure de la quantité de la lumière absorbée par un échantillon en fonction de la longueur d'onde. Lorsque l'énergie du faisceau est proche de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière absorbe un rayonnement ce qui va diminuer l'intensité transmise du faisceau⁷. Le domaine infra-rouge entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} ($2.5 - 25\ \mu\text{m}$) correspond aux domaines d'énergies de la vibration des molécules. Conçu par Michelson, l'interféromètre de Michelson pour la spectroscopie infra-rouge se compose de deux miroirs perpendiculaires l'un à l'autre et un séparateur de faisceau qui fait un angle de 45° avec les miroirs⁸ (**Figure 5**).

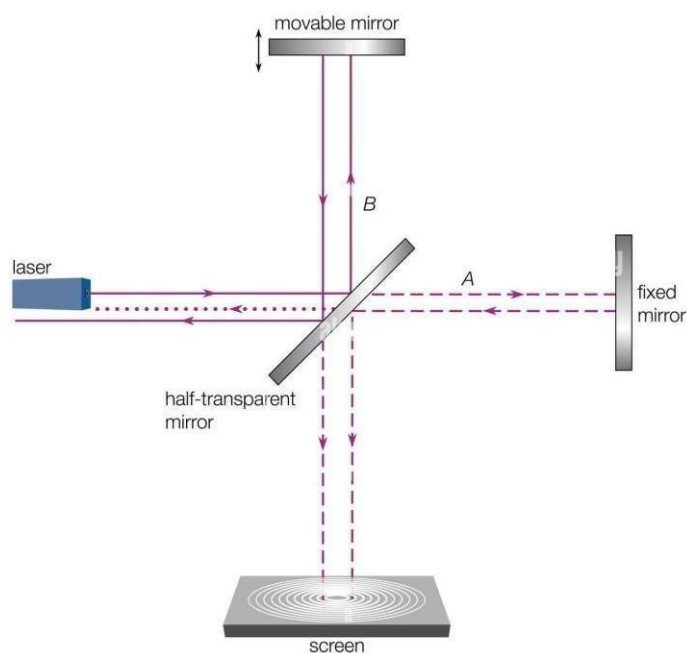


Figure 5 : Interféromètre de Michelson conçu pour la spectroscopie infra-rouge⁹.

Un miroir est fixé dans une position stationnaire et l'autre peut être déplacé dans une direction perpendiculaire à sa surface frontale à une vitesse constante. Entre le miroir fixe et le miroir mobile se trouve un séparateur de faisceau, qui divise la lumière entrante de la source, C'est-à-dire 50 % est transmise et 50 % est réfléchi.

La **figure 6** représente le spectrophotomètre utilisé pour la caractérisation de nos échantillons.



Figure 6 : Spectrophotomètre infra-rouge à transformée de Fourier.

A.1.4 Spectromètre d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES) :

L'ICP-OES est une méthode qui consiste à analyser un échantillon par la spectrométrie optique de photons générés par un plasma à couplage inductif. Elle consiste à ioniser l'échantillon en l'injectant dans un plasma d'argon ou d'hélium afin de transformer les atomes de la matière en ions par une flamme chaude qui peut atteindre les 8000K. Elle permet une détection de l'ordre du $\mu\text{g/L}$ en phase dissoute et en mg/kg en phase solide. Lors d'une analyse ICP, le plasma est généré dans une torche située à l'intérieur de l'inducteur. La torche permet la formation d'un plasma stable et évite la formation d'un arc pour pouvoir introduire l'échantillon. L'échantillon est injecté via l'injecteur sous forme d'un aérosol liquide directement au cœur du plasma. L'échantillon se transforme en aérosol par un nébuliseur¹⁰. L'émission des photons qui sont caractéristiques à l'échantillon se fait grâce à la désexcitation des espèces présentes dans le plasma. Ces photons sont ensuite triés par un spectromètre et détectés.

L'ICP-OES utilisé pour la caractérisation des NPs lors ce travail de thèse est un Perkin Elmer Avio 200 (**Figure 7**).

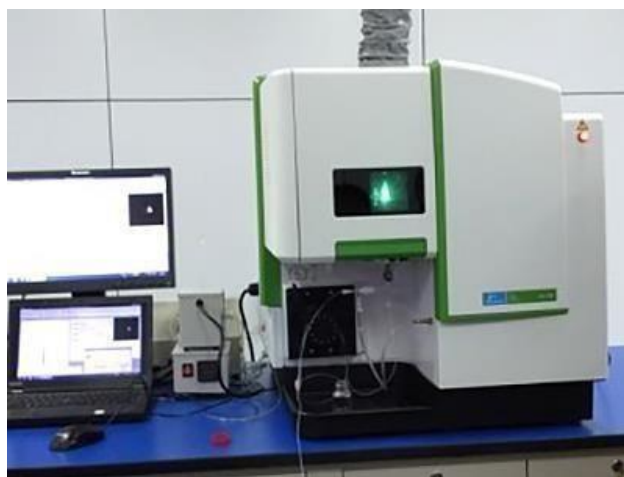


Figure 7 : Perkin Elmer Avio 200- ICP-OES

A.1.5 Analyse thermogravimétrique (ATG) :

L'analyse thermogravimétrique est une technique d'analyse thermique quantitative utilisée pour la mesure de la perte de masse des matériaux et leurs décompositions, la perte des solvant, d'humidité ainsi que l'oxydation des substances. Elle enregistre la masse d'un échantillon à partir d'une masse de 1mg à plusieurs grammes sous l'effet de la température qui peut augmenter jusqu'au 1600°C sous un flux de gaz. Quand la température augmente, la masse de l'échantillon diminue ce qui explique sa décomposition , l'évaporation des composés volatils ou bien la dégradation de son état d'oxydation.

L'appareil de l'ATG se compose d'un plateau d'échantillon qui est le creuset (en platine ou en alumine). Ce dernier est soutenu par une balance de précision, mit dans un four et chauffé et refroidi pendant l'expérience. La masse de l'échantillon est enregistrée pendant l'expérience en fonction de la température ou du temps en présence d'un gaz. Ce gaz peut être soit l'argon, l'azote ou les deux à la fois (**figure 8**).

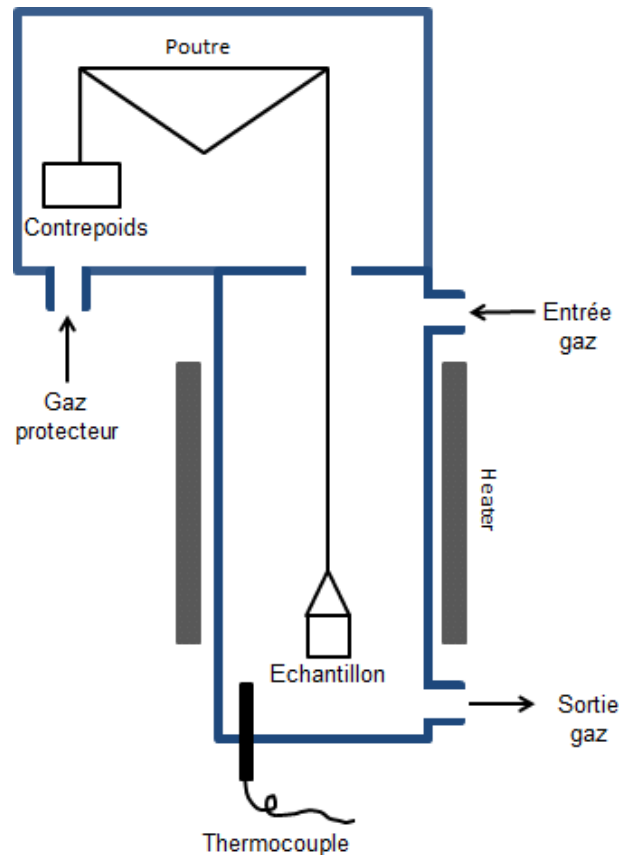


Figure 8 : Montage intérieur d'un appareil ATG

Les analyses ATG ont été réalisées avec un Setaram Setsys évolution 1750 (**figure 9**).



Figure 9 : Appareil ATG Setaram Setsys évolution 1750

A.1.6 Spectroscopie UV- visible (UV-vis) :

La spectroscopie UV-visible permet de déterminer la concentration de soluté dans une solution à partir de son absorbance ou de sa transmittance. Lorsqu'un champ électromagnétique traverse une solution, l'énergie portée par les photons excite les électrons des molécules en solution. Il s'agit d'une transition électronique : les électrons vont sur des orbitales plus hautes en énergie (**figure 10**). La différence d'énergie entre les niveaux est liée à la longueur d'onde d'absorption par la dualité onde-corpuscule de De Broglie :

$$\Delta E = \frac{h.c}{\lambda} \quad (2)$$

Avec :

ΔE : la différence d'énergie (J ou eV)

$h = 6,626.10^{-34}$ J.s la constante de Planck

$c = 3.10^8$ m.s⁻¹ la vitesse de la lumière

λ : la longueur d'onde (m)

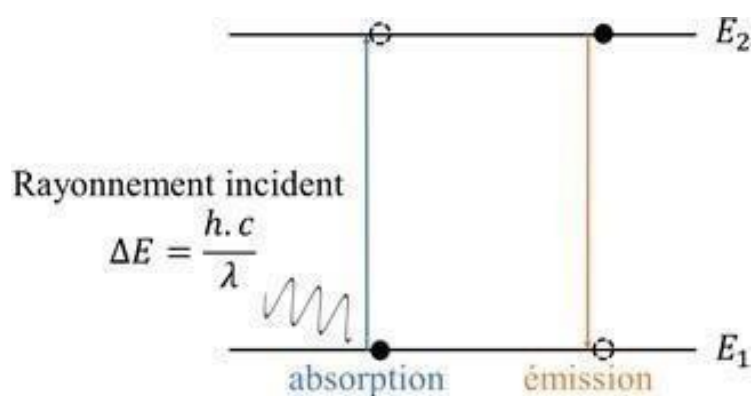


Figure 10 : Principe de la spectroscopie UV-visible

Pour des ΔE comprises entre 1 eV et 10 eV, il s'agit de transitions électroniques et les longueurs d'ondes correspondantes sont dans le domaine spectral UV-visible, soit entre 300 nm et 800 nm.

En spectroscopie UV-vis, la transmittance T de la solution est mesurée. Il s'agit du rapport entre l'intensité de la lumière transmise notée I et l'intensité de la lumière incidente (I_0).

$$\text{On note : } T = \frac{I}{I_0}$$

L'absorbance est définie par : $A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \log T$

La relation entre l'absorbance A et la concentration C est donnée par la loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

Avec :

ϵ : le coefficient d'absorption molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) ;

l : l'épaisseur de solution traversée (cm) ;

C : la concentration molaire en soluté ($mol \cdot L^{-1}$).

Un spectromètre UV-vis permet de tracer l'absorbance A ou la transmittance T en fonction de la longueur d'onde du rayonnement électromagnétique λ . Mesurer l'absorbance à λ_{max} pour différentes concentrations connues permet de tracer une droite d'étalonnage. Cette droite sert ensuite à calculer des concentrations inconnues de solutions contenant le même soluté, connaissant leur absorbance. En effet la concentration C est directement proportionnelle à l'absorbance A .

Le spectrophotomètre UV-visible utilisé lors de notre étude vient de chez Agilent technologie. Il est représenté dans la **figure 11**.



Figure 11 : Spectrophotomètre UV-visible

A.1.7 Diffusion dynamique de la lumière (DLS) :

La diffusion dynamique de la lumière est une technique d'analyse spectroscopique qui consiste à envoyer un faisceau lumineux à travers un échantillon et à décrire le profil de distribution de taille de petites particules au sein d'une solution en mesurant l'intensité i de la lumière diffusée (**figure 12**). Cette dernière provient des propriétés optiques de l'échantillon mesuré. Les propriétés optiques d'ensemble d'un mélange est défini par son indice de réfraction. Le rayon hydrodynamique R_H des particules est mesuré en analysant le coefficient de la diffusion en translation à partir de l'équation de la loi de Stocke-Einstein (**équation**) :

$$R_H = \frac{K_B T}{6M \eta_s D_0}$$

R_H : rayon hydrodynamique (nm),

T : température (K),

D_0 : coefficient de la diffusion en translation (m^2 / s),

η_s : viscosité du solvant (kg / m^2),

K : constante du Boltzmann.

Lors de la mesure DLS, différents facteurs peuvent influencer le mouvement brownien des nanoparticules qui pourra modifier par la suite la taille apparente des NPs, comme la concentration des NPs dans le milieu , la force ionique du milieu utilisée pour l'analyse, la forme

des NPs et leur surface comme ils peuvent influencer la taille du copolymère greffé sur la surface des NPs et modifier sa taille de plusieurs nanomètres¹¹.

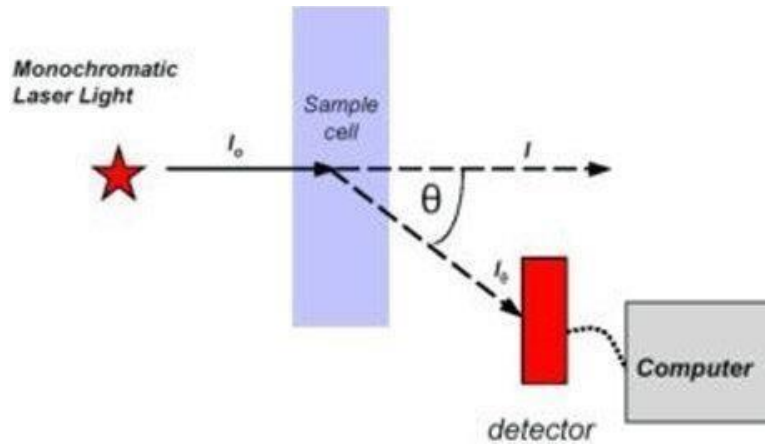


Figure 12 : Schéma représentatif de la DLS.

Lorsque la lumière du laser traverse les nanoparticules en solution dans la cuvette, elle diffuse dans toutes les directions. L'intensité de la lumière diffusée par les particules peut être mesurée à différents angles ou à un angle fixe (90° typiquement). Le mouvement Brownien des particules dans le milieu est dû à l'agitation thermique. L'intensité de la lumière diffusée à chaque point au fil du temps est mesurée par un corrélateur automatique. La variation de la taille des particules obtenue lors de l'analyse se présente par un graphique en fonction de l'intensité de la lumière diffusée.

Les mesures de diffusion de la lumière ont été effectuées à l'aide d'un ALV/ CGS-3 système de goniomètre compact (**Figure 13**), équipé d'un corrélateur numérique tau multiple ALV- 7004 et un laser He-Ne optimisé d'une puissance de sortie de 22 mW fonctionnant à une longueur $\lambda = 632,8$ nm.



Figure 13 : Goniomètre compact ALV / CGS-3

A.1.8 Microscope électronique en transmission à haute résolution (MET-HR) :

Le microscope électronique en transmission est un instrument particulièrement important pour l'étude structurale locale des matériaux à l'échelle de quelques nanomètres en microscopie à moyenne résolution et de quelques dixièmes de nanomètres en microscopie en haute résolution. Il est basé sur le principe de la diffraction des électrons et pouvant atteindre le matériau analysé peut-être visualisé à l'échelle atomique puisque il est possible d'atteindre des résolutions spatiales de 0,1 à 0,2nm. Il est utilisé pour avoir en particulier des informations sur les défauts, limites des grains, la taille, la forme, la composition chimique...

Dans un MET, l'échantillon en solution est déposé sur une grille de carbone de 3mm de diamètre . La grille est mise dans un porte échantillon de l'appareil. Ce dernier est introduit dans la colonne du microscope pour l'analyse.

En mode imagerie, ce sont les électrons transmis à travers l'échantillon qui sont analysés. Leur longueur d'onde λ est de l'ordre du picomètre. Ces électrons sont accélérés dans la colonne sous le vide de $W : 10^{-3}-10^{-4}$ Pa, LaB6 : $10^{-5}-10^{-6}$ Pa à une tension d'accélération qui varient entre 100 et 300Kv. Ce qui produit des électrons avec une longueur d'onde entre $3,7 \cdot 10^{-3}$ nm et $1,97 \cdot 10^{-3}$ nm¹². Les électrons émis par la source (canon à électrons (**figure 14**)) sont focalisés et condensés à l'aide d'un système de lentilles électromagnétiques. La largeur du faisceau est définie par le plan focal choisie qui influence l'éclairage de l'objet. Une lentille magnétique est

sous forme d'une bobine parcourue par un courant. Ce courant peut être de plusieurs ampères et nécessitent d'être refroidies afin d'assurer la stabilité de l'appareil ainsi que la qualité des images. L'eau de refroidissement provient d'un circuit d'eau thermostaté. L'avantage de ces lentilles se présente dans le changement de la focalisation en changeant le courant qui passe dans les bobines. En modifiant la focalisation de projection de ces lentilles, on pourra travailler soit avec le mode d'imagerie ou le mode de diffraction. Ces deux modes sont les deux principaux modes de fonctionnement d'un MET. Dans le mode image, Le faisceau électronique interagit avec l'échantillon selon sa nature (épaisseur, densité ou composition chimique) ce qui conduit à la formation d'une image contrastée. On pourra observer cette image dans la zone d'observation en plaçant le détecteur dans la plan image. Dans le mode de diffraction, C'est le comportement ondulatoire des électrons qui est exploité. Lorsque le faisceau traverse un échantillon cristallisé, il est diffracté ce qui révèle des informations sur sa structure cristalline.

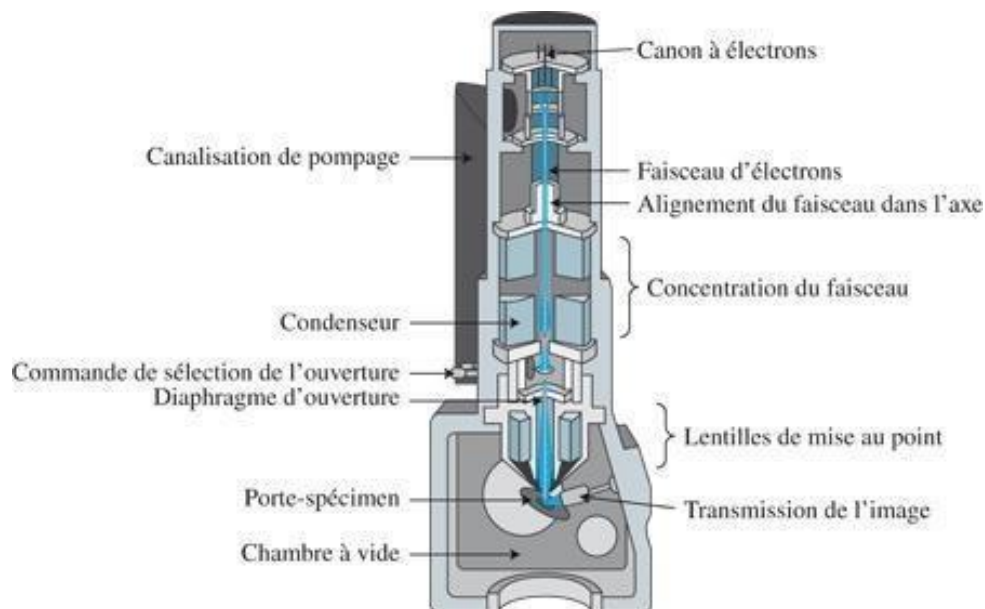


Figure 14 : Schéma représentatif d'un microscope électronique en transmission

Les images des nanoparticules ont été obtenues par un CM200 TEM de Philips avec une tension d'accélération de 200 kV, une résolution ponctuelle d'environ 0,27 nm et un grossissement de $\times 50\,000$ à $\times 750\,000$ (**Figure 15 (a)**). Les images de la haute résolution ont été réalisées sur un microscope FEG froid JEOL JEM - ARM 200F fonctionnant à 200 kV et équipé d'un correcteur de sonde d'aberration sphérique (cs). Les compositions chimiques ont été déterminées par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDXS). Les cartes X ont été enregistrées sur un spectromètre Jeol (SDD, Jeol DRY SD 30 GV) (**Figure 15 (b)**).

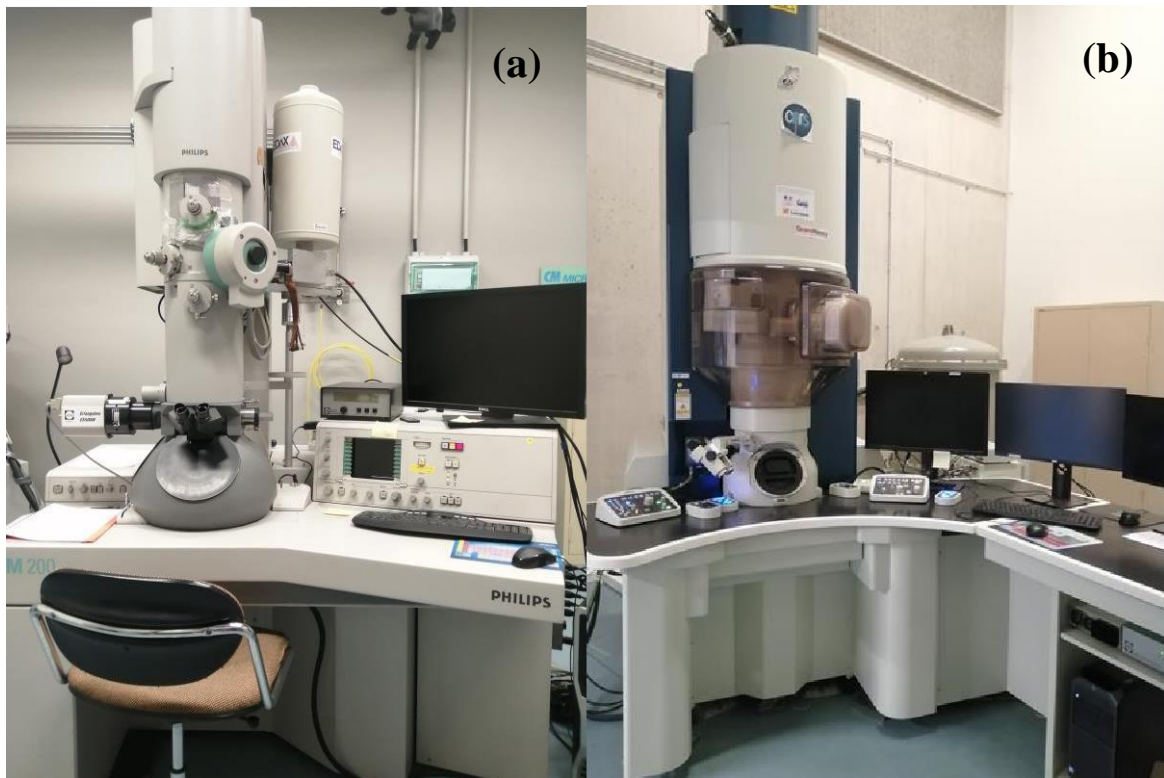


Figure 15 : (a) MET Philips CM200. (b) MET-HR JEOL JEM - ARM 200F.

A.1.9 Dispositif supraconducteur d'interférence quantique (SQUID) :

Un SQUID (Superconducting Quantum Interference Device en anglais) est un dispositif très sensible pour mesurer les champs magnétiques faibles. Il est capable de mesurer des champs magnétiques aussi faibles que 5 aT (5×10^{-18} T). Il est constitué d'une bobine de champ permettant d'appliquer un champ constant de 5 à 7 Tesla sur l'échantillon. Cette bobine est capable de détecter les changements de flux magnétique dans l'échantillon en fonction du champs magnétique appliqué. Le contrôle de la température de l'échantillon est possible de 5K à 400K (avec des extensions à 2K et 1000K)¹³. Il combine deux propriétés de la supraconductivité : l'effet tunnel des paires de Cooper à travers un milieu non supraconducteur (l'effet Josephson) et la quantification de flux dans une boucle supraconductrice¹⁴. L'inconvénient initial d'utiliser un magnétomètre SQUID est le coût de fonctionnement de l'instrument ainsi que la durée d'analyse. Typiquement un seul balayage de température ou d'intensité de champ peut prendre plusieurs heures, ce qui entraîne la consommation d'une grande quantité d'hélium liquide¹⁵.

Les mesures du magnétisme des NPs ont été réalisées à l'aide d'un magnétomètre MPMS3 Squid produit par « Quantum design » (**Figure 16**).



Figure 16 : Magnétomètre MPMS3 Squid de « Quantum design ».

A.1.10 Vibrating magnetometer sample (VSM) :

Un VSM est un magnétomètre qui mesure les propriétés magnétiques sur la base de la loi d'induction de Faraday. Il détecte les changements dans le flux magnétique du matériau de l'échantillon. L'échantillon est monté sur une tige qui est attachée à un oscillateur dans une région d'espace entre deux pôles d'un grand électroaimant. Un champ magnétique est appliqué à l'échantillon au moyen de ce dernier et un flux magnétique est généré dans l'échantillon. L'échantillon est ensuite mis en vibration à une fréquence définie et une force électromotrice (EMF) est induite dans des bobines de détection situées sur les pôles de l'électroaimant. Ce signal est finalement traité pour déterminer la réponse magnétique de l'échantillon¹⁶. Un simple VSM fonctionne dans la plage de température de 4,2 K à 1 273 K, mais il existe également des VSM cryogéniques qui peuvent fonctionner à des températures aussi basses que 1,6 K . Les électroaimants utilisés dans les VSM peuvent généralement générer des champs jusqu'à environ 3,5 T¹⁷.

Le VSM utilisé lors de travail de thèse pour les mesures magnétiques des NPs est un VSM de chez Microsense (**Figure 17**).

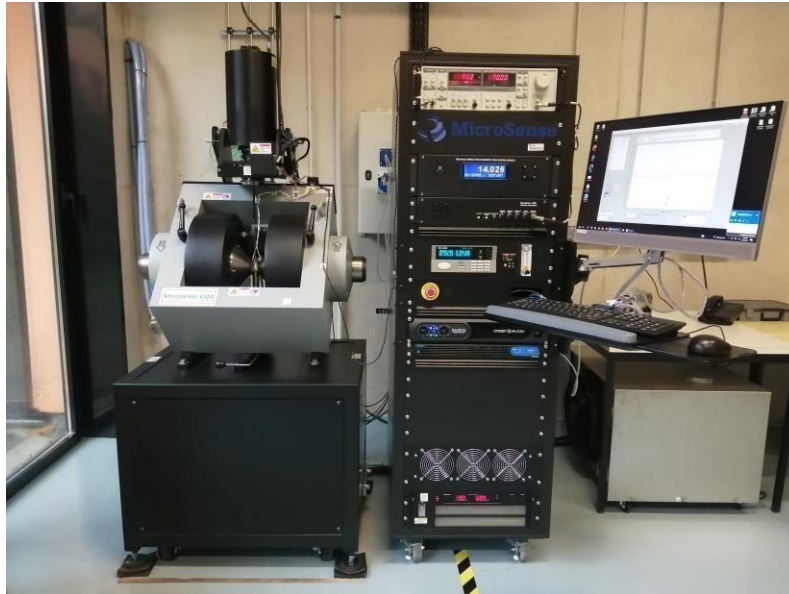


Figure 17 : Magnétomètre VSM de Microsense

Annexe 2 : Synthèses

A.2.1 Centrifugeuse :

Une centrifugeuse est un appareil utilisé pour la séparation des composés d'un mélange en fonction de leur différence de densité (soit deux liquides ou des particules solides en suspension dans un liquide) grâce à une force tournante à grande vitesse.

Dans ce travail de thèse, la centrifugeuse « multifuge X1, thermo scientific » (**figure 18 (a)**) a été utilisée pour séparer les NPs en suspension dans les solvants. La **figure 18 (b)** représente les NPs après la centrifugation.

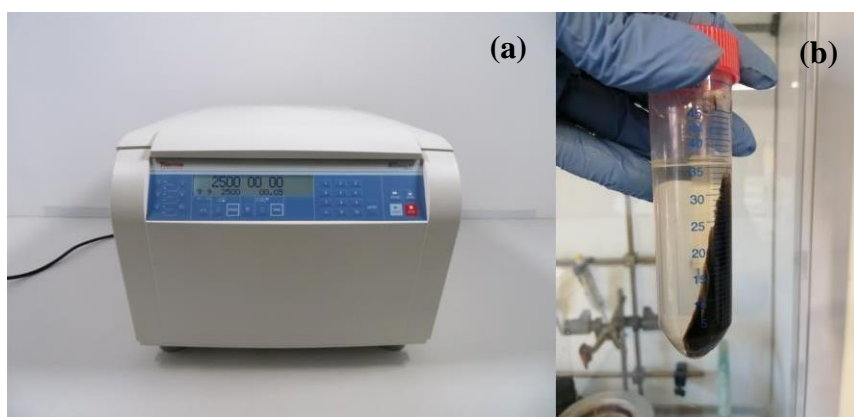


Figure 18: Centrifugeuse multifuge X1, thermo scientific

A.2.2 Modification de l'acide folique (AF) :

La modification de l'AF a été réalisée selon le protocole présenté dans la **figure 19** :

- Une masse de 2g (4,53 mmol) d'AF a été dissoute dans 20mL de DMSO,
- Puis, 1,04 g (5,4 mmol) du chlorhydrate de N- (3-diméthylaminopropyl) -N thylcarbodiimide (EDC) et 0,62 g (5,4 mmol) de N-hydroxysuccinimide (NHS) ont été ajoutés. Le mélange a été agité pendant 3 heures.
- Après 3 heures, 0,71ml (4,53 mmol) de 2-hydroxyéthyl-2bromoisobutyrate ont été injectés dans le mélange et agités pendant 24h,
- Après 24 heures, l' AF modifié a été précipité dans un excès de dichlorométhane et le solide orange résultant a été lavé plusieurs fois avec du dichlorométhane et de l'acétone et séché sous le vide.

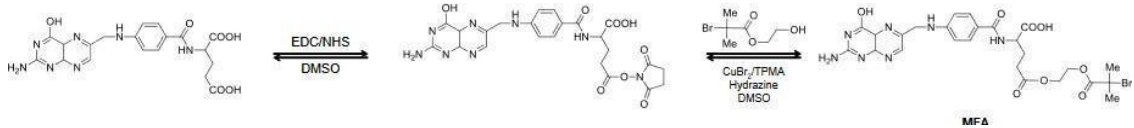


Figure 19 : Synthèse de l'acide folique modifié par l'acide 2-bromoisobutyrate d'hydroxyéthyle

Annexe 3 : Calculs

Dans cet annexe, nous représentons les masses ainsi que les pourcentages théoriques des éléments Fe, Zn, Mn et O qui constituent les NPs $Zn_{0,4}Fe_{2,6}O_4@MnFe_2O_4$ de 10,15,22 et 50nm dans le but de les comparer avec les pourcentages obtenus par l'analyse ICP-OES.

Tableau 1 : Masse globale de chaque élément y compris oxygène dans les $Zn_{0,4}Fe_{2,6}O_4@MnFe_2O_4$ en fonction de la taille des particules

Cœur/coquille	Masses (mg)			
Métaux/taille	10	15	22	50
Fe	$2,50496 \cdot 10^{-24}$	$8,9351 \cdot 10^{-24}$	$3,0416 \cdot 10^{-23}$	$3,75898 \cdot 10^{-22}$
Zn	$7,2782 \cdot 10^{-26}$	$5,8230 \cdot 10^{-25}$	$3,3959 \cdot 10^{-24}$	$5,3062 \cdot 10^{-23}$
Mn	$1,0337 \cdot 10^{-24}$	$2,8059 \cdot 10^{-24}$	$5,6899 \cdot 10^{-24}$	$4,0022 \cdot 10^{-23}$
O	$1.38282 \cdot 10^{-24}$	$4.6951 \cdot 10^{-24}$	$1.49418 \cdot 10^{-23}$	$1.76492 \cdot 10^{-23}$
Masse total	$4,9943 \cdot 10^{-24}$	$1,7017 \cdot 10^{-23}$	$5,4439 \cdot 10^{-23}$	$6,4542 \cdot 10^{-22}$

Tableau 2 : Pourcentage globale de chaque élément y compris oxygène dans les $Zn_{0,4}Fe_{2,6}O_4@MnFe_2O_4$ en fonction de la taille des particules

Cœur/coquille	%			
Métaux/taille	10	15	22	50
Fe	50,15	52,42	55,86	58,23
Zn	1,45	3,42	6,23	8,22
Mn	20,69	16,48	10,45	6,20
O	27,68	27,58	27,44	27,34
% total	100	100	100	100

Tableau 3: Masse globale de chaque élément sans oxygène dans les $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@MnFe_2O_4$ en fonction de la taille des particules

Cœur/coquille	Masses (mg)			
Métaux/taille	10	15	22	50
Fe	$2,50496 \cdot 10^{-24}$	$8,9351 \cdot 10^{-24}$	$3,0416 \cdot 10^{-23}$	$3,75898 \cdot 10^{-22}$
Zn	$7,2782 \cdot 10^{-26}$	$5,8230 \cdot 10^{-25}$	$3,3959 \cdot 10^{-24}$	$5,3062 \cdot 10^{-23}$
Mn	$1,0337 \cdot 10^{-24}$	$2,8059 \cdot 10^{-24}$	$5,6899 \cdot 10^{-24}$	$4,0022 \cdot 10^{-23}$
Masse total	$3,61114 \cdot 10^{-24}$	$1,23233 \cdot 10^{-23}$	$3,95018 \cdot 10^{-23}$	$4,68982 \cdot 10^{-22}$

Tableau 4 : Pourcentage globale de chaque élément sans oxygène dans les $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4@MnFe_2O_4$ en fonction de la taille des particules

Cœur/coquille	%			
Métaux/taille	10	15	22	50
Fe	69,36	72,50	76,99	80,15
Zn	2,015	4,72	8,59	11,31
Mn	28,62	22,76	14,40	8,53
% total	100	100	100	100

Annexe 4 : Courbes d'absorbance et d'étalonnage de la DOX

Cette partie d'annexe représente les courbes d'absorbance et d'étalonnage de la DOX médicale dans les deux milieux : eau et DMEM a différentes températures : ambiante, 37 et 42°C.

- Dans l'eau :

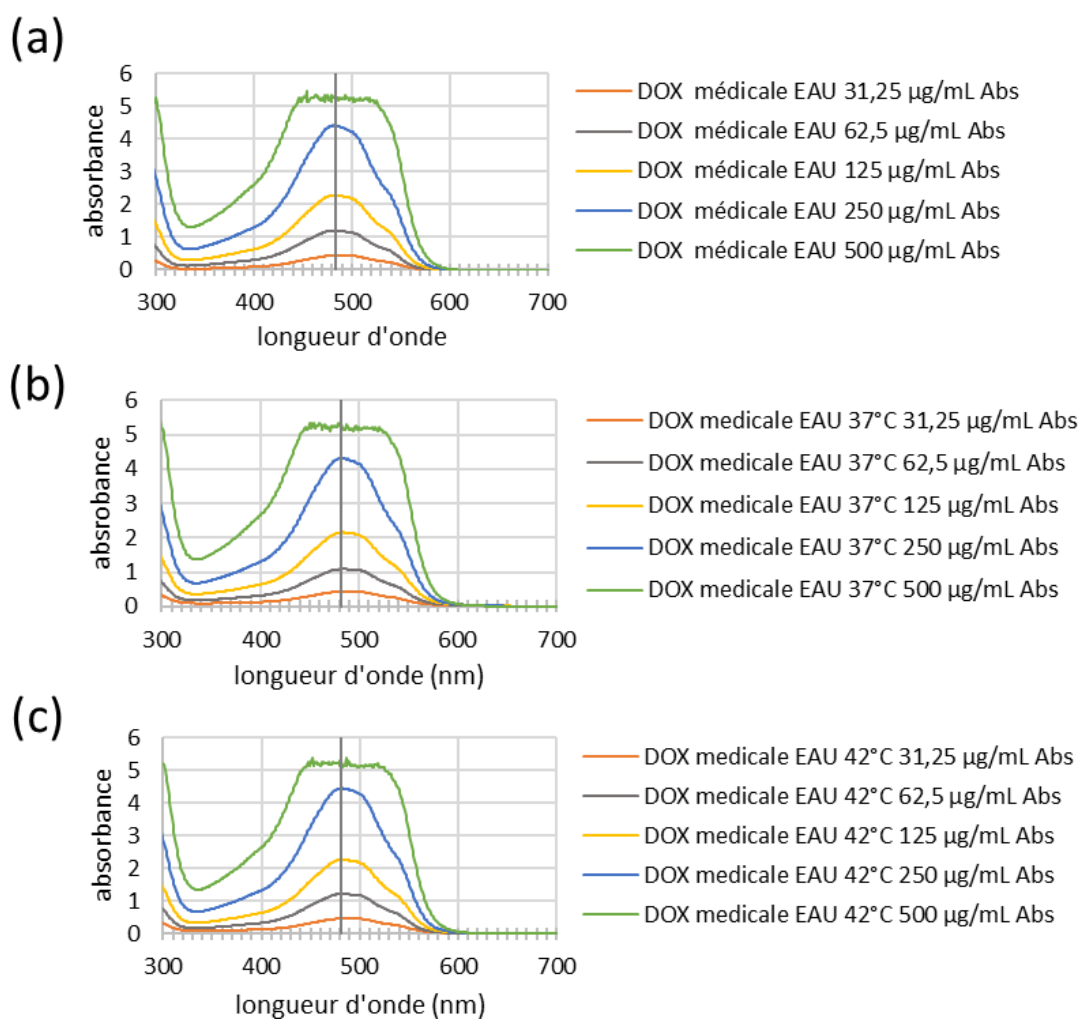


Figure 20 : Absorbance de la DOX médicale dans l'eau à différentes températures : ambiante (a), 37°C (b) et 42°C (c) selon la concentration

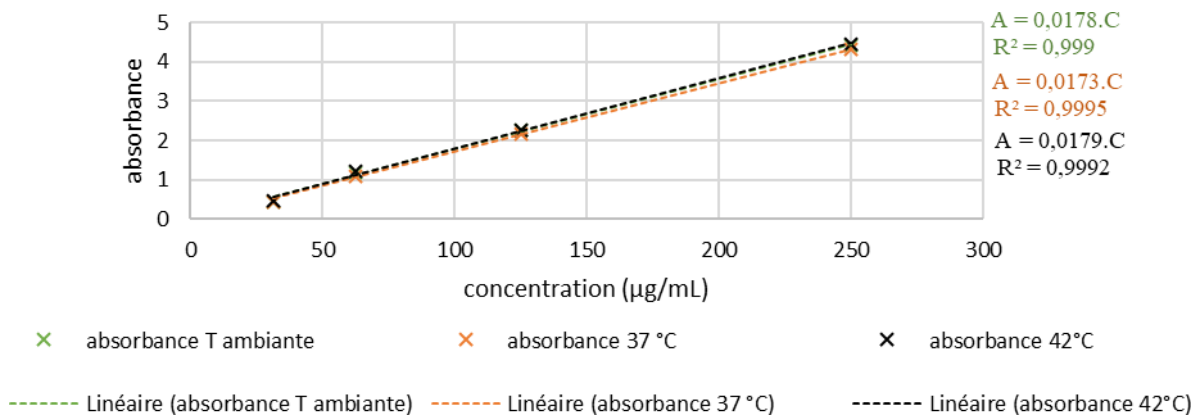


Figure 21 : Courbes d'étalonnage de la DOX dans l'eau selon la température

- Dans le DMEM :

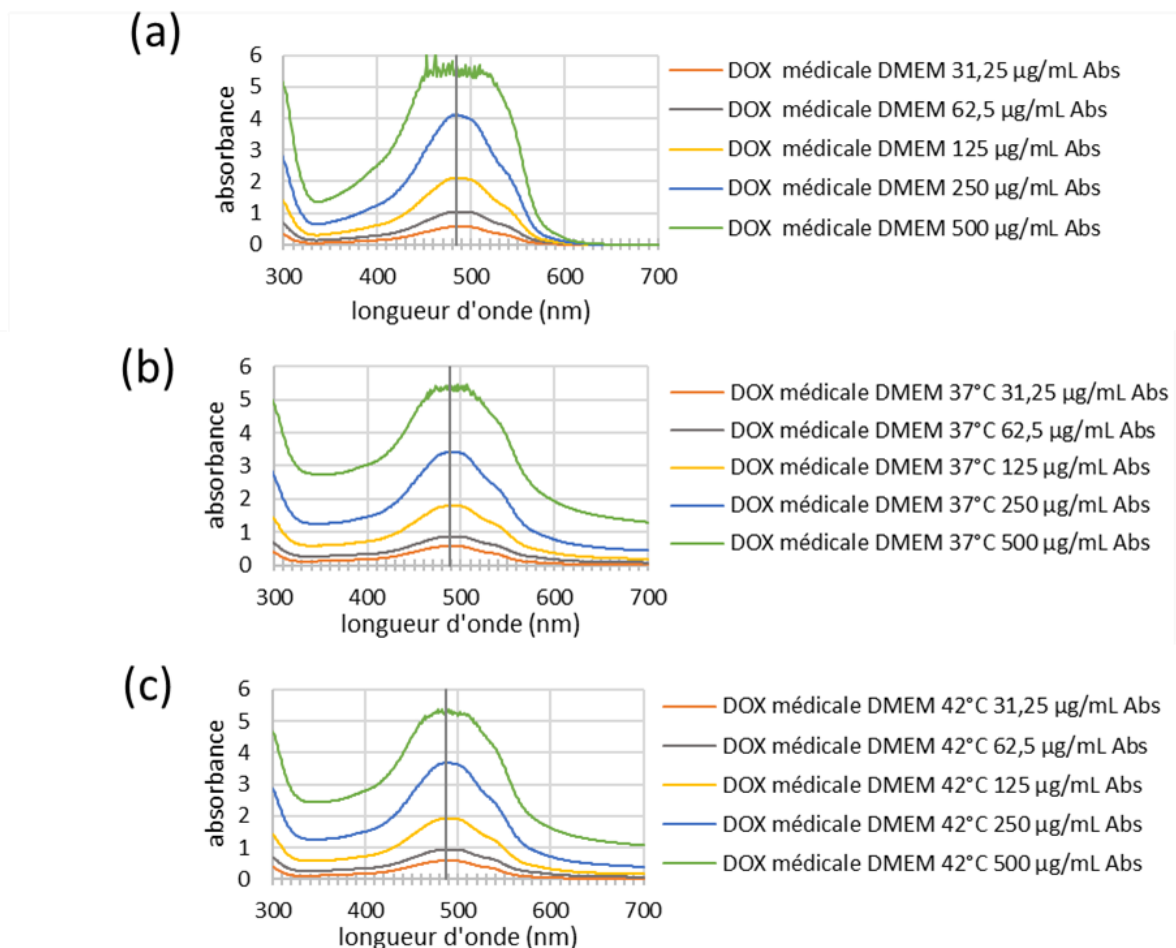


Figure 22 : Absorbance de la DOX médicale dans DMEM à différentes températures : ambiante (a), 37°C (b) et 42°C (c) selon la concentration

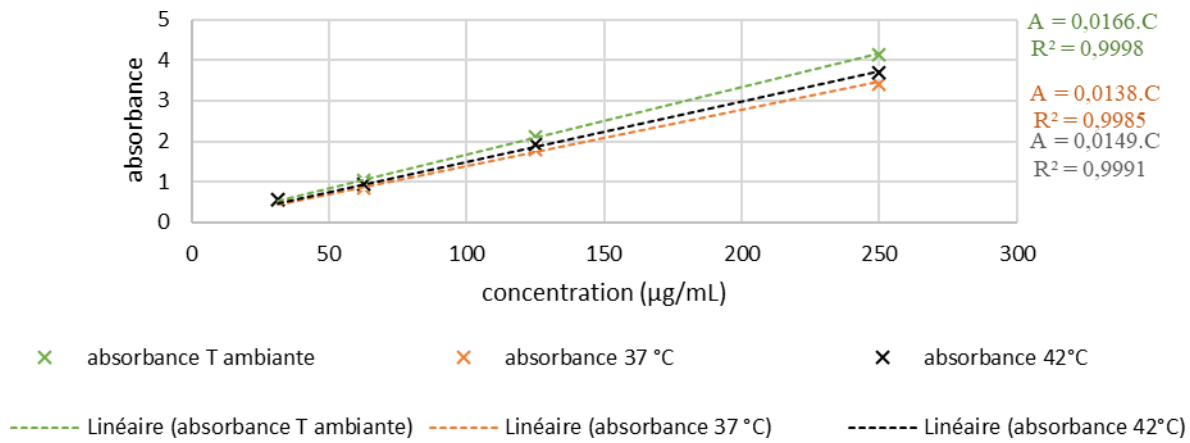


Figure 22 : Courbes d'étalonnage de la DOX dans le DMEM selon la température

Références :

1. Guinebretière R. La diffraction des rayons X sur des échantillons polycristallins. :7.
2. Moram MA, Vickers ME. X-ray diffraction of III-nitrides. *Rep Prog Phys.* 2009;72(3):036502. doi:10.1088/0034-4885/72/3/036502
3. Spectrométrie Mössbauer définition et explications.htm.
4. Spectroscopie Mössbauer — Wikipédia.htm.
5. Longworth G, Window B. The preparation of narrow-line Mossbauer sources of ^{57}Co in metallic matrices. :6.
6. Farcas F, Touzé P. La spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF). Published online 2001:12.
7. Ferjaoui - Synthèse et caractérisation de nanoparticules magn.pdf.
8. Dine EJA. Synthèse et caractérisation des nanoparticules intelligentes. :226.
9. L'interféromètre de Michelson. Lumière, rayonnement électromagnétique, laser Photo Stock - Alamy.txt.
10. Barbier S. ETUDE DES TECHNIQUES DE SPECTROMETRIE DE PLASMA POUR L'ANALYSE.
11. Ferjaoui Z. Synthèse et caractérisation de nanoparticules magnétiques répondantes pour des applications en thérapie cancéreuse. :154.
12. Ihiawakrim D. Etude par les techniques avancées de microscopie électronique en transmission de matériaux fragiles.
13. Fagaly RL. Superconducting quantum interference device instruments and applications. *Rev Sci Instrum.* 2006;77(10):101101. doi:10.1063/1.2354545
14. Cleuziou JP, Wernsdorfer W, Bouchiat V, Ondarçuhu T, Monthieux M. Carbon nanotube superconducting quantum interference device. *Nat Nanotechnol.* 2006;1(1):53-59. doi:10.1038/nano.2006.54
15. Sawicki M, Stefanowicz W, Ney A. Sensitive SQUID magnetometry for studying nanomagnetism. *Semicond Sci Technol.* 2011;26(6):064006. doi:10.1088/0268-1242/26/6/064006
16. Foner S. Versatile and Sensitive Vibrating-Sample Magnetometer. *Rev Sci Instrum.* 1959;30(7):548-557. doi:10.1063/1.1716679
17. Vibrating Sample Magnetometer, Vibrating Sample Magnetometer Manufacturer, Suppliers And Exproters in China.htm.